

## **Formulações tópicas à base de manteiga das sementes de *Platonia insignis* Mart. para o tratamento de lesões relacionadas à leishmaniose cutânea experimental**

Topical formulations based on seeds butter from *Platonia insignis* Mart. for the treatment of injuries related to experimental cutaneous leishmaniasis

Formulaciones tópicas a base de grasa de semillas de *Platonia insignis* Mart. para el tratamiento de lesiones relacionadas con leishmaniosis cutânea experimental

Recebido: 08/03/2021 | Revisado: 15/03/2021 | Aceito: 12/04/2021 | Publicado: 21/04/2021

**Ana Karina Marques Fortes Lustosa**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8275-8736>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [ana\\_lustosa@uol.com.br](mailto:ana_lustosa@uol.com.br)

**Angélica Gomes Coêlho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4024-7652>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [angelicacoelho13@gmail.com](mailto:angelicacoelho13@gmail.com)

**Andressa Amorim dos Santos**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7676-3720>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [amorimandressa13@outlook.com](mailto:amorimandressa13@outlook.com)

**Ytallo Samuel Oliveira Barros**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5495-7348>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [ytallobarros@hotmail.com](mailto:ytallobarros@hotmail.com)

**Klinger Antônio da Franca Rodrigues**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3904-3529>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [klinger.antonio@gmail.com](mailto:klinger.antonio@gmail.com)

**Layane Valéria Amorim**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0412-0750>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [layane.valeria@hotmail.com](mailto:layane.valeria@hotmail.com)

**Michel Muálem de Moraes Alves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4541-6096>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [mualemichel@ufpi.edu.br](mailto:mualemichel@ufpi.edu.br)

**André Luis Menezes Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4438-6203>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [aluismenezes@yahoo.com.br](mailto:aluismenezes@yahoo.com.br)

**Anderson Nogueira Mendes**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-9968>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [anderson.mendes@ufpi.edu.br](mailto:anderson.mendes@ufpi.edu.br)

**Fernando Aécio de Amorim Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0889-9968>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [famorim@ufpi.edu.br](mailto:famorim@ufpi.edu.br)

**Daniel Dias Rufino Arcanjo**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7021-2744>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [daniel.arcanjo@ufpi.edu.br](mailto:daniel.arcanjo@ufpi.edu.br)

**Antônia Maria das Graças Lopes Citó**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2605-4317>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [gracito@ufpi.edu.br](mailto:gracito@ufpi.edu.br)

### **Resumo**

O estudo propõe o desenvolvimento e a avaliação de formulações tópicas à base de manteiga da semente do bacuri (*P. insignis* Mart.) e do seu potencial cicatrizante em lesões cutâneas induzidas pela infecção com *Leishmania amazonensis*

em modelo experimental murino. Para isso, realizou-se a obtenção tecnológica de 3 formulações tópicas, veiculadas em Pluronic® Lecithin Organogel (P.L.O.): uma contendo extrato hexânico das sementes do bacuri 5% (FBBU), outra contendo manteiga de bacuri industrializada 5% (FBBI) e uma terceira formulação livre de manteiga (FLBB). Em seguida, realizou-se a avaliação da estabilidade preliminar e acelerada, analisando-se parâmetros como: características organolépticas, determinação da espalhabilidade, resistência à centrifugação, pH e tamanho de gotícula. Por fim, foi avaliada a atividade antileishmania *in vivo* das formulações utilizando-se camundongos fêmeas, da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, infectados na região da base da cauda com promastigotas em fase estacionária. As formulações mostraram-se estáveis em todos os ensaios, havendo variação apenas na espalhabilidade (aumento) e na viscosidade (redução) após estresse. No tratamento do modelo experimental, o desenvolvimento clínico da doença nos animais deu-se conforme o descrito na literatura e pôde-se observar redução significativa no diâmetro das úlceras dos animais tratados com as formulações contendo a manteiga, comparadas à FLBB. Portanto, foi possível o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, a partir das manteigas do bacuri, reproduzível e com resultados de estabilidade satisfatórios. As formulações apresentaram potencial antileishmania relevante comparados à FLBB, indicando grande potencial da atividade da *P. insignis* Mart. para o tratamento da leishmaniose cutânea.

**Palavras-chave:** Emulgel; *Leishmania*; Tecnologia farmacêutica; Bacurizeiro.

### Abstract

The study proposes the development and evaluation of topical formulations based on seeds butter from “bacuri” (*P. insignis* Mart.) And their healing potential in skin lesions induced by infection with *Leishmania amazonensis* in a murine experimental model. For this, the technological obtainment of 3 topical formulations, carried out in Pluronic® Lecithin Organogel (PLO): one containing hexanic extract of 5% bacuri seeds (FBBU), another containing 5% industrialized bacuri butter (FBBI) and a third butter-free formulation (FLBB). Then, the preliminary and accelerated stability assessment was carried out, analyzing parameters such as: organoleptic characteristics, determination of spreadability, resistance to centrifugation, pH and droplet size. Finally, the *in vivo* antileishmania activity of the formulations was evaluated using female BALB/c mice infected at the base of the tail with promastigotes in stationary phase. The formulations were shown to be stable in all tests, with variation only in spreadability (increase) and viscosity (reduction) after stress. In the treatment of the experimental model, the clinical development of the disease in the animals occurred as described in the literature and it was possible to observe a considerable reduction in the ulcer diameter of the animals treated with the formulations containing butter, compared to the FLBB. Therefore, it was possible to develop a formulation for topical use, from bacuri butters, reproducible and with satisfactory stability results. The formulations showed relevant antileishmanial potential compared to FLBB, indicating great potential for *P. insignis* Mart. for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

**Keywords:** Emulgel; *Leishmania*; Pharmaceutical technology; Bacurizeiro.

### Resumen

El estudio propone el desarrollo y evaluación de formulaciones tópicas a base de mantequilla de semilla de bacuri (*P. insignis* Mart.) y su potencial cicatrizante en lesiones cutáneas inducidas por infección con *Leishmania amazonensis* en un modelo experimental murino. Para ello, la obtención tecnológica de 3 formulaciones tópicas, realizadas en Pluronic® Lecithin Organogel (PLO): una que contiene extracto hexánico de 5% de semillas de bacuri (FBBU), otra que contiene 5% de manteca de bacuri industrializada (FBBI) y una tercera mantequilla formulación libre (FLBB). Luego, se llevó a cabo la evaluación preliminar y acelerada de estabilidad, analizando parámetros como: características organolépticas, determinación de esparcimiento, resistencia a la centrifugación, pH y tamaño de gota. Finalmente, se evaluó la actividad antileishmania *in vivo* de las formulaciones utilizando ratones BALB/c hembra, infectados en la base de la cola con promastigotes en fase estacionaria. Se demostró que las formulaciones eran estables en todas las pruebas, con variación solo en la capacidad de esparcimiento (aumento) y viscosidad (reducción) después de la tensión. En el tratamiento del modelo experimental, el desarrollo clínico de la enfermedad en los animales ocurrió como se describe en la literatura y se pudo observar una reducción considerable en el diámetro de las úlceras de los animales tratados con las formulaciones que contienen mantequilla, en comparación con el FLBB. Por lo tanto, fue posible desarrollar una formulación para uso tópico, a partir de mantecas de bacuri, reproducibles y con resultados de estabilidad satisfactorios. Las formulaciones mostraron un potencial anti-leishmania relevante en comparación con FLBB, lo que indica un gran potencial para *P. insignis* Mart. para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

**Palabras clave:** Emulgel; *Leishmania*; Tecnología farmacéutica; Bacurizeiro.

## 1. Introdução

As leishmanioses são antroponoses, infecto-parasitárias, não contagiosas, causadas por várias espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. Sua transmissão é vetorial com ciclo heteroxênico, no qual o homem pode ser envolvido secundariamente, de modo acidental (Vasconcelos, Gomes, Sousa, Teixeira & Lima, 2018; Brasil, 2017).

A Leishmaniose Tegumentar é um problema de saúde pública em 85 países, tendo um registo de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos ao ano. Por ter um alto índice de detecção e a capacidade de produzir graves deformidades, é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das seis mais importantes doenças infecciosas (Brasil, 2017).

No Mundo, o tratamento de escolha envolve os compostos antimoniais, estando disponível no Brasil apenas o Antimoniato de N-metil glucamina. A anfotericina B é considerada droga de segunda escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana, usada em caso de intolerância, contra-indicações e resistência ao uso de antimoniais (Neves, 2011). Todavia, os fármacos utilizados possuem elevada toxicidade, a partir do seu limiar tóxico facilmente atingido, e requerem administração parenteral (Brasil, 2017). Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa por novas alternativas terapêuticas, visando a redução dos efeitos colaterais, da toxicidade e dos custos dos medicamentos já existentes.

Diante do exposto, inúmeras espécies apresentam compostos bioativos que isolados podem fornecer elementos essenciais e alternativos aos tratamentos convencionais. Dentre elas, destaca-se a *Platonia insignis* Mart. (família Clusiaceae), popularmente conhecida no Brasil como bacurizeiro. A espécie apresenta um fruto com polpa rica em propriedades antioxidantes e uma semente rica em ácidos graxos (Lustosa et al., 2018). A composição graxa da manteiga industrializada das sementes do bacuri (BBI) lhe permite alta absorção, sobretudo devido ao seu elevado nível de tripalmitina (50 a 55%), capaz de agir como conduinte, penetrando na pele rapidamente. O alto valor do ácido graxo palmitoléico (5%), também, a qualifica como um excelente emoliente e umectante (Morais, 2012; Costa Junior, 2011a).

Tais propriedades favorecem a elaboração de formulações de uso tópico a partir da MSB. Estudos como o de Costa Junior et al. (2013) já demonstraram excelentes resultados de uma benzofenona poliprenilada, Garcinieliptona FC, isolada das sementes de *P. insignis*, sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, resultando em dados melhores ou superiores que a anfotericina B. Também, há evidências do efeito antileishmania da BBI contra formas amastigotas de *L. amazonensis* internalizadas em macrófagos (Lustosa et al., 2018).

Além das evidências científicas dos efeitos Antileishmania de compostos presentes na semente da planta, Souza et al. (2017) identificou efeito antileishmania do extrato etanólico, da fração hexânica e de um constituinte isolado da casca do caule de *P. insignis*, denominado Lupeol, contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. De acordo com o estudo, a inibição do crescimento de formas amastigotas ocorreu em concentrações menores que a  $CC_{50}$  para os três compostos testados, sendo, um dos mecanismos identificados, a ativação de macrófagos.

A BBI tem sido muito utilizada para o desenvolvimento de formulações, sobretudo de uso tópico, visando o estudo antileishmania. Além da avaliação do potencial antileishmania da BBI, também tem se avaliado o potencial da formulação como carreador de fármacos, como a anfotericina B e, até mesmo, a observação de um possível mecanismo sinérgico da manteiga, utilizada como carreadora, com o fármaco para avaliação antileishmania (Coelho et al., 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento e avaliação de formulações tópicas à base de manteiga da semente do bacuri (*P. insignis* Mart) e a avaliação do seu potencial cicatrizante em lesões cutâneas induzidas pela infecção com *L. amazonensis* em modelo experimental murino.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Identificação botânica e obtenção das manteigas de *Platonia insignis* Mart.

As sementes foram obtidas de espécimes localizados em Barras, Piauí- Brasil (latitude -04° 14' 40'' e longitude -42° 40' 70'') em março de 2009, e a exsicata foi depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob nº ICN TEPB 27164. As sementes foram secas a temperatura de 55 °C e moídas. Oitocentos e quarenta e oito gramas (848 g) do pó seco foram extraídos com hexano em Soxhlet por 8 h. O extrato foi concentrado a vácuo em rotaevaporador com

rendimento total de 63%. O extrato hexânico foi armazenada a 8 °C e houve a formação de duas fases, utilizando-se a fase menos densa, sendo denominada BBU (Fração do Extrato Hexânico das Sementes do Bacuri).

Uma outra manteiga, denominada BBI (manteiga industrializada das sementes do bacuri), foi gentilmente cedida pela empresa Amazon Oil Indústria e Comércio Ltda, intitulada Manteiga Virgem de Semente de Bacuri/ Bacuri Butter, lote MBA-006/10; data de fabricação 16/08/2010 e data de validade 24 meses.

## 2.2 Obtenção tecnológica e avaliação da estabilidade preliminar e acelerada de formulações tópicas (FBBI e FBBU)

### 2.2.1 Obtenção das formulações tópicas

Foram obtidas 03 (três) formulações baseadas em Pluronic® Lecithin Organogel (P.L.O.), descritas da seguinte forma: uma contendo extrato hexânico das sementes do bacuri a 5% (FBBU), outra contendo manteiga de bacuri industrializada a 5% (FBBI) e uma formulação livre de manteiga de bacuri (FLBB). A composição qualitativa das formulações está descrita na Tabela 1. As formulações foram submetidas a ensaios de caracterização após 48 (quarenta e oito) horas de sua preparação, antes do início dos ensaios, seguindo metodologia descrita por Moraes e Rezende (2004).

A obtenção foi realizada a frio, com dispersão do polímero (polaxamer 407 preparado a 20%) Q. S. P. 100% e conservante em água purificada (fase aquosa) e posterior refrigeração por 24 horas para aumentar a taxa de solubilização (Bentley, Marchetti, Ricardo, Ali-Abi & Collett, 1999). A solução de lecitina (fase oleosa) foi obtida pela mistura de (1:1) de lecitina granulada e palmitato de isopropila (totalizando 22% da solução na formulação), sendo mantida por 24 horas em repouso para facilitar a solubilização da lecitina. As manteigas de bacuri a 5% foram previamente fundidas em banho a 37 °C, sob agitação constante, e homogeneizadas à solução de lecitina. A fase aquosa foi vertida na fase oleosa e a formulação foi mantida sob agitação constante por 30 minutos em agitador mecânico tipo ultra turrax a 8.000 rpm.

**Tabela 1.** Composição centesimal das formulações tópicas de manteiga de bacuri UFPI e Industrializada.

Componentes	Fórmulas		
	FBBI*	FBBU**	FLBB***
Lecitina granulada	11,11%	11,11%	11,11%
Palmitato de isopropila	11,11%	11,11%	11,11%
Ácido Sórbico	1,01%	1,01%	1,01%
Polaxamer 407 (20%)	14,60%	14,60%	14,60%
Fração do extrato hexânico das sementes do bacuri (BBU)	-	5,00%	-
Manteiga industrializada das sementes do Bacuri (BBI)	5,00%	-	-
Sorbato de Potássio	0,2%	0,2%	0,2%
Água destilada	Q.S.P 100%	Q.S.P 100%	Q.S.P 100%

Legenda: \*FBBI – formulação contendo manteiga de bacuri industrializada; \*\*FBBU – formulação contendo manteiga de bacuri UFPI e \*\*\*FLBB – formulação livre de manteiga de bacuri.

Fonte: Autores.

### 2.2.2 Análise das Características Organolépticas

As características organolépticas (Aspectos como: Cor, odor, homogeneidade, precipitação, sedimentação e outras mudanças perceptíveis) foram avaliadas visualmente durante todo o processo de preparo e após 24h, a fim de identificar possíveis sinais de instabilidade (Brasil, 2004; Aulton, 2005; Coelho et al., 2018).

### 2.2.3 Resistência à Centrifugação

As formulações foram centrifugadas durante 30 minutos a 3000 rpm em centrífuga Excelsas Baby II, Fanem 206 e no final foi observado a ocorrência ou não de separação de fases (Brasil, 2004; Coelho et al., 2018).

### 2.2.4 Avaliação da Estabilidade Preliminar e Acelerada das formulações

Para avaliação da estabilidade preliminar, as formulações foram submetidas a condições extremas de temperatura (ciclos de 24h a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$  e 24h a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Os parâmetros analisados foram: características organolépticas, determinação da espalhabilidade, resistência à centrifugação, pH e tamanho de gotícula. Os testes foram realizados após a manipulação e após o ciclo gelo-degelo, em triplicata (Coelho et al., 2018).

Quanto ao teste de estabilidade acelerada, foi realizado por 90 dias, divididos em 0, 15, 30, 60 e 90 dias ( $T_0$ ,  $T_{15}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$  e  $T_{90}$ ). As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa ( $45^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ ) (acondicionadas em frascos plásticos opacos, com paredes lisas e com tampa), expostas à radiação luminosa e a temperatura ambiente (acondicionadas em embalagem de vidro transparente com paredes lisas e com tampa), analisando-se os mesmos parâmetros da estabilidade preliminar, em triplicata.

#### 2.2.4.1 Características Organolépticas

As formulações foram observadas quanto a cor, odor, homogeneidade, precipitação, sedimentação e outras mudanças perceptíveis com o passar do tempo (Ferreira, 2000; Coelho et al., 2018). Além desses critérios verificou-se quaisquer sinais que poderiam estar diferentes das formulações iniciais analisadas. Essas características foram observadas após preparação e estresse térmico, e no decorrer do estudo de estabilidade acelerada (Brasil, 2004).

#### 2.2.4.2 Determinação do pH

O pH foi determinado através de potenciômetro **previamente calibrado com soluções tampão de acetato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0** (Coelho et al., 2018). Para isso, preparou-se uma solução aquosa a 10% (p/v) e mediu-se o pH das amostras **em triplicata, correspondendo o resultado a média das três determinações.**

#### 2.2.4.3 Espalhabilidade

A determinação da espalhabilidade foi realizada em triplicata, de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991). No equipamento utilizado, uma placa molde circular, de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre uma escala milimetrada (Figura 1). A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros atingidos pela amostra, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto.

Os resultados foram expressos em espalhabilidade ( $\text{mm}^2$ ) da amostra em função do peso aplicado (gramas), de acordo com a equação abaixo, sendo que eles correspondem à média de três determinações (Brasil, 2004). Utilizou-se para o teste 10 placas, as quais variavam o peso entre 79,89 g e 309,73 g e foram aplicadas de forma decrescente perfazendo um total de 1676,5 g quando todas se apresentavam sobrepostas. A metodologia foi citada por Borghetti e Knorst (2006).

$$E_i = d^2 \cdot \pi / 4$$

Onde:

$E_i$  = espalhabilidade da amostra para um determinado peso  $i$  ( $\text{mm}^2$ );

$d$  = diâmetro médio (mm);

$\pi$  = 3,14.

**Figura 1.** Aparato para teste de espalhabilidade. Farmácia escola UFPI.



Fonte: Arquivo pessoal.

#### 2.2.4.4 Viscosidade aparente

As viscosidades aparente e relativa foram determinadas, em triplicata, com o auxílio de Viscosímetro Rotacional do tipo Brookfiel da marca Rheology Internacional, usando o “spindles 7” em quatro velocidades (6, 12, 30 e 60 rpm) o que permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade (Coelho et al., 2018).

#### 2.2.4.5 Determinação do tamanho de gotícula

A determinação do tamanho de gotícula foi realizada pela técnica de microscopia óptica, através da aferição de 100 (cem) gotículas por lâmina, em ocular micrométrica, em triplicata. Para tanto, as formulações tópicas foram dispensadas em solução de propilenoglicol e água (1:1), na proporção de uma parte de amostra para 10 partes da solução. A lâmina foi preparada e observada em microscópio óptico Olympus CX 40 com objetivas de 10, 40 ou 100 vezes e uma ocular 10 de aumento (Carvalho, 2007; Zanotti, 2017).

## **2.3 Avaliação da atividade antileishmania *in vivo* usando FBBI e FBBU**

### **2.3.1 Animais**

Foram utilizados camundongos fêmeas da espécie *Mus musculus*, linhagem BALB/c, com idade de 2 a 4 meses e peso entre 20 e 25 gramas, provenientes do Biotério Central da UFPI e mantidos no Biotério Setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais NPPM - UFPI, sob condições de controle de temperatura a  $25 \pm 1$  °C e ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos realizados neste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com animais da UFPI (CEEA/UFPI 076/2010). A eutanásia dos animais foi realizada em conformidade ao Parágrafo Único do Artigo 2º da resolução N° 714, de 20 de junho de 2002 do Conselho Federal de Medicina Veterinária – CFMV.

### **2.3.2 Manutenção das cepas de *Leishmania amazonensis***

Utilizou-se parasitos da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa IFLA/BR/67/PH-8, mantidas no NPPM/UFPI por sucessivas passagens em camundongos BALB/c e replicadas em frascos de cultivo celular com meio de cultura de Schneider's (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA), contendo 10% de soro fetal bovino – SFB (Sigma) inativado, 10.000 UI/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, mantidas em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) a  $26 \pm 1$  °C (Souza et al., 2017; Coelho et al., 2018).

### **2.3.3 Obtenção das massas de leishmania e infecção dos animais**

Foram distribuídos 50 mL de meio de Schneider's (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA) em frascos de cultivo celular, realizando-se incubação em estufa B.O.D. a  $26 \pm 1$  °C por 7 dias (Coelho et al., 2018). Após constatada a viabilidade e ausência de contaminantes, foram separadas as promastigotas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sedimento obtido foi ressuspenso em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e centrifugado nas mesmas condições. O processo foi repetido por três vezes. Por fim, a massa final foi ressuspenso em 1 mL de NaCl 0,9%, contadas em câmara de Neubauer e ajustada para a concentração desejada.

Em seguida, os animais foram tricotomizados na região da base da cauda e inoculados pela via subcutânea com  $1 \times 10^6$  promastigotas infectantes em fase estacionária, ajustados a um volume de 50 µL de inóculo.

### **2.3.4 Tratamento e avaliação da eficácia**

Os animais foram divididos em três grupos ( $n = 6$ ) de acordo com o tipo de tratamento que começou no momento do surgimento das lesões. Os nódulos ou lesões ulcerativas foram tratadas duas vezes ao dia, durante quarenta e sete dias, com 50 µL da formulação tópica em cada aplicação indicada para cada grupo, utilizando-se um multipipetador automático.

Para avaliação da eficácia, quanto ao aspecto clínico, os animais foram acompanhados antes, durante e após o tratamento através da observação diária das lesões, ou seja: presença de nódulo, de úlcera, infecção secundária, surgimento de metástases e cicatrização. Também, realizou-se o acompanhamento quantitativo pela mensuração semanal do diâmetro da lesão com um paquímetro. Como parâmetro, foi tomado o diâmetro, entre as bordas, do eixo perpendicular à linha dorsal do animal.

### **2.3.5 Análise estatística dos resultados**

Realizou-se a análise estatística dos resultados utilizando o programa gráfico *Prism 5.0*. Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média para cada grupo de experimento. Os dados estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método *Tukey's*, quando apropriado. Na

avaliação da atividade antileishmania *in vivo*, para concentração múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância *One way* seguido pelo teste de *Bonferroni*. A análise de significância foi considerada quando o  $p < 0,05$ .

### **3. Resultados e Discussão**

#### **3.1 Obtenção tecnológica e avaliação da estabilidade preliminar e acelerada de formulações tópicas (FBBI e FBBU)**

##### **3.1.1 Obtenção tecnológica das formulações tópicas**

A obtenção de formulações tópicas eficazes depende diretamente das tecnologias empregadas no processo de produção. Assim, a homogeneização por alto cisalhamento empregada do desenvolvimento das formulações tópicas contendo manteiga da semente de bacuri é adequada para a produção de sistemas emulsionadas estáveis, visto que quanto maior o incremento de energia a estes sistemas, menor o diâmetro médio das gotas produzidas e menor é a sua tendência à separação de fases (Coutinho et al, 2018).

Além disso, a seleção do veículo da formulação tem um papel de primordial importância na manutenção das características organolépticas, na estabilidade, na liberação da substância ativa e disponibilidade no local de aplicação. Para que um fármaco alcance o seu sítio de ação algumas propriedades precisam ser avaliadas: a interação entre fármaco/pele e a interação entre o veículo/pele. Quando o objetivo é a penetração deste fármaco na pele é fundamental levar em conta a interação veículo/pele, visto que o veículo pode modificar o estado de permeabilidade da pele permitindo a penetração do ativo em quantidade e velocidade adequadas ao tratamento que está sendo executado (Gobbato, 2019; De Souza, Pinto, Kerppers & Paula, 2016).

##### **3.1.2 Características organolépticas**

Segundo Brasil, 2008, a análise das características organolépticas permite analisar, de imediato, o estado da amostra em estudo com o objetivo de verificar alterações como mudança de coloração, odor, separação de fases, precipitação, dentre outras.

Na triagem inicial, as formulações não apresentaram indício de instabilidade e a manteiga de bacuri foi compatível com o veículo utilizado em FBBI e FBBU (Conforme a Tabela 2). Também, apresentaram aspecto brilhoso e cremoso, coloração amarelada, odor característico e permaneceram desta forma após o ensaio. A manipulação foi realizada em escala de bancada e os lotes mostraram-se reprodutíveis.

**Tabela 2.** Comparação entre a FLBB e as formulações contendo FBBU e FBBI nos tempos T0 (inicial) e TC (ciclo), do teste de estabilidade preliminar.

PARÂMETRO	FORMULAÇÕES					
	FLBB		FBBU		FBBI	
	T0	TC	T0	TC	T0	TC
<b>COR</b>	AM	AM	AM	AM	AM	AM
<b>ODOR</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>HOMOGENEIDADE</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>BRILHO</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>pH</b>	5,36 ± 0,04	5,56 ± 0,03	5,26 ± 0,10	5,38 ± 0,02	5,36 ± 0,04	5,28 ± 0,04
<b>ESPALHABILIDADE Ei (mm<sup>2</sup>)</b>	1586,66 ± 46,18	1500 ± 171,87	1613,33 ± 23,09	2333,66 ± 153,23	1736,33 ± 63,72	2521,66 ± 134,75
<b>VISCOSIDADE APARENTE (Pa.s)</b>	19,40 ± 0,00	19,40 ± 0,04	19,40 ± 0,02	10,85 ± 1,63	19,41 ± 0,05	10,30 ± 0,09

Legenda: AM: amarelo; EC: em conformidade; T0: tempo inicial; TC: tempo final ciclo; FBBU: formulação contendo extrato hexânico das sementes do bacuri; FBBI: formulação contendo manteiga do bacuri industrializada; FLBB: formulação livre de manteiga de bacuri.

Fonte: Autores.

### 3.1.3 Resistência a Centrifugação

A força da gravidade atua sobre os produtos fazendo com que as partículas se movam no seu interior. A centrifugação promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade (Brasil, 2011; Da Silva Schorro et al., 2020). A ocorrência de instabilidade, após o teste, é indicativa da necessidade de reformulação. As formulações que se apresentarem estáveis a esse teste, podem ser submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar (Isaac et al., 2008).

Como é observado na Tabela 2, as formulações se mantiveram estáveis à centrifugação sem qualquer indício de instabilidade de natureza física no tempo final do ciclo (TC).

### 3.1.4 Estabilidade preliminar e acelerada das formulações

Esse estudo auxilia na escolha das formulações por ser um teste realizado na fase inicial do desenvolvimento do produto e ter duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes sugerindo reformulação. Já o estudo de estabilidade acelerado tem como objetivo prever o tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (Brasil, 2004).

Para realização da estabilidade acelerada as amostras foram acondicionadas em frascos de vidro neutro, transparente com tampa, com boa vedação, preenchidos até dois terços da sua capacidade (*head space*). As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa, exposição à radiação luminosa e temperatura ambiente sem a presença de luminosidade direta.

#### **3.1.4.1 Características Organolépticas**

As formulações foram submetidas a estudos de estabilidade preliminar e acelerada e durante estes ensaios, as características organolépticas foram avaliadas. A observação dessas características visou detectar alterações que possam afetar a preparação final (Preto, 2016). A Tabela 3 identifica que não houve grandes mudanças em relação às características organolépticas como cor amarelada, brilho, aspecto cremoso e odor.

#### **3.1.4.2 Determinação do pH:**

Variações grandes de pH são um indicativo de instabilidade da formulação, considerando que ele é um parâmetro químico e pode indicar falta de estabilidade entre os ingredientes das formulações, comprometimento da eficácia e segurança do produto (Brasil, 2004).

O pH da pele humana apresenta-se levemente ácido podendo variar de 4,6 a 5,8 (Leonardi, Gaspar & Campos, 2002; Gonçalves & Campos, 2009). A pele é susceptível à variação de pH, sendo de extrema importância a sua determinação em formulações cosméticas ou dermatológicas visto que alterações na composição destas formulações pode desencadear processos alérgicos ou inflamatórios podendo provocar descamação, vermelhidão, inchaço, perda da elasticidade, ressecamento, dentre outros. Apesar da manteiga de bacuri da UFPI (BBU) apresentar um grande conteúdo lipídico não houve interferência, visto que o pH das formulações foi compatível com a pele humana e não ocorreram alterações significativas neste parâmetro após o ciclo, como mostra a Tabela 3.

**Tabela 3.** Avaliação das formulações FLBB, FBBU e FBBI nos tempos T<sub>0</sub> (inicial) e T<sub>60</sub>.

PARÂMETROS	FORMULAÇÃO												
	T <sub>0</sub> FORMULAÇÕES			FLBB T <sub>60</sub>			FBBU T <sub>60</sub>			FBBI T <sub>60</sub>			
	FLBB	BBU	BBI	T <sub>60</sub> E	T <sub>60</sub> SL	T <sub>60</sub> L	T <sub>60</sub> E	T <sub>60</sub> SL	T <sub>60</sub> L	T <sub>60</sub> E	T <sub>60</sub> SL	T <sub>60</sub> L	
<b>COR</b>	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM
<b>ODOR</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>HOMOGENEIDADE</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>BRILHO</b>	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC	EC
<b>pH</b>	5,36 ±	5,26 ±	5,36 ±	5,03 ±	5,09 ±	5,01 ±	4,92 ±	4,98 ±	4,85 ±	4,94 ±	4,98 ±	5,00 ±	
	0,04	0,10	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	
<b>ESPALHABILIDE</b>	1586,66	1613,33	1736,33	1474,33	1496,66	1497,00	2290,33	2418,66	2289,33	2317,66	2432,66	2377,33	
	± 46,18	± 23,09	± 63,72	± 70,93	± 20,20	± 39,68	± 127,00	± 87,00	± 42,50	± 9,23	± 25,40	± 196,18	
<b>VISCOSIDADE APARENTE</b>	19,4 ±	19,4 ±	19,39 ±	19,39 ±	19,42 ±	19,39 ±	19,49 ±	19,44	19,35	19,39	19,58 ±	19,54 ±	
	0,00	0,02	0,05	0,02	0,03	0,04	0,08	±0,03	±0,01	±0,01	0,015	0,02	

Legenda: AM: Amarelo; EC: Em conformidade; T<sub>0</sub>: Tempo inicial; E: Estufa; L: Presença de luz; SL: Ausência de luz; FLBB: Formulação livre de manteiga; FBBU: Formulação contendo Extrato Hexânico das sementes do bacuri; FBBI: Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada.  $p < 0,05$ . ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

Situações de estresse: estufa, sem presença de luz direta e com a presença de luz direta, do teste de estabilidade acelerada.

Fonte: Autores.

### 3.1.4.3 Espalhabilidade

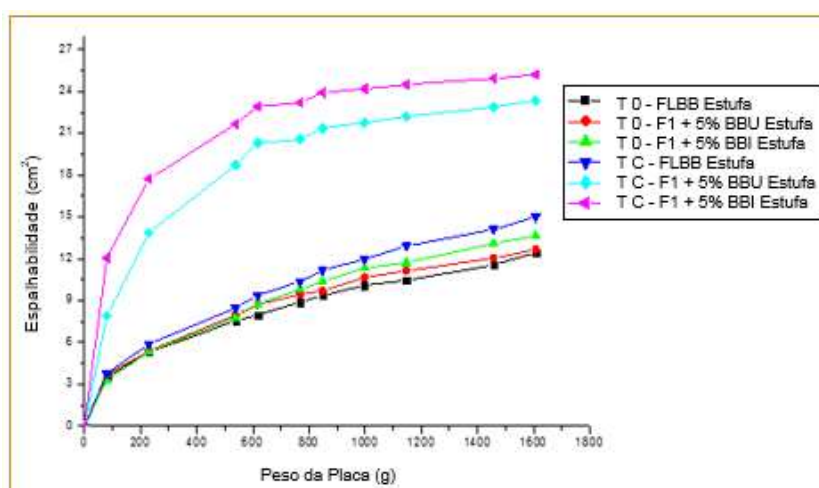
Os testes de avaliação da espalhabilidade e viscosidade possuem o objetivo de investigar potenciais alterações nas características reológicas da formulação durante o estudo. Nas formas farmacêuticas semissólidas, é importante para acompanhar as modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar ou abranger determinada área, o que pode facilitar ou dificultar a sua aplicação (Bugnotto et al., 2006).

O PLO é um organogel que apresenta como característica a termorreversibilidade. Quando são aquecidos acima de uma temperatura crítica perde a sua estrutura tornando-se mais fluido. Esse comportamento vem sendo atribuído a perda de interação entre as moléculas do gel que ao ser arrefecido a temperatura ambiente tem suas interações refeitas, devolvendo a consistência original (Murdan, 2005).

Conforme apresentado na Tabela 2, no tempo 0 (T<sub>0</sub>) não houve diferença significativa entre a FLBB e as formulações FBBU e FBBI, visto que não foram submetidas a stress. No entanto, ao comparar T<sub>0</sub> ao TC nas formulações contendo a manteiga, são evidenciadas modificações, indicando aumento da espalhabilidade, podendo ser devido a característica de termorreversibilidade do veículo. Ao comparar T<sub>0</sub> ao TC, no teste de estabilidade preliminar, a representação gráfica da espalhabilidade em função da massa aplicada (Figura 2), revelou alteração da espalhabilidade de FBBU e FBBI, pode-se inferir que as formulações sofreram alteração na sua estrutura, podendo ter ocorrido pela perda de água ou pela temperatura a que foi submetida formulação (Friedrich et al., 2007).

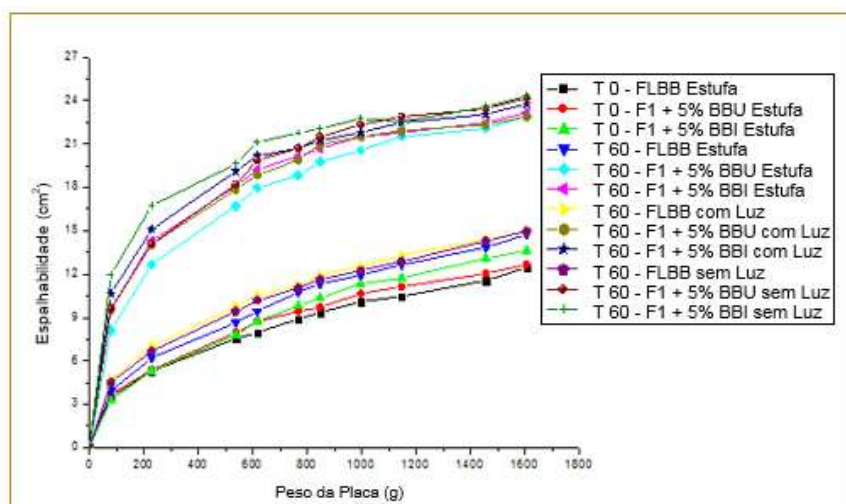
Na Figura 3, referente a avaliação da espalhabilidade no teste de estabilidade acelerada, observou-se comportamento semelhante entre as formulações contendo a manteiga e a FLBB no T<sub>0</sub>, sugerindo que se trata de uma formulação estável. No entanto, após estresse, houve alteração em relação ao grau de espalhabilidade, de FBBI e FBBU, que pode ter acontecido pela perda de água ou pela temperatura a que foi submetida formulação (Friedrich et al., 2007).

**Figura 2.** Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre a FLBB, as formulações FBBU e FBBI nos tempos T<sub>0</sub> e o TC, no teste de estabilidade preliminar.



Fonte: Autores.

**Figura 3.** Gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre a FLBB, as formulações FBBU e FBBI nos tempos T0 e T60, no teste de estabilidade acelerada.



Fonte: Autores.

#### 3.1.4.4 Viscosidade aparente

A viscosidade é a resistência que o produto oferece a deformação ou ao fluxo e depende das características físico-químicas e das condições de temperatura do material (Da Silva Schorro et al., 2020). Pode ser determinada por viscosímetro rotativo que consiste, basicamente, na medição do requerido para rodar um fuso imerso em um fluido (Brasil, 2008).

A reologia da emulsão é uma manifestação direta da interação das forças que ocorrem no sistema. As instabilidades provenientes da variação no tamanho, no número de partículas e na orientação ou migração do emulsionante durante um período de tempo podem ser detectadas por meio de alterações na viscosidade aparente do produto (Logaraj, Bhattacharya, Sankar & Venkateswaran, 2008; Mostefa, Sadok, Sabri & Hadji, 2006; Neto, 2017). A avaliação do comportamento reológico em função da temperatura é fundamental para obter informações da estabilidade física e consistência do produto.

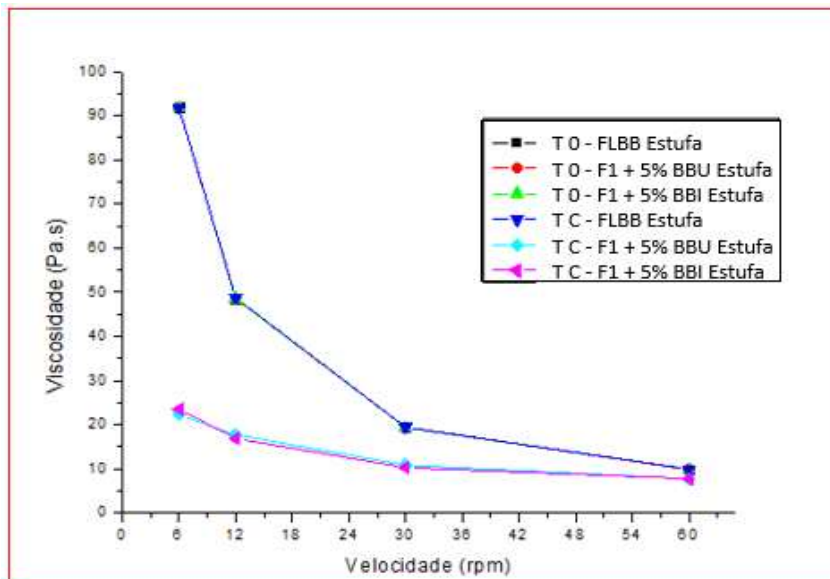
As Figuras 4 e 5 mostram que as amostras em estudo, nos tempos T0 e T60, apresentam comportamento típico de fluidos não – newtonianos possivelmente pseudoplásticos, visto que a viscosidade diminuiu com o aumento da tensão de cisalhamento aplicada e não existe relação linear entre o aumento do cisalhamento e a força aplicada sobre o fluido (Neto, 2017).

Assim, os ensaios evidenciam que as formulações poderão possuir maior espalhabilidade sobre a pele, ou seja, ao ser aplicada ela consegue se espalhar com facilidade, devido a redução da viscosidade ao se aplicar uma certa força, e ao mesmo tempo possui a propriedade de permanecer no local da aplicação sem escorrer (Carvalho et al., 2010; Siddig, Radiman, Jan & Muniandy, 2006).

Na Figura 4, foi possível observar que todas as amostras analisadas em T0 apresentaram comportamento semelhante. A FLBB, relativa ao TC, comportou-se da mesma forma que todas as formulações no T0. No entanto, as formulações que contêm BBU e BBI tiveram alterações sugerindo que BBU e BBI influenciam sobremaneira as características da formulação tópica. A Tabela 2 corrobora com esta afirmativa ao comparar-se o valor relativo da viscosidade, observando uma redução na viscosidade.

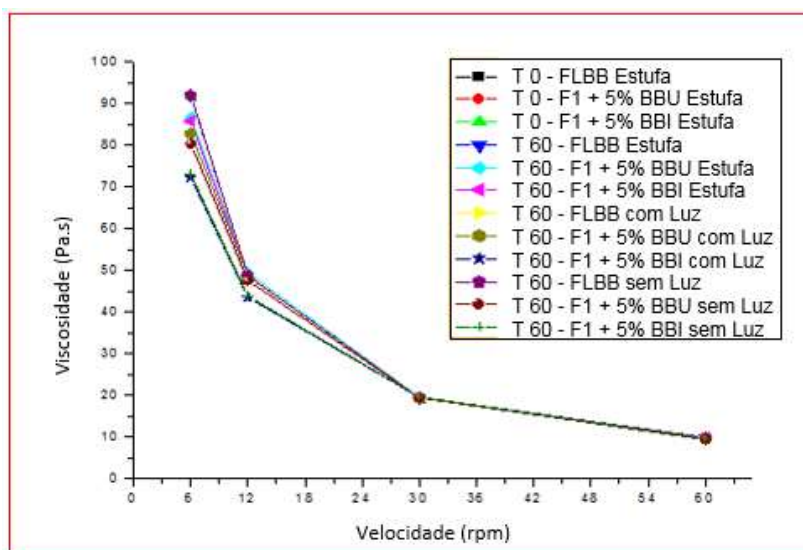
De acordo com a Figura 5, todas as amostras, nas situações analisadas, apresentaram comportamento semelhante, tanto em T0 como em T60, ou seja, comparando-se à FLBB, as formulações com BBU e BBI apresentaram-se estáveis no que diz respeito a viscosidade que não teve alterações significativas mesmo após 60 dias e presença da luz, ou seja, as amostras mantiveram seu comportamento, com fortes indicativos de comportamento pseudoplástico.

**Figura 4.** Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre a FLBB, FBBU e FBBI nos tempos T0 e TC, no teste de estabilidade preliminar.



Fonte: Autores.

**Figura 5.** Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre a FLBB, FBBU e FBBI nos tempos T0 e T60, no teste de estabilidade acelerada.



Fonte: Autores.

Este tipo de comportamento é desejado em formulações farmacêuticas. É necessário ter uma viscosidade aparente elevada a baixas tensões de cisalhamento para impedir a mobilidade da fase dispersa, sendo importante que apresentem fluxo livre quando agitados, apresentando baixa viscosidade frente a altas tensões de cisalhamento, sendo essas alterações reversíveis após certo tempo de repouso, retardando a coalescência ou a cremação (Aulton, 2005).

### 3.1.4.5 Determinação do tamanho de gotícula

A estabilidade macroscópica não implica numa perfeita formação e distribuição no tamanho das gotículas da fase interna de uma emulsão. As formulações podem apresentar a nível microscópico alterações e irregularidades que ao longo da sua produção podem causar desestabilização da preparação. Assim, as características organolépticas podem ser apreciadas, com mais rigor, ao microscópio, permitindo a determinação do tamanho das gotículas dispersas.

A análise microscópica das formulações nos diferentes tempos, ou dias de armazenamento,  $T_0$ ,  $T_{15}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$  e  $T_{90}$  é um importante aliado na determinação da estabilidade das mesmas, logo um método preciso para a determinação da estabilidade é avaliar o tamanho dos glóbulos em função do tempo (Prista, Baía & Vilar, 1995; Prista, Alves & Morgado, 2003).

As Figuras de 6 a 9 indicam que ao comparar e analisar microscopicamente as formulações, observou-se um aumento no diâmetro das partículas no final do  $T_{60}$  (60 dias). Entretanto, a alteração do tamanho de gotícula não foi suficiente para ocorrer separação de fase e comprometer a qualidade da formulação.

As formulações podem ser classificadas como sistemas emulsionados pelo tamanho médio de gotículas, visto que estão na escala micrométrica (Pavoni et al., 2020).

**Figura 6.** Microfotografia da FBBI no  $T_0$  na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



Fonte: Autores.

**Figura 7.** Microfotografia da FBBU no  $T_0$  na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



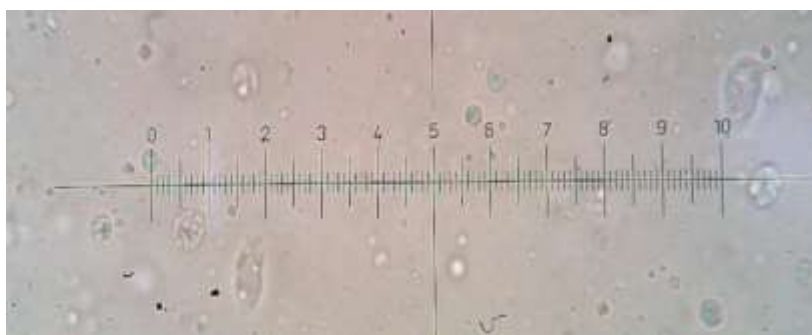
Fonte: Autores.

**Figura 8:** Microfotografia da FBBI no T<sub>60</sub> na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



Fonte: Autores.

**Figura 9:** Microfotografia da FBBU no T<sub>60</sub> na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



Fonte: Autores.

### 3.2 Avaliação da atividade antileishmania *in vivo* usando as formulações FBBI e FBBU

O início do tratamento dos animais ocorreu aproximadamente 30 dias após a infecção, no momento do surgimento dos nódulos. Foi realizada a medida inicial dos nódulos mantendo uma média de 6,82 mm. O desenvolvimento de lesões causadas pela infecção experimental com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c deu-se conforme descrito na literatura (Carvalho, 2001).

Foi observada a formação, inicial, de nódulos (Figura 10A), evoluindo para úlcera com uma espessa crosta capaz de fechar por completo toda a abertura da ferida (Figura 10B), dificultando a aplicação das formulações e favorecendo o desenvolvimento de processo infeccioso secundário. Quando este quadro se instala, observa-se facilmente a presença de material de consistência purulenta que flui facilmente, sob leve pressão, através das bordas da ferida (Figura 10C). Uma vez retirada a crosta da ferida e feita a devida assepsia, pode-se visualizar com clareza a extensão de toda a lesão (Figura 10D).

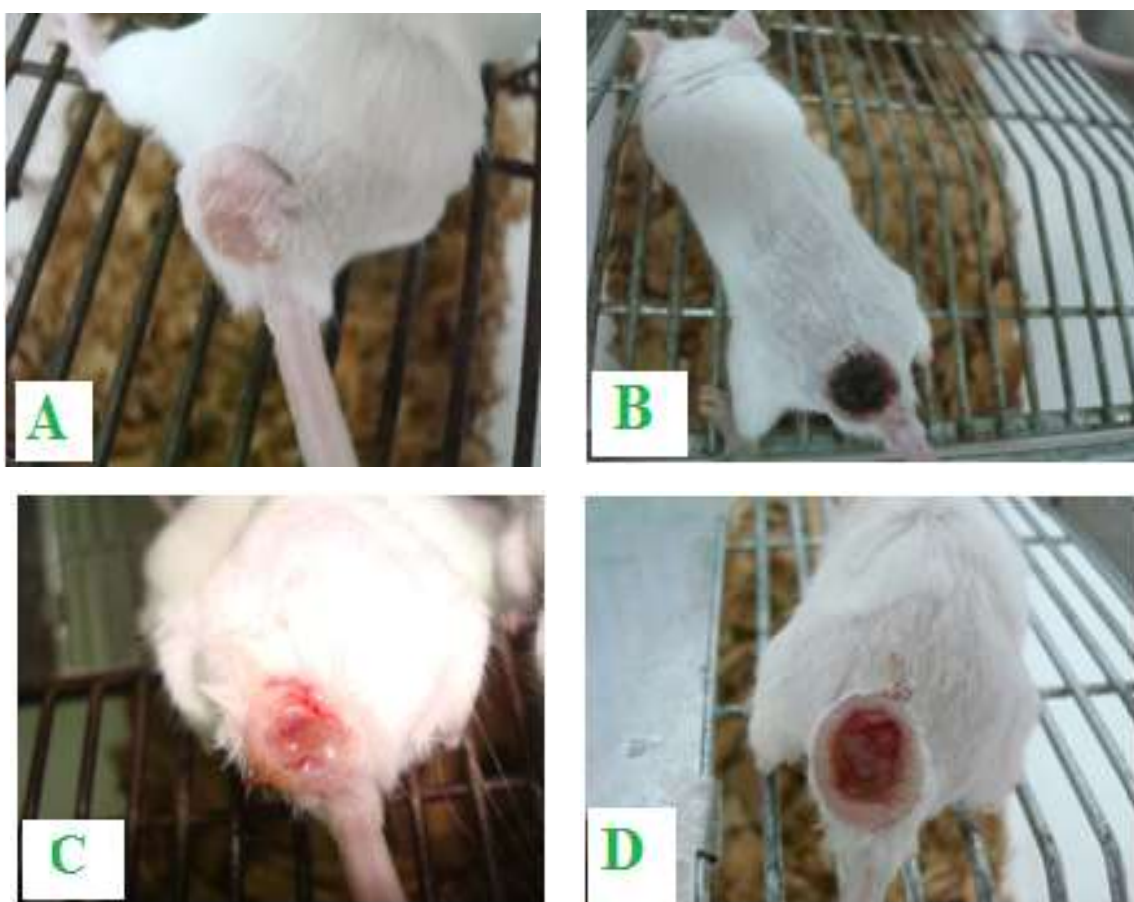
Quando submetidos ao tratamento todos os grupos evoluíram de nódulos para úlceras. As lesões ulcerativas não regrediram ao ponto de cicatrizar completamente, mas se comparadas as lesões do grupo que usou a FLBB tiveram uma redução significativa como mostra a Figura 11. Baseado em dados da literatura, em que vários autores relatam suas experiências com uso tópico de formulações para tratamento de lesões em camundongos causadas pela infecção com *L. amazonensis*, verificou-se a importância e a influência que a escolha da formulação pode representar nos resultados terapêuticos. A permeação da formulação e consequente permeação do princípio ativo são fundamentais na eficácia do tratamento.

Como já descrito anteriormente, é característica clínica da lesão ulcerada na leishmaniose cutânea em camundongos, a formação de uma espessa crosta que recobre toda a superfície da úlcera, dificultando, dessa forma, não somente a aplicação da formulação tópica terapêutica, como também a absorção das manteigas BBU e BBI. Dessa forma, a remoção da crosta e

consequente limpeza da ferida favorece o processo de cura. Procedeu-se a remoção de todas as crostas para facilitar a absorção (Carvalho, 2001).

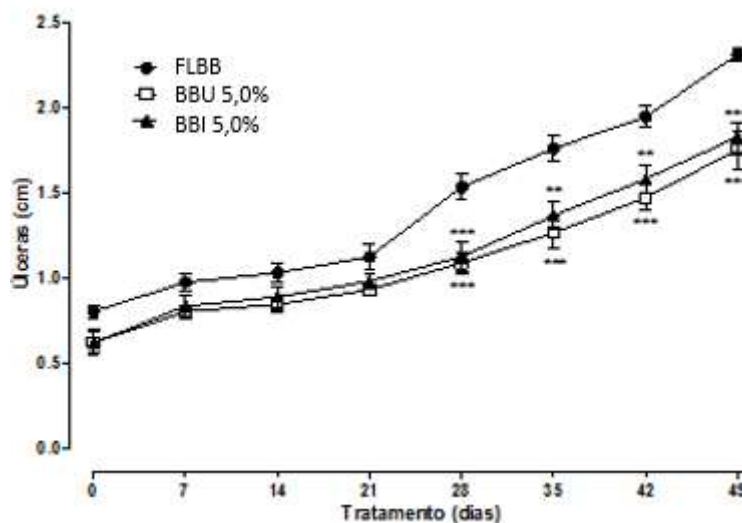
Esses resultados corroboram com estudos anteriores, como o de Costa Junior (2011a) e Lustosa et al. (2020), no qual foi demonstrado que a manteiga, por si só, tem um efeito cicatrizante e anti-inflamatório, respectivamente. Somado a isso, pela atividade demonstrada nas formas amastigotas (Lustosa et al., 2018), tem-se, de fato, um indicativo de atividade antileishmania da manteiga.

**Figura 10.** A - Formação do nódulo; B- Úlcera com crosta capaz de fechar toda a abertura da ferida; C -Úlcera com material de consistência purulenta; D- Extensão total da úlcera após assepsia.



Fonte: Autores.

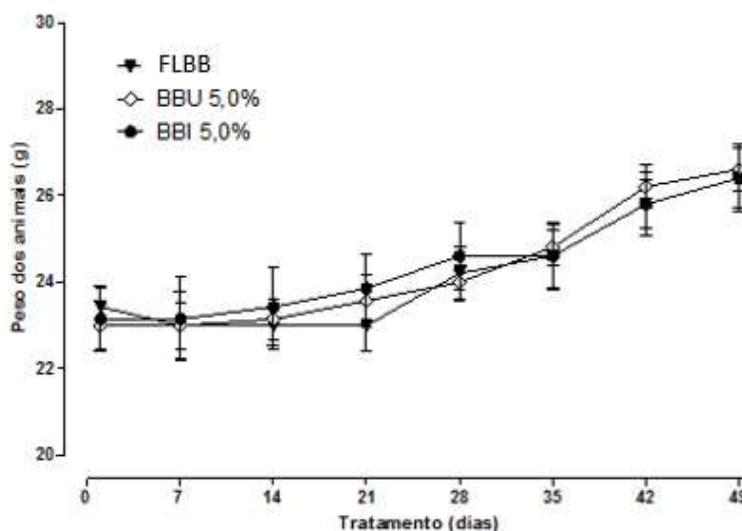
**Figura 11.** Gráfico da relação entre o tamanho das úlceras e os dias de tratamento das formulações FLBB; BBI e BBU.



Fonte: Autores.

Outro parâmetro observado foi a relação entre o ganho de peso dos animais durante os dias de tratamento. A Figura 12 mostra que houve ganho sugerindo que não houve maior comprometimento das funções vitais dos animais.

**Figura 12.** Gráfico da relação entre o ganho peso dos animais e dos dias de tratamento das formulações FLBB, FBBI e FBBU.



Fonte: Autores.

#### 4. Conclusão

Foi possível o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, a partir das manteigas do bacuri, de forma reprodutível e com ótimos resultados de estabilidade físico-química. As formulações apresentaram efeito terapêutico significativo comparadas à FLBB, indicando grande potencial da *Platonia insignis* Mart. para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Tendo em vista o potencial terapêutico identificado para a formulação proposta, bem como o resultado satisfatório de estabilidade físico-química, tem-se grande interesse em aprofundar e aprimorar o estudo em torno da *Platonia insignis* Mart., de forma a potencializar o aproveitamento e aplicabilidade desta formulação no tratamento de leishmaniose cutânea. Dentre as potenciais linhas de interesse, considera-se a possibilidade de associar a formulação desenvolvida a nanossistemas de uso tópico.

## Agradecimentos

Os autores expressão agradecimento ao apoio fornecido pela Farmácia Escola da Universidade Federal do Piauí, e à empresa *Amazon Oil* Indústria e Comércio Ltda, que gentilmente cedeu a Manteiga Virgem de Semente de Bacuri/ Bacuri Butter para realização dos testes.

## Referências

- Aulton, M. E. (2005). Delineamento de formas farmacêuticas. (2a ed.). Artmed.
- Bentley, M. V. L., Marchetti, J. M., Ricardo, N., Ali-Abi, Z., & Collett, J. H. (1999). Influence of lecithin on some physical chemical properties of poloxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 193(1), 49-55.
- Borghetti, G. S., & Knorst, M. T. (2006). Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas*, 42 (4), 531-7.
- Brasil. (2004). Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. <http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cosmeticos.pdf>
- Brasil. (2008). Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008 - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF. Diário Oficial da União, <http://www.sindusfarma.org.br/informativos/BBPAF03808.doc>.
- Brasil. (2011). Formulário Nacional da Farmacopéia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [https://www.crfmg.org.br/farmacoeutico/download/forum\\_seminario/forum\\_magistral\\_fnfb.pdf](https://www.crfmg.org.br/farmacoeutico/download/forum_seminario/forum_magistral_fnfb.pdf)
- Brasil. (2017). Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde. 1-191.
- Bugnotto, C., Soares, G., Laporta, L.V., Alves, M. P., Schmidt, C. A., & Limberger, J. B. (2006). Estudo de Estabilidade de Formulações Tópico contendo Própolis. *Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde*, Santa Maria, 7 (1), 1-12.
- Carvalho, A. L. M. (2007). Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais contendo cetoprofeno. Dissertação de Mestrado 115f., Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco.
- Carvalho, F. A. D. A. (2001). Tratamento tópico da Leishmaniose cutânea experimental- Avaliação de diferentes formulações contendo sulfato de paramomicina e da associação com imunoterapia. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.
- Carvalho, F. C., Barbi, M. S., Sarmiento, V. H. V., Chiavacci, L. A., Netto, F. M., & Gremiao, M. P. D. (2010). Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. *J. Pharmacy and Pharmacol.* 62, 430-439.
- Coêlho, E. S., Lopes, G. L. N., Pinheiro, I. M., de Holanda, J. N. P., de Moraes Alves, M. M., Nogueira, N. C., & Carvalho, A. L. M. (2018). Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) for the treatment of Cutaneous Leishmaniasis: characterisation and in vitro assays. *Drug development and industrial pharmacy*, 44(10), 1713-1723.
- Costa Junior, J. S. (2011a). Análise Fitoquímica e Toxicológica das Sementes de *Platonia insignis* Mart (Bacuri). Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brasil.
- Costa Júnior, J. S., de Almeida, A. A., Ferraz, A. B. F., Rossatto, R. R., Silva, T. G., Silva, P. B., Militão, G. C., Citó, A. M. G. L., Santana, L. C., Carvalho, F. A. A., & Freitas, R. M. (2013). Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. *Natural Product Research*, 27 (4-5): 470-4.
- Coutinho, V. P., S. Júnior, D. B. S., Santos, N. G. O., Silva, C. A. S., & Santana, R. C. (2018) Efeito da velocidade de homogeneização nas propriedades de emulsões cosméticas. *The Journal of Engineering and Exact Sciences*, 4(2).
- Da Silva Schorro, J. R., da Silva, T. P., dos Santos Teodoro, E. I., Chierrito, D., Teston, A. P. M., de Mello, J. C. P., & de Medeiros Araújo, D. C. (2020). Influência de diferentes ativos em formulações de produtos dermocosméticos com fator de proteção solar/Influence of different actives on formulations of dermocosmetic products with solar protection factor. *Brazilian Journal of Development*, 6(5), 29741-29754.
- De Souza, C. C., Pinto, G. I., Kerppers, I. I., & de Paula, D. (2016). Desenvolvimento e caracterização de Formulação Tópica de Extrato de Uvarana para Tratamento de Feridas. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 13(4), 191-200.

- Embrafarma Produtos Químicos e Farmacêuticos. (2010). Gel transdérmico (PLO), farmacotécnica aplicada. [Monografia]. Retrieved in february 5, 2021, from <https://www.yumpu.com/pt/document/read/42351182/gel-transdacrmico-plo- farmacotaccnica-aplicada1-embrafarma>.
- Ferreira, A. D. O. (2000). Guia prático da farmácia magistral. In *Guia prático da Farmácia Magistral* (2a ed.). (pp. 320-320). Juiz de Fora.
- Friedrich, M., Primo, F. T., Funck, J. A. B., Laporta, L. V., Alves, M. P., Bittencourt, C. F., & Escarrone, A. L. V. (2007). Avaliação da estabilidade físico-química de creme não iônico inscrito no Formulário Nacional. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(4), 558.
- Gobbato, C. A. R. S. (2019). Farmacocinética, eficácia e segurança de uma nova formulação tópica nanotecnológica de lidocaína 25 mg/ge prilocaína 25 mg/g em pacientes adultos e pediátricos. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Cidade Universitária "Zeferino Vaz", Distrito de Baarão Geraldo, Campinas, SP, Brasil.
- Gonçalves, G. M. S., & Campos, P. M. B. G. M. (2009). Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(1), 1-10.
- Isaac, V. L. B., Cefali, L. C., Chiari, B. G., Oliveira, C. C. L. G., Salgado, H. R. N., & Correa, M. A. (2008). Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*, 29(1), 81-96.
- Knorst, M. T. (1991). Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. *Compositae* (marcela). Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.
- Leonardi, G. R., Gaspar, L. R., & Campos, P. M. (2002). Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *Anais brasileiros de dermatologia*, 77(5), 563-569.
- Logaraj, T. V., Bhattacharya, S., Sankar, K. U., & Venkateswaran, G. (2008). Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. *Food Chemistry*, 106(3), 937-943.
- Lustosa, A. K. M., Silva, F. V., Silva, E. R. S., Mendes, A. N., Sousa, L. R., Carvalho, A. L., & Citó, A. M.D. G. L. (2020). Lecithin-based organogel for an industrialized butter from *Platonia insignis* Mart. seeds and its anti-inflammatory potential: Formulation and preclinical studies.
- Lustosa, A. K. M. F., Bezerra, É. A., Rodrigues, K. A. F., Amorim, L. V., Lima-Neto, J. S., Araújo, B. Q., Costa Junior, J. S., Mendes, A. N., Carvalho, F. A. A., Arcanjo, D. D. R., & Citó, A. M. D. G. L. (2018). Efeito antileishmania de sementes de frutos de *Platonia insignis* contra formas amastigotas internalizadas por macrófagos de *Leishmania amazonensis*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 23 (2).
- Moraes, S. L. D., & Rezende, M. O. O. (2004). Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. *Química Nova*, 27(5), 701-705.
- Morais, L. R. B. (2012). Química de oleaginosas: valorização da biodiversidade amazônica. Tradução: Ekkhard Gutjahr. Câmara Brasileira do Livro. p.31
- Mostefa, N. M., Sadok, A. H., Sabri, N., & Hadji, A. (2006). Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modelling. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(3), 211-218.
- Murdan, S. A. (2005). A review of pluronic lecithin organogel as a topical and transdermal drug delivery system. *Hospital Pharmacist*, 12, 267-270.
- Neto, D. M. C. (2017). Estudo reológico de emulsões água em óleo de petróleo pesados. Dissertação de Mestrado, *Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Espírito Santo*.
- Neves, L. O., Talhari, A. C., Gadelha, E. P. N., Silva Júnior, R. M. Guerra, J. A. O., & Ferreira, L. C. L. (2011). A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol*, 86(6):1092-101.
- Pavoni, L., Perinelli, D. R., Bonacucina, G., Cespi, M., & Palmieri, G. F. (2020). Uma visão geral das micro e nanoemulsões como veículos para óleos essenciais: Formulação, preparação e estabilidade. *Nanomateriais*, 10 (1), 135.
- Preto, V. L. S. M. (2016). Desenvolvimento de microemulsões para aplicação tópica. Tese de Mestrado, Escola Superior de Tecnologia e de Gestão do Instituto Politécnico de Bragança.
- Prista, L. N., Baía, M. F. C. G., & Vilar, E. (1995). *Dermofarmácia e cosmética*. Associação Nacional das Farmácias.
- Prista, N. L., Alves, C. A., Morgado, R. Tecnologia farmacêutica. (6a ed.), Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.
- Siddig, M. A., Radiman, S., Jan, L. S., & Muniandy, S. V. (2006). Comportamentos reológicos das fases hexagonal e lamelar do surfactante glucocona (APG). *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 276 (1-3), 15-21.
- Souza, A. C., Alves, M. M. M., Brito, L. M., Oliveira, L. G. C., Costa Sobrinho-Junior, E. P., Costa, I. C. G., Freitas, S. D. L., Rodrigues, K. A. F., Chaves, M. H., Arcanjo, D. D. R., & Carvalho, F. A. A. (2017). *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. *Evid Based Complement Alternat Med*. 3126458. 10.1155 / 2017/3126458
- Vasconcelos, J. M., Gomes, C. G., Sousa, A., Teixeira, A. B., & Lima, J. M. (2018). Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *RBAC*, 50(3), 221-7.
- Zanotti, M. A. G. Propriedades de emulsões óleo em água formuladas com emulsificantes reconfiguráveis através de alterações no PH. 2017. 89 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Centro Universitário FEI, São Bernardo do Campo, 2017