**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS – CCAE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**BIANCA DE OLIVEIRA BOTELHO**

# EFEITO IN VITRO DE COMPLEXO ENTRE CETOCONAZOL E ÁCIDO *p*-SULFÔNICO CALIX[6]ARENO SOBRE *Leishmania amazonensis* ***e*** *Leishmania infantum*

**ALEGRE-ES**

**2019**

BIANCA DE OLIVEIRA BOTELHO

# EFEITO IN VITRO DE COMPLEXO ENTRE CETOCONAZOL E ÁCIDO *p*-SULFÔNICO CALIX[6]ARENO SOBRE *Leishmania amazonensis* ***e*** *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.
Orientador: Prof. Dr.: Vagner Tebaldi de Queiroz
Coorientador: Prof. Dr.: Francisco de Paula Careta

**ALEGRE-ES**

**2019**

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

---

Botelho, Bianca de Oliveira, 1993-
B748e Efeito in vitro de complexo entre cetoconazol e ácido p sulfônico calix[6]areno sobre Leishmania amazonensis e Leishmania infantum / Bianca de Oliveira Botelho. - 2019.
63 f. : il.

Orientador: Vagner Tebaldi de Queiroz.
Coorientador: Francisco de Paula Careta.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias e Engenharias.

1. Calix[n]arenos. 2. Leishmaniose. 3. Tratamento. 4. Complexo de inclusão. 5. Cetoconazol. 6. Promastigotas. I. Queiroz, Vagner Tebaldi de. II. Careta, Francisco de Paula. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias e Engenharias. IV. Título.

CDU: 619

---

BIANCA DE OLIVEIRA BOTELHO

**EFEITO IN VITRO DE COMPLEXO ENTRE CETOCONAZOL E ÁCIDO *P*-SULFÔNICO CALIX[6]ARENO SOBRE** *Leishmania amazonensis* **e** *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas

Aprovado em 26 de Fevereiro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA

Vagner T. de Queiroz

**Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz**
**Universidade Federal do Espírito Santo**
**Orientador**

**Prof.(a) Dr.(a) Isabella Vilhena Freire Martins**
**Universidade Federal do Espírito Santo**
**Examinador interno**

**Prof. Dr. Sergio Antonio Fernandes**
**Universidade Federal de Viçosa**
**Examinador externo**

## AGRADECIMENTOS

Graças dou a Deus por tudo o que Ele é pra mim. Pelo seu braço forte que me sustentou até aqui, e por suas promessas que nunca caíram por terra. Porque Dele, por Ele, e para Ele são todas as coisas. Sendo esse agradecimento apenas uma parte do que sou eternamente grata.

Aos meus pais, Silvana e José Epifânio, dos quais foram essenciais na formação do meu caráter e fé. Especialmente à minha querida mãe que nunca me deixou desistir dos meus sonhos e tem me ajudado tanto em oração. Assim também como minha irmã Amanda.

Agradeço ao meu esposo, Sigundo, por todo suporte durante os momentos bons e nos mais difíceis, e por todo amor e dedicação à nossa família.

Agradeço a Universidade Federal do Espírito Santo por todo suporte, apoio técnico, financeiro, estrutural e aos professores que contribuem para que tantas pesquisas aconteçam.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz pela confiança em mim depositada, pela imensa paciência e valiosos ensinamentos, que culminaram em ótimos resultados.

Ao meu coorientador Dr. Francisco de Paula Careta que tanto tem me ajudado e me dado toda orientação necessária para a execução do experimento.

Ao Professor Dr. Marcos Santos Zanini por permitir a utilização de equipamentos necessários para o andamento do projeto.

Agradeço à banca examinadora, composta pelos professores Dra. Isabella Vilhena Freire Martins e Professor Dr. Sergio Antonio Fernandes pelas colaborações e sugestões apresentadas.

Agradeço aos pesquisadores do Grupo de Química Supramolecular e Biomimética do (GQSB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV) coordenado pelo professor Dr. Sergio Antonio Fernandes que gentilmente cederam os compostos testados.

Agradeço aos técnicos dos laboratórios de Bioquímica, Produção Farmacêutica e Análises Clínicas, em especial à Sandra e Gerusa por toda amizade e serviços prestados.

Às meninas do laboratório de Cultivo celular, por toda amizade e companheirismo, especialmente Taysa e Rhaira, que foram grandes amizades que espero levar para vida toda. Agradeço também à Taysa pelo treinamento para o experimento.

Aos colegas de disciplina pela companhia nas aulas e nos trabalhos, e pela amizade construída.

Enfim, sou muito grata a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram em qualquer aspecto do meu experimento e percurso durante o mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“ Mas os que esperam no Senhor renovarão as suas forças, subirão com asas como águias: correrão e não se cansarão; caminharão, e não se fatigarão. ”

Isaías, cap. 40, v.31.

# RESUMO

BOTELHO, BIANCA DE OLIVEIRA. **EFEITO IN VITRO DE COMPLEXO ENTRE CETOCONAZOL E ÁCIDO *p*-SULFÔNICO CALIX[6]ARENO SOBRE** *Leishmania amazonensis* **E** *Leishmania infantum.* 2019. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

O cetoconazol tem sido descrito como um bom agente leishmanicida, no entanto, a baixa solubilidade aquosa do fármaco pode limitar sua biodisponibilidade e, consequentemente, sua eficácia terapêutica. O ácido *p*-sulfônico calix[n]areno tem sido utilizado em estudos para melhorar a solubilidade e eficácia de fármacos através da formação de complexos de inclusão. Objetivou-se avaliar o efeito in vitro do complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ) sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, bem como sua toxicidade para macrófagos da linhagem DH82. Foi avaliado o efeito leishmanicida e a toxicidade do CLX/CTZ, do cetoconazol puro (CTZ) e da mistura física dos dois compostos (MF) pelo método da resazurina. O valor de $IC_{50}$ do CLX/CTZ, CTZ e da MF sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi de 3,95; 14,35 e 13,87 µM; e em L. *infantum* foi de 6,74; 17,47 e 17,54 µM, respectivamente. O CLX/CTZ, CTZ e a MF não apresentaram toxicidade frente às células DH82. O CLX/CTZ também apresentou baixa toxicidade para macrófagos, representando uma alternativa promissora para a utilização em testes pré-clínicos visando o tratamento da leishmaniose.

Palavras-chave: calix[*n*]arenos. leishmaniose. tratamento.

## ABSTRACT

BOTELHO, BIANCA DE OLIVEIRA. **COMPLEXES OF KETOCONAZOLE WITH *p*-SULPHONIC ACID CALIX[6]ARENE ON** *Leishmania amazonensis* **AND** *Leishmania infantum*. 2019. 63 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2018.

Ketoconazole has been described as a leishmanicidal agent, however, the low aqueous solubility of the drug may limit its bioavailability and therapeutic efficacy. *p*-sulphonic acid calix[n]arene has been used to improve solubility and efficacy of drugs. The aim of this work was evaluate the in vitro effect of the ketoconazole/*p*-sulfonic acid calix[6]arene inclusion complex (CLX/CTZ) on promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum*, as well as their toxicity to DH82 macrophages. The leishmanicidal effect and toxicity of CLX/CTZ, pure ketoconazole (CTZ) and the physical mixture of the two compounds (PM) were evaluated by the resazurin method. The IC50 value of CLX/CTZ, CTZ and PM on the *L. amazonensis* promastigotes forms was 3.95, 14.35 and 13.87 µM; and in *L. infantum* was 6.74, 17.47 and 17.54 µM, respectively. The CLX/CTZ, CTZ and PM showed no toxicity to DH82 cells. CLX/CTZ has demonstrated higher leishmanicidal activity than CTZ and PM. CLX/CTZ also presented low toxicity to macrophages, representing a promising alternative for use in preclinical trials for leishmaniasis treatment.



Key words: calix[*n*]arene. leishmaniasis. treatment.

# LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo de transmissão da leishmaniose. FONTE: SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002, adaptado. ..... 17

**Figura 2**. Fórmula estrutural do cetoconazol. ..... 24

**Figura 3.** Representação esquemática do mecanismo de ação cetoconazol sobre a síntese de ergosterol e subsequente alteração da composição e da organização da membrana celular. FONTE: SHAPIRO et al., 2011 e ABE et al., 2009, adaptado. ..... 26

**Figura 4.** Estrutura química do p-terc-butilcalix[4]areno, p-terc butilcalix[5]areno e p-terc-butilcalix[6]areno. ..... 33

**Figura 5**. Valores de $IC_{50}$ (µM) do complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em promastigotas de (A) L. amazonensis e (B) L. infantum obtidos por regressão não-linear. Fonte: O autor. ..... 41

**Figura 6**. Valores de $CC_{50}$ (µM) do complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em macrófagos da linhagem DH82 obtidos por regressão não-linear. Fonte: O autor. ..... 43

## LISTA DE SIGLAS E/OU ABREVIATURAS

LV - Leishmaniose visceral

LC - Leishmaniose cutânea

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

LCL - Leishmaniose cutânea localizada

LD - Leishmaniose cutânea disseminada

LCD - Leishmaniose cutânea difusa

CLX - Ácido *p*-sulfônico calix[6]areno

CTZ - Cetoconazol

CLX/CTZ - Cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno

MF - Mistura física

CN - Controle negativo

CP - Controle positivo

$IC_{50}$ - Concentração inibitória de 50% dos parasitas

$CC_{50}$ - Concentração citotóxica para 50% das células

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1-** Viabilidade de promastigotas de Leishmania amazonensis após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN)..... 39

**Tabela 2-** Viabilidade de promastigotas de Leishmania infantum após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN). ..... 40

**Tabela 3-** Viabilidade de macrófagos DH82 após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN). ..... 42

**Tabela 4-** Valores do índice de seletividade do complexo de inclusão cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) sobre formas promastigotas das espécies de L. amazonensis e L. infantum..... 44

# Sumário

1. **INTRODUÇÃO** ..... 13
2. **REVISÃO DE LITERATURA** ..... 15
2.1 Leishmaniose ..... 15
2.1.1 Ciclo biológico ..... 15
2.1.2 Aspectos clínicos ..... 18
2.1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana ..... 19
2.1.4 Leishmaniose Visceral ..... 20
2.1.5 Terapêutica ..... 21
2.2 Cetoconazol ..... 24
2.2.1 Atividade leishmanicida in vitro e in vivo ..... 26
2.2.2 Solubilidade e sua relação com os efeitos adversos ..... 29
2.3 Encapsulamento de substâncias bioativas com calix[*n*]arenos ..... 31
3. **MATERIAL E MÉTODOS** ..... 35
3.1 Materiais e reagentes ..... 35
3.2 Atividade in vitro do complexo cetoconazol/ácido p-sulfônico calix[6]areno sobre formas promastigotas ..... 35
3.3 Citotoxicidade do complexo cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno frente a macrófagos DH82 ..... 37
3.4 Índice de seletividade ..... 38
3.5 Análise estatística ..... 38
4. **RESULTADOS** ..... 39
4.1 Atividade contra as formas promastigotas ..... 39
4.2 Teste de citotoxicidade ..... 42
4.3 Índice de seletividade ..... 43
5. **DISCUSSÃO** ..... 45
6. **CONCLUSÃO** ..... 50
7. **REFERÊNCIAS** ..... 51

# 1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (MARCONDES, 2016). Tem grande importância na saúde pública de vários países, e está incluída entre as seis endemias de maior relevância mundial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2011).

As leishmanioses são classificadas em leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana (LTA), podendo esta última ser cutânea, mucocutânea ou cutânea difusa (MARCONDES, 2016). A doença tem caráter zoonótico e acomete animais silvestres e, mais raramente, animais domésticos (FURTADO, 1994).

É considerada uma doença negligenciada, por acometer milhares de pessoas em sua grande maioria com baixa renda e residentes em países subdesenvolvidos (BEZERRA *et al*., 2012). Está presente em 98 países em todo o mundo, acometendo 12 milhões de pessoas (WHO, 2016). O Brasil representa uma área endêmica e é um dos países com maiores taxas de notificação da infecção em humanos, responsável por cerca de 90% dos casos de leishmaniose tegumentar da América Latina, sendo registradas em quase todos os Estados (BRASIL, 2012, MENDES, et. al., 2016).

A quimioterapia atual das leishmanioses com fármacos convencionais como os antimoniais e antifúngicos apresenta um desafio devido a problemas de resistência clínica, longa duração do tratamento, efeitos colaterais graves e ao alto custo dos medicamentos. Nesse sentido, a pesquisa por medicamentos eficazes e novas formulações menos onerosas e não tóxicas torna-se indispensável (MAHMOUDVAND et al., 2015; ANDRADE, 2016).

Compostos imidazólicos como o cetoconazol e o itraconazol têm sido reportados na literatura com atividade contra diferentes espécies de *Leishmania* in vitro, individualmente ou associados a outros medicamentos destacando-se como potentes candidatos para o tratamento da leishmaniose (BERMAN et al*.,* 1984; DE MACEDO-SILVA et al*.,* 2013). Esses compostos atuam na inibição de enzimas oxidativas do citocromo P450 inibindo a via de

síntese de esteróides, levando a alterações na permeabilidade da membrana de *Leishmania* spp. (HART et al., 1989).

Apesar do efeito fungicida e leishmanicida do cetoconazol, em medicina veterinária os efeitos adversos associados ao medicamento são estimados em cerca de 15% dos cães tratados para doenças de pele, na dose de 2,6-33,4 mg/kg (MAYER et al., 2008), e incluem sinais gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarreia), prurido, alopecia, catarata (GREEN, 2006) e hepatotoxicidade (PERIASAMY, et al., 2016).

O fármaco é descrito como pouco solúvel em água (classe II da classificação biofarmacêutica), revelando que a sua biodisponibilidade após administração oral é limitada pela sua solubilidade (TUBIC-GROZDANIS et al., 2008; CUSTÓDIO et al., 2008), o que faz com que a dose terapêutica seja elevada, acarretando os efeitos adversos supracitados.

O potencial terapêutico do cetoconazol pode ser melhorado mediante o desenvolvimento de sistemas carreadores supramoleculares, utilizando como veículos hospedeiros capazes de formar complexos de inclusão hidrossolúveis (ABRANCHES et al., 2015). Esses complexos são capazes de maximizar a solubilidade aquosa do fármaco, melhorando a estabilidade e moderando a toxicidade do medicamento em condições fisiológicas (ASHE et al., 2015).

Desta maneira, esses hospedeiros macrocícliclos são candidatos promissores para o transporte de fármacos pouco solúveis em água, sendo úteis nas aplicações biofarmacêuticas para o desenvolvimento de novas formulações. Portanto, representam uma alternativa a ser utilizada para a complexação com o cetoconazol na tentativa de potencializar o efeito leishmanicida deste fármaco (ABRANCHES et al., 2015).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito *in vitro,* de um complexo de inclusão contendo cetoconazol e ácido *p*-sulfônico calix[6]areno sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, bem como sua toxicidade para macrófagos caninos.

# 2. REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Leishmaniose

A Leishmaniose é uma antropozoonose transmitida por animais silvestres e mais raramente por animais domésticos, e o cão é considerado o principal reservatório da leishmaniose visceral nas áreas urbanas (NEUBER, 2008).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2016), as leishmanioses integram o conjunto das seis doenças tropicais mais preocupantes no Velho Mundo e Américas, e representam um grande problema de saúde pública não somente no Brasil, onde é considerada uma das endemias de interesse prioritário, como em grande parte dos continentes americano, asiático, europeu e africano (COSTA, 2005).

Em humanos e animais a doença pode causar lesões deformantes e incapacitantes quando na sua forma cutânea, e na sua forma visceral pode levar a óbito se não tratada (GONTIJO e CARVALHO, 2003; MARCONDES, 2016).

### 2.1.1 Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* compreende protozoários com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e invertebrados, sendo os últimos os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitos de um mamífero a outro (ESPINOSA et al., 2018).

Esses vetores são fêmeas de insetos hematófagos, dípteros da família Psychodidae, subfamília Phebotominae, conhecidos genericamente por flebotomíneos. *Lutzomyia longipalpis* é a principal espécie transmissora da Leishmaniose no Brasil, são conhecidos popularmente como mosquito palha, tatuquiras, birigui, entre outros (BRASIL, 2010; LUTZ e NEIVA, 1912). No entanto, Missawa et al. (2011) evidenciaram a participação de *Lutzomyia cruzi* na transmissão da leishmaniose visceral em Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil.

A espécie *Lutzomyia longipalpis* tem boa adaptação em regiões peridomiciliares e a variadas temperaturas, podendo ser encontrada no interior dos domicílios, em abrigos de animais domésticos, e em meio ao lixo e matéria orgânica em decomposição (FELICIANGELI, 2004).

Esses insetos possuem hábitos noturnos e em áreas urbanas são encontrados, frequentemente, no período crepuscular, sendo o período de maior atividade das 17 horas às 5 horas (BRASIL, 2010). Realizam a oviposição e o desenvolvimento larval em áreas úmidas, com sombreamento e ricas em matéria orgânica (FELICIANGELI, 2004).

Os machos alimentam-se apenas de seiva de plantas, contudo, as fêmeas precisam de sangue para maturação dos ovos (BARATA et al., 2005), e são responsáveis pela transmissão dessa doença. As fêmeas hematófagas realizam repastos sanguíneos em seres humanos, cães, gatos, cavalos, jumentos, cabras, bois, porcos, galinhas e animais silvestres (PASSOS-DIAS; LOROSA; REBÊLO, 2003; MISSAWA; LOROSA; DIAS, 2008). Após o repasto sanguíneo, a partir da ingestão de macrófagos mamíferos infectados, são liberadas no intestino médio dos flebotomíneos formas amastigotas do parasito. As formas amastigotas transformam-se em formas promastigotas procíclicas proliferativas (WILSON et al., 2010).

As formas procíclicas se multiplicam por divisão binária e são capazes de se aderir às microvilosidades do epitélio intestinal, o que impede que o parasito seja expelido juntamente com as excretas do flebotomíneo, após a digestão do sangue (PETERS et al., 2008, SACKS; KAMHAWI, 2001).

Entre o sétimo e o décimo dia após o repasto, acontece a metaciclogênese que resulta no aparecimento de formas promastigotas metacíclicas. As promastigotas procíclicas passam por mudanças morfológicas e fisiológicas, e parte dessa população se diferencia em formas metacíclicas. Esse processo possibilita o desprendimento das formas metacíclicas do epitélio intestinal do inseto vetor, e as torna mais infectantes ao hospedeiro mamífero (PIMENTA; TURCO, 1992, PETERS et al., 2008). Os parasitos se dirigem para a probóscide do inseto, e são inoculadas em um hospedeiro vertebrado quando o inseto realizar outro repasto sanguíneo (LAINSON et al., 1990).

As promastigotas metacíclicas inoculadas no mamífero são inicialmente fagocitadas por neutrófilos. Estas células secretam quimiocinas, substâncias

que recrutam novas células incluindo macrófagos, que irão fagocitar outras promastigotas, que serão internalizadas em vacúolos parasitóforos, que logo se associam aos lisossomos, dando origem aos fagolisossomos (SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002).

Devido a diversos mecanismos de evasão à resposta imune do hospedeiro, os parasitos mantêm-se resistentes ao ambiente hostil, e as formas metacíclicas se transformam em amastigotas e se multiplicam por divisão binária até que rompem a célula hospedeira e são fagocitadas por outros macrófagos (PETERS et al., 2008).

O ciclo se completa quando macrófagos parasitados por amastigotas são ingeridos por vetores invertebrados em um novo repasto sanguíneo (PETERS et al., 2008) (Figura 1).

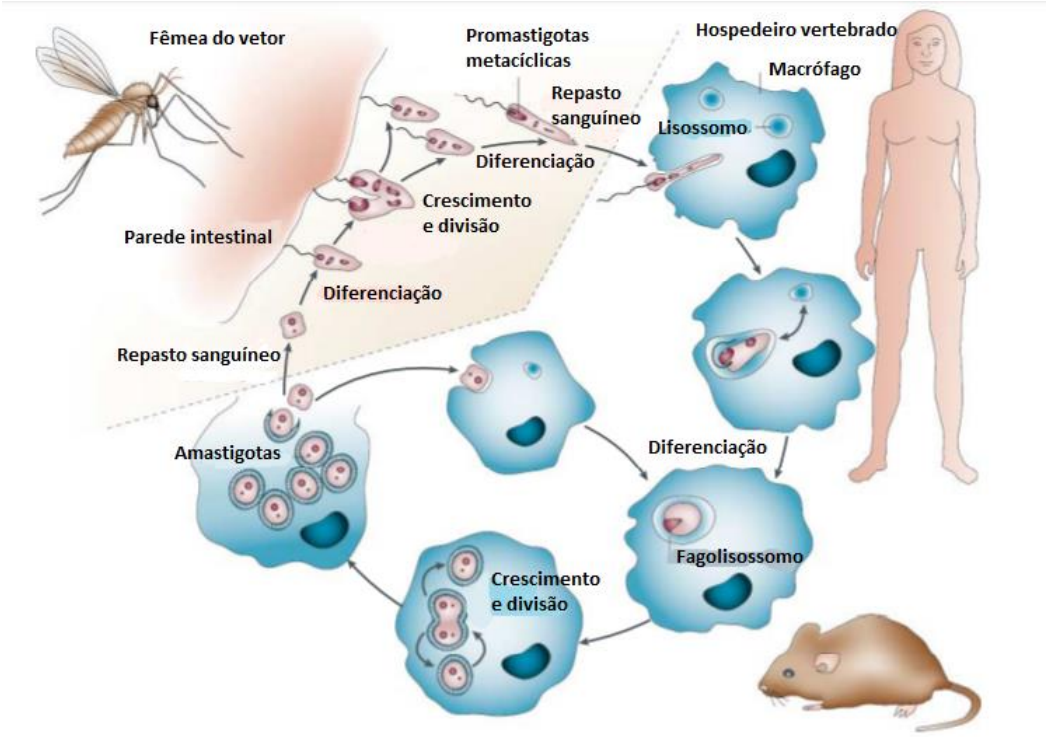


**Figura 1.** Ciclo de transmissão da leishmaniose. FONTE: SACKS e NOBEN-TRAUTH, 2002, adaptado.

### 2.1.2 Aspectos clínicos

As leishmanioses constituem um complexo de enfermidades de caráter crônico, e o período de incubação varia de 2 a 12 meses (OLIVEIRA et al*.,* 1993). A infecção em cães e humanos por espécies de *Leishmania* é clinicamente semelhante (KRAUSPENHAR et al., 2007).

Durante o repasto sanguíneo, a saliva do vetor atua como um agente vasodilatador, que participa da modulação do sistema imune. A penetração do agente na pele gera uma reação inflamatória local, caracterizando a lesão cutânea (MARCONDES, 2016).

Após a inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele, a maior parte é destruída pela ação lítica do complemento (MOSSER; EDELSON 1984; MOSSER et al*.*, 1986), no entanto, algumas das formas promastigotas inoculadas são resistentes à ação lítica do complemento (PIMENTA et al., 1989)

As formas promastigotas metacíclicas que sobreviveram à ação do sistema complemento se aderem a receptores de membrana de macrófagos através de moléculas presentes na superfície chamadas ligantes do parasito (CHANNON et al., 1984).

Após a adesão, a fagocitose pelos macrófagos ocorre de forma rápida. Posteriormente o parasito transforma-se em amastigota dentro do vacúolo parasitóforo; este se funde com grânulos lisossomais para formar os fagolisossomos, onde as formas amastigotas deverão se multiplicar (MURRAY, 1981).

Dentro do macrófago, as formas amastigotas de *Leishmania* inibem diversos mecanismos de defesa celular que deveriam ser responsáveis por sua lise, tais como fusão do fagolisossomo, enzimas hidrolíticas, mecanismos de sinalização celular, produção de óxido nítrico e citocinas (CUNNINGHAM, 2002).

Na leishmaniose visceral os macrófagos infectados disseminam-se pelas vias hematógena e linfática para tecidos ricos em células do sistema fagocítico mononuclear. Assim, ocorre o desenvolvimento de sinais clínicos sistêmicos, caracterizando a forma mais comum da doença nos animais, principalmente no cão (MARCONDES, 2016).

O resultado dessa infecção por *Leishmania* depende em grande parte da capacidade de resposta imune do hospedeiro e da virulência da cepa do parasito infectante. Com isso, os protozoários deste gênero são capazes de produzir um largo espectro de doenças (GRIMALDI E TESH, 1993, MICHALICK & GENARO, 2005).

O gênero *Leishmania* e suas diversas espécies podem se manifestar no organismo em duas formas principais, denominadas Leishmaniose Tegumentar (LT) ou Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e Leishmaniose Visceral (LV). As manifestações clínicas desta primeira forma incluem as formas cutânea localizada (LCL), cutânea disseminada (LD) e cutânea difusa (LCD), além da forma mucosa ou mucocutânea (LM) (BAÑULS et al., 2011, INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2003).

### 2.1.3 Leishmaniose Tegumentar Americana

No Brasil, o acometimento cutâneo pode ser causado por 14 espécies de *Leishmania*, entre as quais, a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LAINSON, 2010, FERREIRA, 2014), e *Leishmania (Viannia) braziliensis* (LLANOS-CUENTAS, 1984, LAINSON, 1993).

A leishmaniose tegumentar americana é caracterizada por nódulos ou pápulas que evoluem para úlceras na pele, formadas no local da picada do inseto vetor da doença (WHO, 2016; BARRAT et al., 2010).

Nos cães, essas úlceras cutâneas sugestivas comumente são limitadas a uma (LCL) ou múltiplas lesões de forma disseminada (LCD), caracterizadas pela formação de bordas elevadas e cor avermelhada, que podem ser recobertas por secreção serosa ou seropurulenta (devido a contaminação bacteriana ou fúngica), frequentemente encontradas nas orelhas, focinho ou bolsa escrotal (BRASIL, 2010).

Na forma mucocutânea essas úlceras podem sofrer metástases para a mucosa oronasal e nasofaringe causando a destruição e perda de função do tecido (LLANOS-CUENTAS, 1984).

### 2.1.4 Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar, ocorre frequentemente em regiões subtropicais e tropicais, e é causada por espécies de *Leishmania* do complexo *Leishmania (Leishmania) donovani*, que compreende as espécies *Leishmania (Leishmania) donovani* e *Leishmania (Leishmania) infantum*. Nas Américas, o agente etiológico é a *L. infantum*, enquanto na Europa, Ásia e África, os agentes responsáveis são a *L. infantum* e a *L. donovani* (CAMARGO et al., 2007).

Estudos realizados identificaram que a espécie *Leishmania infantum* é a responsável pelos casos de leishmaniose visceral em todas as regiões brasileiras (GONTIJO & MELO, 2004).

A LV é o resultado da replicação das formas amastigotas nos fagócitos mononucleares do fígado, baço, linfonodos, medula óssea (BARRATT et al., 2010; BAÑULS et al., 2011) e pele (ALVAR et al, 2004). Considerada a manifestação mais grave da doença, a LV sem tratamento leva cães a óbito em 90% dos casos (GRAMICCIA e GRADONI, 2005).

Os sinais clínicos frequentemente observados na LV incluem, inicialmente, febre intermitente, perda de peso e linfadenopatia, anemia e hipergamaglobulinemia nos exames laboratoriais (LIMA et al., 2004). O quadro pode evoluir com caquexia progressiva, esplenomegalia e hepatomegalia (MICHALICK e RIBEIRO, 2011; BARRATT et al., 2010; BAÑULS et al., 2011), sinais oculares (conjuntivite, ceratoconjuntivite, uveíte), lesões cutâneas (dermatite esfoliativa, úlceras úlceras nas orelhas, focinho e região periorbital e alopecia multifocal), onicogrifose (MANCIANTI et al., 1988); intenso parasitismo (MADEIRA et al., 2006). Outros sinais tais como: dificuldade locomotora, polidipsia, apatia, anorexia, vômito, diarréia, polifagia, epistaxe, melena e colite (SALZO, 2008; FEITOSA et al., 2000).

Nos rins, pode ocorrer insuficiência renal devido à deposição de imunocomplexos nos glomérulos causando glomerulonefrite e nefrite intersticial (SOUSA et al., 2011).

De acordo com Soares et al. (2015), pode haver miocardite multifocal com inflamação linfohistioplasmocitária acentuada e, consequentemente, necrose e degeneração das fibras miocárdicas.

### 2.1.5 Terapêutica

Antimoniais

Para o tratamento das Leishmanioses em humanos são utilizados os antimoniais como medicamentos de primeira escolha há mais de 10 décadas (MAHMOUDVAND et al., 2015). Os antimoniais mais consumidos hoje no mundo são o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (SERENO, et al., 2000).

Essa classe de compostos é administrada via intravenosa ou intramuscular de forma lenta na tentativa de evitar efeitos colaterais, dentre eles, trombose (WHO, 2010). A meia vida plasmática é de apenas 2 horas para o antimoniato e de 76 horas para o estibogluconato, e o tempo de tratamento é de até 28 dias (SEIFERT, 2011).

Alta taxa de cardiotoxicidade e diversos outros efeitos colaterais, estão relacionados ao uso dos antimoniais (OLLIARO et al*.,* 2005). Os efeitos adversos mais relatados incluem náusea, dor abdominal, mialgia, inflamação pancreática, arritmia cardíaca e hepatite (OLIVEIRA, 2011).

Sundar (2001) relata falta de resposta relacionada ao uso dos antimoniais. De acordo com o autor, mais de 60% dos pacientes no norte de Bihar, na Índia, não responderam ao tratamento. O custo elevado, o regime de administração e baixa taxa de resposta ao tratamento tornam complexa a utilização terapêutica desses medicamentos.

Pentamidina

Quando os antimoniais não são efetivos no tratamento da doença, drogas de segunda escolha como a Pentamidina e a Anfotericina B são utilizadas (BRASIL, 2010).

A Pentamidina foi sintetizada no início do século passado como um fármaco antiglicêmico, sendo posteriormente descoberta a sua atividade antiprotozoária e utilizada pela primeira vez no tratamento da LV em 1940 (BALAÑA-FOUCE, 1998, KIRK E MACDONALD, 1940).

A administração da pentamidina é feita preferencialmente por infusão intravenosa a cada 3-4 semanas em até 4 meses (SEIFERT, 2011).

Os efeitos adversos mais comuns são dor de cabeça, náuseas, dores musculares e, menos frequentemente, dormência e hipotensão. Na Índia a utilização do medicamento foi fortemente relacionada à indução de diabetes mellitus insulinodependente, o que levou à redução do seu uso na terapia da LV (SUNDAR e CHATTERJEE, 2006).

Anfotericina B

O composto é um antibiótico poliênico, isolado pela primeira vez em 1955, a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* (SEIFERT, 2011). Pertencente à classe IV do Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), possui baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade em membrana, consequentemente é fracamente absorvido apresentando baixa biodisponibilidade oral em humanos (AMIDON et al*.,* 1995). Por esse motivo sua administração é pela via intravenosa por infusão lenta com reações à perfusão como tromboflebite totalmente esperadas (CHAPPUIS et al*.,* 2007).

O efeito adverso mais importante é a nefrotoxicidade (JOLY et al*.,* 1992), entretanto podem ocorrer também hipocalemia e anafilaxia (CHAPPUIS et al*.,* 2007). As formulações lipossomais reduzem estes efeitos e permitem o emprego de doses mais elevadas, porém devido ao alto custo desses compostos há limitação na sua aplicação (PURKAIT et al*.,* 2012).

Miltefosina

No Brasil, o Ministério da Saúde em 2008 proibiu o tratamento de animais com medicamentos humanos ou medicamentos não registrados no Ministério da Pecuária e Abastecimento (MAPA). Este impedimento ocorreu devido ao risco de seleção de parasitos resistentes, e desde então o serviço público brasileiro utilizava a eutanásia como método de controle em cães sorologicamente positivos (AMARAL, 2009). Em citação a “PORTARIA INTERMINISTERIAL Nº 1.426, DE 11 DE JULHO DE 2008” -“Proíbe o tratamento da leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou

não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento" (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Em setembro de 2016, por meio da Nota Técnica Conjunta nº 001/2016 MAPA/MS assinada pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento e pelo Ministério da Saúde, foi autorizado o registro do produto Milteforan® (miltefosina), indicado para o tratamento da leishmaniose canina (MAPA, 2016).

A miltefosina foi primariamente relatada por sua atividade antiprotozoária contra *Leishmania donovani* na década de 1980 (GUERIN et al*.,* 2002). O fármaco foi o primeiro de utilização via oral na terapia da leishmaniose e, em 2002, foi registrado para o tratamento de LV na Índia (BERMAN, 2005).

Seu regime de administração é de 28 dias (WHO, 2010), e os efeitos secundários são causados pelo seu baixo índice terapêutico (GRIENSVEN et al., 2010). Os efeitos mais comuns incluem distúrbios gastrointestinais e toxicidade renal, que levam o paciente à interrupção prematura do tratamento, aumentando assim os casos de resistência do parasito (SUNDAR E MURRAY, 2005). Teratogenicidade também foi observada em modelos animais (SINDERMANN e ENGEL, 2006).

A meia vida plasmática da miltefosina pode ocasionar desenvolvimento de resistência pelos parasitos (BRUNTON et al*.,* 2012). Esse fato foi confirmado por Dorlo et al. (2008), quando observaram que em pacientes tratados por 28 dias com o fármaco, o mesmo foi detectado na circulação após seis meses do término do tratamento.

De acordo com Soto et al. (2004), outro problema relacionado à droga é que ela não apresenta atividade contra *L. braziliensis*, que no Brasil é a principal causadora da LTA. O estudo foi realizado com pacientes acima de 12 anos com Leishmaniose cutânea, na Colômbia e na Guatemala. De acordo com os autores, a miltefosina foi um agente oral útil contra a leishmaniose cutânea causada por *L. panamensis* na Colômbia, mas não contra a leishmaniose causada *por L. braziliensis* na Guatemala.

O protocolo mais utilizado no Brasil para o tratamento de cães com LTA consiste na utilização de um Leishmaniostático como o Alopurinol, para cessar a multiplicação do protozoário, a utilização de um Leishmanicida (Miltefosina), para diminuir a carga parasitária do protozoário, e um imunomodulador como a

Marbofloxacina e vitaminas para aumentar a imunidade do hospedeiro (o que leva a diminuição dos sinais clínicos e evita infecções secundárias) (YASUR-LANDAU et al., 2016).

Os tratamentos atuais levam à cura clínica do animal infectado, porém ainda não foi descrita a cura parasitológica da doença (REGUERA, 2016). Mesmo após o animal apresentar a cura clínica, não se deve abrir mão dos métodos de controle dos vetores como coleiras e *pour-on,* pois o animal continua sendo reservatório da doença, sendo capaz de infectar outros animais e o homem (OTRANTO e DANTAS-TORRES 2013).

## 2.2 Cetoconazol

O cetoconazol (CTZ), um agente antifúngico imidazólico de amplo espectro, foi introduzido em 1977 e recebeu aprovação do FDA em 1981, por mostrar-se clinicamente seguro e útil contra infecções fúngicas (FDA, 2015).

Conhecido oficialmente como *cis*-1-acetil-4-[4-[2-(2,4-diclorofenil)-2-(*1H*-imidazol-1-ilmetil)-1,3-dioxalan-4-il]metoxi fenil]-piperazina, apresenta fórmula molecular $C_{26}H_{28}Cl_2N_4O_4$ e massa molar 531,44g $mol^{-1}$ (THE MERCKY INDEX, 1989).

O CTZ é um pó branco, com solubilidade intrínseca em água de 0,0017 mg/mL (SWEETMAN, 2009) e apresenta ponto de fusão entre 148 e 152 °C. Em sua estrutura (Figura 2) são evidentes dois grupos básicos, piperazina e imidazol, com seus valores de pKa iguais a 2,94 e 6,5 respectivamente (ABDEL-MOETY, 2002).

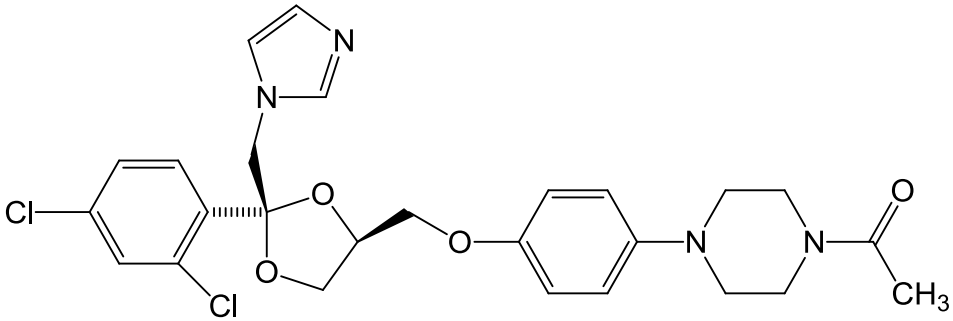


**Figura 2**. Fórmula estrutural do cetoconazol.

É amplamente utilizado para tratar infecções sistêmicas como candidíase, dermatite cutânea blastomicótica, coccidioidomicose, histoplasmose e cromoblastomicose. O CTZ oral foi usado para tratar o hirsutismo feminino, a síndrome dos ovários policísticos e a síndrome de hiperestimulação ovariana (MAERTENS, 2004; YAN, et al., 2013).

O CTZ também é utilizado no tratamento de doenças como a síndrome de cushing (CHROUSOS, 2008; MONCET et al., 2007; SONINO et al., 1990) e no tratamento de tumores malignos da próstata (MEDDA et al., 1987).

Além disso, diversos estudos demonstraram que o CTZ é eficaz na inibição do crescimento de protozoários como *Leishmania* spp e *Trypanosoma cruzi in vitro* (MARRAPU et al., 2011; TAHGHIGHI et al., 2012) e *in vivo* (WEINRAUCH et al., 1983), e foi muito utilizado para o tratamento da leishmaniose nas décadas de 1980 e 1990 (SAENZ et al, 1990).

Essa atividade leishmanicida se deve ao fato de que o Ergosterol é o principal esteroide da membrana de fungos patogênicos e de parasitas tripanossomatídeos como *Leishmania* spp, e o grupo azólico de compostos antifúngicos atua na inibição da síntese e incorporação desse esteróide nas membranas celulares (GINGER et al. 1996; GOAD et al. 1985). O ergosterol é essencial na biorregulação da fluidez, simetria e integridade da membrana celular, a sua diminuição impede o crescimento e a replicação dos protozoários (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

O mecanismo de ação do CTZ (Figura 3) inclui:

i) Inibição das enzimas oxidativas associadas ao citocromo P450 (CYP) [CYP3A4 e CYP2C9] (14-α-lanosterol desmetilase), que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, o que causa um acúmulo de 14*α*-metilesteróis. Esse último causa um desarranjo na estrutura dos fosfolipídeos levando a uma alteração na permeabilidade da membrana das células fúngicas bem como a dos protozoários (BERMAN et al., 1984; CATALÁN e MONTEJO, 2006; VAN DEN BOSSCHE et al., 1980; ROBERTS et al., 2003).

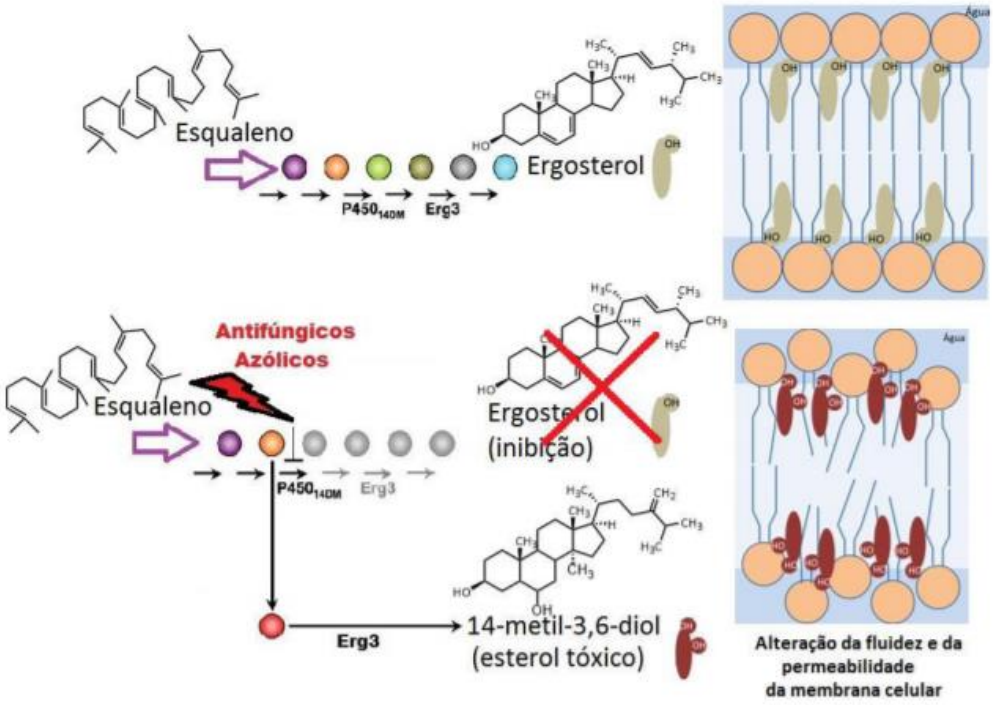


**Figura 3.** Representação esquemática do mecanismo de ação cetoconazol sobre a síntese de ergosterol e subsequente alteração da composição e da organização da membrana celular. FONTE: SHAPIRO et al., 2011 e ABE et al., 2009, adaptado.

ii) Inibição da atividade enzimática oxidativa e peroxidativa resultando na formação intracelular de concentrações tóxicas de peróxido de hidrogênio, o que causa danos na estrutura das organelas celulares dos fungos e protozoários (CATALÁN & MONTEJO, 2006).

Com a inibição da 14*α*-desmetilase, o precursor lanosterol é acumulado, sofrendo posteriormente a ação da Δ-5,6- desaturase, gerando o esterol 14*α*-metil ergosta 8,24(28)-dien-3β,6α-diol, que é um esteroide tóxico para a célula, pois sua incorporação na membrana celular culmina com a desorganização da mesma, levando a alterações em sua fluidez, permeabilidade e integridade (SHAPIRO et al*.*, 2011).

### 2.2.1 Atividade leishmanicida in vitro e in vivo

A ação do cetoconazol (CTZ) sobre o crescimento e a viabilidade celular de *Leishmania* spp. já vem sendo estudada há algum tempo. Berman (1981) foi

um dos pioneiros a avaliar a atividade leishmanicida desse composto. Em 1981, observou que 80 e 95% dos parasitas foram eliminados nas concentrações de fármaco 2,0 e 2,5 $\mu g/mL^{-1}$, respectivamente. No estudo em questão, a atividade anti-leishmania foi determinada em culturas de macrófagos humanos infectados com *Leishmania tropica.*

Gomez Urcuyo e Zaias (1982) realizaram um estudo na Nicarágua, em que seis pacientes com lesão cutânea e mucocutânea inicial de *Leishmania braziliensis* foram tratados com CTZ (400mg diários por 3 meses). Todos os sinais e sintomas clínicos da doença desapareceram em menos de um mês.

Weinrauch et al*.* (1983) relataram o sucesso do tratamento de um caso de infecção por *Leishmania tropica* com 400mg de CTZ diários por 28 dias. O CTZ foi considerado eficiente no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. major* (JOLIFFE, 1986; SALMANPOUR, et al., 2001) e *L. mexicana* (CROFT et al., 2006).

NOLI e AUXILIA, 2005 utilizaram o CTZ no tratamento de 14 cães com leishmaniose cutânea na dose oral de 7mg kg/dia por 7 a 13 semanas. Setenta e um por cento desses animais atingiram remissão clínica completa ou quase completa ao final do tratamento.

Embora a maioria das *Leishmania* spp. dependa da biossíntese de esteróis, de acordo com Croft et al. (2006), promastigotas de *Leishmania donovani*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* são particularmente mais sensíveis ao CTZ do que *Leishmania aethiopica*, *Leishmania major*, *Leishmania tropica* e *Leishmania mexicana*. Em contrapartida, Navin (1992) afirma que o composto apresenta atividade insatisfatória na infecção por *L. braziliensis*. No entanto, quando administrado sinergisticamente com um inibidor da enzima esqualeno epoxidase (terbinafina, por exemplo) a espécie *L. braziliensis* torna-se suscetível a essa droga (Urbina et al*.*, 1997).

Estudos in vitro também mostram uma perturbação da biossíntese de esteróis e, consequente, morte parasitária pelo CTZ em amastigotas intracelulares de *L. mexicana* (BERMAN et al., 1986, HART et al., 1989).

Kulkarni et al*.,* (2013) relataram que o CTZ foi mais efetivo contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis, Leishmania major* e *Leishmania donovani*, quando comparado ao Voriconazol e ao Fluconazol.

De acordo com Saenz et al. (1990), o CTZ oral foi efetivo em todos os casos de LC causados por *L. panamensis.* Nesse estudo o composto apresentou 76% de taxa de cura (N = 21) enquanto o estibogluconato de sódio via intramuscular apresentou 68% (N = 19). Ramanathan et al. (2011) também descreveram o tratamento com sucesso de 3 pacientes com LC por *L. panamensis* utilizando o CTZ oral.

Com base nesses estudos, o CTZ é considerado por alguns pesquisadores como a primeira escolha para o tratamento de lesões cutâneas únicas sem envolvimento da mucosa causadas por *L. panamensis* (SINGH e SIVAKUMAR, 2004).

Poucos dados estão disponíveis a respeito da sensibilidade de *L. infantum* ao CTZ. Gangneux *et al.* (1999) realizaram uma avaliação experimental em um modelo murino de leishmaniose visceral causada por *L. infantum*. Apesar de ser menos eficaz que o antimoniato de meglumina em monoterapia, a combinação com o antimonial resultou em reduções acentuadas nas cargas parasitárias no fígado e no baço. De acordo com os autores, o antimoniato de meglumina associado ao CTZ pode justificar ensaios clínicos em hospedeiros imunossuprimidos, uma vez que elimina o parasita de múltiplos órgãos alvo.

Esse efeito aditivo do CTZ à monoterapia da leishmaniose também foi demonstrado por outros autores. Nunes et al. (2017) avaliaram o efeito da associação do CTZ com o antimoniato de meglumina em amastigotas de *Leishmania amazonensis.* Os resultados obtidos sugerem uma interação aditiva entre os compostos. Shakya et al. (2011) utilizaram uma combinação de CTZ, miltefosina e um agente imunomodulador potente, o picroliv em modelos de hamsters experimentalmente infectados com leishmaniose visceral por *L. donovani.* Animais tratados com a combinação de cetoconazol (50 mg/kg, 5 dias) + miltefosina (5 mg/kg, 5 dias) mostraram aumento de 72% na eficácia contra o parasito em relação ao grupo tratado com CTZ (54,67%) e miltefosina (54,77%).

Galvão e Rabello (2017) realizaram uma revisão de literatura sistemática de estudos que avaliaram a eficácia e a toxicidade associada à terapia azólica para leishmaniose tegumentar. Foram incluídos um total de 37 estudos envolvendo 1259 pacientes que relataram resultados após tratamentos com

fluconazol, CTZ e itraconazol. A taxa final de eficácia dos azóis de acordo com as espécies foram 89% para *L. mexicana*; 88% para *L. infantum*, 80% para *L. donovani*; 53% para *L. major*; 49% para *L. braziliensis*; e 15% para *L. tropica*. As taxas de remissão foram semelhantes entre os grupos fluconazol, CTZ e itraconazol, especificamente 61%, 64% e 65%, respectivamente. Efeitos adversos durante o tratamento com fluconazol, itraconazol e CTZ foram relatados em 7%, 12% e 13% dos pacientes tratados, respectivamente.

### 2.2.2 Solubilidade e sua relação com os efeitos adversos

Com valores de pKa de 2,94 e 6,51 e uma solubilidade aquosa de aproximadamente 0,0017mg $mL^{-1}$, o CTZ apresenta propriedades físico-químicas típicas de uma base fraca pouco solúvel (SWEETMAN, 2009).

O composto azólico é descrito como um fármaco pouco solúvel em água e altamente permeável (classe II do sistema de classificação biofarmacêutica), revelando problemas na preparação de formulações da droga e que a sua biodisponibilidade após administração oral é limitada pela sua solubilidade (HASHEMZADEH e JOUYBAN, 2015; TUBIC-GROZDANIS et al., 2008; CUSTODIO et al*.,* 2008)

Desde que os efeitos biológicos das moléculas foram descobertos, sabe-se que para a obtenção dos efeitos terapêuticos no organismo, os compostos devem ser dissolvidos nos fluidos corporais. Quando um composto é liberado na forma líquida, os efeitos terapêuticossão mais rápidos, então a solubilidade de um medicamento é uma questão importante na farmacologia (JOUYBAN et al*.,* 2014).

Em decorrência da baixa solubilidade do CTZ, a dosagem oral recomendada para humanos (200-400 mg/dia) e para animais (2,6 a 33,4 mg/kg/dia) é alta para obtenção dos efeitos terapêuticos do mesmo, no entanto essa dose é muito propensa a causar reações adversas em pacientes humanos e veterinários (ASHE et al., 2015). Em humanos, os efeitos adversos comuns do CTZ incluem anorexia, náuseas e vômito dose-dependentes, erupções alérgicas e prurido (BENNETT, 1995; ASHE et al*.,* 2015).

Hepatotoxicidade associada ao CTZ é comumente descrita na literatura. Chien et al (1997) realizaram um estudo no qual 211 pacientes com oncomicoses foram tratados com CTZ ou griseofulvina. Foram detectadas disfunção hepática subclínica e hepatite em 18% e 3% dos pacientes tratados com CTZ. A média do tempo entre o início da terapia e a detecção de anormalidades hepáticas foi de 6 semanas.

Após uma revisão sistemática de artigos, YAN et al. (2013), afirmaram que a hepatotoxicidade associada ao uso de CTZ nos 204 estudos avaliados foi de 3,6% a 4,2%. A hepatite induzida por CTZ é mais rara (<1 em 10.000 pessoas), mas pode ser irreversível, aguda e fatal (JANSSEN E SYMOENS, 1983).

A toxicidade e a lesão hepática são mediadas pelo principal metabólito do CTZ em modelos experimentais, o *N*-desacetyl-ketoconazole (DAK), e também associadas à combinação de dose, concentração e duração da exposição (GREENBLATT e GREENBLATT, 2014)

O mecanismo da hepatotoxicidade induzida pelo CTZ é através da formação de espécies reativas de oxigênio e metabólitos reativos que se ligam covalentemente a proteínas hepatocelulares e DNA, causando peroxidação lipídica e fragmentação do DNA (JAESCHKE et al.,2002; AMIN e HAMZA, 2005).

O CTZ em doses elevadas também inibe várias enzimas do citocromo P450 envolvidas na esteroidogênese, levando a relatos de insuficiência adrenal em algumas situações clínicas (DISMUKES, 1994).

Em medicina veterinária, estima-se que os efeitos adversos ocorram em 15% dos cães e 25% dos gatos tratados com CTZ. Estes incluem sinais gastrointestinais (náuseas, vômitos e diarréia), prurido, alopecia, letargia, eritema, clareamento do pêlo e elevações assintomáticas das enzimas hepáticas. Os autores sugerem que os efeitos adversos são dose-dependentes (GREEN, 2006; MAYER, et al., 2008).

A hepatotoxicidade sintomática em cães é relatada como incomum na literatura (MAYER, et al., 2008). Em um estudo de toxicidade e segurança empregando cães da raça beagle recebendo 40 mg/kg de CTZ por dia durante 1 ano, os animais apresentaram redução do apetite, vômitos e diminuição do ganho de peso. As concentrações séricas de FA e ALT foram aumentadas. A

60 mg/kg/dia durante 20 semanas, o aumento foi mais acentuado. A uma dose de 80 mg/kg/dia, gastrite, icterícia e morte ocorreram após 2 a 4 semanas (LEVINE, 1982).

Em 2013, a FDA e o Comitê de Produtos Médicos para Uso Humano da Agência Europeia de Medicamentos publicaram simultaneamente advertências de segurança e limitaram o uso de cetoconazol por causa de sua associação com o risco de induzir lesão hepática (FDA, 2013; EMA-CHMP, 2013).

No entanto, a baixa solubilidade aquosa do CTZ pode limitar sua biodisponibilidade e, consequentemente, sua eficácia terapêutica. O potencial terapêutico do CTZ poderia ser melhorado através de um sistema que maximize a solubilidade aquosa da droga, enquanto demonstra maior estabilidade, moderando a toxicidade por diminuição da dose terapêutica e prolongando a meia-vida da droga em condições fisiológicas (ASHE et al., 2015).

Existem algumas técnicas que podem ser aplicadas para aumentar a solubilidade aquosa dos derivados azólicos, como a adição de agentes tensoativos, co-solventes, ajuste do pH da solução, e a complexação ou encapsulamento com outras substâncias (HASHEMZADEH et al., JOUYBAN, 2015). Dentre os hospedeiros utilizados em encapsulamentos um que vem ganhando destaque nos últimos anos são os calix[*n*]arenos.

## 2.3 Encapsulamento de substâncias bioativas com calix[*n*]arenos

No contexto de problemas relacionados à solubilidade, liberação e absorção de fármacos pouco solúveis em água, uma estratégia tem sido o encapsulamento em sistema de transporte de drogas para melhorar a sua estabilidade físico-química, utilizando veículos que atuam como hospedeiros capazes de formar complexos de inclusão hidrossolúveis com esses fármacos (ARANTES et al., 2009).

Esses transportadores de fármacos favorecem a liberação lenta, direcionamento e aumento da absorção de fármacos, com a finalidade de aumentar a estabilidade e otimizar sua atividade terapêutica (ARANTES et al., 2009; NASEER et al., 2017; CHAO et al., 2016).

Esses sistemas carreadores de drogas incluem ciclodextrinas (CDs) (RUIZ et al*.,* 2014), calix[*n*]arenos (ARANTES et al*.*, 2009, ABRANCHES et al., 2015), micelas (KATAOKA et al*.,* 2001), lipossomas (ASHE et al*.*, 2015), nanopartículas (AHMAD et al*.,*2016) e nanopartículas lipídicas sólidas (BUTANI et al*.,* 2016).

Os calix[*n*]arenos têm sido sintetizados desde 1970 (GUTSCHE et al., 1981), e são bem estudados em química supramolecular, mas pouco investigados a respeito de suas propriedades de transporte de drogas (ARANTES et al*.*, 2009). São consideradas moléculas hospedeiras macrocíclicas orgânicas (ARANTES et al*.*, 2009). São 2,6-metaciclofanos derivados de fenóis com um único grupo metileno separando cada unidade fenólica e um anel central (CRAGG, 2005).

Gutsche foi quem sugeriu o nome calix[*n*]areno devido à semelhança entre a forma de um vaso grego e o modelo molecular de um dos confôrmeros do tetrâmero cíclico. Dessa forma, calix significa vaso e areno indica a presença de anéis aromáticos, e o tamanho do macrociclo é indicado por um número entre colchetes [*n*], inserido entre as palavras “calix” e “areno”. Devido a semelhança com um vaso grego, as estruturas dos calix[n]arenos são geralmente desenhadas com os substituintes *para* direcionados para cima (“coroa superior”) e com os grupos hidroxilas direcionados para baixo (“coroa inferior”) (GUTSCHE, 1989).

Muitos grupos podem ser introduzidos na posição 4 do anel fenólico, e tem sido preparados calix[*n*]arenos com quatro unidades fenólicas (calix[4]areno), e muitos homólogos superiores como os calix[5]areno e calix[6]areno (CRAGG, 2005) (Figura 4). Quanto maior o número de anéis aromáticos, maior o número de conformações possíveis (GUTSCHE et al., 1984).

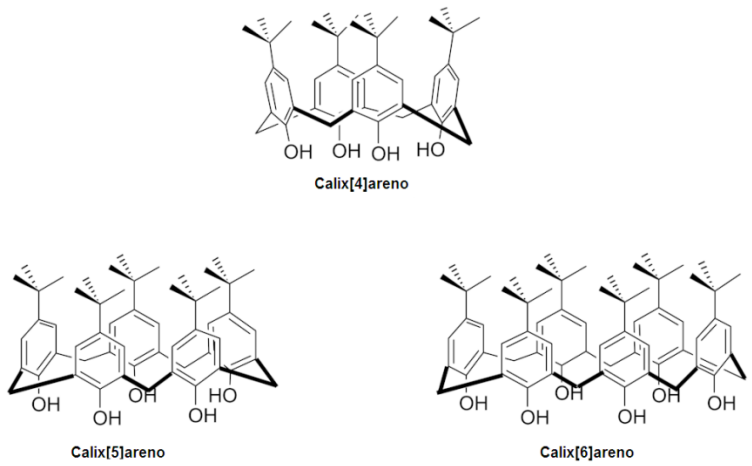


**Figura 4.** Estrutura química do *p-terc*-butilcalix[4]areno, *p-terc* butilcalix[5]areno e *p-terc*-butilcalix[6]areno.

Em decorrência da conformação variável e do tamanho da cavidade, os calix[*n*]arenos podem atuar como hospedeiros para formar complexos de inclusão com uma variedade de íons e moléculas neutras (ABRANCHES et al., 2015).

A introdução de sais como os *p*-sulfonato, *o*-fosfonato e *o*-alquilcarboxilato permitem a síntese de uma grande variedade de derivados de calix[*n*]arenos, e os torna ainda mais solúveis em água, de modo a se ligarem a uma variedade de moléculas biologicamente importantes (ZHANG et al*.,* 2016).

Juntamente com ciclodextrinas e éteres de coroa, os calix[*n*]arenos compreendem a terceira maior classe de supramoléculas (GUTSCHE, 1997), e tem sido utilizado em estudos para melhorar a solubilidade e eficácia de diferentes fármacos (ARANTES et al*.*, 2009; ABRANCHES et al., 2015).

Além disso, estudos demonstraram que os derivados de calix[n]arenos apresentam efeitos tóxicos muito baixos, demonstrando assim sua importância no desenvolvimento de novos sistemas para transportar fármacos pouco solúveis em água (VAREJÃO et al., 2013; ABRANCHES et al., 2015).

Na química supramolecular, um complexo no qual um dos componentes (a molécula hospedeira) possui uma cavidade capaz de alocar uma segunda espécie química (hóspede) pode ser definido como um complexo de inclusão (URBAN et al, 2016).

As funções hidroxilas da coroa inferior permitem uma fácil solubilização de calix[*n*]arenos em água, enquanto a cavidade tem um caráter hidrofóbico e permite a formação de complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas. Esta propriedade é útil para solubilizar e estabilizar moléculas altamente hidrofóbicas em solução aquosa (REKHARSKY e INOUE, 1998).

Estudos indicam que o processo de inclusão é dirigido por forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio, interações $\pi-\pi$, entre outras (ANSLYN e DOUGHERTY; 2006).

Devido a esta habilidade para formar complexos de inclusão com uma variedade de compostos orgânicos ou inorgânicos, os calix[*n*]arenos tem sido estudados não só na química supramolecular como também em outras áreas, tais como, simulação de enzimas, solubilização e modificação de drogas, alimentos, agroquímicos, catálise e em síntese orgânica (ZHANG; CAO, 2001).

ABRANCHES et al., (2015), utilizaram complexos de inclusão de fluconazol com *p*-sulfonato de sódio calix[4]areno e *p*-sulfonato de sódio calix[6]areno para determinar os efeitos da complexação na solubilidade do fármaco. Foi demonstrado que o efeito do *p*-sulfonato de sódio calix[6]areno na solubilidade do fluconazol é positivo, visto que o aumento da solubilidade do fluconazol depende da formação do complexo de inclusão e do tamanho da cavidade do calix[*n*]areno.

Yang e de Villiers (2004) avaliaram os ácidos *p*-sulfônico calix[4, 6 e 8]arenos na melhoria da solubilidade do fármaco furosemida e observaram um aumento na solubilidade do mesmo de (±73–81%), (±84–102%) e (± 104%), respectivamente.

# 3. MATERIAL E MÉTODOS

## 3.1 Materiais e reagentes

O ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX) foi obtido segundo a metodologia descrita por Gutsche et al. (1981). O complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ) foi obtido por liofilização na razão molar 1:1. A mistura física entre o cetoconazol e o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (MF) na razão de 1:1 foi preparada com o auxílio de um graal com pistilo e utilizada como referência para comparação com o complexo de inclusão. Os compostos foram preparados e gentilmente cedidos pelos pesquisadores do grupo de Química Supramolecular e Biomimética do Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa (UFV), coordenado pelo professor Dr. Sergio Antonio Fernandes.

Cetoconazol (CTZ), resazurina sódica, DMSO, meio Schneider e pentamidina/estreptomicina foram adquiridos comercialmente (Sigma-Aldrich, USA). Soro bovino fetal e meio Dulbecco Mem (DMEM) (Gibco®) foram adquiridos pela Thermo Fisher Scientific.

As formas promastigotas de *L*. *infantum* (WHOM/BR/OP046) e macrófagos (DH82) foram gentilmente cedidas pelo professor Alexandre Barbosa Reis da Universidade Federal de Ouro Preto e as promastigotas de *L*. *amazonensis* (WHOM/BR/76/Josefa) pelo professor Daniel Cláudio de Oliveira Gomes da Universidade Federal do Espirito Santo.

## 3.2 Atividade in vitro do complexo cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno sobre formas promastigotas

As culturas foram mantidas em garrafas de cultivo de 25 $cm^2$, em estufa para B.O.D. (Biologycal Oxygen Demand) a 26 ºC, em meio Schneider completo, suplementado com 20% de soro bovino fetal e 1% de pentamidina/estreptomicina.

Promastigotas em fase exponencial de crescimento foram utilizadas para os ensaios de atividade leishmanicida dos compostos. A curva de crescimento parasitária foi obtida a partir da contagem diária de parasitos em cultivo durante uma semana. As promastigotas foram contadas em hemocitômetro, ajustando-se a concentração dos parasitos para $1x10^6$ parasitos/mL com meio Schneider completo.

O CLX, o CTZ, o CLX/CTZ e a MF foram dissolvidos em solução aquosa contendo 0,4% de DMSO (v/v). Nesta concentração o DMSO não é tóxico aos parasitos (AZEREDO et al*.,* 2014).

Em microplacas contendo 96 poços, foram adicionados a cada poço as concentrações de 1; 2; 4; 8; 16 e 32 µM para o CTZ, para o CTZ/CLZ e para a MF. Como controle negativo (CN), as culturas passaram por todos os procedimentos, porém, no CN1 foram mantidas em meio Schneider sem adição dos compostos e no CN2 foi utilizado o DMSO 0,4%. O CLX puro também foi utilizado como controle negativo na concentração de 32 µM. Foram adicionados 100µL da cultura de promastigotas em cada poço, com um volume final de 200µL/poço. Ao final as placas foram incubadas em estufa para B.O.D. a 26 °C por 48 horas, sendo inspecionadas sob microscópio invertido.

Ao final das 48 horas foi adicionada a cada poço a solução de resazurina (3 µM). A solução de resazurina foi preparada com tampão fosfato 1% e pH 7. Em seguida as placas foram mais uma vez incubadas a 26 °C e, após um período de 4 horas os valores de absorbâncias foram determinados em leitor de microplacas (Multiskan GO Thermo Fisher Scientific) nos comprimentos de onda 570 e 600 nm. De acordo com o protocolo do fabricante (ALAMAR BLUE, 2008), para obtenção da % de viabilidade em ensaios de proliferação e citotoxicidade, utilizou-se a seguinte equação:

$$\%\ \text{de viabilidade} = \frac{(\mathrm{O2.A1})-(\mathrm{O1.A2})}{(\mathrm{O2.P1})-(\mathrm{O1.P2})} \,.\, 100$$

Sendo que:

O1 = O valor do coeficiente de extinção molar do alamarBlue® oxidado (azul) a 570nm foi de 80586

O2 = O valor do coeficiente de extinção molar do alamarBlue® oxidado a 600nm foi de 117216

A1 = absorbância dos poços de teste a 570nm

A2 = absorbância dos poços de teste a 600nm

P1 = absorbância dos poços de controle negativo (DMSO) a 570nm

P2 = absorbância dos poços de controle negativo (DMSO) a 600nm

A partir dos valores de viabilidade celular, os valores da concentração inibitória 50% ($IC_{50}$) foram determinados por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

## 3.3 Citotoxicidade do complexo cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno frente a macrófagos DH82

Macrófagos caninos da linhagem DH82 foram cultivados em garrafas de cultivo de 75 $cm^2$ com filtro e meio Dulbecco Mem (DMEM), suplementado com 20% de soro bovino fetal, e 1% de pentamidina/estreptomicina (Sigma-Aldrich®), mantidos em estufa de circulação de ar a 37 ºC e 5% de dióxido de carbono ($CO_2$).

O CLX, o CTZ, o CLX/CTZ e a MF foram dissolvidos em DMSO 0,4% (v/v) (AZEREDO et al*.,* 2014). No ensaio de citotoxicidade, os macrófagos DH82 foram plaqueados em placas de 96 poços, na concentração de $2x10^4$ células/ml em meio DMEM suplementado, em um volume total de 200µL por poço. As placas foram mantidas em estufa de circulação de ar a 37 °C com 5% de dióxido de carbono ($CO_2$) durante 24h. Após este período o meio foi retirado dos poços, mantendo os macrófagos aderidos ao fundo, e foram adicionados 200 µL do CLX/CTZ, da MF e do CTZ nas concentrações de 1; 2; 4; 8; 16 e 32 µM. Assim como no ensaio com as promastigotas, no CN1 as células foram mantidas em meio DMEM sem adição dos compostos, e no CN2 foi utilizado o DMSO 0,4%. O CLX foi utilizado na concentração de 32 µM como controle negativo.

Conforme descrito no item 3.2, após 48 horas de tratamento foi adicionada a cada poço a solução de resazurina (3 µM). Após 4h de incubação,

foi realizada a leitura da viabilidade dos macrófagos no espectrofotômetro nos comprimentos de onda 570 e 600nm. Os valores de absorbância obtidos pela leitura das placas foram utilizadas para o cálculo da viabilidade celular, e a concentração citotóxica 50% ($CC_{50}$) foi determinada por análise de regressão. Cada ensaio foi realizado em triplicata, em três experimentos independentes.

### 3.4 Índice de seletividade

O índice de seletividade foi determinado para avaliar a toxicidade dos compostos, por meio da razão entre a $CC_{50}$ dos macrófagos e a $IC_{50}$ de cada composto para *L. amazonensis e L. infantum.*

### 3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos a partir dos ensaios foram submetidos ao teste de normalidade, e os resultados que não apresentaram distribuição Gaussiana foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Os dados com distribuição normal foram analisados pela análise de variância (ANOVA) e foi utilizado o teste de Scott-Knott para comparação das médias. Valores de $p<0,05$ foram considerados significativos. Os valores de $IC_{50}$, e $CC_{50}$ foram obtidos por análise de regressão não linear. Os programas Sisvar 5.6, GraphPad Prism 5.0.4 e Microsoft Excel 2010 foram utilizados para análise dos dados.

# 4. RESULTADOS

## 4.1 Atividade contra as formas promastigotas

Ao avaliar o efeito do complexo de inclusão CLX/CTZ sobre promastigotas de *Leishmania* spp, observou-se que existe atividade leishmanicida contra essas formas de vida do parasito. Para ambas espécies, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, o cetoconazol puro e a MF nas diferentes concentrações testadas (Tabela 1 e Tabela 2).

Tabela 1- Viabilidade de promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN).

| Compostos | Concentração (µM)[1] | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 | 32 |
| **CLX/CTZ** | 74,68±1,14d[2] | 68,01±0,98d | 65,00±1,01d | 28±2,64d | 7,06±1,05d | 6±1d |
| **CTZ** | 96,66±0,57b | 94,67±0,58c | 94,66±0,57b | 86,7±0,51b | 61,67±0,56b | 25,43±0,98b |
| **MF** | 94,67±0,58c | 96,66±0,57b | 92,66±0,57c | 83,66±0,57c | 59,33±0,57c | 23,5±0,50c |
| **CLX** | 100±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a |
| **CN1** | 99,66±0,57a | 99,66±0,57a | 99,66±0,57a | 99,66±0,57a | 99,66±0,57a | 99,66±0,57a |
| **CN2** | 100 ±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a | 100±1a |

[1] A concentração do CTZ no complexo de inclusão ou na mistura física variou de 1 a 32 µM. Os controles foram testados em uma única concentração: CLX (32 µM), CN2 (0,4% DMSO), CN1 (meio schineider completo).
[2] Valor médio ± EP. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pela análise da Tabela 1, observa-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os controles negativos CN1 e CN2 e o hospedeiro CLX. Para todos os valores de concentração testados 1; 2; 4; 8; 16 e 32 µM houve diferença significativa ($p<0,05$) na viabilidade de promastigotas de

*L.amazonensis* expostas ao CLX/CTZ, ao CTZ e à MF quando comparadas com os controles negativos CN1, CN2 e o hospedeiro CLX.

Observa-se que houve um aumento na atividade leishmanicida dos três compostos (CLX/CTZ, ao CTZ e MF) conforme aumenta-se a concentração dos mesmos. Em todas as concentrações houve diferença significativa entre o complexo de inclusão contendo o cetoconazol e o CTZ (puro), demonstrando que há um efeito leishmanicida superior do CLX/CTZ quando comparado ao CTZ. Da mesma forma, em todas as concentrações houve diferença significativa entre o CTZ e a MF. Portanto, em todas as concentrações o efeito leishmanicida do CLX/CTZ foi superior quando comparado ao CTZ e à MF, visto que os valores de viabilidade de promastigotas de *L. amazonensis* são menores para o CLX/CTZ.

Tabela 2- Viabilidade de promastigotas de *Leishmania infantum* após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN).

| **Compostos** | **Concentração (μM)[1]** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **4** | **8** | **16** | **32** |
| **CLX/CTZ** | 94,81±1,72c[2] | 89,33±0,58c | 82,14±1,22c | 41,35±0,58b | 12,68±0,58b | 5,32±0,64c |
| **CTZ** | 98,41±1,22a | 97,87±0,82a | 96,32±0,78b | 94,86±0,79c | 72,67±0,58c | 24,66± 0,57b |
| **MF** | 99,18±1,05a | 96,76±2,04a | 95,08±1,12b | 90,40±0,70d | 72,32±3,21d | 22,67±1,17b |
| **CLX[1]** | 97,33±2,51a | 97,33±2,51a | 97,33±2,51a | 97,33±2,51a | 97,33±2,51a | 97,33±2,51a |
| **CN1[2]** | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a |
| **CN2[3]** | 99,66±1,15a | 99,66±1,15a | 99,66±1,15a | 99,66±1,15a | 99,66±1,15a | 99,66±1,15a |

[1] A concentração do CTZ no complexo de inclusão ou na mistura física variou de 1 a 32 μM. Os controles foram testados em uma única concentração: CLX (32 μM), CN2 (0,4% DMSO), CN1 (meio schineider completo).
[2] Valor médio ± EP. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pela análise da Tabela 2, observa-se que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os controles negativos CN1 e CN2 e o hospedeiro CLX.

Em *L. infantum* não houve diferença significativa nas concentrações 1, 2, 4 e 32 µM entre a atividade do CTZ e da MF. Em todas as concentrações testadas houve diferença significativa ($p<0,05$) entre o CLX/CTZ e o CTZ. A viabilidade de promastigotas de *L. infantum* tratadas com o CLX/CTZ em todas as concentrações foi menor em relação ao CTZ e a MF, demonstrando que há um efeito leishmanicida superior do CLX/CTZ quando comparado ao CTZ e a MF.

Os valores de $IC_{50}$ obtidos para os compostos testados sobre as promastigotas de *L.amazonensis* e *L.infantum* se encontram na figura 5.

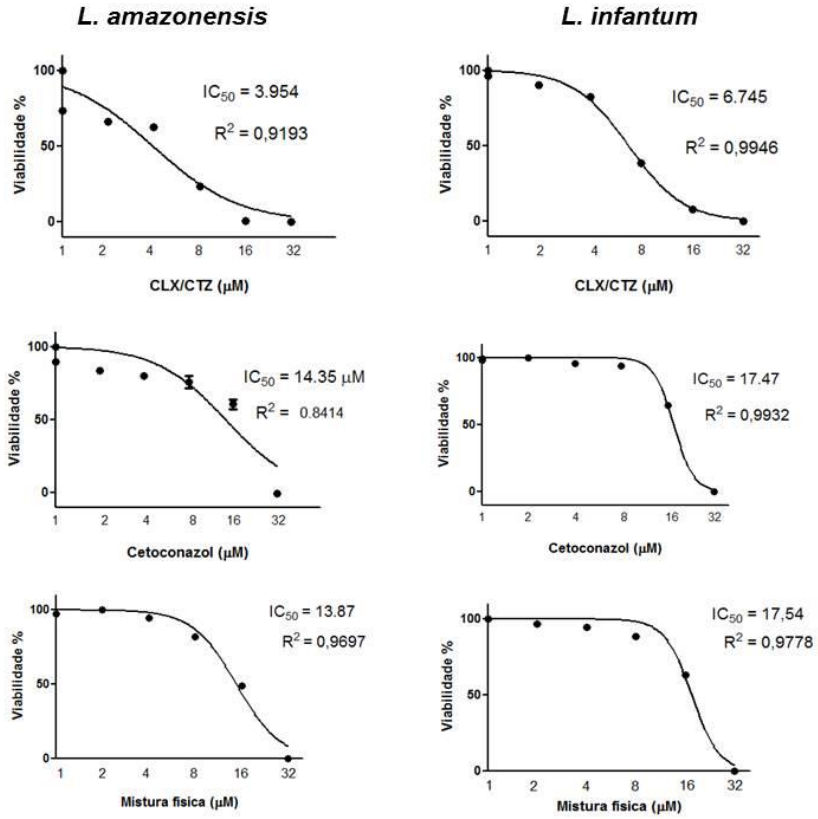


**Figura 5**. Valores de $IC_{50}$ (µM) do complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em promastigotas de (A) *L. amazonensis* e (B) *L. infantum* obtidos por regressão não-linear. Fonte: O autor.

Os valores de $IC_{50}$ para as formas promastigotas da espécie *L. amazonensis* foram 3,95, 14,35 e 13,87 µM para o CLX/CTZ, CTZ e MF, respectivamente. Para *L. infantum* os valores de $IC_{50}$ foram 6,74, 17,47 e 17,54

μM para o CLX/CTZ, CTZ e MF, respectivamente. Quando comparado com a *L. infantum*, a *L. amazonensis* apresentou menores valores de $IC_{50}$ para os três compostos (CLX/CTZ, CTZ e MF).

## 4.2 Teste de citotoxicidade

Os resultados do teste de citotoxicidade do CLX/CTZ, CTZ e da MF em macrófagos DH82 estão representados na Tabela 3.

Todas as concentrações referem-se ao CTZ, seja puro, no complexo de inclusão ou na mistura física, visto que nos dois últimos a estequiometria é de 1:1.

Tabela 3 - Viabilidade de macrófagos DH82 após 48h de exposição ao complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em diferentes concentrações e os controles (CN).

| **Compostos** | **Concentração (μM)[1]** | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | **1** | **2** | **4** | **8** | **16** | **32** |
| **CLX/CTZ** | 100±0a[2] | 100±0a | 100±1a | 100±0,57a | 81±0,90a | 58±1a |
| **CTZ** | 100±0a | 100±0a | 100±1a | 100±0,57a | 72,62±1,07a | 45±0,90a |
| **MF** | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 99±0,77a | 69±0,51a | 48±0,58a |
| **CLX** | 99,93±0,57a | 99,93±0,57a | 99,93±0,57a | 99,93±0,57a | 99,93±0,57a | 99,93±0,57a |
| **CN1** | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a | 100±0a |
| **CN2** | 99,55±0,50a | 99,55±0,50a | 99,55±0,50a | 99,55±0,50a | 99,55±0,50a | 99,55±0,50a |

[1] A concentração do CTZ no complexo de inclusão ou na mistura física variou de 1 a 32 μM. Os controles foram testados em uma única concentração: CLX (32 μM), CN2 (0,4% DMSO), CN1 (meio schineider completo).
[2] Valor médio ± EP. Médias seguidas pela mesma letra minúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Pela análise da tabela 3, observa-se que não houve diferença significativa na viabilidade dos macrófagos DH82 para as diferentes concentrações do CLX/CTZ, CTZ e MF e entre os controles. Estes resultados

sugerem que a viabilidade de macrófagos DH82 não foi afetada pela presença CLX/CTZ, CTZ ou MF, indicando ausência de citotoxicidade nas concentrações testadas.

A concentração citotóxica ($CC_{50}$) para 50% dos macrófagos DH82 foi de 16,36 µM para o CLX/CTZ, 15,29 µM para o CTZ e 15,07 µM para a MF (Figura 6).

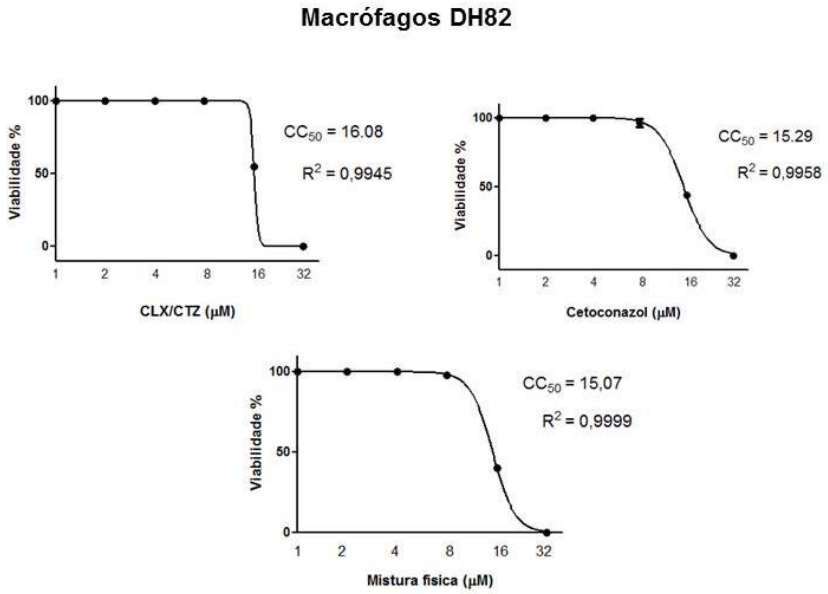


**Figura 6**. Valores de $CC_{50}$ (µM) do complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) em macrófagos da linhagem DH82 obtidos por regressão não-linear. Fonte: O autor.

## 4.3 Índice de seletividade

A citotoxicidade para macrófagos DH82 e para protozoários foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% ($CC_{50}$) para células DH82 e o $IC_{50}$ para protozoários. Quanto maior o índice de seletividade mais eficiente contra os parasitas e menos tóxico para os macrófagos (NAKAMURA et al*.,* 2006).

Para a espécie *L*. *amazonensis* os resultados de IS mostram que o CLX/CTZ, CTZ e MF foram 4,14, 1,06 e 1,08 vezes menos tóxicos para as

células DH82 do que para os protozoários. Para as formas promastigotas de *L*. *infantum,* o CLX/CTZ, CTZ e MF foram 2,42, 0,87 e 0,85 vezes menos tóxicos para as células DH82 do que para os protozoários (Tabela 4).

Tabela 4 - Valores do índice de seletividade do complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), cetoconazol puro (CTZ) e mistura física (MF) sobre formas promastigotas das espécies de *L. amazonensis* e *L. infantum*

| **Compostos** | **Índice de Seletividade** | |
|---|---|---|
| | ***L. amazonensis*** | ***L. infantum*** |
| CLX/CTZ | 4,14 | 2,42 |
| CTZ | 1,06 | 0,87 |
| MF | 1,08 | 0,85 |

# 5. DISCUSSÃO

O cetoconazol (CTZ) é um composto azólico que tem sido amplamente utilizado no tratamento de diversas enfermidades na clínica médica de seres humanos e animais (MAERTENS, 2004; YAN, et al., 2013; CHROUSOS, 2008; MONCET et al., 2007; SONINO et al., 1990).

Os azóis são conhecidos como agentes antifúngicos que inibem a biossíntese do ergosterol pela supressão da enzima 14*α*-desmetilase (DE MACEDO-SILVA et al, 2013). Assim como as células fúngicas, os protozoários *Leishmania* spp. têm a mesma via de biossíntese do ergosterol, portanto, fármacos da classe dos azóis possuem atividade contra esses parasitas (CARRILLO-MUÑOZ, et al., 2006). No entanto, o CTZ é pouco solúvel em água, apresentando problemas no preparo de formulações e de biodisponibilidade após a administração oral, diminuindo sua segurança e eficácia (HASHEMZADEH, e JOUYBAN, 2015).

Os calix[*n*]arenos e derivados como o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno tem sido utilizados em estudos para melhorar a solubilidade e eficácia de fármacos através da formação de complexos de inclusão (ABRANCHES;  et al., 2015; (ARANTES et al., 2009; YANG e DE VILLIERS, 2004).

Neste trabalho, observou-se que complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno (CLX/CTZ), o cetoconazol puro (CTZ) e a mistura física dos dois compostos (MF) apresentaram atividade leishmanicida sobre *L.amazonensis* e *L.infantum*. Isto foi comprovado pela diminuição da viabilidade celular em função do aumento da concentração do CLX/CTZ, CTZ e MF (Tabelas 1 e 2).

Estudos anteriores com o CTZ também revelaram suas propriedades leishmanicidas. Em um estudo realizado por Saenz et al. (1990), a eficácia do CTZ administrado via oral foi comparada com a pentamidina em *L. brasiliensis* e *L. panamensis,* e os pesquisadores concluíram que o CTZ é tão eficaz quanto a pentamidina. Também já foi demonstrado que a eficácia do CTZ é comparável à de fármacos antimoniais (SAENZ et al.,1990; SALMANPOUR et al., 2001).

Os valores de $IC_{50}$ obtidos no presente trabalho revelaram que o complexo CLX/CTZ apresentou atividade superior ao CTZ e a MF contra promastigotas de *L. amazonensis* e *L.infantum*. Em *L. amazonensis* o valor de $IC_{50}$ do CLX/CTZ (3,95 µM) foi aproximadamente 4 vezes menor que o valor do $IC_{50}$ do CTZ (14,35 µM) e da MF (13,87 µM). Em *L.infantum* o valor do $IC_{50}$ do CLX/CTZ (6,7 µM) foi aproximadamente 3 vezes menor que que o valor do $IC_{50}$ do CTZ (17,47 µM) e da MF (17,54 µM).

Valores semelhantes do $IC_{50}$ do CTZ também foram descritos em outros estudos. Andrade-Neto et al. (2016) relataram o valor de 11,3 µM para o $IC_{50}$ do cetoconazol em *L. amazonensis.* Em outro estudo Andrade-Neto et al. (2012) reportaram um valor de 10 µM para a mesma espécie. Khraiwesh et al. (2016), descreveram um valor de 19,85 µM para o $IC_{50}$ do CTZ em *L. major.*

É provável que a maior atividade leishmanicida obtida para o CLX/CTZ em relação ao CTZ e à MF está relacionada a maior solubilidade, estabilidade físico-química e biodisponibilidade do fármaco quando está no complexo de inclusão (YANG e DE VILLIERS, 2004). Valores de viabilidade semelhantes para o CTZ e para a MF indicam que o simples contato físico entre as moléculas (CLX e CTZ) não é capaz de aumentar sua atividade leishmanicida.

Vários autores têm pesquisado a respeito da complexação como uma alternativa para melhorar a atividade leishmanicida de compostos já disponíveis. Ruiz et al. (2014) realizaram um estudo in vitro dos efeitos de um complexo de inclusão contendo anfotericina B e *γ*-ciclodextrina sobre promastigotas de *L. infantum, L. amazonensis, L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Os autores relataram um aumento na atividade leishmanicida do complexo de inclusão dependendo da *Leishmania* spp*,* além de um índice de seletividade entre 2 e 8 vezes maior que a anfotericina B pura. Para os autores, a potencialização do efeito do complexo está relacionada ao aumento da solubilidade do fármaco devido à formação do complexo.

De Micheli et al. (2004) prepararam complexos de inclusão com *β*-ciclodextrina e antimoniato de meglumina e estudaram a atividade leishmanicida dos mesmos. O efeito leishmanicida foi avaliado em camundongos BALB/c experimentalmente infectados com *L. amazonensis*. Os animais tratados com o complexo de inclusão pela via oral desenvolveram lesões significativamente menores do que aqueles tratados com antimoniato de

meglumina puro. A eficácia do complexo de inclusão administrado por via oral foi equivalente à do antimoniato de meglumina administrado via intraperitoneal em doses duas vezes maiores, confirmando a eficácia do mesmo. Segundo os autores, os dados mostraram claramente a relação estabelecida entre a complexação e a melhor biodisponibilidade do antimoniato de meglumina por via oral.

Ainda não há estudos sobre a utilização do complexo CLX/CTZ em *Leishmania spp*. Porém, tendo em vista que o CLX pode formar complexos de inclusão com diferentes moléculas de uma maneira semelhante às ciclodextrinas, acredita-se que os resultados da utilização desse complexo de inclusão possam ser semelhantes ou até mesmo superiores aos descritos nos estudos supracitados.

Os valores obtidos de $IC_{50}$ para o CLX/CTZ, CTZ e MF foram menores em *L. amazonensis* quando comparados a *L. infantum*, o que indica uma maior sensibilidade da primeira espécie ao fármaco. Croft et al. (2006) também relataram uma maior sensibilidade aos azóis nas espécies *L. amazonensis, L. donovani* e *L. braziliensis.*

Além da atividade leishmanicida para as duas formas de vida do parasito, um composto não deve ser tóxico para os macrófagos. No presente trabalho, não houve diferença significativa na concentração citotóxica entre o CLX/CTZ, o CTZ, a MF e os controles negativos. Hart et al*.* (1989) e Nunes et al*.* (2017) também observaram que o CTZ apresenta baixa citotoxicidade para macrófagos com o valor de $CC_{50}$ de 436.5 µM. Estes dados sugerem que o composto azólico pode ser utilizado contra macrófagos infectados por *Leishmania spp*. com segurança e eficácia.

Um dos principais problemas associados ao uso de fármacos quimioterápicos na leishmaniose é a toxicidade relacionada à dose. Nesse sentido, um índice de seletividade mais alto indica que o composto é mais eficiente contra os parasitos e menos tóxico para as células.

Os resultados do índice de seletividade observados para o CTZ e para a MF demonstram que o composto é 1,06; 0,87 e 1,08; 0,85 vezes menos tóxicos para as células DH82 do que para os parasitos *L. amazonensis* e *L. infantum,* respectivamente. Da mesma forma, Shakya et al. (2011) observaram o índice de seletividade de 1,09 para o CTZ em *L. donovani,* espécie causadora de

leishmaniose visceral, um valor aproximado ao encontrado para o CTZ e para a MF no presente estudo.

De acordo com os índices de seletividade observados para o complexo CLX/CTZ, ele foi 4,14 e 2,42 vezes menos tóxicos para as células DH82 do que para os protozoários *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente. Resultado semelhante ao do complexo CLX/CTZ foi obtido por Nunes et al. (2017) em estudo com CTZ, sendo observado um índice de seletividade de aproximadamente 4,1 vezes. Ruiz et al. (2014) também observaram que o complexo de inclusão anfotericina B: γ-ciclodextrina apresentou um índice de seletividade maior do que o fármaco puro (entre 2 e 8 vezes maior) em algumas espécies de *Leishmania*.

Os melhores índices de seletividade observados para o CLX/CTZ em relação ao CTZ e a MF podem estar relacionados com a maior biodisponibilidade do fármaco em solução aquosa, quando o mesmo encontra-se na forma de complexo de inclusão com o CLX (REKHARSKY e INOUE, 1998).

Atualmente, as principais aplicações do CTZ com destaque na literatura, são o emprego do mesmo em associações com outros medicamentos leishmanicidas para obtenção de efeito aditivo na terapia da leishmaniose. Nunes et al. (2017) e Shakya et al. (2011) utilizaram o CTZ associado ao antimoniato de meglumina e à miltefosina, respectivamente, e ambos os resultados sugerem uma interação aditiva entre os compostos, demonstrando a importância do CTZ no tratamento da doença.

Devido ao efeito leishmanicida dos antifúngicos azólicos, diversos estudos sobre esses compostos têm sido realizados buscando potencializar a sua eficácia contra os parasitos e diminuir sua toxicidade para células mamíferas.

De acordo com os dados obtidos de atividade leishmanicida do CLX/CTZ em relação ao CTZ e a MF, o complexo pode ser uma alternativa promissora para ser empregada na farmacoterapia da leishmaniose cutânea e visceral, causadas por *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantu*m.

É necessária uma continuidade em pesquisas relacionadas ao CTZ e ao complexo CTZ/CLX para o melhor entendimento da sua ação sobre os parasitos. A realização de outros estudos in vitro e in vivo poderiam garantir

seu uso em monoterapia ou em associação a outro medicamento para o tratamento da leishmaniose.

# 6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados reportados neste trabalho foi observado para o complexo de inclusão cetoconazol/ácido *p*-sulfônico calix[6]areno valores de $IC_{50}$ 3,95 µM e 6,7 µM para os protozoários *L. amazonensis* e *L. infantum* respectivamente, esses valores de $IC_{50}$ foram inferiores aos do CTZ puro e da MF, que foram 14,35 µM e 13,87 µM para *L. amazonensis* e 17,47 µM e 17,54 µM para *L. infantum*. Além disso, foram observados melhores índices de seletividade para o CLX/CTZ, que é 4,14 e 2,42 vezes menos tóxicos para as células DH82 do que para os protozoários em relação ao CTZ e à MF.

Por fim, foi possível demonstrar neste trabalho a melhora na atividade leishmanicida do cetoconazol quando complexado com o ácido *p*-sulfônico calix[6]areno, representando uma alternativa promissora para a utilização em testes pré-clínicos e clínicos visando o tratamento da leishmaniose.

# 7. REFERÊNCIAS


ABDEL-MOETY, A; et al. Chromatographic determination of clotrimazole, ketoconazole and fluconazole in pharmaceutical formulations. **IL Farmaco**, v 57, n. 11, p. 931-938, 2002.

ABE, F.; USUKI, K.; HIRAKI, T. Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, 48, 8494, 2009.

ABRANCHES, P. A. S. et al. Complexes of fluconazole with sodium p-sulfonatocalix [n] arenes: characterization, solubility and antifungal activity. **RSC Advances**, v. 5, n. 55, p. 44317-44325, 2015.

AHMAD, A. et al. Isatis tinctoria mediated synthesis of amphotericin B-bound silver nanoparticles with enhanced photoinduced antileishmanial activity: a novel green approach. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 161, p. 17-24, 2016.

ALAMAR BLUE. Product Datasheet, BUF012A/B, **Bio-Rad AbD Serotec Limited**, 2008.

ALVAR et al. Canine Leishmaniasis. **Advances in Parastology**; 57:1-88, 2004.

AMARAL T. Leishmaniose Visceral Canina: um alerta para saúde pública. **Revista Cães e Gatos**. 123: 20-25, 2009.

AMIDON, G et al. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharmaceutical Research**, 12, 413; 1995.

AMIN A, HAMZA A.A. Oxidative stress mediates drug-induced hepatotoxicity in rats: a possible role of DNA fragmentation. **Toxicology**; 208:367-375; 2005.

ANDRADE M.A. et al. Essential oils: in vitro activity against Leishmania amazonensis, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

ANDRADE-NETO, V. V. et al. Antileishmanial activity of ezetimibe: inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles and efficacious in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01545-16, 2016.

ANDRADE-NETO, V. V. et al. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in Leishmania amazonensis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 416-419, 2012.

ANSLYN, E. V., DOUGHERTY, D. A.; Modern Physical Organic Chemistry, **University Science Books**, 2006.

ARANTES, L. M. et al. Proparacaine complexation with β-cyclodextrin and p-sulfonic acid calix [6] arene, as evaluated by varied 1H-NMR approaches. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 47, n. 9, p. 757-763, 2009.

ASHE, Sarbani et al. Development of liposome-encapsulated ketoconazole: formulation, characterisation and evaluation of pharmacological therapeutic efficacy. **Micro & Nano Letters**, v. 10, n. 2, p. 126-129, 2015.

AZEREDO CMO, SANTOS TG, MAIA BHLNS, SOARES MJ. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against Trypanosoma cruzi, with emphasis on Cinnamomum verum essential oil. **BMC Complementary Altern Med**; 14:309–15, 2014.

BALAÑA-FOUCE, R.; REQUERA, R. M.; CUBRÍA, J. C.; ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology**, 30, 435, 1998.

BAÑULS, A. L. et al. Clinical pleiomorphism in human leishmaniasis, with special mention of asymptomatic infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1451–1461, 2011.

BARATA, R.A.; FRANÇA-SILVA, J.C.; MAYRINK, W.; SILVA, J.C.; PRATA, A.; LOROSA, E.S.; FIÚZA, J.A.; GONÇALVES, C.M.; PAULA, K.M.; DIAS, E.S. Aspectos da ecologia e do comportamento de flebotomíneo em área endêmica de leishmaniose visceral, Minas Gerais. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v.38, n.5, p. 421-425, 2005.

BARRATT, J. L. N. et al. Importance of nonenteric protozoan infections in immunocompromised people. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 23, n. 4, p. 795–836, 2010.

BENNETT JE. Antimicrobial agents: antifungal agents. In: Hardman JG, Goodman LS, Gilman A, eds. **Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics.** New York: McGraw-Hill, 1180–2, 1995.

BERMAN, Jonathan Dembitz. Activity of imidazoles against Leishmania tropica in human macrophage cultures. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 3, p. 566-569, 1981.

BERMAN JD; et al. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular and biochemical parasitology**, *20*: 85-92, 1986.

BERMAN JD, et al. Effects of ketoconazole on growth and sterol biosynthesis of Leishmania mexicana promastigotes in culture. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 12, n. 1, p. 1-13, 1984.

BERMAN JD. Miltefosine to treat leishmaniasis. **Expert Opion on Pharmacotherapy**;6(8):1381-8, 2005.

BEZERRA WS, MENEGUETTI DUO, CAMARGO LMA. A busca de fármacos para tratamento da tripanossomíase americana:103 anos de negligencia. **Saúde**, 38: 9-20, Santa Maria, 2012.

BRASIL. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2 a Edição ed. 2010.

BRASIL. Casos confirmados de Leishmaniose Visceral, Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federativas Ministério da Saúde de 1990 a 2011. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 2012.

BRUNTON, et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman-12**. AMGH Editora, 2012.

BUTANI, D. et al. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: design and development. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 17-24, 2016.

CAMARGO, J.B. et al. Leishmaniose visceral canina: aspectos de saúde pública e controle. **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 12, n.71, p.86-92, 2007.

CARRILLO-MUÑOZ, A; et al. Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**., 19(2), 130-139, 2006.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J.C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y Farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol**., 23, 39-49, 2006.

CHANNON JY, et al. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**; 53: 345-355, 1984.

CHAO, J. et al. Characterization and enhanced antioxidant activity of the inclusion complexes of baicalin with p-sulfonatocalix [n] arenes. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v. 93, n. 3-4, p. 361-370, 2019.

CHAPPUIS F, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**; 5(11):873-82, 2007.

CHIEN RN, et al. Hepatic injury during ketoconazole therapy in patients with onychomycosis: a controlled cohort study. **Hepatology**; 25:103–107, 1997.

CHROUSOS, G.P. **Farmacologia Básica e Clínica**. Agentes antifúngicos. McGrawHill. 10, 585-586, 2008.

COSTA, J. M. L. Epidemiologia das Leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, 1(Ic) 3–17. 2005.

CROFT SL, SUNDAR S, FAIRLAMB AH. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews** *19*: 111-126, 2006.

CRAG, P. J.; **A pratical guide to supramolecular chemistry**. John Wiley & Sons, 2005.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptative mechanisms in infection by Leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132-141, 2002.

CUSTODIO, et al. Predicting drug disposition, absorption/elimination/transporter interplay and the role of food on drug absorption. **Advanced Drug Delivery Reviews**. Rev. 60, 717–733, 2008.

DE MACEDO-SILVA, S. T. et al. In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against Leishmania amazonensis. **PloS one**, v. 8, n. 12, p. e83247, 2013.

DISMUKES W.E, Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. **New England Journal of Medicine**; 330:263–272, 1994.

DORLO TP, et al. Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**;52(8):2855-60, 2008.

EMA-CHMP, European Medicines Agency's Committee on Medicinal Products for Human Use, **European Medicines Agency Recommends Suspension of Marketing Authorizations for Oral Ketoconazole**, 2013.

ESPINOSA, O. A. et al. An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as Leishmania and Endotrypanum. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 430-442, 2018.

FALQUETO A., et al. Participation of the dog in the cycle of transmission of cutaneous leishmaniasis in the municipality of Viana, State of Espirito Santo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 81:155-63, 1986.

FEITOSA, M.M.; IKEDA, F.A.; LUVIZOTTO, M.C.R.; PERRI, S.H.V. Aspectos clínicos de cães com leishmaniose visceral no município de Araçatuba – São Paulo (Brasil). **Clínica Veterinária**, São Paulo, ano 5, n.28, p.36-44, 2000.

FELICIANGELI, M. D. Natural breeding places of phlebotomine sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 1, p. 71- 80, 2004.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA) Drug Safety Communications. **FDA limits usage of Nizoral (ketoconazole) oral tablets due to potential fatal liver injury and risk of drug interactions and adrenal gland problems**, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Label and approval history**, 2015.

FURTADO T. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Machado-Pinto J, **Doenças infecciosas com manifestações dermatológicas**, 1 ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica Ltda. pp. 319-328, 1994.

GALVÃO, et al. Efficacy of azole therapy for tegumentary leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PloS one**, v. 12, n. 10, p. e0186117, 2017.

GANGNEUX, J.P. et al. Experimental evaluation of second-line oral treatments of visceral leishmaniasis caused by Leishmania infantum. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 1, p. 172-174, 1999.

GINGER ML, et al. Carbon sources for fatty acid and sterol biosynthesis in Leishmania species. **Biochemical Society Transactions**, 24(3):434S (1996).

GOAD L.J; et al. Sterols of ketoconazoleinhibited Leishmania mexicana mexicana promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology,** 15(3):257–279, 1985.

GOMEZ URCUYO, F.; ZAIAS, Nardo. Oral ketoconazole in the treatment of leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 21, n. 7, p. 414-416, 1982.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. DE. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONTIJO, C. M. F; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 338-349, 2004.

GREEN CE. Antifungal chemotherapy. In: Green CE, eds. **Infectious Diseases of the Dog and Cat. Philadelphia**, PA: WB Saunders, 542–50, 2006.

GREENBLATT HK, GREENBLATT DJ. Liver injury associated with ketoconazole: review of the published evidence. **Journal of Clinical Pharmacology**; 54:1321-1329, 2014.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, p. 1169–1180, 2005.

GRIENSVEN, S.V. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet infectious disease**, v.10, p. 184-194,2010.

GRIMALDI, G.; TESH, R. B. Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical microbiology reviews**, v. 6, n. 3, p. 230-250, 1993.

GUERIN, P. J.; et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet Infectious Diseases**, 2, 494, 2002.

GUTSCHE, C. D. et al. Calixarenes 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from para-tertbutylphenol, **Journal of the American Chemical Society**, v. 103., p. 3782-3792, 1981.

GUTSCHE, C. David. The calixarenes. In: **Structural Chemistry**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 1-47, 1984.

GUTSCHE, Calixarenes, Monographs in Supramolecular Chemistry J.F. Stoddard (ed.), **The Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 1989.

GUTSCHE, C. D.; Calixarenos Revisited. **Royal Society of Chemistry**, Cambridge, 1997.

HART, D. T. et al. Perturbation of sterol biosynthesis by itraconazole and ketoconazole in *Leishmania mexicana* infected macrophages. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 33, n. 2, p. 123-134, 1989.

HASHEMZADEH, N; JOUYBAN, A. Solubility of ketoconazole in ethanol+ water mixtures at various temperatures. **Chemical Engineering Communications**, v. 202, n. 9, p. 1211-1215, 2015.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ, II INFORME TÉCNICO: **Leishmaniose visceral americana**. Secretaria de Estado da Saúde do Estado de São Paulo, ed. MS, p.13-14, 2003.

JAESCHKE H, GORES GJ, CEDERBAUM AI, HINSON JA, PESSAYRE D, LEMASTERS JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. **Toxicology Science**; 65:166-176, 2002.

JANSSEN PA, SYMOENS JE. Hepatic reactions during ketoconazole treatment. **American Journal of Medicine**; 74: 80–5, 1983.

JOLIFFE D.S., Cutaneous leishmaniasis from Belize--treatment with ketoconazole. **Clinical and Experimental Dermatology**. 11, 62–68. 1986.

JOLY, V. et al. Inhibiting cholesterol synthesis reduces the binding and toxicity of amphotericin B against rabbit renal tubular cells in primary culture. **The Journal of Infectious Diseases**, 165, 337, 1992.

JOUYBAN, et al. Solubility of ketoconazole in polyethylene glycol 200+ water mixtures at 298.2–318.2 K. **Journal of Solution Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 950-958, 2014.

KATAOKA, et al. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 47, n. 1, p. 113-131, 2001.

KIRK, R.; MACDONALD, D. R. An Unusual case of leishmaniasis treated wiith diamidino diphenoxy pentane. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, 34, 131,1940.

KHRAIWESH, M. et al. Antileishmanial activity of compounds derived from the Medicines for Malaria Venture Open Access Box against intracellular Leishmania major amastigotes. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 2, p. 340-347, 2016.

KRAUSPENHAR, C. et al. Leishmaniose visceral em um canino de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, 37, 2007.

KULKARNI, M. M. et al. Voriconazole suppresses the growth of Leishmania species in vitro. **Parasitology research**, v. 112, n. 5, p. 2095-2099, 2013.

LAINSON R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis – Distribution of the vector Lutzomyia longipalpis (Lutz and Neiva) in relation to the fox Cerdocyon thous (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 85: 135-7; 1990.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica **Revista Pan-Amazônica de Saude** v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LAINSON, R. The american leishmaniasis: some observations and on their and epidemiology. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene,** 7: 569, 1993.

LEVINE, H. B. et al. Ketoconazole in the management of fungal disease. **ADIS Press**, 404 Sydney Road, Balgowlah, NSW 2093, Australia., 1982.

LIMA, W.G. et al. Canine visceral leishmaniasis: a histopathological study of limph nodes. **Acta tropica**, 92: 43-53, 2004.

LLANOS-CUENTAS, E. A. et al. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia-Brazil: an area of Leishmania braziliensis braziliensis transmission. II. Cutaneous disease. Presentation and evolution. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 17, n. 4, p. 169-177, 1984.

LUTZ, A.; NEIVA, A. Contribuição para o conhecimento das espécies do gênero Phlebotomus existentes no Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, n. 1, p. 84-95, 1912.

MADEIRA, M. F. et al. Mixed infection with Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) chagasi in a naturally infected dog from Rio de Janeiro, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. 5, p. 442-445, 2006.

MAERTENS J.A. History of the development of azole derivatives. **Clinical Microbiology and Infection**; 10:1-10, 2004.

MAHMOUDVAND H. et al. In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activities of Pistacia vera Essential Oil. Published online. **Planta Medica;** Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 2015.

MANCIANTI F. et al. Studies on canine leishmaniasis control.1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.; 82(4):566-7,1988.

MAPA (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO). **Nota Técnica nº 11/2016**. Coordenação De Fiscalização De Produtos Veterinários. Bairro Zona Cívico-Administrativa - DF, 2016.

MARCONDES M. Leishmanioses. In: Larsson e Lucas, **Tratado de Medicina Externa**. 1. ed. São Paulo. Interebook Editorial. pp. 313-344, 2016.

MARRAPU, V.K. et al. Design and synthesis of novel tetrahydronaphthyl azoles and related Cyclohexyl azoles as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters,** 21, 1407-1410, 2011.

MAYER, U. K. et al. Adverse effects of ketoconazole in dogs–a retrospective study. **Veterinary dermatology**, v. 19, n. 4, p. 199-208, 2008.

MEDDA, F.; et al. Short term treatment with ketoconazole: effects on gonadal and adrenal steroidogenesis in women. **Clinical and Experimental Obstetrics & Gynecology**, 14(4-3), 161-166, 1987.

MENDES, C. S. et al. Impacto das mudanças climáticas sobre a leishmaniose no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 21, p. 263-272, 2016.

MICHALICK, M.S.M; GENARO, O. Leishmaniose Visceral Americana. **Parasitologia humana**, 11º ed., Ed. Atheneu, São Paulo, p. 56-72, 2005.

MICHALICK, M. S. M. RIBEIRO, R. R. Gênero leishmania. **Parasitologia humana**. 12. Ed. São Paulo: Atheneu, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria Interministerial nº 1.426**, de 11 de julho de 2008. Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e dá outras providências. Diário Oficial da União. 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana**. Secretaria de Vigilância em Saúde Versão eletrônica, 2017.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, E. S. Preferência alimentar de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 365- 368, 2008.

MISSAWA, N. A. et al. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por Lutzomyia cruzi no município de Jaciara, Estado de Mato Grosso, Brasil. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, 2011.

MONCET, D. et al. Ketoconazole therapy: an efficacious alternative to achieve eucortisolism in patients with Cuching's syndrome. **Medicina**, 67(1), 26-31, 2007.

MOSSER D.M., EDELSON P.J. Activation of the alternative complement pathway by *Leishmania* promastigotes: parasite lysis and attachment to macrophages. **Journal of Immunology**; 132: 1501-1505, 1984.

MOSSER DM, BURK SK, COUTAVAS EE, WEDGEWOOD, JF, EDELSON PJ. *Leishmania* species: mecanisms of complement activation by five strains of promastigotes. **Exp Parasitol**; 62: 394-404, 1986.

MURRAY HW. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. **Journal of Experimental Medicine** ; 153: 1302-1315, 1981.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de Piper regnellii (Miq.) C. DC. var. pallescens (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 61-66, 2006.

NASEER, et al. Functionalized calix [4] arenes as potential therapeutic agents. **Chemical biology & drug design**, v. 89, n. 2, p. 243-256, 2017.

NAVIN T.R, et al. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **Infectious Diseases.** 165, 528–534, 1992.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutchen Dermatologischen** Gesellschaft, v.9, p.754-765, 2008.

NOLI, C.; AUXILIA, S.T. Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. **Veterinary dermatology**, v. 16, n. 4, p. 213-232, 2005.

NUNES, D.C.O. et al. In vitro additive interaction between ketoconazole and antimony against intramacrophage Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0180530, 2017.

OLIVEIRA, G.G.S.; et al. The subclinical form of experimental visceral leishmaniasis in dogs. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 88: 243-248, 1993.

OLIVEIRA, L. F.; et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica** 118(2):87-96, 2011.

OLLIARO PL, et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **The Lancet Infectious Disease**; 5(12):763-74, 2005.

OTRANTO, D; DANTAS-TORRES, F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. **Trends in Parasitology**. 29(7):339-45, 2013.

PASSOS-DIAS, F. O.; LOROSA, E. S.; REBÊLO, J. M. M. Fonte alimentar sangüínea e a peridomiciliação de Lutzomyia longipalpis (Lutz & Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 5, p. 1373-1380, 2003.

PERIASAMY, S. et al. Daily sesame oil supplementation mitigates ketoconazole-induced oxidative stress-mediated apoptosis and hepatic injury. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 37, p. 67-75, 2016.

PETERS, N.C.; et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, p.970–974, 2008.

PIMENTA PF, et al. Cell surface nano nanatomy of *Leishmania major* as reveled by fractureflip. A suface meshwork of 44 nm fusiform filaments identifies infective developmental stage promastigotes. **European Journal of Cell Biology**; 48: 180-190, 1989.

PIMENTA, P. F. P.; TURCO, S. J. Stage-specific adhesion of Leishmania promastigotes to the sandfly midgut. **Science,** 256(5065): 1812-1815. 1992.

PURKAIT, B.; et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 56, 1031, 2012.

RAMANATHAN, R. et al. A species-specific approach to the use of non-antimony treatments for cutaneous leishmaniasis. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 84, n. 1, p. 109-117, 2011.

REGUERA, R. M. et al. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, n. 227, p. 98–114, 2016.

REKHARSKY, M.V.; INOUE, Y. Complexation thermodynamics of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, p. 1875-1918, 1998.

ROBERTS CW, et al. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. **Molecular and Biochemical Parasitology,** 126: 129-142, 2003.

RUIZ, H. K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and Leishmania spp. **International journal of pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p. 148-157, 2014.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N.. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845, 2002.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis**. Annual Review of Microbiology**, 55, 453-483. 2001.

SAENZ, R.E., et al. Efficacy of ketoconazole against *Leishmania braziliensis panamensis* cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Medicine**. 88, 147-155, 1990.

SALMANPOUR R.F. et al. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. **Journal of Dermatological Treatment**, 12, 159–162, 2001.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in antileishmanial drug discovery and development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, 5. pp. 31-9, 2011.

SHAKYA, N. et al. Improved treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combination of ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator-Picroliv. **Acta tropica**, v. 119, n. 2-3, p. 188-193, 2011.

SOARES, N. P. et al. Alterações cardíacas em cães com leishmaniose viscera. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 37, n. 4, p. 339-344, 2015.

SONINO, N.; et al. Low-dose ketoconazole treatment in hirsute women. **Journal of Endocrinological Investigation,** 13(1), 35-40, 1990.

SOTO, J. B. et al. Miltefosine for the new world cutâneos leishmaniasis. **Clinical infections Diseases.** v.38, n.9, p. 1266-1272, 2004.

SOBARZO-SANCHEZ, E., et al. Synthetic oxoisoaporphine alkaloids: in vitro, in vivo and in silico assessment of antileishmanial activities. **PLoS One** 8, e77560, 2013.

SOUSA, M.V.C. et al. Níveis séricos de uréia e creatinina em cães naturalmente infectados por Leishmania chagasi. **PUBVET**, Londrina, V. 5, N. 12, Ed. 159, Art. 1078, 2011.

SUNDAR S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis**. Tropical Medicine & International Health**; 6(11):849-54;7(3):293, 2001.

SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. **The Indian Journal of Medical Research**, 123, 345, 2006.

SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bulletin of the World Health Organization**, 83, 394, 2005.

SWEETMAN S.C, **Martindale: The complete drug reference**. London: Pharmaceutical Press. ce. 36th ed. pp 539–540, 2009.

TAHGHIGHI, A., et al., et al. Synthesis and anti-leishmanial activity of 5-(5-nitrofuran-2-yl)-1,3,4-thiadiazol- 2-amines containing N-[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl] moieties. **The European Journal of Medicinal Chemistry**. 50, 124-128, 2012.

THE MERCK INDEX. **An encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals.** USA: 11ed, Merck & CO., INC, p. 835, 1989.

TUBIC-GROZDANIS, M., et al.: Application of gastrointestinal simulation for extensions for biowaivers of highly permeable compounds. **The American Association of Pharmaceutical Scientists**. 10, 213–226, 2008.

URBAN, A. M. et al. Efetividade Antifúngica De Fármacos Complexados Com Ciclodextrinas. **Revista Saúde da Universidade UNIVERITAS/UNG,** v. 10, n. 1-2, p. 97-110, 2016.

URBINA J. A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**;114 Suppl:S91-9, 1997.

VAN DEN BOSSCHE H, et al. In vitro and in vivo effects of the antimycotic drug ketoconazole on sterol synthesis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 17:922-928, 1980.

VAREJÃO V. V. et al. Calix [n] arenes as goldmines for the development of chemical entities of pharmaceutical interest. **Current pharmaceutical design**, v. 19, n. 36, p. 6507-6521, 2013.

WEINRAUCH, L. et al. Cutaneous leishmaniasis: treatment with ketoconazole. **Cutis**, v. 32, n. 3, p. 288-9, 294, 1983.

WILSON, R.; et al. Stagespecific adhesion of Leishmania promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 4(9), 1–9, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of the leishmaniases: Report of a meeting March 2010**, WHO Technical report series; 949, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)**. Leishmaniasis**, Publication, 2016. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Health topics: Leishmaniasis**, 2011. Disponível em: http://www.who.int/leishmaniasis/en. Acesso em: 26/09/2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Status of endemicity of visceral leishmaniasis worldwide**, Publication, 2015. Disponível em:

http://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_VL_worldwide_2015_with_imported_cases.pdf?ua=1. Acesso em: 01/10/2018.

YAN J. Y, et al. Ketoconazole associated hepatotoxicity: a systematic review and meta- analysis. **Biomedical and Environmental Sciences**; 26:605-610, 2013.

YANG, W. & DE VILLIERS, M. M. Aqueous solubilization of furosemide by supramolecular complexation with 4-sulphonic calix[n]arenes. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 56(6), 703–708, 2004.

YASUR-LANDAU, Daniel et al. Allopurinol resistance in Leishmania infantum from dogs with disease relapse. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 1, p. e0004341, 2016.

ZHANG, C. et al. Investigation on the supramolecular recognition behaviour of sulfonatocalix [6] arene with amino benzoic acid isomers. **Physics and Chemistry of Liquids**, v. 54, n. 1, p. 27-36, 2016.

ZHANG, Y; CAO, W.; Self-assembly of small molecules: an approach combining electrostatic self-assembly technology with host–guest chemistry, **New Journal of Chemistry**, v. 25, p. 483-486, 2001.