



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**NANOEMULSÕES CONTENDO FITOL COMO ALTERNATIVA
FARMACOLÓGICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHIMANIOSE CUTÂNEA**

VICTORIA LOUISE PINTO FREIRE

**NATAL-RN
2022**

VICTORIA LOUISE PINTO FREIRE

**NANOEMULSÕES CONTENDO FITOL COMO ALTERNATIVA
FARMACOLÓGICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHIMANIOSE CUTÂNEA**

Dissertação de mestrado apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, como parte do requisito para a obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Arnobio Antônio da Silva Junior

Coorientador: Marcelo Sousa Silva

**NATAL-RN
2023**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

Sistema de Bibliotecas - SISBI

Catálogo de Publicação na Fonte. UFRN - Biblioteca Setorial do Centro Ciências da Saúde - CCS

Freire, Victoria Louise Pinto

Nanoemulsões contendo fitol como alternativa farmacológica para o tratamento da leishmaniose cutânea / Victoria Louise Pinto Freire. - 2023.

68p.: il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Natal, RN, 2023.

Orientador: Arnóbio Antonio da Silva Júnior.

Coorientador: Marcelo Sousa Silva.

1. Leishmaniose cutânea - Dissertação. 2. Nanoemulsão - Dissertação. 3. Fitól - Dissertação. I. Silva Júnior, Arnóbio Antonio da. II. Silva, Marcelo Sousa. III. Título.

RN/UF/BSCCS

CDU 616.993.161

NANOEMULSÕES CONTENDO FITOL COMO ALTERNATIVA FARMACOLÓGICA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Arnóbio Antônio da Silva Júnior
Presidente – UFRN

Prof. Dr. Marcelo de Sousa da Silva
Coorientador – UFRN

Dr. Douglas Dourado Oliveira
Examinador Externo – Fiocruz/PE

Prof. Dr. Valter Ferreira de Andrade Neto
Examinador Interno – UFRN

Dr. Ednaldo Gomes do Nascimento
Examinador Interno – UFRN

Natal, 12 de dezembro de 2022



Emitido em 12/12/2022

DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO Nº 18/2022 - PPGCF/CCS (15.27)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 15/12/2022 17:31)

ARNOBIO ANTONIO DA SILVA JUNIOR

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DFARM/CCS (15.13)

Matricula: ###398#0

(Assinado digitalmente em 14/12/2022 17:09)

EDNALDO GOMES DO NASCIMENTO

TECNICO DE LABORATORIO AREA

DFARM/CCS (15.13)

Matricula: ###318#8

(Assinado digitalmente em 15/12/2022 12:27)

MARCELO DE SOUSA DA SILVA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DACT/CCS (15.09)

Matricula: ###758#0

(Assinado digitalmente em 15/12/2022 14:25)

VALTER FERREIRA DE ANDRADE NETO

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DMP/CB (17.13)

Matricula: ###131#6

(Assinado digitalmente em 14/12/2022 17:04)

DOUGLAS DOURADO

ASSINANTE EXTERNO

CPF: ###.###.445-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrn.br/documentos/> informando seu número: **18**, ano: **2022**, tipo: **DOCUMENTOS DE ACEITAÇÃO**, data de emissão: **14/12/2022** e o código de verificação: **cce5e36e45**

*Dedico esta dissertação a minha avó Maria Lucia
que sempre foi meu maior exemplo de professora
e cientista.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, quero agradecer a Deus por todas as oportunidades colocadas em minha vida e ser minha fonte de força, fé e me amparar nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Shirley, que é o meu bem mais precioso e hoje é meu anjo da guarda que ora, cuida e me guia lá do céu. Ela sempre foi meu exemplo de força, amor e bondade e devo tudo que sou hoje a ela.

Ao meu avô Diassis e à minha avó Ié, que sempre foram meus exemplos de bondade, empatia e altruísmo, e levarei eles sempre no meu coração, onde estiverem.

Aos irmãos Daniel, Gabriel e Giovanna que sempre serão meus grandes amores e meus portos seguros.

Aos meus tios Eurides e Eudes, padrinhos e segundos pais os quais eu tenho uma infinidade de amor e que foram, também, responsáveis pela minha educação.

À minha avó Veva, que sempre me deu muito amor e zelou por mim.

À minha Tia Marlúcia, mas que chamo de vó, por sempre ter investido em minha educação, por me dar a mão para me amparar e ser o meu maior exemplo de mulher e profissional que almejo ser. Uma grande professora e cientista social.

Aos meus tios Distefano e Míria, por sempre me darem muito amor e acolher em sua casa.

À UFRN, por ter me acolhido como aluna e pós-graduanda e por ter transformado a minha compreensão do mundo.

Ao Professor Arnobio por ter, prontamente, aceitado a minha orientação e por ter acreditado no meu potencial. Por ser uma grande profissional da área e com todo seu amor e paciência conseguir passar seus conhecimentos para todos.

Aos meus companheiros de laboratório Lucas, Mariana e Thayse por sempre me acolherem e ajudarem partilhando seus conhecimentos e auxiliando quando necessário meus experimentos e criando laços que vão além do TecBiofar.

Ao Prof. Marcelo Silva, Prof. Sócrates Egito e Prof. Hugo de Oliveira pela contribuição e apoio para realização desse trabalho.

A todos que compõem o TecBiofar da UFRN pela ajuda na realização dos experimentos.

A Júlio, Douglas e Talita do laboratório Lasid da UFRN por terem colaborado compartilhando conhecimentos e criando um laço de amizade.

Ao todos os meus amigos que ganhei ao longo da minha vida, os quais cuidam, zelam e me colocam sempre para cima mostrando que a vida pode ser mais leve e divertida.

RESUMO

A leishmaniose é considerada uma das principais doenças negligenciadas no mundo, com grandes números de casos anualmente, é causada por protozoários do gênero *Leishmania* spp. e atinge principalmente populações de países mais pobres. O tratamento da doença é bastante limitado, tóxico ao paciente, de alto custo e o parasito apresenta resistência aos quimioterápicos. Desta maneira, tentando solucionar os problemas como os efeitos colaterais dos medicamentos já em uso, diminuir a resistência a droga e melhorar os tratamentos já existentes, surge a nanotecnologia farmacêutica com sistemas de liberação de fármacos em escala nanométrica, como é o caso das nanoemulsões (NE). Paralelo a isto, tem se procurado outros princípios ativos leishmanicidas alternativos para tratamento da doença como o fitol, que se trata de um componente da clorofila da classe dos diterpenos, que é encontrado abundantemente na natureza e tem ampla gama de atividades biológicas comprovadas. Com isso, o presente estudo tem como objetivo desenvolver NE contendo fitol biocompatíveis pela técnica de emulsificação por inversão de fases, avaliar o efeito da composição nos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões, observar a estabilidade a longo prazo e acelerada dos sistemas obtidos com e sem o ativo, observar também o perfil citocompatível em células 3T3, o potencial hemolítico em eritrócitos e a capacidade *in vitro* desses sistemas antileishmanicida. Desta forma, foi observado que as NE desenvolvidas se apresentaram estáveis em até 30 dias e em condições de estresse elevadas com centrifugações em altas rotações mostrando os parâmetros macroscópicos e físico-químicos adequados. Observou-se também um perfil citocompatível em até 70% nas concentrações testadas com a linhagem celular testada e no ensaio hemólise só apresentou hemólise nas concentrações iniciais, sendo sugestivo de segurança para administração do sistema em estudo *in vivo*. Observou-se também que a NE desenvolvida teve uma boa atividade e tempo-dependente. Portanto, a NE produzida mostrou-se um promissor fármaco para o tratamento da leishmaniose cutânea, mostrando-se segura e eficaz.

Palavras-chave: Nanoemulsão; Leishmaniose cutânea; Fitol.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered one of the main neglected diseases in the world, with large numbers of cases annually, it is caused by protozoa of the genus *Leishmania* spp. and affects mainly populations in poorer countries. The treatment of the disease is very limited, toxic to the patient, high cost and the parasite is resistant to chemotherapy. In this way, trying to solve problems such as the side effects of drugs already in use, reducing drug resistance and improving existing treatments, pharmaceutical nanotechnology appears with drug delivery systems on a nanometric scale, as is the case of nanoemulsions (NE). At the same time, alternative leishmanicidal active principles have been sought to treat the disease, such as phytol, which is a component of chlorophyll from the diterpene class, which is found abundantly in nature and has a wide range of proven biological activities. Thus, the present study aims to develop NE containing biocompatible phytol by the phase inversion emulsification technique, to evaluate the effect of the composition on the physical-chemical parameters of the nanoemulsions, to observe the long-term and accelerated stability of the systems obtained with and without the active one, also observe the cytocompatible profile in 3T3 cells, the hemolytic potential in erythrocytes and the in vitro capacity of these antileishmanial systems. Thus, it was observed that the EN developed were stable for up to 30 days and under high stress conditions with centrifugations at high rotations showing adequate macroscopic and physical-chemical parameters. A cytocompatible profile was also observed at up to 70% in the concentrations tested with the cell line tested and in the hemolysis assay only showed hemolysis in the initial concentrations, suggesting safety for administering the system in an in vivo study. It was also observed that the developed EN had a good and time-dependent activity. Therefore, the NE produced proved to be a promising drug for the treatment of cutaneous leishmaniasis, proving to be safe and effective.

Keywords: Nanoemulsion; Cutaneous Leishmaniasis; Phytol

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da pele.....	19
Figura 2. A) Flebotomíneo fêmea do gênero <i>Lutzomyia</i> . B) Formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	21
Figura 3. Lesões da leishmaniose cutânea: A) Lesão ulcerosa localizada com borda levantada e eritematosa da leishmaniose cutânea no braço; B) Lesões disseminadas com nódulos infiltrativos e úlceras pequenas na parte posterior do tronco.	21
Figura 4. Epidemiologia da Leishmaniose Cutânea: A) Epidemiologia mundial da LC em 2019 de acordo com a OMS; B) Epidemiologia na região das Américas da LC em 2019 de acordo com a OPAS/OMS.....	22
Figura 5. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	23
Figura 6. Estrutura química dos fármacos de escolha para tratamento da leishmaniose.	24
Figura 7. Estrutura química do fitol.	26
Figura 8. Tipos de nanocarreadores.....	27
Figura 9. Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões.....	31
Figura 10. Esquematização de preparo das nanoemulsões a frio.	34
Figura 11. Teste de mistura tensoativos na NE.	40
Figura 12. Comparação entre a NE BG, NE Br, NE FG e NE FIT com uso de aquecimento na obtenção destas.	42
Figura 13. Gráficos de diâmetro de tamanho das gotículas das NE e PdI ao longo dos 30 dias de estudo.....	44
Figura 14. Gráficos de diâmetro de tamanho das gotículas das NE.....	44
Figura 15. NEs após teste de estabilidade acelerada.	46

Figura 16. Perfil hemolítico das nanoemulsões com e sem Fitol e comparadas com a solução de fitol pura.....	48
Figura 17. Gráfico de viabilidade celular frente as NE.....	49
Figura 18. Perfil da atividade antiparasitária da NE Fit e % de morte do parasito.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Screening de tensoativos variando proporções.	33
Tabela 2. Composição final das nanoemulsões.	33
Tabela 3. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões.	41
Tabela 4. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões a frio contendo poloxamer 407...	43
Tabela 5. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões após estudo de estabilidade acelerada.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
AM	Antimoniato de meglumina
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> / Coleção de cultura tipográfica americana
BG	Nanoemulsão Branca contendo Glicerina
BP	Nanoemulsão Branca contendo Propilenoglicol
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> / Albumina de Soro Bovino
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz ou <i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> /
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTN's	Doenças Tropicais Negligenciadas
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EtOH	Etanol
FA	Fase aquosa
FIT	Fitol
H	Horas
FO	Fase orgânica
LC	Leishmaniose cutânea
LV	Leishmaniose visceral
Min	Minuto
MT	Mistura de tensoativos
MTT	(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)/ brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolio
mV	Milivolts
NCI	Instituto Nacional do Câncer
NE	Nanoemulsão
NEB	Nanoemulsão branca
NE Br	Nanoemulsão branca contendo polaxamer 407
NEF	Nanoemulsão contendo fitol
NE FG	Nanoemulsão contendo fitol e glicerina
NE FIT	Nanoemulsão contendo fitol e polaxamer 407

NE FP	Nanoemulsão contendo fitol e propilenoglicol
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> / tampão fosfato-salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PZ	Potencial Zeta
R	Coeficiente de correlação
RPM	Rotações por minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBF	Soro bovino fetal
SF	Solução de fitol
SSG	Estibugluconato de sódio
SUS	Sistema Único de Saúde
TIF	Temperatura de inversão de fase
UV-vis	Ultravioleta Visível
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	OBJETIVOS.....	18
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1	ESTRUTURA DA PELE	19
3.2	LEISHMANIOSE.....	20
3.2.2	Epidemiologia.....	22
3.2.3	Ciclo biológico	22
3.2.4	Tratamento.....	23
3.2	FITOL.....	26
3.3	NANOEMULSÕES	27
3.2.1	Métodos de obtenção das nanoemulsões	29
3.2.2	Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
4.1	MATERIAIS	32
4.2	MÉTODOS.....	32
4.2.1	Obtenção das nanoemulsões.....	32
4.2.1.1	Preparo das nanoemulsões.....	32
4.3	MONITORIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOEMULSÕES	34
4.3.1	Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta.....	34
4.3.2	Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)	34
4.4	ESTUDO DE ESTABILIDADE FRENTE A CENTRIFUGAÇÃO	35
4.5	ENSAIO DE HEMÓLISE	35
4.6	CITOCOMPATIBILIDADE <i>in vitro</i>	36

4.6.1 Cultivo celular	36
4.6.2 Ensaios de citocompatibilidade celular	37
4.7 ESTUDOS DE EFICÁCIA <i>in vitro</i>	37
4.7.1 Manutenção do parasita	37
4.7.2 Ensaios de MTT	38
4.7.3 Ensaio da Atividade antiparasitária <i>in vitro</i>	38
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO E MONITORIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	40
5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE FRENTE A CENTRIFUGAÇÃO	45
5.3 ENSAIO DE HEMÓLISE	47
5.4 ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR	49
5.5 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA <i>in vitro</i>	50
6 CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) alega que as doenças tropicais negligenciadas (DTN's) compreendem um grupo de dezessete diferentes doenças que ocorrem predominantemente em populações mais humildes de países tropicais e subtropicais, que vivem em calamidades sanitárias, possuem contato direto com o vetor ou animais domésticos infectados (HOTEZ et al., 2020; OMS, 2020). Desta maneira, as DTN's que mais atinge a população brasileira e de caráter emergente são: hanseníase, tuberculose, leishmaniose, dengue, esquistossomose e doença de chagas; sendo essas negligenciadas também pelo governo brasileiro (Informes Técnicos Institucionais, 2010; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2012; Brasil, 2021).

A leishmaniose é uma doença causada por protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* spp. e tem como vetor o flebotomíneo fêmea hematófago do gênero *Phlebotomus*, no velho mundo e, *Lutzomyia* no novo mundo e principal vetor no Brasil (GONTIJO et al., 2011; MAROLI et al., 2013). Os seres humanos são considerados hospedeiros vertebrados deste parasita e os cães domésticos como reservatórios em áreas urbanas e periurbanas (FRANÇA-SILVA et al., 2005). A doença possui três tipos de manifestações as quais são induzidas por diferentes espécies de *Leishmania*, a visceral (também conhecida como kala-azar sendo a forma mais grave da doença), a cutânea (a forma mais comum) e a mucocutânea (OMS, 2019).

O tratamento da leishmaniose depende do tipo de manifestação da doença, de outras comorbidades associadas, espécie do parasita e localização geográfica a qual o paciente se encontra (OMS, 2019). Para o tratamento da doença, os medicamentos de primeira escolha são os compostos antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio, e os de segunda escolha a anfotericina B lipossomal, terbinafina, pentamidina e miltefosina (CROFT et al. 2006b; FREITAS-JUNIOR et al. 2012; MOOSAVIAN KALAT et al. 2014; FARAJZADEH et al. 2015; FARAJZADEH et al. 2016). Tais medicamentos são bastante tóxicos aos usuários, possuem um alto custo de aquisição e os parasitas têm apresentado uma resistência a tais tratamentos (TIWARI et al., 2018).

Visando minimizar os efeitos adversos aos pacientes, resistência do parasita ao medicamento e menor custo de tratamento, alternativas farmacológicas como a nanotecnologia devem ser pensadas (MNYUSIWALLA, DAAR & SINGER, 2003, SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005; SANTOS et al., 2008). A nanotecnologia baseia-se em encapsular fármacos e biomoléculas em sistemas de distribuição de fármacos,

melhorando suas características farmacocinéticas e farmacodinâmicas, desta maneira, podendo levar a diminuição da toxicidade e dos efeitos adversos. São exemplos de nanossistemas os lipossomas, as nanopartículas lipídicas sólidas, as nanopartículas poliméricas, carreadores lipídicos nanoestruturados e as nanoemulsões (ODRIOZOLA et al., 2014; SHARMA et al., 2017; ALFEI et al., 2020; ALI et al., 2020). Desta maneira, as nanoemulsões por serem cineticamente estáveis, um perfil de liberação prolongado e uma boa permeação cutânea ganha um maior destaque frente aos demais nanossistemas (WU et al., 2013; SAXENA et al., 2018)

As nanoemulsões tratam-se de dispersões coloidais de dois líquidos imiscíveis, geralmente água e óleo, as quais são estabilizadas por um agente emulsionante, surfactante e um co-surfactante para formar uma única fase. Estas NE possuem tamanho gotícula até 500 nm, permitindo uma melhor permeação dos fármacos os quais foram incorporados nesse sistema e aumento de sua biodisponibilidade (QIAN, 2011; MAYER et al., 2013; SINGH et al., 2017; BARRADAS et al., 2018). Estas podem ser obtidas através de duas técnicas de emulsificação: a de alta energia e a de baixa energia (SHAKEEL et al., 2013; QADIR et al., 2016). O método de alta energia requer para formação de gotículas em escalas nanométricas a utilização de uma força mecânica, por meio de altas tensões de cisalhamento. Este método pode ser feito usando um sistema de rotor/estator, ultra-som, homogeneização a alta pressão, microfluidização e emulsificação por membrana. Já o método de baixa energia utiliza-se da estratégia da emulsificação espontânea ou inversão de fases por temperatura, os quais utilizam de propriedades físico-químicas do sistema para obter gotículas em tamanho nanométrico (ANTON et al., 2008; KUMAR, 2019).

O uso de moléculas de origem natural como alternativa terapêutica também tem sido bastante utilizado nos dias atuais (DE PASQUALE, 1984; KAYSER et al., 2003; NEWMAN; CRAGG, 2012). Dentre essas moléculas, temos o fitol o qual é um constituinte da clorofila e pertencente a classe dos dipiterpenos de fórmula molecular $C_{20}H_{40}O$, apresenta-se em estado líquido em temperatura ambiente (25°C) e possui baixa solubilidade em meio aquoso. Este ativo tem ganhado bastante atenção uma vez que possui mecanismos de ação bem caracterizados, sua estrutura molecular é simples, facilmente disponível por encontra-se abundantemente na natureza (ISCHEBECK et al., 2006; MCGINTY et al., 2010; CHOWDHURY; GHOSH, 2012; VETTER et al., 2012).

Estudos recentes evidenciaram que a fração rica em fitol da *Lacistema pubescens* apresentou forte atividade contra formas promastigotas de *Leishmania* spp. e amastigotas de *L. amazonensis*, além de seletividade para os parasitas intracelulares (SILVA et al., 2014,

SILVA et al., 2015). Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo o desenvolvimento de uma nanoemulsão contendo fitol a qual foi obtida pelo método de baixa energia e como alternativa farmacológica para o tratamento da leishmaniose cutânea.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver nanoemulsões contendo fitol como alternativa terapêutica para tratamento da leishmaniose cutânea.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

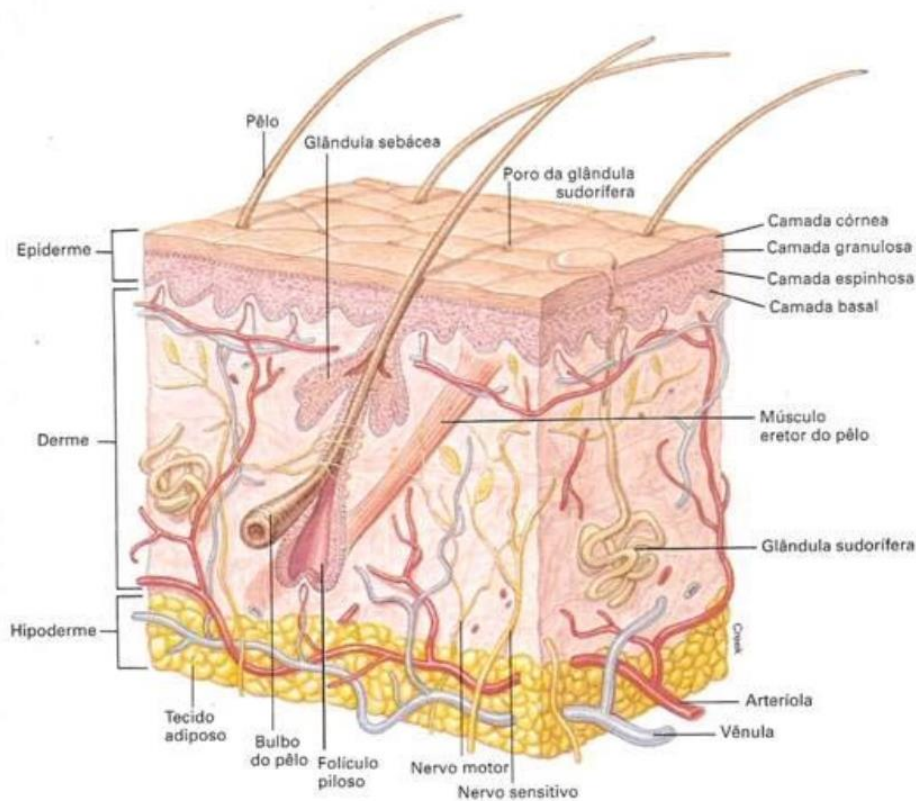
- Estudar parâmetros críticos na obtenção de nanoemulsões pelo método de baixa energia;
- Observar e otimizar os parâmetros envolvidos em uma técnica de baixa energia que afetam a produção de nanoemulsões biocompatíveis;
- Avaliou-se o efeito da composição nos parâmetros físico-químicos das nanoemulsões:
 - Tamanho hidrodinâmico de gotícula e índice de polidispersão;
 - Potencial zeta;
 - Potencial hidrogeniônico (pH)
- Avaliar a estabilidade aparente dos sistemas obtidos com e sem fármacos;
- Testar a citocompatibilidade celular *in vitro*;
- Realizar estudos de biocompatibilidade e de eficácia *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ESTRUTURA DA PELE

A pele é um órgão composto por três camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). Trata-se de um sistema complexo e de suma importância para o ser humano por possuir a função de proteção contra agentes biológicos, físicos e químicos, imunológica, endócrina, previne a perda de água, eletrólitos e a homeostasia do corpo no controle da temperatura corporal (DRÉNO et al., 2016; ROGER et al., 2019; VOSTALOVA et al. 2019).

Figura 1. Estrutura da pele.



Fonte: VAN de GRAAF, 2003.

A epiderme é a camada mais externa, é constituída pelos queratinócitos (responsáveis pela estrutura da epiderme e produção de queratina), melanócitos (produzem a melanina, a qual é responsável pela coloração da pele e proteção contra os raios ultravioletas), as células de Langerhans (são células do sistema imune) e as células ou discos de Merkel (estão ligadas as terminações nervosas periféricas) (DOMANSKY; BORGES, 2012; ECKHART; ZEEUWEN, 2018; NGUYEN; SOULIKA, 2019).

A derme é a camada intermediária e é formada principalmente pelos fibroblastos, células estas que possuem a função de produzir a elastina e o colágeno os quais proporcionam a pele uma maior resistência a tração e flexibilidade. Esta camada também é constituída pelos folículos pilosos, matriz extracelular e glândulas sudoríparas (LOSQUADRO, 2017; MOORE et al., 2018).

A última camada e a mais profunda é a hipoderme, ela tem com finalidade de suporte e unir os tecidos e órgãos adjacentes. É formada principalmente por adipócitos e células endoteliais os quais atuam como fonte de nutrientes através de capilares à derme e epiderme. Também possui como função essa camada de armazenar energia através dos ácidos graxos (NGUYEN; SOULIKA, 2019; OUALLA-BACHIRI et al., 2020).

3.2 LEISHMANIOSE

A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e um problema de saúde pública. Esta apresenta caráter endêmico em mais de 90 países pelo mundo todo e mais de 1 bilhão de pessoas encontram-se em risco de infecção nestas áreas. Desta forma, mais de 90% dos pacientes que possuem a doença no mundo são encontrados em 6 principais países: Índia, Brasil, Somália, Etiópia, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2022). Esta doença é causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* ssp. e transmitida por fêmeas de flebotomíneos do tipo *Phlebotomus* spp. ou *Lutzomyia* spp. , popularmente conhecido por “mosquito palha” (Figura 2) (TORRES-GUERRERO et al., 2017; KARAMI et al., 2013; BENASSI et al., 2018). As manifestações clínicas podem se dar de três formas, de maneira cutânea, mucocutânea e visceral. Onde, as duas primeiras são as formas mais leves da doença e comuns, no continente americano são chamadas de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Já a última é considerada de risco a vida ao paciente e é conhecida popularmente por calazar. Essas manifestações dependem do tipo de espécie de leishmania a qual infecta o hospedeiro e a resposta imune deste (BLACKWELL et al., 2009; BURZA et al., 2018).

Figura 2. A) Flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomyia*. B) Formas promastigotas de *Leishmania* sp.

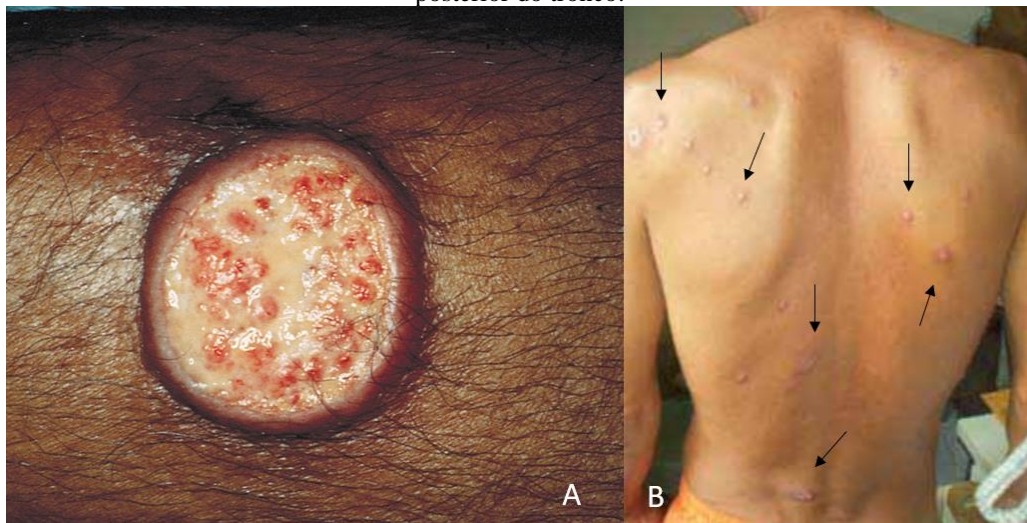


Fonte: Adaptado de Brasil, 2017; Florios (GreenMe), 2015.

3.2.1 Leishmaniose cutânea

A LC causa lesões na pele do paciente que variam de estágios leves a crônicos e/ou desfigurantes. Essas lesões mais graves podem manifesta-se em formas de úlceras, as quais são capazes de deixar nos pacientes cicatrizes na pele que perduraram por toda a vida (HANDLER et al., 2015; SAVOIA, 2015). Inicialmente após a inoculação da *Leishmania* através da picada do mosquito e ocorre a formação de uma pápula no local e progredindo para formação de nódulos ou da ulceração de bordas elevadas em moldura com um fundo granuloso, possuindo ou não exsudato (Figura 3) (WHO, 2022). Estas úlceras costumam ser indolores e quando é feito raspagem para ver presença do parasita é relata baixa presença) (Scott e Novais, 2016).

Figura 3. Lesões da leishmaniose cutânea: A) Lesão ulcerosa localizada com borda levantada e eritematosa da leishmaniose cutânea no braço; B) Lesões disseminadas com nódulos infiltrativos e úlceras pequenas na parte posterior do tronco.

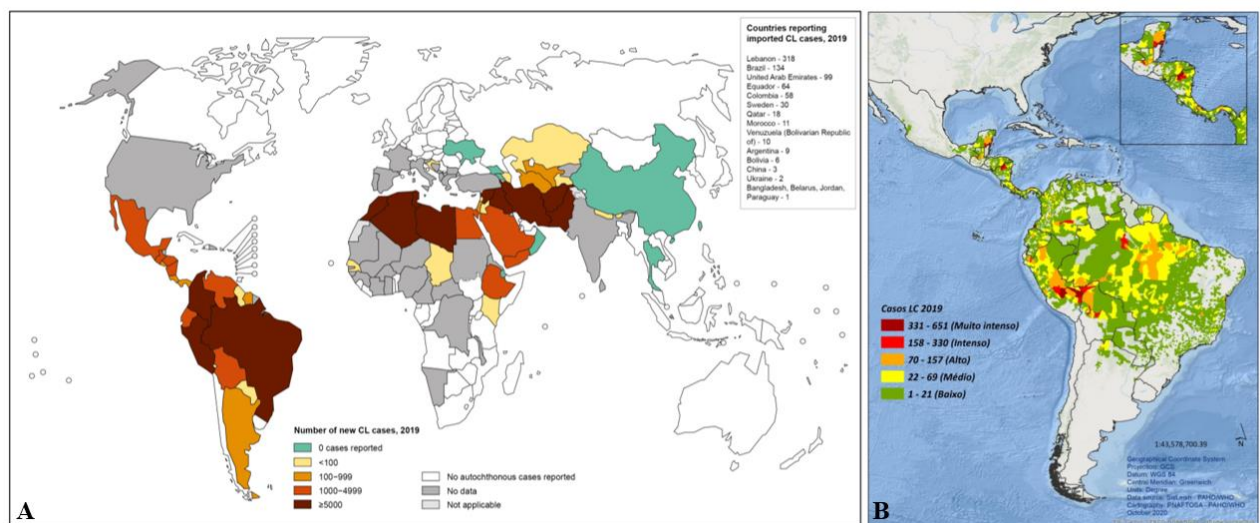


Fonte: Adaptado do Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana (2010); The Merck Manual (2020).

3.2.2 Epidemiologia

Anualmente a LC acomete mais de 1 milhão de casos novos no mundo todo, ocorrendo principalmente em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. (WHO, 2021). No Brasil, em 2019, foram registrados mais de 15 mil casos confirmados encontrando-se em maior incidência na região norte do país (Figura 4) (BRASIL, 2021). As principais espécies de *Leishmania* que causam esse tipo de manifestação são a *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. mexicana* (no Novo Mundo - continente da América do Sul e do Norte), *L. aethiopica*, *L. major* e *L. tropica* (no Velho Mundo) e *L. infantum* (tanto no Novo mundo como no Velho mundo) (REITHINGER et al., 2007; ORYAN, 2016; VAKILI et al., 2020).

Figura 4. Epidemiologia da Leishmaniose Cutânea: A) Epidemiologia mundial da LC em 2019 de acordo com a OMS; B) Epidemiologia na região das Américas da LC em 2019 de acordo com a OPAS/OMS.



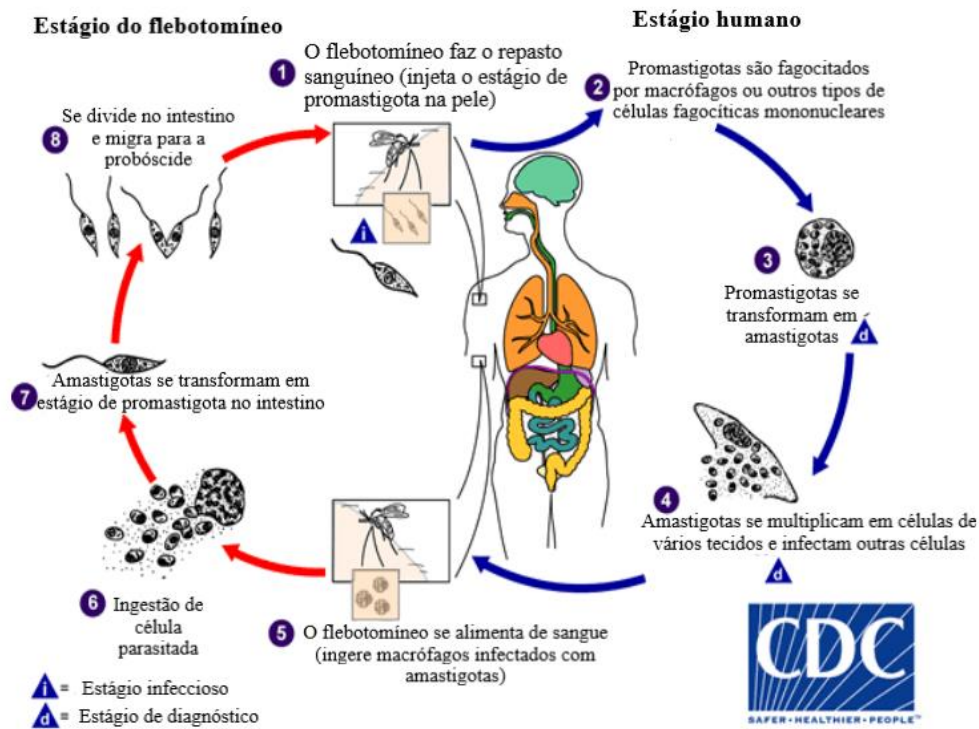
Fonte: Adaptado do SisLeish-OPAS/OMS: Dados notificados pelos programas nacionais de leishmanioses/serviços de vigilância, 2020.

3.2.3 Ciclo biológico

O parasita encontra-se presente em dois tipos de hospedeiros. No homem, hospedeiro vertebrado, encontra-se a forma amastigota do protozoário, já no flebotomíneo, hospedeiro invertebrado, é visto a forma promastigota. Vale ressaltar que ainda existem alguns animais que se caracterizam como reservatório do parasita, como animais silvestres e animais domésticos (MONTANHA et al., 2013; CONCEIÇÃO-SILVA e ALVES, 2014; ABBIATI et al., 2019).

O ciclo biológico da *Leishmania* se dar início com o repasto sanguíneo do flebotomíneo, este ingere macrófagos infectados, presentes na pele e nas mucosas do hospedeiro vertebrado, ou a forma amastigota livre no sangue. Chegando ao intestino médio do flebotomíneo a *Leishmania* ssp. altera para forma promastigota. Após rápida multiplicação esta forma se transforma para uma promastigota infectante que em uma nova alimentação do flebotomíneo é regurgitada ou introduzida na pele do novo hospedeiro vertebrado, desta maneira, dentro do sangue do homem ela se converte novamente na forma amastigota infecta macrófagos e se divide por divisão binária. O mesmo processo ocorre para os reservatórios animais (Figura 5) (FIOCRUZ, 1997; FOGANHOLI & ZAPPA, 2011; CDC, 2021).

Figura 5. Ciclo biológico da *Leishmania*.



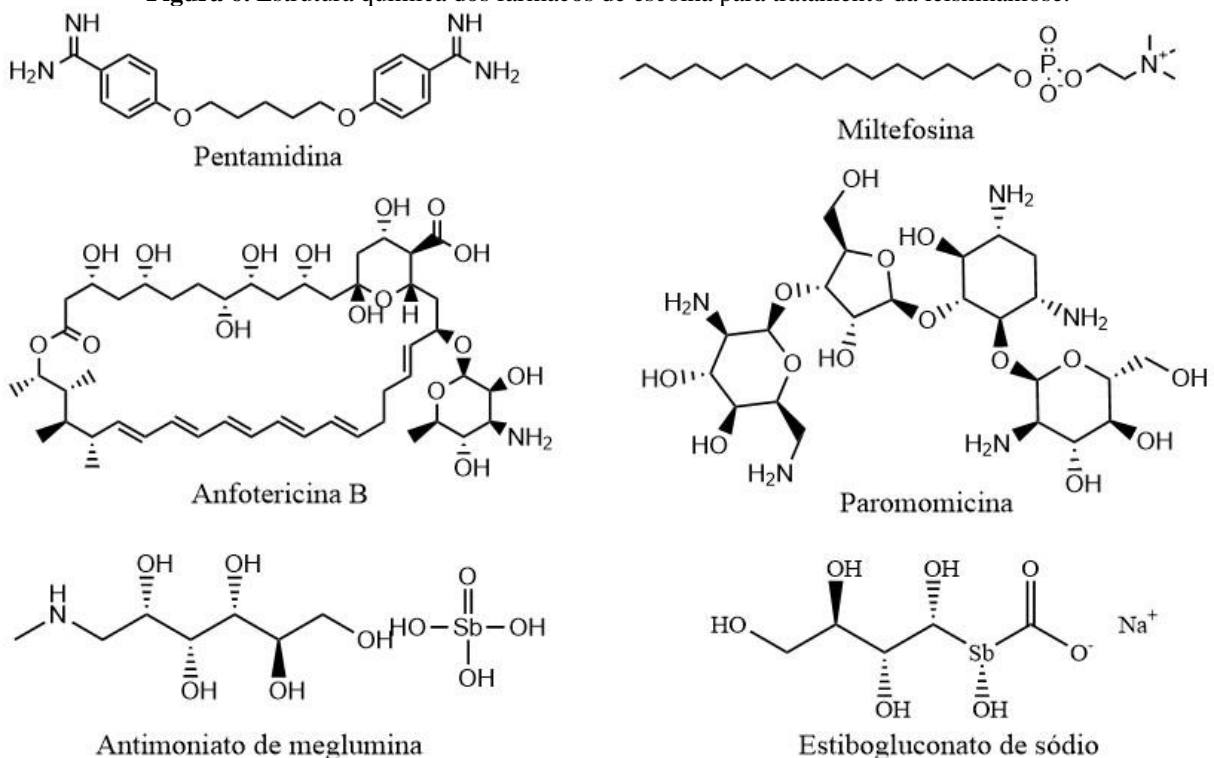
Fonte: Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

3.2.4 Tratamento

Existe documentado mais de 20 espécies de *Leishmania* da qual tem importância médica. Assim, de acordo com a espécie de *Leishmania* que está infectando o paciente, tanto a sintomatologia como o tratamento vão de acordo com isso e outros critérios como se é reinfeção da doença, idade e estado imunológico do paciente (STEVERDING, 2017; ANVERSA, 2018).

O tratamento convencional é feito através da quimioterapia e possui diferentes multiterapias. Assim, pode ser usado desde um único medicamento a combinação de dois ou mais e suas dosagens variam de acordo com a situação de cada paciente (CHAKRAVARTY AND SUNDAR, 2019). Os antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumina (AM) e estibogluconato de sódio (SSG) sendo estes o tratamento de primeira linha, já a pentamidina, terbinafina, miltefosina e anfotericina B são escolhidos como tratamento de segunda linha (Figura 6) (VÁSQUEZ et al., 2006; GONZÁLEZ et al., 2008; GHORBANI, 2017).

Figura 6. Estrutura química dos fármacos de escolha para tratamento da leishmaniose.



Fonte: Autoria própria (2022).

Os antimoniais por serem administrados intramuscular ou intravenoso tem registrado na literatura diversos efeitos adversos como toxicidades cardíaca, hepática, pancreática, renal e do sistema musculoesquelético devido a sua ação torna-se muitas vezes sistêmicas (OLIVEIRA et al., 2011; BASTOS et al., 2016; BRASIL, 2017). Outras desvantagens desse grupo é a resistência microbiana e do parasita a este tipo de medicamento e devido a sua via de administração muitos dos pacientes abandonam o tratamento (ALMEIDA & SANTOS, 2011; RIJAL et al., 2013). O mecanismo de ação desta classe de medicamentos ainda não é

totalmente elucidado, mas sabe-se que eles interferem no consumo energético do parasita (SAMPAIO et al., 2007; SINGH et al., 2012).

Já o uso da anfotericina B ocorre quando o tratamento de primeira linha não apresenta uma resposta boa ao paciente. Assim, como os antimoniais estes apresentam dificuldades em seu tratamento devido a efeitos colaterais como febre, náuseas, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, flebite no local da infusão e sua via de administração que é intravenosa, desta forma muitos dos pacientes tem que se hospitalizar para tratamento (BELLO et al., 2011; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; RIBEIRO et al., 2014). Seu mecanismo de ação se dá pela interação do ergosterol a membrana celular do parasita levando a sua morte (TIUMAN et al., 2011).

A pentamidina é um derivado sintético da amidina e pertencente à classe das diamidinas. Este é um dos fármacos escolhidos para o tratamento de segunda linha da leishmaniose, podendo ser administrada por via endovenosa ou intramuscular. Seu mecanismo de ação ocorre pela inibição da replicação e transcrição da junção da diamidina com o DNA do cineplasto do parasita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Como os demais fármacos de segunda linha, a pentamidina apresenta relatos de toxicidade de seu uso por parte dos pacientes causando principalmente problemas cardiovasculares, renais, gastrointestinais e a indução da diabetes mellitus insulina dependente (RATH et al., 2003; KIP et al., 2018; HENDRICKX, et al., 2019).

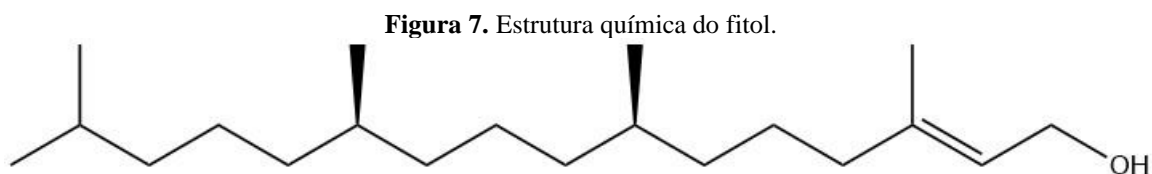
Já a miltefosina, também conhecida como hexadecilfosfocolina, é um antineoplásico, único administrado por via oral para o tratamento de segunda escolha da leishmaniose (VERMA & DEY, 2004; TIWARI et al., 2018). Em 2018, este medicamento foi incorporado ao SUS mas só foi disponibilizado e distribuído para população apenas em 2021 de acordo com o SINCOFARMA de São Paulo em 2021. Este fármaco tem como mecanismo de ação na indução do apoptose e na alteração da composição da membrana do celular do parasito (MARCO et al., 2009; CONITEC, 2018; SEMRA et al., 2022). Como os demais medicamentos para o tratamento da leishmaniose a miltefosina apresenta efeitos colaterais graves como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade, distúrbios gastrointestinais e é teratogênico, sendo contraindicado em mulheres gestantes e mulheres em idade fértil (SOTO et al., 2004; RIJAL et al., 2013).

Nessa mesma linha de tratamento se tem a paromomicina um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, é administrado por via intramuscular, tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas do protozoário (KIP, et al., 2018). A paromomicina por apresentar algumas limitações em sua absorção e efeitos adversos como hepatotoxicidade,

ototoxicidade e nefrotoxicidade (ALMEIDA & SANTOS, 2011; HENDRICKX, et al., 2019). Diante deste cenário, a busca por novos agentes leishmanicidas vem sendo intensificada, que sejam mais seguras aos pacientes e de mais fácil acesso para distribuição a população. Aliada a tais, a nanotecnologia juntamente com seus nanossistemas como as nanoemulsões tem sido um possível e promissora alternativa para o tratamento desta patologia.

3.2 FITOL

O composto 3, 7, 11, 15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol, mais conhecido como fitol, é um diterpeno (figura 7), amplamente distribuído na natureza em algas, plantas, bactérias, principalmente cianobactérias, intestino de ruminantes e seus laticínios, pois é um constituinte da molécula da clorofila a, principalmente, mas é encontrada também na clorofila b, c e d (RONTANI & VOLKMAN, 2003; ISLAM et al., 2015). Por tratar-se de um diterpeno ele é bastante utilizado como fragrância na área de cosméticos e não cosméticos (IFRA, 2004; MCGINTY et al., 2010). O fitol também é utilizado na produção sintética das vitaminas E e K, porém observa-se atividade antinoceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica e até mesmo anticancerígena (RYU et al., 2011; GUO et al., 2014).



Fonte: Autoria própria (2022).

Segundo Chowdhury em 2012, o fitol e seus derivados não mostraram efeito tóxico acumulativo, mesmo em camundongos imunocomprometidos, mostrando-se um composto bastante seguro para aplicações terapêuticas. Corroborando com essa tese estudos mostraram que o fitol, em testes toxicológicos agudo, quando administrados por via oral obteve dose letal (DL50) de 5 g/kg para camundongos e de 10 g/kg para ratos, mostrando uma boa tolerabilidade (SAIKIA et al., 2010).

Este composto é liberado pela ação da clorofilase por bactérias que estão presente no intestino. Quando absorvido pelo organismo de ruminantes, sua metabolização ocorre principalmente no fígado, gerando como produto intermediário o ácido fitênico e o dihidrofitol para posteriormente formar o ácido fitânico, seu principal metabolito, desta forma

é importante lembrar que o fitol só é absorvido pelos mamíferos caso esteja em sua forma livre (STEINBERG et al., 1966; SU & SCHMID, 1975; VAN DEN BRINK & WANDERS, 2006).

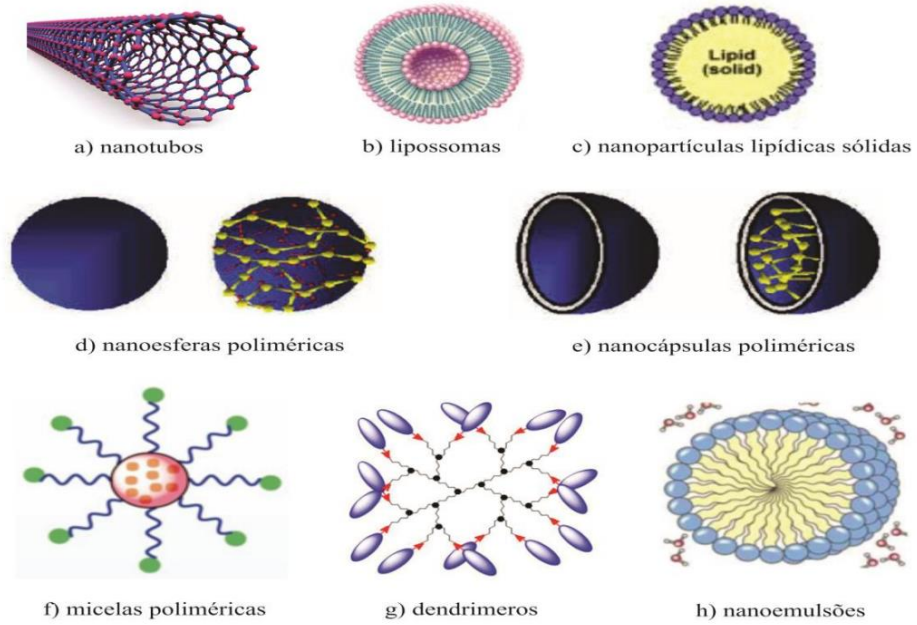
O fitol é um composto bastante lipofílico, pois possui uma grande cadeia de hidrocarbonetos, baixa solubilidade em água de 0,00327 mg/L em temperatura de 25 °C (MCGINTY et al., 2010). Estudos mostraram que essa alta lipofilicidade pode apresentar uma dificuldade em suas aplicações farmacêuticas, desta maneira, o uso da nanotecnologia pode ajudar a melhorar a biodisponibilidade e comprovando sua baixa toxicidade e citotoxicidade quando testado *in vivo* (ISLAM et al., 2017; SATHYA et al., 2017).

3.3 NANOEMULSÕES

As NE também conhecidas como miniemulsões ou emulsões ultrafinas, representam um tipo de sistema nanotecnológico (Figura 8) (AHUJA et al., 2008; KOROLEVA, 2012), onde uma fase é dispersa em outra, composta por uma fase oleosa, uma fase aquosa. Este nanossistema é estabilizado por um filme de tensoativos e co-tensoativos em proporções adequadas e formam gotículas de escala nanométrica que variam seu tamanho de 100 a 500 nm (SINGH et al., 2017; RAI et al., 2018). Desta maneira, as características do agente emulsificante tem bastante interesse, podendo determinar as propriedades da interface da gotícula, como a carga ao redor dela, a hidrofobicidade, a espessura, reatividade química e a aplicabilidade da nanoemulsão (MCCLEMENTS, 2015).

Devido ao seu tamanho reduzido, elas se mostram cineticamente estáveis, onde não sofrem sedimentação ou desnatação como outros tipos de emulsão, gerando uma vantagem frente a outros nanossistemas para o desenvolvimento de estudos na área alimentícia e farmacêutica (KENTISH et al., 2008; CORTÉS-MUÑOZ et al., 2009; LEE & MCCLEMENTS, 2010; DONSI et al., 2012; ADJONU et al., 2014).

Figura 8. Tipos de nanocarreadores.



Fonte: Traczynski, 2016.

3.2.1 Métodos de obtenção das nanoemulsões

Para formação das NE é necessário que uma energia seja fornecida ao sistema, seja ela mecânica ou química, isso ocorre, pois, a energia livre presente entre a fase externa e interna é menor que a energia da emulsão final, desta maneira, as nanoemulsões não se formam de maneira espontânea (MCCLEMENTS E RAO, 2011). Assim, para o preparo das nanoemulsões é importante conhecer o processo de emulsificação, os seus componentes (fase aquosa, oleosa e tensoativo) e a quantidade presente no sistema (YUKUYAMA et al., 2015). Existem dois métodos para se obter uma nanoemulsão, a de baixa energia e a de alta energia, em ambas as técnicas os tamanhos reduzidos de gotículas são obtidos conforme as variáveis dos sistemas e seus componentes (WILSON et al., 2022).

O método de alta energia consiste em utilizar a energia mecânica para quebrar a tensão interfacial existente entre as fases presente no sistema e o tensoativo para obtendo gotículas de tamanho nanométrico desejado, sendo muito utilizada na indústria. O processo ocorre em duas etapas, onde a primeira consiste na obtenção da emulsão grosseira e posteriormente reduz-se ao menor tamanho da gotícula. Os equipamentos mais utilizados no desenvolvimento desse método são os homogeneizadores de alta pressão, dispositivos ultra-sônicos, microfluidização e emulsificação por membrana (JAFARI et al., 2008; ANTON & VANDAMME, 2011b; FRYD, 2012; GHOSH et al., 2013). Desta forma, quando se utiliza de uma alta energia bem como o aumento de tensoativos na interface irá favorecer a obtenção de partículas nanométricas, mas para isso é necessário que vença a pressão de Laplace, onde as gotículas menores acabam se dissolvendo devido a uma diferença de pressão entre a fase dispersa e a fase interna da gotícula, essas gotículas dissolvidas são levadas por difusão pra gotículas maiores (GOODWIN, 2004; GHOSH et al., 2012).

A método de baixa energia é uma técnica que depende das propriedades físico-químicas dos componentes usados no sistema, mas principalmente do tensoativo e co-tensoativo presente na formulação, formando-se de maneira espontânea (ANTON et al., 2008; SUGUMAR et al., 2015). Esse método pode ser feito por emulsificação espontânea, ponto de inversão da emulsão e temperatura de inversão de fase (TIF) (GANACHAUD et al., 2005; MCCLEMENTS et al., 2012b).

A emulsificação espontânea ocorre quando se coloca dois líquidos imiscíveis, fase aquosa e fase oleosa (óleo mais tensoativo) em contato, sob temperatura ambiente (25°C) e sob agitação. Isso ocorre devido ao contato destes líquidos levarem a um estado de não

equilíbrio termodinamicamente e, assim, um aumento da área interfacial e direcionando a um estado metaestável (DAVIES, 1963; SHAFIQ-UM-NABI et al., 2007).

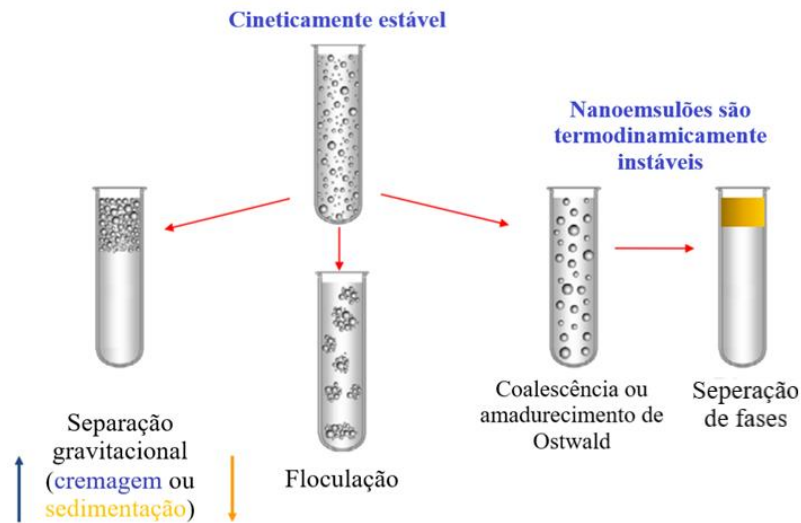
O ponto de inversão da emulsão trata-se no preparo das NE mediante a adição de substâncias que alterem o equilíbrio hidrofílico/lipofílico do sistema, a temperatura ambiente (25°C). Ou seja, é adicionado água de maneira contínua em óleo, permitindo que ocorra uma transição no raio de curva do surfactante e, desta maneira, as gotas de água ficam distribuídas uniformemente na fase oleosa. À medida que se aumenta a quantidade de fase aquosa é observado uma mudança espontânea na curvatura do tensoativo e ocorre a inversão de fase. Esse método pode ocorrer com a adição de eletrólitos, outros tensoativos, entre outros excipientes ao sistema (FERNANDEZ et al, 2004; SOLANS & SOLÉ, 2012; JASMINA et al., 2017).

O método de TIF segue o mesmo fundamento do ponto de inversão, porém o que difere deste método é que a inversão das fases ocorre devido uma mudança na curvatura do tensoativo quando submetidos a determinadas temperaturas as quais esses são sensíveis. Assim, o tensoativo tem sua solubilidade alterada e desta forma ocorre a micelização do sistema (MCCLEMENTS e RAO 2011; CHUESIANG et al., 2018). A temperatura de escolha vai de acordo com o tipo de tensoativo usado na formulação, desta maneira, a afinidade desta pela fase aquosa ou oleosa é mudada com o aumento de temperaturas ao redor da TIF (BOSCÁN, BARANDIARAN e PAULIS, 2018).

3.2.2 Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões

As NE apesar de serem cineticamente estáveis, ainda se mostram termodinamicamente instáveis, ou seja, existe uma força motora que leva a redução da área de contato entre a fase oleosa com a aquosa (MCCLEMENTS, 2011). Assim, esse tipo de sistema fica susceptível aos fenômenos de instabilidade ao longo do tempo como o amadurecimento de Ostwald, separação gravitacional (cremagem ou sedimentação), separação de fase, floculação e coalescência (Figura 9) (MCCLEMENTS, 2018).

Figura 9. Fenômenos de instabilidade das nanoemulsões.



Fonte: Adaptado do Capítulo 1 – General Aspects of Nanoemulsions and Their Formulation, McClementes (2018).

A floculação ocorre quando duas ou mais gotículas se aproximam umas das outras e se agrupam, mas mantem suas características individuais, sem rompimento do filme interfacial e trata-se de um fenômeno reversível. Já a coalescência, é quando duas ou mais gotículas se juntam e formam uma única gotícula maior. Esse tipo de agregação das gotículas ocorre devido a forças atrativas (ligação de van der Waals, hidrofóbica e depleção) entre estas serem superiores as repulsivas (eletrostáticas e estéricas), desta maneira, a escolha dos tensoativos e co-tensoativos é bastante importante no aumento da estabilidade das nanoemulsões, este processo apresenta caráter irreversível (CAPEK, 2004; MCCLEMENSTS, 2018).

Quando se fala de amadurecimento de Ostwald, conhecido também por *Ostwald ripening* trata-se de gotículas maiores aumentam seu diâmetro e se sobressaem no meio e as gotas menores encolhem. Este fenômeno ocorre devido a uma maior solubilidade da fase dispersa sob as gotículas menores do que nas gotículas maiores, desta forma, levando a formação de um gradiente de concentração que impulsiona o crescimento das gotículas. Assim, para evitar que ocorra este fenômeno é preciso o uso de óleos com pouca solubilidade em água, como os triglicerídeos de cadeia longa ou óleo mineral (RAHN-CHIQUE et al., 2012b; GUPTA et al., 2016).

A coalescência, floculação e o amadurecimento de Ostwald podem levar, ainda, a mais três condições de desestabilização da NE, a cremagem, sedimentação e separação de fases. Os dois primeiros fenômenos ocorrem pela flutuação das gotículas para parte superior do sistema formando um creme (cremagem) ou quando estas se depositam na parte inferior do sistema

(sedimentação), isso ocorre devido a diferença de densidade entre a fase contínua e dispersa. Esses processos culminam na separação de fases da nanoemulsão (ROSANI, 2011; JAISWAL et al., 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

L- α -fosfatidilcolina (95%) (Sigma-Aldrich, Brasil); Polaxamer 407 (Sigma-Aldrich, Brasil); Glicerina (Vetec, Brasil); Fitol (97%), mistura de isômeros (Sigma-Aldrich, Brasil); Óleo de Soja (Sigma-Aldrich, Brasil); Polisorbato 80 (Sigma-Aldrich, Brasil); Água purificada foi obtida a partir de equipamento de purificação por osmose reversa, modelo OS50 LX, Gehaka, Brasil; Meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Brasil); Albumina de Soro Bovino (GibcoTM/ Nova Zelândia); Eagle modificado de Dulbecco (DMEM, Life Technologies, Cat. 12800-058, Bleiswijk, Holanda); Soro Bovino Fetal (Life Technologies, Cat. 12657029, Bleiswijk, Holanda); Resazurina (Sigma Aldrich); Tripsina-EDTA (Gibco, Cat. 59418C, Estados Unidos);

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Obtenção das nanoemulsões

4.2.1.1 Preparo das nanoemulsões

Inicialmente, foi feito um *screening* com alguns tensoativos biocompatíveis juntamente com o óleo de soja (Tabela 1), com o objetivo de avaliar quais são os mais adequados, ou seja, que conseguem solubilizar uma maior quantidade de fármaco, para que seja construído um diagrama de fases pseudoternário para determinar a melhor proporção entre tensoativos, óleo e água para a produção das nanoemulsões desejadas. O óleo de soja foi testado na concentração de 2,5% e 5%.

Tabela 1. Screening de tensoativos variando proporções.

	100	75:25	50:50	25:75	100	80:20	60:40	40:60	20:80
Tween 80	0,5g	0,375g	0,25g	0,125g	-	0,4g	0,3g	0,2g	0,1g
Span 80	-	0,125g	0,25g	0,375g	0,5g	-	-	-	-
Fosfatidilcolina	-	-	-	-	-	0,1g	0,2g	0,3g	0,4g

Fonte: Autoria Própria (2022).

Após os screening dos tensoativos, foi escolhido para formulação das NE, 5% de mistura de tensoativos (MT) (na razão volumétrica de 80:20, tween 80 e fosfatilcolina, respectivamente), 5% de óleo, 10% co-tensoativo. Estas eram obtidas através do método TIF, onde a fase oleosa é colocada em banho maria em temperatura controlada de $65\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a dissolução da fosfatidilcolina e uma homogeneização da fase oleosa começasse o gotejamento da fase aquosa nesta. Ao fim do gotejamento cronometra-se 30 min sob aquecimento e agitação constante.

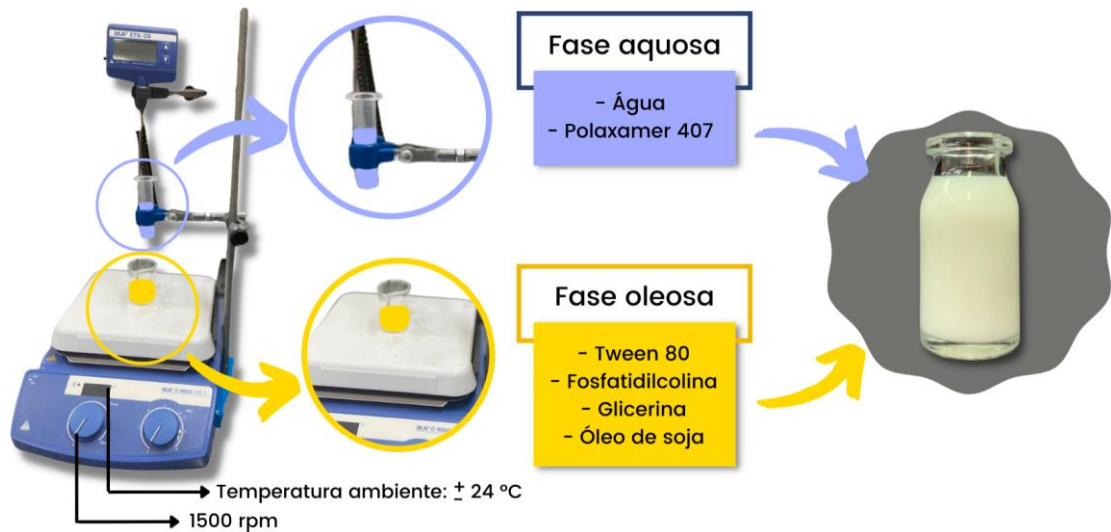
Devido à instabilidade do sistema, otimizações da formulação foram feitas adicionando um polímero chamado polaxamer 407, a formulação final está descrita na Tabela 2. As amostras tiveram como tomada de ensaio 10 g de formulação onde pesou-se primeiramente a fase oleosa em um becker e posteriormente a aquosa. Inicialmente, as NE foram produzidas pelo método de TIF descrito anteriormente, mas depois foi padronizado através da emulsificação por inversão de fases, um método de baixa energia, na qual a fase aquosa é gotejada na fase oleosa sob agitação magnética sem aquecimento para melhor estabilidade da formulação e polímero, como representado na Figura 10. Em seguida as NE foram estudadas e avaliou-se os parâmetros físico-químico e macroscopicamente.

Tabela 2. Composição final das nanoemulsões.

	MT (g/mL)	Óleo de soja (g/mL)	Glicerina (g/mL)	Polaxamer 407(g/mL)	Fitol (g/mL)	Água
NE Br	0,5	0,5	1,0	1,0	-	Qsp
NE Fit	0,5	0,5	1,0	1,0	0,1	Qsp

Legenda: NE Br (sistema sem fármaco contendo polaxamer 407), NE Fit (nanoemulsão contendo fitol), MT (mistura de tensoativo). **Fonte:** Autoria própria (2022).

Figura 10. Esquemática de preparo das nanoemulsões a frio.



Fonte: Autoria própria (2022).

4.3 MONITORIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DAS NANOEMULSÕES

4.3.1 Tamanho de gotícula, índice de polidispersão e potencial zeta

A determinação do tamanho das gotículas foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz com o auxílio do modelo ZetaSizer NanoZS (Malver, 82 Brookhaven, Reino Unido), a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$, comprimento de onda de 633 nm e ângulo de detecção de 173° . Para o índice de polidispersão (PdI), segue a mesma técnica do tamanho de gotícula, onde através do espalhamento dinâmico da luz conseguimos determinar essa variável. O potencial zeta (PZ) das nanoemulsões foi determinado através da análise da mobilidade eletroforética das gotículas utilizando o mesmo equipamento a temperatura de $24 \pm 2^\circ\text{C}$. Para todas as análises, as amostras foram adequadamente diluídas na proporção 1:100 (v/v).

4.3.2 Avaliação do potencial hidrogeniônico (pH)

O valor de pH foi determinado pelo método potenciométrico inserindo o eletrodo (Digimed, mod. DM-22) diretamente nas amostras. Esse ensaio as NE foram utilizadas em triplicata em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ\text{C}$).

4.4 ESTUDO DE ESTABILIDADE FRENTE A CENTRIFUGAÇÃO

Para análise da estabilidade acelerada da nanoemulsão foram retiradas alíquotas de 1 mL de amostra e inserida em um eppendorf e estas foram centrifugadas em 3 ciclos de 3500 e 9000 rpm durante 15 min na Mini Centrífuga (Fisherbrand[®], modelo Gusto, Illinois, Estados Unidos da América), metodologia adaptada de Oliveira et al. (2011b). Posteriormente, as amostras foram lidas no ZetaSizer NanoZS para verificar o tamanho de gotícula, PdI e PZ, cujo os parâmetros foram descritos na seção 4.3.1. Este ensaio foi realizado em triplicatas em temperatura ambiente ($24 \pm 2^\circ \text{C}$).

4.5 ENSAIO DE HEMÓLISE

Foram utilizadas amostras de sangue A+ recém-colhidas de doadores humanos saudáveis de um banco de sangue, de acordo com a declaração de Helsinque e protocolo aprovado 2.809.485 no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Onofre Lopes da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (HUOL/ UFRN). Cada 1 mL de sangue coletado em K3EDTA (1,5 mg EDTA: 1 mL de sangue) foi imediatamente utilizado para os experimentos. A amostra após ser coletada foi centrifugada à 2.000 rpm durante 10 min para separar os eritrócitos do plasma por sedimentação. O sedimento de eritrócitos foi lavado três vezes com tampão fosfato-salino (*phosphate buffered saline*, PBS) previamente realizado (pH 7,4) para remover a hemoglobina liberada e ressuspensão no mesmo tampão na proporção 1:1.

A amostra final foi obtida com 1 mL de eritrócitos em 4 mL de PBS para obter a concentração final de 250 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Dessa amostra foram retirados 15 μL e colocados em contato com PBS (285 μL) contendo as formulações nanoemulsões branca, nanoemulsão contendo fitol com duas concentrações diferentes (5 mg/mL e 10 mg/mL) em 6 diluições seriadas. O controle positivo foi considerado uma solução de água destilada e eritrócitos, e o controle negativo o PBS. A amostra de sangue também foi exposta a solução de fitol na mesma concentração utilizada na formulação de NE.

Todas as amostras foram incubadas por 60 minutos à 37°C . Após o período de incubação, foram centrifugados a 2.000 rpm por 10 min. Em seguida, 200 μL do sobrenadante foi coletado cuidadosamente sem nenhum resquício de eritrócito e colocado em placa de 96

poços para ser analisado no espectrofotômetro a 540 nm (Epoch-Biotek, Winooski, VT) para verificar a porcentagem de hemoglobina liberada. Esta metodologia foi realizada como descrito por Menezes et al. (2014). A porcentagem de hemólise foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{(\text{amostras ABS} - \text{controle ABSnegativo})}{(\text{controle ABS positivo} - \text{controle ABS negativo})} \times 100$$

Onde: Abs. = absorbância

4.6 CITOCOMPATIBILIDADE *in vitro*

4.6.1 Cultivo celular

Células 3T3 de linhagem celular de fibroblastos embrionários de camundongo (ATCC CRL-1658), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² (Sarstedt, Cat. 833910, Alemanha) com meio de cultivo Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), permanecendo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

A manutenção, subcultura ou troca de meio foram realizadas de acordo com a necessidade de linhagem celular. Ao atingir 80% de confluência, foi iniciado o plaqueamento das células 3T3 para avaliação da citocompatibilidade celular.

Para desadesão e contagem de células, o meio de cultura foi removido da garrafa, seguido da lavagem da superfície de cultivo para remoção de SBF utilizando 2 mL de tampão salino-fosfato (PBS) pré-aquecido a 37 °C. Tripsina-EDTA foi adicionada e as células foram mantidas em incubadora de CO₂ por 5 min. A garrafa contendo células da linhagem 3T3 foram novamente lavadas com DMEM com 10% de SBF, a fim de coletar as células não aderidas e inativar a tripsina. O conteúdo foi transferido para tubos cônicos estéreis para centrifugação por 5 min a 1800 rpm, e o pellet de células foi ressuspendido no meio DMEM. As células foram contadas em Câmara de Neubauer, procedendo-se para o plaqueamento com número de células e superfície de cultivo de acordo com o design experimental utilizado.

4.6.2 Ensaios de citocompatibilidade celular

Após 24 horas de incubação, o meio é removido e as células são carenciadas por 24 horas com DMEM sem soro. Em seguida, foram adicionados meio com SBF à 10%, e as demais formulações: solução de FIT (SF), nanoemulsão branca (NEB), nanoemulsão contendo FIT (NEF) para realização do estudo da citocompatibilidade pelo ensaio de MTT (3-metil- [4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), metodologia descrita por Mosmann (1983).

As células viáveis detêm a capacidade para reduzir o MTT a succinato desidrogenase devido a atividade enzimática encontrada nas mitocôndrias. As células da linhagem 3T3 foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^4 células / poço. Todas as amostras foram filtradas por meio de um filtro Millipore de 0,45 μm . Foram utilizadas as seguintes concentrações de FIT: 200 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e 3,125 $\mu\text{g/mL}$.

Após a incubação de 24 e 48 horas, o sobrenadante foi removido e 100 μL da solução de MTT em meio de cultura DMEM foi adicionado (concentração final de 1 mg/mL) a cada poço. As placas foram colocadas numa estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ e CO_2 a 5% durante 4 horas. Após este tempo, a solução de MTT foi removida e 100 μL de etanol absoluto foram adicionados a cada poço. As placas foram protegidas da luz, sob agitação durante 20 min. A absorbância foi medida a 570 nm usando leitor de microplacas ELISA (modelo Biotek®, Epoch), e os valores obtidos foram aplicados na equação abaixo:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}}{\text{Abs controle}} \times 100$$

Onde: Abs. = absorbância

4.7 ESTUDOS DE EFICÁCIA *in vitro*

4.7.1 Manutenção do parasita

Os cultivos das formar promastigotas da *Leishmania amazonensis* foram feitos em garrafas de 25 cm^2 contendo meio RPMI suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10 % de antibiótico estreptomomicina 100 UI/mL a 27 $^{\circ}\text{C}$. Para os testes foram utilizados

cultivos após o 4º Dia de suplementação, obtendo parasitas no final da fase log, ou seja, com o maior crescimento possível.

4.7.2 Ensaios de MTT

Entre os ensaios de citotoxicidade à base de enzimas, o ensaio de MTT é o método mais conhecido para determinar a atividade de desidrogenases mitocondriais em células vivas. Neste método, o MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium) é reduzido a formazan púrpura por NADH. A capacidade de redução do MTT foi utilizada para avaliar a citotoxicidade celular, conforme descrito por Mosmann (1983), com modificações. As células utilizadas foram da linhagem clonal RAW 264.7 (macrófagos murinos). As NE testadas foram diluídas em 1% de DMSO em meio de cultura meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 0.5% BSA, em triplicata. Para o teste foram distribuídas em microplacas de 96 poços, 1×10^6 células/poço da linhagem primária. As células foram mantidas a 37 °C com atmosfera de 5% de CO₂ e, após 24 horas de incubação, o meio de cultura foi substituído por 200 µl de meio contendo as nanoemulsões e controle positivo, o controle negativo recebeu apenas meio de cultura. Após mais 24 horas de incubação a 37 °C, 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionado em cada poço e após 3 horas, o sobrenadante foi removido e 200 µl de DMSO foram adicionados. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm após 10 min. A concentração inibitória de 50% (IC50), *in vitro*, para as células da cultura primária foi determinado. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI), compostos com valores de IC50 inferiores a 30 µg/mL são considerados citotóxicos (Suffness & Pezzuto, 1990). Os testes serão realizados em triplicata e repetidos em três experimentos independentes.

4.7.3 Ensaio da Atividade antiparasitária *in vitro*

Os cultivos foram utilizados a partir do 4º dia após a suplementação para obtenção da fase log da forma promastigota de *Leishmania amazonensis*. Para tal atividade antiparasitária, os parasitos foram diluídos e contados com auxílio da câmara de Neubauer e utilizados na concentração de 1×10^7 parasitos/mL. Em seguida, foram plaqueados 200 µL em cada poço em placas de 96 poços, em um sistema de triplicatas e posteriormente aplicou-se as NEF variando em diferentes concentrações. Em seguida, foram analisados a viabilidade das diferentes cepas do parasita no período de 24 e 48 horas, após o tratamento, como controle

positivo utilizou-se a anfotericina B. Para avaliar essa viabilidade dos parasitas tratados com as nanoemulsões em diferentes concentrações, realizou-se o ensaio de redução da resazurina, que consistiu na aplicação de 20 µL de resazurina na concentração de 3 mM em todos os poços de testes após as 24 e 48 horas de tratamento do composto. Este processo de redução da resazurina tem a durabilidade de 24 horas após sua aplicação e em seguida foi feita a leitura no leitor de microplacas (Epoch, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA) utilizando os comprimentos de onda 570 nm e 600 nm. Na qual o percentual de inibição se dará a partir da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{100 \left((A^{570t} - (A^{600t} \times R0)) \right)}{(A^{570c} - (A^{600c} \times R0))} \times 100$$

Onde A570t representa absorção do tratamento no comprimento de onda 570 nm, A600t a absorção do tratamento no comprimento de onda 600 nm, A570c a absorção do controle no comprimento de onda 570 nm, A600c a absorção do controle no comprimento de onda 600 nm e R0 é o fator de correção do meio interagindo com a resazurina, sendo obtido pela seguinte formula:

$$R0 = \frac{C_{\text{meio570nm}}}{C_{\text{meio600nm}}}$$

Na qual Cmeio570nm representa a absorbância do meio no comprimento de onda de 570 nm e Cmeio600nm equivale a absorbância do meio no comprimento de onda de 600 nm.

Para os sistemas que apresentarem características de interferência com a resazurina, após o tratamento, ou seja, interferirem no processo de redução ou apresentarem a característica oxidante, foi realizado a viabilidade parasitária através da contagem em câmara clara com o auxílio da câmera de Neubauer e calculado a porcentagem de inibição com base na contagem dos controles.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As amostras foram preparadas e analisadas em triplicata. Os resultados foram expressos em média ± desvio padrão. Inicialmente foi realizado o teste de normalidade, seguido de teste *t de student* para análises pareada de duas médias ou da análise de variância de uma entrada

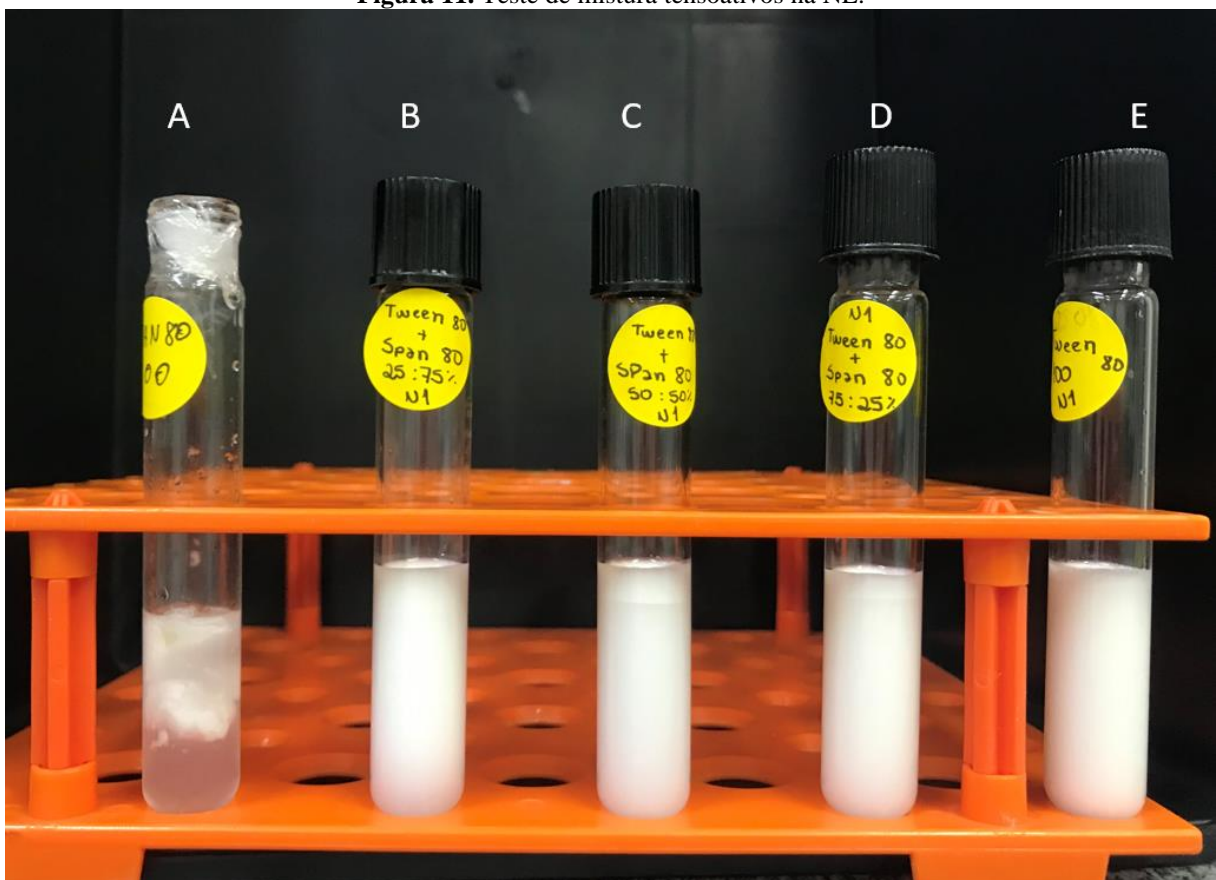
(ANOVA) quando aplicável. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para o valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA NANOEMULSÃO E MONITORIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Para obtenção da formulação final de NE cada sistema tinha diferentes proporções de tensoativos, isolados ou misturados, assim, foi possível observar qual era mais homogêneo e não apresentava nenhum fenômeno de instabilidade. Desta maneira, foi observado que as formulações não se mantiveram estáveis em nenhuma proporção testada após 24h quando se utilizou dos tensoativos Tween® 80 e Span® 80, ocorrendo separação de fases, apresentando um creme na parte superior do sistema (Figura 11).

Figura 11. Teste de mistura tensoativos na NE.



Legenda: A) 100% Tween® 80; B) 25% Tween® 80 e 75% Span® 80; C) 50% Tween® 80 e 50% Span® 80; D) 75% Tween® 80 e 25% Span® 80; E) 100% de Span® 80. **Fonte:** Aatoria propria (2022).

Posteriormente substituiu-se o span® 80 para fosfatilcolina para ver a interação deste novo tensoativo com o tween® 80 e adicionou-se também um óleo (óleo de soja) a fase oleosa. Ao fazer o gotejamento da fase aquosa foi possível observar que o sistema se manteve mais estável após 24h, sem ocorrer separação de fases. Mas, após 7 dias de repouso e armazenamento as NE apresentaram uma camada de creme em sua superfície. Desta maneira, foi observado que com o aumento da concentração do tensoativo no sistema juntamente com o ajuste na proporção deste para 80:20 de tween® 80: forfatildicolina, respectivamente, fez com a formulação permanecesse por mais tempo estável do que as outras. Isso ocorre, pois, a fosfatidilcolina por ser uma molécula anfifílica igual aos fosfolipídeos e desta maneira sua porção hidrofóbica interage melhor com a fase oleosa (fitol) e sua parte hidrofílica juntamente com o tween por ter caráter mais hidrofílico fornece uma película na interface O/A e consequente estabilidade ao sistema (COUVREUR, 1993; MERTINS et al., 2008; BALI et al., 2010).

Com a obtenção da formulação mais estável, avaliou-se o tamanho da gotícula da NE, no aparelho Zetasizer, onde todas as amostras testadas apresentaram tamanho da gotícula superior a 1000 nm, mostrando que o sistema não se encontrou em escala nanométrica como desejado e necessitaria da redução das gotículas.

Observada a instabilidade da formulação proposta, foi desenvolvido uma nova NE a adição de um co-solvente para tentar solucionar tais problemas. Desta maneira, testou-se dois tipos de co-solvente a glicerina e o propilenoglicol. As amostras foram deixadas em 24 horas em repouso e lidas em no ZetaSize nano e foi observado o tamanho de partícula, PDI e potencial zeta. Esses resultados estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões.

Formulações	Diâmetro (nm) ± DP	PdI ± DP	PZ (mV) ± DP
BG	390,4 ± 63,4	0,6 ± 0,060	-18,6 ± 1,30
NE FG	212,8 ± 2,5	0,4 ± 0,002	-29,9 ± 0,15
BP	327,0 ± 107,5	0,5 ± 0,080	-15,9 ± 0,20
NE FP	233,2 ± 11,5	0,6 ± 0,100	-20,1 ± 0,80

Legenda: BG (sistema sem fármaco contendo glicerina), NE FG (nanoemulsão contendo fitol e glicerina), BP (sistema sem fármaco contendo propilenoglicol), NE FP (nanoemulsão contendo fitol e propilenoglicol), DP (desvio padrão), PdI (Índice de polidispersão), PZ (potencial zeta). **Fonte:** Autoria própria (2022).

A formulação NE FP contendo propilenoglicol foi descartada após ter apresentado uma separação de fase após 48 horas e tamanho de gotícula superior ao da NE FG contendo

glicerina que conseguiu se manter estável até 1 semana. Desta maneira, os estudos foram continuados com NE FG.

O sistema contendo glicerina foi reformulado para avaliar sua estabilidade, a qual foi observado que tanto o sistema branco como o que continham o ativo fitol, após 7 dias em temperatura ambiente apresentou separação de fase. Pensando em como solucionar e ampliar a estabilidade da formulação, estas foram reformuladas e adicionadas 5% em sua composição o Poloxamer 407 e foi comparado com a formulação sem polímero, ainda utilizando da metodologia com aquecimento em ambas NE, como mostrado na Figura 12.

Figura 12. Comparação entre a NE BG, NE Br, NE FG e NE FIT com uso de aquecimento na obtenção destas.



Legenda: A) Nanoemulsões brancas (NE BG) e com fitol (NE FG) no tempo 0 horas. B) Nanoemulsões brancas (NE Br) e contendo fitol (NE FIT) e polaxamer 407 no tempo de 0 horas. C) Nanoemulsões brancas (NE BG) e com fitol (NE FG) no tempo 24 horas. D) Nanoemulsões brancas (NE Br) e contendo fitol (NE FIT) e polaxamer 407 no tempo de 24 horas. **Fonte:** Autoria própria (2022).

O Poloxamer 407, é um polímero anfifílico o qual tem em sua composição copolímeros de tribloco de óxido de polietileno-óxido de polipropileno-óxido de polietileno (PEO-PPO-PEO), é bastante usado no transporte de fármacos hidrofóbicos e no aumento da estabilidade das gotículas devido a diminuição da agregação (DEHVARI, 2014; AKHLAGHI et al., 2016; MDLOVU et al., 2019). Desta forma, tem como principal característica ser um polímero termorresponsivo, onde em temperaturas mais amenas, entre 2-8 °C ele é solubilizado em meio aquoso e se torna um gel em temperaturas mais elevadas (JUNG et al., 2017). Devido a formulação ser manipulada na faixa de 65 °C levava a separação de fase do

nanossistema, isso ocorre, pois, as cadeias poliméricas da parte hidrofílica são dessolvatadas e levam a formação de um gel (DEWAN et al., 2015).

Pensando na solução deste problema, os sistemas começaram a ser desenvolvidos através da emulsificação à frio, onde o poloxamer 407 foi solubilizado no meio aquoso em baixas temperaturas e posteriormente gotejado na fase oleosa sob agitação constante. Desta maneira, as formulações foram refeitas e ajustadas nas concentrações da fase oleosa juntamente com a do polímero para maior interação com as cadeias hidrofóbicas presentes no sistema, como descritas na Tabela 2.

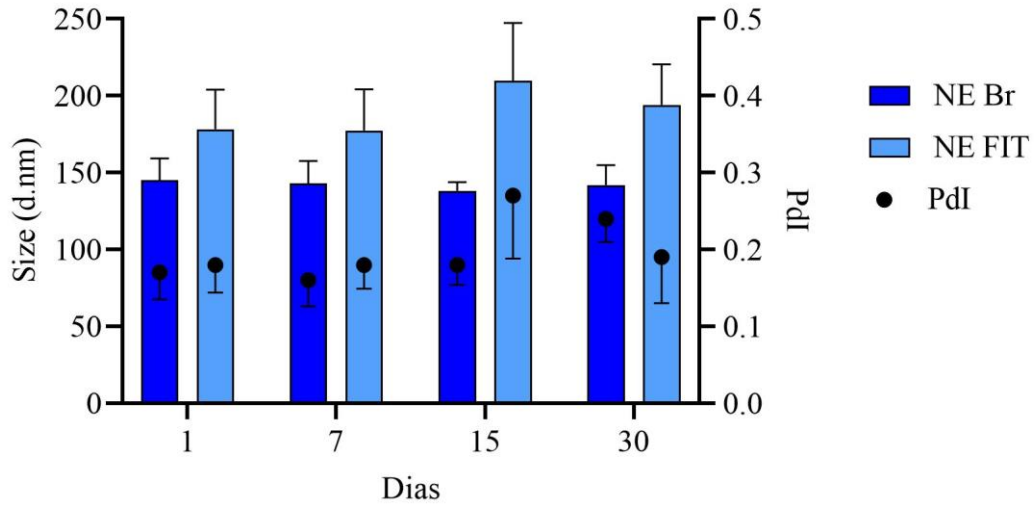
Foram avaliados novamente as propriedades físico-químicas após 24h em repouso e posteriormente com 7, 15 e 30 dias foi continuado os estudos de estabilidade e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 4 e Figura 13 e 14. Foi observado, também, que não houve mudanças ao longo do tempo estaticamente significativas ($p > 0,05$). Assim, durante os 30 dias foi possível verificar que as formulações continuaram estáveis, com aspecto macroscópico e físico-químicos satisfatórias, sem demonstração de separação de fase e qualquer fenômeno de instabilidade.

Tabela 4. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões a frio contendo poloxamer 407.

Formulações	Tempo (dias)	Diâmetro (nm) \pm DP	PdI \pm DP	PZ (mV) \pm DP	pH \pm DP
NE Br	1	145,0 \pm 14,28	0,17 \pm 0,035	-16,6 \pm 1,44	5,39 \pm 0,35
	7	143,1 \pm 14,51	0,16 \pm 0,034	-11,2 \pm 2,57	6,13 \pm 0,11
	15	138,2 \pm 5,58	0,18 \pm 0,026	-16,2 \pm 2,70	6,23 \pm 0,15
	30	142,0 \pm 12,82	0,24 \pm 0,030	-7,9 \pm 4,08	6,36 \pm 0,13
NE FIT	1	178,3 \pm 25,70	0,18 \pm 0,036	-15,9 \pm 1,57	5,56 \pm 0,43
	7	177,3 \pm 27,07	0,18 \pm 0,031	-16,4 \pm 1,86	6,17 \pm 0,22
	15	209,8 \pm 37,53	0,27 \pm 0,082	-18,5 \pm 3,75	6,23 \pm 0,14
	30	194,0 \pm 26,48	0,19 \pm 0,060	-10,7 \pm 4,26	6,21 \pm 0,56

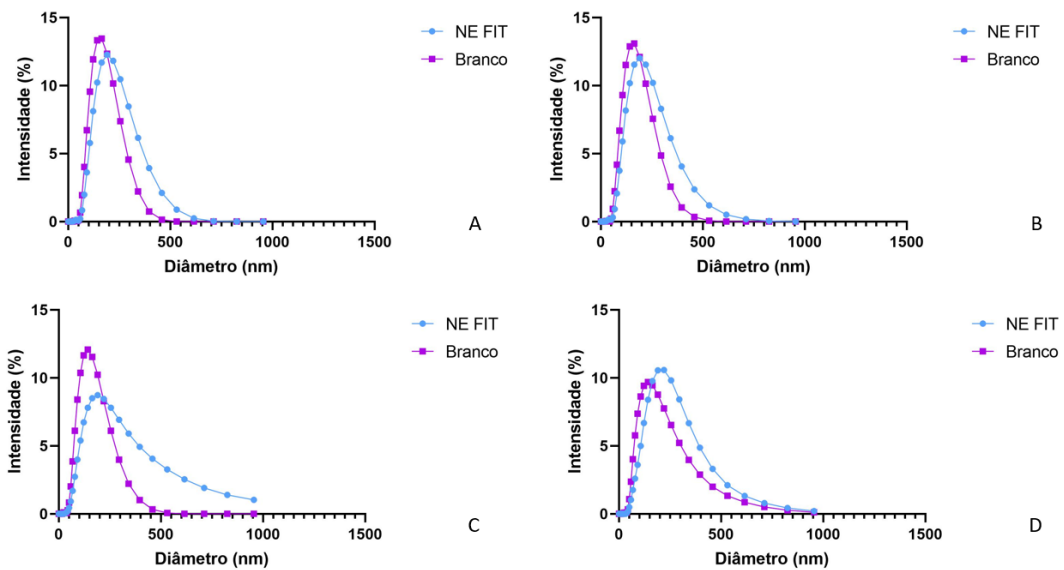
Legenda: NE Br (nanoemulsão branca contendo polaxamer 407), NE FIT (nanoemulsão contendo fitol e polaxamer 407), DP (desvio padrão), PdI (Índice de polidispersão), PZ (potencial zeta), pH (potencial hidrogeniônico). **Fonte:** Autoria própria (2022).

Figura 13. Gráficos de diâmetro de tamanho das gotículas das NE e PdI ao longo dos 30 dias de estudo.



Fonte: Autoria própria (2022).

Figura 14. Gráficos de diâmetro de tamanho das gotículas das NE.



Legenda: A) tamanho em nm com 24h; B) tamanho em nm com 7 dias; C) tamanho em nm com 15 dias; D) tamanho em nm com 30 dias. **Fonte:** Autoria própria (2022).

Durante todo o estudo de estabilidade foi possível observar que as NE se encontram em tamanho nanométrico desejado e com PdI menor que 0,2 mostrando que o sistema está pouco polidisperso e homogêneo como o desejado na nanotecnologia (GAUMET et al., 2008).

O pH obtido das formulações variou entre 5,3 a 6,2, o qual satisfaz a faixa de pH encontrada em uma pele lesionada (5,5-6,6) (FLORIANOPOLIS, 2007). A observação do pH em um sistema nanoemulsionado é importante, pois, este é um dos parâmetros de

estabilidade, onde a alteração do seu valor pode estar relacionada com reações químicas ou alterações microbiológicas que estão ocorrendo dentro da formulação (JUNIOR et al., 2013).

A estabilidade do sistema pode ser observada também através do PZ, este parâmetro avalia a diferença de potencial elétrico entre o meio dispersante e o disperso ligado a partícula dispersa e está associado também à magnitude da carga superficial da gotícula, sendo expresso em milivolts (mV) (KASZUBA et al., 2010; HONARY & ZAHIR, 2013). Para uma nanoemulsão ser considerada estável de acordo com o PZ ela deve se encontrar em valores acima de 30 mV, tanto para positivo como para negativo, valores na faixa de 20 mV indica estabilidade por curto período de tempo e na faixa dos 5 mV é provável formação de agregação das gotículas. Porém, isso não se aplica quando se tem na NE co-tensioativos como o polaxamer 407, pois estes têm uma alta estabilização estérica na gotícula. Desta forma, mesmo com o baixo PZ é possível ter um sistema estável o que justificaria as NE estudadas serem estáveis nas faixas encontradas durante os 30 dias analisados (HONARY e ZAHIR, 2013).

O PZ pode ser relacionado também com o pH, onde formulações que possuem pH mais alto tem uma tendência a apresentar o PZ mais negativo (TANG et al., 2012). Desta maneira, a formulação por apresentar um perfil levemente ácido fornece uma carga menos negativa ao PZ.

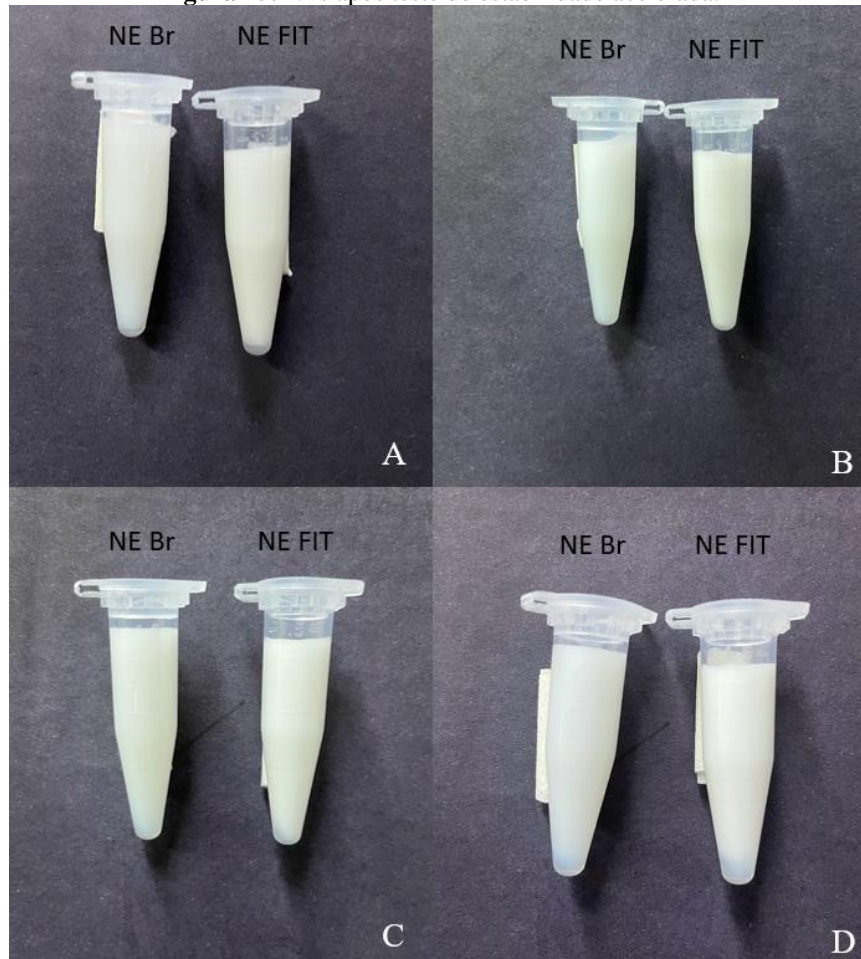
5.2 ESTUDO DE ESTABILIDADE FRENTE A CENTRIFUGAÇÃO

Esse teste leva a um aumento da força gravitacional que atua nas partículas no sistema, assim, levando o aumento das colisões entre essas e prevendo a estabilidade do sistema que quer ser estudado (Landim, 2019). Dessa maneira, amostras foram manipuladas e após 7 dias em repouso a alíquota de 1 mL foi centrifugada e avaliada macroscopicamente seu aspecto, assim, foi observado que mesmo submetido a condição mais drástica as NE não sofreram os fenômenos de instabilidade e não houve separação de fase. Após 15 dias, foi repetido a mesma técnica e novamente foi verificado que não houve nenhuma alteração na formulação, podendo pressupor que as NE são estáveis (Figura 15).

Quando avaliado também sobre o tamanho de gotícula, PDI e PZ é possível observar que as formulações mantiveram também as características antes de submetidas a condições extremas, com os parâmetros dentro dos que consideramos uma nanoemulsão, como mostrado na tabela 5. Em vista disto, quando se considera a vida de prateleira de um produto em condições normais de armazenamento possa ser prevista a partir da separação de fase devido a

algum fenômeno de instabilidade como cremação ou coalescência quando a nanoemulsão é levada a centrifugação, assim, as NE de acordo com seus resultados mostraram-se estáveis macroscopicamente e estáveis como descrito pela literatura (MASSON et al., 2005)

Figura 15. NEs após teste de estabilidade acelerada.



Legenda: A) NE Branca e com fitol após ciclos de centrifugação a 3000 RPM depois de 7 dias de repouso; B) NE Branca e com fitol após ciclos de centrifugação a 9.000 RPM depois de 7 dias de repouso; C) NE Branca e com fitol após ciclos de centrifugação a 3000 RPM depois de 15 dias de repouso; D) NE Branca e com fitol após ciclos de centrifugação a 9.000 RPM depois de 15 dias de repouso. **Fonte:** Autoria própria (2022).

Tabela 5. Propriedades físico-químicas das nanoemulsões após estudo de estabilidade acelerada.

Formulações	Rotação (RPM)	Tempo (dias)	Diâmetro (nm) ± DP	PdI ± DP	PZ (mV) ± DP
NE Br	3000	7	143,2 ± 3,27	0,19 ± 0,022	-18,4 ± 0,72
	9000	7	142,6 ± 3,15	0,16 ± 0,025	-18,2 ± 0,64
	3000	15	145,8 ± 1,90	0,18 ± 0,019	-19,5 ± 0,58
	9000	15	144,5 ± 1,30	0,15 ± 0,010	-19,6 ± 0,61
NE FIT	3000	7	208,5 ± 2,45	0,18 ± 0,027	-19,1 ± 0,58
	9000	7	205,2 ± 2,25	0,15 ± 0,041	-19,5 ± 0,52
	3000	15	218,5 ± 1,29	0,19 ± 0,008	-24,2 ± 0,61
	9000	15	203,1 ± 1,12	0,13 ± 0,020	-21,9 ± 0,64

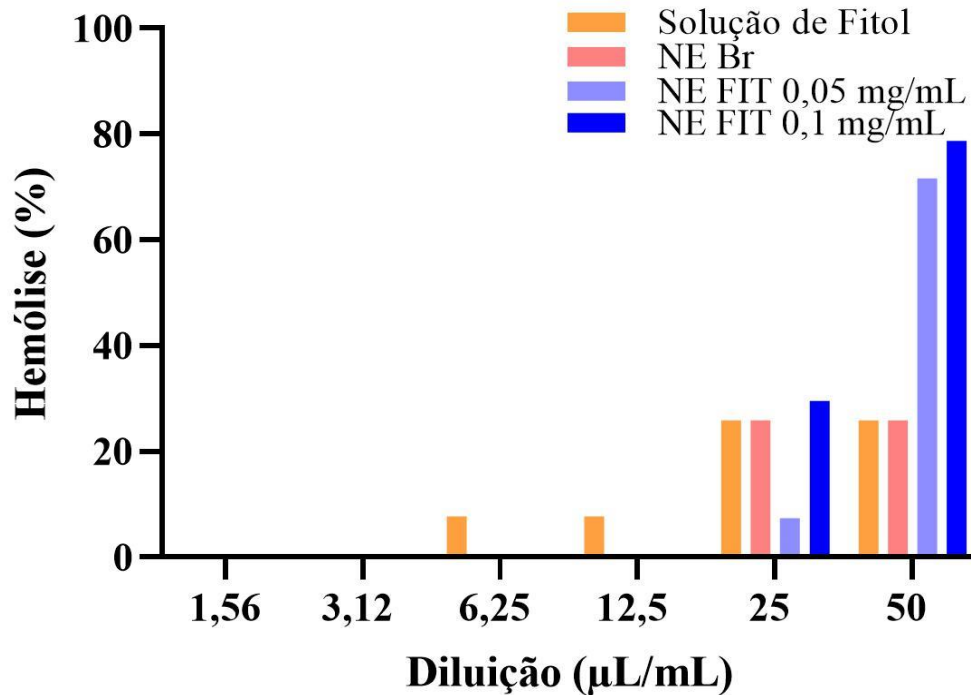
Legenda: NE Br (nanoemulsão branca contendo polaxamer 407), NE FIT (nanoemulsão contendo fitol e polaxamer 407), DP (desvio padrão), PdI (Índice de polidispersão), PZ (potencial zeta). **Fonte:** Autoria própria (2022).

5.3 ENSAIO DE HEMÓLISE

A hemólise tem como objetivo avaliar se a NE apresenta danos a membrana dos eritrócitos de maneira simples e válida, pois, muitos dos tensoativos e co-tensoativos, os quais são utilizados para estabilizar o sistema, tem relatos na literatura de apresentarem um perfil tóxico (NORNOO et al., 2008).

No presente estudo foram feitas diluições seriadas de até 6 vezes, e foram testadas as NE Br e NE FIT em duas concentrações diferentes e a SF para fazer um comparativo, como mostrado na Figura 16. Quando comparados os grupos em questão estatisticamente não foi observada nenhuma significância ($p > 0,05$).

Figura 16. Perfil hemolítico das nanoemulsões com e sem Fitol e comparadas com a solução de fitol pura.



Fonte: Autoria própria (2022).

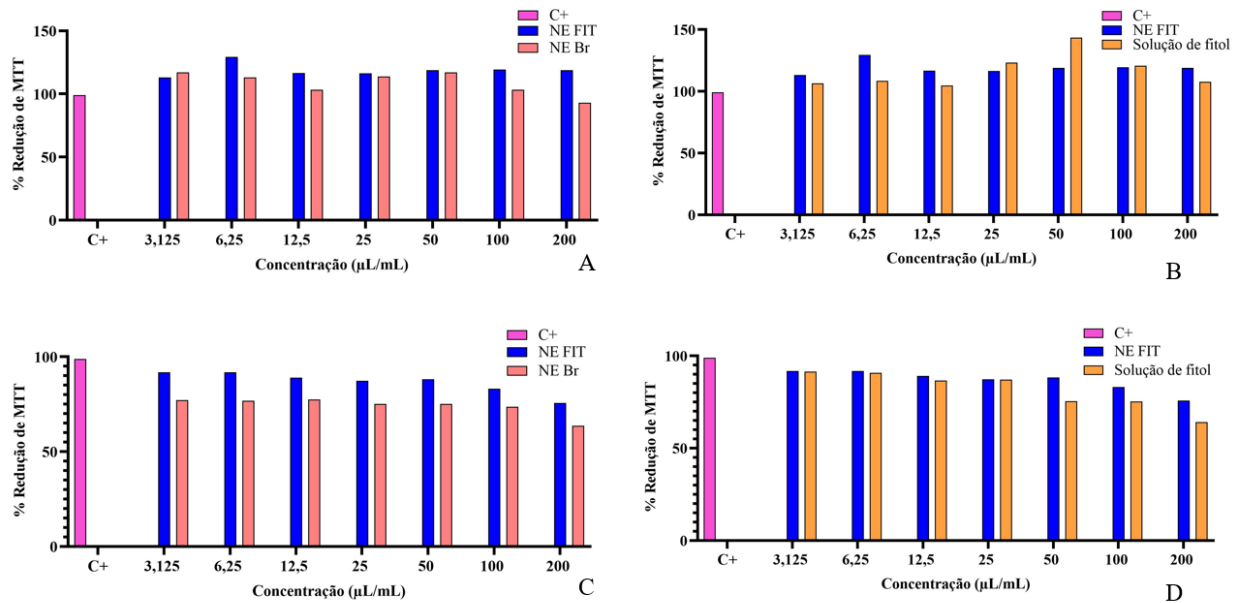
A formulação de NE Br apresentou um perfil hemolítico de até 25% nas duas primeiras diluições e a partir da terceira diluição até a última, esta hemólise não é mais vista. Esse mesmo comportamento da NE Br é visto na NE FIT, onde na concentração 0,05 mg/mL apresentou um percentual de hemólise de 71,65% na primeira diluição e cai para 7,39% na segunda e a partir da terceira é zerada. Já na concentração de 0,1 mg/mL na primeira diluição 78,71% e cai na segunda diluição para 29,52% e na terceira diluição cessa a hemólise nos eritrócitos. Quando comparado as NE com e sem fitol com a solução de fitol é possível observar que mesmo apresentando um percentual de hemólise maior, a partir da terceira diluição cessa, contendo 12,5 µL de fitol, enquanto na forma livre na solução é visto que ocorre a lise dos eritrócitos até a quarta diluição.

De acordo com Islam et al. (2016b), o fitol quando em maiores concentrações apresenta uma citotoxicidade maior, pois seu caráter hidrofóbico ajuda esse ativo a penetrar mais facilmente as membranas celulares, desregulando-as. Assim, isso ajuda a justificar também porque nas NE com o fitol estas apresentaram um maior percentual de hemólise, pois por se tratar de um sistema nanotecnológico possui uma entrega maior as células e por consequência uma maior citotoxicidade.

5.4 ESTUDOS DE VIABILIDADE CELULAR

Os sistemas desenvolvidos (SF, NE Br e NE FIT) foram testados em linhagens células 3T3 no tempo de 24h e 48h, na faixa de concentração de 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 50 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$, 6,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 3,125 $\mu\text{L}/\text{mL}$ usando o ensaio de MTT (Figura 17).

Figura 17. Gráfico de viabilidade celular frente as NE.



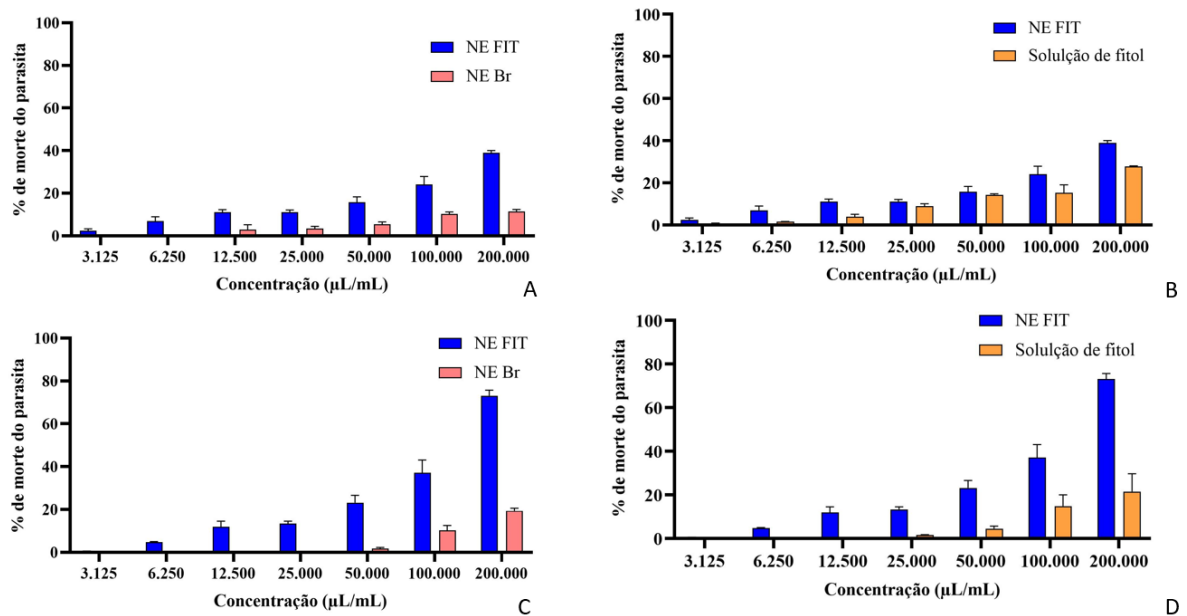
Foi possível observar que durante as primeiras 24h do estudo, os sistemas quando comparados ao controle não apresentou nenhum efeito citotóxico nas células, mantendo a viabilidade acima de 99% em todas as concentrações testadas. Após 48h, a NE FIT nas concentrações entre 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mostrou um perfil de citocompatibilidade em até 88%, sendo valores próximos ao da SF nas mesmas concentrações, a SF variou entre 75% até 91%, respectivamente. Entretanto, nas maiores concentrações (100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$) a NE FIT apresentou uma viabilidade entre 83% a 75%, respectivamente, que se manteve acima de 88% até a mais baixa concentração testada e quando comparada a SF nessas concentrações teve uma viabilidade na faixa entre 75% a 64% (100 e 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente). Desta maneira, mostrando que a NE FIT apresenta uma boa citocompatibilidade com as células testadas, principalmente nas concentrações mais baixas e quando comparada com a NE Br e a SF.

Segundo GHANEIAN et al. (2015), o fitol apresenta uma boa viabilidade celular em células de pele de camundongo em concentração de até 250 $\mu\text{g/mL}$ na faixa de 60% nos tempos de até 24h de incubação. A partir de 500 $\mu\text{g/mL}$, essa viabilidade mesmo nas primeiras horas de incubação fica inferior a 50%. Já na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ abaixo de 40%. Esse mesmo perfil de viabilidade celular também foi visto pela autora Lima et al. onde nanopartícula lipídicas contendo fitol mostraram-se citotóxicas em concentrações mais altas como 125 $\mu\text{g/mL}$ em linhagens de células epiteliais renais embrionárias humanas (HEK-239), mas à medida que diminui essa concentração aumenta-se essa viabilidade para acima de 90% mesmo após 48h de estudo. Assim, tendo como conclusão em ambos relatos de que o fitol quando avaliado quanto a sua viabilidade celular apresenta um perfil dose dependente, quanto maior a dose menor a viabilidade. Esses achados corroboram com os dados encontrados nos ensaios feito e mostrando que a NE FIT até 200 $\mu\text{g/mL}$ possui um perfil de viabilidade superior 75%, sugerindo que a NE FIT é mais citocompatível com a célula que o SF, e à medida que diminuimos a dose maior viabilidade chegando até 91%.

5.5 ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA *in vitro*

A atividade anti-leishmanicida da NE FIT foi testada nas formas promastigotas juntamente com a NE Br e a SFL para fazer um comparativo de quanto o sistema tem a capacidade de matar o parasita nas concentrações testadas que variaram de 200 $\mu\text{L/mL}$, 100 $\mu\text{L/mL}$, 50 $\mu\text{L/mL}$, 25 $\mu\text{L/mL}$, 12,5 $\mu\text{L/mL}$, 6,25 $\mu\text{L/mL}$ e 3,125 $\mu\text{L/mL}$ pela metodologia de MTT (Figura 18).

Figura 18. Perfil da atividade antiparasitária da NE Fit e % de morte do parasito.



Legenda: A) Percentual de morte do parasita comparando a NE FIT com a NE Br em 24h de teste; B) Percentual de morte do parasita comparando a NE FIT com a Solução de fitol livre em 24h de teste; C) Percentual de morte do parasita comparando a NE FIT com a NE Br em 48h de teste; D) Percentual de morte do parasita comparando a NE FIT com a Solução de fitol livre em 48h de teste. **Fonte:** Autoria própria (2022).

A NE FIT após 24h de incubação mostrou um perfil de morte do parasita na faixa de na concentração mais alta (200 µL/mL) de 38,94% e mantendo mesmo que baixa nas demais concentrações a morte do parasita. Enquanto a NE Br foi apenas de 11,35% na concentração mais alta e cessa a partir da concentração de 6,25 µL/mL. Já a SF de 27,75% na concentração de 200 µL/mL e na concentração de 6,25 µL/mL chega a quase nenhuma atividade antiparasitária (1,5%), cessando na concentração de 3,125 µL/mL.

Após 48h de incubação das amostras a NE FIT apresentou um perfil antileishmanicida de 73,11% na concentração de 200 µL/mL e apresenta atividade até a concentração de 6,25 µL/mL e cessando na concentração de 3,13 µL/mL. A NE Br na mesma concentração apresentou um perfil de morte do parasita de 19,38% e a SF de 21,56%, onde ambas a partir da concentração de 50 µL/mL já não apresentam atividade antileishmaniana. Estes dados não apresentaram diferença estatística significativa ($p > 0,05$) durante o tempo de estudo.

Em 24h foi observado um IC₅₀ para as NE Fit, NE Br e SFL foram de 289,7 µL/mL, 1245 µL/mL e 480,5 µL/mL, respectivamente. Após 48h de incubação esses IC₅₀ de NE Fit, NE Br e SFL foram de 127,7 µL/mL, 918 µL/mL e 713,5 µL/mL, respectivamente. É possível observar que a NE FIT possui uma capacidade antiparasitária maior frente SF e a NE Br. Já a NE Br, requer de altas concentração para apresentar uma morte parasitaria. Estes dados

também são comprovados após 48h de estudo, onde em doses ainda mais baixas de NE FIT se tem uma concentração inibitória para matar 50% dos parasitas, assim, podendo sugerir a maior eficácia antileishmanicida desta NE e sendo corroborada com o percentual de morte parasitaria.

De acordo autora Silva et al. (2015), esta mostra que uma fração da planta *Lacistema pubescens* rica em fitol (80%) apresentou uma boa atividade leishmanicida na forma promastigota e amastigota da *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis*. A atividade antiparasitária *L. amazonensis* nas concentrações testadas de 100 a 5 µg/mL apresentou um percentual de morte parasitaria de 77,9% a 29,6%, sendo a mesma cepa testada com a NE FIT. Desta maneira, estes resultados corroboram com os achados no presente estudo, onde é possível observar que a NE FIT tem um bom perfil contra o parasita testado, e quando comparada com a SF apresenta uma atividade superior, mostrando que o sistema desenvolvido é um possível agente terapêutico contra leishmaniose cutânea. É notório também que a atividade antiparasitária da NE FIT aumenta com o passar do tempo, sendo sugestivo que o sistema em questão é tempo-dependente para sua ação. Esse perfil observado pode ser explicado através das propriedades físico-químicas das NE, onde são sistemas de liberação controlada sendo capazes de controlar a velocidade de permeação e liberação do princípio ativo presente na NE (SILVA, 2004).

Essa atividade antiparasitária contra a leishmania pode ser reforçada pelo potencial antiparasitário relatado na literatura contra parasitas como contra o *Schistosoma mansoni*, onde o fitol demonstrou atividade citotóxica em ensaios *in vitro*, mostrando uma redução da atividade motora dos parasitas e morte das fêmeas a partir da concentração de 50 µg/mL e com 24h de incubação, já com 100 µg/mL sendo possível observar morte total dos parasitas tanto machos como fêmeas após 24h de incubação (DE MORAES et al., 2014). O fitol também demonstrou promissora atividade contra *Trypanosoma congolense* de acordo com o autor Saad et al, (2020) principalmente nas concentrações de 100 mg/kg de peso corpóreo.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo observou-se que após a obtenção da formulação final estas se mostraram estáveis pelo tempo de 30 dias, com características físico-químicas adequadas para nanotecnologia e sem a alteração estatística significativa ao longo do tempo analisado. Quando colocadas em condições mais extremas como a centrifugação, as NE também se mostraram estáveis, sendo um ótimo resultado para continuidade dos estudos de estabilidade a longo prazo.

Quanto ao ensaio hemolítico foi visto que a formulação quando menos concentrada apresenta uma baixa toxicidade aos eritrócitos, sendo o mesmo achado encontrado nos estudos *in vitro* em células 3T3, onde quanto menor a concentração testada maior a viabilidade celular frente a NE FIT. Já os resultados da atividade antiparasitária mostraram que a NE FIT possui um perfil antileishmania tempo-dependente e com percentual de morte do parasitaria relevante e até mesmo superior ao fármaco livre.

Portanto, o presente estudo revela que a NE FIT revelou uma promissora alternativa farmacológica para o tratamento da leishmaniose cutânea. Como perspectiva futura se tem desenvolvimento de estudos *in vivo* para observar seu comportamento nas lesões cutâneas e seu possível mecanismo de ação se fazem necessário em momentos futuros.

REFERÊNCIAS

- ABBIATI, T. C., Freitas, D. M., Alves, L. C., Freitas, B. G., Rezende, R. S., Barbosa, S. G., Jorge, A. L. T. A., Santos, S. M., & Lopes, M. C. Leishmaniose visceral canina: Relato de caso. **PUBVET**, 13, 1–8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.31533/pubvet.v13n4a307.1-8>
- ACOSTA, E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, 14 (1), 3-15, 2009.
- ADJONU, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S.. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, 122, 15–27, 2014. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.08.034
- AKHLAGHI S. P., Ribeiro I. R., Boyd B. J., Loh W. Impact of preparation method and variables on the internal structure, morphology and presence of liposomes in Phytantriol-Pluronic® F127 Cubosomes. **Colloids Surf B**, 145, 845, 2016.
- ALMEIDA, O. L., Santos, J. B. Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. **An Bras Dermatol**, v. 86, n. 3, p. 497–506, 2011.
- ALI, S., Radwan, A., Yousry, C., El-maadawy, W. H., Elmehad, A. N., & Shoukri, R. A. Impact of Reverse Micelle Loaded Lipid Nanocapsules on the Delivery of Gallic Acid into Activated Hepatic Stellate Cells : A Promising Therapeutic Approach for Hepatic Fibrosis, 37(9), 2020. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s11095-020-02891-z>
- ANSELL S.M., Harasym T.O., Tardi P.G., Buchkowsky S.S., Bally M.B., Cullis P.R., Antibody conjugation methods for active targeting of liposomes. **Methods Mol. Med.** 25, 51–68, 2000.
- ANTON, N., Benoit, J., Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates: a review. **J. Controlled Release**. 128, 185-199, 2008.
- ANTON, N.; Vandamme, T. F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharm Res**, 28, 978–985, 2011.
- ANVERSA L, Tiburcio MGS, Richini-Pereira VB and Ramirez LE, Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Rev Assoc Med Bras** 64: 281– 289, 2018.
- ARONSON NE, Addressing a clinical challenge: guidelines for the diagnosis and treatment of leishmaniasis. **BMC Med**, 15, 76, 2017.
- BALI, V., Ali, M., Ali, J. Study of surfactant combinations and development of a novel nanoemulsion for minimising variations in bioavailability of ezetimibe, **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 76, 410-420, 2010.
- BARRADAS T.N., Senna J.P., Cardoso S.A., de Holanda E., Silva K.G, Elias Mansur C.R. Formulation characterization and in vitro drug release of hydrogel-thickened nanoemulsions for topical delivery of 8-methoxypsoralen. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl**. 2018 Nov 1;92:245-253. doi: 10.1016/j.msec.2018.06.049.

BASTOS, M. M. et al. Quimioterapia Antileishmania: Uma Revisão da Literatura. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, 2016.

BELLO, M. L. et al. Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure-activity relationship (SAR). **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 5046-5052, 2011.

BENASSI, J. C., Benvenga, G. U., Ferreira, H. L., Soares, R. M., Silva, D. T., Pereira, V. F., Ruiz, V. L. A., & Oliveira, T. M. F. S. Molecular and serological detection of *Leishmania* spp. in horses from an endemic area for canine visceral leishmaniasis in southeastern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 38(6), 1058–1063, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-5150-PVB-5214>

BLACKWELL JM, Fakiola M., Ibrahim ME, Jamieson SE, Jeronimo SB, Miller EN, A. Mishra, Mohamed HS, Peacock CS, Raju M., Sundar S., Wilson ME **Genética e leishmaniose visceral: de camundongos e do homem Parasite Immunol.** , 31, pp. 254 – 266, 2009, DOI: [10.1111 / j.1365-3024.2009.01102.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2009.01102.x)

BOSCÁN, Freddy & Barandiaran, María & Paulis, María. From miniemulsion to nanoemulsion polymerization of superhydrophobic monomers through low energy phase inversion temperature. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**. 58, 2018. DOI: [10.1016/j.jiec.2017.08.052](https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.08.052).

BRASIL. Manual da Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. TRANSMISSÍVEIS, D. D. V. D. D. **Brasil: Ministério da Saúde (Recurso Eletrônico)**. 1: 189 p. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis – DEIDT. Boletim Epidemiológico, 2021 – **Doenças tropicais negligenciadas**. Número especial. 76p. Mar. 2021.

BRUXEL, Fernanda et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova [online]**. v. 35, n. 9 [Acessado 13 Setembro 2022] , pp. 1827-1840, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000900023>>.

BURZA S., Croft SL, Boelaert M. Leishmaniose. **Lancet**, 39, pp. 951 – 970, 2018. DOI: [10.1016 / S0140-6736 \(18\) 31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

BUTLER, A. R.; KHAN, S.; FERGUSON, E. A brief history of malaria chemotherapy. **The journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 40, n. 2, p. 172—177, 2010. Suffness & Pezzuto

CAPEK, I., Degradation of Kinetically-stable o/w emulsions, **Advances in Colloid Interfacial Science**, Amsterdam, v. 107, n.3 p. 125-55, 2004.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC) **Leishmaniasis: General Information (FAQs)** CDC, Atlanta (2018) [Accessed 28 apr 2022]. Available from: http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/gen_info/faqs.html

CHAKRAVARTY J and Sundar S, Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Pharmacother**, 20, 1251– 1265, 2019.

CHOWDHURY R.R., Ghosh S.K. Phytol-derived novel isoprenoid immunostimulants. **Front Immunol** 3: 49, 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00049.

CHUESIANG, P. Siripatrawan U., Sanguandeeikul R., McLandsborough L., Juli D. and McClements. Optimization of cinnamon oil nanoemulsions using phase inversion temperature method: Impact of oil phase composition and surfactant concentration. **Journal of Colloid and Interface Science**, 514, pp. 208-216, 2018.

CONITEC. Miltefosina para o tratamento da Leishmaniose Tegumentar. Brasília/DF: **Ministério da Saúde**, p.3, 2018.

CORTÉS-MUÑOZ, M., Chevalier-Lucia, D., Dumay, E. Characteristics of submicron emulsions prepared by ultra-high pressure homogenisation: effect of chilled or frozen storage. **Food Hydrocolloids**, 23 (3), 640–654, 2009.

COUVREUR P. Liposomes en clinique humaine: Le point sur les résultats thérapeutiques. In: Delattre J., Couvreur P., Puisieux F., Philippot J.-R. et Schuber F. eds. Les liposomes, aspects technologiques, biologiques et pharmacologiques, **Les éditions INSERM**, Paris, 214-224, 1993.

CROFT S.L., Sundar S., Fairlamb A. H. Drug resistance in Leishmaniasis. **Clin Microbiol Rev**, 19:111–126, 2006a. DOI: <https://doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>.

CROFT SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian J Med Res** 123:399–410, 2006b.

CUDDIHY, G.; Wasan E. K.; Di Y.; Wasan K.M. The Development of Oral Amphotericin B to Treat Systemic Fungal and Parasitic Infections: Has the Myth Been Finally Realized? **Pharmaceutics**, 11(3), 99, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11030099>.

DAVIES, J. T.; Rideal, E. K. Interfacial Phenomena. **New York: Academic Press**. Ed. 2, pp. 494, 1963.

DEHVARI K, Lin KS, Wang SS. Structural characterization and adsorption properties of pluronic F127 onto iron oxides magnetic nanoparticles. **J Nanosci Nanotechnol**. 14(3):2361-7, 2014. DOI: 10.1166/jnn.2014.8537.

DE MORAES, J.; de Oliveira, R. N.; Costa, J. P.; Junior, A. L.; de Sousa, D. P.; Freiras, R. M.; Allegretti, S. M.; Pinto, P. L. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 8(1), e2617, 2014.

DE PASQUALE, A. *Pharmacognosy: The oldest modern science*. **Journal of Ethnopharmacology**, 11(1), 1–16, 1984. doi:10.1016/0378-8741(84)90092-8.

DEWAN, M. et al. Effect of methyl cellulose on gelation behavior and drug release from P based ophthalmic formulations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 706–710, 2015.

DIMER FA, Friedrich RB, Beck RCR, et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Quím Nova**. 36(10):1520-26, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422013001000007>

DOANE TL, Burda C. The unique role of nanoparticles in nanomedicine: imaging, drug delivery and therapy. **Chem Soc Ver**. 41(7):2885-911, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1039/c2cs15260f>

DONSÌ, F., Annunziata, M., Vincensi, M., Ferrari, G. Design of nanoemulsionbased delivery systems of natural antimicrobials: effect of the emulsifier. **Journal of Biotechnology** 159 (4), 342–350, 2012.

DRÉNO, B.; Araviiskaia, E.; Berardesca, E.; Gontijo, G.; Sanchez Viera, M.; Xiang, L. F.; Martin, R.; Biber, T. Microbiome in healthy skin, update for dermatologists. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. 30 (12), 2038-2047, 2016. DOI: 10.1111/jdv.13965.

DUA, V.K et al. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya. India **J. Ethnopharmacol**. 136, 123–128, 2011.

ECKHART, L.; Zeeuwen, P. L. J. M. The skin barrier: Epidermis vs environment. **Experimental Dermatology**. 27, (8), 805-806, 2018. DOI: 10.1111/exd.13731

FARAJZADEH S. et al. Comparison between combination therapy of oral terbinafine and cryotherapy versus systemic meglumine antimoniate and cryotherapy in cutaneous leishmaniasis: a randomized clinical trial. **Iran J Parasitol** 10:1–8, 2015.

FARAJZADEH S et al. Topical terbinafine in the treatment of cutaneous leishmaniasis: triple blind randomized clinical trial. **J Parasit Dis** 40:1159–1164, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0641-1>.

FERNANDEZ, Patrick & André, Valérie & Rieger, Jens & Kühnle, Angelika. Nano-Emulsion Formation by Emulsion Phase Inversion. **Aspects**. 251. 53-58, 2004. 10.1016/j.colsurfa.2004.09.029.

FLORIANÓPOLIS. Secretaria Municipal de Saúde. Vigilância em Saúde. Protocolo de cuidados de feridas / Coordenado por Antônio Anselmo Granzotto de Campos; Organizado por Lucila Fernandes More e Suzana Schmidt de Arruda. Florianópolis: **IOESC**, 70 p. II, 2007 [Accessado 15 junho 2022]. Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/26_10_2009_10.46.46.f3edcb3b301c541c121c7786>

FOGANHOLI, J. N., & Zappa, V. (2011). Importância da leishmaniose na saúde pública. **Revista Científica Eletretrônica de Medicina Veterinária**, 17, 1–45.

FRANÇA-SILVA, J. C. et al. Importance of *Lutzomyia longipalpis* in the dynamics of transmission of canine visceral leishmaniasis in the endemic area of Porteirinha Municipality, Minas Gerais, **Brazil**. **Veterinary Parasitology**, 131(3-4):213-220, 2005.

FREITAS-JUNIOR L.H., Chatelain E., Kim H.A., Siqueira-Neto J. L. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **Int J Parasitol Drugs Drug Resist** 2:11–19, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/J.IJPDDR.2012.01.003>.

FRYD, M.M. and Marson, T. G. Advanced nanoemulsions. **Annu. Rev. Phys. Chem.** 63, 493-518, 2012.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. A saúde no Brasil em 2030: diretrizes para a prospecção estratégica do sistema de saúde brasileiro. Rio de Janeiro: **Fiocruz/Ipea/ Ministério da Saúde/Secretaria de Assuntos Estratégicos da Presidência da República**, 2012. 323 p. : il. ; tab. ; graf.

GANACHAUD, F., & Katz, J. L. Nanoparticles and nanocapsules created using the ouzo effect: spontaneous emulsification as an alternative to ultrasonic and high-shear devices. **ChemPhysChem**, 6(2), 209-216, 2005.

GAUMET, M. et al. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1-9, 2008.

GREEN ME. Leishmaniose canina: 4 regras básicas para preveni-la. [Acessado 15 de agosto de 2022] disponível em: <<https://www.greenme.com.br/morar/gato-e-cachorro/59062-leishmaniose-canina-4-regras-basicas-para-preveni-la/>>.

GHANEIAN, M. T., Ehrampoush, M. H., Jabali, A., Hekmatimoghaddam, A., Mahmoudi, M. Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as novel surface disinfectant. **Environmental Health Engineering and Management Journal**, 2, pp. 13-16, 2015.

GHORBANI M and Farhoudi R, Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? **Drug Des Devel Ther** 22: 25– 40, 2017.

GONTIJO, B. B., Pavão, F. F., Silva, F. S. A., Silva, F. D., Tavares, G. C. & Coelho, G. L. Esporotricose e Leishmaniose Tegumentar em cães e gatos: semelhanças e diferenças. **PUBVET**, 51245-1250, 2011.

GOODWIN, J. W. Colloids and interfaces with surfactants and polymers - an Introduction. Portland, Oregon, USA, John Wiley & Sons, Ltd. 2004.

GRIENSVEN, J. Van; Boelaert, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **Lancet (London, England)**, v. 377, n. 9764, p. 443–4, 2011.

GONZALEZ U, Pinart M, Reveiz L, Alvar J. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Issue 4. Art. No.: CD005067, 2008. DOI: 10.1002/14651858.CD005067.pub3

GULLAPALLI, R.P., Sheth, B.B. Influence of an optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil-in-water emulsions, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 48, 233-238, 1999.

GUO, J.; Yuan, Y.; Lu, D.; Du, B.; Xiong, L.; Shi, J et al. Two natural products, trans-phytol and (22E)-ergosta-6,9,22-triene-3 β ,5 α ,8 α -triol, inhibit the biosynthesis of estrogen in human

ovarian granulosa cells by aromatase (CYP19). **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 279, p. 23-32, 2014.

GUPTA, Ankur et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft matter**, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016.

GHOSH A., Roughgarden T., and Sundarajan M. Universally utilitymaximising privacy mechanisms. **SIAM J. COMPUT**, vol. 41, n. 6, pp. 1673–1693, 2012.

HANDLER M.Z., Patel P.A., Kapila R., Al-Qubati Y., Schwartz R.A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Clinical perspectives. **J Am Acad Dermatol**. 73(6), pp. 897-908, 2015. DOI: 10.1016/j.jaad.2014.08.051.

HENDRICKX, Sarah & Caljon, Guy & Maes, Louis. (2019). Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. **Parasitology Research**. 118. 10.1007/s00436-019-06443-2.

HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 1). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 255–264, 2013.

IFRA. (International Fragrance Association) Use Level Survey, 2004.

Informes Técnicos Institucionais. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, 44 (1), 200-202, 2010. DOI: 10.1590/S0034-89102010000100023

ISCHEBECK, T., Zbierzak, A.M., Kanwischer, M., Dörmann, P. A salvage pathway for phytol metabolism in Arabidopsis. **J. Biol. Chem**. 281, 2470–2477, 2006.

ISLAM MT, de Alencar MV, da Conceição Machado K, da Conceição Machado K, de Carvalho Melo-Cavalcante AA, de Sousa DP, de Freitas RM. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chem. Biol. Interact**. 240:60-73, 2015.

ISLAM, M. T. et al. Preparation of phytol-loaded nanoemulsion and screening for antioxidant capacity. **International Archives of Medicine**, p. 1–15, 2016a.

ISLAM, M.T.; Santos, J.V.O.; Ferreira, J.R.O.; Sousa, J.M.C.; Paz, M.F.C.J.; Carvalho, R.M.; et al. A Possible phytol-cytoprotective trait through reactive species-induced oxidative stress ebbing pathway. **International Archives of Medicine**, v.9, p. 1-11, 2016b.

ISLAM, M.T., Streck, L., de Alencar, M.V., Cardoso Silva, S.W., da Conceição Machado, K., da Conceição Machado, K., Gomes Júnior, A.L., Paz, M.F., da Mata, A.M., de Castro, E., Sousa, J.M., da Costa Junior, J.S., Lins Rolim, H.M., da Silva-Junior, A.A., de Carvalho Melo-Cavalcante, A.A., Evaluation of toxic, cytotoxic and genotoxic effects of phytol and its nanoemulsion. **Chemosphere** 177, 93–101, 2017.

JAFARI, S. M.; Assadpoor, E.; He, Y.; Bhandari, B.; **Food Hydrocolloids**, 22, 1191, 2008.

JAISWAL M, Dudhe R, Sharma PK. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. **3 Biotech**. Apr;5(2):123-127, 2015. DOI: 10.1007/s13205-014-0214-0.

JASMINA H, Dzana O, Alisa E, Edina V, Ognjenka R. Preparation of Nanoemulsions by High-Energy and Low- Energy Emulsification Methods. **Springer (Singapore)**, v. 62; p. 317–22, 2017.. DOI: <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4166-2>.

JUNG Y.-S., Park W., Park H., Lee D.-K., Na K., Wang S.S.S, Wu C.-M., Mdlovu N.B., Lin Y.-S. Thermo-sensitve injectable hydrogel based on the physical mixing of hyaluronic acid and Pluronic F-127 for sustained NSAID delivery. **Carbohydr. Polym.**, v. 156, pp. 403-408, 2017.

JUNIOR, E. da S.; Junior, G. B. Z.; Zanella, I.; Raffin, R.; Cielo, V.; Rossato, J.; Bulhões, L. O. S. Formação de nanoemulsões do tipo óleo em água contendo óleo de semente de romã. **Disciplinarum Scientia. Série: Ciências Naturais e Tecnológicas**, Santa Maria, 14, 1, 115-122, 2013.

KARAMI M., Doudi M., Setorki M. Avaliação da epidemiologia da leishmaniose cutânea em Isfahan, Irã **J. Vector Borne Dis.** 50 (1), p. 30, 2013.

KASZUBA, M.; Corbett, J.; Watson, F. M.; Jones, A. High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. **Phil. Trans. R. Soc. A**, 368, 4439–4451, 2010.

KAYSER O., Kiderlen A.F., Croft S.L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitol Res** 90(Suppl 2): S55–S62, 2003. DOI: 10.1007/s00436-002-0768-3.

KENTISH, S., Wooster, T. J., Ashokkumar, M., Balachandran, S., Mawson, R., & Simons, L. The use of ultrasonics for nanoemulsion preparation. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, 9(2), 170-175, 2008.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, v. 32, p.579-593, 2015.

KIMA, P.E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **Int. J. Parasitol.** 37, 1087–1096, 2007.

KIP, A. E., Schellens, J. H. M., Beijnen, J. H., & Dorlo, T. P. C. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clin Pharmacokinet.** v.57, p.151–176, 2018.

KUE, C.S. et al Small molecules for active targeting in cancer. **Med. Res. Rev.** 36(3), 494–575, 2016.

KUMAR M., Bishnoi R.S., Shukla A.K., Jain C.P. **Techniques for formulation of nanoemulsion drug delivery system: a review** Prevent. Nutr. Food Sci., 24 (3), pp. 225-234, 2019. DOI: [10.3746/pnf.2019.24.3.225](https://doi.org/10.3746/pnf.2019.24.3.225).

LANDIM, Marcela Guimarães. Study of the antibacterial activity of nanoemulsion based on copaiba oil (*Copaifera officinalis*) and its combination with anacardic acid . 2019. 99 f., il. Dissertation (Master's in Nanoscience and Nanobiotechnology)University of Brasília, Brasília, 2019.

LEE, S., McClements, D. Fabrication of protein-stabilised nanoemulsions using a combined homogenisation and amphiphilic solvent dissolution/evaporation approach. **Food Hydrocolloids** 24 (6–7), 560–569, 2010.

LIMA T.L.C., Souza L.B.F.C., Tavares-Pessoa L.C.S., Santos-Silva A.M.D., Cavalcante R.S., Araújo-Júnior R.F., Cornélio A.M., Fernandes-Pedrosa M.F., Chaves G.M., Silva-Júnior A.A.D. Phytol-Loaded Solid Lipid Nanoparticles as a Novel Anticandidal Nanobiotechnological Approach. **Pharmaceutics**. 13; 12(9):871, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12090871.

LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the Skin and the Pathogenesis of Nonmelanoma Skin Cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**. 25(3), 283 – 289, 2017. DOI: 10.1016/j.fsc.2017.03.001.

MARCO, C. et al. Hexadecylphosphocholine alters nonvesicular cholesterol traffic from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum and inhibits the synthesis of sphingomyelin in HepG2 cells. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 6, p. 1296-1303, 2009.

MAROLI, M.; Feliciangeli, M.D.; Bichaud, L.; Charrel, R.N.; Gradoni, L. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med. Vet. Entomol.**, 27, 123–147, 2013.

MASSON, D.S.; Morais, G.G.; Morais, J.M.; Andrade, F.F.; Santos, O.D.H.; Oliveira, W.P.; Rocha-Filho, P.A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of o/w emulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 26, p. 463-468, 2005.

MAYER, S.; Weiss, J.; McClements, D. J. Vitamin E-enriched nanoemulsions formed by emulsion phase inversion: factors influencing droplet size and stability. **J. Colloid Interface Sci.**, 402, pp. 122-130, 2013. DOI: 10.1016/j.jcis.2013.04.016.

MCCLEMENTS, D.J., Rao, J. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition** 51 (4), 285–330, 2011.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, difference, and similarities. **Soft Matter**, 8, 1719–1729, 2012a.

MCCLEMENTS, D. J.; JAFARI, S. M. Chapter 1—General aspects of nanoemulsions and their formulation. *Nanoemulsions* (pp. 3-20). 2018.

MCGINTY D., Letizia C.S., Api A.M. Fragrance material review on phytol. **Food Chem Toxicol** 48 Suppl 3: S59–S63, 2010. DOI: 10.1016/j.fct.2009.11.012.

MDLOVU N.V., Mavuso F.A., Lin K.-S., Chang T.-W., Chen Y., Wang S.S.S., Wu C. M., Mdlovu N.B., Lin Y.-S. Iron oxide-pluronic F127 polymer nanocomposites as carriers for a doxorubicin drug delivery system. **Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.**, 562, pp. 361-369, 2019.

MENEZES, Y.A.; Félix-Silva, J.; Da Silva-Júnior, A.A.; Rebecchi, I.M.; De Oliveira, A.S.; Uchoa, A.F.; Fernandes-Pedrosa, M.d.F. Protein-rich fraction of *cnidoscolus urens* (L.) arthur

leaves: Enzymatic characterization and procoagulant and fibrinolytic activities. **Molecules**, 19, 3552–3569, 2014.

MERTINS, O.; Sebben, M.; Schneider, P. H.; Pohlmann, A. R.; Silveira, N. P. da. Caracterização da pureza de fosfatidilcolina de soja através de RMN de ¹H e de ³¹P. **Revista Química Nova**. V. 31, n. 7.p. 1856-1859, 2008.

MEWIS, J., & Wagner, N. *Colloidal Suspension Rheology* (Cambridge Series in Chemical Engineering). **Cambridge: Cambridge University Press.** 2011
DOI:10.1017/CBO9780511977978

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. Brasília/DF: **Misnistério da Saúde**, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Doenças tropicais negligenciadas. Secretaria de Vigilância Sanitária: **Ministério da Saúde**, 2021.

MNYUSIWALLA, Anisa & Daar, Abdallah & Singer, Peter. Mind the Gap’: Science and Ethics in Nanotechnology”, **Nanotechnology**, 14, R9-R13, 2003. DOI: 10.1088/0957-4484/14/3/201.

MOMEN H., Grimaldi Junior G., Deane LM Leishmania infantum, o agente etiológico da leishmaniose visceral americana (LVA)? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 82, pp. 447 – 448, 1987.

MONTANHA, F. P., Azevedo, M. G. P., Fernandes, T. S., Oshima, T. M., Remuszka, R. D. E., & Santos, M. M. Leishmaniose canina–relato de caso. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, 20, 1–6, 2013.

MOORE, A.L., Marshall, C.D., Barnes, L. A., et al.; Scarless wound healing: transitioning from fetal research to regenerative healing Wiley Interdisciplinary Reviews. **Developmental Biology**, v. 7, n. 2, pp. 251-263, 2018.

MOOSAVIAN KALAT S.A., Khamesipour A., Bavarsad N., Fallah M., Khashayarmanesh Z., Feizi E., Neghabi K., Abbasi A., Jaafari M.R. Use of topical liposomes containing meglumine antimoniate (Glucantime) for the treatment of L. major lesion in BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 5-10, 2014.

MOSMANN, Tim. 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.

MOSSER, D.M.; Edelson, P.J The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of Leishmania major. **Nature**, 327, 329–331, 1987.

MOUGNEAU, E.; Bihl, F.; Glaichenhaus, N. Cell biology and immunology of Leishmania. **Immunological reviews**, v. 240, n. 1, p. 286–96, 2011.

NEWMAN D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J Nat Prod** 75: 311–35., 2012. DOI: 10.1021/ np200906s.

NORNOO A.O., Osborne D.W., Chow D.S. Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel I: formulation, cytotoxicity and hemolysis. **Int J Pharm**, 12;349(1-2):108-16, 2008. doi: 10.1016/j.ijpharm.2007.07.042.

NGUYEN, A. V.; Soulika, A. M. The Dynamics of the Skin's Immune System. **International Journal of Molecular Sciences**. 12;20(8):1811, 2019. DOI: 10.3390/ims20081811.

Leishmaniasis. **World Health Organization (WHO)**. 14 de março de 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. Acesso em: 05 de agosto de 2022.

ORYAN, A.; Akbari, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 9, n. 10, p. 925-932, 2016.

ODRIOZOLA-SERRANO, Isabel; Oms-Oliu, Gemma; Martín-Belloso, Olga. Nanoemulsion-based delivery systems to improve functionality of lipophilic components. **Frontiers in nutrition**, v. 1, p. 24, 2014.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta tropica**, v. 118, n. 2, maio 2011a.

OLIVEIRA, J. S.; Aguiar, T. A.; Mezdari, H.; Henrique, O. D. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 60, p. 13014–13018, 2011b.

Organização Mundial da Saúde (OMS) **Leishmaniose: informações básicas. Uma breve história da doença** OMS (2018) [Acessado em 15 de agosto de 2022]. disponível em: <www.who.int/leishmaniasis/en/>

OUALLA-BACHIRI, W., Fernández-González, A., Quiñones-Vico, M. I., et al.; From Grafts to Human Bioengineered Vascularized Skin Substitutes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 21, pp. 1-28, 2020.

PEY, C. M. et al Optimization of nano-emulsions prepares by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial desing study. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspecys**, v. 288, p. 144-150, 2006.

POUTON, C.W., Porter, C.J.H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies, Adv. **Drug Deliv. Rev.**, 60,625-637, 2008.

QADIR, A. et al Critical steps and energetics involved in a successful development of a stable nanoemulsion. **Journal of Molecular Liquids**, 214, 7-18, 2016.

QIAN, C.; McClements, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size **Food Hydrocoll.**, 25 , pp. 1000-1008, 2011. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2010.09.017.

RAHN-Chique K, Puertas AM, Romero-Cano MS, Rojas C, Urbina-Villalba G Evaluación de la velocidad de floculación de nanoemulsiones aceite/agua. 1. Desarrollo de expresiones teóricas para la turbidez de una nanoemulsión. **Interciencia** 37: 577-581, 2012a.

RAHN-Chique, K., Puertas, AM, Romero-Cano, MS, Rojas, C., & Urbina-Villalba, G. Estabilidade da nanoemulsão: Avaliação experimental da taxa de floculação a partir de medidas de turbidez. **Avanços em Colloid and Interface Science**, 178, 1-20, 2012b. DOI:10.1016/j.cis.2012.05.001

RAI, V.K., Mishra, N., Yadav, K. S. e Yadav, N.P. Nanoemulsion as pharmaceutical carrier for dermal and transdermal drug delivery: Formulation development, stability issues, basic considerations and applications. **Journal of controlled release**, 270, 203-225, 2018.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

REITHINGER R., Dujardin J.-C., Louzir H., Pirmez C., Alexander B., S. Brooker Leishmaniose cutânea **Lancet Infect. Dis.**, 7 (9), pp. 581 – 596, 2007.

RIBEIRO, T. G. et al. An optimized nanoparticle delivery system based on chitosan and chondroitin sulfate molecules reduces the toxicity of amphotericin B and is effective in treating tegumentary leishmaniasis. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 5341-5353, 2014.

REBOUÇAS, Louhana Moreira. Nanoemulsões à base de ácido betulínico e óleo de linhaça: uma proposta para o tratamento de carcinoma colorretal. 2019. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

RIJAL S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TP, et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clin Infect Dis**. 56(11):1530–8, 2013.

ROGER, M., Fullard, N., Costello, L., et al., 2019, “Bioengineering the microanatomy of human skin”. *Journal of anatomy*, v. 234, n. 4, pp. 438–455. Available in: < <https://doi.org/10.1111/joa.12942> >. Access on: 10 fev. 2023.

RONTANI, J-F., Volkman, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1–35, 2003.

ROSANI, L. Desenvolvimento e estudo da estabilidade de nanoemulsões do tipo óleo em água com óleos vegetais. Dissertação Mestrado em Química, Universidade de Federal de São Carlos, São Paulo, 2011.

RYU K.R., Choi J.Y., Chung S., Kim D.H. Anti-scratching behavioral effect of the essential oil and phytol isolated from *Artemisia princeps* Pamp. in mice. **Planta Med** 77: 22–26, 2011 DOI:[10.1055/s-0030-1250119](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250119)

SAAD, S.B., IBRAHIM, M.A., JATAU, I.D., SHUAIBU, M.N. The therapeutic potential of phytol towards *Trypanosoma congolense* infection and the inhibitory effects against trypanosomal sialidase. **Exp Parasitol**. 2020. doi: 10.1016/j.exppara.2020.107943.

SAIKIA D, Parihar S, Chanda D, Ojha S, Kumar JK, Chanotiya CS, Shanker K, Negi AS. Antitubercular potential of some semisynthetic analogues of phytol. **Bioorg Med Chem Lett.** 5;20(2):508-12, 2010. DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.11.107.

SALAMANCA-BUENTELLO, Fabio & Persad, Deepa & Court, Erin & Martin, Douglas & Daar, Abdallah & Singer, Peter. Nanotechnology and the Developing World. **PLoS medicine.** 2, e97, 2005. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020097.

SALAM N., Al-Shaqha WM., Azzi A. Leishmaniose no Oriente Médio: incidência e epidemiologia **PLoS Neglected Trop. Dis.** 8 (10), 2014.

SAMPAIO, R.N.R.; LUCAS, I.C.; TAKAMI, H. L. Inefficacy of the association N-methyl glucantime and topical miltefosine in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, v. 13, n. 3, p. 598–606, 2007.

SANTOS, D.O. et al Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. **Parasitol Res** 103:1–10, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0943-2>.

SATHYA, S., Shanmuganathan, B., Saranya, S., Vaidevi, S., Ruckmani, K., Pandima Devi, K. Phytol-loaded PLGA nanoparticle as a modulator of Alzheimer's toxic A β peptide aggregation and fibrillation associated with impaired neuronal cell function. **Artif Cells Nanomed. Biotechnol.** 25, 1–12, 2017.

SAVOIA D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **J Infect Dev Ctries.** 4, 9(6), p.588-96, 2015. DOI: 10.3855/jidc.6833.

SCOTT P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nat Rev Immunol.** 16(9):581-92, 2016.

SEMRA, P., Jos, H. B., Thomas, P.C. D. An update on the clinical pharmacology of miltefosine in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Volume 59, Issue 1, 2022.

SAXENA, V., Hasan, A., Sharma, S., & Pandey, L. M. Nanoemulsão de óleo comestível: um nanoantibiótico orgânico como potencial veículo de entrega de biomoléculas. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials** , 67 (7), 410-419, 2018.

SHAFIQ-UN-NABI S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A, Khar RK, Ali M. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. **AAPS PharmSciTech.** 6;8(2):Article 28, 2007. DOI: 10.1208/pt0802028.

SHAKEEL, F.; Haq , N.; Alanazi, F. K.; Ibrahim, A. A. Impacto f various nanionic surfactants on selfnanoemulsification efficiency of two grades of Capryol (Capryol-90 and Capryol-PGMC). **Jounal of Molecular Liquids**, 14, 57-63, 2013.

SHARMA, A.K.; Gothwal A; Kesharwani P.; Alsaab H.; Iyer A.K.; Gupta U. Dendrimer nanoarchitectures for cancer diagnosis and anticancer drug delivery. **Drug Discov Today.** v.22, n. 2, p. 314-326, 2017. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.09.013.

SILVA, G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. **Surg Neurol.** 61(3):216-20, 2004. DOI: 10.1016/j.surneu.2003.09.036.

SILVA, J.M. et al HPLC-DAD analysis, antileishmanial, antiproliferative, and antibacterial activities of *Lacistema pubescens*: an Amazonian medicinal plant. **Biomed** 16 Res Int. 0-7, 2014.

SILVA, JM. et al O efeito da fração rica em fitol de *Lacistema pubescens* contra *Leishmania amazonensis* é mediado pela disfunção mitocondrial. **Parasitologia Experimental**, 159, 143-150, 2015. DOI: 10.1016 / j.exppara.2015.09.009.

SINGH N., Kumar M., Singh R.K., Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets, **Asian Pac. J. Trop. Med.** 5, 485–497, 2012. DOI:10.1016/S1995-7645(12)60084-4.

SINGH, Y., Meher, JG, Raval, K., Khan, FA, Chaurasia, M., Jain, NK e Chourasia, MK Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release**, 252, 28-49, 2017.

SOLANS, C. and Solé, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods, **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, 17 (5), pp. 246-254, 2012. DOI: 10.1016/j.cocis.2012.07.003

SOLÉ, I.; Maestro, A.; González, C.; Solans, C.; Gutiérrez, J. M. Optimization of nano-emulsion preparation by low-energy methods in an ionic surfactant system. **Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids**, Washington, p8326-8332, 2006.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World Cutaneous Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, 38(9), 1266–1272. 2004.

STEINBERG, D., Avigan, J., Mize, C.E., Baxter, J.H., Cammermeyer, J., Fales, H.M., Hight, P.F. Effects of dietary phytol and phytanic acid in animals. **Journal of Lipid Research**, v. 7, p. 684-691, 1966.

STEVERDING D, The history of leishmaniasis. **Parasit Vectors** 10: 82, 2017.

STRECK, L. et al. Phase transitions of isotropic to anisotropic biocompatible lipid-based drug delivery systems overcoming insoluble benznidazole loading. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 7, p. 1–18, 2016.

SU, K.L., Schmid, H.H. Metabolism of long-chain isoprenoid alcohols. Incorporation of phytol and dihydrophtol into the lipids of rat brain. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 380, p. 119-126, 1975.

SUFFNESS, M.; Pezzuto, J. M.; Hostettmann, K. Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity. **Methods in Plant Biochemistry**, 6th ed.; **Hostettmann, K., Ed**, p. 33-71, 1990.

SUGUMAR S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Nanoemulsion formation and characterization by spontaneous emulsification: Investigation of its antibacterial effects on *Listeria monocytogenes*. **Asian J Pharm.** 9:23-8, 2015.

SUNDAR, S.; Sinha, P. K.; Verma, D. K.; Kumar, N.; Alam, S.; Pandey, K.; Kumari, P.; Ravidas, V.; Chakravarty, J.; Verma, N.; Berman, J.; Ghalib, H.; Arana, B. Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 2, p. 115–7. 2011.

TANG, S. Y.; Manickam, S.; Wei, T. K.; Nashiru, B. Formulation development and optimization of a novel Cremophore EL-based nanoemulsion using ultrasound cavitation. **Ultrasonics Sonochemistry**, 19, 330–345, 2012.

TAPIA-HERNÁNDEZ, J. A., Del-Toro-Sánchez, C. L., Cinco-Moroyoqui, F. J., Ruiz-Cruz, S., Juárez, J., Castro-Enríquez, D. D., ... Rodríguez-Félix, F. Gallic Acid-Loaded Zein Nanoparticles by Electrospraying Process. **Journal of Food Science**, 84(4), 818–831, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14486>

TIUMAN TS, et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. 15:525-32, 2011.

TIWARI, N., Gedda, M. R., Tiwari, V. K., Singh, S. P., & Singh, R. K.. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 1, p. 26-41, 2018. DOI: 10.2174/1389557517666170425105129.

TRADOS, T. F.; Izquierdo, P.; Esqueno, J.; Solans, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in colloid and Interface Science**, 108-109, 303- 318, 2004.

TORRES-GUERRERO E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. **F1000Res**. 26; 6:750, 2017. DOI: 10.12688/f1000research.11120.1.

VAN DEN BRINK, D.M., Wanders, R.J.A. Phytanic acid: production from phytol, its breakdown and role in human disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 15, p. 1752-1765, 2006.

VÁSQUEZ, L. et al. Pharmacokinetics of experimental pentavalent antimony after intramuscular administration in adult volunteers. **Current Therapeutic Research**, v. 67, n. 3, p. 193-203, 2006/05/01/ 2006.

VAKILI B., Nezafat N., Zare B., Erfani N., Akbari M., Ghasemi Y., Rahbar M.R. , Hatam G.R. A new multi-epitope peptide vaccine induces immune responses and protection against *Leishmania infantum* in BALB/c mice **Med. Microbiol. Immunol.**, 209 (1) (2020), pp. 69-79.

VERMA, N. K.; Dey, C. S. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48(8), 3010–3015. 2004.

VETTER W, Schroder M, Lehnert K. Differentiation of refined and virgin edible oils by means of the trans- and cis-phytol isomer distribution. **J Agric Food Chem**. 60: 6103–6107, 2012. DOI: 10.1021/jf301373k.

VOSTALOVA. J.: Galandáková, A.; Zalesak, B.; Lichnovska, R.; Cizkova, K.; Ulrichova, J.; Rajnochova Svobodova, A. Changes in antioxidant, inflammatory and metabolic markers during 1 week cultivation of human skin explants. **Journal of Applied Toxicology**. 39(5), 773-782, 2019. DOI: 10.1002/jat.3766.

WALKER, D.M.; Oghumu, S.; Gupta, G.; McGwire, B.S.; Drew, M.E.; Satoskar, A.R. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cell Mol. Life Sci.**, 71, 1245–1263, 2014.

WILSON, R. J., Li, Y., Yang, G., & Zhao, C. X. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, 64, 85-97, 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis – WHO, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 20 nov. 2022.

WU, Y., Li, Y. H., Gao, X. H., & Chen, H. D. The application of nanoemulsion in dermatology: an overview. **Journal of drug targeting**, 21(4), 321-327, 2013.

YUKUYAMA, M. N., Ghisleni, D. D. M., Pinto, T. J. A., & Bou-Chacra, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics - a review. **International Journal of Cosmetic Science**, 38(1), 13–24, 2015. DOI:10.1111/ics.12260

ZHANG, Y., Pu, C., Tang, W., Wang, S., & Sun, Q. Gallic acid liposomes decorated with lactoferrin: Characterization, in vitro digestion and antibacterial activity. **Food Chemistry**, 293, 315–322, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.04.116>