



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS UNIVERSITÁRIO MINISTRO PETRÔNIO PORTELLA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL TÓPICO À BASE DE ANFOTERICINA B E MANTEIGA DE BACURI (*Platonia insignis* Mart.) PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA: ESTUDOS *in vitro* e *in vivo*.

ELVILENE DE SOUSA COELHO

TERESINA - PI
FEVEREIRO / 2018

ELVILENE DE SOUSA COELHO

DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL TÓPICO À BASE DE ANFOTERICINA B E MANTEIGA DE BACURI (*Platonia insignis* Mart.) PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA: *ESTUDOS in vitro e in vivo*.

Defesa da Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

**TERESINA - PI
FEVEREIRO/2018**

Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde
Serviço de Processamento Técnico

C672d Coêlho, Elvilene de Sousa.
Desenvolvimento de emulgel tópico à base de anfotericina B e manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) para o tratamento de leishmaniose cutânea : estudos *in vitro* e *in vivo*. / Elvilene de Sousa Coêlho. -- 2018.
116 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2018.
“Orientação : Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho.”
Bibliografia

1. Anfotericina B. 2. Cicatrização. 3. Leishmaniose cutânea. 4. Emulgel.
5. *Platonia insignis* Mart. I. Carvalho, Fernando Aécio de Amorim. II. Título.

CDD 615.1

ELVILENE DE SOUSA COELHO

DESENVOLVIMENTO DE EMULGEL TÓPICO À BASE DE ANFOTERICINA B E MANTEIGA DE BACURI (*Platonia insignis* Mart.) PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA: ESTUDOS *in vitro* e *in vivo*.

Defesa da Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Curso de Farmácia da Universidade Federal do Piauí, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27/02/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho (Orientador)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - CCS/UFPI

Prof^a. Dra. Marcília Pinheiro da Costa (Avaliadora interna)

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - CCS/UFPI

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho (Avaliador interno)

Departamento de Bioquímica e Farmacologia - CCS/UFPI

Prof^a Dra. Giovana Damasceno Sousa (Avaliadora externa)

Departamento de Farmácia - NUDFAC/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITOR

Prof^ª. Dra. Nadir do Nascimento Nogueira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^ª. Dra. Regina Lúcia Ferreira Gomes

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Viriato Campelo

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof. Dr. Luciano da Silva Lopes

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Prof Dr. André Luis Menezes de Carvalho

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Cloves Barbosa Coêlho e Deuselena de Sousa Coêlho**, que dignamente me apresentaram à importância da família e ao caminho da honestidade, persistência, amor e humildade; às minhas queridas irmãs, **Chyntia de Sousa Coêlho e Stella Dayane de Sousa Coêlho**, pelo carinho, incentivo e por sempre acreditarem em mim, e à **madrinha Deusacy Barbosa**, pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Em especial, dedico à minha amada vovó Elvina (*in memoriam*), por ser meu exemplo de professora admirada, respeitada, por ter sido uma mulher guerreira sem perder a delicadeza e a essência feminina, mostrando-me sempre que existe um Deus Maior a nos conduzir e nos proteger. Com você, aprendi a acreditar e a buscar, aprendi a pedir e esperar, respeitar, ter humildade e, principalmente, que sempre podemos compartilhar. Sua organização me acompanha pela vida. Sei que hoje você é luz a me guiar.

DEDICATÓRIA ESPECIAL

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luis Menezes Carvalho e ao co-orientador, Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho, pelo exemplo de profissionais éticos e mestres, os quais me acolheram e me proporcionaram o benefício do conhecimento e da pesquisa. Isaac Newton diz: *“Se enxerguei mais longe, foi por que me apoiei sobre os ombros de gigantes”*. Obrigada por todo apoio, confiança e incentivo ao longo desta jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu Deus, por estar sempre ao meu lado e me fazer sentir Sua presença, principalmente nos momentos mais difíceis.

À toda linda e maravilhosa família que Deus me concedeu, a qual foi base para a minha construção espiritual, significando segurança e a certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Mamãe, obrigada por me conduzir sempre no caminho da verdade, me ensinar a ter metas, à sempre buscar, e principalmente, por me orientar a estudar por sede de conhecimento e não por mera obrigação. Agradeço à todos os tios e tias, primos e primas, avós e à todos os entes queridos, pelo carinho constante e por sempre se fazerem presentes.

À grande amiga Gleiziane Sousa, a precursora de tudo, que exemplifica a ética e a competência profissional, a dedicação e o aprimoramento contínuos, à Jaqueline Mesquita e Luciane Alves, pelo incentivo e por sempre acreditarem na minha capacidade “Vai Elvis”.

Aos amigos e colegas de trabalho que de certa forma fizeram parte desta conquista. Em especial agradeço à minha grande amiga Conceição Ferreira e ao Dr. Erasmo, pela presença e apoio constantes, essenciais em mais esta etapa da minha vida.

À Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes, à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí, na pessoa do Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira, e a todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF) da Universidade Federal do Piauí pelo empenho em compartilhar seus conhecimentos.

Aos colegas de turma do PPGCF, pelos momentos agradáveis e também pelos difíceis e superados, grata por conviver com cada um de vocês. Agradeço em especial à Grasielly, pelo exemplo de garra, inteligência, humildade, pelas risadas gostosas e por ser esse anjo que Deus colocou em minha vida. Obrigada por tudo. Roberta, não tenho palavras para agradecer o que você fez por mim. Incansáveis ligações e sem o seu apoio esse projeto teria sido muito mais difícil. Que Deus possa retribuir tanta humildade e generosidade.

À minha família científica da Farmácia Escola, em especial as minhas queridas ICs (Natália e Naiane), com as quais aprendi muito; ao estagiário que tornou minhas tardes mais leves e produtivas (Allyson Martins); a Gláucia Laís, exemplo de humildade, inteligência, dedicação e aprimoramento contínuo; Iluska, por estar sempre pronta a ajudar e com um sorriso no rosto; Sr. Carlos, por sua paciência, compreensão e por suas músicas entoadas com assovios

as quais nos transmitem alegria. Espero encontrá-los nos degraus da vida. Sentirei saudades. Que Deus ilumine sempre vossos caminhos com muito sucesso, paz e prosperidade.

À Michel Muállen, pela solicitude, prontidão e grande aprendizado e à sua esposa, pela compreensão nos momentos de ausência dedicados a este projeto. Muito obrigada a toda brilhante equipe que compôs o experimento *in vivo*: Jéssica, Kayo, Layanne, Felipe, Ingrid, Valéria, Lucas e Rodolfo. Que Deus os abençoe e lhes concedam grandes realizações.

À equipe do biotério, em especial ao Sr. Carlos, pelo exemplo de funcionário ético, responsável, dedicado e, principalmente, pelos ensinamentos e grande ajuda.

Larissa e Gisely, eu não poderia deixar de falar em vocês e dizer o quão sou grata pelo que fizeram por mim, não tem preço. Gratidão.

Dizem que um bom professor deixa em cada um dos seus alunos uma marca indestrutível, um pedacinho do seu 'eu' e da sua sabedoria. Professora Marcia Rizzo, você fortaleceu esta opinião da qual eu compartilho. Muito obrigada por sua dedicação, empenho e por todo o carinho.

Aos meus queridos e seletos amigos e amigas, por fazerem a vida mais leve e feliz; e à todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“O segredo consiste em preparar com
antecipação os dias futuros, semeando hoje
o que anelamos colher amanhã.”

González Pecotche

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
TABELAS	20
RESUMO.....	21
ABSTRACT	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	25
2.1. Objetivo Geral.....	25
2.2. Objetivos Específicos.....	25
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	26
3.1. Leishmaniose Tegumentar Americana.....	26
3.2. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana.....	28
3.3. Tratamento tópico e Combinação de Fármacos para Leishmaniose Tegumentar Americana....	30
3.4. <i>Platonia insignis</i> Mart.....	31
3.5. Emulgeis.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
Capítulo I: Emulgel tópico à base de anfotericina B e manteiga de bacuri (<i>Platonia insignis</i> Mart.) para o tratamento de Leishmaniose Cutânea: caracterização e ensaios <i>in vitro</i>.....	39
RESUMO.....	40
ABSTRACT	41
1. INTRODUÇÃO	42
2. MATERIAL E MÉTODOS	44
2.1. Material	44
2.1.1. Reagentes e Insumos	44
2.1.2. Equipamentos	44
2.2. Métodos	44
2.2.1. Desenvolvimento Tecnológico das Formulações.....	44

2.2.1.1. Preparação da Fase de Gel	44
2.2.1.2. Preparação do Emulgel	45
2.2.1.3 Design experimental	45
2.2.2. Caracterização Físico-química e Estabilidade Preliminar	47
2.2.2.1. Características Organolépticas	47
2.2.2.2. Teste de Centrifugação	47
2.2.2.3. Estabilidade Preliminar	47
2.2.2.4. Determinação do Tamanho de Gotículas	47
2.2.2.5. Determinação do pH	48
2.2.2.6. Determinação da Condutividade Elétrica	48
2.2.2.7. Determinação da Viscosidade	48
2.2.2.8. Determinação da Espalhabilidade	49
2.2.2.9. Determinação do teor de Anfotericina B por espectrofotometria no ultravioleta (UV – VIS)	49
2.2.3. Ensaio de liberação <i>in vitro</i>	50
2.2.3.1. Ensaio de Liberação <i>in vitro</i> Utilizando Células de Difusão do tipo Franz	50
2.2.4. Avaliação da Atividade Antileishmania <i>in vitro</i>	51
2.2.4.1. Obtenção de Células e Parasitos	51
2.2.4.2. Atividade Antileishmania das formas Promastigotas de <i>L. major</i>	52
2.2.5. Determinação da Citotoxicidade	52
2.2.5.1. Citotoxicidade sobre Macrófagos e Índice de Seletividade (IS)	52
2.2.6. Análise Estatística	53
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	53
3.1. Planejamento Fatorial.....	53
3.2. Características Organolépticas	53
3.3. Resistência à Centrifugação	54
3.4 Estabilidade Preliminar	55
3.5. Microscopia.....	58
3.6. Determinação do pH.....	59
3.7. Condutividade Elétrica.....	60
3.8. Determinação da Viscosidade	61
3.9. Espalhabilidade	63
3.10. Determinação da Anfotericina B por Espectrofotometria no Ultravioleta.....	64
3.11. Cinética de Liberação <i>in vitro</i>	66
3.12. Diagrama de Pareto	71
3.13. Atividade Antileishmania sobre formas Promastigotas de <i>L. major</i>	75

3.14. Citotoxicidade sobre Macrófagos e Índice de Seletividade (IS)	78
4. CONCLUSÃO.....	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
Capítulo II: Avaliação da potencial atividade antileishmania in vivo, de Emulgel de Anfotericina B e manteiga de bacuri (Platonia insignis Mart.) no tratamento tópico da leishmaniose cutânea em modelos murinos	91
RESUMO.....	92
ABSTRACT	93
1. INTRODUÇÃO	94
2. MATERIAL E MÉTODOS	95
2.1. Considerações Éticas.....	95
2.2. Avaliação da Atividade Antileishmania <i>in vivo</i>	95
2.2.1. Animais	95
2.2.2. Cepa de <i>Leishmania major</i>	95
2.2.3. Obtenção das massas de L. major para infecção	96
2.2.4. Infecção dos Animais	96
2.2.5. Tratamento	97
2.2.6. Avaliação da Eficácia do Tratamento	97
2.2.6.1. Aspecto Físico.....	97
2.2.6.2. Aspecto Clínico.....	98
2.2.6.3. Acompanhamento da Lesão Ulcerativa.....	98
2.2.7. Eutanásia	98
2.2.8. Avaliação Laboratorial.....	99
2.2.9. Carga Parasitária	99
2.2.10 Análise Histopatológica	100
2.2.11 Análise Estatística	100
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES	100
4. CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

µg - Micrograma

ALT - Alanina aminotransferase

AmB - Anfotericina B

AMP - Aminometil Propanol

ANOVA - Análise de Variância

BOD - demanda bioquímica de oxigênio

CRE - Creatinina

d - Diâmetro médio

DICQ - Sistema Nacional de Acreditação

Ei - Espalhabilidade da amostra

h - Horas

K⁺ - Potássio

LC - Leishmaniose cutânea

LTA - Leishmaniose Tegumentar Americana

Mb - Manteiga de bacuri

mg - Miligrama

mL - Mililitro

mm - Milímetro

MPI - Manteiga da *Platônia insignis* Mart.

MTT - Sal tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2- il)-2,5-difeniltetrazólio bromide]

MbAmB - Manteiga de Bacuri e Ambotericina B

MS - Ministério da Saúde

NaCl - Cloreto de Sódio

OMS - Organização Mundial da Saúde

p/p - peso/peso

Pa - Pascal

PALC - Programa de Acreditação de Laboratórios Clínicos

pH - Potencial Hidrogeniônico

q.s. - Quantidade suficiente

q.s.p. - Quantidade suficiente para

r - Coeficiente de determinação

rpm - Rotações por minuto

s - Segundo

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde

UI - Unidade Internacional

URE - Ureia

USA - *United States of American*

USP - *United States Pharmacopeia*

UV - Ultravioleta

Vis - Visível

WHO - *World Health Organization*

ϵ - Absortividade molar

® - Marca registrada

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo Vital de <i>Leishmania sp.</i>	26
Figura 2: Estrutura química da anfotericina B.	29
 Capítulo I:	
Figura 3: Apresentação esquemática da preparação do emulgel de AmB e Mb.....	46
Figura 4: Viscosímetro rotativo digital do tipo Brookfield, usado para realização do teste de viscosidade das formulações.	48
Figura 5: Teste de espalhabilidade das formulações.....	49
Figura 6: Agitador magnético e células de difusão <i>in vitro</i> , tipo Franz.	51
Figura 7: Ilustração dos componentes da uma célula de difusão, tipo Franz, usados para realização de testes de cinética de liberação.....	51
Figura 8: Aspecto visual das formulações do emulgel de AmB e Mb.	54
Figura 9: Formulações de emulgel de AmB e Mb, após teste de resistência à centrifugação.....	55
Figura 10: Aspecto visual das formulações de emulgel de AmB e Mb, após teste do ciclo gelo-degelo.	56
Figura 11: Aspecto visual Condutividade média das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo, que apresentaram separação de fases.	57
Figura 12: Imagem da microscópica das formulações de emulgel de AmB e Mb, em objetiva de 100x.	58
Figura 13: O pH médio das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * p <0,05; ** P <0,01; *** p <0,001.....	59
Figura 14: Condutividade média das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * p <0,05; ** P <0,01; *** p <0,001.	60

Figura 15: Viscosidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F1 - F4), antes o ciclo gelo-degelo.....	62
Figura 16: Viscosidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F5 - F8), antes e após ciclo gelo-degelo.	62
Figura 17: Espalhabilidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F1- F4), antes e após o ciclo gelo-degelo, em diferentes forças aplicadas.	63
Figura 18: Espalhabilidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F5- F8), antes e após o ciclo gelo-degelo, em diferentes forças aplicadas.	64
Figura 19: Curva de calibração da AmB nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µg/mL, em metanol.	65
Figura 20: Teor médio da AmB nas formulações de emulgel de AmB e Mb (% p/p), antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * p <0,05; ** P <0,01; *** p <0,001.....	66
Figura 21: Perfil de liberação da Anfotericina B a partir das formulações de emulgel de AmB e Mb.....	68
Figura 22: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a condutividade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.....	72
Figura 23: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para o pH das formulações de Emulgel de AmB e Mb.	72
Figura 24: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a espalhabilidade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.....	73
Figura 25: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a viscosidade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.....	74
Figura 26: Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2 ³ obtido para a propriedade de fluxo de liberação (linha vertical define 95% do intervalo de confiança) das formulações de Emulgel de AmB e Mb.....	75
Figura 27: Atividade antileishmania do Controle Negativo sobre as formas promastigotas de <i>L. major</i> . Os parasitas (1 x 10 ⁶) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias de AmBc utilizada como controle positivo na concentração de 2 µg/mL. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as *p<0.05 vs. controle; **p<0.01 vs. controle; ***p<0.001 vs. controle.	76

Figura 28: Atividade antileishmania da Mb sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.77

Figura 29: Atividade antileishmania da MbAmB 1% sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.77

Figura 30: Atividade antileishmania da MbAmB 3% sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.78

Figura 31: Efeitos citotóxicos de Controle Negativo contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.79

Figura 32: Efeitos citotóxicos de Mb contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.79

Figura 33: Efeitos citotóxicos de AmB 1% contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.80

Figura 34: Efeitos citotóxicos de AmB 3% contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.80

Capítulo II:

Figura 35: Camundongos BALB/c, infectados com <i>L. major</i>	95
Figura 36: Infecção dos camundongos BALB/c com <i>L. major</i> , na base da calda.	96
Figura 37: Adesão do emulgel de AmB na pele dos camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	97
Figura 38: Mensuração do tamanho das lesões com paquímetro digital em camundongos BALB/c, infectados com <i>L. major</i>	98
Figura 39: Colheita de sangue realizada em de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. major</i> e tratados com emulgeis de AmB e <i>Platonia insignis</i> Mart., e em um grupo controle de animais não infectados.....	99
Figura 40: Apresentação visual de camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , submetidos a diferentes tipos de tratamentos, . Utilizou-se emulgel de AmB 1%, emulgel de AmB 3%, manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5% e Controle negativo.....	102
Figura 41: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se um placebo (Controle Negativo) – emulgel.....	103
Figura 42: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se Controle negativo (placebo) – emulgel.	103
Figura 43: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5%.....	104
Figura 44: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se emulgel de AmB 1% com manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5%.	105
Figura 45: Efeito do tratamento sobre o tamanho médio das lesões em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de <i>L. major</i> , utilizando-se emulgel de AmB 3% com Manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5%.....	105

Figura 46: Quantificação de parasitos recuperados de camundongos BALB/c infectados com *L.major*. Média do número de parasitos viáveis recuperados do sítio de infecção da borda da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. major*. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni e as diferenças foram consideradas significativas com $p < 0,05$ **107**

Figura 47: Avaliação referente ao peso dos camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*, durante e após o tratamento. Foram submetidos a diferentes tipos de tratamentos utilizando-se emulgel de AmB 1%, emulgel de AmB 3%, manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5% e Controle negativo (placebo). **108**

Figura 48: Avaliação do dano renal e/ou hepática em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*, submetidos a diferentes tipos de tratamentos, onde utilizou-se emulgel de AmB 1%, emulgel de AmB 3%, manteiga de bacuri 10% e ácido oléico 5% e placebo. Testes realizados no equipamento Vittros 5.600 Johnson e Johnson... **109**

Figura 49: Avaliação da concentração de glóbulos vermelhos, através do hematócrito, em camundongos BALB/c, inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major*, submetidos a diferentes tipos de tratamento, onde utilizou-se emulgel de AmB 1%, emulgel de AmB 3% , manteiga de bacuri 10%, ácido oléico 5% e Controle negativo (placebo).... **110**

Figura 50: Análise histopatológica das lesões de pele de camundongo BALB/c inoculados com 1×10^6 promastigotas infectantes de *L. major* nos grupos não tratados (controle/B) e tratados com emulgel de Mb (C), MbAmB 1% (D) e MbAmB 3% (E e F) e no grupo não infectado (A). **111**

TABELAS

Tabela 1: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para obtenção das formulações de anfotericina B e manteiga da semente do bacuri (<i>Platonia insignis</i> Mart.)... 45	45
Tabela 2: Planejamento fatorial 2^3 para otimização das propriedades de fluxo das formulações de emulgel de AmB e Mb..... 46	46
Tabela 3: Características organolépticas das formulações de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo. 56	56
Tabela 4: Teor médio da AmB nas formulações de emulgel de AmB e Mb (% p/p), antes e após ciclo gelo-degelo. 65	65
Tabela 5: Modelos matemáticos comumente utilizados para descrever as curvas de dissolução de substâncias ativas. 67	67
Tabela 6: Coeficientes de determinação, coeficiente de liberação e resíduo do quadrado médio para os diferentes modelos cinéticos de liberação das formulações de emulgel de AmB e Mb..... 69	69
Tabela 7: Fluxo de liberação de AmB a partir das formulações de emulgel de AmB e Mb... 70	70
Tabela 8: Quantidade de AmB liberada a partir das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, em 6 horas. 71	71
Tabela 9: Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para CN, AmBc, Mb, MbAmB 1% e MbAmB 3%..... 76	76

RESUMO

A Leishmaniose cutânea (LC) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos. Os tratamentos convencionais, embora eficazes, apresentam elevada toxicidade, com muitos efeitos adversos e restrições. Neste contexto, muita ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas. O objetivo deste estudo foi desenvolver formulações de emulgel à base de Anfotericina B e manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.), avaliando o potencial de liberação *in vitro* e sua atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo*, para o tratamento tópico de leishmaniose cutânea. Inicialmente, foram obtidas as formulações que foram caracterizadas quanto as características organolépticas, pH, condutividade, microscopia óptica, espalhabilidade, viscosidade, teor e testes de estabilidade preliminar, bem como cinética de liberação *in vitro* em 6 horas. Em seguida, realizou-se o estudo *in vitro* e *in vivo* para verificar a atividade antileishmania da formulação e foram realizados exames clínicos laboratoriais para avaliar possíveis alterações. A partir do estudo, obteve-se emulgeis visualmente homogêneos, de cor amarela escura, odor característico da manteiga de bacuri, e resultados que viabilizam a utilização da formulação por administração tópica. No estudo *in vivo*, utilizam-se camundongos BALB/c, infectados com de *Leishmania major*, onde os animais foram submetidos ao tratamento duas vezes ao dia, durante quinze dias consecutivos. Os animais apresentaram redução das lesões (nódulos e úlceras), menor recuperação de parasitos em fragmentos de pele, baço e fígado e ausência de nefrotoxicidade e hepatotoxicidade. Os resultados obtidos neste estudo demonstram um produto com grande potencial para ser utilizado como alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose cutânea.

Palavras-chave: Anfotericina B. Cicatrização. Leishmaniose cutânea. Emulgel. *Platonia insignis* Mart.

ABSTRACT

Cutaneous Leishmaniasis (LC) is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* transmitted to man by the bite of Sandfly mosquitoes. Conventional treatments, although effective, present high toxicity, with many adverse effects and restrictions. In this context, much emphasis has been given to the development of new therapeutic approaches. The objective of this study was to develop emulgel formulations of Amphotericin B and Bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) evaluating the potential for in vitro release and its antileishmania activity in vitro and in vivo, for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. Initially, the formulations that were characterized in organoleptic characteristics, pH, conductivity, optical microscopy, scattering, viscosity, content and preliminary stability tests, as well as in vitro release kinetics in 6 hours. The in vitro and in vivo study was performed to check the antileishmanial activity of the formulation and laboratory tests were performed to assess possible changes. From the study, it was obtained visually homogeneous emulsions, of dark yellow color, characteristic odor of the bacuri butter, and results that make possible the use of the formulation by topical administration. In the in vivo study, BALB/c mice, infected with *Leishmania major*, were used, where the animals were treated twice a day for fifteen consecutive days. The animals presented reduction of lesions (nodules and ulcers), less recovery of parasites in fragments of skin, spleen and liver and absence of nephrotoxicity and hepatotoxicity. The results obtained in this study demonstrate a product with the greater potential to be used as a therapeutic alternative in the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Amphotericin B. Healing. Cutaneous leishmaniasis. Emulgel. *Platonia insignis* Mart.

1 INTRODUÇÃO

As zoonoses, por representarem 75% das doenças infecciosas emergentes do mundo, são consideradas um grave problema de saúde pública, pois estima-se que 60% dos patógenos humanos são zoonóticos e que 80% dos patógenos animais têm diversos hospedeiros (LIMA; GRISOTTI; SANTOS, 2016).

As leishmanioses são antropozoonoses de ampla distribuição mundial. A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos (Ordem *Diptera*; Família *Psychodidae*; Sub-Família *Phlebotominae*) (BASANO, 2004; LIMA; GRISOTTI; SANTOS, 2016).

Com morfologia peculiar, a forma cutânea apresenta-se através de úlceras de fundo granuloso e avermelhado com bordas elevadas e bem definidas, localizadas nas partes expostas do corpo. A forma mucosa, mostra-se como lesões destrutivas secundárias às cutâneas, normalmente localizando-se nas mucosas das vias aéreas superiores (XAVIER; MENDES; ROSSI-BARBOSA, 2016).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas residem em países onde, pelo menos, uma das diferentes formas de leishmaniose é endêmica e que 12 milhões de pessoas estão infectadas em todo o mundo, com uma taxa anual de mortalidade de 60 mil pessoas, notificando-se em torno de 2 milhões de novos casos a cada ano (FILARDY et al., 2014; WHO, 2015). No Brasil os últimos dados fornecidos em 2015 pelo Ministério da Saúde (MS) apontam mais de 20.000 casos, onde as regiões de maior incidência foram a região Norte com 9.278, e a região Nordeste com 5.417 novos casos notificados (MS/SVS, 2015).

O tratamento convencional tem como medicamentos de primeira escolha os antimoniais pentavalentes, seguidos do isotionato de pentamidina e anfotericina B (AmB). Os antimoniais têm alta toxicidade e efeitos nocivos para pacientes com cardiomiopatia e mulheres grávidas. A anfotericina B também apresenta alta toxicidade e restrições de uso, ou seja, embora estes tratamentos possam ser eficazes, existem muitos efeitos adversos e restrições (PINTO et al., 2016).

Diante às dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, muita ênfase tem sido dada ao desenvolvimento de abordagens terapêuticas alternativas para as leishmanioses, incluindo a identificação e o estudo de formulações para o tratamento tópico

da leishmaniose cutânea (LC) (GOMES; NUNAN; RODRIGUES, 2012; SANTOS et al., 2008). Esse tipo de tratamento pode ser interessante nos casos de doença não disseminada, oferecendo muitas vantagens em comparação ao tratamento convencional, como facilidade de administração do medicamento, menor incidência de efeitos adversos e redução dos custos associados ao tratamento, principalmente se considerarmos que a LC ocorre, muitas vezes, em áreas onde o acesso aos cuidados em saúde é precário (RODRIGUES, 2012).

Além da utilização de formas tópicas, a combinação de fármacos para as leishmanioses também tem se mostrado uma alternativa promissora por: a. aumentar a atividade antileishmania através do uso de compostos com ação sinérgica ou aditiva; b. evitar o surgimento da resistência aos fármacos; c. proporcionar o uso de doses menores, reduzindo as chances de efeitos tóxicos e reduzindo, também, os custos (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; PONTE-SUCRE et al., 2017).

Devido à escassez de terapia não agressiva, a qual aumenta a adesão do paciente ao tratamento e, por conseguinte, à cura, torna-se crescente o interesse no estudo de plantas medicinais como possíveis fontes de novos compostos, com melhores atividades terapêuticas leishmanicidas e com menos efeitos adversos. Diante deste cenário, ressalta-se a manteiga da semente de bacuri (*Platonia insignis* Mart.), sobre a qual tem se evidenciado estudo crescente no tocante à atividade leishmanicida (COSTA-JUNIOR et al., 2011; COSTA-JUNIOR et al., 2013).

Diante disso, verifica-se a necessidade de novas terapias que proporcionem uma maior adesão ao tratamento da LC, buscando a diminuição dos efeitos adversos dos tratamentos convencionais a partir da utilização de formas farmacêuticas tópicas e da associação de fármacos com potencial terapêutico antileishmania, diminuindo assim as concentrações utilizadas.

Portanto, o objetivo desse trabalho foi o desenvolvimento tecnológico de um emulgel de ação tópica, à base de AmB e manteiga de bacuri e avaliar as características do sistema de liberação dos fármacos *in vitro* e atividade antileishmania *in vivo* visando a redução dos efeitos tóxicos da AmB.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver emulgéis à base de anfotericina B e manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e avaliar o potencial de liberação do fármaco, *in vitro*, bem como sua atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo* para o tratamento tópico do modelo de infecção murina.

2.2 Objetivos Específicos

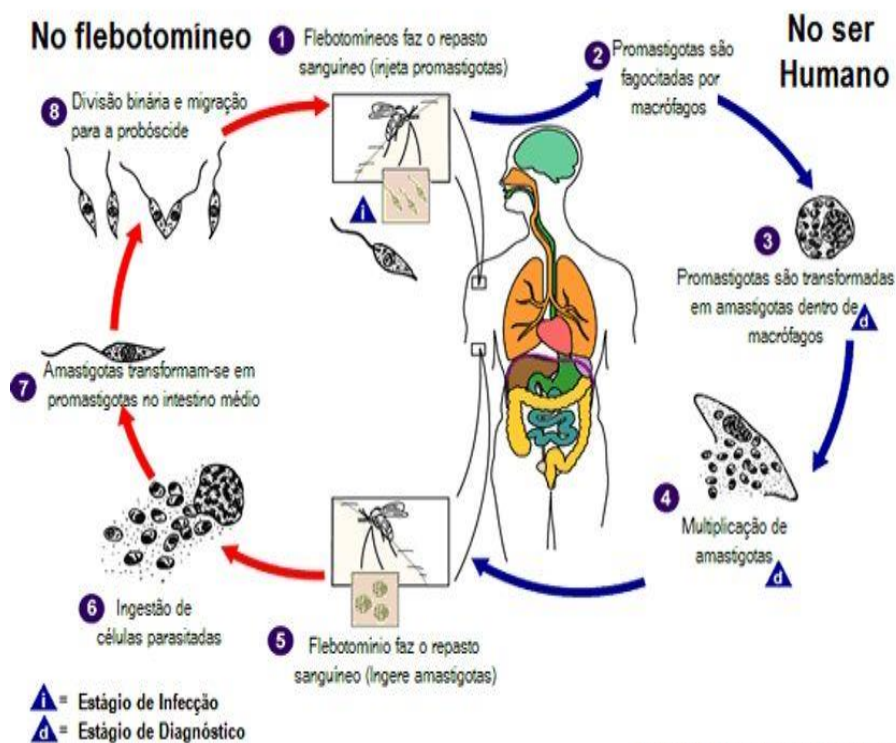
- ✓ Obter e fazer caracterização físico-química das formulações de emulgel à base de anfotericina B e manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.);
- ✓ Avaliar a estabilidade preliminar das formulações obtidas;
- ✓ Avaliar a liberação *in vitro* do fármaco nas formulações desenvolvidas, através do estudo de cinética de liberação;
- ✓ Avaliar a atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *Leishmania major*;
- ✓ Avaliar atividade antileishmania *in vivo*, utilizando camundongos da linhagem BALB/c infectados com *Leishmania major*;
- ✓ Avaliar a nefrotoxicidade e hepatotoxicidade, bem como a presença de anemia nos animais submetidos ao tratamento, através de exames bioquímicos e hematológico;
- ✓ Avaliar a carga-parasitária dos animais submetidos ao tratamento experimental;
- ✓ Realizar estudos histopatológicos dos tecidos dos animais submetidos ao tratamento Com o emulgel.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

As leishmanioses são causadas por protozoários da ordem Kinetoplastida, da família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. A *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema mononuclear fagocitário, com duas formas principais: uma flagelada, chamada promastigota, encontrada no inseto vetor, e a outra, sem flagelo aparente, a amastigota, que é observada nos tecidos dos hospedeiros mamíferos. O parasito é transmitido para os hospedeiros vertebrados durante o repasse sanguíneo por flebotomíneos (Díptera: Psychodidae), que são insetos alados dos gêneros *Lutzomyia* (no Novo Mundo), e *Phlebotomus* nas demais regiões geográficas (BATES, 2008). Representação do ciclo vital de *Leishmania sp* (figura 1).

Figura 1: Ciclo Vital de *Leishmania sp*.



As leishmanioses podem se apresentar em duas formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), que atinge os órgãos internos, leishmaniose tegumentar (LT), que se subdivide em leishmaniose cutânea (LC), que atinge a pele e a leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM), as mucosas e a pele. No Brasil existem as três formas: A LV, a mais agressiva das leishmanioses, tem caráter sistêmico e afeta principalmente órgãos como fígado, baço e medula óssea. Se não tratadas, leva a óbito em 90% dos casos, e atinge principalmente crianças menores de 10 anos. A LC, sendo a mais comum, é caracterizada pelo aparecimento de lesões no local da infecção, as quais são indolores, com bordas bem definidas, base eritematosa e fundo avermelhado. E a LCM causa lesões destrutivas localizadas na mucosa, em geral nas vias aéreas superiores, provocando grau elevado de deformidades (ALVES et al., 2013; WHO, 2010).

A LT também tem ampla distribuição mundial (no continente Americano é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA). Há registro de casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. Dos cerca de 1,5 milhão de novos casos por ano no mundo, o Brasil notificou, em média, 23.274 casos nos últimos seis anos. Esse número coloca o Brasil entre os dez países responsáveis, por mais de 90%, de todos os casos de LT notificados no mundo (SINAN/SVS/MS, 2013; WHO, 2010).

No Brasil, oito espécies dermatrópicas de *Leishmania* já foram identificadas como agentes etiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo as mais importantes: *L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* e, mais recentemente, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. shawi*, e *L. lindenbergi* foram descritas em Estados das regiões Norte e Nordeste, porém com pouca importância epidemiológica. As principais espécies de insetos envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei*. Os reservatórios mais importantes do parasito, primariamente silvestres, são roedores, marsupiais, edentatus e canídeos (BRASIL, 2007).

A diversidade de agentes etiológicos da LTA, as características epidemiológicas, reservatórios, vetores e ecossistemas, aliados ao conhecimento ainda insuficiente sobre vários aspectos da sua epidemiologia, tornam complexo e difícil o estabelecimento de um programa de controle eficaz para essa endemia (BRASIL, 2007).

Embora não seja fatal, a LTA é uma das afecções dermatológicas de grande importância pelo grau de deformidades que pode provocar no ser humano, com reflexos no campo social e econômico. Com isso, a doença deve ser tratada de forma a acelerar sua cura, reduzir as lesões e prevenir a disseminação do parasito ou as recorrências, reduzindo assim a morbidade (WHO, 2010; BRASIL, 2007).

3.2 Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

Desde a década de 1940, o tratamento das leishmanioses consiste na administração de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}) como fármacos de primeira escolha e, no caso de resistência, o desoxicolato de anfotericina B e a anfotericina B lipossomal podem ser usadas. Existem dois tipos de antimoniais pentavalentes que podem ser utilizados, o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio, sendo este último não comercializado no Brasil (BRASIL, 2010).

Os antimoniais pentavalentes são fármacos considerados leishmanicidas, pois interferem na bioenergética das formas amastigotas, pela inibição da glicólise e da oxidação dos ácidos graxos, acompanhados pela inibição da redução na produção de ATP e GTP (BRASIL, 2010).

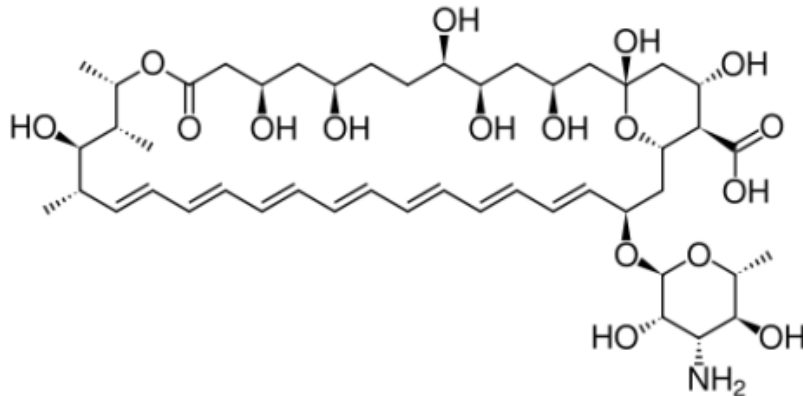
A ampla utilização do glucantime levou à seleção de linhagens que apresentam mecanismos de resistência a esses medicamentos. Os relatos de pacientes não responsivos à terapia têm aumentado espantosamente, seja devido a essa seleção ou à imunossupressão, causada principalmente pela coinfeção com o HIV. Como exemplo, cita-se o Estado de Bihar, na Índia, onde cerca de 70% dos casos de LV não respondem mais aos tratamentos à base de Sb^{5+} . Da mesma forma, o Brasil tem enfrentado dificuldades para tratar uma parcela importante dos casos de LV e LTA, em razão da resistência ao glucantime (YAMAMOTO et al., 2015; BRASIL, 2014b; WHO, 2010).

A principal medida de controle de todas as formas de leishmanioses no homem continua sendo a quimioterapia. Os fármacos de primeira escolha são derivados do antimônio pentavalente (Sb^{5+}), como o antimoniato de N-metilglucamina (glucantime), o mais utilizado no Brasil. Outros leishmanicidas são pentostam, pentamidina, miltefosina, paromomicina e sitamaquina. A AmB, um antibiótico isolado de *Streptomyces nodosus* constitui um fármaco de segunda escolha para tratamento de leishmaniose. Nanoformulações da anfotericina B estão disponíveis para tratamento da LV, mas seu uso é limitado devido seu alto custo (BRASIL, 2007; WHO, 2010; SEIFERT, 2011; BRASIL, 2014; ARONSON, 2016).

A anfotericina é uma molécula anfipática (Figura 2), ou seja, possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica, sendo que esta última a torna insolúvel em meios aquosos (KAMIŃSKI, 2014). A solubilidade aquosa é adquirida através da formulação com o desoxicolato de sódio ou uma variedade de carreadores lipídicos (MESA-ARANGO; SCORZONI; ZARAGOZA, 2012). Foi introduzida na década de 1950, continua sendo o medicamento mais valioso reservado para infecções fúngicas sistêmicas (ISHIDA et al.,

2015). E além de ser indispensável para o tratamento das infecções fúngicas, é também um antimicrobiano importante para o tratamento da LV e LC, sendo o medicamento de segunda escolha para o tratamento de LTA e de primeira escolha nos casos de portadores do vírus HIV e/ou que apresentem resistência aos Sb^{5+} (BRASIL, 2010).

Figura 2: Estrutura química da anfotericina B.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2009.

A anfotericina B (AmB) liga-se preferencialmente ao ergosterol nas membranas de plasma fúngicas, embora também interaja com esteróis, como o colesterol, nas células hospedeiras, o que explica largamente a sua conhecida toxicidade. Assim, a aplicação de AmB é dificultada pela terapia de longa duração associada a efeitos adversos graves, incluindo: nefrotoxicidade, neurotoxicidade e hepatotoxicidade (DENNING; HOPE, 2010; KAMIŃSKI, 2014).

O mecanismo de ação da AmB ainda não está completamente elucidado, mas pode-se falar em efeitos diretos sobre a membrana celular e efeitos intracelulares de indução de estresse oxidativo. O efeito na membrana baseia-se na sua interação com o ergosterol, um esteroide essencial da membrana celular dos organismos fúngicos, e de alguns protozoários (gênero *Leishmania*). A estrutura poliênica da molécula forma complexos com o ergosterol, o que forma poros na membrana e resultam em perda de sua integridade e rápido extravasamento de potássio e outros íons, ocasionando a morte celular (FALCI, PASQUALOTTO, 2015).

O sequestro do ergosterol pelas moléculas de AmB também resulta em efeito tóxico para as células do patógeno, visto que o ergosterol é essencial para múltiplos processos celulares, como endocitose, fusão de vacúolos e estabilização de proteínas da membrana (MESA-ARANGO; SCORZONI e ZARAGOZA, 2012).

A AmB é, via de regra, administrada por via intravenosa, associada a com um agente solubilizante como o deoxicolato de sódio. Essa combinação é a formulação mais utilizada para o tratamento de infecções fúngicas, desde 1958, especialmente em países em desenvolvimento (FALCI, PASQUALOTTO, 2015; ARONSON, 2016).

Com o objetivo de reduzir principalmente a nefrotoxicidade, buscou-se o desenvolvimento de formulações farmacêuticas inovadoras de AmB. Para alcançar somente os tecidos-alvo com máxima concentração e seletividade, o interesse tecnológico está voltado para o desenvolvimento de sistemas “carreadores” coloidais ou através de partículas como lipossomos ou nanopartículas, produtos estes inovadores, tais como o complexo lipídico-AmB (Abelcet®), o produto lipossomal (AmBisome®), suspensões coloidais (Amphocil®, Amphil® e Amphotec®) e a solução de detergente (Fungizone®) (ISHIDA, 2015). Porém, esses produtos são de alto custo e de difícil adesão para o tratamento de populações carentes.

3.3 Tratamento tópico e combinação de fármacos para Leishmaniose Tegumentar Americana

O prognóstico e tratamento da doença varia com o tipo de hospedeiro e a escolha do tratamento depende da espécie de *Leishmania* envolvida. Infelizmente, a identificação das espécies por cultura e pelo exame isoenzimático é exigente, e demorado, e novas ferramentas rápidas, como a amplificação gênica pela reação em cadeia da polimerase, não estão amplamente disponíveis. Esta é a razão pela qual os clínicos que se deparam com pacientes com leishmaniose tratam com frequência pacientes sem identificação das espécies, inferidos da localização geográfica do paciente e a epidemiologia da doença na área (MINODIER; PAROLA, 2007).

Solução tópica de 25% de podofilina é uma nova terapia tópica eficaz da LC. É um método de terapia não dispendioso, indolor, com poucos efeitos colaterais, especialmente adequado para crianças. O possível mecanismo de ação da podofilina como medicamento antileishmanial é pouco conhecido, mas as ações bem conhecidas da podofilina em células podem ser aplicadas em parasitas de leishmania e essas ações incluem: parada do ciclo celular, mitose em metafase, bloquear enzimas de oxidação no ciclo do ácido tricarbóxico, inibir o axônio, transporte de proteína, RNA, síntese de DNA e também inibição da atividade mitocondrial (SHARQUIE; NOAIMI; AL-GHAZZI, 2005).

Um estudo de Santos et al. (2008) apresentou resultados clínicos benéficos da resposta à formulação hidrofílica de Paramomicina (PA), já que se observou evolução para a cura ou

melhora na maioria dos pacientes. Com o re-tratamento, evidenciou-se incremento desse benefício, uma vez que o número de pacientes curados havia aumentado. No entanto, foram observados episódios de ausência total de resposta à PA tópica.

Outro estudo apresentou resultados da utilização de imiquimod à 5% creme (aplicação de uma fina camada de creme durante 20 dias) associado a antimoniato de meglumina (20 mg/kg/d por 20 dias). Os resultados mostraram que as cicatrizes residuais pareciam menos proeminentes no grupo tratado com o creme de imiquimod à 5%, porém nenhuma escala padronizada foi utilizada para avaliar a qualidade da cicatriz (MIRANDA-VERASTEGUI et al., 2005)

Em Israel, alguns pacientes infectados com *L. major* foram tratados com sucesso com dispersão coloidal de anfotericina B e sulfato de colesterol (Amphocil®), dispersos em etanol a 5% sem glicose (VARDY et al., 2001). O tratamento tópico com AmB nanolipossomal, diminui progressivamente o tamanho de lesões em um estudo de tratamento de 10 semanas de lesões cutâneas não ulceradas (BALB/c, por 4 semanas) (VARICUTI et al., 2017).

Nos últimos anos, os produtos naturais têm sido uma boa fonte para pesquisadores em busca de substâncias bioativas. Embora as perspectivas para a cura da leishmaniose ainda sejam incertas, o desenvolvimento de novas técnicas de extração e a identificação de novas potentes frações das plantas estão contribuindo para esse efeito. Certas moléculas isoladas de fontes naturais representam um grande avanço na busca de novos fármacos antiprotozoários, uma vez que há necessidade urgente de uma nova era de medicamentos inovadores (TIUMAN et al., 2012).

3.4 *Platonia insignis* Mart.

O Brasil possui uma vasta variedade de plantas e frutas tropicais que despertam o interesse da comunidade científica para o estudo, conservação e utilização racional destes recursos. Muitos estudos estão sendo realizados sobre a atividade antioxidante exercida pelos compostos naturais em sistemas biológicos (SILVA et al., 2012).

Neste sentido, o levantamento bibliográfico sobre derivados vegetais com atividade leishmanicidas, isto é, espécies vegetais já avaliadas quanto à atividade antileishmania, torna-se interessante (SINGH et al., 2014). Nos últimos anos foi demonstrada a atividade de vários derivados de plantas contra parasitos do gênero *Leishmania*, dentre as quais *Kalanchoe pinnata*, *Plumbago scandens*, *Physalis angulata*, *Piper aduncum*, *australis* e *Phyllanthus amarus* e *Platonia insignis* Mart. Considera-se que estas poderão servir de base para o

desenvolvimento de formulações de fitoterápicos para o tratamento de leishmanioses e representam oportunidades para a inovação em medicamentos a partir da biodiversidade brasileira (COSTA-JUNIOR et al, 2011; OLIVEIRA, GILBERT e VILLAS BÔAS, 2013).

A espécie *Platonia insignis* Mart, mais conhecida como “bacuri”, pertence à família Clusiaceae. Planta arbórea de clima tropical, nativa da Amazônia brasileira, cujas áreas de ocorrência abrangem os Estados do Pará, Maranhão, Piauí, Goiás e Mato Grosso. (NASCIMENTO et al., 2014). Apresenta-se como um fruto o tamanho de uma laranja, redondo, com casca grossa e de cor amarelo-citrina, com uma polpa viscosa e saborosa. Quando maduro, exala um perfume suave e fragrante que se assemelha ao jasmim e é rico em terpenos (CALVAZARA, 1970; YAMAGUCHI et al., 2014; SANTOS; 2015).

O fruto contém uma polpa rica em constituintes químicos com propriedades antioxidantes, como a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferóis) e o óleo extraído das sementes é rico em ácidos graxos insaturados (oléico e linoléico), diterpenos, e benzofenonas preniladas, como a Garcinialiptona (GFC), uma molécula com reconhecida atividade antioxidante (NASCIMENTO, 2014; SILVA et al., 2014) e com atividade antileishmania (COSTA-JUNIOR et al., 2011).

O óleo de bacuri possui importantes propriedades antioxidantes, cicatrizantes e antiinflamatórias (YAMAGUCHI, 2014; COSTA-JUNIOR, 2011) e atividade leishmanicida (COSTA JUNIOR, et al., 2013a). Este óleo é disponível para comercialização, podendo ser encontrado em indústria brasileira com o nome de manteiga da semente de bacuri. Segundo Santos-Júnior e colaboradores, (2010), a composição do óleo das sementes do bacuri é de ácidos graxos, diterpenos, alcoóis e hidrocarbonetos de cadeia longa; sendo que os ácidos graxos encontrados na manteiga do bacuri são o palmítico (na forma de tripalmitina), o oleico, o esteárico e o linoleico.

A extração do óleo de bacuri é um processo lento que exige muito cuidado devido ao grau de dificuldade, pois as sementes são colocadas para repousar em entumescimento, com água, por mais de um ano; posteriormente são fervidas, sendo o óleo retirado da superfície da água fervente. Estudos com esta espécie demonstram interesse especial para sua segurança e eficácia em ensaios pré-clínicos (SANTOS et al., 2013; SILVA et al., 2014).

3.5 Emulgéis

Emulgéis surgem como um promissor sistema terapêutico para entrega de fármacos hidrofóbicos (são imiscíveis com a água). As preparações de uso tópico, em sua maioria, são usadas para os efeitos no local de sua aplicação, pois o fármaco age nas camadas subjacentes

da pele ou membranas mucosas e embora possa ocorrer absorção indesejada, sendo esta sub-terapêutica e geralmente não causa preocupação. Os géis possuem capacidade de liberação de fármaco mais rápida quando comparados a outras preparações semissólidas, pois a alta concentração de seu componente aquoso permite uma maior dissolução de fármacos, além de permitir fácil migração do fármaco através de um veículo em comparação com a pomada ou a base de creme, permitindo assim uma maior aceitação pelo paciente. Porém, apresenta como desvantagem a entrega de fármacos hidrofóbicos (KHULLAR et al., 2012).

Para superar essa limitação, surge a necessidade de preparação de um emulgel (são combinações de géis e emulsões), onde o agente gelificante na fase aquosa converte a emulsão em um emulgel. Estes são sistemas de óleo-em-água e água-em-óleo ideais para trabalhar com drogas lipofílicas e hidrofílicas, respectivamente. É crescente o interesse no uso de novos polímeros com funções complexas como emulsificantes e espessantes assim, proporcionam a formulação de emulsões e cremes estáveis, diminuindo a tensão superficial e interfacial e, ao mesmo tempo, aumentando a viscosidade da fase aquosa, devido à capacidade de gelificação desses compostos. Apresentam-se de forma agradável, com certo grau de elegância, são facilmente laváveis, têm alta capacidade de penetrar a pele, sem gordura, facilidade de aplicação e remoção, podem apresentar comportamento tixotrópico, emoliente e possuem vida útil mais longa (VARMA, 2014; JADALE; PAWAW, 2017).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, C.F.; FIGUEIREDO, M.M.F.; SOUZA, C.C.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; MELO, M.N.; TAFURI, W.L.; RASO, P.; SOARES, R.P.; TAFURI, W.L. American tegumentary leishmaniasis: Effectiveness of an immunohistochemical protocol for the detection of *Leishmania* in skin. **PLoS ONE**, v. 8, n.5, p. e63343. San Francisco. 2013. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone>>. Acessado em: 2/09/2017. doi.org/10.1371/journal.pone.0063343.

ARONSON, Naomi et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p.e202-e264, 14 nov. 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciw670>.

BATES, P.A. Leishmania sand fly interaction: progress and challenges. PMC. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, p.340-344. USA. 2008. Doi.org/10.1016/j.mib.2008.06.003 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science>. Acessado em: 15/08/2017.

BRASIL 2007. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar. Ministério da Saúde. Brasília. 2007.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira, volume 2. Brasília, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde . Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL 2014a. Ministério da Saúde. Dados de situação epidemiológica - casos LV.

BRASIL 2014b. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Departamento de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Brasília. 2006.

BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 328–337, 2004. disponível em: <https://www.scielo.org/scielo>. Acessado em: 10/07/2017.

CALZAVARA, B.B.G.; Fruteiras: abieiro, abricozeiro, bacurizeiro, biribazeiro, cupuaçuzeiro. IPEAN, **Séries Culturais da Amazônia**, Belém, p.63-68, 1970. Disponível em: <file:///C:/Users/luiza/Downloads/IPEAN-CulturasAmazonia3.pdf>. Acessado em: 11/10/2017.

COSTA JUNIOR, J. S.; FERRAZ, A. B. F.; FILHO, B. A. B.; FEITOSA, C. M.; CITÓ, A. M. G. L.; FREITAS, R. M.; SAFFI, J. Evaluation of antioxidante effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart.. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.2, p.293-299, 2011. Disponível em: <http://www.academicjournals.org/journal>. Acessado em: 14/07/2017.

COSTA-JÚNIOR, Joaquim S. et al. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Nat Prod Res**, v.27, n.4-5, p. 470-4, 2013a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22708546>. Acessado em: 21/10/2013. doi: 10.1080/14786419.2012.695363

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006. Disponível em: <http://cmr.asm.org/content/19/1/111.short>. Acessado em: 15/09/2017.

DENNING, D.W.; HOPE, W.W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities **Trends Microbiol.**, V.18, p. 195-204, 2010. Doi: 10.1016/j.tim.2010.02.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acessado em: 03/10/2017

FALCI, R.D.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clin Biomed Res**, v. 35, n.2, p.65-82, 2015. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/158750/001012984.pdf?sequence=1>> Acessado em: 22/10/2017.

FILARDY, Alessandra A. et al. Infection with *Leishmania major* Induces a Cellular Stress Response in Macrophages. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e85715, 9 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085715>.

ISHIDA, K.; CASTRO, R. A.; BORBA L. P. S.; QUINTELLA, L. P.; LOPES, L. M.; ROZENTAL, S. Amphotericin B, alone or followed by itraconazole therapy, is effective in the control of experimental disseminated sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Med. Mycol**, v.53, p. 34-41, 2015. Doi: 10.1093/mmy/myu050. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acessado em: 02/09/2017.

KAMIŃSKI, Daniel Michał. Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments. **European Biophysics Journal**, [s.l.], v. 43, n. 10-11, p.453-467, 31 ago. 2014. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00249-014-0983-8>.

KIESSLING, S. ; DUBEAU-LARAMÉE, G.; OHM, H.; LABRECQUE, N.; OLIVIER, M.; CERMAKIAN, N. The circadian clock in immune cells controls the magnitude of *Leishmania* parasite infection. **SciRep**, 7:10892, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5589941/>. Acessado em 26/10/2017. doi: 10.1038/s41598-017-11297-8.

JAGDALE, S.; PAWAR, S. Gellified emulsion of ofloxacin for transdermal drug delivery System. **Adv Pharm Bull**, v. 7, n.2, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5527237/>>. Acessado em: 08/01/2018. doi: 10.15171/apb.2017.028.

KHULLAR, Rachit et al. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.63-67, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.001>.

LIMA, C. C. M.; GRISOTTI, M.; SANTOS, F. S. Os desafios no controle das leishmanioses no contexto da cidade de Montes Claros (MG). **Unimontes Científica**, v. 18, n. 2, p. 132-147, 2016. Disponível em: <<http://www.ruc.unimontes.br>>. Acessado em: 18/09/2017.

MESA-ARANGO, A.C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Front Microbiol.** v. 3, n.286, p.1-10, 2012. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00286>>. Acessado em: 01/07/2017.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel medicine and infectious disease**, v. 5, n. 3, p. 150-158, 2007. Doi: 10.1016/j.tmaid.2006.09.004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> Acessado em: 21/10/2017.

MIRANDA-VERASTEGUI, C. et al. Randomized, Double-Blind Clinical Trial of Topical Imiquimod 5% with Parenteral Meglumine Antimoniate in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clinical Infectious Diseases**, [s.l.], v. 40, n. 10, p.1395-1403, 15 maio 2005. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1086/429238>.

MS/SVS. Rede internacional de informações para a saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. **Ministério da Saúde, MS/SVS.** 2015. Disponível em: < <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>>. Acessado em: 25/10/2017.

NASCIMENTO, Juliana L., et al. Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. **Bol Inform Geum**, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2014. <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/geum/article/view/2460>.

OLIVEIRA, Alaíde B. et al. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phythomedicines. Part I. Alkaloids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s.l.], v. 81, n. 4, p.715-740, dez. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0001-37652009000400011>.

OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B., VILLAS-BÔAS, G.K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. **Farmanguinhos/Fiocruz. Revista Fitos**, v. 8, n.1, p.1-72, 2013. Disponível em: <http://revistafitos.far.fiocruz.br>. Acessado em 16/08/2017.

PINTO, J. G. et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 5, p. 883-90, Jul 2016. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056699>.

PONTE-SUCRE, Alicia et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>

RODRIGUES, L. F. **Avaliação da atividade in vivo do antimoniato de meglumina e de sua associação com o tratamento tópico sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de pacientes portadores de leishmaniose cutânea.** 2012. Tese de Doutorado.

SANTOS, A. M.; NORONHA, E. F.; FERREIRA, L.A.M.; CARRANZA-TAMAYO, C.O.; CUPOLILLO, E.; ROMERO, G.A.S. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com

antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.5, p.444-448, 2008. Disponível em: <<https://www.researchgate.net>>. Acessado em: 03/10/2017.

SANTOS-JUNIOR, R.Q.; SOARES, LC.; MAIA FILHO, A.L.M.; ARAUJO, K.S.; SANTOS, I.M.S.P.; COSTA-JUNIOR, J.S.; SAFFI, J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**, v.9, n.4, p.575-581, 2010. disponível em: <http://www.redalyc.org>. Acessado em: 07/09/2017.

SANTOS, M. R. A.; CHAGAS, S. E. S; GUIMARÃES, M. C, M. Estabelecimento de protocolo para descontaminação de explante foliares de bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) **Saber Científico**, v.4, n.2, p.15- 23, 2015. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br>. Acessado em: 21/09/2017.

SANTOS, P. R. P; CARVALHO, R. B. F; COSTA JÚNIOR, J. S, FREITAS, R. M.; FEITOSA, C. M. Survey of physical and pharmacological properties químicas of extracts and compounds isolated from *Platonia insignis* Mart. a perspective for the development of herbal medicines. **Rev Bras Farm**, v. 161 n. 8, p. 94, 2013.

SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in antileishmanial drug discovery and development. **Bentham Open. The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p.31-39. 2011. ISSN 1874-1045. doi:10.2174/1874104501105010031. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>> Acessado em: 17/09/2017.

SHARQUIE, Khalifa E.; NOAIMI, Adil A.; AL-GHAZZI, Ahmed G.. Treatment of cutaneous leishmaniasis by topical 25% podophyllin solution (single, blinded, therapeutic, controlled study). **Journal Of Dermatology & Dermatologic Surgery**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.108-113, jul. 2015. Medknow. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdds.2014.10.001>.

SINGH, N.; MISHRA, B.B.; BAJPAI, S.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. Elsevier. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p.18-45. 2014.

SILVA, A. P. S.C.L.; , LOPES, J. S.L.; VIEIRA, P. S.; PINHEIRO, E. E.A.; SILVA, M. G.; FILHO, J. C. C.L. S.; COSTA JÚNIOR, S.J; DAVID, M.J.; FREITAS, M. R. Behavioral and neurochemical studies in mice pretreated with garcinielliptone FC in ilocarpine-induced seizures. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.124, p. 305–310, 2014. doi: 10.1016/j.pbb.2014.05.021. Acessado em: 01/11/2017

SILVA, O.A.; OLIVEIRA, F. R. D. A. M.; LIMA, T. C.; SOUSA, D.P.;SOUZA, A. A.; FREITAS, R.M. Evaluation of the antioxidant effects in vitro of the isopulegone. **Free Radicals and Antioxidants**, v. 2, n. 3, p. 50-55, 2012. <https://doi.org/10.5530/ax.2012.4.9> Acessado em: 01/08/2017.

SINAN/SVS/MS. Ministério da Saúde. Sistema de Informação e Agravos de Notificação – SINAN Net. Leishmaniose tegumentar, 2015. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br>> Acesso em: 13/10/2017.

TIUMAN, T.S.; BRENZANM M.A; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B.P.D; CORTEZ, D.A.G.C.; NAKAMURA, C.V. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (–)

mammea A/BB. **Phytomedicine**, v.19, n.13, p.1196-1199, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2012.08.001>.

VARDY,D.; BARENHOLZ, Y.; NAFTOLIEV, N.; KLAUS, S.; GILEAD, L.; FRANKENBURG, S. Efficacious topical treatment for human cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid amphotericin B. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 184-186, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90158-0](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90158-0)

VARIKUTI, Sanjay et al. Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Acta Tropica**, [s.l.], v. 173, p.102-108, set. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.06.004>.

VARMA, V. Naga Sravan Kumar et al. Calcipotriol delivery into the skin as emulgel for effective permeation. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, n. 6, p.591-599, dez. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2014.02.007>.

WHO. 2015. Leishmaniasis fact sheet no. 375. **World Health Organization**, Geneva, Switzerland: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acessado em: 25/10/2017.

WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. In: WHO Technical Report Series, Organization, W.H., p. 201. Editora World Health Organization. 2010.

XAVIER, K. D.; MENDES, F. C. F.; ROSSI-BARBOSA, L. A. R. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA : estudo clínico- epidemiológico. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v.14, n.2, p.1210–1222, 2016. Disponível em: <http://periodicos.unincor.br/index.php> Acessado em: 20/08/2017

YAMAMOTO, Eduardo Seiji et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasitology Research**, [s.l.], v. 113, n. 1, p.333-339, 31 out. 2013. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-013-3659-x>.

YAMAGUCHI, K.K.L.; PEREIRA, C. V. L.; LIMA, E.S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DO BACURI (*Platonia insignis*). **Scientia Amazonia**, v. 3, n.2, 39-46, 2014. Disponível em: < <http://www.scientia.ufam.edu.br> > Acessado em: 25/10/2017.

Capítulo I: Emulgel tópico à base de anfotericina B e manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) para o tratamento de leishmaniose cutânea: caracterização e ensaios *in vitro*.

DRUG DEVELOPMENT AND INDUSTRIAL PHARMACY
<https://doi.org/10.1080/03639045.2018.1492610>



RESEARCH ARTICLE



Emulgel based on amphotericin B and bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) for the treatment of cutaneous leishmaniasis: characterization and *in vitro* assays

RESUMO

As leishmanioses são consideradas doenças infecciosas, apresentando alta incidência e capacidade de produzir deformidades, onde a forma cutânea é a mais disseminada. O tratamento preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) é agressivo e tóxico, tornando assim o tratamento tópico uma alternativa promissora. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica de anfotericina B (AmB) com manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e avaliando *in vitro* a sua ação antileishmania. As formulações desenvolvidas foram submetidas à testes de caracterização organoléptica, resistência à centrifugação, tamanho de gotículas, pH, condutividade elétrica, viscosidade, espalhabilidade, teor, estabilidade preliminar, ensaio de liberação *in vitro*, avaliação da atividade antileishmania das formas promastigotas de *Leishmania major*, citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de Seletividade (IS). As emulsões recém-preparadas apresentaram-se com odor característico atribuído à manteiga de bacuri, cor amarela escura, homogêneas e brilhosas, com pH compatível para aplicação tópica, comportamento não-newtoniano, teor do fármaco dentro dos padrões estabelecidos e modelo cinético de liberação de primeira ordem. Neste estudo, foi verificado que a integridade do fármaco, nas proporções utilizadas (1% e 3%), foi mantida. Sendo assim, as formulações demonstraram capacidade sinérgica com o fármaco convencional, diminuindo a citotoxicidade para as células do hospedeiro e ainda potencializando a atividade antileishmania da Anfotericina B. Conclui-se que as formulações desenvolvidas apresentaram ação antileishmania e potencial para utilização por via tópica.

Palavras-chave: Anfotericina B. Citotoxicidade. Emulgel. Perfil de liberação *in vitro*. *Platonia insignis* Mart.

ABSTRACT

Leishmaniasis is considered an infectious disease, presenting a high incidence and capacity to produce deformities, where the cutaneous form is the most disseminated. The treatment recommended by the World Health Organization (WHO) is aggressive and toxic, thus making topical treatment a promising alternative. This work aimed to develop and characterize a topical formulation of amphotericin B (AmB) with bacuri butter (*Platonia insignis* Mart.) And evaluating its antileishmania action in vitro. The formulations were submitted to organoleptic characterization tests, centrifugation resistance, droplet size, pH, electrical conductivity, viscosity, spreadability, content, preliminary stability, in vitro release assay, evaluation of antileishmanial activity of *Leishmania major* promastigotes, macrophage cytotoxicity and the selectivity index (IS). The newly prepared emulsions presented a characteristic odor attributed to bakery butter, dark yellow color, homogeneous and shiny, with a compatible pH for topical application, non-Newtonian behavior, drug content within established standards and kinetic model of the release of the first order. In this study, it was verified that the integrity of the drug, in the proportions used (1% and 3%), was maintained. Thus, the formulations demonstrated synergistic ability with the conventional drug, reducing cytotoxicity to host cells and further potentiating the antileishmanial activity of Amphotericin B. It is concluded that the formulations developed showed antileishmania action and potential for topical use.

Keywords: Amphotericin B. Cytotoxicity. Emulgel. In vitro release profile. *Platonia insignis* Mart.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS) destaca as leishmanioses como uma das seis principais doenças infecciosas com alta incidência e capacidade de produzir deformidades e com prevalência global de 12 milhões de pessoas infectadas (FILARDY et al., 2014; WHO, 2015). No Brasil, segundo o Ministério da Saúde (2015), foram notificados mais de 20.000 casos, com maior incidência nas regiões Norte e Nordeste do país.

As manifestações clínicas causadas pela variedade de espécies de *Leishmania* compreendem formas viscerais e tegumentares. As formas tegumentares da doença incluem leishmanioses cutâneas (LC), difusas e mucocutâneas. A forma cutânea é a mais disseminada, podendo ser assintomática ou causar problemas físicos, sociais e psicológicos aos pacientes. No entanto, não existe, ainda, um tratamento satisfatório para LC que seja efetivo, seguro e confortável para paciente (ALVES et al., 2017; OLLIARO et al., 2018).

Desde a década de 20, os antimoniais foram usados com sucesso na quimioterapia para a leishmaniose, porém, nos últimos 10 anos, o mundo presencia um aumento da falha terapêutica, entre outras razões, pelos altos índices de resistência. A anfotericina (AmB), fármaco usado na terapia de pacientes com co-infecções ou em casos de resistência aos antimoniais, é altamente eficaz, porém relativamente tóxica (cardiotoxicidade e nefrotoxicidade). Estes fármacos requerem administração parenteral, têm efeitos adversos graves e altas taxas de recaída. Diante destas dificuldades, a busca de novas terapias, mais seguras e eficazes é marcadamente relevante (PINTO et al., 2016; DIDWANIA et al., 2017; PONTE-SUCRE et al., 2017; VARIKUTI et al., 2017).

O tratamento para administração tópica é uma alternativa promissora para o tratamento da LC, pois oferece diversas vantagens, em comparação ao convencional. Entre estas vantagens pode-se destacar: praticidade de administração, melhor eficácia e segurança terapêutica, entregando as moléculas do fármaco ao sítio alvo, uma liberação controlada e/ou prolongada e, com isso, alcançar uma terapia não agressiva, com redução das reações adversas e toxicidades atribuídas ao fármaco e maior adesão do paciente ao tratamento (SANTOS et al., 2008; RUELA et al., 2016; SHILAKARI et al., 2016).

Os emulgeis, que são combinações de géis com emulsões, são excelentes alternativas para aplicação tópica, pois permitem a incorporação de fármacos lipofílicos (sistemas óleo-em-água) e hidrofílicos (sistemas água-em-óleo), apresentam-se de forma elegante, têm boa espalhabilidade e alta capacidade de penetrar a pele e liberar o fármaco (KHULLAR et al.,

2012; SUPRIYA et al, 2014; JAGDALE, PAWAR, 2017), além de poder obter formulações igualmente eficientes para o tratamento de determinada enfermidade, utilizando concentrações reduzidas de princípio ativo (PINHEIRO et al., 2016).

A associação de fármacos e derivados de plantas com atividade antileishmania tem se mostrado uma alternativa vantajosa, pois a ação sinérgica destes pode intensificar a ação do produto, permitindo a utilização de doses menores, reduzindo, assim, as chances de efeitos tóxicos, custos associados e resistência terapêutica (OLIVEIRA et al., 2017; PONTE-SUCRE et al., 2017). Dentre as diversas plantas com atividade antileishmanicida comprovada, destaca-se a *Platonia insignis* Mart., popularmente conhecida como bacuri (COSTA-JUNIOR et al., 2013^a; 2013^b; LUSTOSA et al., 2015; 20 SOUZA et al., 2017).

Diante das dificuldades encontradas no tratamento das leishmanioses, surge a necessidade de desenvolver novas alternativas terapêuticas. A aplicação de um emulgel tópico, de liberação modificada permite uma ação local com redução de possíveis reações adversas, sendo uma formulação de fácil obtenção, baixo custo e com possível transposição para escala industrial.

Assim sendo, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar uma formulação tópica de anfotericina B com manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e avaliar a sua atividade sobre *Leishmania major* e sua citotoxicidade sobre células de mamíferos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Materiais

Manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) foi adquirida da Amazon Oil (Brasil), polaxamer 407[®] foi adquirido da Embrafarma (Brasil), desoxicolato de anfotericina B adquirida da Valdequímica (Brasil), ácido oléico foi adquirido da Synth (Brasil), propilenoglicol e metanol foram adquiridos da Vetec (Brasil), sorbato de potássio e ácido sórbico foram adquiridos da Nantong (Brasil), filtro de nitrato de celulose foi adquirido da Sartorius Stedim Biotech (Alemanha), (álcool etílico - teor 99,5%) e álcool metílico PA (teor min. 99,8%) foram adquiridos da Dinâmica (Brasil), AMP ULTRA PC 2000 foi adquirido da Agron (Brasil), água destilada; meio de cultura Schneider's, RPMI (Soro fetal bovino - SFB), MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio Bromo, Azul Alamar (Resazurina[®]), os antibióticos penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Sigma Chemical (Brasil), *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friendlin) obtida do Laboratório de Atividade Antileishmania do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI), macrófagos de camundongos BALB/c machos e fêmeas (4 a 5 semanas de idade), meio tioglicolato fuido puro adquirido da Biosystems (Brasil). Os animais foram provenientes do biotério setorial do NPPM/UFPI. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEEAPI n° 265/2016).

2.1.2 Equipamentos

Espectrofotômetro UV- Visível UV- 1800 (Shimadzu), viscosímetro EW-98965-41 (Cole-Parmer), potenciômetro (Bel W3B), condutivímetro (Marte MB-11), célula de Franz, centrífuga (Excelsa II - Fanem), microscópio óptico (Olympus Cx 40), balança analítica eletrônica Fa2104n (Bioprecisa); agitador magnético/aquecedor (TELGA, TMA 10CF).

2.2 Métodos

2.2.1 Desenvolvimento Tecnológico das Formulações

2.2.1.1 Preparação da Fase de Gel

As emulsões foram obtidas utilizando-se uma farmacotécnica de preparo simples. Para obtenção da fase aquosa usou-se polaxamer 407[®] como agente gelificante, sorbato de

potássio como conservante e água destilada (q.s.p.), sob intumescimento, em refrigerador, por 24 horas (*over night*) (UR-REHMAN, 2011; PINHEIRO et al., 2016).

2.2.1.2 Preparação do Emulgel

Para obtenção da fase oleosa (emulsão) usou-se a manteiga de bacuri (Mb) e propilenoglicol (emoliente), sob leve aquecimento (40°C). Em seguida, adicionou-se o ácido sórbico (conservante) e a Anfotericina B (AmB). O emulgel foi obtido após inversão da fase aquosa sobre a fase oleosa, agitando-se até completa homogeneização. Após 24h verificou-se quanto a homogeneidade e estabilização das formulações para se dar início aos testes de caracterização (PINHEIRO et al., 2016; LIMA, 2017).

2.2.1.3 Design Experimental

Com a finalidade de verificar possíveis alterações nas formulações de Anfotericina B (AmB) e manteiga de bacuri (Mb) no presente estudo, aplicou-se um planejamento fatorial 2^3 , com as seguintes variáveis: (1) presença ou ausência do ácido oleico como promotor de permeação; (2) mudança na concentração da manteiga de bacuri (10% e 15%) e (3) mudança na concentração de polaxamer (20% e 25%) (tabela 1), buscando fatores que possam otimizar as propriedades de liberação das formulações de emulgel (LOPES et al., 2015). A concentração de cada formulação foi decidida com base nos resultados obtidos pelo planejamento fatorial 2^3 (tabela 2). Os resultados do planejamento fatorial foram analisados pelo estudo do Gráfico de Pareto.

Tabela 1: Fatores e níveis utilizados no planejamento fatorial 2^3 para obtenção das formulações de anfotericina B e manteiga da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.).

Fatores	Níveis
(1) Ácido Oleico	Presença
	Ausência
(2) Concentração de manteiga de bacuri	10%
	15%
(3) Concentração de polaxamer	20%
	25%

Fonte: Adaptado de Lopes et al., 2015.

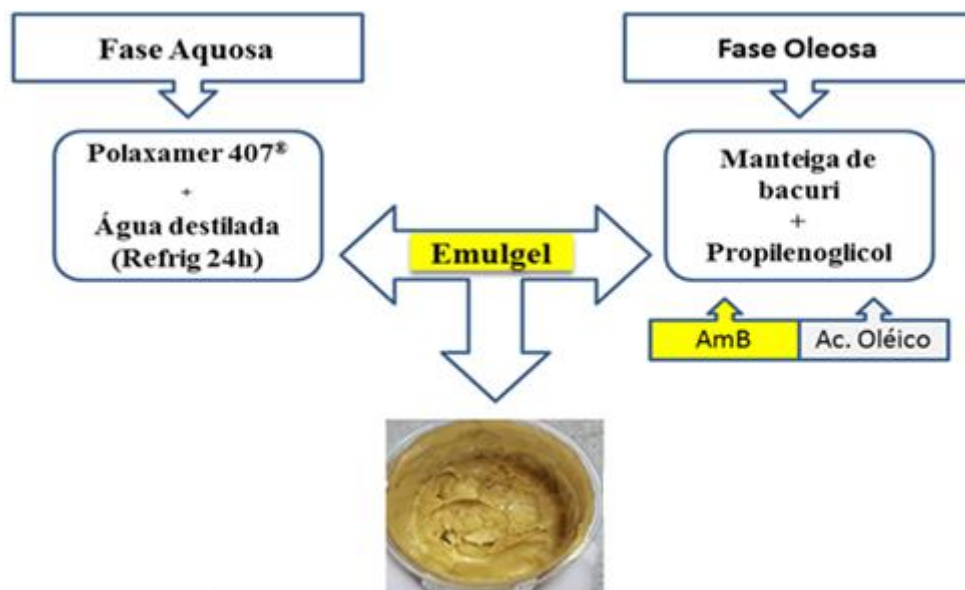
Tabela 2: Planejamento fatorial 2^3 para otimização das propriedades de fluxo das formulações de emulgel de AmB e Mb.

Planejamento Fatorial						
Variáveis	Polaxamer %	Ácido Oleico %	Manteiga %	AmB %	Ácido Sórbico %	Sorbato de K ⁺ %
Formulação						
F1	20	0	10	3	0,2	0,2
F2	20	0	15	3	0,2	0,2
F3	20	5	10	3	0,2	0,2
F4	20	5	15	3	0,2	0,2
F5	25	0	10	3	0,2	0,2
F6	25	0	15	3	0,2	0,2
F7	25	5	10	3	0,2	0,2
F8	25	5	15	3 </td <td>0,2</td> <td>0,2</td>	0,2	0,2

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8; AmB: anfotericina B.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 3: Apresentação esquemática da preparação do emulgel de AmB e Mb.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

2.2.2 Caracterização Físico-química e Estabilidade Preliminar

2.2.2.1 *Características Organolépticas*

A análise macroscópica foi realizada observando-se comportamento de fase direta das formulações, quanto à aparência, coalescência espontânea das fases ou alterações de cor e odor (SMAOUI et al., 2017).

2.2.2.2 *Teste de Centrifugação*

Antecedendo ao protocolo de estudos de estabilidade preliminar, as formulações foram submetidas ao teste de triagem (resistência à centrifugação). Para o teste foram usados 5 g de cada formulação acondicionadas em tubos Falcon e submetidas à centrifugação em 3.000 rotações por minuto (rpm), durante 30 minutos, em temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$). Na sequência, observou-se cada formulação quanto à ocorrência ou não de separação de fases ou de qualquer indício de instabilidade (BRASIL, 2004; DOURADO et al., 2015; OCHOA-ANDRADE et al., 2017).

2.2.2.3 *Estabilidade preliminar*

A estabilidade das formulações foi avaliada de acordo com o Guia de estabilidade de produtos cosméticos e o Guia para realização de estudos de estabilidade contemplando o teste de ciclo gelo-degelo. Em cada ciclo, as amostras foram submetidas à alta temperatura ($45 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e baixa temperatura ($-5 \pm 2^{\circ}\text{C}$) a cada 24h, durante doze dias, totalizando seis ciclos. (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; DAHER et al., 2014; DAUT et al., 2015). Os parâmetros analisados para cada formulação, com resultados expressos pela média \pm desvio padrão (média \pm DP, $n = 3$), antes e após os testes foram: características organolépticas, pH, condutividade elétrica, espalhabilidade e viscosidade.

2.2.2.4 *Determinação do tamanho de gotículas*

A análise do tamanho das gotículas foi determinada por microscopia óptica, na objetiva de imersão, em temperatura ambiente. Foram analisadas três lâminas de cada formulação, medindo-se o diâmetro de 100 gotículas por lâmina. Para preparação das lâminas, foram diluídas as amostras em solução de propilenoglicol e água destilada (1:1), na proporção de uma parte de amostra para 10 partes da solução (PINHEIRO, 2014).

2.2.2.5 Determinação do pH

O pH das formulações foi realizado à temperatura ambiente ($25,0 \pm 2,0^\circ\text{C}$), utilizando-se um Potenciômetro Bel W3B, previamente calibrado com solução tampão pH 4,0 e 7,0. As medições foram realizadas por imersão direta do eletrodo de vidro na amostra (ANVISA, 2010; DOURADO et al, 2015). Para ajuste de pH das formulações destinadas aos testes *in vivo*, foi utilizado neutralizador AMP (Aminometil Propanol) ULTRA PC 2000, permanecendo estes na faixa de 5,8 e 6,3.

2.2.2.6 Determinação da Condutividade Elétrica

As medidas de condutividade dos emulgeis foram realizadas à temperatura de 25°C , através imersão direta do eletrodo na amostra, sem diluição prévia (DAHER et al., 2014).

2.2.2.7 Determinação da Viscosidade

A viscosidade foi realizada utilizando viscosímetro rotativo digital, do tipo Brookfield (figura 4). As velocidades utilizadas para a curva ascendente foram: 6, 12, 30, 60 e 100 rpm (rotações por minuto), com o uso do spindle dois (SP = 2), à temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). A velocidade de cisalhamento tem como unidade s^{-1} , mas em determinações de viscosímetros rotacionais, como o de Brookfield, costuma-se usar a medida de rotações por minuto (OCHOA-ANDRADE et al., 2017).

Figura 4: Viscosímetro rotativo digital do tipo Brookfield, usado para realização do teste de viscosidade das formulações.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

2.2.2.8 Determinação da Espalhabilidade

Para determinação da espalhabilidade, utilizou-se o método do dispositivo para determinação *in vitro* de Knorst (1991), apud Cordeiro et al. (2013), que corresponde à relação entre a área de espalhamento alcançado com a aplicação de esforço sobre o produto e o esforço limite.

Para a realização do teste, foi utilizada uma placa-base de vidro, posicionada sobre uma escala milimetrada (figura 5). Com o auxílio de uma seringa, foi colocado um grama (1g) da amostra no orifício central da placa, e sobre esta, colocou-se uma placa de vidro de peso pré-estabelecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros alcançados pela amostra, em posições opostas (horizontal e vertical) com auxílio de uma escala milimetrada. Repetiu-se este procedimento acrescentando-se sucessivamente as doze placas, em intervalos de um minuto entre uma placa e a outra. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio e os resultados foram expressos de acordo com a equação $E_i = d^2 \cdot \pi / 4$, onde: “ E_i ” expressa a espalhabilidade da amostra para um determinado peso em milímetro quadrado (mm^2) e “ d ” corresponde ao diâmetro médio em milímetro (mm). Os resultados foram expressos pela média de três determinações e as medições foram realizadas antes e após o teste de estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo).

Figura 5: Teste de espalhabilidade das formulações.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

2.2.2.9 Determinação do teor de Anfotericina B por Espectrofotometria no Ultravioleta (UV – VIS)

O teor do fármaco na preparação semissólida, foi determinado por método previamente validado por Pinheiro (2014) e revisado por Lima (2017), onde a análise da quantidade de AmB presente nas amostras foi determinada na região do visível usando um

espectrofotômetro UV-Vis em comprimento de onda 405,4 nm, com auxílio do software UV-Probe 2.42. Uma curva de calibração foi construída nos pontos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µg/mL, e foi utilizado metanol como solvente (PINHEIRO, 2014).

Pesou-se 0,025 g da formulação e diluídas em metanol, com volume total de 25 mL. Após 20 minutos, fez-se uma diluição de 1:10 com metanol em balão volumétrico de 10 mL, resultando em uma concentração teórica de 3 µg/mL. Absorbâncias obtidas a partir de soluções de fármaco foram processadas para eliminar o erro dado por possíveis interferências de qualquer excipiente absorvente no mesmo comprimento de onda ($\lambda = 405,4$ nm). Assim, utilizou-se metanol como branco.

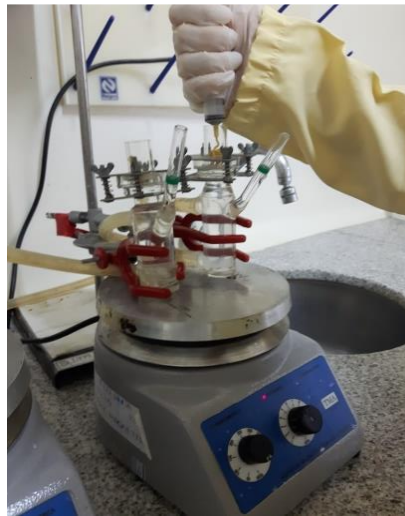
2.2.3 Ensaio de Liberação *in vitro*

2.2.3.1 Ensaio de liberação *in vitro* utilizando células de difusão do tipo Franz

Os estudos de liberação foram realizados utilizando células de difusão do tipo Franz (figura 6 e 7), com área de difusão efetiva de 1,15 cm², usando membranas artificiais de nitrato de celulose 0,45µm. O compartimento receptor foi preenchido com uma solução pronilenoglicol/etanol (7:3) num sistema composto de seis células individuais conectado a um banho-maria termostatizado (37°C), sob agitação constante de 100 rpm em agitador magnético por um período de 6 horas (figura 6).

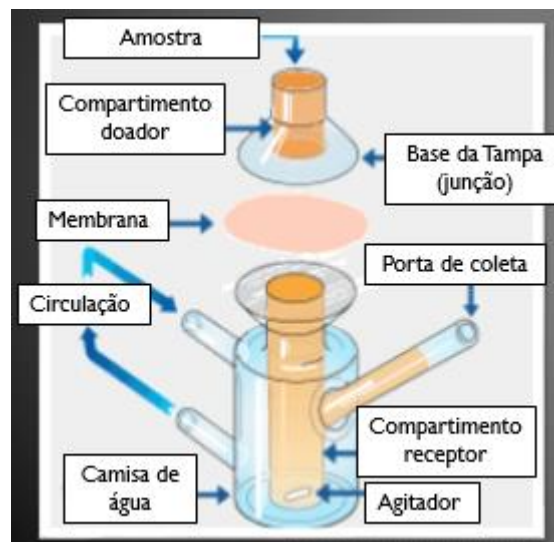
As membranas foram colocadas na parte superior da célula receptora e no compartimento doador, foi colocado aproximadamente 0,4 g da formulação, diretamente sobre a membrana sem oclusão. As amostras da solução receptora foram coletadas nos tempos: 0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0 e 6,0 para cinética de 6 horas. Foram coletados 3 mL em cada intervalo e para manutenção das condições *sink* do sistema, foi repostado o mesmo volume de meio receptor (FRANZ, 1975). A concentração de AmB liberada foi determinada por espectrofotometria UV-Vis através do método analítico desenvolvido e validado previamente por Pinheiro (2014).

Figura 6: Agitador magnético e células de difusão *in vitro*, tipo Franz.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 7: Ilustração dos componentes da uma célula de difusão, tipo Franz, usados para realização de testes de cinética de liberação.



Fonte: adaptado de [researchgate.net/figure](https://www.researchgate.net/figure)

2.2.4 Avaliação da Atividade Antileishmania *in vitro*

2.2.4.1 Obtenção de Células e Parasitos

Para a avaliação da atividade antileishmania foi utilizada a cepa *L. major* (MHOM/IL/80/Friendlin). As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider's suplementado (10% de soro fetal bovino (SFB), 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de

estreptomicina, incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C). Foram coletados macrófagos murinos das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c machos e fêmeas (4 a 5 semanas de idade), após elicitação prévia (72 horas) pela aplicação de 2 mL de tioglicolato a 3% via intraperitoneal.

2.2.4.2 Atividade Antileishmania das formas Ppromastigotas de *L. major*

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. major* em fase logarítmica de crescimento. Os parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmania/100 μ L de meio já contendo as formulações adicionadas previamente aos poços, em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo oito faixas de concentrações finais desejadas (800 a 6,25 μ g/mL). A placa foi incubada em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) à temperatura de 26°C por 48 h e, restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 μ L de resazurina 1×10^{-3} mol/L, quando incubou-se novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek 31 (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%) (OLIVEIRA et al., 2017; ALVES et al., 2017). O controle positivo foi realizado com 2 μ g/mL de AmB em meio Schneider's e o controle negativo equivaleu ao meio Schneider's, somente. Neste caso, a AmBc foi considerada 100% de viabilidade para os parasitos (VALADARES et al., 2011; ALVES et al., 2017).

2.2.5 Determinação da Citotoxicidade

2.2.5.1 Citotoxicidade sobre Macrófagos e Índice de Seletividade (IS)

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços utilizando o ensaio com o MTT. Foram incubados 2×10^5 macrófagos por poço em 100 μ L de meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de SFB, 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 4 h para a adesão celular. Após esse período retirou-se o sobrenadante para remoção das células que não aderiram. As formulações foram diluídas em meio RPMI suplementado, adicionados à placa contendo os macrófagos em concentrações seriadas atingindo oito faixas de concentrações finais (800 a 6,25 μ g/mL), e incubados a 37°C e 5% de CO₂ durante 48 h. Após esse período, a citotoxicidade foi avaliada por adição de 10 % de MTT [5 mg/mL] diluído em 100 μ L de meio RPMI suplementado e incubou-se novamente a placa durante 4 horas a 37°C e 5% de CO₂. Passado esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos por adição de 100 μ L de DMSO.

Finalmente, a absorvância (550 nm) foi medida utilizando um leitor de placas Biotek (ELx800). O índice de seletividade de cada tratamento foi calculado dividindo a concentração citotóxica média (CC₅₀) observada para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pela concentração inibitória média (CI₅₀), calculada para as diferentes formas de apresentação do parasita (OLIVEIRA et al., 2017).

2.2.6 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm DP de pelo menos três repetições. A concentração inibitória média (IC₅₀), a concentração citotóxica média (CC₅₀) com um limite de confiança de 95% foram calculadas utilizando a regressão probit do programa SPSS 13.0. O índice de seletividade foi calculado dividindo o CC₅₀ por IC₅₀. Análises de variância ANOVA seguida do teste de Bonferroni foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.0, tomando como valor máximo de significância estatística o valor de $p < 0,05$. O gráfico de Pareto foi estruturado para cada parâmetro com os resultados obtidos usando o software Minitab® 18.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Planejamento Fatorial

A partir do estudo fatorial 2³, usando três variáveis independentes, obteve-se oito combinações em diferentes concentrações da manteiga de bacuri, do gel e a presença ou ausência do promotor de permeação, sendo possível definir as condições ideais de produção das formulações, com alta eficiência.

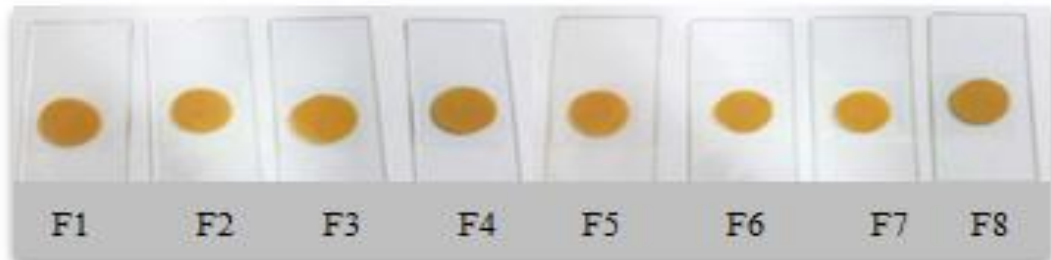
O planejamento fatorial de dados é uma ferramenta que visa diminuir a quantidade de variáveis originais a serem utilizadas, diminuindo assim quantidade de combinações que podem ser obtidas. É bastante utilizada em pesquisas, pois auxilia na mensuração de possíveis problemas que venham a ocorrer durante a pesquisa. (ZELLER; CARMINES, 1980; FILHO; JÚNIOR, 2010; SOLIMAN et al., 2016)

3.2 Características Organolépticas

Neste estudo, as emulsões recém-preparadas apresentaram-se homogêneas, brilhosas, com sensorial viscoso, sem sinais de instabilidade, com odor característico atribuído à manteiga de bacuri, cor amarela escura, onde F2, F4, F6 e F8 apresentaram tonalidade um

pouco mais escura que as demais, em virtude de possuírem maior concentração da Mb nestas formulações (figura 8) (CANUTO et al., 2010).

Figura 8: Aspecto visual das formulações do emulgel de AmB e Mb.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

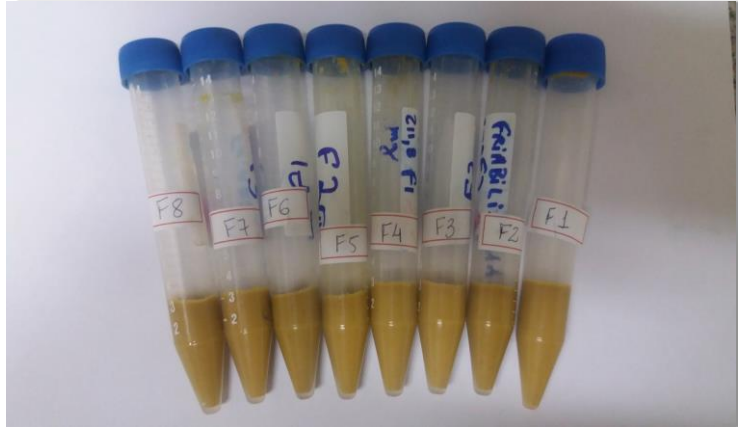
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.3 Resistência à Centrifugação

A centrifugação é considerada uma ferramenta amplamente utilizada nos estudos de estabilidade de sistemas dispersos, permitindo observar possíveis instabilidades físico-químicas das formulações, em curto espaço de tempo (GHOSH et al., 2013).

Todas as formulações submetidas ao teste de resistência à centrifugação (figura 9) permaneceram estáveis, sem qualquer evidência de separação de fases, portanto, foram aprovadas neste teste de triagem que antecede a análise da estabilidade preliminar. O teste de centrifugação não deve necessariamente indicar a estabilidade física das amostras, porém, fornece informações rápidas sobre separação de fases, podendo dessa forma, indicar a necessidade de reformulação do produto (BRASIL, 2008) sendo também eficiente para selecionar as formulações que devem ser submetidas aos testes de estabilidade preliminar, acelerada e de prateleira (BRASIL, 2004).

Figura 9: Formulações de emulgel de AmB e Mb, após teste de resistência à centrifugação.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.4 Estabilidade Preliminar

Após o teste de estabilidade preliminar (ciclo gelo-degelo), as formulações F2, F5 e F6 apresentaram sinais macroscópicos de instabilidade (separação de fases); as demais formulações permaneceram sem alterações na cor, odor, aparência e homogeneidade. Segundo Mollica, Ahuja, Cohen (1978) e (SILVA et al., 2009a) a estabilidade dos produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade, luz e de outros fatores relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas, de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação; e que o estudo da estabilidade preliminar orienta a obtenção da formulação, a escolha do material de acondicionamento, permite estimar as alterações organolépticas que venham a aparecer, assegurando assim a qualidade do produto.

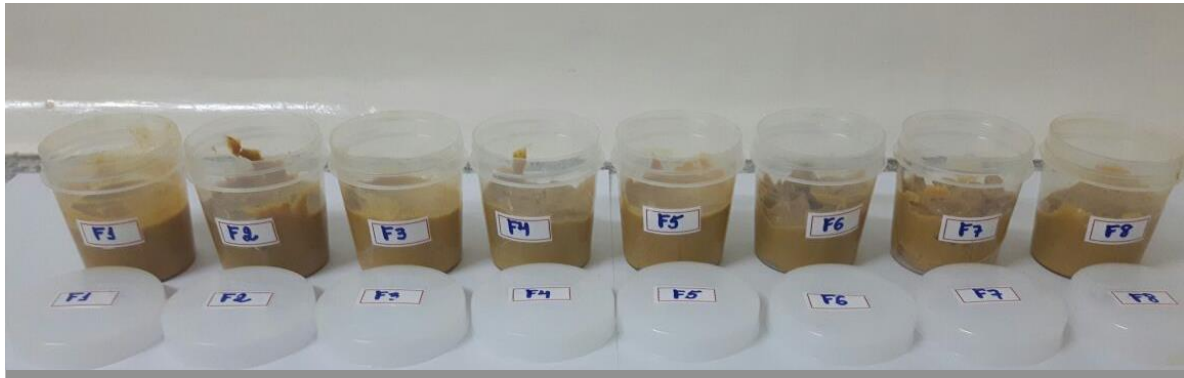
Tabela 3: Características organolépticas das formulações de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo.

	Antes da Estabilidade Preliminar			Após Estabilidade Preliminar		
	Cor	Odor	Aspecto	Cor	Odor	Aspecto
F1	P	P	P	P	P	P
F2	P	P	P	P	P	M
F3	P	P	P	P	P	P
F4	P	P	P	P	P	P
F5	P	P	P	P	P	M
F6	P	P	P	P	P	M
F7	P	P	P	P	P	P
F8	P	P	P	P	P	P

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.; P: padrão; M: moderada.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

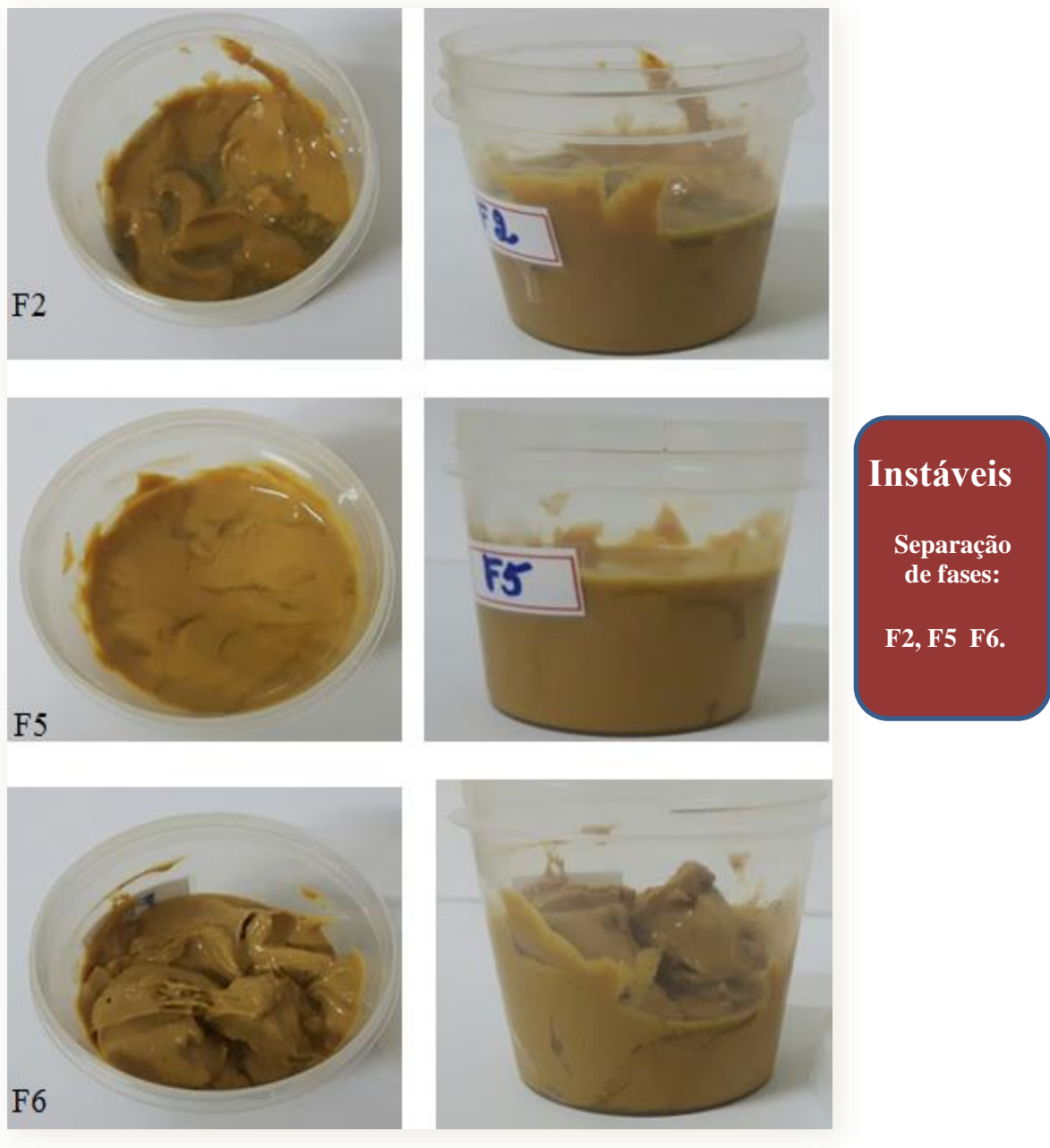
Figura 10: Aspecto visual das formulações de emulgel de AmB e Mb, após teste do ciclo gelo-degelo.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 11: Aspecto visual Condutividade média das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo, que apresentaram separação de fases.



Legenda: F2: Formulação 2; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

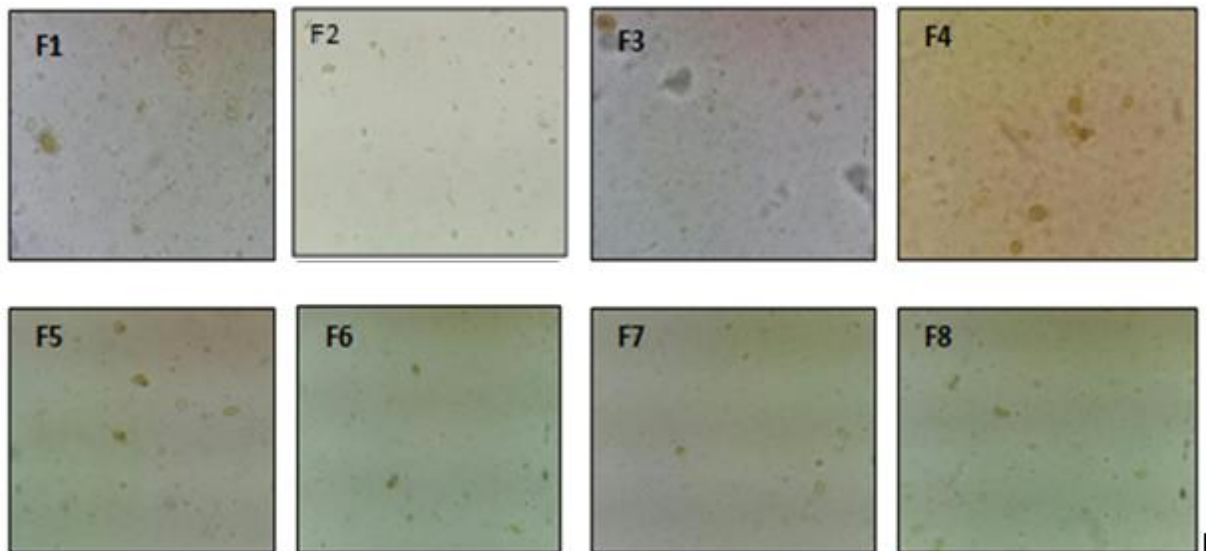
3.5 Microscopia

A microscopia óptica é um método que possibilita a visualização direta do aspecto real das gotículas lipídicas e a detecção de instabilidade física (ANTUNES, 2007), sendo que a incorporação de fármacos, Segundo Marcato (2009), pode influenciar o diâmetro e a distribuição das gotículas.

No método de microscopia óptica não foi possível observar gotículas em nenhuma das formulações (figura 12). Estes resultados discordam dos obtidos em estudo realizado por Pinheiro (2014), onde se analisou emulgeis de AmB 3% com diferentes promotores de permeação, sendo possível a determinação do tamanho das gotículas pelo mesmo método empregado no presente estudo. Esta divergência pode ser justificada, devido adição da manteiga de bacuri, produto este rico em lipídios, podendo o mesmo ter reduzido às gotículas a tamanhos não detectados pelo método aplicado, sendo necessários estudos de microscopia eletrônica.

Estudiosos defendem que nenhum método isolado é plenamente suficiente para caracterizar os sistemas em termos de tamanho de gotículas, portanto uma combinação de pelo menos duas técnicas é recomendada, sendo uma dessas técnicas a microscópica (KLANG et al., 2012).

Figura 12: Imagem da microscópica das formulações de emulgel de AmB e Mb, em objetiva de 100x.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

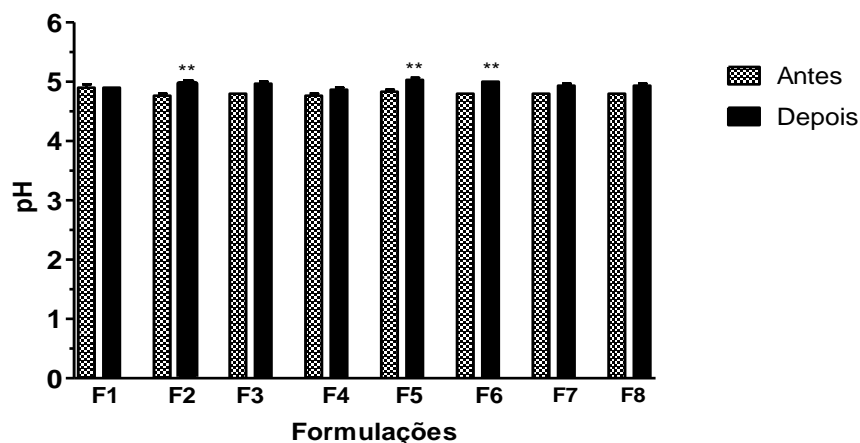
3.6 Determinação do pH

A compatibilidade da pele é o principal requisito para uma boa formulação tópica (levemente ácido compreendido na faixa entre 4,6 à 5,8) (GONÇALVES; CAMPOS, 2009; BAIBHAY et al., 2009) e também com o pH em que o fármaco incorporado exige para sua ótima eficácia. A tolerância biológica máxima da pele às formulações tópicas varia entre pH 4,6 à 7,5 (SILVA e al., 2009), porém, faz-se necessário uma alcalinização das formulações em torno de pH 6,0 pois além de ideal para uma formulação tópica, pode proporcionar uma maior ação do fármaco durante o tratamento, visto que o pH em que a AmB tem sua atividade terapêutica máxima está compreendido entre a faixa de 6 a 7,5 (Kaur; Kakkar, 2010; ARAUJO, 2013).

Os valores de pH encontraram-se na faixa de 4,73 à 5,02. Após o ciclo gelo-degelo, o pH variou entre 4,84 à 5,09, verificando-se diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) nas formulações F2, F5 e F6 (figura 13). Estas foram as mesmas que com comportamento de instabilidade (separação de fases) na análise macroscópica após o teste de estabilidade. Nas demais formulações, os valores de pH mostram-se com adequação para aplicação tópica.

Para proporcionar uma maior ação do fármaco durante o tratamento, fez-se necessário ajuste do pH das formulações para a faixa, em torno de pH 6,0.

Figura 13: O pH médio das formulações de emulgel de AmB e de emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

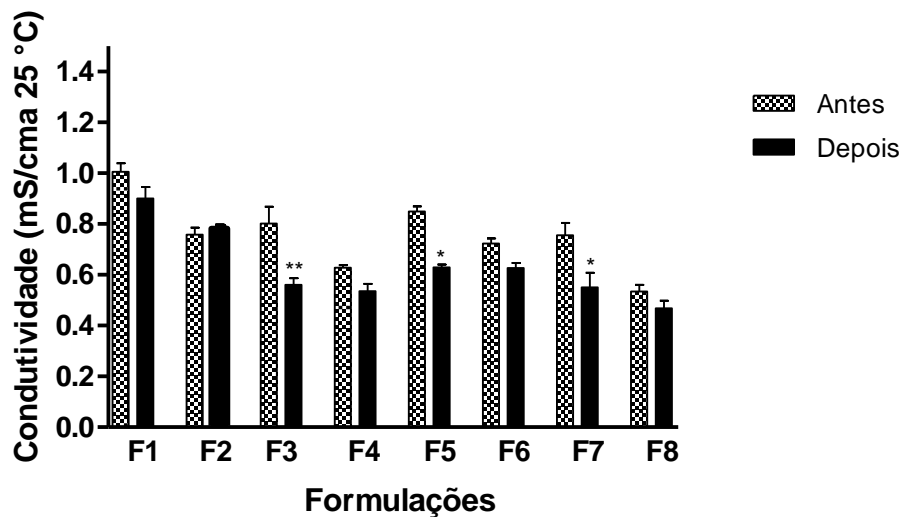
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.7 Condutividade Elétrica

No que concerne a condutividade, com exceção da formulação F2, todas as outras formulações apresentaram diminuição da condutividade após do ciclo gelo-degelo (figura 14) apresentando diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em F3, F5 e F7.

A diminuição da condutividade elétrica nas formulações após o ciclo gelo-degelo, exceto em F2, pode ser explicado pela proporção da fase aquosa ser maior em relação à fase oleosa e também pela evaporação de água, quando submetidas a temperaturas elevadas durante o ciclo. No entanto, o fato de apenas F2 ter aumentado sua condutividade após o ciclo, pode ser decorrente da instabilidade apresentada por esse emulgel, após o ciclo gelo-degelo. A medição da condutividade elétrica de uma formulação permite estimar a capacidade da fase dispersante ser formada por óleo ou água, sendo possível determinar os domínios polares ou apolares (NAOUI et al., 2011).

Figura 14: Condutividade média das formulações de emulgel de AmB e emulgel de AmB e Mb, antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.8 Determinação da Viscosidade

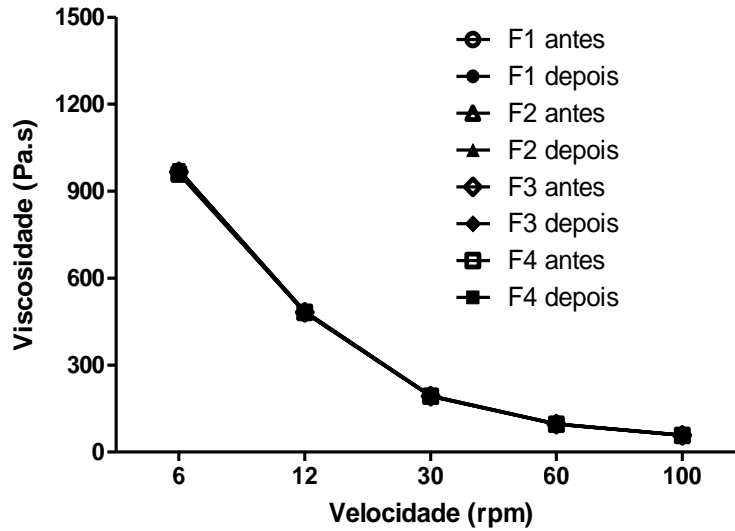
Os resultados para a viscosidade demonstraram que os emulgéis sofrem deformação com a aplicação de uma força, reportando uma diminuição da viscosidade com o aumento da velocidade de 6 a 100 rpm (figuras 15 e 16).

Em uma formulação estável, a aplicação de uma força, como a que é aplicada para espalha-lá sobre a pele, não induz mudanças estruturais irreversíveis que possam ser interpretadas como perda de estabilidade. O teste de viscosidade permite analisar como as formulações comportam-se mediante a aplicação de diferentes forças, pois quanto mais viscosa ela for, menos se espalhará sobre a pele (ANDRADE; PARENTE; ARES, 2014).

As formulações exibiram comportamento não-newtoniano mostrando uma redução da viscosidade com o aumento da velocidade de cisalhamento, podendo inferir um provável comportamento pseudoplástico, que pode ser confirmado com a utilização de um reômetro. O comportamento pseudoplástico é identificado quando há uma diminuição da viscosidade com o aumento da tensão de cisalhamento, fazendo com que o composto se torne mais fluido. No entanto, após a retirada da força, elas voltam ao seu estado inicial (SUÑER, 2017).

No que se refere à administração tópica, a característica tixotrópica, encontrada nos emulgéis contribui com o tempo de retenção da formulação no local de aplicação, pois maior é a capacidade de se tornar mais fluida quando submetida a uma pressão externa. Assim, espalha-se mais facilmente na região de aplicação (SUÑER et al., 2017) e contribui para a liberação do fármaco e sua biodisponibilidade na pele (ROGGIA et al., 2014).

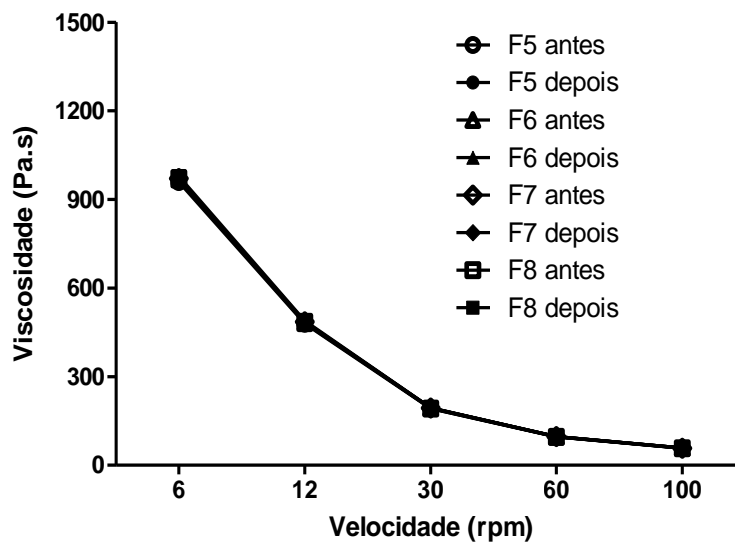
Figura 15: Viscosidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F1 - F4), antes o ciclo gelo-degelo.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 16: Viscosidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F5 - F8), antes e após ciclo gelo-degelo.



Legenda: F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

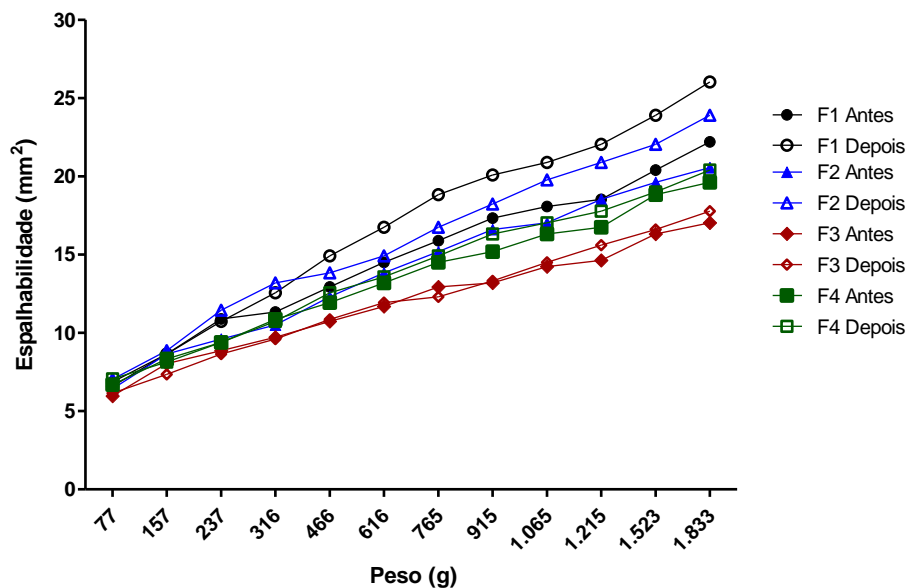
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.9 Espalhabilidade

Nas figuras 17 e 18, pode-se observar que as formulações F1, F2, F5, F6 e F7 aumentaram a espalhabilidade após o ciclo gelo-degelo, ao passo que F3, F4 e F8 diminuíram.

O aumento da espalhabilidade nas formulações F2, F5 e F6 após o ciclo gelo-degelo, pode ser justificado pela perda da estabilidade dos emulgeis (separação de fases) tornando o sistema mais fluido. As alterações de comportamento nos demais emulgeis, não afetaram de forma crítica sua propriedade de dispersão, o que demonstra que as concentrações do polímero utilizado na formulação, não afetaram a qualidade do produto. Segundo Nikumbh, Sevankar, Patil (2015), uma boa capacidade de espalhamento, ou seja, de dispersão, é critério essencial para os emulgeis, e Cordeiro et al., (2015) ressalta sobre a importância da mesma para melhor aceitação do produto.

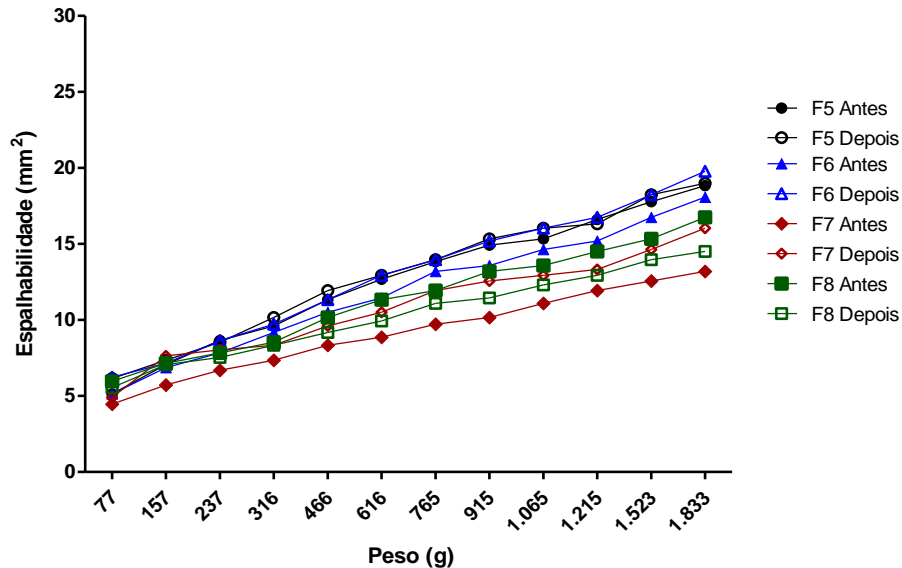
Figura 17: Espalhabilidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F1- F4), antes e após o ciclo gelo-degelo, em diferentes forças aplicadas.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 18: Espalhabilidade média das formulações de emulgel de AmB e Mb (F5- F8), antes e após o ciclo gelo-degelo, em diferentes forças aplicadas.

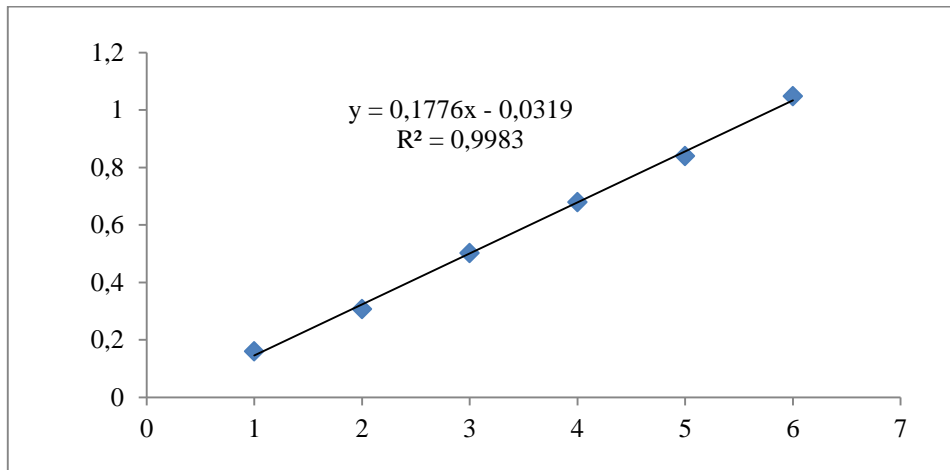


Legenda: F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.
 Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.10 Determinação da Anfotericina B por Espectrofotometria no Ultravioleta

Para que fosse possível determinar o teor de AmB presente em cada uma das formulações foi construída uma curva de calibração analítica, usando a absorbância de 405,4 nm (figura 19). Este valor de absorbância foi escolhido segundo achados na literatura, descritos por (PINHEIRO, 2014) que validou uma metodologia de quantificação para o fármaco em questão. A curva analítica construída apresentou equação da reta $y = 0,1776x - 0,0319$, onde, y é absorbância e x a concentração em $\mu\text{g/mL}$ da amostra analisada. O coeficiente de linearidade obtido foi $r^2 = 0,9983$, sendo ele significativo.

Em toda formulação, o teor do fármaco presente deve estar dentro dos padrões estabelecidos em compêndios oficiais. De acordo com a USP (2016) o intervalo do teor de AmB em formulações tópicas não pode conter menos de 90% ou mais de 125%. Pode ser observado na tabela 4 que todas as formulações estavam dentro da faixa de teor estabelecido, apesar da formulação F1 ter apresentado uma diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$ (figura 20), ela ficou dentro da faixa de teor aceita pela farmacopeia americana.

Figura 19: Curva de calibração da AmB nas concentrações de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 µg/mL, em metanol.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

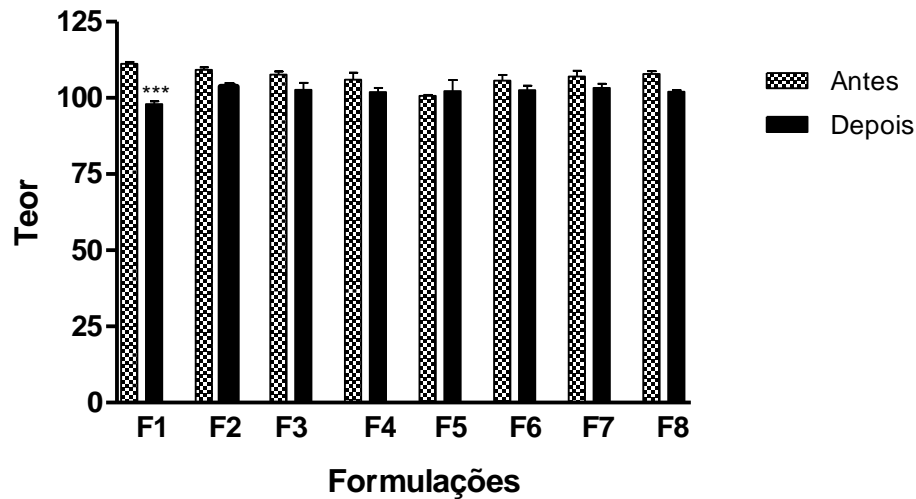
Tabela 4: Teor médio da AmB nas formulações de emulgel de AmB e Mb (% p/p), antes e após ciclo gelo-degelo.

Formulações	Média do Teor (%)	Média do Teor (%)
	Antes da Estabilidade	Depois da Estabilidade
F1	111,2328	97,95045
F2	109,1854	103,6878
F3	107,6434	102,696
F4	105,9995	101,8814
F5	100,7095	102,2452
F6	105,7153	102,5932
F7	107,0516	103,3294
F8	107,8311	101,9949

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 20: Teor médio da AmB nas formulações de emulgel de AmB e Mb (% p/p), antes e após o ciclo gelo-degelo. ANOVA One-way foi realizada, seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Bonferroni, assumindo * $p < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.11 Cinética de Liberação *in vitro*

A avaliação da cinética de liberação de formas farmacêuticas semissólidas de aplicação tópica é crucial na adequabilidade delas como veículos capazes de prover a sua disponibilização em nível epidérmico, além de apresentar-se como uma ferramenta imprescindível no controle de qualidade de formas farmacêuticas não convencionais. Por isso, além dos parâmetros acima descritos, outro fator determinante na escolha de uma formulação é o seu perfil de liberação *in vitro* (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

A liberação de uma substância biologicamente ativa a partir de formulações tópicas é diretamente dependente das propriedades do veículo e do fármaco, ocorrendo, geralmente, por combinação dos mecanismos de difusão do ativo através da matriz do veículo e do coeficiente de partição (PINHEIRO, 2014).

A fim de prever e correlacionar a cinética de liberação *in vitro* dos fármacos a partir de suas formas farmacêuticas, diversos modelos matemáticos foram propostos, sendo os mais aplicáveis os de ordem zero, primeira ordem e Higuchi, cujas respectivas equações encontram-se apresentadas na tabela 5, onde Q representa a quantidade de fármaco liberado em função de tempo t, Q_0 a quantidade inicial de fármaco, k a constante de velocidade

característica do modelo e n é o expoente de liberação (ALMEIDA, 2014). A tabela 5 mostra os modelos cinéticos mais utilizados.

Tabela 5: Modelos matemáticos comumente utilizados para descrever as curvas de dissolução de substâncias ativas.

Modelos matemáticos	Equações
Ordem zero	$Q = kt + Q_0$
Primeira ordem	$Q = Q_0 \cdot e^{kt}$
Higuchi	$Q = kt^{0,5}$

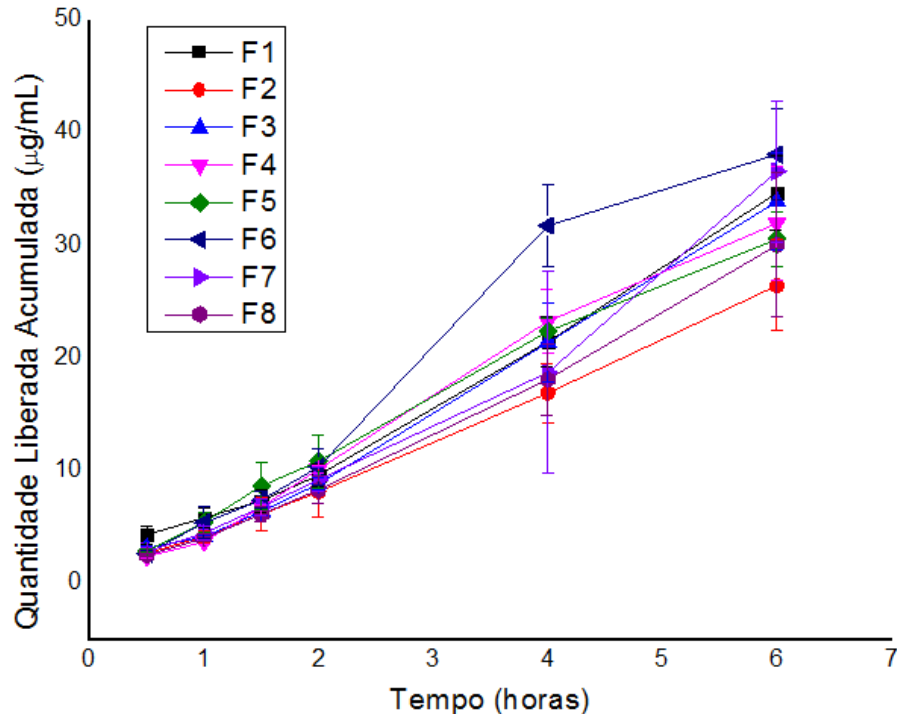
Fonte: Adaptado de Almeida (2014).

O modelo cinético de ordem zero é utilizado para descrever a dissolução do fármaco a partir de sistemas, cuja velocidade de liberação independe de sua concentração na forma farmacêutica. Já o modelo de primeira ordem descreve a cinética a partir de sistemas onde a liberação do ativo ocorre por um mecanismo difusional, sendo proporcional à quantidade que permanece em seu interior. No modelo de Higuchi, também conhecido como pseudo-ordem zero, o processo de liberação do fármaco é baseado na lei de difusão de Fick, dependente da raiz quadrada do tempo (ALMEIDA, 2014).

A partir da cinética de liberação *in vitro*, foi verificado que a melhor adequação das formulações foi ao modelo de liberação matemática de primeira ordem. Esta relação pode ser usada para descrever a difusão do fármaco em formas farmacêuticas tais como matrizes solúveis em água (RAMTEKE et al., 2014).

O gráfico da cinética de liberação *in vitro* foi construído considerando o tempo em horas (figura 21). Observa-se nos três primeiros pontos que a liberação do fármaco apresentava-se semelhante entre todas as formulações já que todas as formulações eram emulgéis, havendo uma maior diferenciação entre os perfis de liberação das formulações principalmente nos três últimos pontos, no “steady state” (estado estacionário).

Figura 21: Perfil de liberação da Anfotericina B a partir das formulações de emulgel de AmB e Mb.



Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

A figura 21 mostra os valores da quantidade acumulada de AmB libertada no prazo de 6 horas (Q6) nos ensaios de libertação *in vitro*; onde podemos observar que as formulações F1, F6 e F7 foram as que liberaram uma quantidade maior de AmB no ponto final (Q6). O perfil de libertação *in vitro* de AmB nas emulsões é apresentado na Figura 6. As três posições iniciais do gráfico demonstram que a libertação do fármaco é semelhante em todas as formulações. Esta semelhança fundamental na libertação do fármaco é devido às formulações apresentarem características de um sistema modificado de libertação de fármaco; uma diferenciação entre os perfis de libertação das formulações é observada apenas nos três últimos pontos da curva, denominados “steady state” (estado estacionário). O coeficiente de determinação correspondente aos modelos matemáticos aplicados determina qual modelo melhor descreve o perfil de libertação da AmB. No entanto, os valores foram muito próximos (tabela 6), então o resíduo do quadrado médio (RQM) foi utilizado para avaliar o modelo que melhor se adequava. A partir dos modelos matemáticos aplicados, o modelo de primeira

ordem é o mais adequado, pois o RQM foi menor que os demais modelos comparados no estudo (tabela 6), indicando melhor adequação.

Tabela 6: Coeficientes de determinação, coeficiente de liberação e resíduo do quadrado médio para os diferentes modelos cinéticos de liberação das formulações de emulgel de AmB e Mb.

	Ordem Zero		RQM	Primeira Ordem		RQM	Higuchi		RQM
F1	$r^2= 0,989$	$k=0,00052$	1,9512	$r^2= 0,953$	$k=9,6 \times 10^{-5}$	0,0070	$r^2= 0,935$	$k=0,00199$	11,5086
F2	$r^2= 0,998$	$k=0,00038$	0,2512	$r^2= 0,989$	$k=8,8 \times 10^{-5}$	0,0019	$r^2= 0,960$	$k=0,00146$	4,2500
F3	$r^2= 0,992$	$k=0,00052$	1,4398	$r^2= 0,965$	$k=0,00010$	0,0070	$r^2= 0,944$	$k=0,00200$	10,447
F4	$r^2= 0,993$	$k=0,00045$	1,3192	$r^2= 0,986$	$k=8,8 \times 10^{-5}$	0,0034	$r^2= 0,973$	$k=0,00176$	4,7948
F5	$r^2= 0,996$	$k=0,00041$	0,6225	$r^2= 0,998$	$k=7,9 \times 10^{-5}$	0,0003	$r^2= 0,985$	$k=0,00159$	2,1178
F6	$r^2= 0,964$	$k=0,00058$	10,2335	$r^2= 0,983$	$k=0,00496$	0,0042	$r^2= 0,949$	$k=0,00227$	14,456
F7	$r^2= 0,974$	$k=0,00057$	5,3887	$r^2= 0,980$	$k=0,00455$	0,0041	$r^2= 0,912$	$k=0,00216$	18,0106
F8	$r^2= 0,994$	$k=0,00045$	0,8646	$r^2= 0,988$	$k=9,6 \times 10^{-6}$	0,0025	$r^2= 0,948$	$k=0,00173$	7,3381

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

A membrana semipermeável controla a velocidade de liberação do fármaco a partir do reservatório. O controle do fluxo do fármaco depende do tamanho dos poros, no caso de membranas microporosas, ou da dissolução e difusão do fármaco em membranas poliméricas densas (RUELA, 2012). As formulações F1, F3, F6 e F7 apresentaram os maiores valores de fluxo (tabela 7).

Tabela 7: Fluxo de liberação de AmB a partir das formulações de emulgel de AmB e Mb.

Formulação	Fluxo ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{h}^{-1}$)
F1	6,25
F2	4,58
F3	6,26
F4	5,45
F5	4,92
F6	6,93
F7	6,84
F8	5,43

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.

Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Na tabela 8, verificam-se os valores liberados em 6 horas (Q6) no estudo de cinética de liberação *in vitro* e pode-se observar que as formulações que apresentaram maior quantidade de fármaco liberado ao final do período analisado foram F1, F6 e F7. A formulação F6, que possuiu maior liberação, apesar de não conter o promotor de permeação, apresentava maior porcentagem de manteiga de bacuri (15%), o que demonstra que esse componente pode ter auxiliado na liberação do fármaco. A formulação F7 que possui em sua composição 5% de ácido oléico apresentou a segunda maior liberação, o que pode ser explicado pelo fato dessa substância ser utilizada como promotor químico de liberação, o que promoveu aumento da passagem da AmB através de membranas. Associa-se essa promoção na permeação em membranas ao aumento da permeabilidade da pele por meio de uma perturbação seletiva das bicamadas lipídicas entre as células presentes no estrato córneo (SRISUK, 2012). Já a formulação F1 apesar de não conter o ácido oleico, apresentava concentração inferior de gel polaxamer em sua composição, o que pode reduzir o aprisionamento do fármaco na matriz polimérica do gel, resultando por fim em uma maior difusão do princípio ativo através da matriz. Entretanto, apesar de ter sido observado diferenças na quantidade final liberada, não houve diferença estatisticamente significativa após realização de teste ANOVA seguido de pós-teste de Tukey para $p < 0,05$.

Tabela 8: Quantidade de AmB liberada a partir das formulações de emulgel de AmB de emulgel de AmB e Mb, em 6 horas.

Formulação	Q6 (μg)
F1	34,7015
F2	26,5020
F3	33,9525
F4	32,0209
F5	30,6130
F6	38,1368
F7	36,6416
F8	30,0949

Legenda: F1: Formulação 1; F2: Formulação 2; F3: Formulação 3; F4: Formulação 4; F5: Formulação 5; F6: Formulação 6; F7: Formulação 7; F8: Formulação 8.
 Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

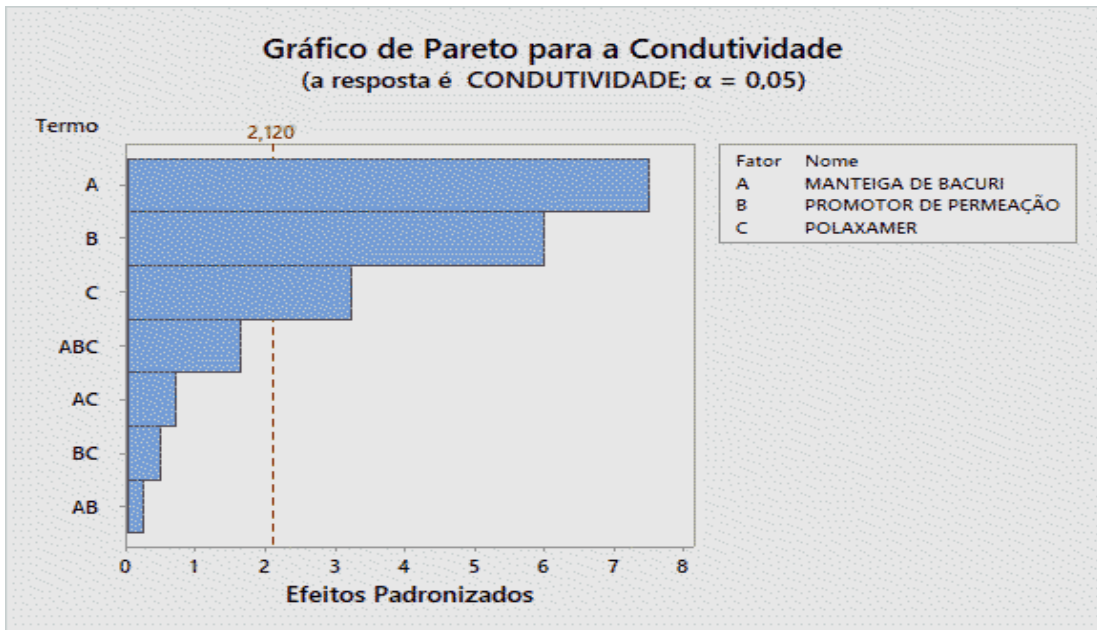
3.12 Diagrama de Pareto

O Diagrama de Pareto é uma ferramenta básica da qualidade que permite ao pesquisador visualizar e identificar causas ou problemas com as variáveis do estudo, bem como, seus efeitos e suas interações, segundo o grau de significância, sempre do maior para o menor, permitindo assim, as priorizações em relação às ações que devem ser realizadas. Este diagrama proporciona a demonstração da relação de ação/benefício e é composto basicamente por um gráfico de barras que ordena a frequência dos acontecimentos de forma decrescente (SELEME; HUMBERTO, 2012).

Para verificar quais variáveis modificadas no planejamento fatorial 2^3 (tabela 2) apresentou maior influencia nas propriedades de pH, condutividade, viscosidade, espalhabilidade e fluxo de liberação da formulação, estruturou-se um gráfico de Pareto, para cada parâmetro, com os resultados obtidos.

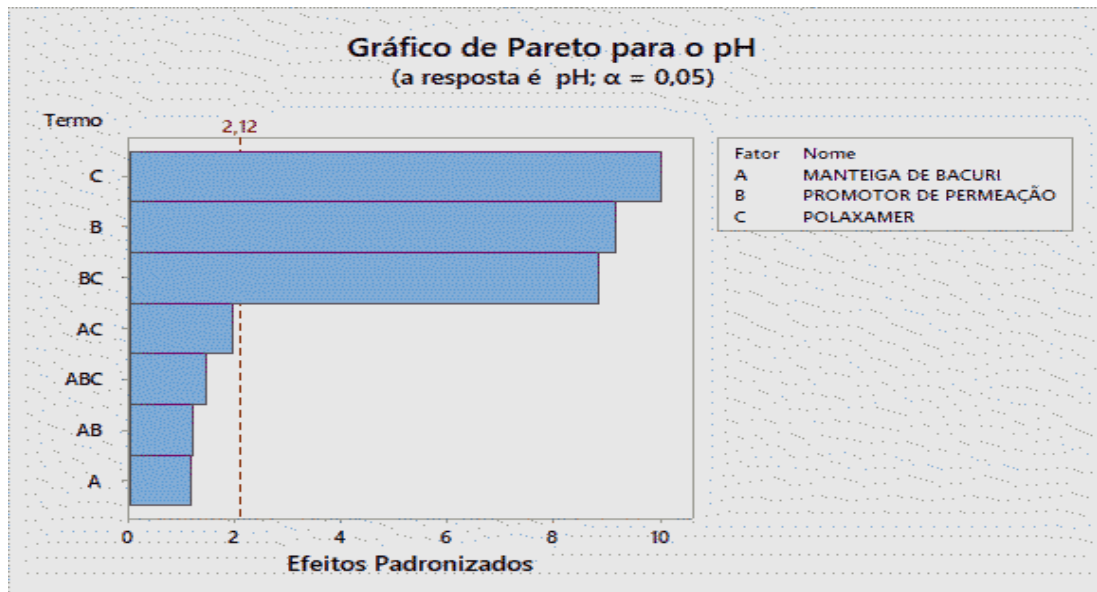
Observou-se que, separadamente, as variáveis escolhidas como fator (concentração da Mb, ausência ou presença de promotor de permeação e concentração do gel) têm efeito significativo na resposta final em relação à condutividade, pH e espalhabilidade, visto que todas obtiveram valores de efeito superiores a 2,12 (para $\alpha=0,05$), porém quando se avalia a interação entre elas na formulação final não há variância estatisticamente significativa (figuras 22, 23, 24).

Figura 22: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a condutividade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.



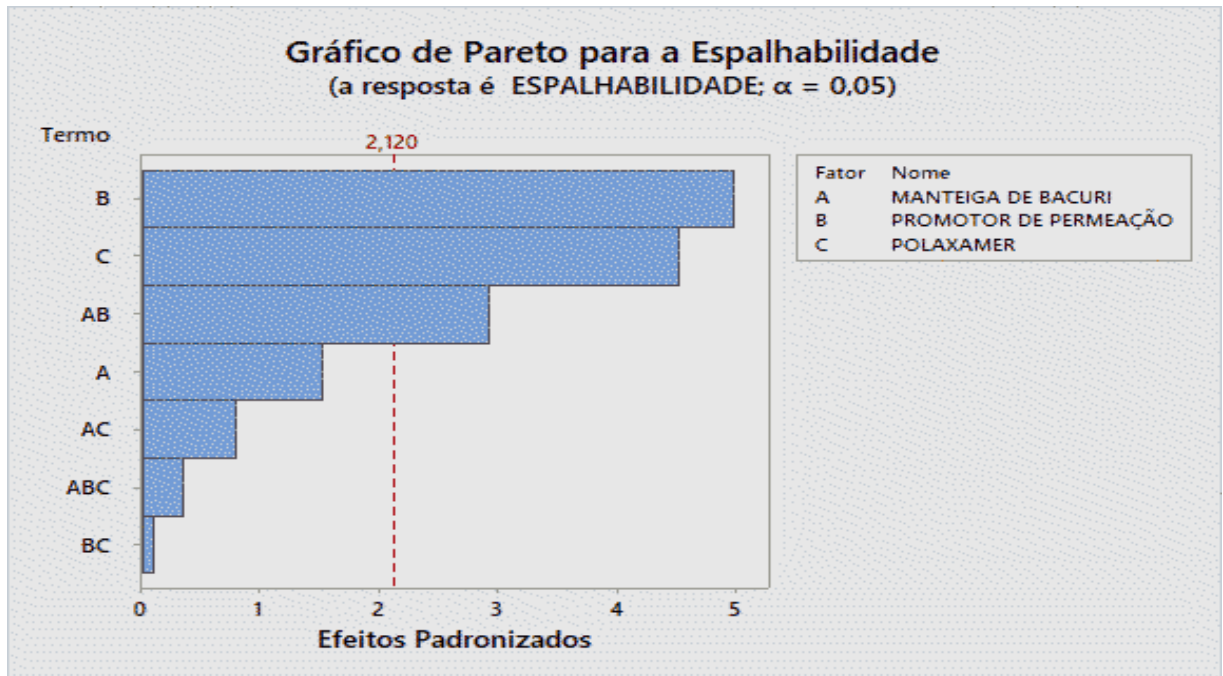
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 23: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para o pH das formulações de Emulgel de AmB e Mb.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

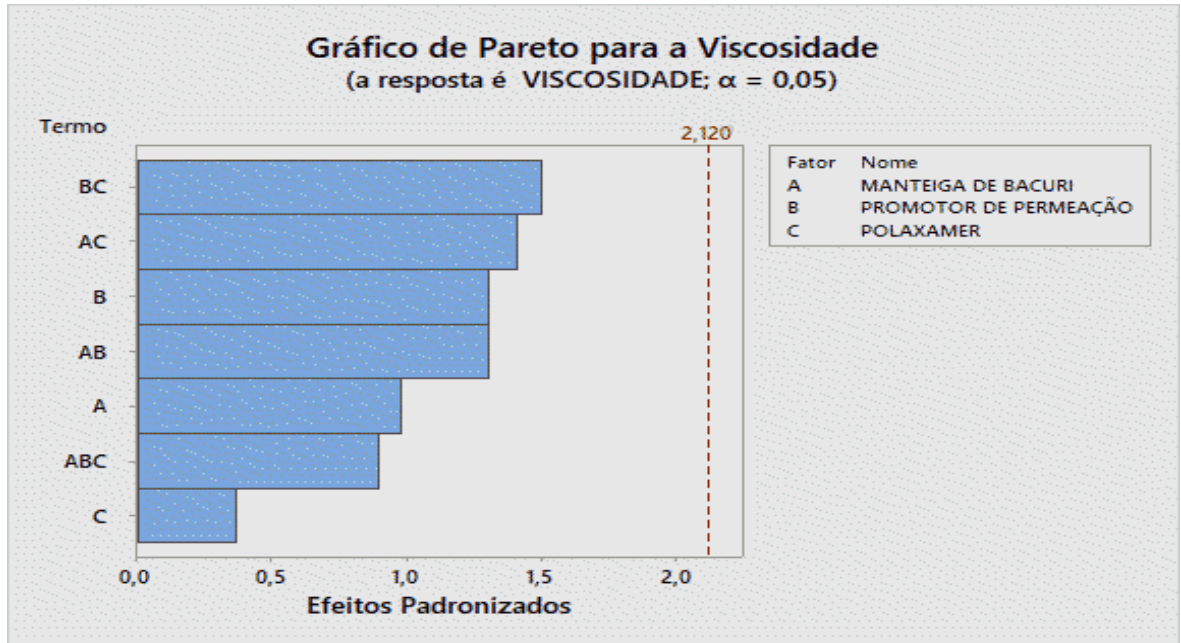
Figura 24: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a espalhabilidade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Na observação da resposta quanto à viscosidade (figura 25), nenhuma das variáveis estudadas apresentou-se, separadamente, resultado estatisticamente significativo para a formulação final e nem a interação entre elas gerou respostas que sejam significativas no comportamento reológico, do ponto de vista estatístico.

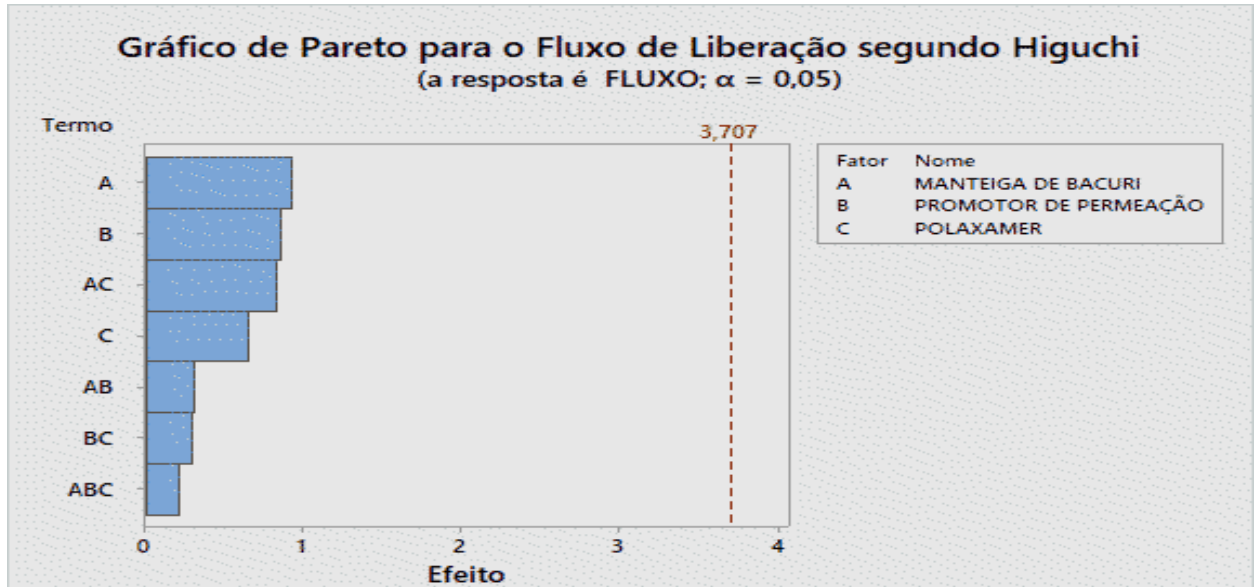
Figura 25: Gráfico de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis e de suas combinações para a viscosidade das formulações de Emulgel de AmB e Mb.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Tendo em vista que nenhum dos fatores, isoladamente ou combinados tiveram valores de significância maior que 3,707 (para $\alpha=0,05$), verificou-se que nenhuma das variáveis modificadas no planejamento fatorial influenciou estatisticamente o parâmetro resposta de fluxo das formulações (figura 23).

Figura 26: Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3 obtido para a propriedade de fluxo de liberação (linha vertical define 95% do intervalo de confiança) das formulações de Emulgel de AmB e Mb.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Após a análise de todos os parâmetros avaliados, a formulação F7 (polaxamer 25%, ácido oleico 5%, manteiga de bacuri 10%) foi escolhida para os testes *in vitro* e *in vivo*, pois além de apresentar um bom perfil de liberação da AmB, obteve-se excelentes resultados frente aos testes de estabilidade preliminar.

3.13 Atividade Antileishmania sobre formas Promastigotas de *L. major*

As formulações contendo manteiga de bacuri (Mb - figura 28), manteiga de bacuri associada a anfotericina B à 1 % (MbAmB 1% - figura 29) e manteiga de bacuri com anfotericina B à 3% (MbAmB 3% - figura 30) inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. major*, dependente da concentração. Na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$, as formulações Mb, MbAmB 1% e MbAmB 3% apresentaram índices de 70%, 90% e 100% de inibição do crescimento das formas promastigotas, respectivamente. A anfotericina B utilizada como controle positivo (AmBc), a 2 $\mu\text{g/mL}$ inibiu o crescimento destas mesmas formas do parasito em de 90%, com concentração inibitória média (CI_{50}) de 1,74, em relação ao controle negativo. Os resultados encontrados para Mb, MbAmB 1%, MbAmB 3% foram, respectivamente: 134,77; 109,89; 36,27 $\mu\text{g/mL}$, conforme constam na tabela 9.

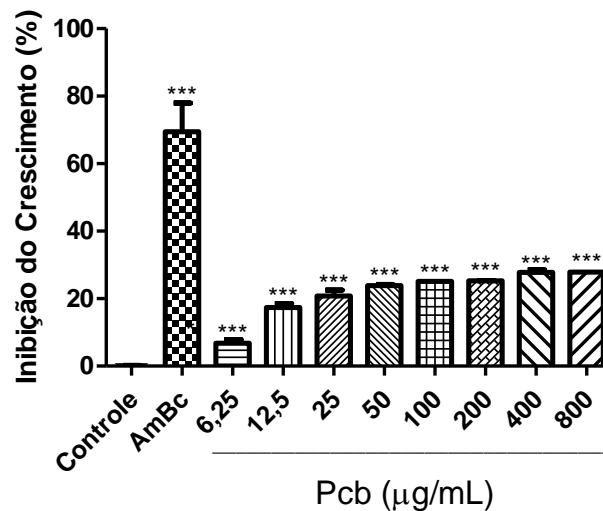
Tabela 9: Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e valores de índice de seletividade calculados para CN, AmBc, Mb, MbAmB 1% e MbAmB 3%.

Substâncias	Promastigotas	Macrófagos	Índice de seletividade
	CI ₅₀ µg/mL	CC ₅₀ µg/mL	IS
CN	> 800	> 800	ND*
Mb	134,770	> 800	ND*
MbAmB 1%	109,897	696,551	6,338
MbAmB 3%	36,276	139,576	3,847
AmBc	1,742	8,750	5,022

*ND = Não determinado.

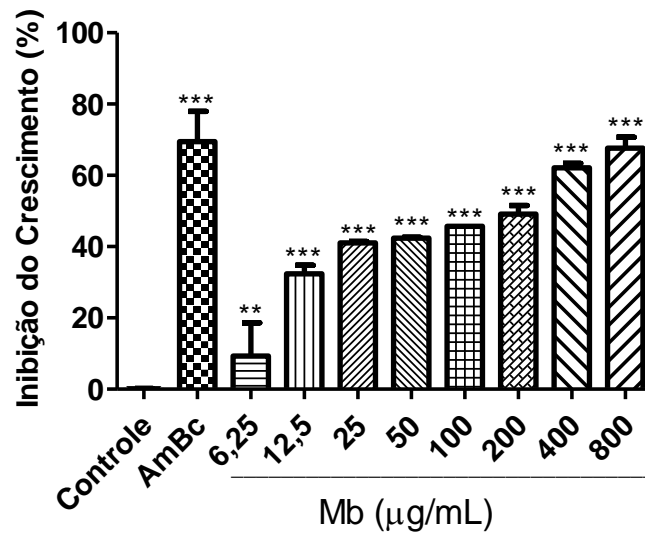
Legenda: CN – Controle negativo, Mb – Manteiga de bacuri, MbAmB – Manteiga de bacuri + anfotericina B e AmBc – Controle positivo com anfotericina B.

Figura 27: Atividade antileishmania do Controle Negativo sobre as formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias de AmBc utilizada como controle positivo na concentração de 2 µg/mL. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as * $p < 0.05$ vs. controle; ** $p < 0.01$ vs. controle; *** $p < 0.001$ vs. controle.



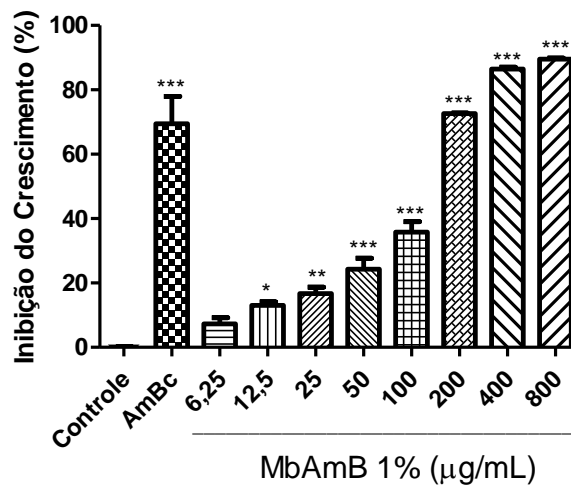
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 28: Atividade antileishmania da Mb sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.



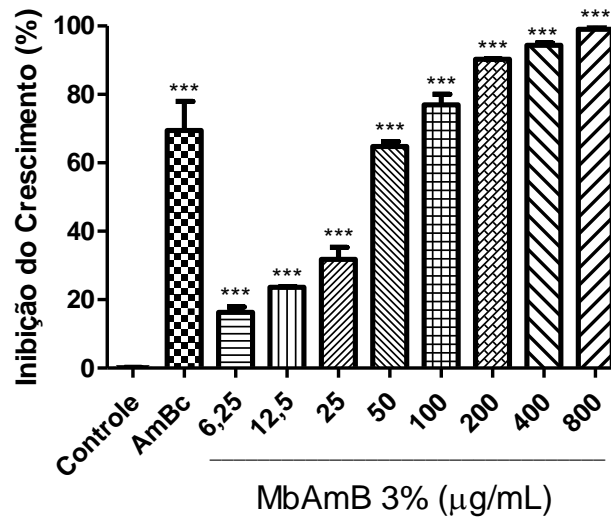
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 29: Atividade antileishmania da MbAmB 1% sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 30: Atividade antileishmania da MbAmB 3% sobre formas promastigotas de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) foram expostos à diferentes concentrações das substâncias AmBc. B foi utilizada como controle positivo na concentração de $2 \mu\text{g/mL}$. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as $*p < 0.05$ vs. controle; $**p < 0.01$ vs. controle; $***p < 0.001$ vs. controle.



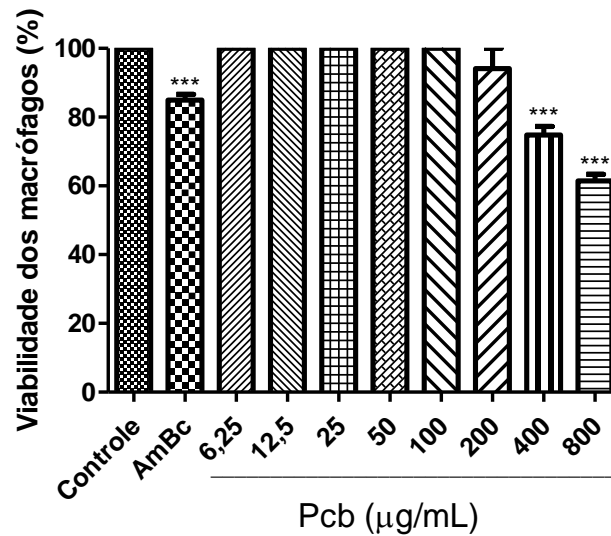
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

3.14 Citotoxicidade sobre Macrófagos e Índice de Seletividade (IS)

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade, utilizando o método do MTT sobre macrófagos murinos (figuras 32, 33, 34), mostram que as formulações apresentaram baixa toxicidade sobre este tipo celular, apresentando índices elevados de concentração citotóxica medida (CC_{50}) quando comparados ao apresentado pela AmBc como controle positivo. O aumento da concentração da AmB na formulação aumentou significativamente sua citotoxicidade, reduzindo em cinco vezes seu índice médio.

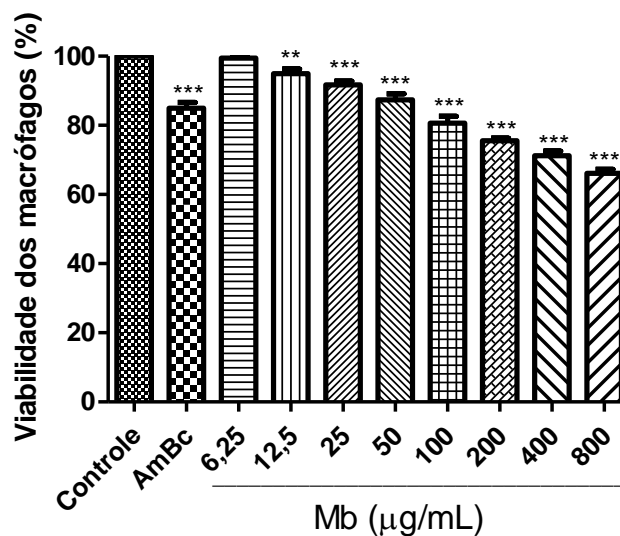
Nossos resultados mostram que a AmBc, bem como as formulações contendo a manteiga do bacuri, foram mais seletivas para o parasito que para os macrófagos murinos, conforme evidenciado pelos índices de seletividade (IS) encontrados. Este índice variou de acordo com a concentração. A MbAmB 3% reduziu em 1,64 vezes seu índice de seletividade quando comparado a MbAmB 1% (tabela 9).

Figura 31: Efeitos citotóxicos de Controle Negativo contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as * $p < 0.05$ vs. controle; ** $p < 0.01$ vs. controle; *** $p < 0.001$ vs. controle.



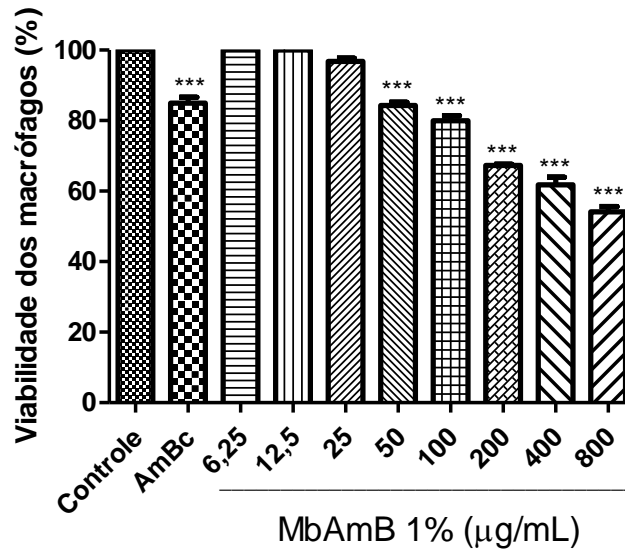
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 32: Efeitos citotóxicos de Mb contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as * $p < 0.05$ vs. controle; ** $p < 0.01$ vs. controle; *** $p < 0.001$ vs. controle.



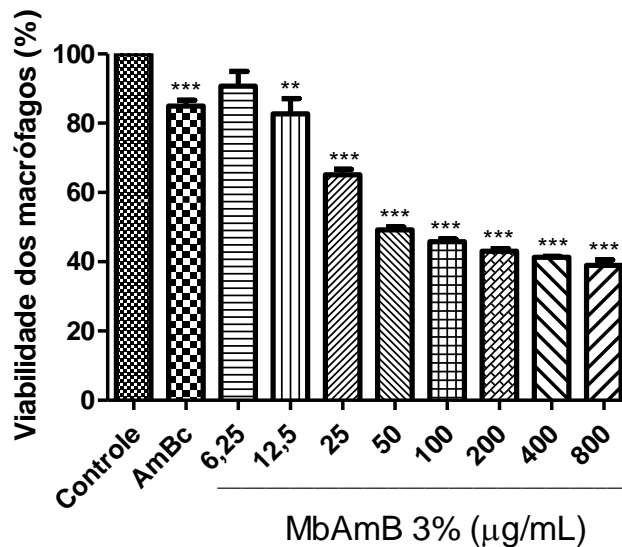
Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 33: Efeitos citotóxicos de AmB 1% contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as * $p < 0.05$ vs. controle; ** $p < 0.01$ vs. controle; *** $p < 0.001$ vs. controle.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

Figura 34: Efeitos citotóxicos de AmB 3% contra macrófagos peritoneais murinos. Os macrófagos foram incubados por 48 horas na presença de diferentes concentrações. Foi realizado one-way ANOVA seguida do pós-teste de comparação múltipla Bonferroni, admitindo-se as * $p < 0.05$ vs. controle; ** $p < 0.01$ vs. controle; *** $p < 0.001$ vs. controle.



Fonte: arquivo pessoal, COELHO, E.S (2018).

A espécie *P. insignis*, conhecida como "bacuri", tem seu uso etnofarmacológico relacionado ao extrato das sementes, atuando como agentes cicatrizantes e antiinflamatórios. Atualmente, várias atividades foram relatadas para todas as partes do fruto (semente, casca e polpa) e da casca do caule (ARCANJO et al., 2014; COSTA JUNIOR et al., 2013; SILVA et al., 2016; SOUZA et al., 2017; UEKANE et al., 2017). A manteiga obtida do processamento das sementes do fruto apresenta diversas propriedades biológicas, como cicatrizante, antimicrobiano, antitumoral, citotóxico, antioxidante e antileishmania (COSTA JÚNIOR et al., 2011; COSTA JÚNIOR et al., 2013^a; NASCIMENTO et al., 2014), tendo como compostos relacionados a estas atividades, classes de terpenos, xantonas e fenólicos, relatados como constituintes principais, além dos compostos já isolados como Garcinialiptona FC (GFC) e lupeol (COSTA JÚNIOR et al., 2011; COSTA JÚNIOR et al., 2013^a; YAMAGUCHI et al., 2014; LUSTOSA et al., 2015).

Esta planta, em ensaios realizados para avaliação de sua atividade antileishmania, demonstrou ser eficaz contra formas promastigotas livres desse parasita, em meio de cultivo, e contra suas formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos (COSTA JUNIOR et al., 2013a, SOUZA, et al 2017). Não obstante, esta espécie foi também capaz de apresentar propriedades imunoestimulatórias em macrófagos elicitados da cavidade peritoneal de camundongos e de resolver a infecção deste tipo celular, reduzindo, também, sua infectividade (LUSTOSA et al., 2015, SOUZA et al., 2017).

Neste trabalho, em que se objetivou o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, associando as propriedades farmacológicas da manteiga do bacuri com a anfotericina B, observou-se que o emulgel Mb, bem como as formulações contendo Mb associada a AmB (MbAmb 1% e MbAmB 3%) demonstraram grande atividade de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. major*, após 48 horas de incubação, com atividade dependente da concentração. É interessante notar que a Mb obteve CI_{50} de 134,77 $\mu\text{g/mL}$ evidenciando que esta planta tem potencial atividade antileishmania, corroborando com os dados obtidos por Souza et. al., 2017 ao pesquisar essa atividade relacionada ao extrato etanólico e fração hexânica obtidas da casca do caule dessa planta.

A associação da Mb com a AmB potencializou seu efeito antileishmania, como pode ser observado pela redução nos valores de CI_{50} da ordem de 1,23 vezes para a MbAmb 1% e de 3,71 vezes para a MbAmB 3%. Essa associação torna-se interessante, uma vez que havendo sinergismo entre os constituintes dessa formulação, poderá obter-se resultados mais satisfatórios na terapêutica das leishmanioses.

O emulgel MbAmb 3% apresentou-se mais potente e mais eficaz em relação aos demais quanto a sua atividade antileishmania, porém mais tóxico para os macrófagos murinos, conforme pode-se observar através dos valores de CC_{50} apresentados. A formulação MbAmb 1% apresentou-se menos tóxico e, por isso, mais seletivo ao parasito, com índice de seletividade (IS) de 6,33, sendo considerado um bom índice. Este fato pode ser justificado pela associação da Amb nessa concentração com as propriedades farmacológicas das moléculas constituintes da manteiga, rica em ácidos graxos insaturados (ácido oléico e linoleico), diterpenos, e benzofenonas preniladas (Garcinialiptona - GFC), uma molécula com potencial atividade antileishmania e baixa citotoxicidade para esse tipo celular (COSTA JUNIOR et al., 2011; COSTA JUNIOR et al., 2013^b; ARCANJO et al., 2014; SILVA et al., 2016; UEKANE et al., 2017).

Um importante critério na prospecção de novos produtos com ação antileishmania é que eles tenham como finalidade serem mais seletivos para promover toxicidade aos parasitos em comparação às células do hospedeiro (NWAKA; HUDSON, 2006; OSORIO et al., 2007). Para tanto, nossas formulações obtiveram sucesso nessa avaliação. Ou seja, apresentaram-se mais toxicidade para *L. major* do que para os macrófagos murinos.

Comercialmente, não há no mercado medicamento à base de AmB específico para o tratamento tópico das formas cutâneas da doença em humanos. Contudo, vários estudos têm mostrado a eficácia de tratamentos com este fármaco em formulações diversas e com variadas concentrações. Layegh et al., (1999) utilizaram AmB a 5 mg/mL em formulação lipídica tópica para o tratamento da CL em humanos obtendo bons resultados. Uma abordagem com o objetivo de estudar o efeito da AmB complexada com a B-gama ciclodextrina contra diversos fungos e contra diferentes espécies de leishmania foi conduzida por Ruiz et al., (2014), tendo os autores encontrado resultados satisfatórios. Mais recentemente, Pinheiro et al. 2016, tratando experimentalmente camundongos com emulgel de AmB à 3% para aplicação tópica obteve excelentes resultados, mostrando a utilização de concentrações cada vez menores do fármaco como sendo o ideal para a segurança do paciente e para a indústria.

A manteiga de bacuri também potencializou a ação antileishmania da AmB, apresentando maior seletividade e menor toxicidade, mesmo na menor concentração da AmB (1%) a presença da manteiga de bacuri apresentou eficácia equivalente, podendo reduzir efeitos adversos relacionados ao fármaco.

4 CONCLUSÃO

Quanto às características físico-químicas, os emulgéis apresentaram-se estáveis ao teste de centrifugação, e após o ciclo gelo-degelo as formulações F1, F3, F4, F7 e F8 mantiveram-se estáveis. As formulações apresentaram características de flúidos não-newtonianos e apresentaram melhor modelo cinético de liberação de primeira ordem para todas as formulações a partir da análise do resíduo do quadrado médio. Foi possível observar que quantidades maiores da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) podem proporcionar uma maior liberação de AmB.

Neste trabalho pode-se demonstrar que a manteiga de bacuri é eficaz sobre formas do parasito e que sua associação com a anfotericina B pode potencializar seu efeito em função de possível sinergismo existente entre este fármaco e os constituintes da manteiga. Ficou evidenciado também que concentração mais baixa de anfotericina B no emulgel (1%) pode ser igualmente eficaz contra *Leishmania*, quando comparada a concentrações maiores (3%), tornando-se mais interessante do ponto de vista da segurança, uma vez que reduz sua toxicidade e aumenta seu índice de seletividade.

Um dos fatores limitadores para a utilização da AmB em pacientes com qualquer uma das formas de leishmaniose são seus efeitos adversos e, sendo assim, essa associação pode significar a redução da quantidade de AmB usada nas recomendações terapêuticas.

Conclui-se que o emulgel de ação tópica, à base de AmB e manteiga de bacuri é promissor para ser testado no tratamento da leishmaniose cutânea, de modo a reduzir os efeitos tóxicos promovidos pelos tratamentos convencionais. Pode ser utilizado em formas menos graves e sem risco de disseminação ou como terapia combinada junto a outro tratamento sistêmico, facilitando a adesão do paciente ao tratamento com consequente melhora na sua qualidade de vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, M. M. M. et al. Gallic and ellagic acids: two natural immunomodulator compounds solve infection of macrophages by *Leishmania major*. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 390, n. 9, p. 893-903, Sep 2017. ISSN 1432-1912 (Electronic)0028-1298 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28643086>.
- ALMEIDA, K. B. **Desenvolvimento de hidrogel semissólido contendo óleo essencial de *Cymbopogon Citratus* (Dc.) Stapf carregado em nanopartículas poliméricas para o tratamento tópico da herpes**. Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Produtos para Saúde da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal Fluminense. Niterói- RJ. 2014.
- ANDRADE, Ana Ochoa; PARENTE, María Emma; ARES, Gastón. Screening of mucoadhesive vaginal gel formulations. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 4, p.931-941, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502014000400029>.
- ANTUNES, M. S. Estudo à microscopia eletrônica da estabilidade física de emulsões lipídicas utilizadas em misturas 3 em 1. **Rev Bras Nutr Clin** 22(1):45--53. 2007. Disponível em: <<http://www.docplayer.com.br/15827415>> Acessado em: 25/10/2017.
- ARAÚJO, G.M.F. Nanoemulsões de Anfotericina B: desenvolvimento, caracterização e atividade leishmanicida. Campina Grande, 2013. 91p. Dissertação de Mestrado – Pós Graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Estadual da Paraíba.
- ARCANJO, Daniel Dias Rufino et al. Garcinielliptone FC, a polyisoprenylated benzophenone from *Platonia insignis* Mart., promotes vasorelaxant effect on rat mesenteric artery. **Natural Product Research**, v. 28, n. 12, p.923-927, 28 fev. 2014. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.889136>.
- BAIBHAY, Joshi, et al. Development and Characterization of Clarithromycin Emulgel for topical delivery. **Inter J of Drug Development & Res**, v. 4, p. 310-323. Jul/Sep 2012. <http://www.ijddr.in/drug-development/development-and-characterization-of-clarithromycin-emulgel-for-topical-delivery.php?aid=5120>.
- BRASIL. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. 1ªed. Brasília: ANVISA, 2004.
- BRASIL. **Guia para a realização de estudos de estabilidade**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RE n° 1, de 29 de julho de 2005.
- CANUTO, Gisele A.B, et al. Caracterização Físico-Química de Polpas de Frutos Da Amazônia e sua Correlação com a Atividade Anti-Radical Livre. **Rev Bras Frutic**, v. 32, n. 4, p. 1196-1205, Dez 2010. http://www.scielo.br/pdf/rbf/2010/nahead/AO_P12_910.pdf.
- CORDEIRO, Marciana S.F., et al. Desenvolvimento tecnológico e avaliação de estabilidade de gel dermatológico a partir do óleo essencial de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) **Rev. Bras. Farm**, v. 94, n. 2, p. 148-153, 2013. <http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-94-2-10-2013.pdf>

COSTA JÚNIOR, Joaquim S. et al. Cytotoxic and leishmanicidal properties of garcinielliptone FC, a prenylated benzophenone from *Platonia insignis*. **Natural Product Research**, v. 27, n. 4-5, p.470-474, mar. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2012.695363>.

COSTA-JUNIOR, J.S. et al. Evaluation of antioxidante effects in vitro of garcinielliptone FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **J Medicinal Plants Res**, v.5, n. 2, p. 293-299, Jan 2011. <http://www.academicjournals.org/journal/JMPR/articleabstract/4C1D26D18707>.

COSTA JÚNIOR, Joaquim S. et al. Investigation of Biological Activities of Dichloromethane and Ethyl Acetate Fractions of *Platonia insignis* Mart. Seed. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 112, n. 1, p.34-41, 31 ago. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-7843.2012.00924.x>.

DAHER, Cláudia Cecilio et al. Development of O/W emulsions containing *Euterpe oleracea* extract and evaluation of photoprotective efficacy. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 50, n. 3, p.639-652, set. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502014000300024>.

DAUDT, Renata Moschini et al. Pinhão starch and coat extract as new natural cosmetic ingredients: Topical formulation stability and sensory analysis. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p.573-580, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.08.038>.

DOURADO, D.; BARRETO, C.; FERNANDES, R.S. Development and evaluation of emulsifying systems of the material grease from Brazilian flora. **J Pharm & Pharmacognosy Research**, v.3, n. 5, p. 130-140, 2015. <http://www.redalyc.org/html/4960/496050276003/>

DIDWANIA, Nicky et al. Alternative to Chemotherapy—The Unmet Demand against Leishmaniasis. **Frontiers In Immunology**, v. 8, 21 dez. 2017. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2017.01779>.

FRANZ, Thomas J. Percutaneous Absorption. On the Relevance of in Vitro Data. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 64, n. 3, p.190-195, mar. 1975. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12533356>.

FIGUEIREDO FILHO, Dalson Brito; SILVA JÚNIOR, José Alexandre da. Visão além do alcance: uma introdução à análise fatorial. **Opinião Pública**, v. 16, n. 1, p.160-185, jun. 2010. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0104-62762010000100007>.

FILARDY, Alessandra A. et al. Infection with *Leishmania major* Induces a Cellular Stress Response in Macrophages. **Plos One**, v. 9, n. 1, p. e85715, 9 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0085715>.

GADAD, A.P., et al. Formulation and characterization of oxiconazole-loaded emulgel for topical application. **Indian J Health Sci Biomed Res**, v. 10, p. 303-10, 2017. <http://www.ijournalhs.org/article.asp?issn=2349-5006;year=2017;volume=10;issue=3;spage=303;epage=310;aulast=Gadad>

GONÇALVES, Gisele Mara Silva; CAMPOS, Patrícia Maria Berardo Gonçalves Maia. Aplicação de métodos de biofísica no estudo da eficácia de produtos dermocosméticos. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, p.1-10, mar. 2009. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1984-82502009000100002>.

JAGDALE, Swati; PAWAR, Saylee. Gellified Emulsion of Ofloxacin for Transdermal Drug Delivery System. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, [s.l.], v. 7, n. 2, p.229-239, 30 jun. 2017. International Society for Phytocosmetic Sciences. <http://dx.doi.org/10.15171/apb.2017.028>.

KAUR, Indu Pal; KAKKAR, Shilpa. Topical delivery of antifungal agents. **Expert Opinion On Drug Delivery**, [s.l.], v. 7, n. 11, p.1303-1327, 20 out. 2010. Informa Healthcare. <http://dx.doi.org/10.1517/17425247.2010.525230>.

KHULLAR, Rachit et al. Formulation and evaluation of mefenamic acid emulgel for topical delivery. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.63-67, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2011.08.001>.

KLANG, Victoria et al. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2-3, p.85-103, fev. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>.

KNORST, M.T. **Desenvolvimento tecnológico de forma farmacêutica plástica contendo extrato concentrado de Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Compositae (marcela)**. Porto Alegre, 1991. 228p. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LAYEGH, Pourn et al. Efficacy of Topical Liposomal Amphotericin B versus Intralesional Meglumine Antimoniate (Glucantime) in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Journal Of Parasitology Research**, v. 2011, p.1-5, 2011. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2011/656523>.

LOPES, G. L., et al. Influência das variáveis de processo na obtenção de cápsulas gelatinosas duras de ibuprofeno em farmácia universitária **Bol Inform Geum**, v. 6, n. 4, p. 59-62, out/dez 2015. <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/geum/article/view/4432>

LIMA, M.F.M.B. **Obtenção Tecnológica e Perfil de Liberação in vitro de Emulgel Leishmanicida à Base de Platonía Insignis Mart. + Anfotericina**. Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

LUSTOSA, Ana Karina M.f. et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of the fruit seeds from *Platonía insignis*, a native species from Brazilian Amazon Rainforest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 1, p.77-82, jan. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.014>.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, p.01-37, 2009. Disponível em: <https://www.revistas.ufg.br/REF/article/view/6545>.

MOLLICA, Joseph A.; AHUJA, Satinder; COHEN, Jerold. Stability of Pharmaceuticals. **Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, n. 4, p.443-465, abr. 1978. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.2600670405>.

MORA-HUERTAS, C.e.; FESSI, H.; ELAISSARI, A.. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p.113-142, jan. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.10.018>.

MS/SVS. Rede internacional de informações para a saúde. Indicadores de morbidade e fatores de risco. **Ministério da Saúde**, MS/SVS. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>>. Acessado em: 25/10/2017.

NAOUI, Wafa et al. Microemulsion Microstructure Influences the Skin Delivery of an Hydrophilic Drug. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 7, p.1683-1695, 25 mar. 2011. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11095-011-0404-y>.

NASCIMENTO, Juliana L., et al. Avaliação da atividade antioxidante in vitro do extrato hexânico da semente do bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de seu complexo de inclusão com β -ciclodextrina. **Bol Inform Geum**, v. 5, n. 2, p. 44-53, 2014. <http://www.ojs.ufpi.br/index.php/geum/article/view/2460>.

NIKUMBH, Kishor V.; SEVANKAR, Shailesh G.; PATIL, Moreshwar P.. Formulation development, in vitro and in vivo evaluation of microemulsion-based gel loaded with ketoprofen. **Drug Delivery**, v. 22, n. 4, p.509-515, 25 nov. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2013.859186>.

NWAKA, Solomon; HUDSON, Alan. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p.941-955, nov. 2006. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nrd2144>.

OCHOA-ANDRADE, Ana et al. Study of the Influence of Formulation Variables in Bioadhesive Emulgels Using Response Surface Methodology. **Aaps Pharmscitech**, v. 18, n. 6, p.2269-2278, 17 jan. 2017. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0707-8>.

OLIVEIRA, Luciano Gomes de Castro et al. In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania Amazonensis*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 120, n. 1, p.52-58, 16 set. 2016. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/bcpt.12639>.

OLLIARO, P. et al. Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 12, n. 1, p. e0006141, Jan 2018. ISSN 1935-2735 (Electronic) 1935-2727 (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29329311>.

OSORIO, Edison et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal Of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p.630-635, maio 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2007.01.015>.

PATIL, SUCHITA A., et al. Formulation and evaluation of etodolac trans-emulgel. **World J of Pharmacy and Pharmaceutical Sci**, v. 3, n.7, p 1731-1749, Jun 2014. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Formulation+and+evaluation+of+etodolac+trans-emulgel.+&btnG=

PINHEIRO, M.I. **Desenvolvimento Tecnológico de Emulgel de Anfotericina B com promotor químico de liberação cutânea**. Piauí, 2014. 123p. Dissertação de Mestrado – Pós Graduação em Ciências farmacêuticas Universidade Federal do Piauí.

PINHEIRO, Iluska Martins et al. Evaluation of the in vivo leishmanicidal activity of amphotericin B emulgel: An alternative for the treatment of skin leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 164, p.49-55, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2016.02.010>.

PINTO, J. G. et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci**, v. 31, n. 5, p. 883-90, Jul 2016. ISSN 1435-604X (Electronic) 0268-8921 (Linking). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27056699>.

PONTE-SUCRE, Alicia et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 12, p. e0006052, 14 dez. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.

RAMTEKE, K.H., et al. Mathematical models of drug dissolution: a review. **Sch. Acad. J. Pharm**, v. 3, n. 5, p. 388-396, 2014. <https://pdfs.semanticscholar.org/5fda/8aa6fa8c807862a30287a43d7354a21dfbbd.pdf>

RANGA, P.M. et al. Formulation and in vitro evaluation of ciprofloxacin loaded topical emulgel. **Int J Pharm Chem Sci**, v. 1, p. 237-242, Jan/Mar 2012. https://scholar.google.com.br/scholar?hl=pt-BR&as_sdt=0%2C5&q=Formulation+and+in+vitro+evaluation+of+ciprofloxacin+loaded+topical+emulgel.+&btnG=

RAUT, Sushil, et al. Comparative evaluation of Zidovudine loaded hydrogels and emulgels. **Res J Pharm Technol**, v. 5, p. 41-45, Jan 2012. https://www.researchgate.net/profile/Santosh_singh_Bhadoriya/publication/225088911

ROGGIA, Isabel, et al. Validação de metodologia analítica para a determinação de benzofenona-3 nanoencapsulada incorporada em creme gel e estudo da estabilidade físico química. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 35, n. 2, p. 223-232. 2014. http://200.145.71.150/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewArticle/2898

RUELA, André Luís Morais et al. Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations. **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p.527-544, set. 2016. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s198482502016000300018>.

RUIZ, Helga K. et al. New amphotericin B-gamma cyclodextrin formulation for topical use with synergistic activity against diverse fungal species and *Leishmania* spp. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 473, n. 1-2, p.148-157, out. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2014.07.004>.

SANTOS, Aline Marques dos et al. Efeito de uma formulação hidrofílica de paromomicina tópica na leishmaniose cutânea em pacientes com contra-indicações de tratamento com antimonial pentavalente. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p.444-448, out. 2008. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822008000500002>.

SELEME, R.; HUMBERTO, S. Controle de qualidade: as ferramentas essenciais. Curitiba: **InterSaberes**, 2012.

SHILAKARI, ASTHANA, G.; SHARMA, P. K.; ASTHANA, A. In Vitro and In Vivo Evaluation of Niosomal Formulation for Controlled Delivery of Clarithromycin. **Scientifica (Cairo)**, v. 2016, p. 6492953, 2016. ISSN 2090-908X (Print) 2090-908X (Linking). Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27293976>.

SILVA, Ana Paula dos Santos C. L da et al. Pre-clinical toxicology of garcinielliptone FC, a tautomeric pair of polyprenylated benzophenone, isolated from *Platonia insignis* Mart seeds. **Phytomedicine**, v. 23, n. 5, p.477-482, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.013>.

SILVA, K.E.R., et al. Modelos de avaliação da estabilidade de fármacos e medicamentos para a indústria farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v. 30, n. 2, p. 129-135. 2009^a http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/868/798

SILVA, José A., et al. Estudo de liberação e permeação in vitro do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, p. 1389-1393, 2009. http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No6_1389_04-AR08164.pdf.

SOLIMAN, Sara M. et al. Novel non-ionic surfactant proniosomes for transdermal delivery of lacidipine: optimization using 23factorial design and in vivo evaluation in rabbits. **Drug Delivery**, v. 23, n. 5, p.1608-1622, 13 jan. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3109/10717544.2015.1132797>.

SMAOUI, Slim et al. Development and stability studies of sunscreen cream formulations containing three photo-protective filters. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 10, p.s1216-s1222, fev. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2013.02.020>.

SOUZA, Adriana Cunha et al. *Platonia insignis* Mart., a Brazilian Amazonian Plant: The Stem Barks Extract and Its Main Constituent Lupeol Exert Antileishmanial Effects Involving Macrophages Activation. **Evidence-based Complementary And Alternative Medicine**, v. 2017, p.1-12, 2017. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2017/3126458>.

SRISUK, Pathomthat et al. Physico-chemical characteristics of methotrexate-entrapped oleic acid-containing deformable liposomes for in vitro transepidermal delivery targeting psoriasis treatment. **International Journal Of Pharmaceutics**, [s.l.], v. 427, n. 2, p.426-434, maio 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.01.045>.

SUÑER, Joaquim et al. Development of Clotrimazole Multiple W/O/W Emulsions as Vehicles for Drug Delivery: Effects of Additives on Emulsion Stability. **Aaps Pharmscitech**, v. 18, n. 2, p.539-550, 28 abr. 2016. American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS). <http://dx.doi.org/10.1208/s12249-016-0529-8>.

SUPRIYA U, SEEMA C, Preeti K. Emulgel: A Boon for Dermatological Diseases. **Inter J of Pharm Research & Allied Sci**, v.3, n. 4, p. 1-9, 2014. <http://ijpras.com/volume-3-issue-4/IJPRAS-2014-3-4-1-9.pdf>

UEKANE, Thais M. et al. Studies on the volatile fraction composition of three native Amazonian-Brazilian fruits: Murici (*Byrsonima crassifolia* L., Malpighiaceae), bacuri (*Platonia insignis* M., Clusiaceae), and sapodilla (*Manilkara sapota* L., Sapotaceae). **Food Chemistry**, v. 219, p.13-22, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.098>.

UR-REHMAN, Tofeeq; TAVELIN, Staffan; GRÖBNER, Gerhard. Chitosan in situ gelation for improved drug loading and retention in poloxamer 407 gels. **International Journal Of Pharmaceutics**, v. 409, n. 1-2, p.19-29, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.017>.

USP - The United States Pharmacopeia Convention. Monographs Amphotericin B, December 1, 2016.

VALADARES, Diogo G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p.357-363, dez. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2011.06.001>.

VARIKUTI, S. et al. Topical treatment with nanoliposomal Amphotericin B reduces early lesion growth but fails to induce cure in an experimental model of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana*. **Acta Trop**, v. 173, p. 102-108, Sep 2017. ISSN 1873-6254 (Electronic)0001-706X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28602835> >.

WHO. 2015. Leishmaniasis fact sheet no. 375. World Health Organization, Geneva, Switzerland: Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets>

YAMAGUCHI, Klenicy K.L., et al., Química e Farmacologia do Bacuri (*Platonia insignis*). **Scien Amazonia**, v. 3, n. 2, p. 39-46, Jul 2014. <http://scientia-amazonia.org/wp-content/uploads/2016/06/v3-n2-39-46-2014.pdf>

ZELLER, R. A; CARMINES, E. G. Measurement in the social sciences: The link between theory and data. Cambridge: Cambridge University Press, 1980.

PÁGINAS RESTRITAS

91 À 116