ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DE AZUL DE METILENO FORMULADO EM PLURONIC® DE F-108, PVA E ÁCIDO CÍTRICO CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Gabriel Iamassaki Staquicini de Paula (PIBIC/FA), Anibal Salinas Junior, Arthur Girardi Francalin Laureano, Matheus Simplicio Sena, Aline Ávila Brustolin, Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré (Orientador). E-mail: acfhrmilare2@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR

Área e subárea do conhecimento: Farmácia/Farmacotecnia.

Palavras-chave: Azul de metileno; Terapia fotodinâmica; Leishmaniose.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar (LT), causada principalmente por *Leishmania amazonensis* (*LLa*) no Brasil, apresenta limitações terapêuticas devido à toxicidade e ao prolongado tratamento com antimoniais e anfotericina B. A terapia fotodinâmica (TFD), utilizando azul de metileno (AM) como fotossensibilizador, surge como alternativa promissora. Este estudo avaliou a atividade anti-*Leishmania* do AM puro e formulado com Pluronic® F-108, poli(álcool de vinila) (PVA) e ácido cítrico (AC), associado à TFD em formas amastigotas de *LLa*. Macrófagos J774A.1 infectados com *LLa* foram tratados com diferentes concentrações de AM puro e formulado (1%, 0,5% e 0,25%), com ou sem exposição à luz de 660 *nm* por 30 minutos. Após coloração e contagem de células, foram determinados o índice de infecção e o percentual de inibição. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do post hoc Dunn, e pelo tamanho de efeito $\eta^2[H]$. A associação do AM à TFD aumentou a atividade anti-*Leishmania* em todas as formulações, com destaque para as concentrações de 1% e 0,5%, que apresentaram maiores reduções do índice de infecção. As formulações demonstraram importante atividade como fotossensibilizador, com menor toxicidade aos macrófagos, se comparado à literatura para o AM puro. O AM formulado apresentou potencial terapêutico contra as amastigotas de *LLa*, ainda sendo necessários novos estudos para otimização das concentrações e confirmação de sua eficácia.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses negligenciadas e endêmicas que afetam populações vulneráveis. No Brasil, destaca-se a espécie *Leishmania amazonensis* (*LLa*). Os parasitos são transmitidos pela picada de fêmeas infectadas de insetos flebotomíneos, do gênero *Lutzomyia*. Após a inoculação dos parasitos no hospedeiro, ocorre o processo de fagocitose, principalmente, por macrófagos, onde as promastigotas se diferenciam para a forma amastigota, adaptada ao meio intracelular. No interior das células hospedeiras, as amastigotas multiplicam-se, o que resulta na lise celular e consequente propagação da infecção. De forma geral,

as manifestações clínicas dividem-se em leishmaniose visceral (LV) e tegumentar (LT), sendo esta a mais comum (BRASIL, 2017).

O tratamento convencional da LT utiliza os antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, com a anfotericina B como alternativa. Contudo, a alta toxicidade sistêmica e seus frequentes efeitos adversos somados à necessidade de um período longo de tratamento, propiciam o abandono terapêutico (BRASIL, 2017).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como uma alternativa promissora aos tratamentos convencionais para a LT, destacando-se por sua seletividade e baixa toxicidade. A TFD baseia-se na excitação de um agente fotossensibilizador por uma fonte de luz, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O Azul de Metileno (AM) é um corante que atua como agente fotossensibilizador, e já demonstrou atividade promissora para o tratamento de LT, diminuindo o número de células infectadas e de amastigotas internalizadas, *in vitro* (OLIVEIRA *et al*., 2017).

As formulações em estudo são compostas por Pluronic® F-108, que apresenta propriedades anfifílicas e capacidade de formar micelas e hidrogéis. Tais características favorecem a liberação controlada de fármacos, além de potencializar propriedades biofarmacêuticas, farmacodinâmicas e farmacocinéticas (NASCIMENTO *et al*., 2018). Associado a ele, o poli(álcool de vinílico) (PVA) é empregado como estabilizador em suspensões de nanopartículas, com estudos demonstrando aumento de biodisponibilidade (VALAMLA *et al*., 2022). Além disso, o ácido cítrico (AC) contribui para a melhoria de propriedades como a estabilidade, biocompatibilidade e liberação controlada de fármacos (NANGARE *et al*., 2021). Diante disso, o estudo busca avaliar TFD associada AM, puro e formulado, como agente fotossensibilizador e seu potencial para tratamento alternativo da LC.

MATERIAIS E MÉTODOS

Azul de metileno formulado e fonte de luz

A fonte de luz, de 660 *nm*, e as soluções de AM (Siynth®) puro e formulado com Pluronics® de F-108, PVA e AC foram fornecidos em diferentes concentrações pelo Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá (Nupesf/UEM).

Infecção, tratamento e contagem de células e amastigotas

Os macrófagos J774A.1 foram semeados em placas de 24 poços com lamínulas de vidro, incubados a 37 °C, em atmosfera de 5% CO_2 por 2h30. As células foram lavadas e infectadas com *LLa*. Após 4 horas de incubação para induzir a infecção por formas amastigotas, os poços foram lavados para a remoção de parasitos não fagocitados. Em seguida, o AM foi adicionado em diferentes concentrações, puro e as versões formuladas em 1%, 0,5% e 0,25%; uma placa foi exposta à luz por 30 minutos, enquanto a placa controle permaneceu protegida da luz. Para a leitura, as células aderentes em lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico rápido, para a contagem e determinação do percentual de macrófagos infectados e do número médio de parasitos por macrófago.

Análises estatísticas

Com base nos resultados da contagem de células, foram calculados o índice de infecção e o percentual de inibição de infecção. Por meio do software RStudio v. 4.5.3, foram calculados a média, o desvio padrão e o intervalo de confiança de 95%. A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homocedasticidade pelo teste de Levene. Optou-se pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do post hoc de Dunn. Dado que o valor de p é uma medida influenciada pelo tamanho da amostra, também foram calculados os tamanhos de efeito eta-quadrado ordinal ($\eta^2[H]$). O tamanho de efeito $\eta^2[H]$ pode ser classificado em: pequeno ($\eta^2[H] \geq 0,01$), médio ($\eta^2[H] \geq 0,06$) ou grande ($\eta^2[H] \geq 0,14$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram distribuídos conforme a Tabela 1.

Tabela 1: Avaliação da atividade do AM com diferentes concentrações de formulação, com e sem a aplicação de TFD

Droga	Concentração (µg/mL)	TFD	Índice de Infecção (Média ± DP [95%IC])	Redução média de infectividade	Redução percentual
Controle	-	-	367.88 ± 18.7 [352.24 - 383.51]	ref	ref
AM 0,25%	3,00	Sem luz	405.00 ± 18.16 [376.1 - 433.9][a]	0,00	0,00
		Com luz	313,00 ± 12.19 [293.61 - 332.39][a]	54,88	14,92
	1,50	Sem luz	400.75 ± 64.56 [298.03 - 503.47][*]	0,00	0,00
		Com luz	335.38 ± 28.13 [290.62 - 380.13][*]	32,50	8,83
AM 0,5%	3,64	Sem luz	447.50 ± 53.32 [362.66 - 532.34][b]	0,00	0,00
		Com luz	268.25 ± 22.36 [232.68 - 303.82][b]	99,63	27,08
	1,82	Sem luz	396.88 ± 26.19 [355.21 - 438.54][*]	0,00	0,00
		Com luz	338.25 ± 35.88 [281.16 - 395.34][*]	29,63	8,05
AM 1%	3,10	Sem luz	340.62 ± 24.94 [300.94 - 380.31][*]	27,26	7,41
		Com luz	248,00 ± 18.86 [217.99 - 278.01][*]	119,88	32,59
	1,55	Sem luz	387.88 ± 28.07 [343.21 - 432.54][*]	0,00	0,00
		Com luz	344.88 ± 32.54 [293.1 - 396.65][*]	23,00	6,25
AM Puro	9,92	Sem luz	461.62 ± 38.56 [400.27 - 522.98][c]	0,00	0,00
		Com luz	293.12 ± 15.12 [269.07 - 317.18][c]	74,76	20,32
	4,96	Sem luz	427.88 ± 49.82 [348.6 - 507.15][d]	0,00	0,00
		Com luz	336.12 ± 38.11 [275.48 - 396.77][d]	31,76	8,63

Os pares de letras indicam diferenças estatisticamente significativas entre si; teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn; $p < 0,05$. [a][Dunn = 2,54; p< 0,05; $\eta^2[H] = 0,923$; "Grande"]. [b][Dunn = 3,7; p< 0,01; $\eta^2[H] = 1,95$; "Grande"]. [c][Dunn = 3,75; p< 0,01; $\eta^2[H] = 2,01$; "Grande"]. [d][Dunn = 2,54; p< 0,05; $\eta^2[H] = 0,923$; "Grande"]. [*]Pares (com/sem luz) que não apresentaram diferenças estatisticamente significativas mas tamanho de efeito considerando grande.

A redução média da infectividade representa a diminuição absoluta do índice de infecção promovida pelo tratamento em relação ao grupo controle não tratado, calculada pela diferença entre os índices médios de infecção. A redução percentual da infectividade representa essa diminuição proporcionalmente ao índice médio de infecção do grupo controle não tratado, sendo calculada pela diferença entre os índices médios de infecção, dividida pelo índice médio de infecção do controle e multiplicada por 100. O índice de infecção foi determinado pela multiplicação do percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófago.

Os resultados evidenciam a melhoria da atividade anti-*Leishmania* do AM em todos os testes, quando aplicada à TFD, com maior destaque para o AM 1% e 0,5% nas suas maiores concentrações, apresentando as melhores reduções. Os pares com tamanho de efeito grande indicam que, com a adição de novas observações, há uma tendência de haver significância estatística entre estes grupos.

A literatura indica atividade do AM puro em concentração de 12,5 µg/mL, quando aplicado à TFD, porém com alta toxicidade aos macrófagos (OLIVEIRA *et*

al., 2017). As versões formuladas testadas apresentaram menos toxicidade, com concentrações ativas frente aos parasitos significativamente menores.

CONCLUSÕES

Conclui-se que a TFD com o AM formulado reduziu o índice de infecção de amastigotas, sendo, também, mais efetivo que o AM puro. Novos ensaios são necessários para avaliar a efetividade entre os grupos, em diferentes concentrações da formulação.

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos à Fundação Araucária, CNPq/CAPES, ao Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Imunologia Clínica e Epidemiologia, assim como a todos seus integrantes e professores.

REFERÊNCIAS

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar.** 1 ed. Brasil, 2017.

NANGARE, S.; VISPUTE, Y.; TADE, R.; DUGAM, S.; PATIL, P. Pharmaceutical applications of citric acid. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 54, 2021. DOI: https://doi.org/10.1186/s43094-021-00203-9.

NASCIMENTO, M. H. M.; FRANCO, M. K. K. D.; YOKAICHYIA, F.; DE PAULA, *et al*. Hyaluronic acid in Pluronic F-127/F-108 hydrogels for postoperative pain in arthroplasties: influence on physico-chemical properties and structural requirements for sustained drug-release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 204-213, 2018. DOI: https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2018.06.023.

OLIVEIRA, S. de; TRAHAMANE, E. J. da O.; MONTEIRO, J.; *et al*. Leishmanicidal effect of antiparasitic photodynamic therapy-ApPDT on infected macrophages. **Lasers Med Sci**, 2017. DOI 10.1007/s10103-017-2292-9.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2025. Disponível em: https://www.R-project.org/.

VALAMLA, B.; THAKOR, P.; PHUSE, R.; *et al*. Engineering drug delivery systems to overcome the vaginal mucosal barrier: current understanding and research agenda of mucoadhesive formulations of vaginal delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, 103162, 2022. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103162