



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

LUAN CÍCERO DA SILVA

**CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS POR QUITOSANA: POTENCIAL
TERAPÊUTICO CONTRA *ESCHERICHIA COLI* PATOGENICA E
LEISHMANIA SPP.**

Recife
2025

LUAN CÍCERO DA SILVA

**CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS POR QUITOSANA: POTENCIAL
TERAPÊUTICO CONTRA *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA E
LEISHMANIA SPP.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário
Ferro Cavalcanti

Coorientador: Me. Jeferson Ricardo da
Silva

Recife
2025

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Luan Cícero da.

Curcumina nanoencapsulada em lipossomas revestidos por quitosana:
Potencial terapêutico contra *Escherichia coli* patogênica e *Leishmania* spp. /
Luan Cícero da Silva. - Recife, 2025.
55 p. : il., tab.

Orientador(a): Isabella Macário Ferro Cavalcanti

Cooorientador(a): Jeferson Ricardo da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2025.

Inclui referências.

1. Nanotecnologia. 2. Antibacteriano. 3. Antiparasitário. 4. *Escherichia coli*. 5. *Leishmania* spp.. I. Cavalcanti, Isabella Macário Ferro. (Orientação). II. Silva, Jeferson Ricardo da. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

LUAN CÍCERO DA SILVA

**CURCUMINA NANOENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS
REVESTIDOS POR QUITOSANA: POTENCIAL TERAPÊUTICO
CONTRA *ESCHERICHIA COLI* PATOGÊNICA E *LEISHMANIA* SPP.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 11 / 12 / 2025

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE)

Profa. Dra. Gabriela Souto Vieira de Mello
Centro de Ciências da Saúde (CCS/UFPE)

Prof. Lucas de Almeida Silva
Instituto Keizo Asami (iLIKA/UFPE)

Dedico este trabalho a minha família,
que sempre foi o meu porto seguro e
meu motivo para seguir firme em
busca de um sonho.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me conceder saúde, resiliência e discernimento para concluir mais uma etapa tão significativa da minha vida acadêmica e pessoal.

À minha orientadora, Profa. Isabella Macário, pela orientação exemplar, paciência e ouvidos acolhedores para tirar dúvidas e me guiar ao longo de todo o desenvolvimento do trabalho. Além de uma excelente orientadora, é uma pessoa inspiradora, cujo exemplo e humanidade levarei comigo ao longo da minha trajetória profissional.

Ao meu coorientador, Jeferson Ricardo, expresso minha profunda gratidão por me acompanhar desde o início da minha trajetória na iniciação científica. Sou imensamente grato por todos os ensinamentos, orientações e conselhos compartilhados, bem como pela relação de amizade, confiança e respeito construída ao longo desse período. Sua orientação foi essencial para meu crescimento acadêmico e pessoal.

Ao grupo de pesquisa MicroNAT, expresso minha sincera gratidão pelo acolhimento, pelos ensinamentos compartilhados e pelas amizades construídas durante este período tão enriquecedor. Agradeço a todos os integrantes do grupo que, de alguma forma, contribuíram para esta jornada, em especial à doutoranda Jaqueline Barbosa, cuja colaboração, apoio e dedicação foram fundamentais para a realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, Genival e Suely, que são o meu ponto de equilíbrio e a minha maior inspiração. Mesmo diante das dificuldades, nunca mediram esforços para me proporcionar as melhores oportunidades. O sacrifício e a dedicação de vocês jamais serão esquecidos. Agradeço por todo amor, apoio e incentivo, mesmo quando meus objetivos pareciam difíceis de compreender. Aos meus irmãos - Vanessa, Lucas, Leonardo, Leandro, Fernanda e Viviane - pelo incentivo. Amo vocês imensamente.

Aos amigos que a UFPE me proporcionou conhecer, em nome de Gabi, Emily, Beatriz, Jediel, João Gabriel, João Guilherme, Alicia, Kleyverson, Maju e Isadora, expresso minha sincera gratidão por compartilharem comigo essa trajetória.

A presença de vocês tornou os desafios, os momentos de estresse e as dificuldades muito mais leves. Obrigado por cada experiência vivida, pelas risadas, pelo apoio e pela amizade que tornaram essa caminhada inesquecível.

Aos meus amigos que a Casa dos Estudantes de Bezerras me possibilitou conhecer, em nome de Muriel, Kalel, Shirleide, Maria, Davyd e Micael, agradeço por compartilharem comigo tantos dias (e madrugadas) repletos de companheirismo e momentos marcantes. As conversas, risadas e brincadeiras tornaram minha rotina mais leve e acolhedora. Juntos, formamos uma verdadeira família aqui em Recife, vibrando por cada uma de nossas conquistas e crescendo juntos. Sou profundamente grato por nossa amizade e por cada memória construída ao longo dessa jornada.

Por fim, agradeço à Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e todo o corpo docente pela significativa contribuição para minha formação e por tornar essa conquista possível.

Muito obrigado.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na
beleza de seus sonhos”

Eleanor Roosevelt

SILVA, Luan Cícero. **Curcumina nanoencapsulada em lipossomas revestidos por quitosana: Potencial terapêutico contra *Escherichia coli* patogênica e *Leishmania* spp.** 2025. p. 55. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

RESUMO

As doenças infecciosas provocadas por bactérias e protozoários continuam a representar um desafio crítico para a saúde pública, agravado pela crescente resistência aos tratamentos convencionais. A curcumina, um polifenol de amplo espectro com propriedades antimicrobianas e antiparasitárias, apresenta, entretanto, limitações clínicas associadas à baixa solubilidade, instabilidade química e reduzida biodisponibilidade. Neste estudo, foi desenvolvida e caracterizada uma formulação de curcumina nanoencapsulada em lipossomas revestidos por quitosana (Lipo-CUR-Qui), a fim de avaliar suas características físico-químicas, estabilidade e citotoxicidade, além da atividade antibacteriana e antibiofilme frente a cepas de *Escherichia coli* e eficácia antiparasitária contra *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*. A formulação apresentou elevada eficiência de encapsulação (97,2%), estabilidade de até 120 dias sob refrigeração a 2 °C e potencialização expressiva da atividade antimicrobiana em comparação à curcumina livre. Observou-se redução significativa das concentrações inibitórias mínimas contra *E. coli*, além de efeito dose-dependente na inibição da formação de biofilmes. Em macrófagos RAW 264.7, Lipo-CUR-Qui demonstrou menor citotoxicidade, indicando maior segurança comparado a CUR livre. Nos ensaios contra *Leishmania* spp., a encapsulação resultou em aumento da potência e da seletividade, sobretudo frente a *L. amazonensis*, aproximando-se do perfil terapêutico da anfotericina B, mas com menor toxicidade. Esses resultados evidenciam que lipossomas revestidos por quitosana são uma plataforma promissora para potencializar a atividade biológica da curcumina, configurando-se como estratégia inovadora para o tratamento de infecções bacterianas e parasitárias.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Antibacteriano. Antiparasitário. *Escherichia coli*. *Leishmania* spp..

SILVA, Luan Cícero. **Curcumina nanoencapsulada em lipossomas revestidos por quitosana: Potencial terapêutico contra *Escherichia coli* patogênica e *Leishmania* spp.** 2025. p. 55. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2025.

ABSTRACT

Infectious diseases caused by bacteria and protozoa continue to pose a critical challenge to public health, exacerbated by increasing resistance to conventional treatments. Curcumin, a broad-spectrum polyphenol with antimicrobial and antiparasitic properties, nevertheless presents clinical limitations associated with low solubility, chemical instability, and poor bioavailability. In this study, a curcumin formulation nanoencapsulated in chitosan-coated liposomes (Lipo-CUR-Qui) was developed and characterized in order to evaluate its physicochemical performance, stability, antibacterial and antibiofilm activity against *Escherichia coli* strains, and antiparasitic efficacy against *Leishmania infantum* and *L. amazonensis*. The formulation showed high encapsulation efficiency (97.2%), stability for up to 120 days under refrigeration, and a marked increase in antimicrobial activity compared to free curcumin. A significant reduction in the minimum inhibitory concentrations against *E. coli* was observed, as well as a dose-dependent effect in inhibiting biofilm formation. In RAW 264.7 macrophages, Lipo-CUR-Qui demonstrated lower cytotoxicity, indicating greater safety compared to free CUR. In assays against *Leishmania* spp., encapsulation resulted in increased potency and selectivity, especially against *L. amazonensis*, approaching the therapeutic profile of amphotericin B but with lower toxicity. These results demonstrate that chitosan-coated liposomes are a promising platform to enhance the biological activity of curcumin, representing an innovative strategy for the treatment of bacterial and parasitic infections.

Keywords: Nanotechnology. Antibacterial. Antiparasitic. *Escherichia coli*. *Leishmania* spp..

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura química da molécula de curcumina, exibindo em (A) os grupamentos cetonas e em (B) os grupos hidroxilas..... 19
- Figura 2** – Representação esquemática de lipossoma carreando fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos.....23
- Figura 3** – Inibição da formação de biofilme de cepas de *Escherichia coli* H10407 após o tratamento de curcumina encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana.....38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização de Lipo-Qui e Lipo-CUR-Qui.....	32
Tabela 2 – Estudo de estabilidade a 2 °C das dispersões de Lipo-CUR-Qui.....	34
Tabela 3 – Avaliação da atividade antibacteriana de CUR, e Lipo-CUR-Qui frente a <i>E. coli</i> ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407.....	35
Tabela 4 – Citotoxicidade da CUR e Lipo-CUR-Qui, bem como do fármaco de referência anfotericina B, sobre macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 3,7 a 100 µg/mL após 48 h de tratamento.....	40
Tabela 5 – Valores de IC ₅₀ sobre promastigotas, CC ₅₀ sobre macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos diferentes compostos testados frente a <i>L. infantum</i> (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 – LD1c2) e <i>L. amazonensis</i> (cepa WHOM/00 LTB 0016 – LTBC4) expressando β-galactosidase.....	41
Tabela 6 - Valores de IC ₅₀ sobre amastigotas CC ₅₀ sobre macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos diferentes compostos testados frente a <i>L. infantum</i> (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 – LD1c2) e <i>L. amazonensis</i> (cepa WHOM/00 LTB 0016 – LTBC4) expressando β-galactosidase.....	43

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	INFECÇÕES BACTERIANAS E PARASITÁRIAS.....	16
2.1.1	<i>Escherichia coli</i> e Resistência Antimicrobiana.....	16
2.1.2	<i>Leishmania</i> spp. e Leishmaniose.....	17
2.2	CURCUMINA.....	18
2.2.1	Estrutura química da CUR.....	19
2.2.2	Atividades Biológicas.....	20
2.3	NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA FRENTE A INFECÇÕES BACTERIANAS E PARASITÁRIAS.....	22
2.4	LIPOSSOMAS.....	23
2.5	QUITOSANA.....	24
3	OBJETIVOS.....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4	METODOLOGIA.....	27
4.1	PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA CONTENDO CURCUMINA.....	27
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS.....	27
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE LIPO-CUR-QUI.....	28
4.4	ESTABILIDADE DAS DISPERSÕES LIPOSSOMAIS.....	28
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE LIPO-CUR-QUI.....	28
4.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE LIPO-CUR-QUI.....	29
4.7	CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7.....	29
4.8	ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> EM PROMASTIGOTAS.....	30
4.9	ENSAIOS COM FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA</i> SP.....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA.....	32

5.2	ESTABILIDADE DAS DISPERSÕES LIPOSSOMAIS.....	33
5.3	ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	35
5.4	ATIVIDADE ANTIBIOFILME.....	37
5.5	ATIVIDADE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7.....	39
5.6	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> EM PROMASTIGOTAS.....	40
5.7	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE <i>IN VITRO</i> EM AMASTIGOTAS.....	43
6	CONCLUSÃO.....	46
	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas continuam a representar um dos principais desafios para a saúde pública global, sendo responsáveis por elevada morbidade e mortalidade, especialmente em países tropicais e subtropicais. Entre os microrganismos de maior relevância clínica, destacam-se certas bactérias e protozoários, cuja resistência a terapias convencionais e complexidade biológica dificultam o tratamento eficaz (Baker *et al.*, 2022; Fan *et al.*, 2024).

Entre os microrganismos de maior relevância clínica destacados anteriormente, a *Escherichia coli* configura-se como um exemplo particularmente expressivo. Embora seja uma bactéria Gram-negativa integrante da microbiota intestinal humana, determinadas estirpes patogênicas estão associadas a diferentes quadros infecciosos, tais como gastroenterites, infecções do trato urinário, septicemia e meningite neonatal (Geurtsen *et al.*, 2022; Pokharel *et al.*, 2023).

Alinhada ao panorama global de resistência antimicrobiana, a emergência de variantes multirresistentes da *E. coli* agrava substancialmente os desafios terapêuticos já mencionados, evidenciando a necessidade premente de novas estratégias farmacológicas baseadas em agentes alternativos e dotados de mecanismos de ação inovadores (Wu *et al.*, 2024).

Paralelamente, os protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis pela leishmaniose, uma doença endêmica em diversas regiões do mundo, que se manifesta em diferentes formas clínicas, dependendo da espécie envolvida e da resposta imune do hospedeiro (Shmueli; Ben-Shimol, 2024). *L. infantum* é o agente etiológico da leishmaniose visceral, doença potencialmente fatal caracterizada por febre prolongada, hepatoesplenomegalia e pancitopenia, enquanto *L. amazonensis* está frequentemente associada à leishmaniose cutânea, que provoca lesões tegumentares crônicas de difícil cicatrização, podendo evoluir para formas mais severas em imunossuprimidos (Machado *et al.*, 2025; Rosar *et al.*, 2025).

O ciclo de vida desses parasitas é complexo, alternando entre formas promastigotas extracelulares no vetor flebotomíneo e formas amastigotas intracelulares em macrófagos humanos. Essa alternância dificulta o desenvolvimento de terapias eficazes e seguras, pois o fármaco deve atingir tanto formas extracelulares quanto intracelulares sem causar toxicidade significativa às células do hospedeiro (Campos *et al.*, 2025).

Nesse cenário, compostos naturais bioativos, como a curcumina, têm despertado grande interesse devido ao seu amplo espectro de atividades, incluindo ação antimicrobiana, antiparasitária, anti-inflamatória e antioxidante (Hussien *et al.*, 2025). A curcumina, um polifenol derivado do rizoma de *Curcuma longa*, apresenta grande potencial no combate a infecções bacterianas e parasitárias (Liu, 2024). No entanto, sua aplicação clínica direta é limitada pela baixa solubilidade em água, instabilidade química, rápida metabolização e biodisponibilidade reduzida, fatores que comprometem a eficácia terapêutica em modelos *in vitro* e *in vivo* (Rai *et al.*, 2020).

Assim, a nanotecnologia farmacêutica tem emergido como uma ferramenta promissora para superar essas limitações, e, através da encapsulação de curcumina em lipossomas revestidos por quitosana oferece uma estratégia inovadora, combinando proteção da molécula ativa, liberação controlada e aumento da interação com membranas celulares (Chen *et al.*, 2025).

O revestimento com quitosana, um polissacarídeo biocompatível e biodegradável, não só melhora a estabilidade do lipossoma como também confere propriedades antimicrobianas adicionais e mucoadesividade, potencializando a entrega e a eficácia da curcumina (Wang *et al.*, 2025). Essa abordagem nanotecnológica pode permitir a utilização de doses mais baixas de fármaco, reduzir efeitos adversos, além de aumentar a seletividade terapêutica (Jang *et al.*, 2024).

Diante deste contexto, o presente estudo avaliou o potencial terapêutico da curcumina nanoencapsulada em lipossomas revestidos por quitosana frente a *E. coli* e formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* e *L. amazonenses*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 INFECÇÕES BACTERIANAS E PARASITÁRIAS

Infecções causadas por microrganismos, como bactérias e protozoários, representam um grande problema de saúde pública mundial, principalmente, devido à contínua exposição dos seres humanos a esses patógenos, os quais podem ser transmitidos entre os indivíduos, por contato com animais ou a partir do meio ambiente, especialmente, aquelas infecções advindas de ambiente hospitalar merecem adicional atenção devido à sua gravidade. As bactérias constituem os principais agentes etiológicos de infecções disseminadas. Entre os microrganismos mais frequentemente associados a esses quadros destacam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, entre outros. O agravamento dessas infecções está frequentemente relacionado a fatores clínicos relevantes, como condições de imunossupressão, comorbidades e a presença de infecções secundárias (Boudier *et al.*, 2023; Holmes *et al.*, 2025).

Estas infecções destacam-se como a segunda maior causa de mortes em todo o mundo, catalisada principalmente pela perda de eficácia dos tratamentos convencionais (Lin *et al.*, 2021). O uso de antibióticos e antiparasitários é a principal medida de tratamento de infecções bacterianas e parasitárias. Entretanto, o uso repetitivo desses fármacos requer doses progressivamente mais altas para alcançar os efeitos terapêuticos, induzindo toxicidade, com aumento de efeitos adversos e perda da eficácia do tratamento. Conforme destacado por Domagalska *et al.* (2023), a falha terapêutica de um antimicrobiano está intimamente relacionada com a resistência a drogas, contribuindo, desse modo, para a emergência global de resistência antimicrobiana (Peng *et al.*, 2024).

2.1.1 *Escherichia coli* e Resistência Antimicrobiana

E. coli é um bacilo Gram-negativo que coloniza o trato gastrointestinal humano, e de outros animais, de forma comensal, e desempenha importantes funções no equilíbrio da microbiota intestinal. Esse grupo de *E. coli* comensal, é majoritariamente composto por cepas do grupo filogenético A e B1. Entretanto, algumas cepas apresentam potencial efeito patogênico no organismo,

principalmente as cepas pertencentes ao grupo filogenético B2, estando este associado a uma das mais frequentes causas de infecções na corrente sanguínea em humanos, infecções no trato urinário e em outros sítios corpóreos, além de ser uma das principais causas de diarreia em crianças, causadas principalmente pela *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), associada a produção de toxinas termoestáveis e termolábeis, responsáveis pela sua patogenicidade (Alfuraiji *et al.*, 2021; Kobayashi *et al.*, 2021; Mentzer *et al.*, 2023).

Antimicrobianos são amplamente utilizados no tratamento de infecções bacterianas causadas por *E. coli* em humanos e outros animais, além de ter extensivo uso na agricultura e pecuária como forma de aprimorar o cultivo de alimentos e criação de animais para o consumo. Entretanto, diversos estudos têm demonstrado que o uso exacerbado e inadequado de antimicrobianos tem sido um dos principais fatores envolvidos no alarmante crescimento da resistência bacteriana no mundo, tornando difícil o tratamento de infecções, o que contribui para o aumento de morbidades e mortalidades (Arbab *et al.*, 2022). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a resistência bacteriana ocupa o top 10 de ameaças à saúde pública global, assim, em 2023 foram desenvolvidos planos nacionais de combate à resistência bacteriana, envolvendo 178 países, alinhados a um Plano de Ação Global (GAP) (OMS, 2023; Chetri, 2025).

Os mecanismos de resistência de *E. coli* se dividem em mecanismos intrínsecos e extrínsecos. Os mecanismos intrínsecos são aqueles inerentes a esta espécie bacteriana, como a presença da membrana externa e a expressão de bombas de efluxo em sua superfície. Já os extrínsecos, estão relacionados com a aquisição de resistência do meio externo, por mecanismo genético ou pela transferência horizontal de genes, por via plasmidial, modo este que representa um alarmante papel na disseminação de genes de resistência aos antimicrobianos usados na prática clínica (Mota *et al.*, 2021; Smit *et al.*, 2023).

2.1.2 *Leishmania* spp. e Leishmaniose

Leishmania spp. é um protozoário da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, apresentando duas fases em seu ciclo de vida: a forma amastigota, encontrada intracelularmente em macrófagos após terem sido fagocitadas por essas células de defesa para atuarem como apresentadoras de

antígenos, induzindo a diferenciação de células T CD4 em células T helper (Th1); e a forma promastigota que é uma forma flagelada de desenvolvimento no trato gastrointestinal do flebotomíneo, sendo o promastigota metacíclico a forma infectante do parasita (Baneth *et al.*, 2022; Bowman *et al.* 2025).

A leishmaniose compreende um grupo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, tendo mais de 20 espécies envolvidas em zoonoses em humanos e outros animais. Trata-se de uma Doença Tropical Negligenciada (DNT) com elevada prevalência globalmente, principalmente em países tropicais e em desenvolvimento, estimando-se haver de 700 mil a um milhão de novos casos anualmente em todo o mundo, sendo estes números ainda subestimados,. Além disso, apresenta endemicidade em quase 100 países, responsável por gerar impactos não apenas na saúde pública, mas na economia e na sociedade no geral (Vries *et al.*, 2022; Fernandes *et al.*, 2024). Essa doença é transmitida, principalmente, através da picada de um flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, conhecido como mosquito-palha, entretanto, outras formas de transmissão também são relatadas, como transmissão vertical, transfusão sanguínea, transplante de órgãos e exposição laboratorial acidental (Pederiva *et al.*, 2023).

A leishmaniose é classificada em três principais tipos, os quais se manifestam dependendo da espécie infectante e das condições imunes do hospedeiro: a visceral (LV), cutânea (LC) e mucocutânea (MC), sendo a forma cutânea a mais prevalente no mundo, representando cerca de 90% dos casos e de caráter endêmico em várias regiões. Já a forma visceral, também chamada de calazar, causado principalmente pelas espécies viscerotrópicas *L. infantum* e *L. donovani*, apresenta uma manifestação mais severa e potencialmente fatal. A MC apresenta uma menor prevalência, embora frequentemente associada a alta morbidade (Mann *et al.*, 2021; Angoiti *et al.*, 2023). As formas de tratamento atuais apresentam limitações devido a seus efeitos adversos e baixa eficácia. Além disso, a resistência parasitária a fármacos também tem sido um fator de grande preocupação atualmente (Pradhan *et al.*, 2022).

2.2 CURCUMINA

A curcumina (CUR) é um polifenol natural, o principal componente obtido a

partir da *Curcuma longa*, planta herbácea aromática pertencente à família Zingiberaceae, sendo amplamente utilizada na culinária asiática como tempero, aditivo e corante natural, devido à sua chamativa cor amarelo dourado, o que permite serem muito utilizados também na produção de tintas ecológicas (Urosevic *et al.*, 2022). A CUR também é amplamente utilizada na medicina tradicional indiana e chinesa por séculos, sendo usada como tratamento de diversos problemas de saúde, como tosse, disfunção hepática, reumatismo, mordeduras de insetos e entre outras, devido a suas grandes propriedades terapêuticas, como antioxidante natural, antimicrobiana, anticâncer, anti-inflamatória e entre outras (Kumari *et al.*, 2022; Sadeghi *et al.*, 2023). Entretanto, apesar das notáveis vantagens, a CUR isoladamente apresenta baixa biodisponibilidade, fotodegradação, insolubilidade em água e instabilidade de sua estrutura química, sendo indispensável a combinação com outros sistemas que atenuem essas dificuldades (Salle *et al.*, 2021).

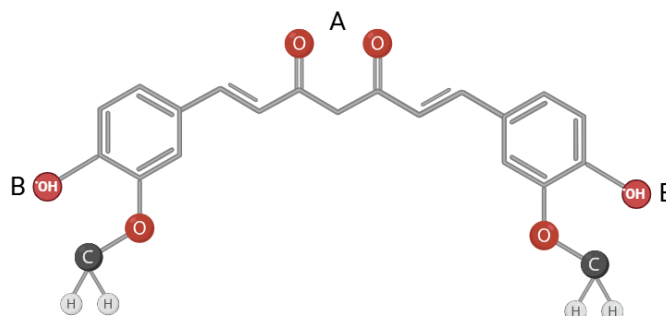
2.2.1 Estrutura química da CUR

A curcumina, quimicamente nomeada de diferuloilmetano, foi isolada pela primeira vez, em 1815, pelos pesquisadores Vogel e Pelletier, a partir da *Curcuma longa*, recebendo grande atenção da comunidade científica. Porém, apenas em 1910, estudos poloneses conseguiram determinar sua exata estrutura química espacial, que consiste basicamente de dois anéis fenólicos, ligados a grupos hidroxila e metoxilo, obtendo a estrutura 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione, sendo os polifenóis o principal componente ativo para o desempenho de sua função. É importante mencionar também que a CUR é rapidamente degradada sob influência da luz ultravioleta (UV), sendo importante o armazenamento em condições adequadas (Hussain *et al.*, 2022; Drozd *et al.*, 2024).

A presença de cetonas ligadas à estrutura química da CUR (como mostrado em A, na figura 1) oferece uma certa instabilidade à molécula em condições fisiológicas, reduzindo o seu perfil farmacocinético se utilizado isoladamente devido às cetonas serem substratos comuns de diversas enzimas redutases, levando à utilização deste radical químico e consequente degradação da molécula de CUR.

Figura 1. Estrutura química da molécula de curcumina, exibindo em (A) os

grupamentos cetonas e em (B) os grupos hidroxilas.



Adaptado de Drozd (2024).

Porém, esse efeito pode ser mitigado se houver modificações na fração cetona, como a associação a compostos que confere uma proteção à molécula, como lipídio, lipossomas ou surfactantes, reduzindo a degradação da molécula de CUR induzida pelos grupos cetona. Por outro lado, os grupos hidroxila (em B, na figura 1) presentes na molécula desempenha um importante papel antioxidante, devido ao fato deste grupo atuar nas reações de transferência de elétrons, formando compostos fenoxi que protegem contra espécies reativas de oxigênio (EROs), reduzindo, assim, o estresse oxidativo (Kumari *et al.*, 2022; Drozd *et al.*, 2024).

2.2.2 Atividades Biológicas

Diversos estudos mostram o importante potencial terapêutico da CUR no tratamento de infecções causadas por diferentes patógenos bacterianos, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Salmonella* sp., entre outros (Salama *et al.*, 2024). Estudos conduzidos por Yuan *et al.* (2022) demonstraram que a associação da CUR com a Terapia Fotodinâmica (PDT) potencializa significativamente sua atividade antibacteriana frente a *S. aureus*, indicando um efeito sinérgico promissor para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

Embora os mecanismos de ação antimicrobiana da curcumina (CUR) ainda não estejam completamente elucidados, estudos indicam que esse composto exerce sua atividade antibacteriana principalmente por meio da despolarização e

permeabilização da membrana plasmática bacteriana. Além disso, evidências mostram que a CUR pode induzir apoptose em *E. coli* pela inibição da proteína RecA, essencial para os mecanismos de reparo do DNA, conforme demonstrado por Lee *et al.* (2008). Outros efeitos descritos incluem dano direto à membrana celular e inibição da proliferação bacteriana. A CUR também apresenta efeito sinérgico quando associada a antibióticos, uma vez que seu mecanismo de aumento da permeabilidade da membrana facilita a entrada desses fármacos no citoplasma, contribuindo para uma maior eficiência terapêutica (Wray *et al.*, 2021; Alonso-Espanol *et al.*, 2023).

A CUR desempenha, além de sua reconhecida atividade antibacteriana, uma significativa ação antibiofilme frente a alguns patógenos. Este composto é capaz de reduzir a capacidade de agregação microbiana, bem como de reduzir a formação dos componentes dos biofilmes, tornando esses microrganismos mais suscetíveis à ação dos antimicrobianos e facilitando a abordagem terapêutica (Kumbar *et al.*, 2021). Como demonstrado nos estudos realizados por Ke *et al.* (2023), a CUR, *in vitro*, foi capaz de inibir significativamente a formação de biofilme de *Streptococcus mutans*, além de induzir a degradação de biofilme maduro já formado.

A CUR está associada também a propriedades antiparasitárias contra diferentes patógenos, como *Cryptosporidium parvum*, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondi*, *Plasmodium falciparum* e os agentes causadores da leishmaniose cutânea e visceral, incluindo *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. infantum*, nas suas formas amastigota e promastigota. Além disso, CUR apresenta atividade antiinflamatória e antioxidante, embora os mecanismos de ação ainda não estejam completamente compreendidos (Albalawi *et al.*, 2020; Dourado *et al.*, 2024).

Apesar do reconhecido potencial terapêutico da CUR, seu uso *in vivo* apresenta limitações significativas decorrentes de fatores como baixa solubilidade em água, instabilidade em solução, reduzida biodisponibilidade, limitada absorção e rápida eliminação pelo organismo, o que compromete sua janela terapêutica. Dessa forma, estratégias combinadas devem ser utilizadas para mitigar essas limitações, como a utilização de agentes adjuvantes e de sistemas de liberação controlada de fármacos, os quais podem prolongar o tempo de ação do composto no organismo e, conseqüentemente, aumentar sua eficácia (Trigo-Gutierrez *et al.*, 2021; Ejaz *et al.*, 2022).

2.3 NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA FRENTE A INFECÇÕES BACTERIANAS E PARASITÁRIAS

A nanotecnologia farmacêutica atua na manipulação de materiais biológicos e fármacos em uma escala nanométrica. Este ramo da ciência desenvolve estratégias baseadas nas propriedades físico-químicas das moléculas e sua capacidade de gerar respostas biológicas, tendo sido extensamente explorado como uma ferramenta inovadora no tratamento de diversas doenças (Guerra *et al.*, 2024). Nanopartículas são estruturas encontradas na natureza ou sintetizadas em laboratório, que podem ser utilizadas como sistemas de liberação controlada de fármacos. Estes sistemas apresentam diversas vantagens quando comparados aos tratamentos convencionais, como liberação mais controlada e sustentada de fármacos, maior especificidade ao tecido alvo, menor risco de degradação do fármaco *in vivo* e, quando combinados a moléculas de revestimento, como a quitosana, apresentam maior estabilidade no organismo (Rashki *et al.*, 2021; Lyu *et al.*, 2025).

Existem diversas formulações de nanopartículas que podem ser aplicadas a diferentes finalidades, como nanopartículas de prata, ouro, óxidos de zinco, óxidos de ferro e entre outras. Essas estruturas podem ser obtidas por diferentes métodos, dentre eles incluem-se a coprecipitação, decomposição termal, microemulsão, evaporação de solvente, emulsificação, nanoprecipitação, dentre outros. Cada um desses métodos apresenta particularidades que influenciam nas propriedades físico-químicas das nanopartículas, permitindo adequá-las a variados usos clínicos (Mercan *et al.*, 2022; Algabbani *et al.*, 2023).

A atuação da nanotecnologia farmacêutica tem se mostrado promissora no tratamento de infecções causadas por *Leishmania* spp., principalmente por meio da utilização de lipossomas contendo anfotericina B. Essa forma já apresenta amplo uso clínico, pois os lipossomas oferecem maior estabilidade a fármacos e protegem-os da degradação no trato gastrointestinal, permitindo a administração oral do medicamento, o que contribui para uma maior adesão ao tratamento por parte dos pacientes (Majoer *et al.*, 2025). Nanopartículas também têm se mostrado eficazes no tratamento de infecções bacterianas, segundo estudos conduzidos por Lyu *et al.* (2025), nanopartículas revestidas por quitosana encapsulando o peptídeo 3W-2 apresentaram potente atividade antibacteriana contra infecção causada por ETEC, além de manterem efetiva atividade no trato gastrointestinal, quando comparado a

administração do peptídeo isoladamente. Esses resultados mostram o potencial terapêutico da nanotecnologia e a sua capacidade de revolucionar o tratamento contra infecções bacterianas e parasitárias (Jing *et al.*, 2024).

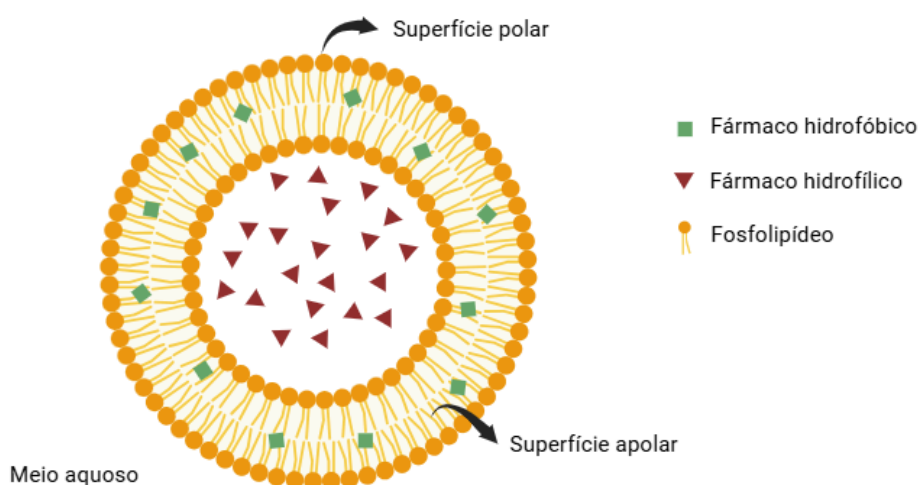
2.4 LIPOSSOMAS

A nanotecnologia farmacêutica tem ganhado grande destaque no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada (SLCs) de medicamentos, com o objetivo de aumentar a concentração de fármacos no organismo, direcioná-las para tecidos corporais específicos e aprimorar sua ação (Adepu *et al.*, 2021). Dentre os SLCs mais utilizados, os lipossomas têm crescido exponencialmente, tendo o seu uso clínico já aprovado em diversos países (Almeida *et al.*, 2020).

Lipossomas foram descobertos em 1965, pelo hematologista britânico Alec D. Bangham, após conseguir observar, por microscopia eletrônica, estruturas lipídicas multilamelares formadas espontaneamente em meio aquoso. Posteriormente, tornou-se possível a formulação dessas estruturas, pela primeira vez, utilizando fosfolípidios. Anos mais tarde, o potencial dos lipossomas como sistemas carreadores de fármacos foi sugerido por Gregory Gregoriadis, possibilitando seu uso no transporte de DNA para as células, entre outras aplicações (Large *et al.*, 2021; Park *et al.*, 2023).

Os lipossomas, segundo Guimarães *et al.* (2021), podem ser definidos como estruturas esféricas coloidais compostas por camadas lipídicas possuindo um compartimento interno aquoso. São nanopartículas que podem ser classificadas, baseadas em sua lamelaridade (camadas lipídicas), em vesículas unilamelares, oligolamelares ou multilamelares, com aplicações diversas. São estruturas relativamente simples de preparar, sendo possível adaptá-las para diversos usos terapêuticos, seja modificando seu tamanho, composição, número de camadas lipídicas ou mesmo combinando com outras moléculas para aumentar sua efetividade (Leo *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022).

Figura 2. Representação esquemática de lipossoma carreando fármacos hidrofóbicos e hidrofílicos.



Fonte: Autoria própria (2025).

Apesar das significativas vantagens e notável eficiência das nanopartículas lipídicas, estas apresentam algumas limitações quando comparadas com nanopartículas poliméricas, sendo os lipossomas geralmente menos estáveis, especialmente em relação à degradação, agregação às células alvo e fusão das vesículas à membrana plasmática, além de possuir um mecanismo de liberação de droga mais difícil de controlar. Nesse contexto, modificações na superfície dos lipossomas com revestimento de moléculas, peptídeos, anticorpos ligantes ou biopolímeros, como a quitosana, permitem tornar essas nanopartículas lipídicas mais eficientes e mitigar suas limitações de estabilidade (Fan *et al.*, 2021; Leo *et al.*, 2022; Souza *et al.*, 2020).

2.5 QUITOSANA

A quitosana (QUI) é um biopolímero na forma desacetilada obtido a partir da quitina, um dos polissacarídeos mais abundantes da natureza presentes em diversas fontes animais, como em moluscos, crustáceos e no exoesqueleto de insetos, em vegetais e na parede celular de fungos. Entretanto, a quitina apresenta baixa solubilidade em solventes comuns e pouco biodegradável, devido à sua estrutura química complexa, limitando sua aplicação na indústria e saúde (Wang *et al.*, 2020; Cohen *et al.*, 2022).

A QUI é mais hidrofílica, permitindo uma maior solubilidade em água, além de ser possível realizar modificações químicas diretas, enzimáticas ou por combinação com outros polímeros, de forma mais facilmente, permitindo adequar a QUI para diferentes aplicações e expandir sua eficiência (Hack *et al.*, 2020). Nos últimos anos, diversos estudos têm apresentado o potencial da QUI como um biopolímero ativo com atividade antimicrobiana, suprimindo o crescimento bacteriano, provavelmente, a partir da ligação direta à superfície da célula. A QUI possui também atividade antitumoral e atua na condução nervosa, além de ser um composto não tóxico para o organismo (Riseh *et al.*, 2022; Aghbashlo *et al.*, 2023).

O uso da QUI tem se destacado como um biopolímero promissor para o revestimento de nanopartículas de liberação controlada de fármacos, em virtude de suas propriedades químicas únicas, pois apresenta excelente capacidade de adesão a tecidos biológicos, interagindo facilmente com superfícies negativamente carregadas, como membranas mucosas e superfície bacteriana e fúngica, por meio de reações eletrostáticas, o que contribui para seus reconhecidos efeitos antimicrobianos e antifúngicos. Isso se deve ao fato da QUI apresentar baixo grau de acetilação, uma vez que moléculas com menor grau de acetilação tendem a exibir maior solubilidade e efeitos biológicos mais pronunciados. Além disso, apresenta baixa toxicidade e alta compatibilidade, atribuída à sua afinidade por peptidoglicanos. Por fim, a QUI se destaca pela sua capacidade de inibição de bomba de efluxo, mecanismo em que xenobióticos, principalmente fármacos, são expulsos das células bacterianas, exercendo, dessa forma, um relevante papel no controle da resistência antimicrobiana (Kou *et al.*, 2022; Jaferník *et al.*, 2023; Poznanski *et al.*, 2023).

O efeito antimicrobiano da QUI resulta de uma combinação de características químicas atribuídas a essa molécula. Dentre elas se destacam: a excelente interação eletrostática com a superfície celular bacteriana, que são geralmente carregadas negativamente; o seu baixo peso molecular, permitindo a ligação ao DNA bacteriano, a inibição de mRNA e, consequentemente, a síntese proteica; quitosanas associados a íons metálicos, formando quelatos, demonstram grande potencial em promover a morte celular bacteriana. A eficácia desses mecanismos, entretanto, depende de fatores como a espécie bacteriana, o grau de acetilação e o peso molecular da QUI (Pathak *et al.*, 2023; Mu *et al.*, 2024).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desempenho da Lipo-CUR-Qui frente a cepas de *Escherichia coli* e a eficácia antiparasitária contra *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formular lipossomas revestidos com quitosana contendo curcumina;
- Realizar caracterização de Lipo-CUR-Qui;
- Determinar a estabilidade das dispersões lipossomais;
- Avaliar atividade antibacteriana e antibiofilme de Lipo-CUR-Qui frente a cepas de *Escherichia coli*;
- Avaliar citotoxicidade de Lipo-CUR-Qui;
- Avaliar atividade de Lipo-CUR-Qui *in vitro* em promastigotas de *L. amazonensis*;
- Avaliar atividade de Lipo-CUR-Qui em formas amastigotas de *Leishmania* spp.

4 METODOLOGIA

4.1 PREPARAÇÃO DOS LIPOSSOMAS REVESTIDOS COM QUITOSANA CONTENDO CURCUMINA

Os lipossomas contendo CUR foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico seguido de sonicação. Para encapsulação de fármacos hidrofílicos, os lipídeos, colesterol (CH), CUR e fosfatidilcolina (PC), Tween 80 foram solubilizados em solvente orgânico sob agitação magnética. Em seguida, o filme lipídico foi formado pela evaporação dos solventes à pressão reduzida, que, posteriormente foi ressuspensionado com a solução de tampão fosfato (pH= 7.4) formando espontaneamente lipossomas multilamelares grandes (MLV). Em seguida estes foram sonicados obtendo os lipossomas unilamelares pequenos (SUV) (Souza *et al.*, 2024).

Para o revestimento dos Lipo-CUR-Qui, a quitosana foi solubilizada em ácido acético glacial. A solução de quitosana a 1% foi submetida a agitação constante overnight. Os lipossomas foram adicionados gota a gota na solução de quitosana e se manterão sob agitação magnética por 1 hora (Alshamsan *et al.*, 2019).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS LIPOSSOMAS

Os Lipo-CUR-Qui foram submetidos à caracterização físico-química através da análise do tamanho de partícula (\emptyset), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ζ) e pH como previamente descrito por Souza *et al.* (2024). As dispersões de lipossomas foram dimensionadas por espectroscopia de correlação de fótons utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido).

Para análise do tamanho da partícula, a dispersão lipossomal foi diluída em água purificada. As medições foram realizadas a 25 °C com um ângulo fixo de 90° e os resultados foram expressos como a média do diâmetro hidrodinâmico dos lipossomas (nm). O potencial zeta dos lipossomas foi medido após a diluição da dispersão de lipossomas em uma solução de água ultrapura. A carga superficial dos lipossomas (mV) foi avaliada utilizando o Zetasizer Nano-ZS90 (Malvern, Worcestershire, Reino Unido). O pH do lipossoma foi medido com um eletrodo de vidro e um medidor de pH digital MS Tecnozon (mPA-210P, São Paulo, Brasil) em temperatura ambiente.

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR E EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE LIPO-CUR-QUI

Para determinar o teor de CUR nas formulações, os lipossomas foram diluídos em CH₃OH, centrifugada durante 10 minutos e o sobrenadante foi mensurado por espectrofotometria no comprimento de onda de 420 nm. Os resultados foram expressos em percentual a partir da média das absorbâncias. O experimento foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.

A eficiência de encapsulação (EE%) de CUR foi determinada pela técnica de ultrafiltração/ultracentrifugação, utilizando unidades de filtração (Amicon Ultra Centrifugal Filters; Millipore, Billerica, MA). Amostras de lipossomas foram inseridas nos filtros e submetidas à ultracentrifugação a 8.000 rpm a 4 °C por 1h. Uma alíquota da amostra filtrada foi diluída em CH₃OH. A EE% de CUR foi mensurado por espectrofotometria e os resultados foram expressos em percentual a partir da média das absorbâncias. Os dados de eficiência de encapsulação dos fármacos foram calculados usando a equação descrita abaixo:

$$\% EE = \text{Total de CUR} - \text{filtrado de CUR} \times 100 / \text{Total de CUR}.$$

4.4 ESTABILIDADE DAS DISPERSÕES LIPOSSOMAIS

A estabilidade físico-química das dispersões lipossomais de Lipo-CUR-Qui foram avaliadas 24h após a formulação, após armazenamento em geladeira a 2°C. As formulações foram monitoradas após 7, 15, 30, 60 e 120 dias após formuladas através da avaliação dos seguintes parâmetros: aspecto macroscópico, Ø, PDI, ζ, pH, teor e taxa de encapsulação para os lipossomas contendo fármaco.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE LIPO-CUR-QUI

A atividade antibacteriana *in vitro* de CUR e Lipo-CUR-Qui foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2025). Inicialmente foi distribuído caldo Mueller-Hinton em cada poço das placas. Em seguida, foram adicionados, CUR e Lipo-CUR-Qui, através de diluição seriada e por fim as suspensões de *Escherichia coli* ATCC 25922, *E. coli* NCTC13846 e *E. coli* H10407. As microplacas foram incubadas a 35

°C por 24h e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por espectrofotometria no comprimento de onda de 630 nm.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada depois dos resultados de CIM. Uma alíquota dos microrganismos dos poços em que não há crescimento visível foi inoculada em ágar Müller-Hinton e as placas foram incubadas a 35 °C por 24h. Após este período a CBM foi determinada como a menor concentração em que não houve crescimento microbiano (CLSI, 2025). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE LIPO-CUR-QUI

A atividade antibiofilme de Lipo-CUR-Qui frente a *E. coli* ATCC H10407 foi realizada através do método do cristal violeta. Inicialmente a cepa bacteriana foi ajustada na escala 0,5 de McFarland. A contagem de células foi confirmada por espectrofotometria a 630 nm e as suspensões bacterianas foram distribuídas em placas de microdiluição de fundo plano até uma concentração final de 10^5 UFC/mL e incubadas a 35 °C por 24 h. Após o crescimento do biofilme, o conteúdo de cada poço foi aspirado e diluições em série de CUR e Lipo-CUR-Qui foram realizadas em TSB e adicionadas a cada poço.

As placas foram novamente incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h. Após incubação o conteúdo dos poços foi aspirado e foram realizadas lavagens com salina (0,9%). As placas foram secas e em seguida as bactérias aderidas foram fixadas com metanol a 99%. Após a fixação, o metanol foi removido e as placas foram postas para secar novamente.

Posteriormente, as bactérias aderidas nas placas foram coradas com cristal violeta a 1%. O excesso de corante foi removido e foram realizadas lavagens com salina em cada poço. Em seguida a análise do resultado foi realizada através de espectrofotometria a 570 nm (Multiskan FC microplate photometer, Thermo Scientific, Madrid, Espanha). A Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir a formação do biofilme (Peeters *et al.*, 2016). Todo o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

4.7 CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7

Células RAW 264.7 foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade celular pelo ensaio de MTT. As células ($0,2 \times 10^5$ células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C em 5% de CO₂ para adesão. Os compostos foram adicionados em oito concentrações (0,78 a 100 µg/mL) e incubados por 48 h. Anfotericina B, CUR e Lipo-CUR-Qui também tiveram sua citotoxicidade avaliada nas mesmas concentrações.

Após a incubação com os compostos, foi adicionado 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) a 5 mg/mL em PBS. O meio de cultura celular foi descartado após 2 h, e 100 µL de DMSO foram adicionados para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida a 570 nm. A concentração citotóxica que inibe 50% das células (CC₅₀) foi determinada por regressão não linear a partir das oito concentrações em duplicata, utilizando o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Dois experimentos independentes foram realizados.

4.8 ATIVIDADE *IN VITRO* EM PROMASTIGOTAS

Promastigotas da cepa *L. amazonensis* LTB 0016 foram mantidas em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 10 µg/mL de gentamicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) a 24 °C. A curva de crescimento do parasita foi obtida pela contagem diária da cultura durante 7 dias. Promastigotas na fase exponencial de crescimento (2×10^6 promastigotas/mL) foram utilizados para o ensaio de viabilidade. Os promastigotas foram incubados com diferentes concentrações de CUR e Lipo-CUR-Qui (0,78–100 µg/mL). Anfotericina B foi usada como controles positivos em meio Schneider a 24 °C por 48 h. Como controle negativo, os promastigotas foram mantidos sem nenhum tratamento.

Após o tratamento, o resazurina foi adicionado a cada poço em concentração final de 50 µM, e as placas foram novamente incubadas por 2 h a 26 °C. A fluorescência foi medida usando um espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT, EUA, modelo Synergy H1) com excitação a 560 nm e emissão a 590 nm. A concentração que inibiu 50% dos parasitas (IC₅₀) foi obtida por regressão não linear da curva concentração-resposta utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O índice de

seletividade (IS) foi calculado pela razão entre CC_{50} e IC_{50} , servindo como parâmetro inicial para avaliar a seletividade do composto frente às formas promastigotas de *Leishmania* sp.

Os experimentos foram realizados em triplicata, em pelo menos três experimentos biológicos independentes. Os resultados foram submetidos à análise estatística pelo teste One-way ANOVA, seguido do post-test de Bonferroni ($\alpha = 5\%$), considerando $p < 0,05$ como estatisticamente significativo.

4.9 ENSAIOS COM FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA* SP.

As formas promastigotas de *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263) e *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016) expressando o gene β -galactosidase (da Silva Santos *et al.*, 2019) foram cultivadas em meio Schneider com 10% de soro fetal bovino, 2,5 $\mu\text{g/mL}$ de hemina, 1% de antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina) e 50 $\mu\text{g/mL}$ de higromicina, a 26 °C. Para a obtenção das formas amastigotas, células RAW 264.7 foram semeadas ($0,2 \times 10^5$ células/poço) em placas de 96 poços e deixadas aderir por 24 h a 37 °C em 5% de CO_2 . As células aderidas foram então infectadas com promastigotas em fase estacionária de crescimento, na proporção de 1:15, a 37 °C por 6 h. Em seguida, os parasitas não internalizados foram removidos por lavagem, e as culturas infectadas foram incubadas por 24 h em meio completo RPMI 1640 (controle negativo) e tratadas com os compostos (0,78 a 100 $\mu\text{g/mL}$). Anfotericina B foi usada como controles positivos.

Após 24 h, as culturas foram novamente lavadas, o meio foi substituído, e o chlorophenol red β -D-galactopyranoside (CPRG) a 100 μM e Nonidet P-40 a 0,1% foram adicionados às placas, sendo incubadas por 2 a 6 h a 37 °C. A absorbância foi medida a 570 nm em um leitor de microplacas automatizado. Os resultados são expressos como porcentagem de inibição do crescimento do parasita. A IC_{50} foi determinada por regressão não linear a partir de oito concentrações em duplicata, utilizando o software GraphPad Prism 8.0. O IS foi calculado pela razão entre CC_{50} e IC_{50} , servindo como parâmetro inicial para avaliar a seletividade do composto frente às formas amastigotas de *Leishmania* sp. Três experimentos independentes foram realizados.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

As formulações Lipo-Qui apresentaram tamanho médio de partícula (TP) de $97,72 \pm 0,7$ nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,298, potencial zeta de $+12,4 \pm 0,9$ mV e pH 5,0. Já as formulações Lipo-CUR-Qui exibiram TP de $142,0 \pm 2,2$ nm, PDI de 0,386, potencial zeta de $+15,0 \pm 0,6$ mV e pH 5,1, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Caracterização de Lipo -Qui e Lipo-CUR-Qui

Formulação	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	pH	Teor	%EE
Lipo-Qui	$97,7 \pm 0,7$	0,298	$+12,4 \pm 0,9$	5,0	-	-
Lipo-CUR-Qui	$142,0 \pm 2,2$	0,386	$+15,0 \pm 0,6$	5,1	$99,9 \pm 0,1\%$	$97,2 \pm 0,6\%$

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana; Lipo-CUR-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CUR.

A caracterização físico-química das formulações Lipo-Qui e Lipo-CUR-Qui mostrou pequenas alterações nos parâmetros avaliados, principalmente relacionadas ao aumento do tamanho médio das partículas (Ø) após a incorporação da curcumina e o revestimento com quitosana. Esse aumento discreto permanece compatível com a via de administração pretendida, sem impacto clínico relevante, indicando que o fármaco está totalmente incorporado ao sistema e que a estrutura dos lipossomas não sofreu modificações significativas (Souza *et al.*, 2024).

O PDI apresentou leve incremento, de 0,298 para 0,386, permanecendo dentro dos limites aceitáveis para aplicações farmacêuticas. Esses valores refletem que a distribuição do tamanho das partículas continua adequada, garantindo estabilidade e funcionalidade das nanoformulações (Danaei *et al.*, 2018; Bodnár *et al.*, 2025).

O potencial zeta aumentou de $+12,4 \pm 0,9$ mV para $+15,0 \pm 0,6$ mV, evidenciando a presença de grupos amina protonados da quitosana na superfície dos lipossomas. Essa modificação confirma a efetividade do revestimento, com a quitosana desempenhando seu papel esperado de conferir estabilidade coloidal e favorecer interações eletrostáticas com membranas celulares, sem causar alterações relevantes na partícula (Gil-Gonzalo *et al.*, 2024; Jara-Quijada *et al.*, 2025).

O pH das formulações manteve-se em torno de 5,0-5,1, indicando que o processo de encapsulação não alterou significativamente a acidez das amostras. O pH levemente ácido é favorável à estabilidade da curcumina durante a passagem pelo trato gastrointestinal, protegendo o fármaco de degradação e possibilitando liberação controlada no intestino delgado, o que contribui para maior biodisponibilidade e eficácia terapêutica (Ang *et al.*, 2024; Souza *et al.*, 2024).

A encapsulação de curcumina em lipossomas revestidos por quitosana também se mostrou extremamente eficiente, com teor de fármaco de $99,9 \pm 0,1\%$ e eficiência de encapsulação (%EE) de $97,2 \pm 0,6\%$. Esses resultados indicam que quase toda a curcumina adicionada foi incorporada aos lipossomas, garantindo que o fármaco permaneça dentro de uma faixa terapêutica adequada por tempo suficiente para exercer seu efeito biológico. A nanoencapsulação pode ser responsável por aumentar a solubilidade aquosa da curcumina, facilitando sua administração, absorção e distribuição sistêmica, o que potencialmente melhora a resposta terapêutica contra microrganismos patogênicos e parasitas (Hu *et al.*, 2022; Afyouni *et al.*, 2024).

Assim, essas características tornam a formulação promissora para aplicações terapêuticas futuras, oferecendo uma estratégia eficaz para superar limitações de solubilidade, biodisponibilidade e estabilidade do fármaco, além de possibilitar ação direcionada contra bactérias e parasitas de relevância clínica.

5.2 ESTABILIDADE DAS DISPERSÕES LIPOSSOMAIS

A Tabela 2 apresenta os parâmetros físico-químicos de estabilidade da formulação de Lipo-CUR-Qui armazenada a 2 °C por 120 dias. Observou-se aumento progressivo no diâmetro hidrodinâmico (\emptyset), acompanhado de discreta elevação do índice de polidispersão (PDI). Assim, o diâmetro inicial foi menor (149,1

$\pm 0,5$ nm), atingindo $169,4 \pm 1,7$ nm em 120 dias. O PDI apresentou incremento contínuo (0,396 para 0,436), embora tenha permanecido dentro de limites aceitáveis para dispersões lipossomais. O potencial zeta diminuiu de $+14,6 \pm 0,9$ mV para $+11,4 \pm 0,7$ mV, mantendo valores positivos durante todo o período de armazenamento. O pH manteve-se estável (5,2 para 5,0), sugerindo ausência de degradação relevante da curcumina ou da matriz lipídica.

Tabela 2. Estudo de estabilidade a 2 °C das dispersões de Lipo-CUR-Qui

Formulação	Tempo (dias)	Ø (nm)	PDI	ζ (mV)	pH
Lipo-CUR-Qui	7	$149,1 \pm 0,5$	0,396	$+14,6 \pm 0,9$	5,2
	14	$156,4 \pm 2,9$	0,401	$+13,4 \pm 1,6$	5
	30	$163,5 \pm 1,5$	0,412	$+12,6 \pm 0,9$	5
	60	$166 \pm 2,4$	0,424	$+12,1 \pm 0,6$	5
	120	$169,4 \pm 1,7$	0,436	$+11,4 \pm 0,7$	5

Ø: Tamanho de partícula; PDI: Índice de polidispersão; ζ: Potencial zeta; %EE: Eficiência de encapsulação; Lipo-CUR-Qui: Lipossomas revestidos com quitosana encapsulando CUR.

A avaliação da estabilidade das formulações indicou que o Lipo-CUR-Qui manteve parâmetros físico-químicos adequados para aplicações terapêuticas durante 120 dias a 2 °C, sem evidências de agregação significativa ou degradação. O aumento gradual no diâmetro hidrodinâmico é esperado em sistemas lipossomais e pode refletir processos de fusão ou reorganização da bicamada lipídica durante o armazenamento (Chen *et al.*, 2022). Apesar desse aumento, a formulação permaneceu em escala nanométrica, característica desejável para aplicações terapêuticas, especialmente por favorecer a internalização em macrófagos, característica relevante ao avaliar a terapia para leishmaniose, uma vez que permite que o fármaco alcance diretamente as células hospedeiras onde o parasita se encontra (Zhou *et al.*, 2021).

O PDI do Lipo-CUR-Qui apresentou valores ligeiramente mais elevados, porém ainda aceitáveis para dispersões de nanopartículas, sugerindo relativa homogeneidade. Esse comportamento está de acordo com relatos prévios de

sistemas lipossomais recobertos com polímeros, nos quais o aumento do PDI ao longo do tempo reflete adaptações estruturais sem perda crítica de estabilidade (Valencia *et al.*, 2023). E, a redução moderada nos valores de ζ ao longo do tempo não comprometeu a estabilidade coloidal, já que as formulações mantiveram carga positiva acima de +9 mV, limite considerado satisfatório para dispersões nanométricas estabilizadas por polieletrólitos (Yu *et al.*, 2023).

Quanto ao pH, as dispersões apresentaram apenas pequenas variações, sugerindo que a curcumina permaneceu estável no ambiente lipossomal durante o armazenamento refrigerado. Isso é consistente com achados recentes que demonstram que o encapsulamento em lipossomas com recobrimento polimérico reduz a degradação oxidativa e fotoquímica da curcumina, preservando sua bioatividade (Zhou *et al.*, 2021).

Assim, os dados demonstram que Lipo-CUR-Qui apresentaram estabilidade satisfatória durante 120 dias a 2 °C. A manutenção das características físico-químicas sugere viabilidade de armazenamento em condições refrigeradas, reforçando o potencial dessas formulações para aplicações farmacêuticas no tratamento de infecções bacterianas e da leishmaniose.

5.3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana demonstrou que a CUR livre apresentou concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações bactericidas mínimas (CBM) variáveis entre as cepas de *E. coli*, com CIM e CBM de 125 µg/mL para *E. coli* ATCC 25922, CIM de 1000 µg/mL para *E. coli* NCTC 13846, e CIM de 250 µg/mL com CBM de 500 µg/mL para *E. coli* H10407. Em contraste, os Lipo-CUR-Qui apresentaram CIM e CBM uniformes de 62,5 µg/mL para todas as cepas testadas, indicando que a encapsulação em sistema de liberação controlada potencializou significativamente a atividade antibacteriana da curcumina (Tabela 3). Além disso, como previsto a formulação Lipo-Qui não demonstrou nenhuma atividade antibacteriana.

Tabela 3. Avaliação da atividade antibacteriana de CUR, e Lipo-CUR-Qui frente a *E. coli* ATCC 25922, NCTC 13846 e H10407

Bactérias	CUR		Lipo-CUR-Qui	
	µg/mL			
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>E. coli</i> ATCC 25922	125	125	62,5	62,5
<i>E. coli</i> NCTC 13846	1000	1000	62,5	62,5
<i>E. coli</i> H10407	250	500	62,5	62,5

CUR: Curcumina; Lipo-CUR-QUI: Lipossoma contendo curcumina revestido por quitosana; CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima.

A atividade antibacteriana da CUR livre frente a bacilos Gram-negativos é naturalmente limitada, como demonstrado por Kareem *et al.* (2020), que relataram CIM e CBM de 256 e 512 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, frente à cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Essa baixa eficácia está associada à dificuldade de permeação da CUR através das membranas bacterianas, resultante de sua natureza lipofílica, o que reduz sua capacidade de inibir o crescimento microbiano. Assim, sistemas nanoestruturados surgem como ferramentas estratégicas para ultrapassar essas limitações, pois possibilitam a entrega direcionada do fármaco diretamente no interior das células bacterianas, aumentando a concentração local do composto e potencializando sua ação antimicrobiana (Zhu *et al.*, 2024).

Estudos com CUR encapsulada em nanossistemas demonstram uma redução significativa das concentrações inibitórias frente a bactérias Gram-negativas, evidenciando o efeito potenciador da nanoencapsulação. Targhi *et al.* (2021) observaram que a CUR encapsulada em niossomas (Cur-Nio) apresentou CIM de 25 $\mu\text{g/mL}$ frente a isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*, enquanto a CUR livre apresentou CIM de 50 $\mu\text{g/mL}$, indicando que a entrega por sistemas nanoestruturados amplifica a eficácia do composto.

De maneira semelhante, Chen *et al.* (2025) avaliaram a atividade antimicrobiana de nanofibras compostas por lipossomas contendo CUR e verificaram

eficácia aprimorada contra *E. coli*, com zona de inibição de $38,0 \pm 1,1$ mm, superior à observada para a CUR livre ($32,4 \pm 0,2$ mm). Esses achados reforçam o potencial dos sistemas nanoestruturados em aumentar a disponibilidade local da CUR, promovendo maior interação com a membrana bacteriana e, consequentemente, amplificando sua atividade antibacteriana.

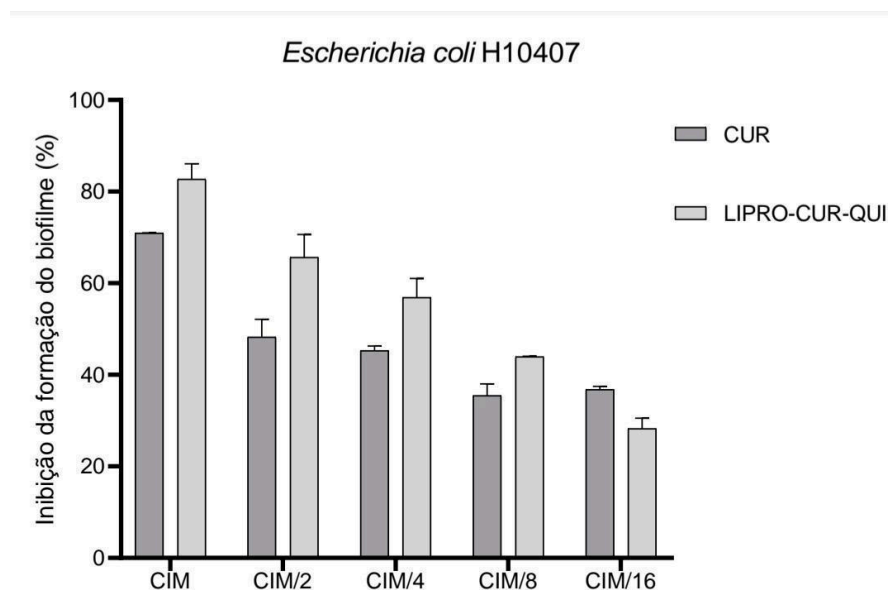
Nesse contexto, os resultados obtidos neste estudo confirmam esse efeito, demonstrando que a curcumina encapsulada em lipossomas revestidos por quitosana (Lipo-CUR-Qui) reduziu significativamente a CIM e a CBM frente a diversas cepas de *E. coli*, em comparação com a CUR livre. A potencialização da atividade antibacteriana está relacionada à presença dos curcuminóides, principais metabólitos secundários da CUR, que exibem ação tanto contra bactérias sensíveis, quanto contra cepas resistentes aos antibióticos convencionais (Hettiarachchi *et al.*, 2022).

Portanto, esses achados reforçam que a nanoencapsulação da CUR não apenas melhora sua solubilidade e biodisponibilidade, mas também maximiza sua atividade biológica, destacando os lipossomas revestidos por quitosana como sistemas de liberação controlada promissores, capazes de superar barreiras bacterianas e ampliar a eficácia terapêutica frente a patógenos resistentes.

5.4 ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A inibição da formação de biofilme apresentou resposta dependente da dose para os diferentes agentes testados. A maior inibição foi observada na concentração correspondente à CIM, enquanto a menor ocorreu na CIM/16, conforme ilustrado na Figura 1. Os resultados demonstraram variação significativa nos níveis de inibição do biofilme, com CUR apresentando inibição entre 36,3% e 71%, e a formulação Lipo-CUR-Qui entre 26,61% e 85,07%. Conforme esperado, a formulação Lipo-Qui não apresentou efeito sobre a formação de biofilme em nenhuma das concentrações avaliadas. Esses achados destacam a importância da concentração do agente na eficácia da inibição do biofilme, fornecendo informações relevantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e aplicações clínicas futuras (Maurizi *et al.*, 2022).

Figura 3. Inibição da formação de biofilme de cepas de *Escherichia coli* H10407 após o tratamento de curcumina encapsulados em lipossomas revestidos com quitosana.



Fonte: Autoria própria (2025).

Biofilmes são comunidades microbianas organizadas em uma matriz de exopolissacarídeos, que atua como barreira protetora, isolando as bactérias de agentes antimicrobianos. Para que um composto seja eficaz na desestruturação de biofilmes, é essencial que ele possua capacidade de penetrar essa matriz e eliminar as bactérias presentes nesses aglomerados (Badr-Eldin *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2025). Nesse contexto, a atividade de inibição de biofilme observada nas formulações desenvolvidas neste estudo pode ser atribuída à ação dos lipossomas encapsulando curcumina, que demonstram potencial na prevenção, particularmente nas fases de adesão dessas estruturas bacterianas complexas (Shamim *et al.*, 2023).

A formação de biofilme inicia-se com a adesão das bactérias a uma superfície, seguida pelo crescimento celular e produção de exopolissacarídeos, processos regulados pelo *Quorum Sensing* (QS), que coordena o comportamento bacteriano em função da densidade populacional. A adesão bacteriana à superfície e a produção de exopolissacarídeos são determinantes para a consolidação do biofilme. Estratégias para inibição da formação de biofilme incluem ataques diretos

às células bacterianas, prevenção da adesão à superfície ou interrupção do QS (Atac *et al.*, 2023).

Estudos demonstram que a encapsulação da CUR em lipossomas aumenta sua eficácia antibiofilme. Shariffian *et al.* (2020) demonstraram que a presença de nanopartículas de curcumina (Nano-Cur) reduziu significativamente a formação de biofilme por *P. aeruginosa* ATCC 10145. Sem a Nano-Cur, a cepa apresentou produção robusta de biofilme, já com Nano-Cur em concentrações de 15 e 20 µg/mL, a formação do biofilme foi reduzida para níveis moderado (2+) e fraco (1+), respectivamente, evidenciando o potencial da curcumina encapsulada na inibição de biofilmes.

De forma similar, Hu *et al.* (2023) avaliaram a formação de biofilme de *S. mutans* e observaram redução significativa no grupo tratado com lipossomas contendo curcumina (Lipo-CUR) em comparação com a curcumina livre a 10 µM. A curcumina livre perdeu efeito após quatro horas, momento em que o biofilme já estava estabelecido, enquanto a curcumina encapsulada permaneceu aderida ao biofilme, exercendo ação antibacteriana contínua durante todo o período de cultivo.

Além da própria ação da curcumina, características físico-químicas dos lipossomas podem potencializar o efeito antibiofilme. Estudos indicam que lipossomas com diâmetros entre 100 e 300 nm favorecem a penetração e o direcionamento de agentes antibacterianos dentro do biofilme (Makhlouf *et al.*, 2023; Souza *et al.*, 2024). Nesse sentido, os lipossomas desenvolvidos neste estudo apresentaram tamanho médio de aproximadamente 142,0 nm, adequado para promover penetração eficaz e ação prolongada da curcumina sobre as bactérias no biofilme.

5.5 ATIVIDADE DA CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS RAW 264.7

A CUR exibiu CC_{50} de $3,7 \pm 0,1$ µg/mL sobre RAW 264.7, indicando alta citotoxicidade em baixa concentração. Em contraste, o nanossistema Lipo-CUR-Qui alcançou o maior CC_{50} ($12,7 \pm 0,1$ µg/mL), sugerindo melhor perfil de segurança. A anfotericina B, usada como fármaco padrão, apresentou CC_{50} de 8,5 µg/mL.

Tabela 4. Citotoxicidade da CUR e Lipo-CUR-Qui, bem como do fármaco de referência anfotericina B, sobre macrófagos RAW 264.7 nas concentrações de 3,7 a 100 µg/mL após 48 h de tratamento.

CC₅₀ sobre RAW 264.7	
Composto	µg/mL
CUR	3,7 ± 0,1
Lipo-CUR-Qui	12,7 ± 0,1
AmB	8,5

CC₅₀: Concentração citotóxica 50%; CUR: Curcumina; Lipo-CUR-QUI: Lipossoma contendo curcumina revestido por quitosana; AmB: Anfotericina B.

Esses achados se alinham a tendências bem descritas na literatura para nanossistemas, a encapsulação costuma atenuar a citotoxicidade e, ao mesmo tempo, potencializar a atividade biológica, ao melhorar solubilidade, estabilidade e liberação controlada do fármaco (Gholami *et al.*, 2023). Em modelos celulares de macrófagos do tipo RAW 264.7, sistemas nanoestruturados de curcumina frequentemente não exibem citotoxicidade relevante nas faixas testadas, reforçando o papel protetor do carreador frente à molécula livre (Pengjam *et al.*, 2021; Dzoyem *et al.*, 2022).

O revestimento com quitosana desponta como um fator decisivo, ao comparar Lipo-CUR-Qui com CUR, observa-se incremento progressivo do CC₅₀, culminando no menor risco celular com a partícula revestida. A termos de mecanismos, esse efeito é plausível por fatores: I) Estabilização coloidal e proteção contra degradação da curcumina; II) Redução da liberação imediata e III) Modulação das interações partícula-membrana, já que a quitosana organiza a interface e pode reduzir interações descontroladas com a bicamada celular. Indica-se que o revestimento aumenta a estabilidade e retarda a liberação do fármaco em comparação com lipossomas não revestidos, exatamente o que explicaria o CC₅₀ mais alto observado para Lipo-CUR-Qui (Nasra *et al.*, 2023; Jantarawong *et al.*, 2023; Vochita *et al.*, 2024).

5.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* EM PROMASTIGOTAS

A CUR apresentou diferenças marcantes entre as duas espécies. Para *L. infantum*, o IC₅₀ foi de 43,5 ± 0,4 µg/mL, resultando em baixo índice de seletividade (IS = 0,09), indicando baixa eficácia frente ao parasita e alta citotoxicidade relativa. Já contra *L. amazonensis*, o IC₅₀ foi reduzido para 7,9 ± 0,6 µg/mL, com discreta melhora na seletividade (IS = 0,5). A anfotericina B, utilizada como controle positivo, manteve-se altamente potente contra ambas as espécies, com IC₅₀ de 0,6 µg/mL e IS = 14,2.

Nos Lipo-CUR-Qui, foram observadas diferenças importantes. Para *L. infantum*, a IC₅₀ foi de 16,7 ± 3,5 µg/mL, com IS = 0,8, representando melhora em relação à curcumina livre. Já frente a *L. amazonensis*, os valores de IC₅₀ variaram entre 6,2 ± 0,1 e 11,5 ± 1,6 µg/mL, com IS entre 1,1 e 1,5, evidenciando maior eficácia e seletividade em comparação à curcumina livre.

Tabela 5. Valores de IC₅₀ sobre promastigotas, CC₅₀ sobre macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos diferentes compostos testados frente a *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 – LDlc2) e *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016 – LTBC4) expressando β-galactosidase.

<i>L. amazonenses</i>			
Composto	IC ₅₀ sobre Promastigotas ¹	CC ₅₀ sobre RAW ²	IS ³ (Promastigotas)
µg/ mL			
CUR	7,9 ± 0,6	3,7 ± 0,1	0,5
Lipo-CUR-Qui	11,5 ± 1,6	12,7 ± 0,1	1,1
AmB	0,6 ± 0	8,5	14,2
<i>L. infantum</i>			
CUR	43,5 ± 0,4	3,7 ± 0,1	0,09
Lipo-CUR-Qui	16,7 ± 3,5	12,7 ± 0,1	0,8
AmB	0,6	8,5	14,2

CC₅₀: Concentração citotóxica 50%; CUR: Curcumina; Lipo-CUR-Qui: Lipossoma contendo curcumina revestido por quitosana; AmB: Anfotericina B.

¹ Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário em 50%.

² Concentração do composto que inibe a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 em 50%.

³ Índice de Seletividade: IC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre promastigotas. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração do composto em análise e os valores de IC₅₀ e CC₅₀ correspondem a média \pm desvio padrão de duas réplicas técnicas. Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de análise de regressão não linear usando o programa GraphPAD 8.

A análise comparativa demonstra que a resposta aos compostos foi espécie-dependente. A curcumina livre apresentou baixa eficácia frente a *L. infantum*, mas melhor desempenho contra *L. amazonensis*. Esse comportamento já foi relatado na literatura, em que diferenças entre espécies de *Leishmania* influenciam a suscetibilidade a compostos fenólicos devido à variação no metabolismo oxidativo e na composição da membrana celular (Amaral *et al.*, 2014; Fattahi-Bafghi *et al.*, 2021; Santos *et al.*, 2022).

O revestimento da curcumina em lipossomas com quitosana resultou em melhora significativa da seletividade e da potência contra *L. infantum*, em comparação com a curcumina livre (Pereira *et al.*, 2021). Esses resultados corroboram estudos prévios que mostram que o encapsulamento em lipossomas aumenta a estabilidade e a biodisponibilidade da curcumina, além de proteger o composto da degradação rápida no meio biológico (Fattahi-Bafghi *et al.*, 2021; Dourado *et al.*, 2024). Por outro lado, frente a *L. amazonensis*, o efeito do encapsulamento foi mais discreto, indicando que essa espécie pode apresentar barreiras fisiológicas adicionais à ação da curcumina nanoestruturada (Dourado *et al.*, 2024).

Comparando com o padrão terapêutico, a anfotericina B manteve-se mais potente e seletiva em ambas as espécies (Ferraz *et al.*, 2022). Entretanto, os resultados com Lipo-CUR-Qui, especialmente frente a *L. infantum*, indicam um potencial promissor para uso em formulações alternativas ou adjuvantes no tratamento da leishmaniose, com menor toxicidade que os fármacos convencionais.

A avaliação da atividade do fármaco frente à forma promastigota de *Leishmania* sp. é importante como etapa inicial de triagem, uma vez que permite identificar compostos com potencial leishmanicida antes da análise em formas intracelulares (Jara *et al.*, 2023). Embora essa forma do parasito seja extracelular e não represente diretamente a fase clínica da infecção, sua sensibilidade ao fármaco fornece informações preliminares sobre a eficácia do composto, contribuindo para a seleção de formulações promissoras para testes subsequentes em amastigotas, que refletem a fase intracelular relevante para a terapia da leishmaniose (Saki *et al.*, 2022).

5.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* EM AMASTIGOTAS

Nos testes utilizando as formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* expressando β -galactosidase, a CUR apresentou IC_{50} de $2,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$, com CC_{50} de $3,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ em macrófagos, resultando em IS de 1,3. Já o Lipo-CUR-Qui apresentou IC_{50} inferior a $0,78 \mu\text{g/mL}$ e CC_{50} de $12,7 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, resultando em IS de 16,2. A anfotericina B, utilizada como fármaco de referência, apresentou a maior potência, com IC_{50} de $0,13 \mu\text{g/mL}$ e IS de 65,4.

Na avaliação frente à *L. amazonensis*, a CUR apresentou IC_{50} de $2,5 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$, com seletividade baixa (1,5). O Lipo-CUR-Qui mostrou maior atividade, com IC_{50} $1,4 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, alcançando IS de 9,1. A anfotericina B manteve-se como o composto mais eficaz, com IC_{50} $0,13 \mu\text{g/mL}$, além de índices de seletividade elevados (IS = 65,4).

Tabela 6. Valores de IC_{50} sobre amastigotas CC_{50} sobre macrófagos RAW 264.7 e índice de seletividade (IS) dos diferentes compostos testados frente a *L. infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263 – LDlc2) e *L. amazonensis* (cepa WHOM/00 LTB 0016 – LTBC4) expressando β -galactosidase.

<i>L. infantum</i>			
Composto	IC_{50} sobre Amastigotas ¹	CC_{50} sobre RAW ²	IS ³

$\mu\text{g/ mL}$			
CUR	$2,8 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,1$	1,3
Lipo-Qui	$3,6 \pm 1,6$	$6,2 \pm 0,4$	1,7
Lipo-CUR-Qui	<0,78	$12,7 \pm 0,1$	>16,3
AmB	0,13	8,5	65,4
<i>L. amazonensis</i>			
CUR	$2,5 \pm 0,1$	$3,7 \pm 0,1$	1,5
Lipo-Qui	$5,2 \pm 2,6$	$6,2 \pm 0,4$	1,2
Lipo-CUR-Qui	$1,4 \pm 0$	$12,7 \pm 0,1$	9,1
AmB	0,13	8,5	65,4

CC₅₀: Concentração citotóxica 50%; CUR: Curcumina; Lipo-CUR-Qui: Lipossoma contendo curcumina revestido por quitosana; AmB: Anfotericina B.

¹ Concentração do composto que reduz o crescimento parasitário em 50%.

² Concentração do composto que inibe a viabilidade dos macrófagos RAW 264.7 em 50%.

³ Índice de Seletividade (IS): CC₅₀ do composto sobre macrófagos RAW 264.7 dividido pelo IC₅₀ do composto sobre amastigotas. Os ensaios foram realizados em duplicata para cada concentração do composto em análise e os valores de IC₅₀ e CC₅₀ correspondem a média \pm desvio padrão de duas réplicas técnicas. Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de análise de regressão não linear usando o programa GraphPAD 8.

A análise comparativa dos compostos revelou diferenças significativas na suscetibilidade de *L. infantum* e *L. amazonensis*, confirmando que a resposta aos tratamentos é espécie-dependente. Frente à *L. infantum*, a CUR apresentou atividade moderada contra formas amastigotas, mas com baixa seletividade (IS = 1,3). Esse resultado está em consonância com estudos recentes que demonstram a eficácia limitada da curcumina em sua forma livre devido à baixa solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade (Spindóla *et al.*, 2025).

O encapsulamento da CUR em lipossomas revestidos com quitosana resultou em expressivo aumento da potência e da seletividade contra *L. infantum*, superando

amplamente a curcumina livre. Esse comportamento corrobora relatos que destacam a capacidade das nanoformulações lipossomais em aumentar a estabilidade da curcumina, prolongar sua meia-vida e otimizar a entrega intracelular (Soto-Sánchez *et al.*, 2024). Além disso, a presença da quitosana no revestimento potencializa a interação com membranas e receptores específicos, mecanismo também descrito em nanopartículas manosiladas contendo curcumina, que exibiram redução significativa da carga parasitária em modelos de leishmaniose visceral (Chaubey *et al.*, 2018).

Na avaliação contra *L. amazonensis*, a CUR apresentou IC₅₀ de 2,5 µg/mL em amastigotas, com baixa seletividade (IS = 1,5). Entretanto, a formulação Lipo-CUR-Qui mostrou desempenho superior, com IC₅₀ de 1,4 µg/mL e IS = 9,1, evidenciando maior seletividade frente a essa espécie. Esses achados reforçam que a associação da curcumina ao lipossoma recoberto com quitosana é uma estratégia eficaz para aumentar sua potência e seletividade, especialmente contra amastigotas, principal forma responsável pela manutenção da infecção em hospedeiros vertebrados (Marcolino *et al.*, 2024).

Mais uma vez a anfotericina B, utilizada como controle, manteve-se como o composto mais potente e seletivo em ambas as espécies, conforme já bem estabelecido na literatura (Borges *et al.*, 2023). Contudo, os resultados obtidos com Lipo-CUR-Qui são promissores, especialmente considerando o potencial de reduzir efeitos tóxicos característicos dos tratamentos convencionais, uma vez que índices de seletividade significativamente superiores aos da curcumina livre foram alcançados tanto em *L. infantum* quanto em *L. amazonensis*.

6 CONCLUSÃO

A formulação de curcumina em lipossomas revestidos por quitosana apresentou propriedades físico-químicas estáveis e alta eficiência de encapsulação, o que resultou em aumento significativo da atividade antimicrobiana e antiparasitária em comparação à curcumina livre. Os resultados evidenciaram efeito bactericida frente a diferentes cepas de *E. coli* patogênicas, inclusive com inibição da formação de biofilmes, além de maior seletividade e potencial contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.. Ademais, a citotoxicidade reduzida em macrófagos RAW 264.7 reforça a segurança da formulação, aproximando seu desempenho ao de fármacos convencionais como a anfotericina B, mas com menor toxicidade.

Esses achados confirmam que a encapsulação desse produto em lipossomas constitui uma estratégia promissora para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas e antiparasitárias mais eficazes e seguras. Estudos futuros devem investigar a eficácia *in vivo*, bem como explorar o potencial desta plataforma nanotecnológica como adjuvante em regimes terapêuticos combinados, visando ampliar as alternativas disponíveis no combate às infecções bacterianas e às doenças parasitárias negligenciadas, como a leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- ADE, C. *et al.* Polymer micelles vs polymer–lipid hybrid vesicles: a comparison using RAW 264.7 cells. **Biomacromolecules**, v. 23, n. 3, p. 1052-1064, 2022.
- ADEPU, S. *et al.* Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. **Molecules**, v. 26, n. 5905, 2021.
- AFYOUNI, I. *et al.* Studying the characteristics of curcumin-loaded liposomal nanoparticles. **Asian Pacific Journal of Cancer Biology**, v. 9, n. 2, p. 183-218, 2024.
- AGHBASHLO, M. *et al.* Tuning chitosan's chemical structure for enhanced biological functions. **Trends in Biotechnology**, v. 41, n. 6, 2022.
- ALBALAWI, A. E. *et al.* A systematic review of curcumin and its derivatives as valuable sources of antileishmanial agents. **ACTA Parasitológica**, v. 66, p. 797-811, 2021.
- ALFURAIJI, N. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* virulence characteristics and antimicrobial resistance among pediatric urinary tract infections. **Journal of Medicine and Life**, v. 15, n. 5, 2022.
- ALGABBANI, Q. Nanotechnology: A promising strategy for the control of parasitic infections. **Experimental Parasitology**, v. 250, 2023.
- ALMEIDA, B. *et al.* Recent Progress in Bioconjugation Strategies for Liposome-Mediated Drug Delivery. **Molecules**, v. 25, n. 23, p. 5672, 2020.
- ALONSO, L. *et al.* Ivermectin and curcumin cause plasma membrane rigidity in *Leishmania amazonensis* due to oxidative stress. **BBA - Biomembranes**, v. 1864, n. 9, 2022.
- ALONSO-ESPANOL, A. *et al.* The antimicrobial activity of curcumin and xanthohumol on bacterial biofilms developed over dental implants surfaces. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 2335, 2023.
- ALSHAMSAN, A. *et al.* Exploring anti-MRSA activity of chitosan-coated liposomal dicloxacillin. **Journal of microbiological methods**, v. 156, p. 23-28, 2019.
- AMARAL, A. C. F. *et al.* liposomal formulation of turmerone-rich hexane fractions from *Curcuma longa* enhances their antileishmanial activity. **BioMed research international**, v. 2014, n. 1, p. 694934, 2014.
- ANG, S. S. *et al.* Apigenin encapsulated in spray-dried liposomes coated with chitosan: heat, pH, light, oxygen, salt and storage stability. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 6, p. 3701-3710, 2024.
- ANGOITI, E. M. *et al.* Is leishmaniasis the new emerging zoonosis in the world. **Veterinary Research Communication**, v. 47, p. 1777-1799, 2023.

ARBAB, S. *et al.* Antimicrobial drug resistance against *Escherichia coli* and its harmful effect on animal health. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, p. 1780-1786, 2022.

ATAC, N. *et al.* Fimbria targeting superparamagnetic iron oxide nanoparticles enhance the antimicrobial and antibiofilm activity of ciprofloxacin against quinolone-resistant *E. coli*. **Microbial Biotechnology**, v. 16, n. 11, p. 2072-2081, 2023.

BAKER, R. E. *et al.* Infectious disease in an era of global change. **Nature reviews microbiology**, v. 20, n. 4, p. 193-205, 2022.

BANETH, G. *et al.* Leishmaniasis. **Vet Clin Small Anim**, v. 52, p. 1359-1375, 2022.

BODNÁR, K. *et al.* Development of *Salvia officinalis*-based self-emulsifying systems for dermal application: antioxidant, anti-inflammatory, and skin penetration enhancement. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 2, p. 140, 2025.

BORGES, B. S. *et al.* *In vitro* anti-Leishmania activity of triclabendazole and its synergic effect with amphotericin B. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 1044665, 2023.

BOUDIER, A. *et al.* Nanoparticles and other nanostructures and the control of pathogens: From bench to vaccines. **International Journal of Molecular Sciences**, v.24, n. 9063, 2023.

BOWMAN, B. A. *et al.* Oxygen and immunity to *Leishmania* infection. **Infection and Immunity**, v. 94, n. 7, 2025.

CAMPOS, M. B. *et al.* Systematic suppression of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-mediated delayed-type hypersensitivity response in American cutaneous leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 18, n. 1, p. 336, 2025.

CHAUBEY, P. *et al.* Mannose-conjugated curcumin-chitosan nanoparticles: Efficacy and toxicity assessments against *Leishmania donovani*. **International journal of biological macromolecules**, v. 111, p. 109-120, 2018.

CHEN, H. W. *et al.* Characterization, antibacterial property, biocompatibility, and optimization of novel composite nanofibers incorporating curcumin-loaded flexible nano-liposomes. **Biophysical Chemistry**, v. 107453, 2025.

CHEN, W. T. *et al.* Improving the stability and bioactivity of curcumin using chitosan-coated liposomes through a combination mode of high-pressure processing. **Lwt**, v. 168, p. 113946, 2022.

CHETRI, S. *Escherichia coli*: An arduous voyage from commensal to antibiotic-resistance. **Microbial Pathogenesis**, v. 198, 2025.

CHIONG, H. S. *et al.* Cytoprotective and enhanced anti-inflammatory activities of liposomal piroxicam formulation in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1245-1255, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**. 35^a ed. Suplemento CLSI M100. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2025.

COHEN, E. *et al.* Hydrophilic chitosan derivatives: Synthesis and applications. **Chemistry - A European Journal**, v. 28, 2022.

DA SILVA SANTOS, A. C. *et al.* Assessment of *Leishmania* cell lines expressing high levels of beta-galactosidase as alternative tools for the evaluation of anti-leishmanial drug activity. **Journal of Microbiological Methods**, v. 166, p. 105732, 2019.

DANAEI, M. R. M. M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DOMAGALSKA, M. A. *et al.* Drug resistance in *Leishmania*: does it really matter?. **Trends in Parasitology**, v. 39, n. 4, p. 251-259, 2023.

DOURADO, D. *et al.* Curcumin-loaded nanostructured systems for treatment of leishmaniasis: a review. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 15, n. 1, p. 37-50, 2024.

DROZD, K. K. *et al.* Potential of curcumin in the management of skin diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 3617, 2024.

DZOYEM, J. P. *et al.* Liposome-encapsulated bioactive guttiferone e exhibits anti-inflammatory effect in lipopolysaccharide-stimulated mh-s macrophages and cytotoxicity against human cancer cells. **Mediators of Inflammation**, v. 2022, n. 1, p. 8886087, 2022.

EJAZ, S. *et al.* Chitosan-curcumin complexation to develop functionalized nanosystems with enhanced antimicrobial activity against hetero-resistant gastric pathogen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 204, p. 540-554, 2022.

EL-HACK, M. E. A. *et al.* Antimicrobial and antioxidant properties of chitosan and its derivatives and their applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 2726-2744, 2020.

FAN, Y. *et al.* Analytical characterization of liposomes and other lipid nanoparticles for drug delivery. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 192, 2021.

FAN, Z. *et al.* Functional probes for the diagnosis and treatment of infectious diseases. **Aggregate**, v. 5, n. 6, e620, 2024.

FATTAHI-BAFGHI, A. *et al.* A novel delivery of curcumin by the efficient nanoliposomal approach against *Leishmania major*. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 51, n. 10, p. 990-997, 2021.

FERNANDES, J. C. R. *et al.* Mechanisms regulating host cell death during *Leishmania* infection. **mBIO**, v. 15, n. 11, 2024.

FERRAZ, R. *et al.* Synthesis and biological evaluation of amphotericin b formulations based on organic salts and ionic liquids against *Leishmania infantum*. **Antibiotics**, v. 11, n. 12, 1841, 2022.

GEURTSSEN, J. *et al.* Genomics and pathotypes of the many faces of *Escherichia coli*. **FEMS microbiology reviews**, v. 46, n. 6, fuac031, 2022.

GHOLAMI, L. *et al.* Selective cellular uptake and cytotoxicity of curcumin-encapsulated SPC and HSPC liposome nanoparticles on human bladder cancer cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 29, n. 13, p. 1046-1058, 2023.

GIL-GONZALO, R. *et al.* Chitosan-coated liposome formulations for encapsulation of ciprofloxacin and etoposide. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, p. 1036, 2024.

GUERRA, R. O. *et al.* Metallic nanoparticles and treatment of cutaneous leishmaniasis: A systematic review. **Journal of trace elements in medicine and biology**, v. 83, 2024.

GUIMARÃES, D. *et al.* Design of liposomes as drug delivery system for therapeutic applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 601, 2021.

HETTIARACHCHI, S. S. *et al.* Comparison of antibacterial activity of nanocurcumin with bulk curcumin. **ACS omega**, v. 7, n. 50, p. 46494-46500, 2022.

HOLMES, C. L. *et al.* Bloodstream infections: mechanisms of pathogenesis and opportunities for intervention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 23, n. 4, p. 210-224, 2025.

HU, Z. *et al.* Functional liposome loaded curcumin for the treatment of *Streptococcus mutans* biofilm. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1160521, 2022.

HUSSAIN, Y. *et al.* Antimicrobial potential of curcumin: Therapeutic potential and challenges to clinical applications. **Antibiotics**, v. 11, n. 322, 2022.

HUSSIEN, F. H. *et al.* *In vitro* activity of *Curcuma longa* extract against the promastigote stage of cutaneous leishmania parasite. **Medical Journal of Babylon**, v. 22, n. 2, p. 519-525, 2025.

JAFERNIK, K. *et al.* Chitosan-based nanoparticles as effective drug delivery systems - A review. **Molecules**, v. 28, n. 1963, 2023.

JANG, G. H. *et al.* A chitosan/alginate coated nano-liposome to improve intestinal absorption of curcumin for oral administration. **Food Science and Biotechnology**, v. 33, n. 7, p. 1707-1714, 2024.

JANTARAWONG, S. *et al.* Modified curcuminoid-rich extract liposomal cre-sdinhibits osteoclastogenesis via the canonical nf-kb signaling pathway. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 9, p. 2248, 2023.

JARA, M. *et al.* Unveiling drug-tolerant and persister-like cells in *Leishmania braziliensis* lines derived from patients with cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, n. 1253033, 2023.

JARA-QUIJADA, E. *et al.* Chitosan-coated liposomes loaded with green tea polyphenols incorporated into apple juice: characterization, stability, *in vitro* digestion, and sensory analysis. **Food and Bioprocess Technology**, p. 1-12, 2025.

JING, G. *et al.* Nanoparticles help in combating chronic wound biofilms infection. **International Journal of Nanomedicine**, v. 19, p. 11883-11921, 2024.

KAREEM, S. M. *et al.* Effects of Curcumin and Silymarin on the *Shigella dysenteriae* and *Campylobacter jejuni* *in vitro*. **Journal of gastrointestinal cancer**, v. 51, p. 824-828, 2020.

KE, L. *et al.* Identification of the antibacterial action mechanism of curcumin on *Streptococcus mutans* through transcriptome profiling. **Archives of Oral Biology**, v. 149, 2023.

KOBAYASHI, T. *et al.* Clinical and microbiological characteristics of recurrent *Escherichia coli* bacteremia. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 3, 2021.

KOU, S. *et al.* Chitosan: A review of molecular structure, bioactivities and interactions with the human body and micro-organisms. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, 2022.

KUMARI, M. *et al.* Potential of curcumin nanoemulsion as antimicrobial and wound healing agent in burn wound infection. **Burns**, v. 49, n. 5, p. 1003-1016, 2023.

KUMBAR, V. M. *et al.* Effect of curcumin on growth, biofilm formation and virulence factor gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. **Odontology**, v. 109, p. 18-28, 2021.

LARGE, E. D. *et al.* Liposome composition in drug delivery design, synthesis, characterization, and clinical application. **Advanced Drug Reviews**, v. 176, 2021.

LEO, V. *et al.* Liposomes containing nanoparticles: preparation and applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 218, 2022.

LIN, Y. *et al.* The antibiofilm nanosystems for improved infection inhibition of microbes in skin. **Molecules**, 26, n. 6392, 2021.

LIU, P. *et al.* A review of liposomes as a drug delivery system: Current status of approved products, regulatory environments, and futures perspectives. **Molecules**, v. 27, n. 1372, 2022.

LIU, Q. Effect of curcumin-loaded zein/polysaccharides nanoparticles on fatigue stress injury. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 20, n. 4, p. 645-654, 2024.

LOISEAU, P. M. *et al.* Chitosan contribution to therapeutic and vaccinal approaches for the control of leishmaniasis. **Molecules**, v. 25, n. 18, p. 4123, 2020.

LYU, Y. *et al.* Antimicrobial peptide-chitosan nanoparticles combat ETET-induced bacterial infection in mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 311, 2025.

MAJOOR, A. *et al.* Leishmaniasis: Strategies in treatment development. **Parasite**, v. 32, n. 18, 2025.

MAKHLOUF, Z. *et al.* Liposomes-based drug delivery systems of anti-biofilm agents to combat bacterial biofilm formation. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 875, 2023.

MANN, S. *et al.* A review of leishmaniasis: Current knowledge and future directions. **Current tropical medicine reports**, v. 8, n. 2, p. 121-132, 2021.

MARCOLINO, L. M. C. *et al.* Photodynamic therapy of cationic and anionic BSA-curcumin nanoparticles on amastigotes of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 46, p. 104001, 2024.

MENTZER, A. V. *et al.* Colonization factors of human and animal-specific enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends in Microbiology*, v. 32, n. 5, p. 448-464, 2021.

MERCAN, D. A. *et al.* Nanoparticles for antimicrobial agents delivery - An up-to-date review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13862, 2022.

MOTA, R. *et al.* Multidrug-resistant bacteria as intestinal colonizers and evolution of intestinal colonization in healthy university students in Portugal. **Access Microbiology**, v. 3, n. 1, 2020.

MU, L. *et al.* Progress in chitin/chitosan and their derivatives for biomedical applications: Where we stand. **Carbohydrate Polymers**, v. 384, 2024.

NASRA, S. *et al.* Reprogramming M1-to-M2 phenotype to alleviate inflammation: using liposomal curcumin as a tool to redefine macrophage functionality. **ACS Applied Bio Materials**, v. 6, n. 7, p. 2886-2897, 2023.

PARK, H. *et al.* Evolution of drug delivery systems: From 1950 to 2020 and beyond. **Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society**, v. 342, p. 53–65, 2021.

PATHAK, R. *et al.* Chitosan nanoparticles and bases composites as biocompatible vehicles for drug delivery: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 253, n. 7, 2023.

PEDERIVA, M. M. C. *et al.* Asymptomatic *Leishmania* infection in humans: A systematic review. **Journal of Infection and Public Health**, v. 16, p. 286-294, 2023.

PENG, X. *et al.* Biofunctional lipid nanoparticles for precision treatment and prophylaxis of antibacterial infections, **Science Advances**, v. 10, 2024.

PENGJAM, Y. *et al.* Curcuminoid (CRE-Ter)/Liposome as delivery platform for anti-osteoclastogenesis via NF- κ B/ERK pathways in RANKL-induced RAW 264.7 cells through PLA foams. **Heliyon**, v. 7, n. 9, p. 1-13, 2021.

PEREIRA, A. H. C. *et al.* Evaluation of the photodynamic therapy with curcumin on *L. braziliensis* and *L. major* amastigotes. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 634, 2021.

POKHAREL, P. *et al.* The diversity of *Escherichia coli* pathotypes and vaccination strategies against this versatile bacterial pathogen. **Microorganisms**, v. 11, n. 2, p. 344, 2023.

POZNANSKI, P. *et al.* Chitosan and chitosan nanoparticles: Parameters enhancing antifungal activity. **Molecules**, v. 28, n. 2996, 2023.

PRADHAN, S. *et al.* Treatment options for leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 47, p. 516-521, 2022.

RAI, M. *et al.* Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 4, p. 367-379, 2020.

RASHKI, S. *et al.* Chitosan-based nanoparticles against bacterial infections. **Carbohydrate Polymers**, v. 251, 2021.

RISEH, *et al.* Chitosan as a potential natural compound to manage plant diseases. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 220, p. 998-1009, 2022.

ROSAR, A. D. S. *et al.* Clinical, histopathological and parasitological follow-up of dogs naturally infected by *Leishmania infantum* before and after miltefosine treatment and associated therapies. **Plos one**, v. 20, n. 1, e0313167, 2025.

SADEGHI, M. *et al.* Curcumin and chemokines: mechanism of action and therapeutic potential in inflammatory diseases. **Inflammopharmacology**, v. 31, p. 1069-1093, 2023.

SAHEBI, K. *et al.* *In vitro* and *in vivo* anti-parasitic activity of curcumin nanoemulsion on *Leishmania major*. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 24, n. 238, 2024.

SAKI, J. *et al.* The *in vitro* anti-Leishmania Effect of *Zingiber officinale* Extract on Promastigotes and Amastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*. **Turkish Journal of Parasitology**, v. 12, p. 1-18, 2022.

SALAMA, A. *et al.* Curcumin-loaded gold nanoparticles with enhanced antibacterial efficacy and wound healing properties in diabetic rats. **International Journal of Pharmaceuticals**, v. 666, 2024.

SALLE, A. D. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm activity of curcumin-loaded electrospun nanofibers for the prevention of the biofilm-associated infections. **Molecules**, v. 26, n. 4866, 2021.

SANTOS, D. B. *et al.* Current applications of plant-based drug delivery nano systems for leishmaniasis treatment. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 11, p. 2339, 2022.

SHAMIM, A. *et al.* Natural medicine a promising candidate in combating microbial biofilm. **Antibiotics**, v. 12, n. 2, p. 299, 2023.

SHARIFIAN, P. *et al.* Investigating the effect of nano-curcumin on the expression of biofilm regulatory genes of *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Drug Resistance**, v. 18, p. 2477-2484, 2020.

SHMUELI, M.; BEN-SHIMOL, S. Review of Leishmaniasis treatment: can we see the forest through the trees?. **Pharmacy**, v. 12, n. 1, p. 30, 2024.

SMIT, C. C. H. *et al.* One health determinants of *Escherichia coli* antimicrobial resistance in humans in the community: An umbrella review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, 2023.

SOTO-SÁNCHEZ, J. *et al.* Combination therapy and phytochemical-loaded nanosystems for the treatment of neglected tropical diseases. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 10, p. 1239, 2024.

SOUZA, J. B. *et al.* Ceftazidime and usnic acid encapsulated in chitosan-coated liposomes for oral administration against colorectal cancer-inducing *Escherichia coli*. **Pharmaceutics**, v. 17, n. 6, p. 802, 2024.

SOUZA, J. B. *et al.* Lipossomas revestidos com quitosana: Uma estratégia promissora para a liberação de antimicrobianos. **Pesquisas em Temáticas de Ciências da Saúde**, v. 3, p. 45-56, 2020

SPÍNDOLA, F. F. *et al.* *In Vitro* and *In Silico* Assessments of Curcuminoids and Turmerones from *Curcuma longa* as Novel Inhibitors of *Leishmania infantum* Arginase. **Pharmaceutics**, v. 18, n. 6, p. 851, 2025.

TARGHI, A. A. *et al.* Synergistic effect of curcumin-Cu and curcumin-Ag nanoparticle loaded niosome: Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 115, p. 105116, 2021.

TRIGO-GUTIERREZ, J. K. *et al.* Antimicrobial activity of curcumin in nanoformulations: A comprehensive review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 13, 2021.

UROSEVIC, M. *et al.* Curcumin: Biological activities and modern pharmaceutical forms. **Antibiotics**, v. 11, n. 135, 2022.

VALENCIA, M. S. *et al.* Characterization of curcumin-loaded lecithin-chitosan bioactive nanoparticles. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 2, p. 100119, 2021.

VASARRI, M. *et al.* Liposomal formulation improves the bioactivity of usnic acid in raw 264.7 macrophage cells reducing its toxicity. **Current Drug Delivery**, v. 21, n. 1, p. 91-103, 2024.

VOCHIȚA, G. *et al.* Comparative *in vitro* study between biocompatible chitosan-based magnetic nanocapsules and liposome formulations with potential application in anti-inflammatory therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 15, p. 8454, 2024.

VRIES, H. J. C. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 updated narrative review into diagnosis and management developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 23, p. 823-840, 2022.

WANG, W. *et al.* Chitosan: Structural modification, biological activity and application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 4532-4546, 2020.

WANG, X. *et al.* Preparation of sodium alginate and chitosan modified curcumin liposomes and study on the formation of protein corona. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 293, p. 139392, 2025.

WRAY, R. *et al.* Curcumin activation of a bacterial mechanosensitive channel underlies its membrane permeability and adjuvant properties. **Plos Pathogens**, v. 17, n. 12, 2021.

WU, S. *et al.* Liposomal antibiotic booster potentiates carbapenems for combating NDMs-producing *Escherichia coli*. **Advanced Science**, v. 11, n. 2, p. 2304397, 2024.

YU, L. *et al.* A Co-encapsulation of coenzyme q10 and curcumin in liposomes coated with chitosan (Q10-Cur-Lip-Chi) with enhanced solubility and stability for good release performance and antioxidative activity. **Current Drug Delivery**, v. 20, n. 9, p. 1391-1403, 2023.

YUAN, Y. *et al.* Antibacterial efficacy and mechanism of curcumin-based photodynamic treatment against *Staphylococcus aureus* and its applications in juices. **Molecules**, v. 27, n. 7136, 2022.

ZHANG, J. *et al.* Synergistic bactericidal and antibiofilm effects of curcumin and nisin dual-loaded liposomes combined with photodynamic treatment on *Listeria monocytogenes*. **Food Chemistry**, e. 145557, 2025.

ZHOU, W. *et al.* The formation of chitosan-coated rhamnolipid liposomes containing curcumin: stability and *in vitro* digestion. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 560, 2021.

ZHU, J. *et al.* Curcumin for treating breast cancer: A review of molecular mechanisms, combinations with anticancer drugs, and nanosystems. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 1, p. 79, 2024.