



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Ana Karina Marques Fortes Lustosa**

**Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida.**

Teresina  
2012

**Ana Karina Marques Fortes Lustosa**

**Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, sob orientação da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e co-orientação do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

Teresina

2012

**Ana Karina Marques Fortes Lustosa**

**Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Educação do Centro de Ciências da Educação da Universidade Federal do Piauí, como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Educação, sob orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e co-orientação do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

Aprovada em 27/02 /2012.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó  
(Orientador)  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho  
(Co-orientador)  
Universidade Federal do Piauí

---

Prof. Dr. Joaquim Soares da Costa Júnior  
Instituto Federal do Piauí – IFPI

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Amélia de Carvalho Melo Cavalcante  
Universidade Federal do Piauí

Teresina

2012

Dedico aos meus queridos pais, Assis e Gracinha, exemplos sempre presentes. Ao meu marido, Luiz Fortes que sempre me deu forças e não me deixou desistir, a Dr<sup>a</sup> Virgínia pela compreensão e incentivo, a Virgínia (in memorian) pela luz, garra, exemplo de vida, a minha irmã Ana Valéria pelo tempo perdido e as minhas filhas pelo simples fato de existirem.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, fonte infinita de amor, por tudo e todos que estão na minha vida

A Prof<sup>ª</sup>. Graça por ter me acolhido, confiado em mim e me aceito mesmo eu estando a tanto tempo longe da academia.

Ao Prof. Dr. Fernando pela amizade, pelos ensinamentos transmitidos e por contribuir de forma direta para o meu crescimento profissional.

Aos meus pais pelo amor incondicional, exemplos concretos de trabalho e honestidade e pelos esforços em me educar.

Ao meu marido, Luiz Fortes, pelo apoio, por entender minha ausência, sempre me incentivar sem deixar que nos momentos de desespero eu desistisse.

A Virgínia, filha amada, pelas infindáveis alegrias e por me acompanhar em todos os momentos.

A Ana Vitória, projeto de vida, ainda no ventre, mas que já participou ativamente deste projeto.

A Dra Virgínia por ser como uma mãe pra mim e me tratar como filha, sempre compreensiva, me incentivando, me apoiando, me dando suporte. Pela generosidade infinita e por ser alguém que sei que sempre vou poder contar.

A Virginia (*in memoriam*) por fazer parte da construção do que eu sou hoje como pessoa e principalmente como profissional. Pelo exemplo de vida, por ter me ensinado tudo o que sei e por ter sempre acreditado em mim.

A Amanda que é como uma filha querida, pela presença constante.

Ao prof. Mrs. Daniel Arcanjo por ter sido um grande amigo, doando seu tempo, seus conhecimentos e sua disponibilidade em ajudar. Sem ele boa parte deste trabalho não seria possível.

Ao prof. Mrs. André pela dedicação, pela paciência, pelo respeito doado, pelo esforço em me fazer entender o fluxo das coisas;

Ao Prof. Dr. Joaquim por toda a generosidade e contribuição significativa a esta pesquisa.

A Prof<sup>ª</sup> Dra. Rita pela atenção.

A Mayara pela disponibilidade, dedicação, companheirismo, responsabilidade e presteza em ajudar.

Aos meus irmãos, e demais familiares pelo amor e carinho, e por compreenderem a minha ausência em muitas reuniões da família.

Ao Bruno pela determinação em me ajudar a elucidar a composição das manteigas.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação, em especial, a Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Graça Medeiros que mesmo quando eu nem pensava em seguir em frente na academia me instigou a isso;

Ao Edgar pelas dicas e ensinamentos no LIMAV.

Aos amigos Laiane, Klinger, Sabrina e Bernardo que me ajudaram e muito a entender o mundo das Leishmanias.

Ao Ítalo por fazer parte da construção deste projeto.

A Farmácia escola, em especial ao Professor André, a Verônica, ao Terceiro pela contribuição.

A Farmácia Galeno por possibilitar a fabricação das formulações.

Aos companheiros de jornada Ana Paula, Mayara, Ricardo, Rian, Layanne.

Aos amigos que conheci durante este período.

Aos que não citei porque a esta altura do campeonato minha memória não permite.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

O sucesso é construído à noite! Durante o dia você faz o que todos fazem. Mas, para conseguir um resultado diferente da maioria, você tem de ser especial. Se fizer igual a todo mundo, obterá os mesmos resultados. Não se compare à maioria, pois, infelizmente, ela não é modelo de sucesso. Se você quiser atingir uma meta especial, terá de estudar no horário em que os outros estão tomando chope com batatas fritas. Terá de planejar, enquanto os outros permanecem à frente da televisão. Terá de trabalhar, enquanto os outros tomam sol à beira da piscina. A realização de um sonho depende da dedicação.

Roberto Shinyashiki

LUSTOSA, Ana Karina Marques Fortes. **Avaliação do potencial farmacológico da manteiga de bacuri (*Platonia insignis* Mart.) e de forma farmacêutica de uso tópico com ela desenvolvida** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Piauí, Centro de Ciências Saúde, Programa de Pós-Graduação Ciências Farmacêuticas : Teresina, 2012.

### RESUMO

Pertencente à família Clusiaceae, no Brasil, a planta *Platonia insignis* Mart. é popularmente conhecida como “bacuri”, tem sua origem no Pará na Ilha de Marajó, sendo encontrada também no Mato Grosso, na Amazônia, no Tocantins, no Maranhão e no Piauí. Fora do Brasil encontra-se também nas Guianas, no Peru, na Bolívia, na Colômbia e no Equador. É muito utilizada na medicina popular para tratar diarreias, problema de pele, doenças inflamatórias, dores de ouvido e picada de insetos. Neste estudo foram avaliadas duas banhas-manteigas de bacuri, uma que representa o extrato hexânico das sementes, extraída na UFPI e denominada (BBU) e outra obtida industrialmente, também das sementes, denominada (BBI). As manteigas foram avaliadas do ponto de vista químico, sua composição foi determinada por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM) e, posteriormente foi realizado o doseamento da Garcinielliptona FC (GFC), um floroglucinol isolado das sementes, usando espectrofotometria na região do ultravioleta visível (UV-Vis). As manteigas foram analisadas quanto à atividade citotóxica em MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) e quanto à toxicidade aguda em ratos não apresentando diferenças significativas em relação aos grupos analisados. Os ensaios *in vitro* da atividade leishmanicida mostraram que as manteigas inibem significativamente formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, bem como aumentam os parâmetros de ativação de macrófagos. Quanto à atividade anti-inflamatória das manteigas, por via oral, no modelo de pata, induzido por carregenina, a BBI apresentou resultados superiores à BBU. Foram desenvolvidas formulações utilizando as manteigas de bacuri e o Pluronic® Lecithin Organogel (PLO), denominadas de FBBU (Formulação contendo manteiga de bacuri da UFPI) e FBBI (Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada). O PLO é uma emulsão que aumenta a permeação na pele facilitando a penetração do ativo. Em relação às formulações foram realizados os testes preliminares de estabilidade e estabilidade acelerada que mostram a estabilidade da composição durante o período verificado. As formulações tiveram sua atividade contra *Leishmania* testadas *in vivo* mostrando resultado significativo se comparadas ao placebo. A atividade anti-inflamatória das formulações tópicas mostrou que a FBBI possui um resultado bastante significativo se comparada à FBBU. Portanto, os resultados apresentados neste trabalho sugerem que o processo de obtenção das manteigas influencia de sobremaneira sua composição bem como nas suas atividades farmacológicas e mostra que a veiculação de ativos em formas farmacêuticas semi-sólidas pode representar uma excelente alternativa para tratamento tópico de várias enfermidades. A busca por

alternativas terapêuticas de origem natural em substituição às que existem no mercado farmacêutico, utilizando plantas como fonte importante de produtos bioativos, impulsionou o estudo das atividades desta planta como promissora para o desenvolvimento de fitofármacos.

**Palavras-chave:** *Platonia insignis*. Formulação semissólidas. Banha/manteiga de bacuri

## ABSTRACT

Belonging to the Clusiaceae family, in Brazil, the plant *Platonia insignis* is popularly known as "bacuri" has its origin on Marajó Island in the state of Pará, being found also in the states of Mato Grosso, Amazon, Tocantins, Maranhão and Piauí. Out of Brazil it is also found in Guyana, Peru, Bolivia, Colombia, and Ecuador. It is widely used in folk medicine to treat diarrhea, skin problems, inflammatory diseases, earaches and insect bites. We evaluated two bacuri flare-butters, one which represents a hexane extract of the seeds extracted at UFPI and named (BBU) and another obtained industrially, also of seeds, called (BBI). The butters were evaluated in terms of chemical composition, and this was determined by high resolution gas chromatography (GC-MS) and then it was performed the assay of Garcinielliptone FC (GFC), an isolated phloroglucinol from seeds using spectrophotometry in the visible ultraviolet region (UV-Vis). Butters were tested for cytotoxic activity in MTT (bromide, 3 - [4,5-dimethylthiazo-2-il] -2,5-diphenyltetrazolium bromide) and for acute toxicity in rats, showing no significant differences in the groups analyzed. In vitro assays from leishmanicidal activity showed that the butters inhibit significantly promastigotes of *Leishmania amazonensis* as well as increase the parameters of macrophage activation. As for the butters' anti-inflammatory activity, orally, in the paw model induced by carrageenin, BBI showed better results than BBU. Formulations were developed using the bacuri butters and Pluronic® Lecithin Organogel (PLO). Called FBBU (Formulation containing UFPI's bacuri flare-butters) and FBBI (Formulation containing bacuri flare-butters industrialized). PLO is an emulsion that increases skin permeation facilitating the penetration of the active. With regard to formulations, preliminary tests were performed for stability and accelerated stability. The results showed stability of the composition during the established period. Formulations had activities tested in vivo against *Leishmania*, showing significant results compared to placebo. The anti-inflammatory activity of topical formulations showed that BBI has a very significant result compared to the BBU. Therefore, the results presented here suggest that the process of getting butters greatly influences its composition and in their pharmacological activities and shows that the placement of assets in semi-solid dosage forms may represent an excellent alternative for topical treatment of various diseases. The search for therapeutic alternatives from natural sources in substitution of those that exist in the pharmaceutical market, using plants as an important source of bioactive products, boosted the study of the activities of this plant as promising for the development of phytochemicals.

**Keywords:** *Platonia insignis*. Semi-solid formulation. Bacuri flare/butter

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01	<i>Platonia insignis</i> Mart (Árvore)	25
Figura 02	<i>Platonia insignis</i> Mart (Flores)	25
Figura 03	<i>Platonia insignis</i> Mart (Frutos)	26
Figura 04	<i>Platonia insignis</i> Mart (A-fruto fechado, B-fruto aberto, C-Polpa; D-semente fechada e E-semente aberta)	27
Figura 05	Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> nos hospedeiros vertebrado e invertebrado	32
Figura 06	Camadas da pele com as suas estruturas	39
Figura 07	Modelo esquemático do complexo processo de migração das células da camada basal até a camada córnea	39
Figura 08	Representação esquemática da penetração de substâncias através da camada córnea e dos canais formados pelos anexos cutâneos	42
Figura 09	Esquema do Clean up e análise das banhas-manteigas do Bacuri ( <i>P. insignis</i> )	53
Figura 10	Curva analítica padrão e espectro de absorção com a substância de referência Garcinielliptona (GFC)	54
Figura 11	Aparato para teste de espalhabilidade	59
Figura 12	Reação de redução do MTT para formazan	61
Figura 13	Animal em posição de decúbito dorsal e com peritônio exposto para coleta de macrófagos	65
Figura 14	Ensaio de determinação do volume lisossomal e ensaio de determinação da capacidade fagocítica.	67
Figura 15	Placa de 24 poços e cultivo de macrófagos <i>in vitro</i> /Visualização dos macrófagos infectados em microscopia óptica	68
Figura 16	Frações acetato de etila da banha-manteiga de bacuri UFPI (BBU) e banha-manteiga de bacuri industrializada (BBI)	73
Figura 17	Cromatograma de íons totais (TIC <i>Scan</i> ) das frações acetato de etila de bacuri. Fração acetato de etila da banha-manteiga de bacuri industrial (Fr AcOEt BBI). Fração acetato de etila da banha-manteiga da UFPI (Fr AcOEt BBU)	74
Figura 18 A	Cromatograma de íons totais da amostra de BBU	75

Figura 18 B	Cromatograma de íons totais da amostra de BBI	76
Figura 19	Gráfico comparativo da espalhabilidade em do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos T0 e o TC ao controle.	84
Figura 20	Gráfico comparativo da espalhabilidade em do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI tempos T0 e o T60.	84
Figura 21	Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos To e o TC ao controle.	86
Figura 22	Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos T0 e T60 ao controle.	86
Figura 23	Microfotografia da formulação de PLO contendo BBI no T0 na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x	87
Figura 24	Microfotografia da formulação de PLO contendo BBU no T0 na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.	88
Figura 25	Microfotografia da formulação de PLO contendo BBI no T60 na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x	88
Figura 26	Microfotografia da formulação de PLO contendo BBU no T60 na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x	88
Figura 27	Gráfico das curvas de ganho de peso após tratamento agudo com veículo, BBU e BBI (2,0 g/kg, v.o.) em ratos.	90
Figura 28	Gráfico dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido hepático após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.)	92
Figura 29	Gráfico dos níveis de catalase em tecido hepático após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).	92
Figura 30	A - Formação do nódulo; B- Úlcera com crosta capaz de fechar toda a abertura da ferida; C –Úlcera com material de consistência purulenta; D- Extensão total da úlcera após assepsia.	94
Figura 31	Gráfico da relação entre o tamanho das úlceras e os dias de tratamento das formulações placebo; BBI e BBU	95

Figura 32	Gráfico da relação entre o ganho de peso dos animais e o dias de tratamento das formulações placebo; FBBI e FBBU	96
Figura 33	Gráfico da retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com BBI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	97
Figura 34	Gráfico da retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com BBU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	97
Figura 35	Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com BBI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	98
Figura 36	Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com BBU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	99
Figura 37	Efeito do pré-tratamento de macrófagos com BBI (A) Percentual de infecção de macrófagos e (B) número médio de amastigotas por macrófago infectado	100
Figura 38	Efeito do pré-tratamento de macrófagos com BBU (A) Percentual de infecção de macrófagos e (B) número médio de amastigotas por macrófago infectado	101
Figura 39	Efeito de duas formulações tópicas à base de BBU 5,0% e BBI 5,0% sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata, i.pl.) em ratos	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Composição centesimal das formulações de organogel de banha- manteiga de bacuri UFPI e industrializada.	56
Tabela 02	Tabela comparativa entre o placebo, formulações contendo manteiga de bacuri da UFPI (FBBU) e Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada (FBBI) nos tempos $T_0$ (inicial) e $T_c$ (ciclo).	79
Tabela 03	Tabela comparativa entre o placebo, formulações contendo manteiga de bacuri da UFPI (FBBU) e Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada (FBBI) nos tempos $T_0$ (inicial) e $T_{60}$ nas seguintes situações de estresse: estufa, sem presença de luz direta e com a presença de luz direta	82
Tabela 04	Atividade citotóxica em MTT das amostras de BBI e BBU	89
Tabela 05	Peso relativo dos órgãos após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).	90
Tabela 06	Principais sinais clínicos e comportamentais de toxicidade avaliados após tratamento agudo com veículo, BBU e BBI (2,0 g/kg, v.o.) em ratos.	91
Tabela 07	Avaliação de parâmetros bioquímicos após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).	93
Tabela 08	Relação entre a toxicidade das manteigas de bacuri para os macrófagos murinos ( $CC_{50}$ ) e a toxicidade para o parasito ( $CI_{50}$ ) - índice de seletividade	102
Tabela 09	Efeito da Manteiga de Bacuri UFPI (BBU) sobre o edema de pata induzido por carragenina 0,1% em ratos.	104
Tabela 10	Efeito da Manteiga de Bacuri Industrializada (BBI) sobre o edema de pata induzido por carragenina 0,1% em ratos.	105

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não-estereoidais
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BBI	Banha- manteiga de bacuri Industrializada
BBU	Banha –manteiga de bacuri obtida na UFPI
CC <sub>50</sub>	Concentração Citotóxica
CCDC	Cromatografia Comparativa em Camada Delgada
CCD	Centro de Controle de Doenças
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
CGAR-EM	Cromatografia Gasosa de Alta Resolução- Espectrometria de Massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
FBBI	Formulação contendo banha- manteiga de bacuri industrializada
FBBU	Formulação contendo banha- manteiga de bacuri UFPI
FDA	Food and Drugs Administration
FUNASA	Fundação Municipal de Saúde
GFC	Garcinielliptona FC
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LV	Leishmaniose Visceral
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
MTT	(brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
NPPM	Núcleo de Plantas Mediciniais
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffer Saline
PG	Prostaglandinas
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina

P.L.O.	Pluronic® Lecithin Organogel
p/v	Peso/volume
rpm	Rotação por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SPE	Extração em fase sólida
STTs	Sistemas Terapêuticos Transdérmicos
t	Tempo
TIC	Cromatograma de íons totais
UCM	Unresolved complex mixture (complexa mistura não resolvida)
UV- vis	Ultravioleta visível
Vi	Volume inicial
Vf	Volume final
v/v	Volume/volume

## SUMÁRIO

### 1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Plantas medicinais: cultura e tradição .....	22
<b>Família Clusiaceae</b> .....	23
<b>A espécie <i>Platonia insignis</i> Mart.</b> .....	24
<i>Usos populares.</i> .....	27
<b>Fitoterápicos e programa de plantas medicinais.</b> .....	28
1.2 – Leishmanioses: Aspectos gerais .....	29
<i>Prevalência e distribuição geográfica</i> .....	29
<i>Etiologia</i> .....	30
<i>Ciclo biológico de <i>Leishmania</i></i> .....	31
<i>Aspectos clínicos da Leishmaniose LTA</i> .....	32
<i>Drogas de referência no tratamento e controle das leishmanioses</i> .....	33
<i>O uso de plantas medicinais no tratamento das Leishmanioses</i> .....	34
1.3 – Atividade anti-inflamatória .....	
<i>Fisiopatologia da Inflamação</i> .....	35
1.4 – Estrutura da pele .....	37
<i>Pele o maior órgão do corpo humano</i> .....	37
<i>A pele como barreira</i> .....	40
<i>Penetração de fármacos pela pele</i> .....	41
1.5 – Desenvolvimento farmacotécnico de formas farmacêuticas de uso tópico ....	44
<i>Organogéis</i> .....	44
<i>PLO como veículo de liberação de fármaco</i> .....	44
<i>Estudos de estabilidade de formas farmacêuticas</i> .....	45
Estabilidade preliminar .....	46
Estabilidade acelerada .....	46
2 – OBJETIVOS	
2.1 – Objetivo geral .....	48
2.2 – Objetivos específicos .....	48
3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	50
3.1 – MATERIAIS	
3.1.1 – Matérias primas e reagentes .....	50
3.1.2 – Equipamentos .....	50
3.2 – MÉTODO .....	51

<b>3.2.1 – Identificação botânica e obtenção das manteigas de <i>Platonia insignis</i></b>	
<b>Mart.</b> .....	51
<b>3.2.2 – Caracterização química das manteigas de <i>Platonia insignis</i></b> .....	52
<b>Análise por Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM)</b> .....	52
<i>Análise das banhas- manteigas do bacuri (Platonia insignis)</i> .....	52
<i>Clean up das manteigas de bacuri (Platonia insignis)</i> .....	52
<i>Análise da fração acetato de etila por CGAR-EM</i> .....	52
<b>Doseamento de Garcinielliptona FC (GFC) nas amostras BBU e BBI</b>	53
<b>3.2.3 – Obtenção tecnológica e avaliação da estabilidade preliminar e</b> .....	
<b>acelerada de formulações emulsionadas (FBBI e FBBU)</b> .....	55
<b>Preparação das formulações semi-sólidas</b> .....	55
<b>Análise Macroscópica das formulações</b> .....	55
<b>Resistência a Centrifugação</b> .....	56
<b>Estabilidade preliminar das formulações</b> .....	56
<b>Estabilidade acelerada das formulações</b> .....	57
<i>Características organolépticas</i> .....	57
<i>Determinação do pH</i> .....	58
<i>Espalhabilidade</i> .....	58
<i>Microscopia ótica</i> .....	59
<i>Viscosidade Aparente</i> .....	59
<i>Análise estatística dos resultados</i> .....	60
<b>3.2.4 – Avaliação Farmacológica das manteigas de <i>Platonia insignis</i> (BBU e</b>	
<b>BBI) e Formulações (FBBU e FBBI)</b> .....	60
<b>3.2.4.1 - Determinação da Toxicidade manteigas de <i>Platonia insignis</i> Mart</b>	60
<i>Atividade citotóxica em (MTT)</i> .....	60
<i>Avaliação da toxicidade aguda em ratos</i> .....	61
Parâmetros bioquímicos .....	61
Peso relativo de órgãos internos .....	62
<i>Análise estatística</i> .....	62
<b>3.2.4.2 - Avaliação da atividade leishmanicida</b> .....	62
<b>Avaliação da Atividade leishmanicida <i>in vivo</i> usando FBBI e FBBU</b>	62
Animais .....	62
<i>Manutenção das cepas de <i>Leishmania amazonensis</i></i> .....	63
<i>Obtenção das massas de <i>Leishmania</i> para infecção</i> .....	63

<i>Infecção</i> .....	63
<i>Tratamento</i> .....	63
<u><i>Protocolo básico de tratamento</i></u> .....	64
<u><i>Avaliação da eficácia do tratamento</i></u> .....	64
Aspecto Clínico .....	64
Acompanhamento da lesão ulcerativa.....	64
<i>Análise estatística</i> .....	64
<b>Avaliação da atividade leishmanicida <i>in vitro</i> usando BBI e BBU</b> .....	65
<b>Determinação de parâmetro para ativação de macrófagos</b> .....	65
<i>Elicitação e cultivo de macrófagos peritoneais de</i> .....	
<i>camundongo</i> .....	65
<i>Preparo das soluções</i> .....	66
<i>Ensaio de determinação do volume lipossomal</i> .....	66
<i>Ensaio de determinação da capacidade fagocítica</i> .....	66
<b>Avaliação da atividade leishmanicida sobre formas amastigotas</b> .....	67
<b>Análise Estatística</b> .....	68
<b>3.2.4.3 – Avaliação da atividade anti-inflamatória</b> .....	68
<i>Animais</i> .....	68
<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória das manteigas de BBU e BBI ..por via oral no modelo de para induzido por carregenina</i> .....	68
<u><i>Drogas</i></u> .....	69
<u><i>Edema de pata induzido por carregenina</i></u> .....	69
<i>Avaliação da atividade anti-inflamatória das formulações FBBU e FBBI por via tópica no modelo de para induzido por carregenina</i> .....	69
<u><i>Drogas</i></u> .....	69
<u><i>Edema de pata induzido por carregenina</i></u> .....	69
<i>Análise estatística</i> .....	70
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>4.1 – Caracterização química das manteigas de <i>Platonia insignis</i></b> .....	72
4.1.1 – <i>Análise por Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM)</i> .....	72
4.1.2 - <i>Doseamento de <i>Garcinielliptona FC</i></i> .....	77
<b>4.2 – Obtenção tecnológica e avaliação da estabilidade preliminar e acelerada de ... formulações emulsionadas de FBBI e FBBU</b> .....	78
<b>4.2.1 – Obtenção tecnológica de formulações semi-sólidas</b> .....	78

Características organolépticas.....	78
Resistência a Centrifugação.....	80
Estabilidade preliminar e acelerada das formulações .....	80
<b>4.3. – Avaliação Farmacológica das manteigas de <i>Platonia insignis</i> (BBU e BBI) e formulações (FBBU e FBBI).....</b>	<b>89</b>
<b>4.3.1 – Determinação da Toxicidade manteigas de <i>Platonia insignis</i> Mart ....</b>	<b>89</b>
<i>Atividade citotóxica em (MTT)</i> .....	89
<i>Avaliação da toxicidade aguda em ratos</i> .....	89
<b>4.3.2 – Avaliação da atividade leishmanicida .....</b>	<b>93</b>
<i>Avaliação da Atividade leishmanicida in vivo</i> usando as formulações FBBI e FBBU .....	93
<i>Avaliação da Atividade leishmanicida in vitro</i> usando as manteigas BBI e . BBU .....	96
<b>4.3.3 – Avaliação da atividade anti-inflamatória usando as manteigas BBI e BBU e as formulações FBBI e FBBU.....</b>	<b>103</b>
<b>6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>109</b>
<b>7 – REFERÊNCIAS .....</b>	<b>111</b>

## ***INTRODUÇÃO***

---

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1- Plantas Medicinais: cultura e tradição

As plantas têm sido, desde a antiguidade, um recurso ao alcance do ser humano possibilitando o acúmulo e o aprendizado empírico de informações sobre o ambiente através da observação constante dos fenômenos naturais a fim de melhorar as condições de alimentação e cura das enfermidades, demonstrando, uma inter-relação muito estreita entre o uso de plantas e a sua própria evolução. Há evidências do uso de plantas como remédio entre 4500 e 1600 a.C (MIGUEL; MIGUEL, 2000; ROKAYA et al., 2010; ALLABI et al., 2011). Poderes sobrenaturais eram atribuídos aos feiticeiros, pajés, xamãs, magos, curandeiros, dentre outros, que possuíam a “sabedoria” sobre o poder das drogas e venenos. A partir desse método empírico, foi possível acumular bastante conhecimento sobre o uso de plantas medicinais com fins de prevenção, tratamento e cura de doenças; servindo de referencial e fonte inesgotável de novos compostos na busca de fitomedicamentos (CORRÊA et al., 2003, DE VOS, 2010; LEONTI et al., 2010).

Em virtude da sua composição química complexa e variada as plantas medicinais apresentam as mais diversas atividades farmacológicas em que estes compostos naturais que, na maioria dos casos, atuam em sinergismo e produzem poucos efeitos adversos quando comparados com as drogas sintéticas, sendo assim, são promissoras fonte de novos medicamentos (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; LOVKOVA et al., 2001); entretanto a população tem a tendência de generalizar essa idéia, considerando que as plantas medicinais são sempre melhores para a saúde, portanto, deve-se disseminar o seu uso em estudos de eficácia e segurança, os quais permitem a prática racional do uso dessas plantas, promovendo à saúde da população e reduzindo os custos para o Sistema de Saúde (BENT, 2008).

A descoberta dessas plantas medicinais inclui inúmeros campos de investigação e vários métodos de análise. O processo, tipicamente, começa com um botânico, etnobotânico, etnofarmacologista, ou um ecologista que coleta e identifica a planta de interesse. A coleta pode envolver espécies com atividade biológica conhecida que não teve seu princípio ativo isolado (ervas tradicionalmente utilizadas como remédios) ou pode envolver uma coleta randômica. Em todo o caso é necessário respeitar o direito da propriedade intelectual da população de interesse onde ocorreu a coleta. Fitoquímicos preparam extratos dessas plantas, sujeitam esses extratos a vários testes farmacológicos relevantes, e começam o processo de isolamento e caracterização dos compostos. A biologia molecular tem se tornado essencial

para a descoberta de novas drogas através da determinação e implementação de testes direcionados a alvos moleculares específicos (BAKER et al., 1995).

Numerosos métodos têm sido utilizados para adquirir novas drogas de produtos naturais: síntese química, química combinacional e modelagem molecular (LEY; BAXENDALE, 2002; GEYSEN et al., 2003; LOMBARDINO; LOWE, 2004). Apesar do recente interesse dessas técnicas pela indústria farmacêutica, os produtos naturais são as fontes mais importantes para novas drogas e novas entidades químicas; nos anos de 2001 e 2002, aproximadamente, um quarto das melhores vendas mundiais foram de produtos naturais ou seus derivados (NEWMAN et al., 2000; BUTLER, 2004).

No âmbito técnico-científico, tal estudo multidisciplinar amplia o conhecimento das plantas para a produção racional de fitoterápicos seguros, eficientes, com reprodutibilidade garantida e mais acessível economicamente, ajudando a promover a saúde da população. Dessa forma, os extratos obtidos de plantas foram evocados como fontes relevantes de produtos naturais (DANTAS et al., 2008; VEIGA-JR; PINTO, 2005). A prática do uso de plantas medicinais vem crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e baixo custo (BALUNAS; KINGHORN, 2005).

Sabe-se que a medicina alopática tem suas raízes na medicina popular, e é muito provável que os futuros fármacos ainda sejam descobertos seguindo as pistas fornecidas pelos conhecimentos e pelas experiências populares (MACIEL et al., 2002). De qualquer forma, o que ocorre na maioria das sociedades atuais é uma complementaridade entre a alopatia e o uso de plantas medicinais. Portanto, as pessoas no mundo inteiro ainda usam a matéria medica para assistência à saúde; prova disso é que, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80 % da população mundial – principalmente dos países em desenvolvimento – contam com medicamentos derivados de plantas para assistência médica. Também é fato que um quarto de todas as prescrições médicas são formulações de substâncias derivadas de plantas ou de seus análogos sintéticos (MARTINS et al., 2003; TANG; HALLIWELL, 2010).

### **Família Clusiaceae**

A família Clusiaceae inclui aproximadamente 50 gêneros e 1200 espécies distribuídas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do globo. Estas plantas tipicamente tropicais possuem metabólitos secundários com importante atividade biológica. A família engloba árvores, arbustos, lianas e ervas de interesse econômico pela produção de frutos comestíveis, madeiras, derivados químicos de interesse farmacêutico e tintas. A maioria das

espécies está distribuída em três gêneros: *Hypericum* L (350 spp), *Clusia* L (200 spp) e *Garcinia* L (200 spp) (JUNIOR, et al, 2005). Em nove desses gêneros, cerca de 90 espécies são de plantas cujos frutos são comestíveis (BARROSO et al, 2002; COSTA JUNIOR, 2011a).

Investigações sobre a composição química das plantas da família Clusiaceae mostraram que estas são ricas em xantonas e benzofenonas poliisopreniladas que foram isolados não só nas resinas, mas também em outras partes das plantas (PICCINELLI et al., 2009; CHEN et al., 2010, COSTA JUNIOR, 2011a). Dentre as atividades biológicas conhecidas apresentam atividade antidepressiva, antioxidante, antifúngica, anti-HIV e antibacteriana.

### **A espécie *Platonia insignis* Mart.**

*Platonia insignis* Mart (família Clusiaceae) é popularmente conhecida no Brasil como bacuri ou bacurizeiro (Figura 01). A palavra Bacuri tem origem tupi e significa “ba”, cair e “curi”, logo, ou seja o que cai logo que amadurece, indicando desta forma que atingiu a maturação plena. Apresenta-se como uma árvore grande, podendo chegar de 15 a 25 metros de altura e cerca de 1 a 1,5 metros de diâmetro. Tem tronco reto com látex amarelo e galhos opostos em posição de V aberto; até de longe é possível reconhecê-la. Suas folhas são opostas, brilhosas, e as flores são grandes com pétalas róseas. No Brasil, o bacurizeiro tem seu centro de dispersão no Estado do Pará, podendo ser encontrado também no Mato Grosso, Amazônia, Tocantins, Maranhão, Piauí, fora do Brasil encontra-se também nas Guianas, Peru, Bolívia, Colômbia e Equador. No Pará as maiores concentrações estão nas regiões Salgado, Bragantina e Ilha de Marajó. Cresce em terra firme e fornece uma madeira de cor amarela, compacta, resistente muito utilizada na construção naval (MORAES, R.L.B. et al, 2009; COSTA JUNIOR, 2011a; SHANLEY; MEDINA, 2005; FERREIRA, 2008).

Segundo Pio Corrêa (1984) do Amazonas até o Piauí, Goiás e Mato Grosso tem como sinônimos *Bacuryuba*, *Ibacopary*, *Ibacury*, *Pacoury grande*; no Maranhão, *Pacuru* e *Ubacury*; no Paraguai, *Bacury- Guazú*; *Pakooru* na Guiana Inglesa e *Pacouri* na Guiana Francesa. Moura (2007) acrescenta outros nomes pelo qual o bacuri é conhecido na Guiana Francesa, *parcori* e *manil*; na Guiana Inglesa *pakuri*, *pakoori*, *geelhart*, *ger'ati*, *makasoe*, *mongo-mataaki* e wild *mammee Apple*; no Enquanto *matazama*, no Suriname, *pakoeli*. Na língua inglesa é mais comumente grafado como *bakuri*.

As flores do baruzeiro são hermafroditas e andrógenas, são encontradas nos galhos jovens podendo cobrir toda a copa da árvore. Possuem 4 sépalas e de 4 a 6 pétalas no início com a coloração rosada e depois vermelha (Figura 02).

Figura 01. Bacurizeiro - *Platonia insignis* Mart (Árvore).



Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

Figura 02: *Platonia insignis* Mart (flores) .



Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

O bacurizeiro começa a produzir frutos a partir de 10 a 15 anos de idade, mas se proveniente de enxertia este tempo pode diminuir para 6 anos, podendo produzir por volta de

2000 frutos, sendo a média de 400 por exemplar. Muitas árvores “descansam” de um ano para o outro e esta variação na produção não é algo descrito na literatura e é atribuída a ciclicidade da produção (FERREIRA, 2008).

Apresenta um fruto (Figura 03) com polpa rica em constituintes químicos com propriedades antioxidantes como, a vitamina C (ácido ascórbico) e E (tocoferóis) (BRAND-WILLIAMS et al., 1995) e uma semente rica em ácidos graxos, oléico (C18:1) 27,59%, palmítico (C16:0) 25,31%, éster metílico do ácido linoleico (C 18:2) 4,35%, ácido erúico (C 22:1) 3,50%, mirístico 3,34%, linoléico (C18:2) 2,5%, esteárico (C18:0) 1,86%, palmitoleico (C16:1 *cis* 9) 1,82%, além da presença de tripalmitina, cerca de 10 - 12% dos extrativos graxos das sementes de bacuri (COSTA JÚNIOR, 2011a; BENTES et al., 1986/1987; MORAES; GUTJAHR, 2009). A presença do diterpeno caur-16-eno, alcoóis graxos como eicosanol, octadecanol e hidrocarbonetos C<sub>15</sub>, C<sub>25</sub> e C<sub>28</sub> no óleo da semente de *P. insignis* foi investigada por espectrometria de massas (SILVA et al., 2009). ROGEZ et al (2004), relatou a presença de glutamina, ácido glutâmico como os aminoácidos majoritários, dentre outros, carboidratos (glicose, frutose e sacarose) e minerais (Na, K, Ca, Mg, P, Fe, Zn, Cu e Mn) na polpa do fruto do bacuri.

Figura 03- *Platonia insignis* Mart.(frutos)

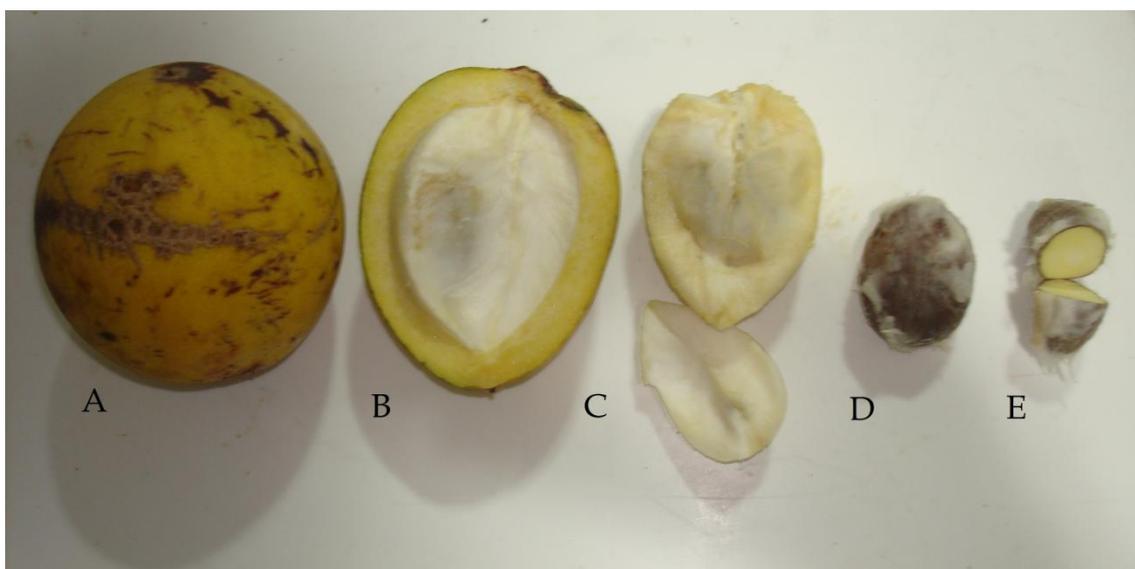


Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

No Pará, o floresce de junho a agosto e o seu fruto está disponível de dezembro a abril. A safra desta fruta pode variar em diferentes regiões, prolongando o seu fornecimento no mercado (SHANLEY, MEDINA, 2005). O tamanho do fruto pode variar de acordo com o local do plantio, condições gerais como temperatura, umidade, vegetação ao redor, e até mesmo da época da colheita feita em uma mesma planta. Em média, o fruto pesa 250 g, tem

um formato ovalado coberto por uma casca, cuja espessura varia entre 0,7 a 1,6 cm, representando 70% do peso (Figura 04) A parte comestível corresponde ao endocarpo, e representa 13% do peso do fruto. O endocarpo é de cor branca, com aroma forte e sabor adocicado. Encontra-se em cada fruta em média 4 sementes oleosas (FERREIRA, 2008; MORAES, GUTJAHR, 2009).

Figura 04: *Platonia insignis* Mart (A- fruto fechado, B- fruto aberto, C- polpa, D- semente fechada, E-semente aberta).



Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

### *Usos Populares*

O fruto do bacuri é muito procurado nas feiras de Belém para o preparo de doces, tortas, compotas, sucos e sorvetes. A procura crescente pelo fruto tem estimulado produtores a estabelecer áreas de cultivo. Sua semente não tem utilidade na alimentação mas pode ser utilizada na produção de sabão ou produção da banha de bacuri. A extração do óleo de bacuri ocorre com grande dificuldade visto que as sementes colocadas de molho em água por mais de um ano e depois são fervidas, sendo o óleo retirado da superfície da água fervente. As aplicações deste óleo a nível fitoterápico é popularmente como sendo um remédio eficaz contra picadas de aranhas, cobras, no tratamento de problemas de pele, para dor de ouvido, reumatismos e artrites. A manteiga de bacuri dá um tom dourado à pele, em poucos minutos após sua aplicação, ela é absorvida e a pele fica com um toque aveludado, além de tirar

manchas e diminuir cicatrizes (COSTA JÚNIOR, 2011a, MORAES, GUTJAHR, 2009; FERREIRA, 2008).

A composição graxa do óleo de bacuri corresponde a um óleo de alta absorção, devido ao seu elevado nível de tripalmitina (50 a 55%), que age como um conduinte penetrando na pele rapidamente. O alto valor do ácido graxo palmitoléico (5%), em comparação com outros óleos que não possuem mais que 0,5 a 1,5%, qualifica o óleo do bacuri como um emoliente fantástico podendo também ser utilizado como umectante. O ingrediente bioativo tripalmitina é utilizado em comprimidos mastigáveis por ter uma hidrólise lenta, isso atenua os efeitos colaterais de medicamentos pesados e dosa as quantidades para que o organismo fique sempre absorvendo as suas ações medicamentosas, de acordo com a farmacocinética. A atual fonte de tripalmitina no mundo é de uma planta chamada vulgarmente de Japanisi wax (*Rhus succedanea*) que é originária do Japão (MORAES, GUTJAHR, 2009).

### **Fitoterápicos e programa de plantas medicinais**

Um dos pré-requisitos para o sucesso do sistema de saúde primário é a disponibilidade dos medicamentos. As plantas sempre têm sido uma fonte comum de fármacos, seja na forma de preparações tradicionais ou do princípio ativo isolado. Então, é razoável, para as tomadas de decisões no Sistema de Saúde, identificar as plantas disponíveis que poderiam ser adicionadas na lista nacional de plantas medicinais e, se possível, informar aquelas que possam substituir preparações farmacêuticas disponíveis comercialmente ou importadas (FARNSWORTH et al., 1985).

No Brasil existe uma Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde que tem como objetivo subsidiar o desenvolvimento de toda cadeia produtiva, inclusive nas ações que também serão desenvolvidas pelos outros Ministérios participantes do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, relacionadas à regulamentação, cultivo/manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais e fitoterápicos. Essa lista contém 71 espécies, e esta deverá ser atualizada periodicamente (RENISUS, 2012).

Sabe-se ainda que o Sistema Público de Saúde no Brasil, sobretudo o do Nordeste brasileiro, não possui uma política de assistência farmacêutica capaz de suprir as necessidades medicamentosas da população. Desta forma, alguns estados e municípios brasileiros vêm implementando Programas de Fitoterapia na atenção primária à saúde, com o intuito de suprir as carências medicamentosas de suas comunidades (SILVA et al., 2006). Portanto é relevante

a caracterização, e avaliação de segurança e eficácia de plantas medicinais por grupos de pesquisas; já que esses estudos preliminares podem embasar a produção de um fitoterápico.

## 1.2– Leishmanioses: Aspectos gerais

As leishmanioses ou Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) são doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, que acometem o homem, causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. Sua transmissão é vetorial com ciclo heteroxênico; sendo caracterizada como doença primariamente zoonótica, no qual o homem pode ser envolvido secundariamente e de modo acidental. A infecção pode apresentar diferentes formas clínicas, dependendo da espécie de *Leishmania* envolvida e da relação do parasita com seu hospedeiro (FUNASA, 2001; GONTIJO, 2003).

A LTA é um problema de saúde pública mundial. É considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma das doenças infectoparasitárias endêmicas de maior relevância (MANDELL et al, 2005). O número de casos no Brasil é crescente, observando-se a existência de um duplo perfil epidemiológico, expresso pela manutenção de casos oriundos de focos antigos ou de áreas próximas a eles e pelo aparecimento de surtos epidêmicos associados a fatores como o processo acelerado de expansão das fronteiras agrícolas, a implantação de garimpos, a construção de estradas e o processo de invasão na periferia das cidades (FUNASA, 2000). Negligenciada por pesquisadores e agências de financiamento, as leishmanioses são endêmica em 88 países do mundo em que vivem 350 milhões de pessoas consideradas em risco de infecção. Nestes países, estima-se que 80% da população ganha menos do que \$ 2 dólares por dia (DESJEUX, 2003).

Fatores de risco crescentes estão fazendo das leishmanioses um problema de saúde pública em muitos países (NGURE et al, 2009). Novos tratamentos e ferramentas são essenciais para permitir a redução da incidência dessa doença.

### *Prevalência e distribuição geográfica*

Com exceção da Antártica a LTA é encontrada em todos os continentes do mundo, sendo principalmente endêmicas em regiões tropicais e sub-tropicais (PISCOPO, MALLIA, 2006). Segundo a OMS as leishmanioses ainda são uma das doenças mais negligenciadas do planeta, afetando principalmente os mais pobres e os países em desenvolvimento e estima-se

que ocorrem cerca de 1,5 a 2 milhões de casos anualmente, causando 57 mil mortes (TAVARES, 2009; WHO, 2010).

Estima-se que 90% de todos os casos de Leishmaniose visceral ocorrem no Brasil, Bangladesh, Índia e Sudão. Noventa por cento dos casos de leishmaniose cutâneo-mucosa ocorrem no Brasil, Bolívia e Peru, e 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Brasil, Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita e Síria (BASANO, CAMARGO, 2004).

No Brasil foram registrados 21.824 casos de leishmaniose cutânea em 2009 e 3.693 casos de leishmaniose visceral, no mesmo ano segundo levantamento do Ministério da Saúde. Anualmente são registrados em torno de 600 novos casos com alguns anos apresentando surtos epidêmicos, como em 2002 sendo registrados 1.250 casos (DUNAISKI, 2009).

A LTA encontra-se em fase de expansão geográfica e a sua incidência no Brasil tem aumentado, nos últimos 20 anos, em praticamente todos os estados. surtos epidêmicos têm ocorrido nas regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e, mais recentemente, na região Amazônica, relacionados ao processo predatório de colonização. Nas últimas décadas, as análises de estudos epidemiológicos da LTA, têm sugerido mudanças no comportamento epidemiológico da doença. Inicialmente considerada zoonose de animais silvestres que acometia ocasionalmente pessoas em contato com florestas, a LTA começa a ocorrer em zonas rurais já praticamente desmatadas e em regiões peri urbanas (FUNASA, 2001; GONTIJO, 2003).

### *Etiologia*

As leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias causadas por parasitas protozoários do gênero *Leishmania* pertencentes ao sub-filo *Mastigophora*, por apresentarem flagelo; à ordem *Kinetoplastida*, pois seu flagelo emerge de uma bolsa flagelar e à família *Trypanosomatidae*, por apresentarem mais de uma forma biológica durante seu desenvolvimento. Os vetores responsáveis pela transmissão dos parasitas são insetos da ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, em países do Velho Mundo e *Lutzomyia*, nas Américas (OLIVEIRA, 2010).

Apenas os vetores fêmeas possuem hábitos hematófagos e, dessa forma, são capazes de transmitir o parasita ao hospedeiro mamífero, no qual se incluem o homem e o cão (GRIMALDI; TESH, 1993). Estes insetos são mais ativos ao anoitecer, ao amanhecer e durante a noite, mas eles picam se forem perturbados em seus esconderijos (tocas animais,

buracos de árvores, cavernas) (PISCOPO; MALLIA, 2006). Durante o dia permanecem em repouso, na sombra, protegidos do vento e de predadores naturais (BRASIL, 2006).

### *Ciclo Biológico de Leishmania*

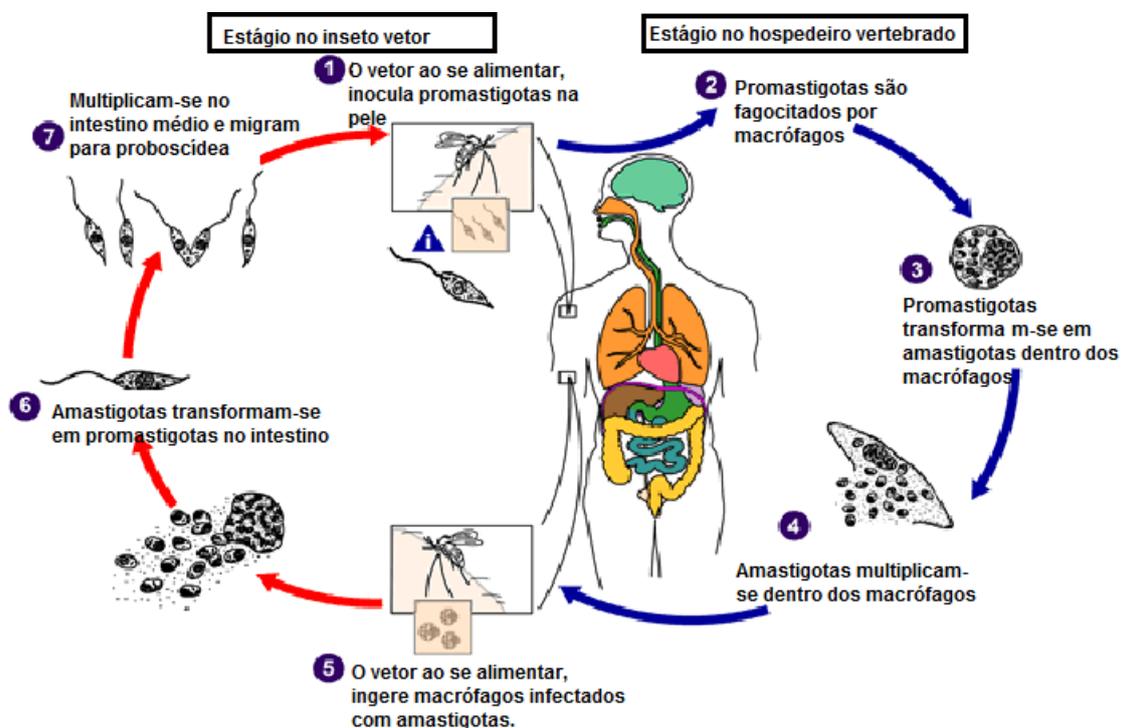
O gênero *Leishmania* agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos, encontrados nas formas promastigota, forma extracelular que parasita o trato digestivo do vetor flebotomíneo e a amastigota, um parasita intracelular obrigatório encontrada em células fagocítico-mononuclear no hospedeiro mamífero. Nos hospedeiros vertebrados a forma amastigota é arredondada e imóvel (Figura 05) (OLIVEIRA, 2010).

O ciclo biológico do parasita *Leishmania spp.* é bem definido. Os parasitas são transmitidos após a picada do vetor que ao regurgitar, inocula, junto com sua saliva, algumas centenas de formas promastigotas metacíclicas (geralmente de 100 a 1000 parasitas, por picada) na derme do hospedeiro vertebrado, enquanto realizam seu repasto sanguíneo. No local da picada, essas formas podem escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, representados principalmente pela imunidade inata e podem ser fagocitadas por células residentes no local, tais como macrófagos, monócitos e células de *Langerhans*. No interior dessas células, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas, permanecendo dentro de fagolisossomos, onde, então, originam o vacúolo parasitóforo, no qual iniciam os processos de reprodução por divisão binária e desenvolvimento celular. Ao se romperem liberam uma grande quantidade de parasitas, que podem infectar novas células. Os macrófagos infectados movem-se do local da picada para os linfonodos drenantes e, posteriormente, migram para outros órgãos como o baço, fígado e a medula óssea, visceralizando a infecção (OLIVEIRA, 2010)

Durante a hematofagia, um novo vetor flebotomíneo, ainda não infectado, pode ingerir células infectadas do hospedeiro mamífero infectado e que contenham formas amastigotas do parasita. As mesmas chegam ao intestino do vetor e se diferenciam em promastigotas, que são encontradas livres no trato digestivo médio e anterior do flebotomíneo. As promastigotas denominadas procíclicas multiplicam-se, amadurecem e aderem-se ao epitélio do esôfago e faringe do vetor, local onde se processa uma nova diferenciação para a forma promastigota metacíclica. As formas promastigotas metacíclicas, livres, dirigem-se para a parte anterior do aparelho bucal do vetor. O ciclo biológico do parasita completa-se quando o vetor flebotomíneo, agora infectado, alimenta-se de outro hospedeiro vertebrado ainda não infectado (NEVES, 2004; OLIVEIRA, 2010).

**Figura 05:** Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.

Adaptado de [HTTP://www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)



### *Aspectos Clínicos da Leishmaniose LTA*

É uma doença de caráter zoonótico que acomete o homem e várias espécies de animais silvestres e domésticos, podendo ter diversas manifestações clínicas. Duas formas de leishmaniose, cutânea e visceral, acometem em humanos. Alguns textos também distinguem uma forma muco cutânea, enquanto outros consideram que é um subconjunto da leishmaniose cutânea. A forma da doença e os sinais clínicos usuais variam de acordo com as espécies de *Leishmania* e com a resposta imune do hospedeiro. Sendo que algumas infecções permanecem assintomáticas (BRASIL, 2006; PISCOPO, MALLIA, 2006; MELO NETO, 2011).

Leishmaniose cutânea é a forma mais comum de todas as leishmanioses, podendo envolver somente a pele caracterizada por uma a dezenas de lesões. Dependendo da espécie de *Leishmania*, úlceras, nódulos lisos, placas planas podem ser vistos. Geralmente, as lesões iniciais em que foi exposta ao flebotomíneos formam as pápulas. Podendo a lesão permanecer localizada ou disseminada pelo sistema linfático originando lesões secundárias (PISCOPO, MALLIA, 2006)

*Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* é uma espécie destacada por ser responsável por duas formas de interesse clínico: a Leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por lesões geralmente únicas, de caráter benigno, e Leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada imunologicamente por uma anergia do hospedeiro e falta de resposta imunitária de base celular (WHO, 2010).

Os doentes de leishmaniose são caracterizados por um espectro de manifestações clínicas: lesões cutâneas ulcerativas desenvolvidas no sítio da mordedura flebotomíneo (leishmaniose cutânea localizada - LCL); nódulos múltiplos não-ulcerativos (leishmaniose cutânea difusa - LCD); inflamação destrutiva das mucosas (leishmaniose mucosa - LM); e infecção disseminada visceral (leishmaniose visceral, LV). O resultado da infecção depende da espécie de *Leishmania* e da resposta imune específica do hospedeiro (REITHINGER et al., 2007).

#### *Drogas de referência no tratamento e controle das leishmanioses*

No Mundo, o tratamento de escolha envolve os compostos antimoniais, existindo no mercado atualmente duas formulações de Sb+5 disponíveis: Stibogluconato de sódio e o antimoniato-N-metil glucamina, não parecendo existir diferenças quanto a eficácia terapêutica entre os dois. No Brasil, a única formulação disponível é o antimoniato N-metil glucamina, que vem sendo distribuída pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2006). Entretanto, a droga possui elevada toxicidade, de modo que requer administração parenteral, além disso, em muitos casos, não é efetiva no tratamento (NETO, 2008).

Outras drogas podem ser utilizadas, como a anfotericina B clássica, apesar de sua toxicidade e necessidade de ambiente hospitalar para sua administração e a pentamidina que é nefro-cardio-hepatopancreatotóxica. As principais reações adversas são dor, hipotensão, síncope, náuseas, vômitos, desconforto abdominal, tontura, adinamia, mialgias, cefaléia, hipoglicemia e hiperglicemia (ALMAGRO, 2005).

Nos últimos anos, doses progressivamente maiores dos antimoniais têm sido recomendadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos da América devido ao aparecimento de resistência primária do parasita a essas drogas. Vale ressaltar ainda a aplicação, ainda que em forma experimental, das pentamidinas (sulfato e mesilato), os imunomoduladores (interferon gama e GM-CSF). Os efeitos colaterais da anfotericina B são inúmeros e frequentes, todos dose dependentes (BRASIL, 2006). Novas drogas têm sido propostas como o miltefosine com bons

resultados na Índia para Leishmaniose cutânea, contudo apresenta muito efeitos tóxicos (BEZERRA, 2006)

### *O uso de plantas medicinais no tratamento das leishmanioses*

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas.

Inúmeras plantas apresentam na sua composição compostos bioativos que isolados podem fornecer elementos essenciais e alternativos aos tratamentos convencionais visando à redução não só dos efeitos colaterais, da toxicidade e dos custos dos medicamentos já existentes (BEZERRA, 2006). Para o tratamento das leishmanioses, como exemplo, temos compostos pertencentes a diferentes classes químicas como alcalóides (quinolonas isoladas da *Galipeda longiflora*), lignanos tal como (+) niasol isolado a partir de *Asparagus africanus*); terpenos, cumarinas, lactonas, saponinas que com estruturas bem conhecidas e trabalhadas podem ser usadas como modelos de desenvolvimento pra novas drogas (AKENDENGUE et al, 1999).

No Brasil, o uso das plantas medicinais foi disseminado principalmente pela cultura indígena. Temos um país rico em diversidade biológica, cujo território possui cinco principais biomas a floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de produtos terapêuticos, no entanto, este potencial para a descoberta de plantas como fonte de novas drogas é pobremente explorado ou regulamentado (MELO NETO, 2011).

Algumas espécies vêm sendo estudadas e tem apresentado resultados promissores como os óleos essenciais ricos em terpenos: *Croton cajucara*, com atividade sobre formas promastigotas e amastigotas; óleo essencial de *Piper auritum*; alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*; extrato hidroalcoólico de *Tanacetum parthenium* hoje é industrializada e vendida para tratamento da enxaqueca (ROSA et al., 2003; MONZOTE et al., 2010; FERREIRA et al., 2004).

Costa Junior, 2011a, em sua tese, apresentou excelentes resultados da atividade de *P. insignis* Mart sobre formas promastigotas resultando em dados melhores que a anfotericina B.

Diante do apresentado, salientando a necessidade em reduzir as dificuldades no tratamento das leishmanioses, e a importância da investigação de novas substâncias, o

presente trabalho propõe avaliar duas banhas-manteigas de bacuri: uma obtida da semente do bacuri através de extração com hexano e a outra obtida industrialmente efetuando, desta forma, testes *in vivo* e *in vitro* contra *Leishmania amazonensis*.

### 1.3-Atividade Anti-inflamatória

#### *Fisiopatologia da Inflamação*

A resposta inflamatória representa um dos mecanismos de defesa do nosso organismo, e consiste de uma longa cadeia de reações e atividades celulares com o intuito de reparar o tecido em que ocorre uma lesão ou destruição celular, ocorrendo atividades celulares, aumento de arteríolas e vênulas, assim como aumento da permeabilidade vascular e fluxo sanguíneo, como consequência, o acúmulo de líquidos (CARVALHO, 2004). Esta inflamação, geralmente aguda, é a resposta inicial ao agressor e pode tornar-se desconfortável para o paciente devido ao edema formado e a dor.

Desse modo, a inflamação pode ser definida como o conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em resposta a estímulos agressivos ao organismo, uma vez que sua principal função é eliminar a infecção ou reparar os danos e assim retornar ao estado de homeostase (BARTON, 2008). É amplamente definida como uma reação inespecífica protetora à lesão de tecidos vascularizados. As características clássicas deste fenômeno estão relacionadas ao aumento do fluxo sanguíneo capilar (calor e rubor) e da permeabilidade vascular, à infiltração de células em tecido (edema) e à liberação de substâncias no local da inflamação (dor) (LARSEN; HOLT, 2000), resultando assim, nos quatro sinais característicos da inflamação. Pode ocorrer, em alguns casos, a perda da função da área lesionada (ROCHA et al., 2007).

A inflamação pode ocorrer em três fases distintas e cada uma mediada por diferentes mecanismos: uma aguda que tem como característica principal a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular; uma fase sub-aguda que consiste na infiltração de leucócitos e fagócitos; e por fim, a fase crônica caracterizada pela degeneração dos tecidos e na presença de fibroses (ROTELLI et al., 2003). A inflamação aguda é a primeira resposta a uma lesão celular ou tecidual, na qual contempla uma série de alterações sequenciais. Ela é mediada através de substâncias, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos (LIEBERMAN, 2009).

Na reação inflamatória existem eventos vasculares que levam à formação de edema e aqueles que acarretam a migração de leucócitos. Estes eventos são desencadeados por diferentes mediadores que se originam do plasma ou células locais, podendo ser ampliados ou modificados por mediadores liberados das células inflamatórias que migraram para o local da inflamação (PAUL, 1998). Os eventos vasculares consistem em dilatação inicial das pequenas arteríolas, resultando no aumento do fluxo sanguíneo, seguido de redução e, a seguir, estase do sangue e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, com exsudação de líquido. A vasodilatação é produzida por diversos mediadores, entre eles, prostaglandinas (PG)  $E_2$  e  $PGI_2$  (prostaciclina), aminas vasoativas, como a histamina (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

Durante o processo inflamatório ocorre a interação de vários mediadores que, agindo em conjunto, induzem modificações morfológicas e funcionais peculiares ao processo, tais como eritema, rubor, edema, dor ocorrendo perda de função celular ou estrutural (BALBINO et al., 2005). Esses mediadores pró-inflamatórios são tanto de origem tissular, por exemplo, os eicosanóides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), fator de ativação plaquetária, aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF e IFN- $\alpha$ ), óxido nítrico, como de origem plasmática, os componentes do sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema das cininas (FEGHALI; WRIGHT, 1997; CARVALHO, 2004).

Fármacos com ação anti-inflamatória estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (PARENTE, 2000; FIORUCCI et al., 2001). Eles podem acarretar efeitos adversos, resultantes da inibição da atividade da prostaglandina  $E_2$  sintetase, incluindo perfuração e hemorragia do trato gastrointestinal (SCHOLICH; GEISSLINGER, 2006).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) induzem o aparecimento de graves efeitos adversos como sangramento gastrointestinal, alterações renais e nos mecanismos de hemostase. Tais ações, que parecem ser decorrentes da inibição da COX-1, levaram à busca de inibidores mais seletivos, o que resultou no surgimento de drogas mais específicas para COX-2, como, por exemplo, rofecoxib e celecoxib. Contudo, estes inibidores seletivos de COX-2 inibem a  $PGI_2$  que possui efeitos protetores sobre o sistema vascular, o que pode explicar a maior incidência de ataques cardíacos e acidente vascular cerebral entre aqueles que utilizam estes fármacos (SCHOLICH; GEISSLINGER, 2006). Além disso, estudos clínicos têm sugerido que esses inibidores poderiam causar outros efeitos colaterais tais como lesões gastrointestinais e hipersensibilidade (ARAICO et al., 2007).

Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias derivadas de produtos naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos. Desse modo, o óleo obtido das sementes do fruto de *P.insignis* apresenta um forte potencial por ser utilizado na medicina popular como agente anti-inflamatório e cicatrizante (SANTOS-JÚNIOR et al. 2010).

#### 1.4 – Estrutura da pele

##### *Pele: maior órgão do corpo humano*

A pele é o maior órgão do corpo humano de estrutura biológica complexa, compreendendo 10 a 15% do peso corporal, e realiza múltiplas atividades de forma precisa para regular e defender o organismo (PEYREFITTE, 1998; LEONARDI, 2004; CLARK et al., 2007). Esse envoltório de proteção e comunicação com o meio externo desempenha diferentes funções, como termorregulação, resposta aos estímulos imunológicos, síntese bioquímica, proteção frente a atritos e a radiação ultravioleta, detecção sensorial e comunicação social e sexual (OLIVEIRA et al., 2004).

A pele é organizada, essencialmente, de três camadas: uma superior - a epiderme, estratificada e avascular; uma camada intermediária - a derme, formada por tecido conjuntivo; e uma camada profunda - a hipoderme, constituída por tecido conjuntivo adiposo (Figura 06 – Camadas da pele). Tais estruturas podem apresentar consideráveis variações regionais na espessura, distribuição dos anexos cutâneos e cor (HUANG et al., 2005).

A epiderme é um epitélio pavimentoso estratificado, cujas células estão em processo dinâmico, ou seja, em constante renovação. A principal célula e mais abundante dessa camada é o queratinócito, correspondendo cerca de 95% do total das células epidérmicas. À medida que o queratinócito progressivamente se desloca da membrana basal à superfície da pele, formam-se as distintas camadas da epiderme (Figura 07): estrato basal, estrato espinhoso, estrato granuloso e estrato córneo. Nas palmas das mãos e plantas dos pés, há uma camada adicional entre o estrato córneo e granuloso: o estrato lúcido. Outros tipos de células encontradas são os melanócitos, as células de Langerhans e as células de Merkel (KHAVKIN, ELLIS, 2011).

A diferenciação morfológica sofrida pelos queratinócitos é conhecida como queratinização ou corneificação, a qual consiste em marcantes alterações, tais como: perda das principais organelas celulares, agregação de filamentos de queratina e formação de um

envelope celular. Nesse processo, um certo número de proteínas são submetidas a modificações pós-translacionais, incluindo pontes dissulfeto e ligamentos cruzados de isopeptídeos (YING et al, 2009).

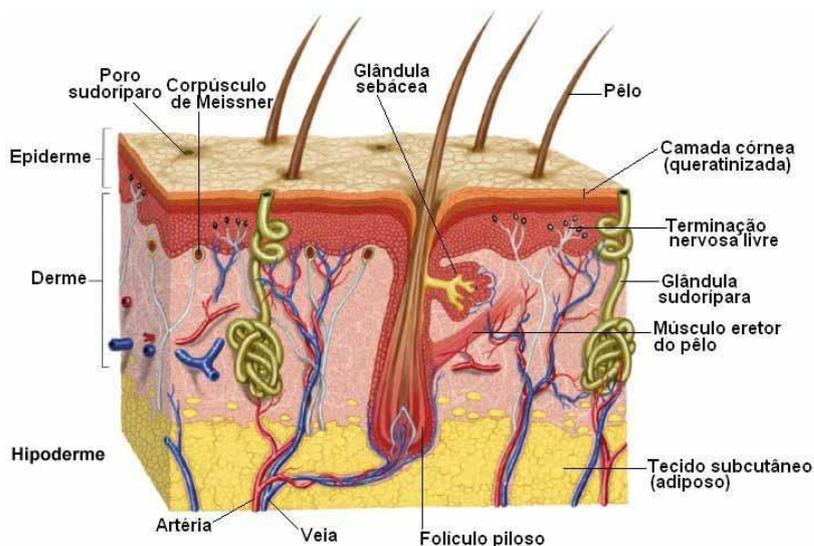
Após essas modificações estruturais, essas células passam a ser chamadas de corneócitos e, juntamente com a matriz lipídica, formam o estrato córneo, que, de fato, é a barreira física que nos protege da perda excessiva de água e da invasão de substâncias químicas e biológicas. Sendo assim, o estrato córneo constitui o principal obstáculo para a penetração de ativos hidrofílicos, enquanto a epiderme viável, que se localiza logo abaixo do estrato córneo, confere maior resistência às substâncias altamente lipofílicas (MOSER et al, 2001; RAWLINGS et al., 2008).

Com uma espessura de até 15  $\mu\text{m}$ , o estrato córneo é a principal barreira física à entrada da maioria das substâncias na pele e à perda de água (ELIAS, 1983; SCHEUPLEIN, BLANK, 1985; POTTS, FRANCOLEN, 1991), embora seja levemente permeável a água. A queratina, depositada nos corneócitos, confere resistência química e física ao tecido (ZATZ, 1993). A hidratação da queratina fornece plasticidade à pele, tornando a função barreira menos vulnerável a estresse mecânico. Quando os corneócitos perdem água, a pele se torna quebradiça, e a impermeabilidade é comprometida (FORSLIND, 1994).

A derme é a camada mais profunda, diretamente adjacente à epiderme e fornece o suporte mecânico para a pele. É constituída por elementos do tecido conjuntivo, composto por proteínas fibrosas (colágeno e elastina) e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanas, sais, água, além de fibroblastos. Além disso, é extensivamente vascularizada e apresenta unidades pilosebáceas e glândulas sudoríparas. Pode ser subdividida em duas camadas: a derme papilar que está em contato com a epiderme e que é formada por tecido conjuntivo frouxo, e a reticular, constituída por tecido conjuntivo denso não modelado, onde predominam as fibras de colágeno (VENTRE et al., 2009).

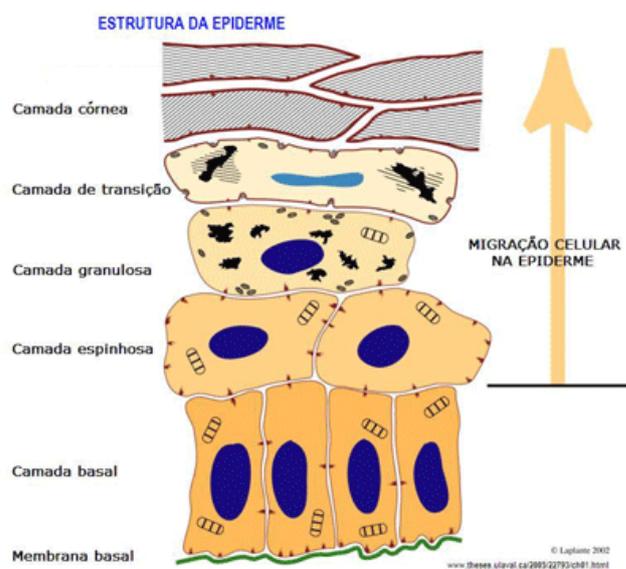
A hipoderme ou panículo adiposo é a camada mais profunda da pele apresentando uma espessura variável e constitui-se de células de gordura denominadas adipócitos. Funcionalmente, a hipoderme, além de depósito nutritivo de reserva, participa do isolamento térmico e da proteção mecânica do organismo, possuindo uma vasta vascularização (GEERLIGS et al., 2008).

Figura 06 – Camadas da pele com as suas estruturas.



Fonte: MARINHO, L. **A importância da Pele.** Disponível em:<  
<http://irmasgg.blogspot.com/2010/08/importancia-da-pele.html>>. Acesso em: 30 mar. 2011.

Figura 07- Modelo esquemático do complexo processo de migração das células da camada basal até a camada córnea



Fonte: MARINHO, L. **A importância da Pele.** Disponível em:<  
<http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://projetoferidas.zip.net/images/epiderm1.jpg&imgrefurl=http>>. Acesso em: 28 mar. 2011.

### *A pele como barreira*

A pele mantém importante função de barreira física para proteção do organismo e contra perda de água. Os lipídios são os responsáveis pela função de barreira à perda de água e entrada de substâncias do estrato córneo (ELIAS, 1983; BOMMANNAN et al., 1990). Barry demonstrou o elevado ponto de fusão desses lipídios, indicando que essas estruturas na camada córnea estão arranjadas com um alto grau de ordem e alta densidade (BARRY, 1987).

Além disso, a pele também é um órgão capacitado à execução de múltiplas funções. Uma das funções é a de exercer proteção imunológica devido a sua grande atividade imunológica, onde atuam intensamente os componentes da imunidade humoral e celular. Além disso, a pele também desempenha um a função de termorregulação através de seus sistemas de circulação e evaporação. Outra função é a percepção de sensações de toque, dor, calor e frio através de uma complexa e especializada rede nervosa cutânea. A pele é capaz de sintetizar hormônios (ex. dehidrotestosterona) e vitaminas (ex. vitamina D) assim como metabolizar xenobióticos (PROKSCH et al, 2008).

Antigamente a pele era conceituada apenas como um mero envoltório que separava o meio externo do meio interno, desconhecendo-se tais funções como a função e estrutura do estrato córneo. Para que houvesse uma mudança de opinião e conceito foi necessário que o estrato córneo fosse analisado de forma isolada e observados as particularidades da permeabilidade dessa camada, descrevendo estruturas que liberavam a matriz lipídica encontrada entre os corneócitos, dentre outras funções. O modelo esquemático da pele foi plenamente aceito para explicar o estrato córneo do ponto de vista da permeabilidade, chamado de “*brick & mortar*”, em que os tijolos são os corneócitos e o cimento são os lipídeos (ADDOR, AOKI, 2010).

Durante as últimas décadas, o modelo de dois compartimentos simples evoluiu para um conceito apresentando o estrato córneo como um sistema de atividade metabólica regulamentada e como um biosensor para fatores externos (por exemplo, regulando a atividade proteolítica, síntese de DNA e síntese lipídica). Assim, os componentes do estrato córneo são considerados como estruturas controladoras da taxa de permeação transcutânea de xenobióticos (DARLENSKI et al., 2009), fato relevante para administração de fármacos pela via tópica (LOFTSSON, OLAFSSON, 1998).

Dessa forma, a habilidade de um fármaco em uma formulação tópica permear a pele e exercer seu efeito depende, além das características do estrato córneo, tanto das propriedades físico-químicas do agente bioativo, quanto de outros fatores relacionados com a composição

do veículo (BRINON et al., 1999). Estudar os aspectos que regulam a permeação cutânea são, portanto, de extrema importância, já que a eficácia clínica de um fármaco aplicado por via tópica depende, não só das suas propriedades farmacológicas, mas também da sua disponibilidade no local de ação (LOFTSSON, OLAFSSON, 1998).

### *Penetração de fármacos pela pele*

Produtos farmacêuticos aplicados na pele podem ser subdivididos em duas categorias: (i) sistemas transdérmicos, que têm como objetivo a absorção dos fármacos pela circulação sanguínea para tratamento de doenças sistêmicas e (ii) formulações dermatológicas, como cremes, pomadas, loções e géis, para o tratamento local de doenças na pele. Apesar de possuírem características e objetivos distintos, a eficácia de ambos dependerá da liberação do fármaco da formulação que o contém e de sua penetração/difusão pelas camadas da pele (BEMVINDO, 2006; SHAH et al., 1991).

Na década de 50 foi introduzido um novo conceito de liberação de fármacos através da pele, apesar de um crescente avanço da pesquisa científica em cima desta nova descoberta, apenas em 1979 foi aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA) e disponibilizado comercialmente nos Estados Unidos, a primeira geração de medicamentos de aplicação na pele destinados a náuseas, vômitos e angina associados às viagens, principalmente marítimas. Os sistemas terapêuticos transdérmicos (STTs) facilitam a passagem de quantidades terapêuticas de fármacos através da pele, com o objetivo de atingir a circulação sanguínea, para exercer efeitos sistêmicos (ALLEN et al., 2007).

Observa-se um aumento na popularidade dos sistemas terapêuticos transdérmicos (STT) nos últimos anos por uma série de razões, incluindo: (1) grande adesão dos pacientes ao tratamento; (2) níveis plasmáticos constantes, resultado da liberação contínua de fármaco por determinado período; (3) menor incidência de efeitos colaterais, devido à ausência de picos de concentração, (4) eliminação do efeito de primeira passagem e (5) disponibilidade de tecnologia para formulações confiáveis e confortáveis ao uso (SHAH et al., 1991)

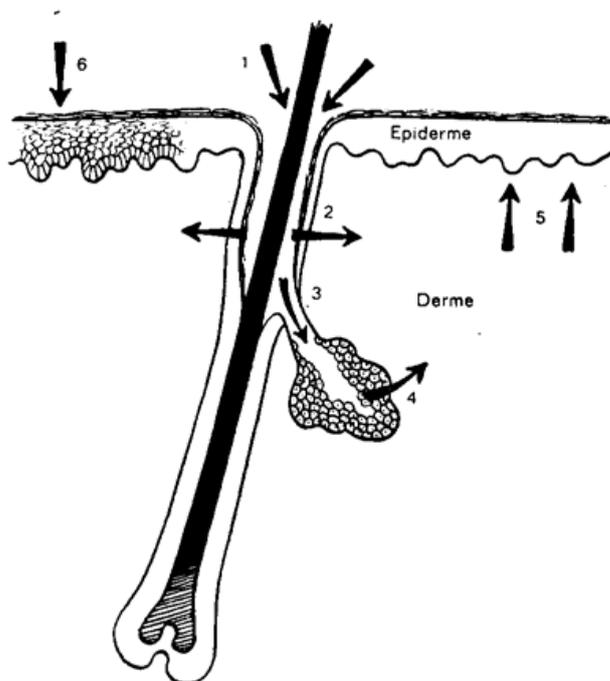
O processo básico envolvido na tecnologia de liberação de fármacos transdérmicos é a absorção percutânea ou transdermal do fármaco (SINKO, 2008).

A administração transdérmica, entretanto, possui limitações muito específicas que se originam, principalmente, na excelente propriedade de barreira oferecida pelo estrato córneo. Apenas compostos dotados de certa lipofilia, não ionizados e de baixo peso molecular podem penetrar passivamente a pele, a ponto de sofrerem absorção percutânea. Clonidina, nicotina e

estradiol são exemplos de fármacos disponíveis em formulações transdérmicas (AULTON, 2005).

A organização em camadas lamelares dos muitos lipídios do estrato córneo compõe a principal barreira para a permeação de substâncias ativas na pele. A permeação de substâncias através da pele (Figura 08) podem ser entre os lipídios do estrato córneo, chamada de permeação transcelular, pelos lipídios do estrato córneo, chamada de permeação intercelular e ainda através de glândulas e folículos, chamada de permeação transpendicular (CHORILLI et al, 2007). Em quaisquer dos caminhos que a permeação possa ocorrer, a estrutura do estrato córneo obriga o fármaco a se difundir através das bicamadas lipídicas intercelulares (ROUGIER et al., 1983).

Figura 08 - Representação esquemática da penetração de substâncias através da camada córnea e dos canais formados pelos anexos cutâneos. 1-Canal do pêlo, 2-Canal excretor de sebo, 3-Colo da glândula sebácea, 4-Glândula sebácea, 5-Passagem transfolicular, 6-Passagem transepidérmica.



Fonte: PRISTA e colaboradores, 1992.

Estas diferentes rotas para permeação cutânea de fármacos foram debatidas por muitos anos. A contribuição da área de apêndices cutâneos para permeação de fármacos é

praticamente negligível uma vez que apresenta 0,1 % da área total de permeação cutânea, sendo este caminho importante para moléculas muito polares e para administração específica de fármacos no folículo piloso (BARRY, 2004).

Todavia a penetração através do estrato córneo ocorre principalmente através de duas vias, sendo elas: via intercelular, onde o fármaco difunde-se ao redor dos corneócitos pela matriz lipídica intercelular; e via transcelular, onde o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica (BARRY, 2004).

Os sistemas terapêuticos transdérmicos foram, tecnicamente, divididos por Allen, 2007 em duas classes distintas: sistemas monolíticos e sistemas controlados por membrana. Os sistemas monolíticos de liberação transdérmica apresentam o fármaco incorporado em uma camada matricial composta por material polimérico que controla a liberação do fármaco. Este material polimérico geralmente é solubilizado juntamente com o fármaco para formação da matriz e após passar pelo processo de secagem, esta mistura é incorporada entre a camada anterior e a frontal do adesivo transdérmico (ALLEN et al, 2007).

Os sistemas controlados por membrana contem um reservatório geralmente na forma líquida ou de gel contendo o fármaco, uma membrana que controla a velocidade de liberação e camada adesiva. A vantagem sobre os sistemas monolíticos é que a velocidade de liberação permanece constante, uma vez que a solução do fármaco no reservatório permanece saturada. De uma forma geral, os TTSs são constituídos por diferentes números de camadas, incluindo uma camada externa que protege o sistema do ambiente externo e de perdas, uma camada matricial ou de reservatório que armazena e libera o fármaco para a pele, uma camada adesiva para manter o fármaco em contato com a pele e uma última lâmina protetora que deve ser removível antes do uso (ALLEN et al., 2007).

A promoção de permeação de fármacos através da pele pode ter os seguintes resultados: (1) melhoramento da liberação do fármaco a partir de preparações farmacêuticas transdérmicas; (2) aumento do fluxo de fármaco através da pele ou retenção de fármaco nesta; (3) aumento da liberação localizada, tópica ou dos tecidos alvo através da pele; (4) combinação de 1, 2 e 3 (MATSUDA, ARIMA, 1999).

Com o objetivo de, por um lado, ultrapassar os problemas devidos à impermeabilidade da pele e à variabilidade biológica e, por outro, de aumentar o número de fármacos candidatos ao desenvolvimento de medicamentos transdérmicos, vários métodos para remover reversivelmente a resistência desta barreira da pele têm sido investigados, entre os quais, a utilização de promotores de permeação (MARTINS, VEIGA, 2002).

## 1.5 - Desenvolvimento farmacotécnico de formas farmacêuticas de uso tópico

### *Organogéis*

O organogel ou MBG do inglês, *microemulsion based gels*, é formado pela solubilização de gelatina em uma microemulsão água em óleo, para a formação de géis transparentes. A formação do organogel foi primeiramente descrita em 1986, e sua caracterização física/estrutural tem sido alvo de vários estudos. As mudanças que ocorrem na estrutura dos organogéis variam de acordo com a quantidade de seus componentes (água, óleo, surfactante e gelatina), permitindo obter diagramas de fases, também conhecidos como “regiões de estabilidade”. Estes, por sua vez, possibilitam estudar a relação dos componentes do organo-gel no processo de gelatinização, para se obter organo-géis com rigidez e estabilidade diversas (QUEIROZ, NASCIMENTO, 1999).

A primeira descrição do organogel de lecitina foi dada em um artigo publicado por Scartazzini e Luici em 1988. Eles descobriram que a adição de pequena quantidade de água em soluções não-aquosas de lecitina natural causava um abrupto aumento na viscosidade ( $10^4$ - $10^6$  vezes), produzindo uma transição para um estado gelatinoso. Este fato permite considerar que a formação do organogel por adição de água é um fenômeno comum inerente de soluções não aquosas de lecitina (SHCHIPUNOV, 2001).

Organogéis são sistemas semi-sólidos, no qual uma fase líquida orgânica é imobilizado por uma rede tridimensional de fibras de gelatina entrelaçadas. Apesar de sua composição majoritariamente líquida, estes sistemas demonstram aparência e comportamento reológico de sólidos (VINTILOIU, LEROUX, 2008).

### *PLO como veículo de liberação de fármaco*

O PLO é um gel derivado de organogels de lecitina composto de palmitato de isopropila, lecitina de soja, água e polímero hidrofílico Pluronic F127. Segundo Murdam (2005) o PLO não é realmente um organogel o que se dá devido a presença do polímero e a uma quantidade de água maior que de óleo, mas que pode ser pensado como um organogel devido ao seu nome. Desde o seu desenvolvimento tem sido utilizado como veículo tanto para uso humano como veterinário. Pesquisas indicam que pode veicular uma gama bem variada de princípios ativos que vão desde hormônios, anti-inflamatórios a antidepressivos, sem falar

que o PLO pode ser usado de forma promissora e eficiente na “entrega” ou melhor na absorção dos ativos. Outra característica importante do PLO é o fato de ser termicamente estável, viscoelástico, biocompatível com várias formulações e apropriado para uso com solventes orgânicos e solventes polares (SCARTAZZINI, 1988).

### *Estudos de estabilidade de formas farmacêuticas*

A estabilidade é definida como o tempo durante o qual a especialidade farmacêutica ou mesmo a matéria prima considerada isoladamente, mantém dentro dos limites especificados e durante todo o período de estocagem e uso, as mesmas condições e características que possuía quando da época de sua fabricação. Pode também ser definida como o período de tempo compreendido entre o momento no qual o produto está sendo fabricado àquela que sua potência está reduzida a não mais do que 10%, desde que os produtos de alteração estejam todos seguramente identificados e previamente reconhecidos seus efeitos (TABORIANSKI, 2003; VEHABOVIC et al., 2003; SILVA, 2009).

A estabilidade de produtos farmacêuticos depende de fatores ambientais como temperatura, umidade e luz, e de outros relacionados ao próprio produto como propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005).

Com a finalidade de garantir a integridade química, física, microbiológica, terapêutica e toxicológica do fármaco e da forma farmacêutica dentro dos limites especificados, sob influência dos fatores ambientais em função do tempo, são preconizados estudos de estabilidade (ANSEL et al., 2007).

O estudo de estabilidade descrito pela RE nº1/2005 (Brasil, 2005) possui como principal aplicabilidade a determinação do prazo de validade do produto farmacêutico. Porém, também determina a quantificação dos produtos de degradação e o método analítico correspondente, que resultou na publicação de um Informe Técnico nº 1/2008, com o objetivo de esclarecer procedimentos nos casos em que a impureza ou o padrão do produto de degradação não estão disponíveis. Estes procedimentos envolvem a realização de testes de estresse sob condições variadas (BRASIL, 2008).

### Estabilidade preliminar

Os testes de estabilidade preliminar são de suma importância no desenvolvimento de formulações. Infelizmente a RE nº1/ 2005 não faz menção a estes testes. No Brasil, como referencial utilizamos o Guia de Estabilidade para produtos cosméticos.

Segundo o Guia de Estabilidade para produtos cosméticos da ANVISA (BRASIL, 2004) os testes de estabilidade preliminar funcionam auxiliando na triagem de formulações. Devido às condições extremas de temperatura que são submetidas, (com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes) podem surgir inúmeros pontos que podem ser considerados como sinais de instabilidade. É um teste prático, rápido e que dá um grande suporte aos desenvolvedores de produtos.

### Estabilidade acelerada

Os testes de estabilidade acelerada têm como objetivo fornecer dados para prever a estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento. Utiliza condições menos extremas que o de estabilidade preliminar e pode ser usado para estimar o prazo de validade do produto, interação entre os componentes da formulação e dos componentes com a embalagem (BRASIL, 2004).

## ***OBJETIVOS***

---

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - Objetivo Geral

Obtenção tecnológica de formulações de uso tópico (FBBU e FBBI), avaliação do seu potencial farmacológico e das manteigas de *Platonia insignis* Mart. obtidas na UFPI (BBU) e industrialmente(BBI) em modelos *in vivo* e *in vitro*.

### 2.2 - Objetivos específicos

Caracterizar quimicamente as manteigas de *P.insignis* Mart. por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM).

Dosear a GFC utilizando espectrofotometria na região do ultravioleta-visível (UV/VIS);

Analisar a citotoxicidade *in vivo* e *in vitro* (MTT) das manteigas de bacuri (BBU e BBI);

Desenvolver formulação farmacêutica de uso tópico usando as manteigas (FBBU e FBBI);

Realizar estudos de estabilidade preliminares e acelerado das formulações FBBU e FBBI;

Avaliar o potencial toxicológico *in vitro* (MTT) das manteigas de *P. insignis* Mart.(BBU e BBI);

Avaliar o potencial toxicológico *in vivo* das manteigas de *P. insignis* Mart.(BBU e BBI);

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* das manteigas de *P. insignis* Mart.(BBU e BBI);

Avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* das formulações contendo manteiga de bacuri da UFPI- FBBU e manteiga de bacuri industrializada - FBBI;

Avaliar a atividade anti-inflamatória das manteigas de bacuri (BBU e BBI) no modelo de edema de pata induzida por carragenina em ratos via oral;

Avaliar a atividade anti-inflamatória das formulações (FBBU e FBBI) no modelo de edema de pata induzida por carragenina em ratos via tópica.

## ***MATERIAIS E MÉTODOS***

---

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Materiais

##### 3.1.1 – *Matérias primas e Reagentes*

Metanol PA- Synth  
Lecitina de soja - Embrafarma  
Palmitado de isopropila- Embrafarma  
Polaxamer - Embrafarma  
Ácido sórbico - Embrafarma  
Sorbato de potássio - Embrafarma  
Etanol PA - Vetec  
Hexano (HPLC/SPECTRO) - Tédia  
Água purificada por osmose reversa  
Éter etílico – Merck  
Sílica 60 – Merck  
Acetato de Dexamentasona – EMS  
Acetato de Etila – (HPLC/SPECTRO) – Tédia  
Carragenina - Sigma  
Sílica flash Merck  
Propilenoglicol- Pharma Nostra  
Indometacina - Deg  
Tween 80 – Sigma  
Suspenplus ® - Embrafarma

##### 3.1.2 – *Equipamentos*

Paquímetro – Venier caliper  
Aparato para teste de espalhabilidade  
Multipipetador - Multimete+ - HTL  
Espectrofotômetro UV- VIS- Varian cary  
Espectrofotômetro UV- VIS – modelo EEL- 800; Biotek  
Estufa - Odontobras

Estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, 85% de umidade relativa e 37 ° ± 1 °C - WWR  
Estufa de Cultura – Bod Q- 315M - Quimis  
Fluxo laminar - Deltaseries  
Microscópio -Olympus  
Osmose reversa - Gehaka  
pH metro digital - Gehaka  
Ultrassom – modelo Cleanner; Marconi  
Refrigerador Zyrium Frostfree- Brastemp  
Viscosímetro rotacional Brookfiel- Rheology Internacional  
Chapa de aquecimento - Thelga  
Centrifuga - sigma Laboratory  
Balança analítica Kern 410- Digimed  
Homogenizador turax T25- digital Ultra turrax  
Centrifuga Excelsas Baby II, Fanem 206  
Cromatógrafo a gás acoplado a espectrofotômetro de massas – Agilent Technologies.  
Modelo 7890<sup>a</sup> com detector de massas modelo 5975<sup>a</sup> pertencente ao laboratório de  
Geoquímica Orgânica – IQ- UNICAMP  
Software NIST, biblioteca de espectros de massas

### 3.2 – Método

#### 3.2.1 Identificação botânica e obtenção das manteigas de *P. insignis* Mart.

As sementes foram obtidas de espécimes localizados em Barras, Piauí- Brasil (latitude -04 ° 14' 40'' e longitude -42 ° 40' 70'') em março de 2009, e a exsicata foi depositada no Herbário Graziella Barroso da Universidade Federal do Piauí (UFPI) sob n.º ICN TEPB 27164. As sementes extraídas dos frutos foram secas a temperatura de 55°C e moídas. Oitocentos e quarenta e oito gramas (848 g) do pó seco foram extraídos com hexano em Soxhlet por 8 h. O extrato foi concentrado a vácuo em rotaevaporador com rendimento total de 63%.

O extrato hexânico foi armazenada a 8 °C e houve a formação de duas fases, uma mais densa e esbranquiçada, constituída basicamente de tripalmitina e trioleína, e outra superior mais escura. Retirou-se a fase mais densa 64,10 g e utilizou-se a outra menos densa. A banha-

manteiga de bacuri cujo processo de extração foi realizado na Universidade Federal do Piauí-UFPI foi denominada BBU.

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

Foram realizados dois estudos comparativos entre as amostras- BBU e BBI. O primeiro foi estudo de cromatografia gasosa de alta resolução CGAR-EM e o segundo a avaliação do teor de garcinialiptona (GFC), um floroglucinol, portanto uma substancia de natureza polar, isolada das sementes de bacuri por Costa Júnior *et al*, 2011b.

### 3.2.2 Caracterização química das manteigas de *P. insignis* Mart.

#### **Análise por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM)**

##### *Análise das banhas-manteigas de bacuri (P.insignis)*

##### *Clean up das manteigas de bacuri (P. insignis)*

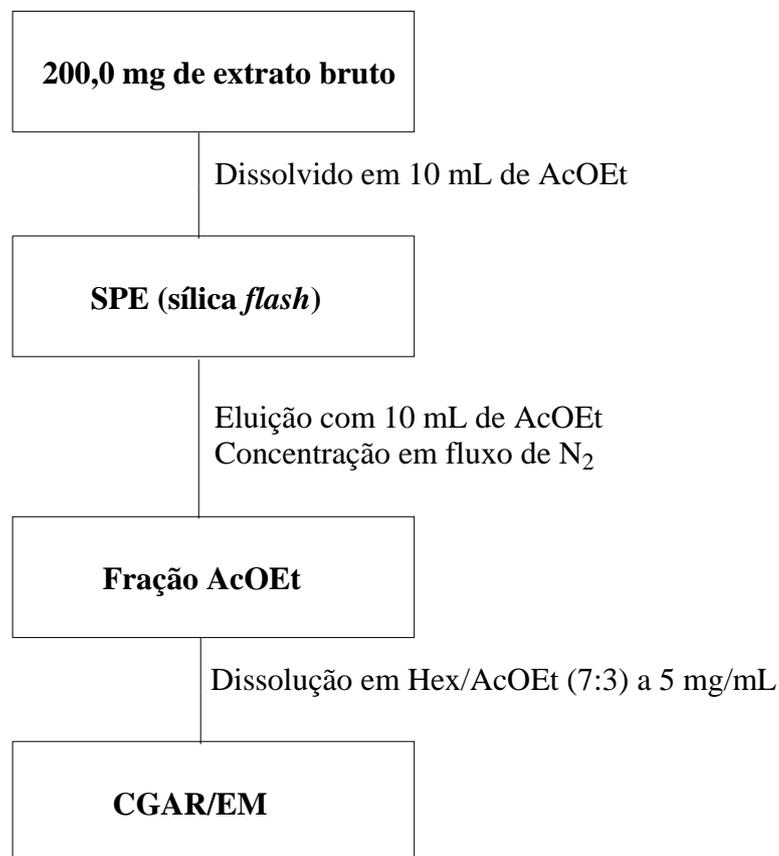
As amostras (200,0 mg) foram dissolvidas em 10 mL de AcOEt (HPLC/Spectro Tedia®) e aplicadas em uma coluna de extração em fase sólida (SPE). A coluna foi empacotada com 400,0 mg de gel de sílica 60 (0,063-0,200 mm) (Merck), a eluição foi realizada com 10 mL de AcOEt. A fração acetato de etila obtida por SPE foi avaliada por CCDC (Hex/AcOEt (7:3) e revelador solução de anisaldeído/AcOH e analisada por CGAR-EM (Figura 09).

##### *Análise da fração acetato de etila por CGAR-EM*

A fração acetato de etila foi dissolvida em um mistura de solventes grau HPLC/Spectro da Tedia® Hex/AcOEt (7:3) na concentração de 5,0 mg/mL, transferiu-se 500 µL para um vial, em seguida, adicionou-se 500 µL da solução etérea de diazometano, previamente preparado. Após a metilação, o solvente foi evaporado em fluxo de N<sub>2</sub> e adicionou-se 500 µL de Hex/AcOEt (7:3). Uma alíquota de 1 µL das soluções metiladas foram injetadas em um cromatógrafo (CGAR/EM) Agilent com coluna capilar DB5

(J&W) (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ) no modo *split* (10:1). Temperatura do injetor: 310 °C e temperatura do detector: 310 °C. Programação da coluna: temperatura inicial de 150 °C por 12 min, taxa de 4 °C  $\text{min}^{-1}$  até 290 °C permanecendo por 45 min. Tempo total de análise: 92 min. O gás de arraste foi hélio (1.5 mL/min). A aquisição dos espectros de massas no modo *Scan*, corte do solvente em 8 min, faixa de massas de 40 a 750 Daltons, utilizando o método de ionização por elétrons (IE), com energia de ionização de 70 eV, analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 300 °C. Os constituintes químicos identificados pela fragmentação característica e por comparação dos espectros de massas obtidos com os registros da biblioteca computacional NIST 2.0.

Figura 09: *Clean up* e análise das banhas- manteigas do Bacuri (*P. inisgnis*)



### Doseamento de GFC nas amostras BBU e BBI

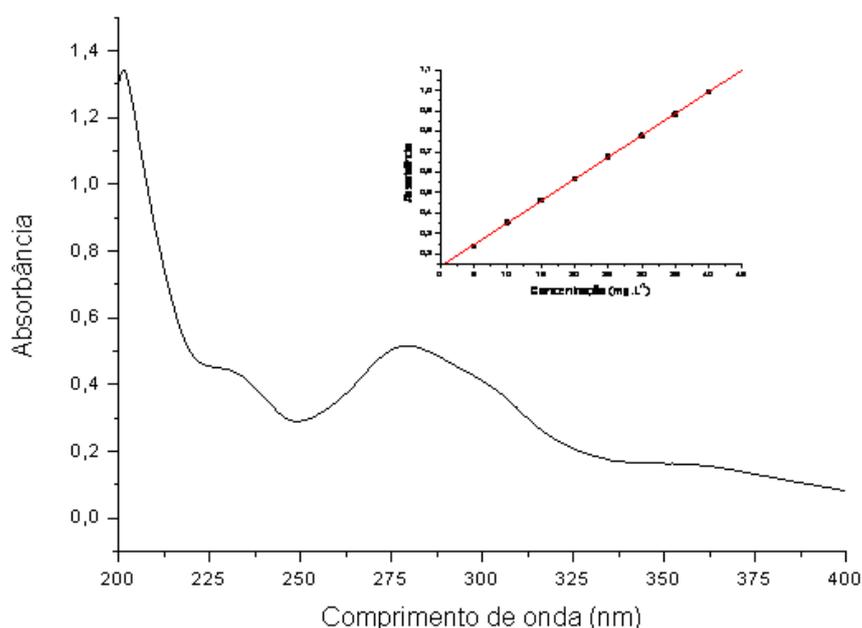
Para a determinação do teor de GFC nas amostras, seguiu-se metodologia similar a reportada na Farmacopéia Brasileira, 4<sup>a</sup> edição (1996), para a determinação do teor do paracetamol, matéria prima utilizada na produção de comprimidos, cápsulas, soluções orais.

As análises foram realizadas em espectrofotômetro Varian Cary 300 de duplo feixe UV/Vis. Inicialmente foi realizado o espectro de varredura da Garcinielliptona (GFC), substância referência, dissolvida em metanol, na faixa de: 200 a 400nm, em células de quartzo com percurso ótico de 1 cm, volume equivalente a 4 mL a temperatura ambiente, para a determinação do ( $\lambda_{\text{máx}}$ ).

Foi utilizado como referência a substância GFC isolada e purificada, através de cromatografia em coluna de gel de sílica do extrato hexânico das sementes de *P. insignis* Mart e identificada por ressonância magnética nuclear de Hidrogenio e Carbono e espectrometria de massas (COSTA JUNIOR, 2011b).

Utilizou-se uma solução estoque da substância de referência garcinaliptona na concentração de  $0,2 \text{ g L}^{-1}$  em metanol a partir da qual preparou-se uma série de diluições para obtenção das concentrações de 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10 e 5  $\text{mg L}^{-1}$ , para as quais fez-se as leituras das medidas de absorbância no comprimento de onda ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) 280 nm, de acordo com o espectro de absorção da GFC (Figura 10). Utilizou-se metanol como branco. O gráfico gerado quando foram plotadas as medidas de absorbâncias versus concentrações, por regressão linear apresentou a equação  $A = 0,0214C + 0,1385$ , onde A é a absorbância em 280 nm e C a concentração, o coeficiente de correlação linear  $R = 0,9999$ . Abaixo o espectro de absorção do padrão de GFC.

Figura 10 – Curva analítica padrão e espectro de absorção com a substância de referência Garcinielliptona (GFC).



O teor de GFC, nas manteigas, foi determinado por interpolação direta da absorvância das amostras na curva padrão utilizando-se como referência a substância GFC.

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

#### **Preparação das formulações semi-sólidas**

Foram obtidas 03 (três) formulações veiculadas em Pluronic® Lecithin Organogel (P.L.O.); uma contendo manteiga de bacuri da UFPI a 5% (FBBU), outra contendo manteiga de bacuri industrializada 5% (FBBI) e o placebo. As formulações do organogel foram preparadas 48 horas antes dos ensaios, para que ocorresse a estabilização termodinâmica das micelas a temperatura ambiente (MORAES, 2004). A manipulação foi a frio, com dispersão do polímero (polaxamer 407) e conservante em água destilada (2 a 8%) correspondente a fase aquosa do organogel. Esta solução foi mantida sob refrigeração por 24 horas para aumentar a taxa de solubilização (BENTLEY *et al*, 1999; ). A fase oleosa ou solução de lecitina foi obtida pela mistura de (1:1) de lecitina granulada e palmitato de isopropila, sendo mantida por 24 horas em repouso para facilitar a solubilização da lecitina. O gel de polaxamer 407® foi preparado a 20% e acrescentado a formulação em quantidade suficiente para 100% da formulação.

As manteigas de bacuri a 5% foram previamente fundidas em banho maria e sob agitação constante, misturadas a solução de lecitina a 22%. Para a formação do organogel foi acrescentado o gel aquoso de polaxamer em quantidade suficiente para 100% da formulação. A formulação foi mantida sob agitação constante por 30 minutos em agitador mecânico tipo ultra turrax a 8000 rpm.

#### **Análise Macroscópica das Formulações**

As características organolépticas (aspecto, cor) foram avaliadas visualmente durante todo o processo de análise das amostras. Após 24h que as formulações foram preparadas, analisaram-se as características organolépticas, a fim de identificar possíveis processos de instabilidade das formulações como coalescência, floculação e cremação (AULTON, 2005; BRASIL, 2004).

Os ensaios de estabilidade foram iniciados 24 h após a preparação das formulações tempo necessário para a estabilização das micelas das formulações.

### Resistência a centrifugação

As formulações foram centrifugadas durante 30 minutos a 3000 rpm em centrífuga Excelsas Baby II, Fanem 206 e no final foi observado a ocorrência ou não de separação de fases. O produto deve permanecer estável e qualquer sinal de instabilidade indica a necessidade de reformulação (BRASIL, 2004).

Tabela 01: Composição centesimal das formulações de organogel de manteiga de bacuri UFPI e Industrializada.

Componentes	Fórmulas		
	FBBI*	FBBU**	PLAC***
Lecitina granulada	11,11%	11,11%	11,11%
Palmitato de isopropila	11,11%	11,11%	11,11%
Ácido Sórbico	1,01%	1,01%	1,01%
Polaxamer 407	14,60%	14,60%	14,60%
Manteiga de Bacuri	-	5,00%	-
UFPI (BBU)			
Manteiga de Bacuri Industrializada (BBI)	5,00%	-	-
Sorbato de Potássio	Qs%	Qs%	Qs%
Água destilada	Qsp 100%	Qsp100%	Qsp 100%

\* FBBI- creme P.L.O. contendo manteiga de bacuri industrializada;

\*\*FBBU - creme P.L.O. contendo manteiga de bacuri UFPI;

\*\*\* PLAC- creme P.L.O polaxamer usado como placebo.

### Estabilidade preliminar das formulações

As formulações desenvolvidas foram submetidas a testes prévios de estabilidade que consiste em submeter à amostra a condições extremas de temperatura, onde foram

selecionados ciclos de 24 h a  $45 \pm 2^\circ\text{C}$ , e 24 h a  $-5 \pm 2^\circ\text{C}$ , possibilitando desta forma que fossem aceleradas as possíveis reações de degradação. Os parâmetros analisados foram: características organolépticas, determinação da espalhabilidade, resistência à centrifugação, valores de pH e microscopia óptica. Os testes foram realizados após a manipulação e após o ciclo gelo-degelo. Para todos os momentos todos os parâmetros foram realizados em triplicata.

### **Estabilidade acelerada das formulações**

As formulações foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada ou normal que tem como objetivo fornecer dados para prever estabilidade do produto, tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (ANVISA, 2004). Aplicadas condições menos extremas que os da estabilidade acelerada foi realizada pelo período de 90 dias sendo divididos em  $T_0$ ,  $T_{15}$ ,  $T_{30}$ ,  $T_{60}$  e  $T_{90}$ . As amostras foram submetidas ao aquecimento em estufa (temperatura –  $45^\circ\text{C} \pm 5^\circ\text{C}$ ), expostas à radiação luminosa e a temperatura ambiente.

Os parâmetros analisados foram os mesmos da estabilidade preliminar: características organolépticas, determinação da espalhabilidade, resistência à centrifugação, valores de pH e microscopia óptica.

Todas as análises foram realizadas em triplicata. As amostras foram acondicionadas em frascos plásticos opacos, com paredes lisas e com tampa para as amostras submetidas as variações de temperatura em estufa ( $37 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Para as amostras expostas a radiação luminosa e ao ambiente usou-se embalagem de vidro transparente com paredes lisas e com tampa.

### *Características organolépticas*

As formulações foram observadas quanto a cor, odor e aspecto (FERREIRA, 2000).

Além desses critérios verificou-se outros que poderiam estar diferentes das formulações iniciais analisadas. Essas características foram observadas após a preparação das formulações, após o stress térmico e durante toda a estabilidade acelerada (BRASIL, 2004).

### *Determinação do pH*

Utilizou-se para determinação do pH pHgâmetro digital previamente calibrado com soluções tampão de acetato pH 4,0 e tampão fosfato pH 7,0.

Preparou-se uma solução aquosa a 10% (p/v) e mediu-se o pH em triplicata para cada amostra correspondendo o resultado a média das três determinações.

### *Espalhabilidade*

A determinação da espalhabilidade foi realizada de acordo com metodologia previamente descrita na literatura por Knorst (1991). No equipamento utilizado, uma placa molde circular, de vidro (diâmetro = 20 cm; espessura = 0,2 cm), com orifício central de 1,2 cm de diâmetro, foi colocada sobre uma placa-suporte de vidro (20 cm x 20 cm) posicionada sobre uma escala milimetrada (Figura 10). A amostra foi introduzida no orifício da placa molde e a superfície foi nivelada com espátula. A placa molde foi cuidadosamente retirada e sobre a amostra foi colocada uma placa de vidro de peso conhecido. Após um minuto, foi realizada a leitura dos diâmetros atingidos pela amostra, em duas posições opostas, com auxílio da escala do papel milimetrado. Posteriormente, foi calculado o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido acrescentando-se sucessivamente outras placas, em intervalos de um minuto.

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

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

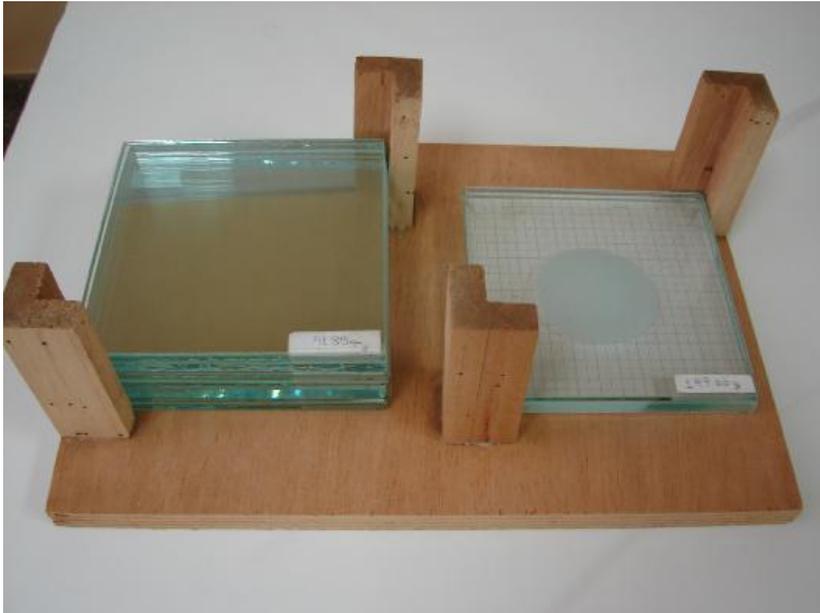
Onde:

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

$d$  = diâmetro médio (mm);

$\pi = 3,14$ .

Figura 11: Aparato para teste de espalhabilidade – Farmácia escola UFPI



### *Microscopia ótica*

A análise microscópica foi realizada medindo-se o diâmetro de 100 gotículas por lâmina em ocular micrométrica em triplicata. Para tanto, as amostras do organogel foram dispensadas em solução de propilenoglicol e água (1:1), na proporção de uma parte de amostra para 10 partes da solução. A lâmina foi preparada e observada em microscópio óptico Olympus CX 40 com objetivas de 10, 40 ou 100 vezes e uma ocular 10 aumento (CARVALHO, 2007).

### *Viscosidade aparente*

As viscosidades aparentes e relativas foram determinadas com o auxílio de Viscosímetro Rotacional do tipo Brookfiel da marca Rheology Internacional, usando o “spindles 7”, em quatro velocidades (6, 12, 30 e 60 rpm) o que permite medir eletronicamente a força de torção já convertida em viscosidade. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### *Análise estatística dos resultados*

Os resultados foram apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão da média para cada grupo de experimento. Os dados estatísticos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de múltipla comparação utilizando-se o método Tukey's, quando apropriado, considerando  $p < 0,05$ .

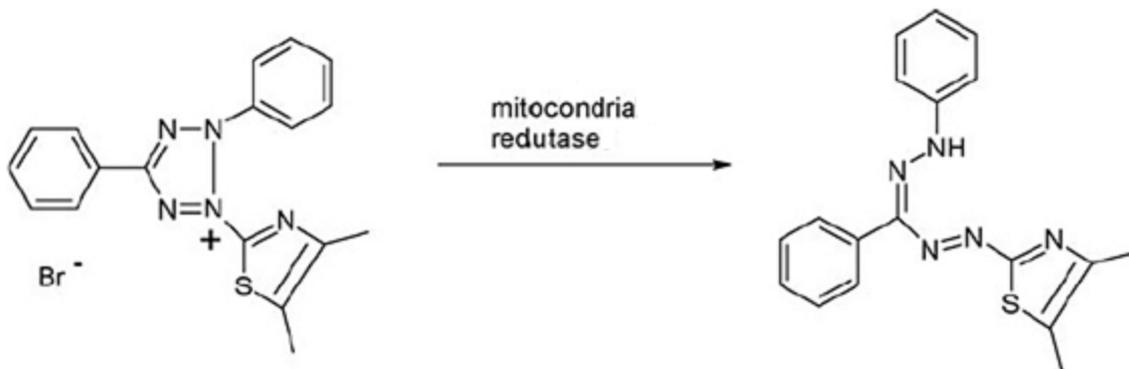
### **3.2.4 – Avaliação Farmacológica das manteigas de *P. insignis* (BBU e BBI) e formulações (FBBU e FBBI)**

#### **3.2.4.1 Determinação da toxicidade das manteigas de *P. insignis*.**

##### *Atividade citotóxica em MTT*

A citotoxicidade das manteigas de bacuri foi realizada utilizando o teste do MTT. Em placa de 96 poços foram adicionados 100  $\mu$ L de meio RPMI 1640 completo (contendo 10% de soro fetal bovino, 10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina) e cerca de  $1 \times 10^5$  macrófagos por poço. As células foram incubadas por 4 h para adesão. Após esse tempo, foram feitas duas lavagens com meio RPMI completo para retirada das células que não aderiram. Posteriormente, foi adicionado as manteigas de bacuri, em triplicata, previamente diluídos para um volume final de 100  $\mu$ L para cada poço nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12  $\mu$ g/mL. Em seguida foram incubadas por 48 h e, ao final da incubação, foi adicionado 10  $\mu$ L de MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio) diluído em PBS a uma concentração final de 5 mg/mL (10% do volume; ou seja, 10  $\mu$ L para cada 100  $\mu$ L de poço). Foram incubados por mais 4 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>, e em seguida o sobrenadante foi descartado e foi adicionado 100  $\mu$ L de DMSO em todos os poços. Em seguida, a placa foi colocada sob agitação por cerca de 30 min a temperatura ambiente para dissolução completa do formazan (Figura 12). Por último, foi realizada a leitura a 550 nm em leitora de placa (NOGUEIRA et. al., 2007).

Figura 12: Reação de redução do MTT para formazan.



#### *Avaliação da toxicidade aguda em ratos*

A avaliação toxicológica das manteigas de bacuri foi realizada através do Teste de Dose Fixa, preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2001). Os animais foram divididos em 03 grupos de 05 animais cada, sendo dois grupos-teste tratados com BBU e BBI, respectivamente, na dose de 2,0 g/kg por via oral (v.o.), e um grupo controle tratado com Suspend-Plus<sup>®</sup> 65%, um agente suspensor inerte utilizado na solubilização e preparo das suspensões à base de BBU ou BBI.

Logo após a administração, os animais foram avaliados do ponto de vista clínico e comportamental com maior atenção durante as primeiras 4 horas após a administração, conforme protocolo de reconhecimento e avaliação de sinais clínicos preconizados pela OECD (2000). Em seguida, as avaliações foram realizadas diariamente, assim como a obtenção do peso dos animais, durante 14 dias.

#### *Parâmetros bioquímicos*

No final do experimento, realizou-se coleta de amostras de sangue a partir de punção da veia cava sob anestesia com tiopental sódico (45 mg/kg, i.p.). Após 30 minutos, as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 min para obtenção do soro, que foi submetido à determinação de diversos parâmetros bioquímicos conforme Tabela 07.

### Peso relativo de órgãos internos

Após eutanásia dos animais seguida de necropsia, realizou-se avaliação macroscópica de órgãos internos (pulmões, coração, estômago, fígado, cérebro e rins) quanto à textura, consistência e cor. Em seguida, os órgãos foram pesados a fim de obter o seu peso relativo através da fórmula: peso do órgão (g) / peso do animal no dia da necropsia (g) x 100.

### Análise estatística

Os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas através da aplicação do Teste t de “Student” para amostras não-pareadas ou Análise de Variância (ANOVA) Two-way seguida dos pós-testes de Tukey ou Dunnett, para análise de significância entre os grupos. Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando o  $p < 0,05$ . Para todas as análises estatísticas e plotagem das curvas utilizou-se o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

## **3.2.4.2 - Avaliação da Atividade leishmanicida**

### **Avaliação da Atividade leishmanicida *in vivo* usando FBBI e FBBU**

#### *Animais*

Foram utilizados camundongos fêmeas, da espécie *Mus musculus*, linhagem Balb/c, fêmeas, com idade de 1 a 2 meses e peso entre 20 e 25 gramas, provenientes do biotério setorial do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais “Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”- NPPM- UFPI, mantidos sob condições de controle de temperatura a  $25 \pm 1$  °C e ciclo claro-escuro de 12 horas com água e ração *ad libitum*.

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

### *Manutenção das cepas de Leishmania amazonensis*

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

### *Obtenção das massas de Leishmania para infecção*

Para obtenção das massas de parasitas dos estoques, distribuiu-se 50 mL de meio de Schneider's (Sigma, Chemical Co, St Louis, USA) em frascos de cultivo celular com capacidade nominal para 50 mL de cultura e incubados em estufa a  $26 \pm 1$  °C por 7 dias. Após constatada a viabilidade e ausência de contaminantes foram separadas as promastigotas por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi ressuscitado em solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%) e centrifugado nas mesmas condições. O processo foi repetido por três vezes. A massa foi ressuscitada em 1 mL de solução salina fisiológica estéril (NaCl 0,9%), contadas em câmara de Neubauer e ajustada a concentração desejada.

### *Infecção*

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

### *Tratamento*

Os animais foram divididos em três grupos ( $n = 6$ ) de acordo com o tipo de tratamento a serem submetidos. O tratamento começou no momento do surgimento do nódulo, antes da formação das lesões ulcerativas.

Os nódulos/ lesões ulcerativas foram tratadas duas vezes ao dia, durante quarenta e sete dias, com 50  $\mu$ L da formulação tópica em cada aplicação indicada para cada grupo, utilizando-se um multipipetador automático. O volume aplicado foi suficiente para cobrir toda a área da lesão ulcerativa do início do tratamento.

#### Protocolo básico do tratamento tópico

- a) Formulações: Creme de P.L.O. com 5% da manteiga de bacuri da UFPI (FBBU), Creme de P.L.O. com 5% da manteiga de bacuri Industrializada (FBBI) e controle.
- b) Número de aplicações diárias: 2 aplicações
- c) Período de tratamento: 7 semanas
- d) Grupo: Foi aplicada em fêmeas as formulações acima descritas.

#### Avaliação da eficácia do tratamento

##### Aspecto clínico

Os animais foram acompanhados antes, durante e após o tratamento através da observação diária das lesões, ou seja: presença de nódulo, de úlcera, infecção secundária, surgimento de metástases e cicatrização.

##### Acompanhamento da lesão ulcerativa

A avaliação quantitativa da ação das formulações utilizadas neste experimento foi pela mensuração semanal do diâmetro da lesão ulcerativa/nódulo com um paquímetro. Como parâmetro, foi tomado o diâmetro, entre as bordas, do eixo perpendicular a linha dorsal do animal.

#### *Análise Estatística dos Resultados*

A análise estatística dos resultados obtidos, em triplicata, foi realizada utilizando-se programa gráfico Prisma 5.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para concentração múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância

One way seguido pelo teste de Benferroni. A análise de significância foi considerada quando o  $p < 0,05$ .

### **Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* usando BBI e BBU**

#### **Determinação dos parâmetros para ativação de macrófagos**

##### *Elicitação e cultivo de macrófagos peritoneais de camundongo*

Foram utilizados macrófagos peritoneais residentes obtidos de camundongos Balb/c. Depois de anestesiados com injeção intramuscular de cloridrato de xilazina 2 mg/kg de peso vivo e cloridrato de ketamina 15 mg/kg de peso vivo os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, imersos em álcool a 70% por um minuto para anti-sepsia e fixados em suporte na posição de decúbito dorsal (Figura.13).

Figura 13 - Animal em posição de decúbito dorsal e com peritônio exposto para coleta de macrófagos.



Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

Em fluxo laminar, o peritônio foi exposto por dissecação da pele ventral (Figura 12) e administrado-se na cavidade abdominal, cerca de 8 mL de salina tamponada com fosfato (PBS-*Phosphate Buffer Saline*), pH 7,4, estéril, a 4 °C. Após leve massagem no abdômen do animal, a solução contendo macrófagos do peritônio foi aspirada e reservada em tubo estéril, sobre banho de gelo.

Esse material foi submetido à centrifugação a 2.300 rpm, por 10 minutos, a 4 °C por duas vezes, intercaladas pela lavagem das células com salina 0,9% estéril. Ao final o sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 2 mL de meio RPMI 1640

contendo 10% de SFB, penicilina- estreptomicina 10.000 UI/mg e realizada contagem dos macrófagos em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Trypan para análise da viabilidade celular.

#### *Preparo das soluções*

A solução estoque de corante vermelho neutro foi preparada pela solubilização de 0,02 g de corante em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). A solução de extração utilizada nos dois protocolos consistiu de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O zimosan corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque e 0,02 g de zimosan não opsonizado em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% v/v, cloreto de sódio 2% p/v e acetato de cálcio 1% p/v em água destilada (BONATTO, 2008).

#### *Ensaio de determinação do volume lisossomal*

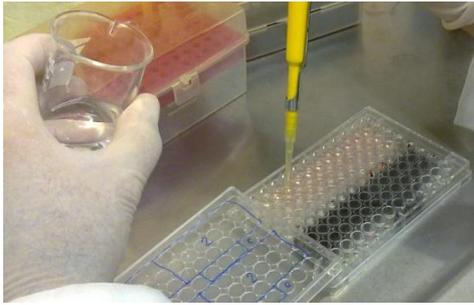
Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com as manteigas BBI e BBU de *P. insignis*. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% em DMSO e voltou-se a incubar durante 30 minutos. Após este tempo, o sobrenadante foi descartado, procedeu-se a lavagem dos poços com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais (Figura 13). Após trinta minutos em agitador de Kline a placa foi lida a 550 nm em leitora Biotek modelo ELx800 (BONATTO, 2008).

#### *Ensaio de determinação da capacidade fagocítica*

Macrófagos peritoneais foram plaqueados e incubados com as manteigas de BBI e BBU. Após 24 horas de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO<sub>2</sub>, acrescentou-se 10 µL de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 minutos a 37 °C. Após o procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker, para paralisar o processo de fagocitose (Figura 14) e, 30 minutos posteriormente, a placa foi lavada com salina 0,9% a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador Kline as

absorvâncias foram medidas a 550 nm em leitora Biotek modelo ELx800. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo controle considerado como 100% (BONATTO,2008).

Figura 14- Ensaio de determinação do volume lisossomal e ensaio de determinação da capacidade fagocítica.

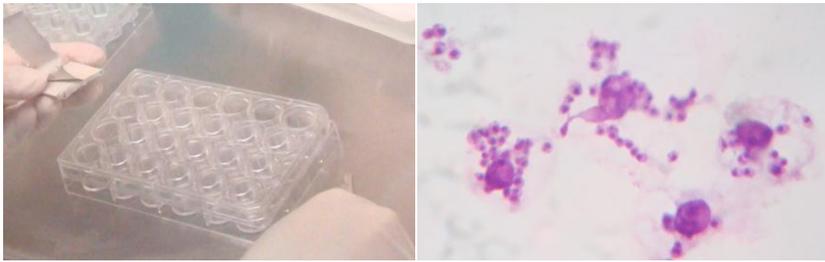


Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

#### **Avaliação da atividade leishmanicida sobre formas amastigotas**

Macrófagos foram coletados em placas de cultura com 24 poços (Figura 15) na concentração de  $2 \times 10^5$  células/500  $\mu$ L do meio, contendo lamínulas estéreis redondas de 13 mm. Elas foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 2 horas para a adesão celular. Após este tempo, o meio foi substituído por 500  $\mu$ L de RPMI-1640 suplementado com SFB, penicilina e estreptomicina e incubados por 15 horas. Após este período, o meio RPMI-1640 suplementado foi aspirado e novo meio adicionado contendo formas promastigotas na proporção de 8 promastigotas para 1 macrófago em cada poço. Após 4 horas de incubação a 5% de CO<sub>2</sub>, 37 °C, o meio foi aspirado para remover as promastigotas livres e 1 mL de RPMI-1640 foi adicionado contendo BBU e BBI, diluídas em DMSO, nas seguintes concentrações: 50, 24, 12,5, 6,25, 3,12  $\mu$ g/mL nos grupos experimentais, Schneider com 0,2 % de DMSO no grupo controle e anfotericina B em concentrações adequadas. Este foi incubado por 72 horas, no final do qual, as lamínulas foram removidas, fixadas em metanol e corados com Giemsa. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata para cada concentração. Para cada lamínula, 100 células foram avaliadas, e o número de macrófagos infectados e o número de parasitas por macrófagos contados (Figura 15). Os resultados, apresentados como índice de associação (IA) foram obtidos multiplicando a porcentagem de macrófagos infectados pela média do número de amastigostas por macrófagos (ROSA *et al.*, 2003).

Figura 15: Placa de 24 poços e cultivo de macrófagos *in vitro* Visualização dos macrófagos infectados em microscopia óptica. LUSTOSA, A.K.M.F, 2011.



Fonte: Arquivo pessoal, LUSTOSA, A.K.M.F.

### **Análise Estatística dos Resultados**

A análise estatística dos resultados obtidos, em triplicata, foi realizada utilizando-se programa gráfico Prisma 5.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para concentração múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância One way seguido pelo teste de Benferroni. A análise de significância foi considerada quando o  $p < 0,05$ .

#### **3.2.4.3. Avaliação da atividade anti-inflamatória**

##### *Animais*

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas (*Ratus norvegicus*), pesando entre 180-220 g provenientes do Biotério do Núcleo de Pesquisas de Plantas Mediciniais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram mantidos em gaiolas a uma temperatura controlada ( $24 \pm 1$  °C), com ciclo claro/escuro de 12 h, tendo livre acesso à água e ração (Purina, Brasil). Foram aclimatizados ao ambiente de teste por 2 h antes de cada experimentação. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com sobredose de tiopental sódico (100 mg/kg, i.p.). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UFPI) sob número 076/2010.

*Avaliação da atividade anti-inflamatória das manteigas de BBU e BBI por via oral em modelo de edema de pata induzido por carregenina*

### Drogas

Para todos os experimentos, os seguintes agentes foram utilizados: BBU – manteiga de bacuri da UFPI; BBI- manteiga da semente de bacuri industrializada (Amazon Oil, Brasil), carragenina (Sigma, EUA), indometacina, Tween80<sup>®</sup> (Sigma, EUA) e Suspen-Plus<sup>®</sup> (Embrafarma, Brasil). As manteigas de bacuri foram dissolvidas em Suspen-Plus<sup>®</sup> 65,0% em água destilada. Indometacina foi dissolvida em bicarbonato de sódio 5,0% em solução salina 0,9%. A carragenina foi dissolvida em Tween 80 1,0% em água destilada.

### Edema de pata induzido por carragenina

O potencial anti-inflamatório das manteigas de bacuri foi avaliado através do modelo experimental do edema de pata induzido por carragenina em ratos (1,0%; 0,1 ml/pata, i.pl.), de acordo com WINTER et al (1960). Os animais foram divididos em 4 grupos de 7 animais cada e pré-tratados com veículo, indometacina (5 mg/kg), BBU e BBI (50, 100, 200 ou 400 mg/kg), respectivamente. O edema foi medido a cada 1 hora, durante seis horas. A diferença do volume da pata no tempo final (Vf) e tempo zero (Vi) foi determinada para cada animal com o uso de paquímetro digital .

*Avaliação da atividade anti-inflamatória das formulações FBBU e FBBI por via tópica em modelo de edema de pata induzido por carragenina*

### Drogas

Para todos os experimentos, os seguintes agentes foram utilizados: FBBU – formulação contendo manteiga de bacuri da UFPI; FBBI- formulação contendo manteiga de bacuri industrializada, carragenina (Sigma, EUA), acetato de dexametasona 0,1% creme (EMS, Brasil).

### Edema de pata induzido por carragenina

O potencial anti-inflamatório das formulações FBBU e FBBI foi avaliado através do modelo experimental do edema de pata induzido por carragenina em ratos (1,0%; 0,1 ml/pata, i.pl.), de acordo com WINTER et al (1960) e modificado por CALVO et al (2006).

Os animais foram divididos em 4 grupos de 7 animais cada, e o pré-tratamento foi realizado com a aplicação tópica de 0,3 g de creme base, acetato de dexametasona 0,1% creme, FBBU ou FBBI 5,0% creme na superfície plantar da pata traseira direita do animal, seguida de leve fricção com o dedo indicador por cerca de 50 vezes. Este procedimento foi realizado 1 h antes da indução da resposta edematogênica. O edema foi medido a cada 1 hora, durante seis horas. A diferença do volume da pata no tempo final (Vf) e tempo zero (Vi) foi determinada para cada animal com o uso de paquímetro digital.

#### *Análise Estatística dos Resultados*

A análise estatística dos resultados obtidos, em triplicata, foi realizada utilizando-se programa gráfico Prisma 5.0 e os valores foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Para concentração múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância One way seguido pelo teste de Benferroni. A análise de significância foi considerada quando o  $p < 0,05$ .

## ***RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

## 4.1 – Caracterização química das manteigas de *P. insignis*

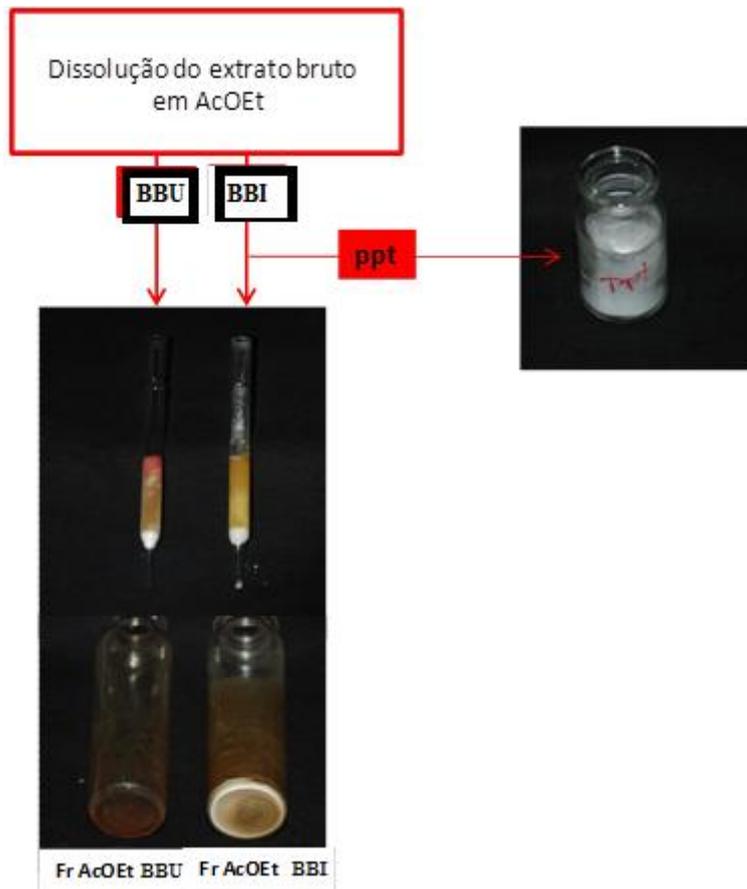
### 4.1.1 – Análise por Cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM)

A técnica de CGAR/EM têm sido bastante utilizada para identificar e monitorar a presença de constituintes químicos de extratos brutos (BRANCO, PIZZOLATTI, 2002; PATITUCCI et al., 1995; ALVES et al., 2002). Nesse caso, os extratos brutos precisam ser separados de resinas, pigmentos e compostos polares, não volatilizáveis por meio de extração em fase sólida (SPE) ou fracionamento prévio para *clean up* de extratos brutos, seguido da adição de reagente de metilação como diazometano ( $\text{CH}_2\text{N}_2$ ) para esterificação de ácidos livres.

O procedimento de *clean up* das amostras foi realizado como no procedimento descrito na parte experimental, página 52, nas duas amostras de banha- manteigas de bacuri: banha-manteiga de bacuri industrial (BBI) e banha- manteiga UFPI (BBU). O resultado da pré-separação das amostras de manteiga de bacuri está apresentado na Figura 16. Particularmente, a amostra de manteiga de bacuri industrial (BBI) na dissolução do extrato bruto com AcOEt, anteriormente a aplicação na SPE de sílica, formou um precipitado branco amorfo (25,0 mg) correspondendo a 12,5% do extrato bruto, identificado na literatura como tripalmitina, esse constituinte foi encontrado na semente do fruto do bacuri (BENTES et al., 1986/1987). A tripalmitina e a trioleína foram também obtidas do extrato hexânico (BBU), e foram separadas quando este extrato foi refrigerado, por isso não formou mais precipitado com a adição de acetato de etila.

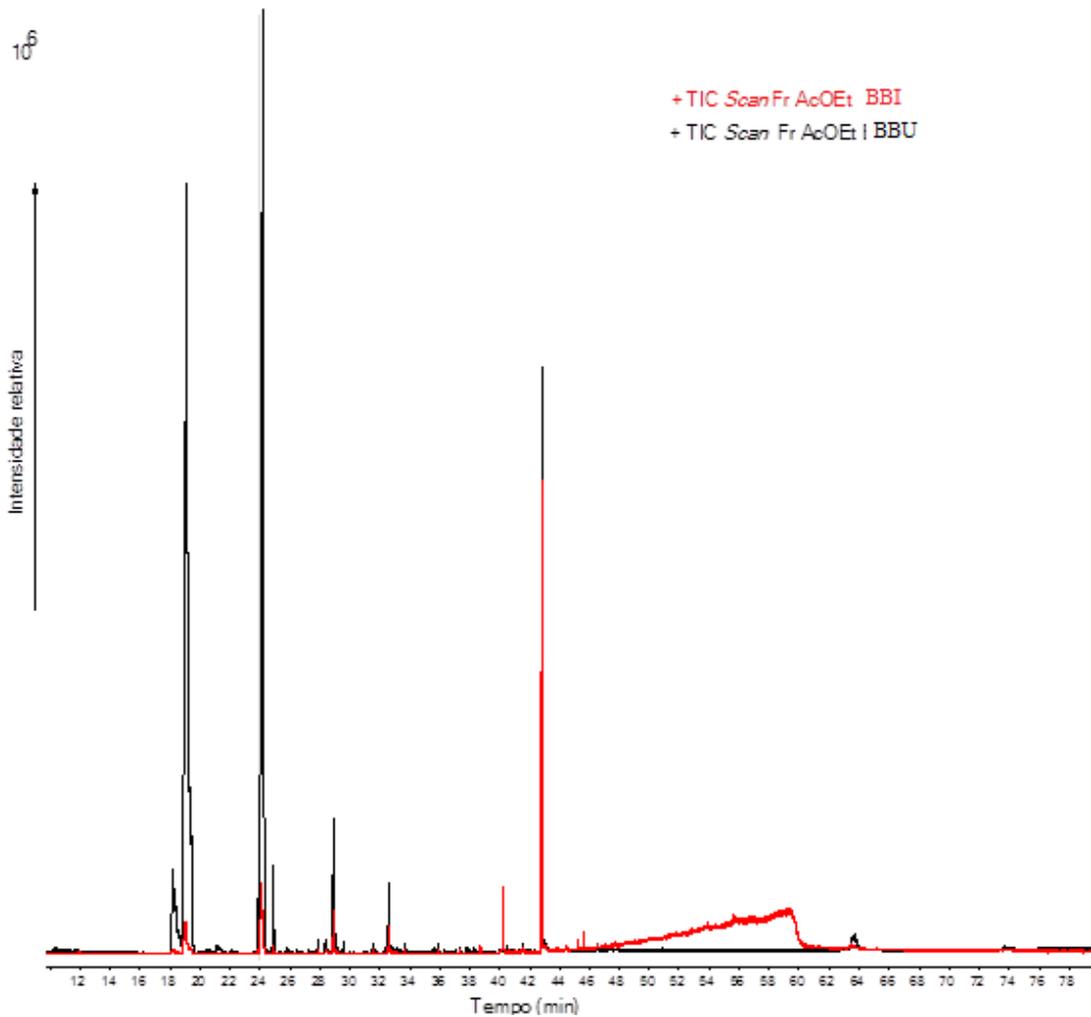
As frações acetato de etila das manteigas de bacuri resultantes do *clean up* foram obtidas com os seguintes rendimentos: Fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga de bacuri industrial (Fr AcOEt BBI) e Fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga UFPI (Fr AcOEt BBI), 190,0 mg (165,0 mg + 25,0 mg (Fração *clean up* + ppt) e 149,0 mg, respectivamente. Como mostra a Figura 16, as frações acetatos de etila apresentaram características físico-químicas diferentes. A fração AcOEt BBI foi caracterizada como um óleo viscoso enquanto a fração AcOEt BBU uma mistura do óleo impregnado nas paredes do frasco coletor e uma quantidade significativa de um sólido branco amorfo.

Figura 16. Frações acetato de etila do extrato bruto de manteiga de bacuri UFPI (BBU) e extrato bruto de manteiga de bacuri industrializada (BBI)



As frações acetato de etila foram dissolvidas à concentração de 5 mg/mL. Os perfis cromatográficos dos extratos brutos das manteigas de bacuri (*P. insignis*) industrial e da UFPI foram obtidos por cromatografia gasosa de alta resolução acoplada a espectrometria de massas (CGAR/EM), na Figura 17, está apresentado os perfis no modo *overlaid* (sobreposição). No *overlaid mode* os cromatogramas de íons totais são sobrepostos e suas intensidades relativas são mantidas sem correção de escala, ou seja, é possível verificar a concentração relativa dos constituintes químicos na fração acetato de etila, em relação a teor (maior ou menor teor). Como observado na Figura 17, a Fr AcOEt BBU apresenta menor intensidade relativa em relação a Fr AcOEt BBI. A Fr AcOEt BBI (manteiga de bacuri industrial) é mais rica em constituintes químicos como observado na Figura 18b.

Figura 17. Cromatograma de íons totais (TIC *Scan*) das frações acetato de etila de bacuri. Fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga de bacuri industrial (Fr AcOEt BBI). Fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga laboratório (Fr AcOEt BBU).



O cromatograma de íons totais (TIC *Scan*) da amostra Fr AcOEt BBU apresentou uma complexa mistura não resolvida (UCM - unresolved complex mixture), entre 48-60 minutos aproximadamente, relativa a eluição de triacilgliceróis, a FR AcOEt BBI apresenta elevado conteúdo de triacilgliceróis. A identificação dos constituintes químicos foi realizada pela aquisição dos espectros de massas pela fragmentação característica e comparação com biblioteca computacional (NIST 2.0). Na Figura 18A e 18B estão apresentados os cromatogramas de íons totais das amostras estudadas com a identificação dos principais constituintes químicos.

Figura 18A. Cromatograma de íons totais da fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga de bacuri da UFPI (Fr AcOEt BBU). **1** – ácido palmitoléico C16:1 *cis* 9, **2** – ácido palmítico C16:0, **3** – ácido linolênico C18:3 *cis/cis/cis* 9,12,15, **4** – ácido linoléico C18:2 *cis/cis* 9,12, **5** – ácido oléico C18:1 *cis* 9 **6** – ácido esteárico C18:0, **7** – monopalmitato de glicerila, **8** – ácido terpênico – não identificado, **9** – ácido beénico C22:0, **10** – ácido terpênico – não identificado, **11** – monooleanato de glicerila, **12** – ácido erúico C22:1 *cis* 9, **13** – ácido lignocérico C24:0, **14** – derivado de isoprenóide, **15** – esqualeno, **16** epoxiesqualeno, **17** – ester etílico do ácido 8-(2,5-dimetoxifenil)-6-metil-2-(4-metilpent-3-enil)octa-2,6-dienóico, **18** –  $\gamma$ -tocoferol, **19** – tocoferol, **20** – campesterol, **21** – estigmasterol, **22** –  $\beta$ -sitosterol, **23** – lanosterol, **24** – margarato de colesterol, **25** – triacilgliceróis.

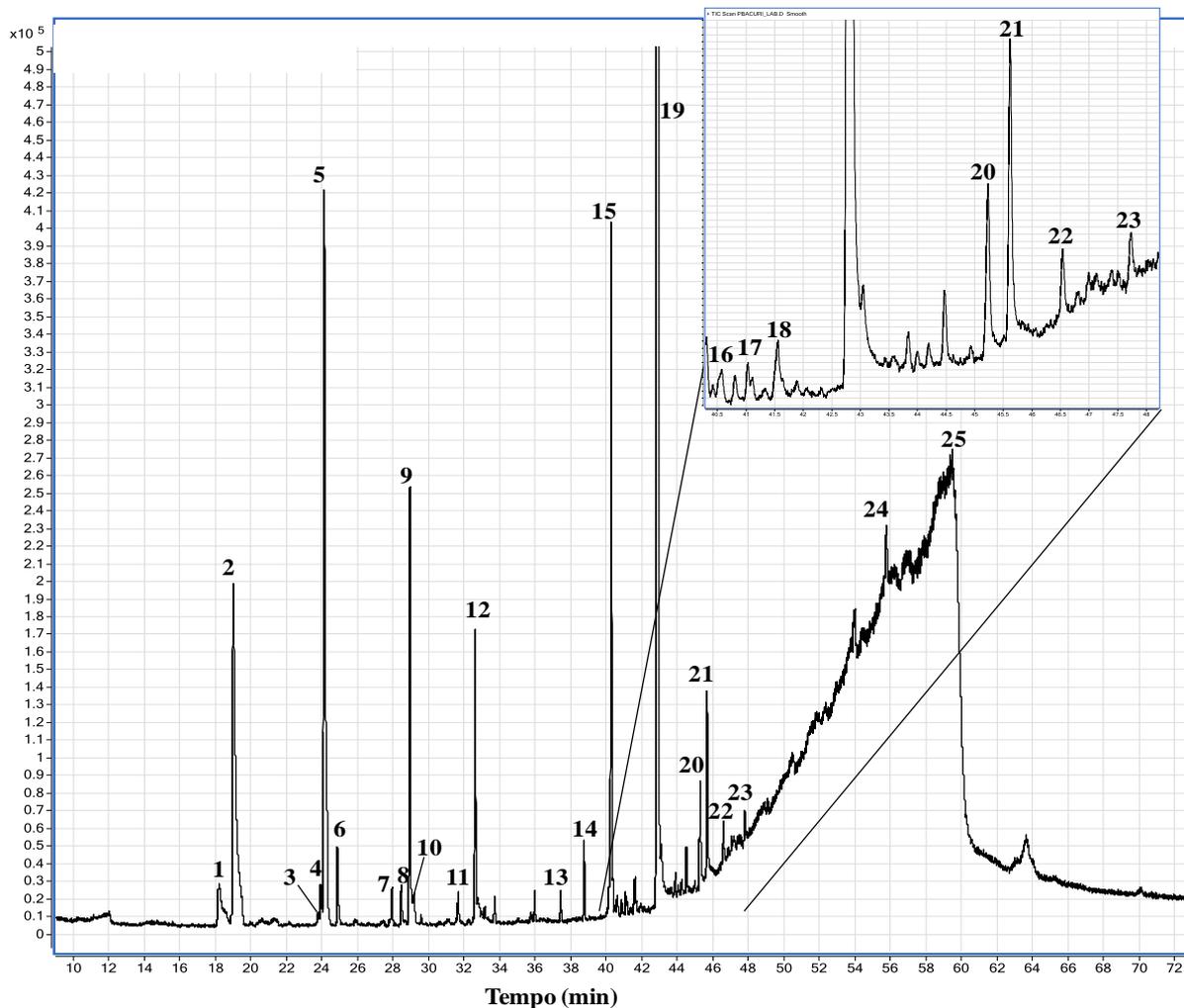
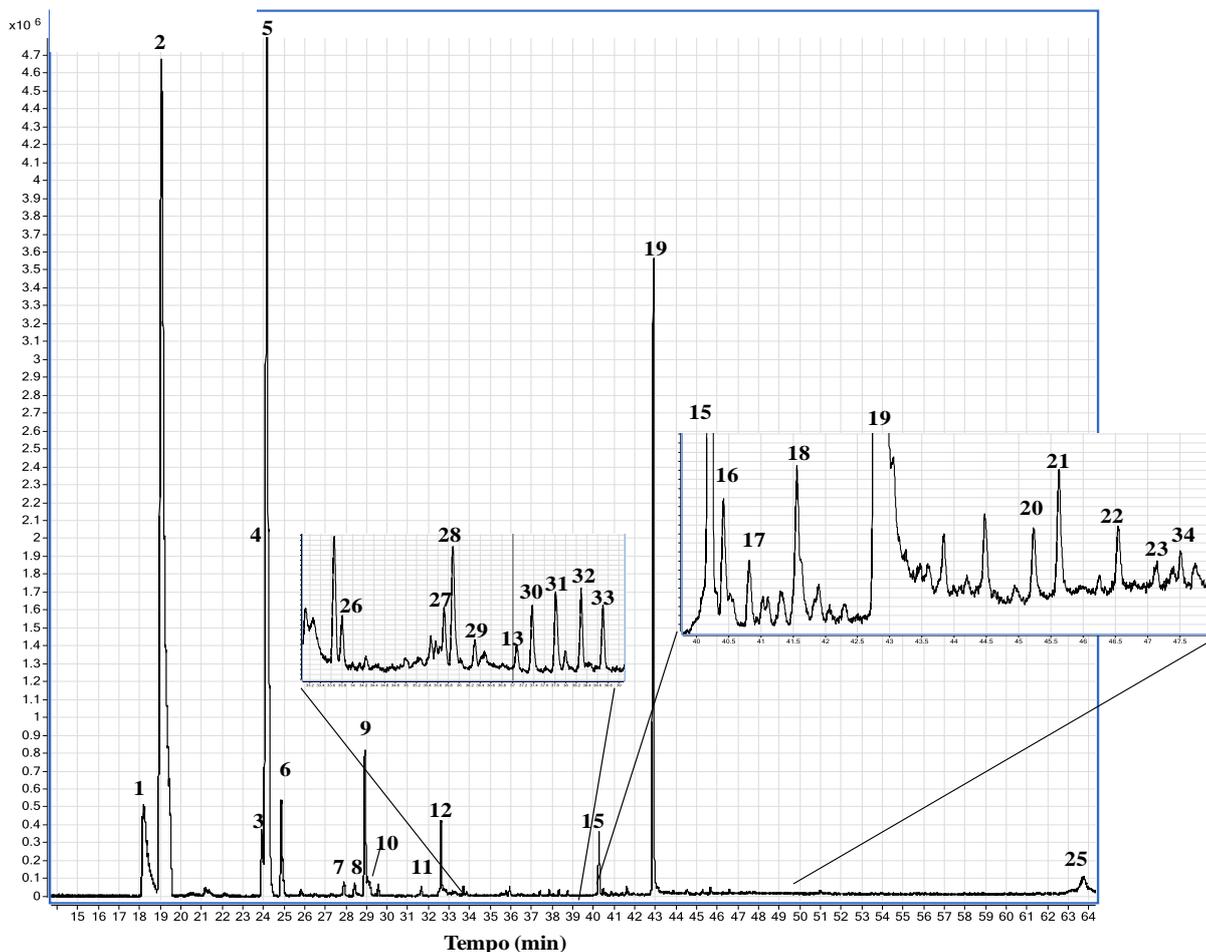


Figura 18B. Cromatograma de íons totais da fração acetato de etila do extrato bruto de manteiga de bacuri industrial (Fr AcOEt BBI). **1** – ácido palmitoléico C16:1 *cis* 9, **2** – ácido palmítico C16:0, **3** – ácido linolênico C18:3 *cis/cis/cis* 9,12,15, **4** – ácido linoléico C18:2 *cis/cis* 9,12, **5** – ácido oléico C18:1 *cis* 9 **6** – ácido esteárico C18:0, **7** – monopalmitato de glicerila, **8** – ácido terpênico – não identificado, **9** – ácido beénico C22:0, **10** – ácido terpênico – não identificado, **11** – monooleanato de glicerila, **12** – ácido erúico C22:1 *cis* 9, **13** – ácido lignocérico C24:0, **14** – derivado de isoprenóide, **15** – esqualeno, **16** epoxiesqualeno, **17** – ester etílico do ácido 8-(2,5-dimetoxifenil)-6-metil-2-(4-metilpent-3-enil)octa-2,6-dienóico, **18** –  $\gamma$ -tocoferol, **19** – tocoferol, **20** – campesterol, **21** – estigmasterol, **22** –  $\beta$ -sitosterol, **23** – lanosterol, **24** – margarato de colesterol **25** – triacilgliceróis, **26** – ácido *E*-labda-8(20),13-dien-15,19-dióico (ácido diterpênico), **27** – derivado de ionona, **28** – derivado ácido diterpênico – não identificado, **29** – derivado de ácido diterpênico – não identificado, **30** – derivado terpênico – não identificado, **31** – derivado terpênico – não identificado, **32** – derivado terpênico – não identificado, **33** – derivado terpênico – não identificado, **34** – estigmastenona.



Os constituintes químicos que não foram identificados foram na sua maioria, correlacionados a espectros de massas de isoprenóides, especialmente ácidos diterpênicos. No total foram assinalados 34 constituintes químicos nos cromatogramas de íons totais, sendo 23 constituintes químicos comuns a duas manteigas de bacuri.

As duas manteigas apresentam composição rica em ácidos graxos, destacando o ácido oléico C18:1 *cis* 9 (pico 5), além de considerável conteúdo de tocoferol (pico 19), no entanto, a manteiga de bacuri industrial, além de não ter sido retirada a tripalmitina, apresentou maior quantidade de constituintes terpênicos em relação à manteiga de bacuri extraída no laboratório da UFPI, dentre os quais destaca-se o constituinte **26** – ácido *E*-labda-8(20),13-dien-15,19-dióico (ácido diterpênico), uma vez que diterpenos com esqueleto labdano apresentam atividade farmacológica comprovada destacando-se a atividade anti-inflamatória (MELO, 2001).

A análise por CG/EM do material solúvel das cascas do fruto do bacuri extraído por fluido supercrítico identificou a presença de constituintes voláteis como: hidrocarbonetos, alcoóis monoterpênicos e seus óxidos: linalol,  $\alpha$ -terpineol, dentre outros, ácidos graxos, ésteres e eugenol (MONTEIRO et al., 1997). Os monoterpênóides,  $\alpha$ -terpineol, linaol dentre outros e os esteróides, estigmasterol e sitosterol foi encontrada na fração hexânica da casca do bacuri (SOUSA et al., 2009). A composição de constituintes voláteis e compostos glicosilados, principalmente monoterpênicos glicosilados da polpa de bacuri foi investigada por Boulanger e colaboradores (1999). Recentemente, a literatura relata a presença de derivados de floroglucínóis da semente de *P. insignis* com propriedades antioxidantes (COSTA JÚNIOR et al., 2011b).

#### 4.1.2 – Doseamento de Garcinielliptona FC (GFC)

O teor de GFC foi determinado nas manteigas de bacuri BBU e BBI utilizando a curva analítica da GFC (substância de referência) e a equação da reta. O método utilizado determinou que a concentração de GFC na banha-manteiga de bacuri BBU foi de 5,95% e na banha-manteiga de bacuri industrializada BBI a concentração de GFC de 4,86%.

A metodologia mostrou-se eficiente na determinação da concentração nas amostras.

## **4.2 – Obtenção tecnológica e avaliação da estabilidade preliminar e acelerada de ... formulações emulsionadas de FBBI e FBBU**

### **4.2.1 – Obtenção tecnológica de formulações semi-sólidas**

A seleção do veículo da formulação tem um papel de primordial importância na manutenção das características organolépticas, na estabilidade, na liberação da substância ativa e disponibilidade no local de aplicação (SATO et al 2007). Para que um fármaco alcance o seu sítio de ação algumas propriedades precisam ser avaliadas: a interação entre fármaco/pele e a interação entre o veículo/pele. A finalidade da aplicação de uma formulação, se uma ação local com formação de barreira ou uma ação sistêmica com penetração do fármaco deve ser estudada criteriosamente. No primeiro caso, a interação fármaco/pele tem uma importância significativa acontecendo na fabricação dos protetores solares e hormônios. Quando o objetivo é a penetração deste fármaco na pele é fundamental levar em conta a interação veículo/pele, visto que o veículo pode modificar o estado de permeabilidade da pele permitindo a penetração do ativo em quantidade e velocidade adequadas ao tratamento que está sendo executado (AULTON, 2005; ANTONIO, 2007).

#### **Características organolépticas**

Segundo Brasil (2008), a análise das características organolépticas são procedimentos utilizados para avaliar o produto e fornecer parâmetros que permitam analisar, de imediato, o estado da amostra em estudo com o objetivo de verificar alterações como mudança de coloração, odor, separação de fases, precipitação.

As formulações deste estudo foram produzidas em escala de bancada e os lotes mostraram-se reprodutíveis. Na triagem inicial, as formulações emulsionadas de PLO não apresentaram indício de instabilidade e a manteiga de bacuri foi compatível com o veículo utilizado em FBBI e FBBU, conforme descrito na Tabela 02. As formulações apresentaram aspecto brilhoso e cremoso, coloração amarelada, odor característico e permaneceram desta forma após a realização deste ensaio.

Tabela 02: Tabela comparativa entre o placebo, formulações contendo manteiga de bacuri da UFPI (FBBU) e Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada (FBBI) nos tempos To (inicial) e Tc (ciclo)

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

**Legenda:** AM : Amarelo; C: conforme; ; To: tempo inicial; Tc: Tempo final ciclo; FBBU: Formulação contendo manteiga de bacuri da UFPI; FBBI: Formulação contendo manteiga de bacuri Industrializada.  $p < 0,05$ . ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

## **Resistência a Centrifugação**

A força da gravidade atua sobre os produtos fazendo com que as partículas se movam no seu interior. A centrifugação promove estresse na amostra, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto e coalescência (BRASIL, 2005). As amostras devem ser submetidas à centrifugação, durante 30 minutos, a uma velocidade de 3.000 rpm com três leituras para cada amostra. A ocorrência de instabilidade é indicativa da necessidade de reformulação. As formulações que se apresentarem estáveis a este teste, podem ser submetidas ao Teste de Estabilidade Preliminar (ISAAC et al, 2008)

As formulações foram submetidas à centrifugação possibilitando, desta forma, observar possível instabilidade entre a mistura das manteigas de bacuri e o organogel PLO, bem como parâmetros iniciais e finais de comportamento. Como é observado na Tabela 02, as formulações se mantiveram estáveis à centrifugação sem qualquer indício de instabilidade de natureza física ou química.

## **Estabilidade preliminar e Estabilidade acelerada**

Para realização dos testes de estabilidade preliminar utilizamos o Guia de estabilidade de produtos cosméticos da Anvisa de 2004, considerando que a resolução RE nº 01, de 29 de julho de 2005 que trata de estudos de estabilidade de produtos farmacêuticos não abrange os estudos de estabilidade preliminar.

O estudo de estabilidade preliminar auxilia na escolha das formulações por ser um teste realizado na fase inicial do desenvolvimento do produto e ter duração reduzida. Emprega condições extremas de temperatura com o objetivo de acelerar possíveis reações entre seus componentes sugerindo reformulação, portanto, é de fundamental importância no desenvolvimento de qualquer formulação. Já o estudo de estabilidade acelerado tem como objetivo prever o tempo de vida útil e compatibilidade da formulação com o material de acondicionamento (BRASIL, 2004).

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

### *Características organolépticas*

As formulações foram submetidas a estudos de estabilidade preliminar e acelerada e durante estes ensaios, as características organolépticas foram avaliadas. A Tabela 03 identifica que não houve grandes mudanças em relação às características organolépticas como cor amarelada, brilho, aspecto cremoso e odor.

### *pH*

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

A pele humana é susceptível á variação de pH sendo de extrema importância a sua determinação em formulações cosméticas ou dermatológicas visto que alterações na composição destas formulações pode desencadear processos alérgicos ou inflamatórios podendo provocar descamação, vermelhidão, inchaço, perda da elasticidade, ressecamento, dentre outros. O pH da pele apresenta-se levemente ácido podendo variar entre 4,6 a 5,8 (LEONARDI et al, 2002; GONÇALVES,et al, 2009). Apesar da manteiga de bacuri da UFPI (BBU) apresentar um grande conteúdo graxoso não houve interferência, visto que o pH das formulações foi compatível com a pele humana e permaneceu inalterado após o ciclo como mostra a Tabela 03, p.82.

Tabela 03: Tabela comparativa entre o placebo, formulações contendo manteiga de bacuri da UFPI (FBBU) e Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada (FBBI) nos tempos To (inicial) e T60 nas seguintes situações de estresse: estufa, sem presença de luz direta e com a presença de luz direta

PARÂMETRO	PLACEBO TO			FORMULAÇÕES								
	PLACEBO			FBBU			FBBI					
	To	To BBU	To BBI	T60E	T60SL	T60L	T60E	T60SL	T60L	T60E	T60SL	T60L
COR	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM	AM
ODOR	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
HOMOGENEIDADE	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
BRILHO	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
pH	5,36 ± 0,04	5,26 ± 0,10	5,36 ± 0,04	5,03 ± 0,04	5,09 ± 0,04	5,01 ± 0,04	4,92 ± 0,04	4,98 ± 0,04	4,85 ± 0,04	4,94 ± 0,04	4,98 ± 0,02	5,00 ± 0,02
ESPALHABILIDADE Ei (mm2)	1586,66 ± 46,18	1613,33 ± 23,09	1736,33 ± 63,72	1474,33 ± 70,93	1496,66 ± 20,20	1497 ± 39,86	2290,33 ± 127,00	2418,66 ± 87,00	2289,33 ± 42,50	2317,66 ± 9,23	2432,66 ± 25,40	2377,33 ± 196,18
VISCOSIDADE APARENTE (Pa.s)	19,4 ± 0,00	19,4 ± 0,02	19,39 ± 0,05	19,39 ± 0,02	19,42 ± 0,03	19,39 ± 0,04	19,49 ± 0,08	19,44 ± 0,03	19,35 ± 0,01	19,39 ± 0,01	19,58 ± 0,15	19,54 ± 0,02

**Legenda:** AM : Amarelo; C: conforme; To: tempo inicial; E: estufa; L: presença de luz; SL: ausência de luz; FBBU: Formulação contendo manteiga de bacuri da UFPI; FBBI: Formulação contendo manteiga de bacuri industrializada.  $p < 0,05$ . ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

### *Espalhabilidade*

A espalhabilidade em conjunto com a viscosidade serve para avaliar alterações nas características reológicas da formulação durante o estudo. Em especial, nas formas farmacêuticas semissólida, este parâmetro é importante para acompanhar as modificações na capacidade que a formulação tem de se espalhar ou abranger determinada área, o que pode facilitar ou dificultar a sua aplicação (BUGNOTTO et al, 2006)

O PLO é um organogel que apresenta como característica a termorreversibilidade. Quando são aquecidos acima de uma temperatura crítica perde a sua estrutura tornando-se mais fluído. Este comportamento vem sendo atribuído a perda de interação entre as moléculas do gel que ao ser arrefecido a tem suas interações refeitas devolvendo a consistência original (MURDAN, 2005). Segundo a Tabela 02, no tempo 0 (To) não houve diferença significativa entre o placebo e as formulações FBBU e FBBI, visto que não foram submetidas a algum tipo de stress. No entanto, ao comparar To ao Tc tanto da FBBU quanto na FBBI são evidenciadas modificações, indicando aumento da espalhabilidade que pode ser devido as características do creme. Ao comparar To ao Tc, a representação gráfica da espalhabilidade, da base e suas réplicas, em função da massa aplicada (Figura 19) revelou comportamentos diferenciado para as formulações FBBU e FBBI, dando fortes indícios que as formulações sofreram alteração na sua estrutura.

A Figura 19 apresenta gráfico comparativo entre o To e o Tc que representa a espalhabilidade e mostra comportamento semelhante a todos os placebos. Nas formulações FBBI e FBBU houve alteração em relação ao grau de espalhabilidade, que pode ter acontecido pela perda de água ou pela temperatura a que foi submetida formulação (FRIEDRICH et al 2007).

A Figura 20 apresenta o gráfico comparativo da espalhabilidade em função do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos TO e o T60 ao controle. Representa a espalhabilidade e mostra comportamento semelhante a todos os placebos sugerindo que se trata de uma formulação estável. Nas formulações FBBI e FBBU houve alteração em relação ao grau de espalhabilidade, que pode ter acontecido pela perda de água ou pela temperatura a que foi submetida formulação (FRIEDRICH et al 2007)

Figura 19: Gráfico comparativo da espalhabilidade em do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos TO e o TC ao controle.

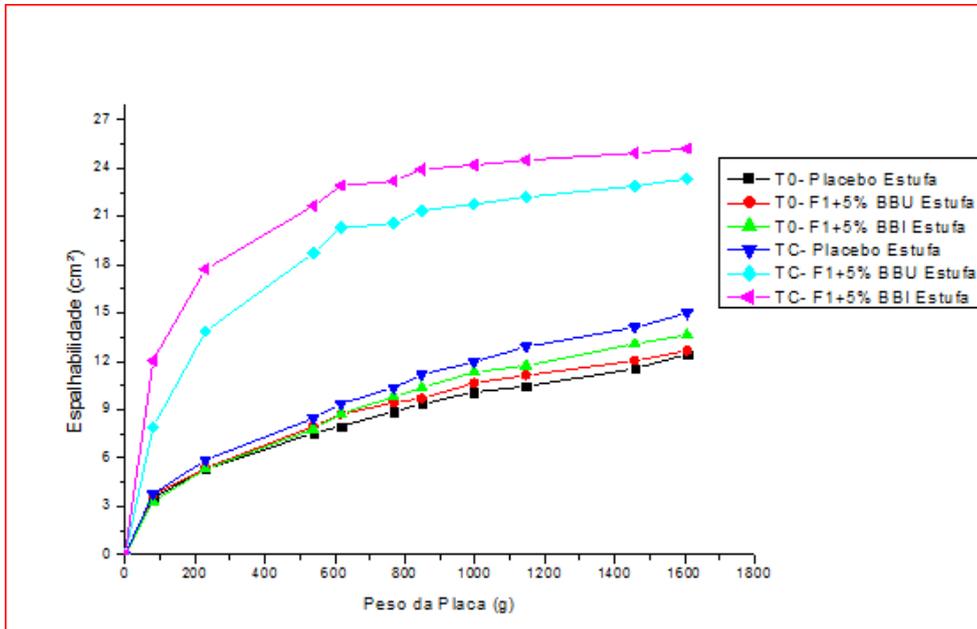
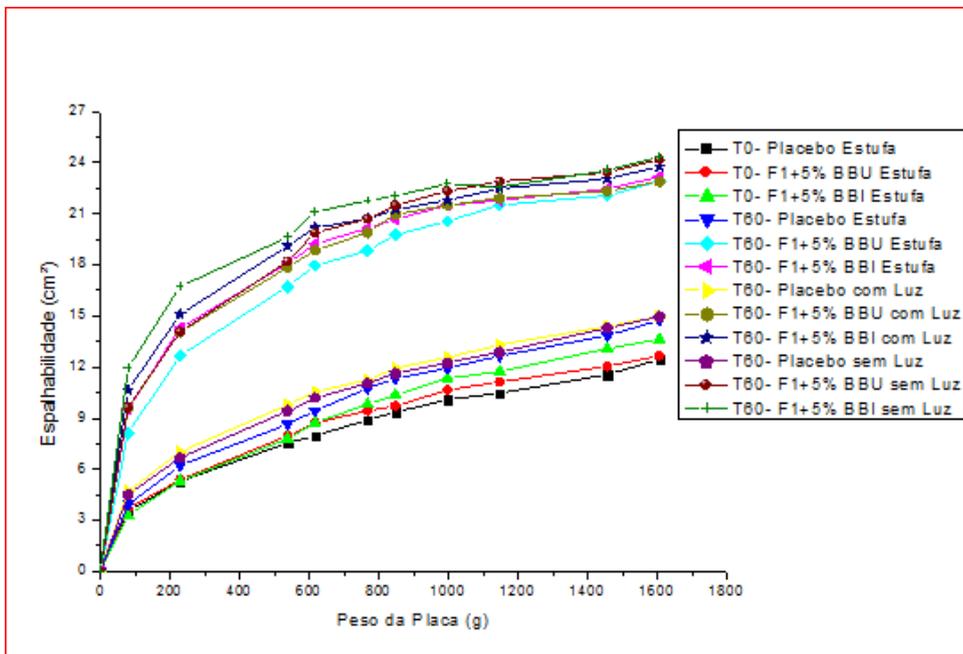


Figura 20: Gráfico comparativo da espalhabilidade em do peso da placa nas diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos TO e T60.



### *Viscosidade aparente*

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

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

As Figuras 21 e 22 mostram que as amostras em estudo, nos tempos  $T_0$  e  $T_{60}$ , apresentam comportamento típico de fluídos não – newtonianos possivelmente pseudoplásticos, visto que a viscosidade diminuiu com o aumento da tensão de cisalhamento aplicada e não existe relação linear entre o aumento do cisalhamento e a força aplicada sobre o fluido. A diminuição da viscosidade juntamente com o comportamento pseudoplástico observado nos ensaios mostraram que as formulações tendem a possuir uma facilidade maior na sua espalhabilidade sobre a pele, ou seja, ao ser aplicada ela consegue se espalhar com facilidade, devido a redução da viscosidade ao se aplicar uma certa força, e ao mesmo tempo possui a propriedade de permanecer no local da aplicação sem escorrer. (CARVALHO et al., 2010; SIDDIG et al., 2006)

Na Figura 21, foi possível observar que, todas as amostras analisadas em  $T_0$  apresentaram comportamento semelhante. O placebo relativo ao  $T_c$  comportou-se da mesma forma que todas as formulações no  $T_0$ . No entanto, as formulações que contem BBU e BBI tiveram alterações sugerindo que BBU e BBI influenciam de sobremaneira na composição do creme. A Tabela 02 corrobora com esta afirmativa ao comparar-se o valor relativo da viscosidade, observando uma diminuição na viscosidade.

De acordo com a Figura 22, todas as amostras, nas situações analisadas, apresentaram comportamento semelhante, tanto em  $T_0$  como em  $T_{60}$ , ou seja, comparando-se ao placebo, as formulações com BBU e BBI apresentaram-se estáveis no que diz respeito a viscosidade que não foi alterada mesmo após 60 dias e presença da luz, ou seja, as amostras mantiveram seu comportamento, com fortes indícios de ter comportamento pseudoplástico.

Figura 21. Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos TO e o TC ao controle.

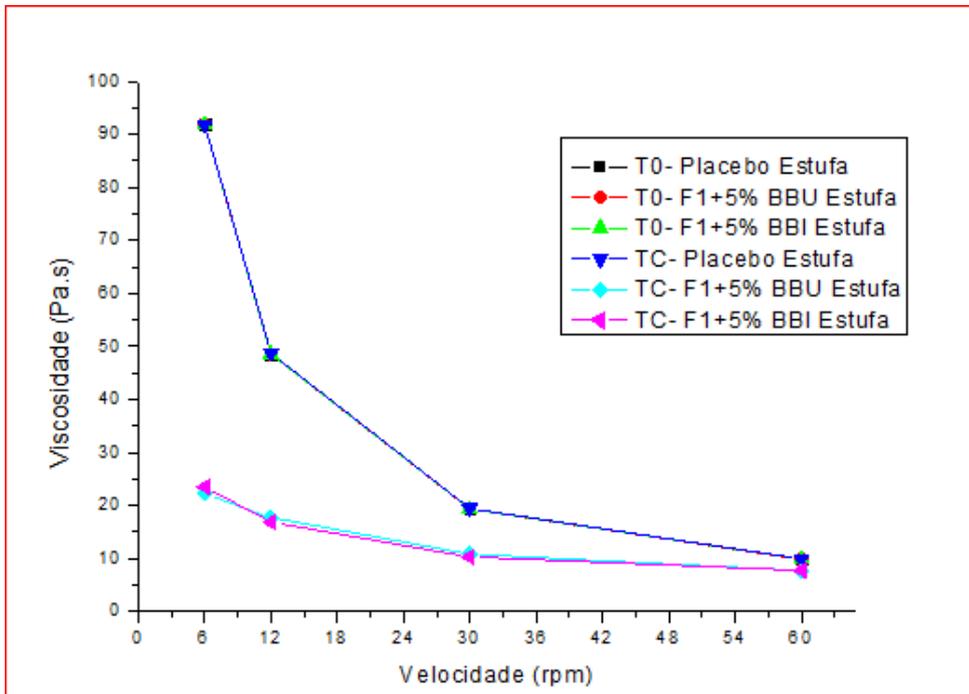
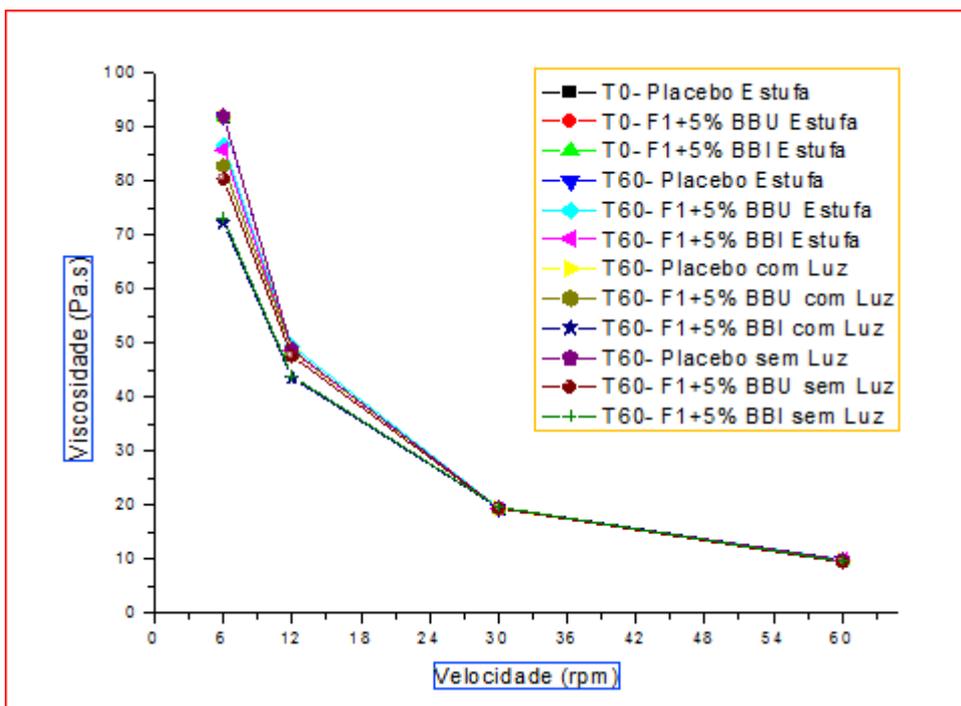


Figura 22. Gráfico comparativo da viscosidade das diferentes situações de estresse, entre o placebo, as formulações FBBU e FBBI nos tempos TO e T60 ao controle.



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

### *Microscopia*

A estabilidade macroscópica não implica numa perfeita formação e distribuição no tamanho das gotículas da fase interna de uma emulsão. As formulações podem apresentar a nível microscópico alterações e irregularidades que ao longo da sua fabricação podem causar desestabilização da preparação. As características organolépticas podem ser apreciadas, com mais rigor, ao microscópio, permitindo a determinação do tamanho das partículas dispersas. A análise microscópica das formulações nos diferentes tempos TO, TC, T15, T30 e T60 é um importante aliado na determinação da estabilidade das mesmas, logo um método preciso para a determinação da estabilidade é avaliar o tamanho dos glóbulos em função do tempo (PRISTA, 1995).

As Figuras de 23 a 26 indicam que ao comparar e analisar microscopicamente as formulações no To e no T60, o diâmetro das partículas no final do T60 apresentam um aumento no diâmetro dos glóbulos, mas que provavelmente não aconteceram com tanta intensidade, para ocorrer separação. Isso não compromete a qualidade das formulações, pois essa variação no tamanho e frequência não foi significativa e não corresponde à instabilidade, visto que as partículas dispersas não se tornaram tão grandes a ponto de separar-se como líquido livre.

As formulações podem ser classificadas como sistemas microemulsionados pelo tamanho médio de gotículas, visto que estão na ordem micrométrica.

Figura 23: Microfotografia da formulação de PLO contendo BBI no TO na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.

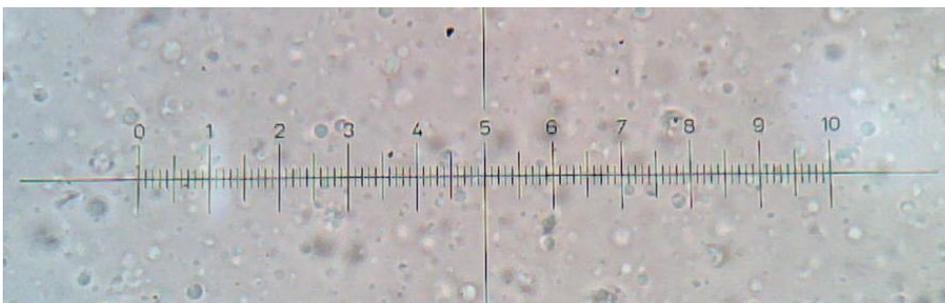


Figura 24: Microfotografia da formulação de PLO contendo BBU no TO na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



Figura 25: Microfotografia da formulação de PLO contendo BBI no T60 na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.

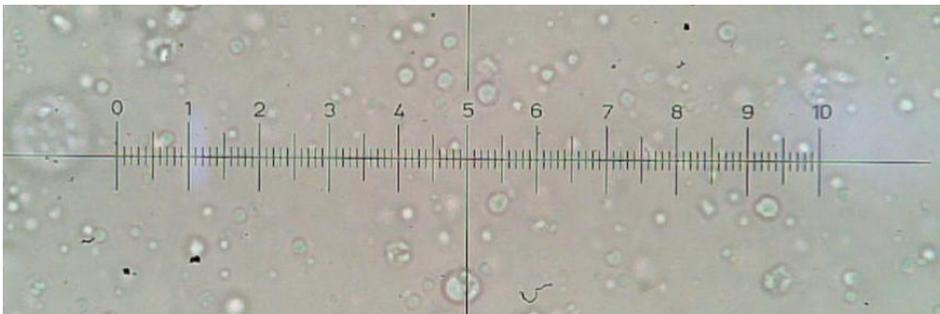
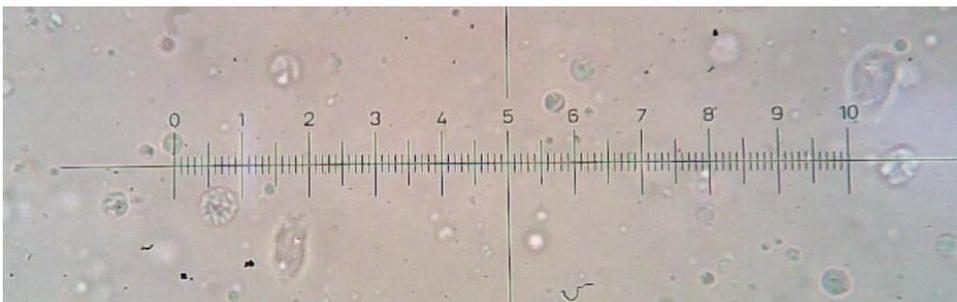


Figura 26: Microfotografia da formulação de PLO contendo BBU no T60 na presença de luz na lente com ocular micrométrica com aumento de 100x.



### 4.3. – Avaliação Farmacológica das manteigas de *Platonia insignis* (BBU e BBI) e formulações (FBBU e FBBI)

#### 4.3.1 – Determinação da Toxicidade manteigas de *P. insignis* Mart

##### *Atividade citotóxica em (MTT)*

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* para macrófagos são usuais na pesquisa por princípios ativos eficientes no tratamento das leishmanioses. Um dos métodos utiliza o composto conhecido como MTT que tem cor amarela e é solúvel em água. O MTT entra nas células pela membrana plasmática e, em contato com o superóxido produzido pela atividade mitocondrial, é oxidado a MTT-formazan, sal de cor arroxeadada e insolúvel em água. Assim, a oxidação de MTT é proporcional à atividade mitocondrial e, portanto, à viabilidade celular (LOOSDRECHT et al., 1991).

Os valores para a concentração citotóxica média (CC<sub>50</sub>) das manteigas de bacuri estão dispostos na Tabela 04. Observa-se que não foi observada diferença significativa entre BBU e BBI.

Observa-se que as manteigas BBU e BBI possuem um certo grau de toxicidade considerando que são capazes de reduzir 50% da viabilidade de macrófagos com 77 µg/mL e 89,86 µg/mL, respectivamente.

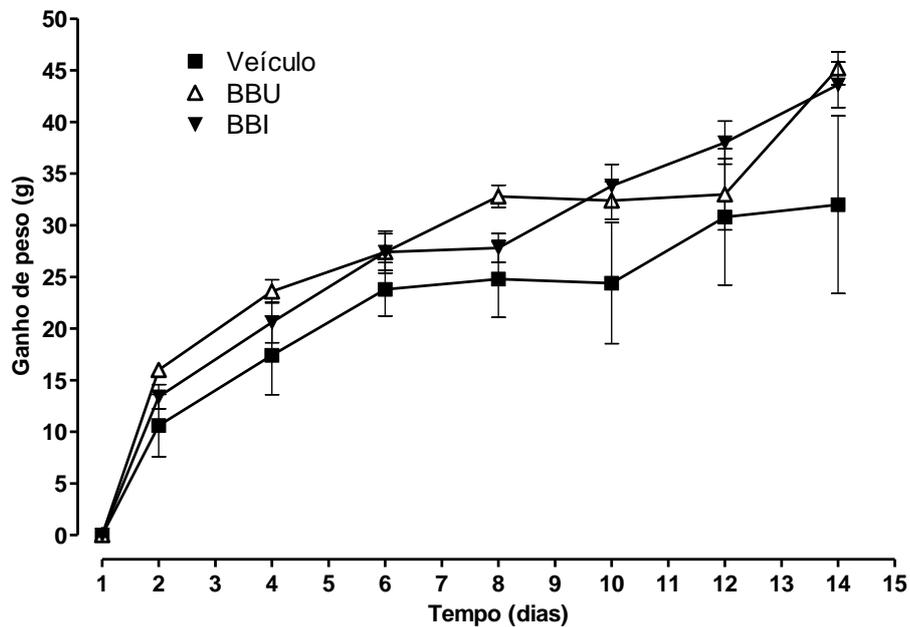
Tabela 04 – Atividade citotóxica em MTT das amostras de BBI e BBU

Substância	CC <sub>50</sub> (µg/mL) 48 horas	Intervalo de Confiança 95%
BBI	77	62,8 – 94,8
BBU	89,86	69,9 – 117,4

##### *Avaliação da toxicidade aguda em ratos*

Na avaliação toxicológica, não foram observados morte ou alteração nos parâmetros clínicos e comportamentais avaliados diariamente durante 14 dias (Tabela 06). Em relação aos pesos, não se observou diferença significativa entre os grupos utilizando veículo, BBU e BBI (Figura 27). Ao contrário, apresentaram significativo aumento de peso no 14.º dia em relação ao 1.º dia de tratamento ( $32,0 \pm 8,6$  g,  $45,2 \pm 1,6$  g e  $43,6 \pm 2,2$  g, respectivamente).

Figura 27 – Gráfico das curvas de ganho de peso após tratamento agudo com veículo, BBU e BBI (2,0 g/kg, v.o.) em ratos. Os valores são expressos como média  $\pm$  e.p.m (n = 5).



Após a necropsia, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos internos avaliados, assim como em seus pesos relativos, em relação ao grupo controle (Tabelas 05) não havendo nenhum parâmetro significativo. Da mesma forma, em nenhum dos estômagos avaliados observou-se a presença de úlceras gástricas.

A avaliação dos parâmetros bioquímicos não apresentou diferença entre os grupos analisados (Tabela 07), indicando conformidade com os parâmetros relatados na literatura (SANTOS et al., 2010). Adicionalmente, observou-se aumento nos níveis de GSH, mas não de catalase, nos tecidos hepáticos do grupo tratado com BBI (Figura 28 e 29).

Tabela 05 - Peso relativo dos órgãos após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).

Órgãos	Veículo	BBU	BBI
Pulmões	0,652 $\pm$ 0,063	0,502 $\pm$ 0,007	0,501 $\pm$ 0,021
Coração	0,336 $\pm$ 0,007	0,350 $\pm$ 0,012	0,431 $\pm$ 0,100
Estômago	0,701 $\pm$ 0,037	0,800 $\pm$ 0,106	0,740 $\pm$ 0,042
Fígado	3,745 $\pm$ 0,304	4,428 $\pm$ 0,111	3,875 $\pm$ 0,192
Cérebro	0,814 $\pm$ 0,030	0,845 $\pm$ 0,019	0,821 $\pm$ 0,035
Rim Direito	0,363 $\pm$ 0,010	0,392 $\pm$ 0,011	0,359 $\pm$ 0,011
Rim Esquerdo	0,349 $\pm$ 0,010	0,346 $\pm$ 0,009	0,344 $\pm$ 0,007

Tabela 06 – Principais sinais clínicos e comportamentais de toxicidade avaliados após tratamento agudo com veículo, BBU e BBI (2,0 g/kg, v.o.) em ratos.

SINAIS	Veículo			BBU			BBI		
	1.º dia	7º dia	14º dia	1.º dia	7.º dia	14.º dia	1.º dia	7.º dia	14.º dia
Hiperatividade	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Agressividade	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Compulsão	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsão	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piloereção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptose palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sedação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ataxia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Catatonía	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo corneal	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Grooming	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Auto-mutilação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vocalização	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Contorções abdominais	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Icterícia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cifose/Lordose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inconsciência	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Morte	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defecação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Constipação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Diâmetro da pupila	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paresia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacrimajamento	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Espasmo palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Micção	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Salivação	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cianose	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispneia	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vômito	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Legenda: (0) Sem alterações.

Figura 28 – Gráfico dos níveis de glutathiona reduzida (GSH) em tecido hepático após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.). \* $p < 0,05$  vs. Veículo.

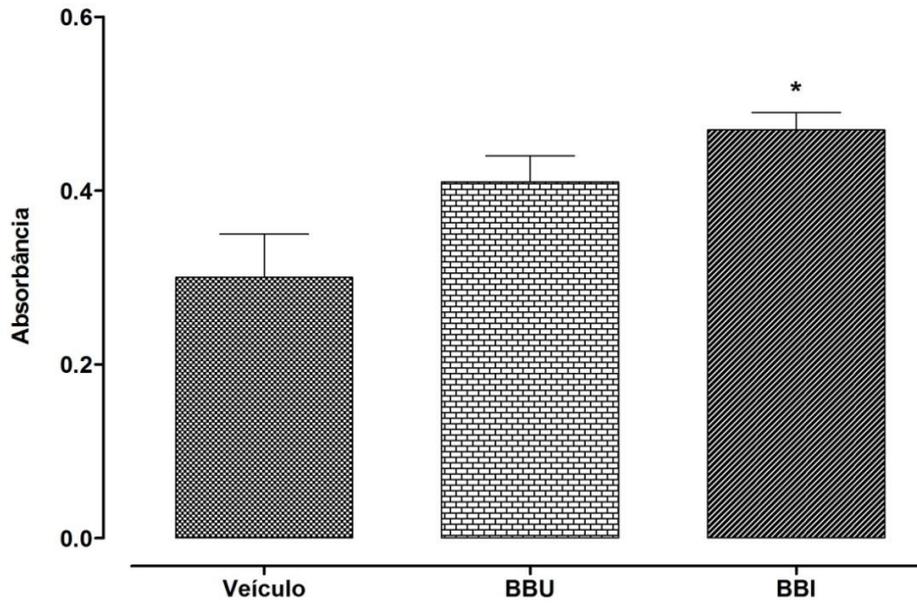


Figura 29 – Gráfico dos níveis de catalase em tecido hepático após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).

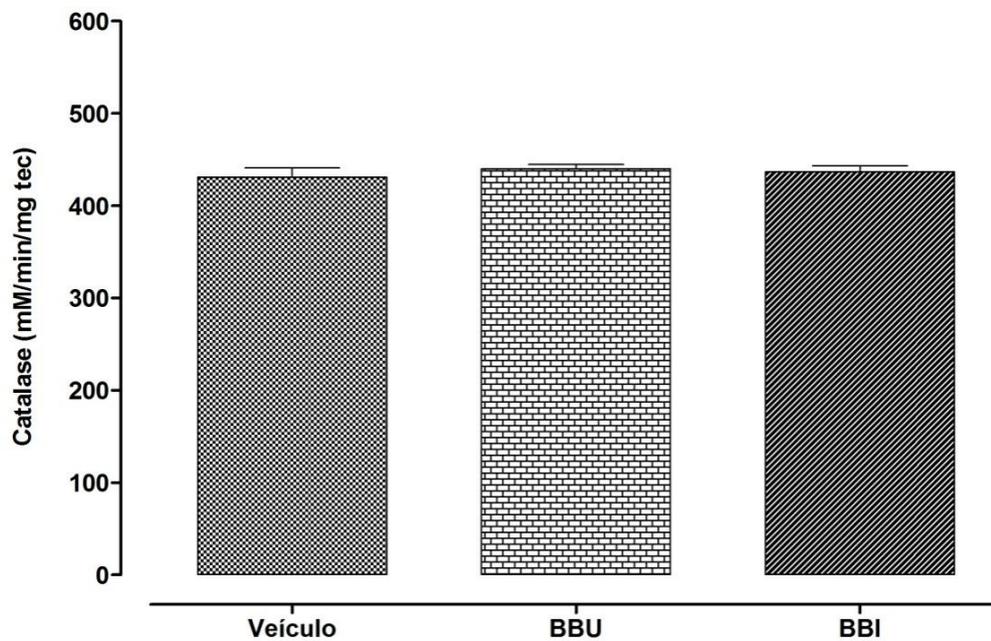


Tabela 07 – Avaliação de parâmetros bioquímicos após 14 dias do tratamento agudo com veículo, BBU ou BBI (2,0 g/kg, v.o.).  $p < 0,05$ . ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

<i>Parâmetros</i>	<b>Veículo</b>	<b>BBU</b>	<b>BBI</b>
Proteínas Totais (mg/dl)	6,96 ± 0,103	7,08 ± 0,139	6,40 ± 0,141
Albumina (mg/dl)	4,02 ± 0,143	4,44 ± 0,121	4,16 ± 0,087
Fosfatase Alcalina (U/L)	214,80 ± 29,986	158,40 ± 15,584	138,20 ± 20,301
ALT (U/L)	59,20 ± 4,409	93,80 ± 25,605	58,20 ± 5,342
AST (U/L)	108,00 ± 6,790	110,20 ± 4,663	98,40 ± 3,696
Bilirrubina Total (mg/dl)	0,10 ± 0,000	0,10 ± 0,000	0,10 ± 0,000
Bilirrubina Direta (mg/dl)	0,036 ± 0,006	0,046 ± 0,002	0,036 ± 0,005
Bilirrubina Indireta (mg/dl)	0,064 ± 0,006	0,054 ± 0,002	0,064 ± 0,005
Uréia (mg/dl)	36,80 ± 1,241	44,00 ± 1,378	43,20 ± 2,818
Creatinina (mg/dl)	0,30 ± 0,032	0,30 ± 0,032	0,28 ± 0,037
Ácido Úrico (mg/dl)	0,68 ± 0,049	0,96 ± 0,169	1,12 ± 0,402
Glicose (mg/dl)	129,60 ± 6,408	136,40 ± 7,903	164,60 ± 10,642
Colesterol (mg/dl)	118,50 ± 6,083	103,50 ± 4,111	105,00 ± 9,006
Triglicerídeos (mg/dl)	98,50 ± 20,857	68,00 ± 5,060	87,20 ± 13,021
Sódio (mmol/l)	142,00 ± 1,140	143,60 ± 0,872	140,60 ± 0,600
Potássio (mmol/l)	3,74 ± 0,125	3,56 ± 0,075	3,82 ± 0,111
Cloreto (mmol/l)	101,60 ± 1,364	101,80 ± 0,374	102,40 ± 0,510

#### 4.3.2. – Avaliação da atividade leishmanicida

##### *Avaliação da Atividade leishmanicida in vivo* usando as formulações FBBI e FBBU

O desenvolvimento de lesões causadas pela infecção experimental com *L. amazonensis* em camundongos BALB/c deu-se conforme descrito na literatura. Inicialmente verificou-se uma pápula de coloração avermelhada no sítio de inoculo, na base da calda, progredindo, no curso de 2 a 3 semanas, para a formação de um nódulo que evolui gradativamente, culminando com o surgimento de uma úlcera bem circunscrita e de bordas abauladas (CARVALHO, 2001)

O início do tratamento dos animais ocorreu aproximadamente 30 dias após a infecção, no momento do surgimento dos nódulos. Foram feitas duas aplicações diárias em cada grupo de animais usando as formulações BBI; BBU e o placebo. Foi realizada a medida inicial dos nódulos mantendo uma média de 6,82 mm.

No início da infecção houve primeiramente a formação de nódulos (Figura 30A) com a evolução do processo formou-se a úlcera com uma espessa crosta capaz de fechar por completo toda a abertura da ferida (Figura 30B), dificultando a aplicação das formulações e favorecendo o desenvolvimento de processo infeccioso secundário. Quando este quadro se instala, observa-se facilmente a presença de material de consistência purulenta que flui facilmente, sob leve pressão, através das bordas da ferida (Figura 30C). Uma vez retirada a crosta da ferida e feita a devida assepsia, pode-se visualizar com clareza a extensão de toda a lesão (Figura 30D).

Quando submetidos ao tratamento todos os grupos evoluíram de nódulos para úlceras. As lesões ulcerativas não regrediram ao ponto de cicatrizar completamente, mas se comparadas as lesões do grupo que usou o placebo tiveram uma redução significativa como mostra a Figura 31.

Figura 30: A - Formação do nódulo; B- Úlcera com crosta capaz de fechar toda a abertura da ferida; C –Úlcera com material de consistência purulenta; D- Extensão total da úlcera após assepsia.

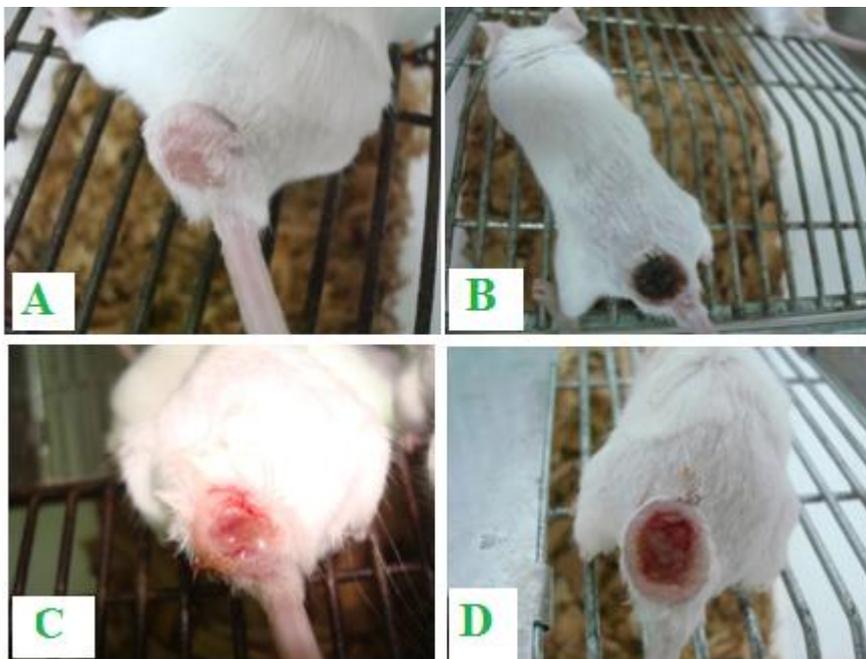
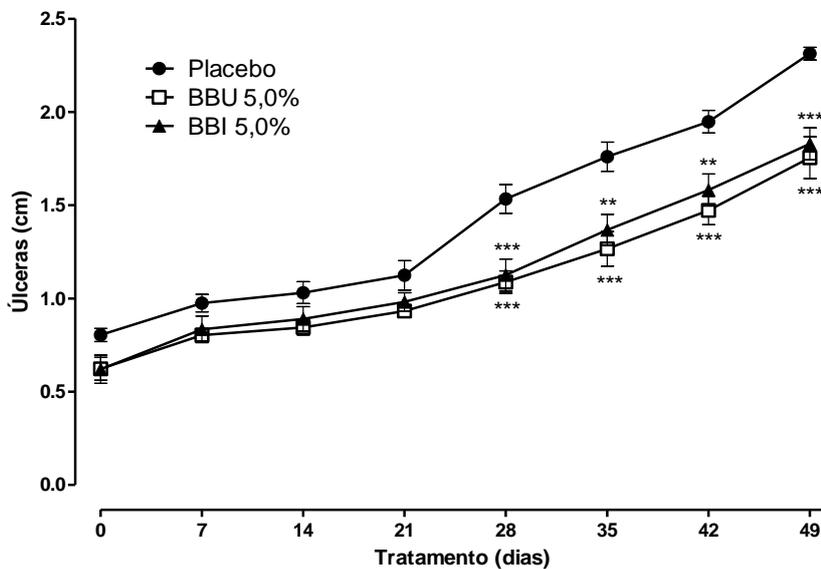


Figura 31: Gráfico da relação entre o tamanho das úlceras e os dias de tratamento das formulações placebo; BBI e BBU.

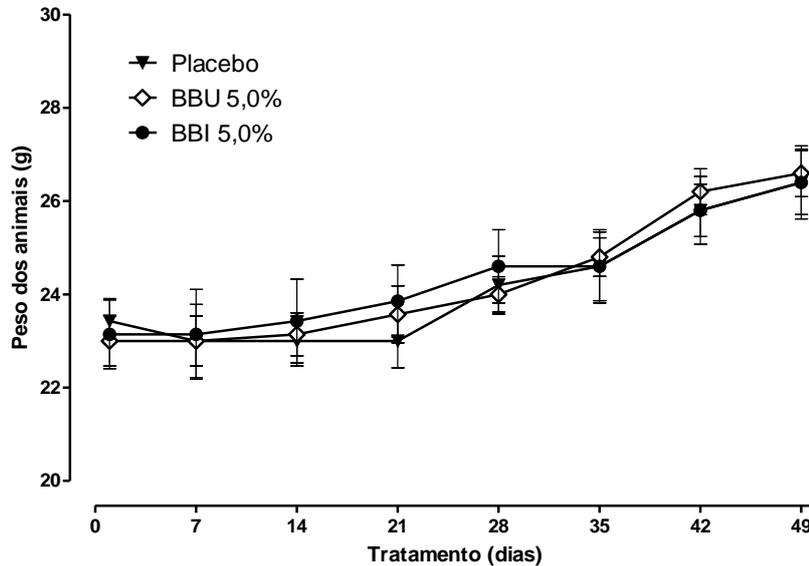


Baseado em dados da literatura, em que vários autores relatam suas experiências com uso tópico de formulações para tratamento da *L. amazonensis*, verificou-se a importância e a influência que a escolha da formulação pode representar nos resultados terapêuticos. A permeação da formulação e conseqüente permeação do princípio ativo são fundamentais na eficácia do tratamento.

Como já descrito anteriormente, é característica clínica da lesão ulcerada na leishmaniose cutânea em camundongos, a formação de uma espessa crosta que recobre toda a superfície da úlcera, dificultando, dessa forma, não somente a aplicação da formulação tópica terapêutica, como também a absorção das manteigas BBU e BBI. Dessa forma, a remoção da crosta e conseqüente limpeza da ferida favorece o processo de cura. Procedeu-se a remoção de todas as crostas para facilitar a absorção (CARVALHO, 2001).

Outro parâmetro observado foi à relação entre o ganho de peso dos animais durante os dias de tratamento. A Figura 32 mostra que houve ganho sugerindo que não houve maior comprometimento das funções vitais dos animais.

Figura 32: Gráfico da relação entre o ganho peso dos animais e o dias de tratamento das formulações placebo; FBBI e FBBU.



*Avaliação da Atividade leishmanicida in vitro usando as manteigas BBI e BBU*

#### *Ensaio de determinação do volume lisossomal*

O aumento do volume lisossomal em macrófagos foi avaliado pela retenção de vermelho neutro dissolvido em DMSO. O vermelho neutro retido no lisossomo foi quantificado colorimetricamente. Destaca-se que BBI promoveu um significativo incremento na retenção do vermelho neutro nas vesículas de secreção de macrófagos nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que BBU apresentou efeito significativo apenas nas concentrações de 50, 25 e 12,5  $\mu\text{g/mL}$  (Figuras 33 e 34).

Figura 33 – Gráfico da retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com BBI ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Valores expressos como média das absorvâncias/ $10^6$  células. $\text{mL}^{-1} \pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni;  $**p < 0,01$  e  $***p < 0,01$  vs. controle.

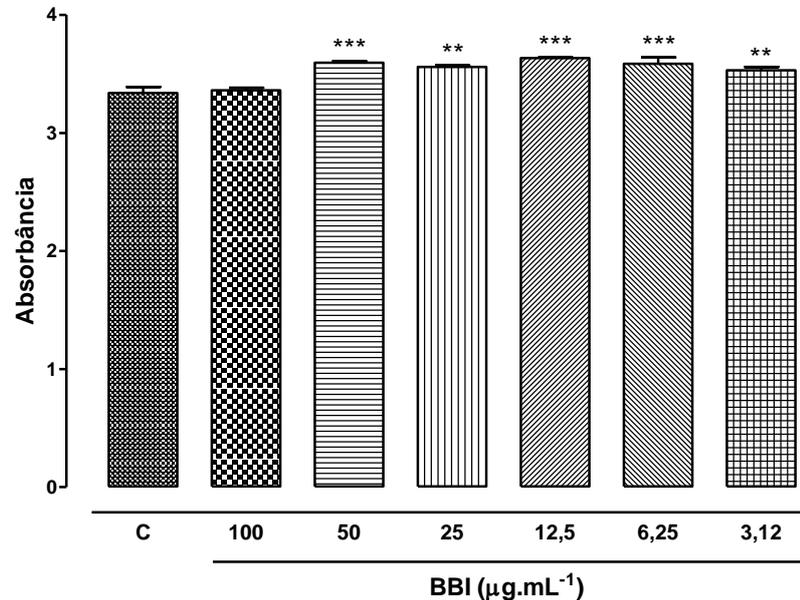
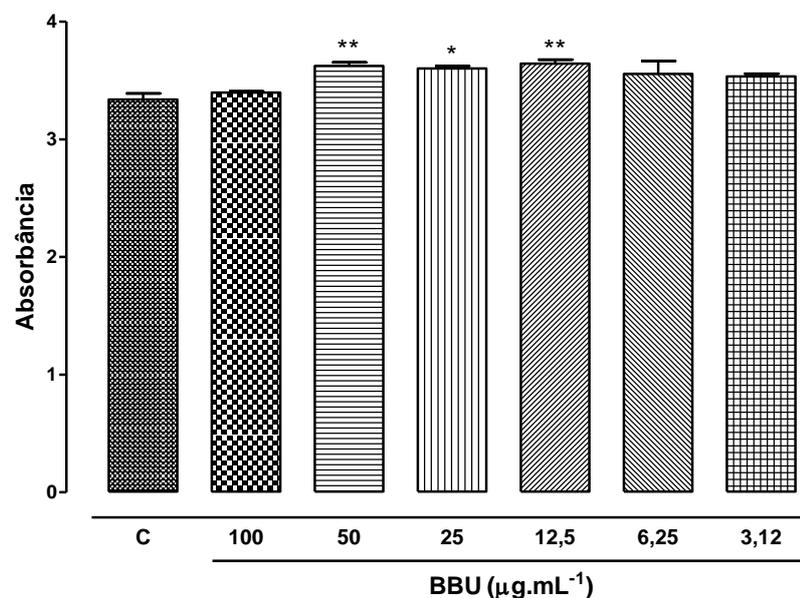


Figura 34 – Gráfico da retenção de vermelho neutro em vesículas de secreção de macrófagos tratados com BBU ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Valores expressos como média das absorvâncias/ $10^6$  células. $\text{mL}^{-1} \pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni;  $*p < 0,05$  e  $**p < 0,01$  vs. controle.



Segundo Ghazanfari et al (2006), a ativação dos macrófagos é necessária para estabelecer o controle de infecção intracelular e a progressão da infecção por leishmanias. As plantas, na tentativa de se adaptarem às agressões do meio ambiente, produzem um vasto número de substâncias com potencial antimicrobiano e/ou imunomodulador (IELPO et al., 2000). Os resultados do ensaio de

determinação do volume lisossomal mostram que o tratamento dos macrófagos com BBI ou BBU promoveu discreto aumento no número e/ou volume das vesículas do compartimento endocítico, sugerindo o aumento no potencial de defesa dessas células.

#### *Ensaio de determinação da capacidade fagocítica*

Outro parâmetro de ativação de macrófagos avaliado foi a resposta celular frente a um estímulo externo. A capacidade fagocítica dos macrófagos foi mensurada colorimetricamente. Observa-se que o BBU estimulou a fagocitose das partículas de zimosan nas concentrações de 25, 12,5, 6,25 e 3,12  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto que BBI apresentou elevações significativas apenas nas concentrações de 25, 12,5 e 6,5  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 35 – Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com BBI ( $\mu\text{g/mL}$ ). Valores expressos como média das absorbâncias/ $10^6$  células. $\text{mL}^{-1} \pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni. \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,01$  vs. controle.

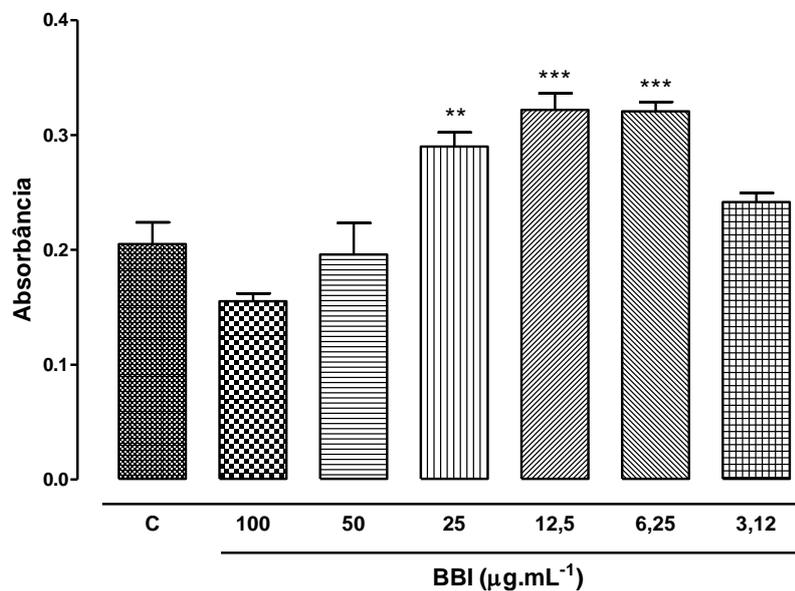
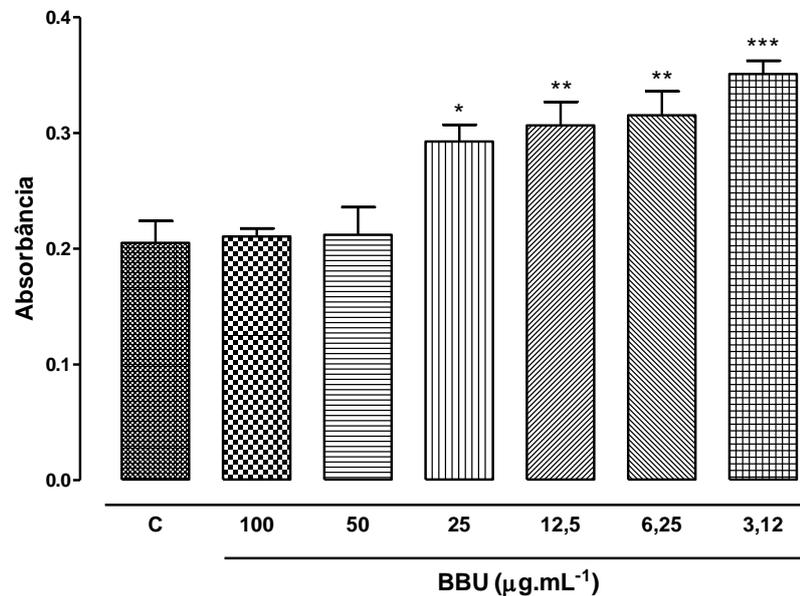


Figura 36 - Fagocitose de partículas de zimosan pelos macrófagos tratados com BBU ( $\mu\text{g/mL}$ ). Valores expressos como média das absorvâncias/ $10^6$  células. $\text{mL}^{-1} \pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,01$  vs. controle.



A capacidade fagocítica dos macrófagos foi estimada pela incorporação de partículas de zimosan corado com vermelho neutro. Zimosan é um polissacarídeo preparado a partir da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* na forma de pó insolúvel em água, com partículas de diâmetro médio de 3  $\mu\text{m}$ . Estudos *in vitro* tem demonstrado que o zimosan tem a capacidade de estimular células de defesa a induzir resposta imunológica do tipo Th1, inclusive com incremento na produção de IFN- $\gamma$  (WEN-CHI et al., 2011) Quando os macrófagos murinos foram estimulados com partículas de zimosan observou-se que houve um incremento na atividade fagocitária por todos os tratamentos. Os resultados mostraram que as manteigas de bacuri induzem a ativação dos macrófagos frente a um agente externo, segundo Schwartz et al (2007). Muitos sistemas enzimáticos antimicrobianos são ativados dentro das vesículas fagocíticas com o intuito de digerir patógenos e/ou substâncias fagocitadas.

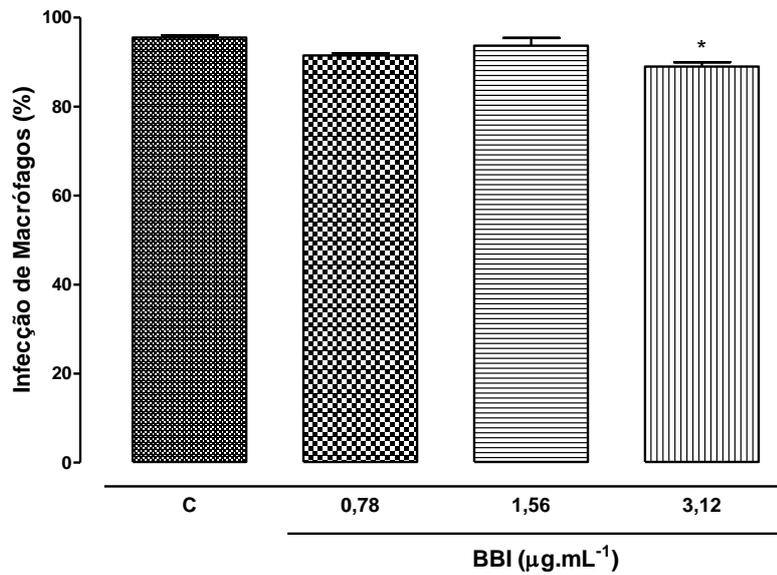
#### *Infeção de macrófagos tratados in vitro por Leishmania amazonensis*

As Figuras 37 e 38 mostraram o efeito do tratamento de macrófagos com as manteigas de bacuri realizado 30 minutos antes da infecção experimental com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os valores obtidos revelam que ocorre redução significativa no número

de amastigostas por macrófago de forma dependente de concentração. O percentual de infecção apresenta redução apenas para a BBI na concentração de 3,12  $\mu\text{g/mL}$ .

Figura 37 – Efeito do tratamento de macrófagos infectados com BBI (A) Percentual de infecção de macrófagos e (B) número médio de amastigostas por macrófago infectado. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni; \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. controle.

A



B

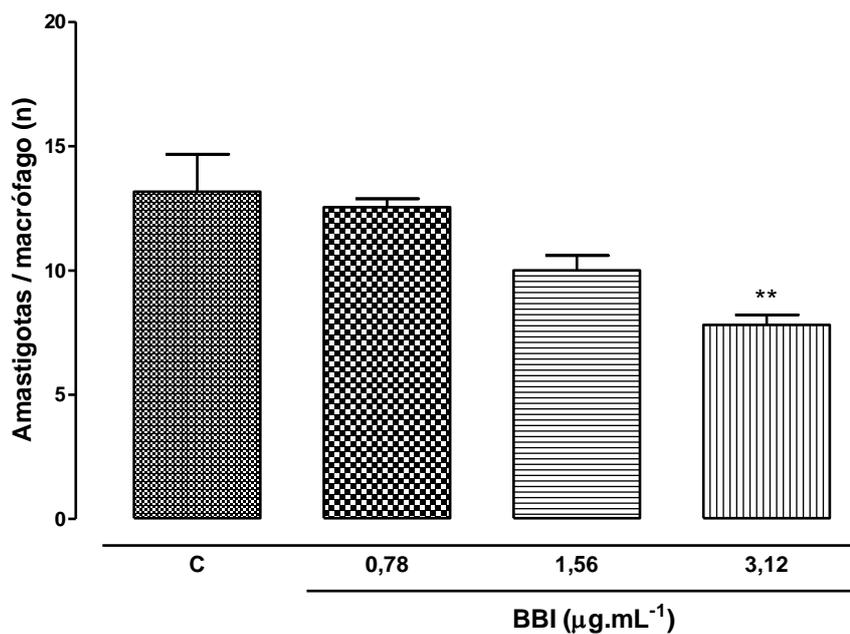
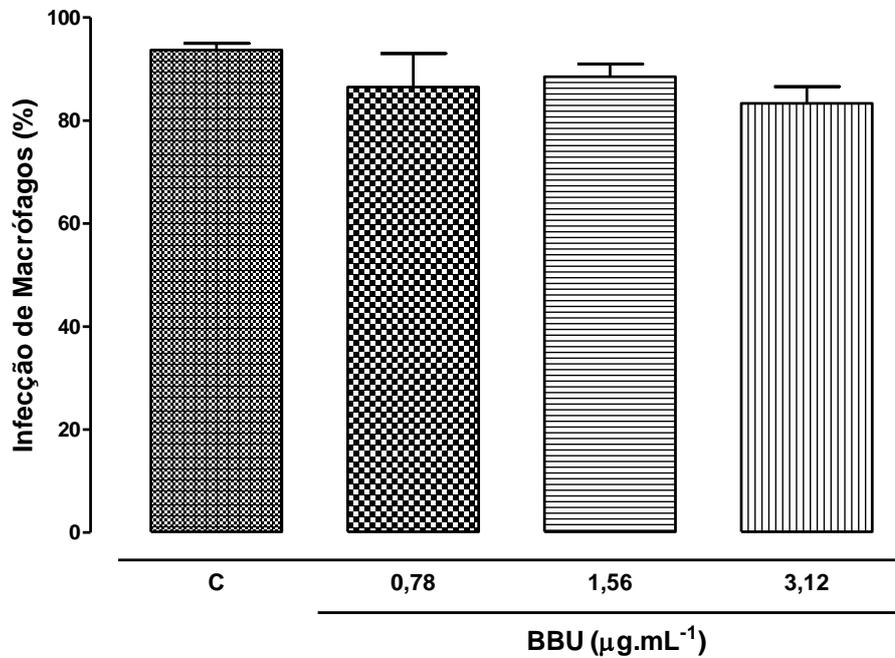
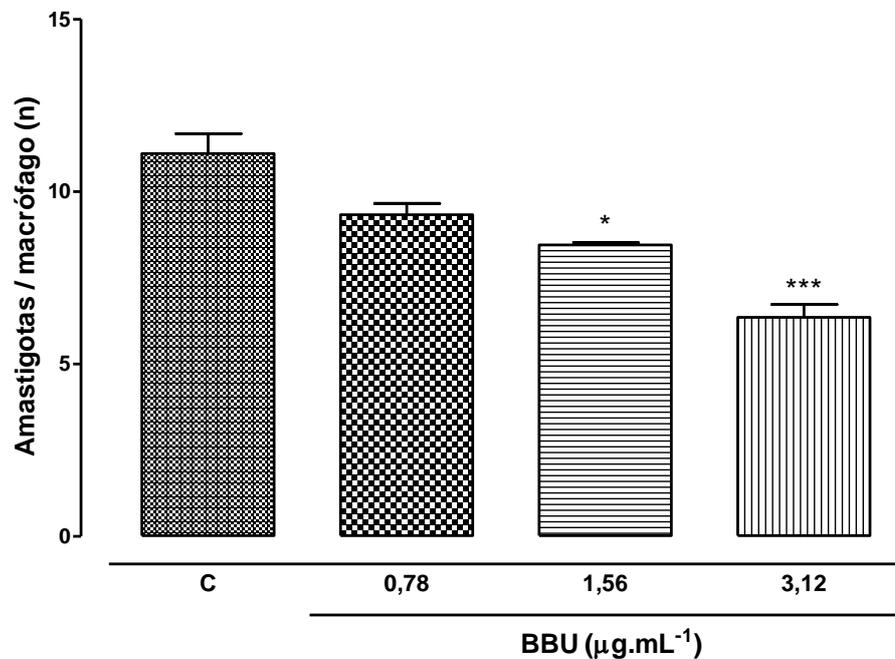


Figura 38 – Efeito do tratamento de macrófagos infectados com BBU (A) Percentual de infecção de macrófagos e (B) número médio de amastigotas por macrófago infectado. Valores expressos como média  $\pm$  e.p.m. ANOVA de uma via, seguido de Bonferroni; \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  vs. controle.

A



B



A partir destes resultados, pôde-se calcular a concentração inibitória média ( $CI_{50}$ ) das manteigas de bacuri BBU e BBI. Utilizando-se destes valores juntamente com os valores de  $CC_{50}$ ,

calculou-se o índice de seletividade para avaliar o nível de segurança dos mesmos frente a células mamíferas. Esse índice representa a relação entre  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$  (Tabela 08).

Tabela 08 - Relação entre a toxicidade das manteigas de bacuri para os macrófagos murinos ( $CC_{50}$ ) e a toxicidade para o parasito ( $CI_{50}$ ) - índice de seletividade.

Manteiga de bacuri	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Índice de Seletividade
BBI	73,26 (60,53 – 88,66)	3,95 (2,77 – 5,62)	18,55
BBU	90,03 (70,72 – 114,6)	4,18 (2,98 – 5,88)	21,54

As manteigas de bacuri apresentaram valores de  $CC_{50}$  aceitáveis, acima dos valores de  $CI_{50}$ . A avaliação da atividade antileishmania pode ser feita através da determinação do índice de seletividade, utilizando-se a razão entre  $CC_{50}$  e  $CI_{50}$ . Quanto maior o valor encontrado, maior a segurança do extrato. A literatura recomenda que para formas amastigotas internalizadas em macrófagos este índice deve apresentar-se próximo e/ou superior a 20 (vinte) (OSÓRIO et al., 2007; NWAKA; HUDSON, 2006). Dessa forma, os resultados mostram que as manteigas de bacuri são seguras para macrófagos, apresentando bons índices de seletividade para as formas amastigotas, demonstrando considerável atividade leishmanicida.

#### 4.3.3 – Avaliação da atividade anti-inflamatória usando as manteigas BBI e BBU e as formulações FBBI e FBBU

A avaliação da atividade anti-inflamatória das manteigas de bacuri demonstrou que o pré-tratamento tópico com a formulação BBI 5,0% creme inibiu o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragenina a partir da 1.<sup>a</sup> hora, mantendo a resposta constante até o final da 6.<sup>a</sup> hora, em comparação com o grupo tratado apenas com o creme base. Ainda nesse modelo, o acetato de dexametasona 0,1% creme, um medicamento conhecido por sua atividade anti-inflamatória tópica, também reduziu significativamente o volume do edema em todos os tempos estudados, sem diferença estatística em relação ao grupo tratado com BBI 5,0% creme.

A carragenina, um polissacarídeo sulfatado, é um agente flogístico que desencadeia uma inflamação aguda associada à hiperalgesia que se caracteriza por edema, exacerbada sensibilidade a

estímulos térmicos e mecânicos em função de uma ação sequencial de vários mediadores (histamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), cininas, prostaglandinas), incluindo o sistema de complemento (FERREIRA et al., 2004). O edema induzido por carragenina é comumente utilizado como modelo de inflamação aguda (GUPTA et al., 2003), que provoca um edema em três fases (DI ROSA et al., 1971), rico em proteínas e neutrófilos (GUPTA et al., 2003; ZHANG et al., 2007). A primeira hora é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, mediada pela histamina e serotonina. Na segunda hora, este aumento é mediado por cininas. O pico máximo do edema ocorre na terceira hora após a injeção de carragenina, que é caracterizado pela ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade vascular (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971).

O tratamento oral com BBU apresentou uma leve redução do edema de pata apenas nas duas primeiras horas para as doses de 50, 100 ou 200 mg/kg, e não para a dose de 400 mg/kg. Estes resultados estão em conformidade com o fato de que a formulação BBU 5,0% creme não foi capaz de reduzir o edema nas 6 h avaliadas. Os resultados observados para BBU podem indicar sua provável ação apenas sobre mediadores rápidos da resposta inflamatória, como histamina e serotonina, sem atuar sobre a síntese e liberação de prostaglandinas. Desse modo, os resultados comprovam que BBI apresenta um potente efeito anti-inflamatório tópico, com resposta similar à dexametasona. Os resultados estão de acordo com a resposta observada no pré-tratamento oral com BBI sobre o edema de pata a partir da quarta hora, sugerindo que seus efeitos provavelmente estão relacionados com a inibição da síntese de prostaglandinas (Tabelas 9 e 10)

Tabela 09: Efeito da Manteiga de Bacuri UFPI (BBU) sobre o edema de pata induzido por carragenina 0,1% em ratos.

Tratamento (mg/kg)	Volume do edema (mm) após a injeção de carragenina					
	1h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Veículo	2,89 ± 0,25	5,16 ± 0,18	5,16 ± 0,07	5,28 ± 0,17	4,74 ± 0,11	4,71 ± 0,21
BBU 50	<b>1,56 ± 0,15***</b>	<b>3,85 ± 0,07 **</b>	5,28 ± 0,33	5,15 ± 0,13	4,69 ± 0,12	4,72 ± 0,11
BBU 100	<b>1,86 ± 0,23 *</b>	<b>3,92 ± 0,31 *</b>	5,34 ± 0,20	5,43 ± 0,25	5,11 ± 0,28	4,98 ± 0,30
BBU 200	<b>1,88 ± 0,17 *</b>	<b>4,13 ± 0,33 *</b>	5,22 ± 0,30	4,95 ± 0,27	4,59 ± 0,25	4,09 ± 0,31
BBU 400	3,32 ± 0,31	4,97 ± 0,32	4,81 ± 0,79	4,98 ± 0,46	4,36 ± 0,44	4,41 ± 0,33
Indometacina	<b>0,91 ± 0,06***</b>	<b>1,42 ± 0,22***</b>	<b>1,46 ± 0,17***</b>	<b>2,25 ± 0,20***</b>	<b>2,40 ± 0,20***</b>	<b>2,30 ± 0,35***</b>

Os dados foram expressos como média ± e.p.m (n = 6). Os valores assinalados em negrito representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ) quando comparados com o controle. ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

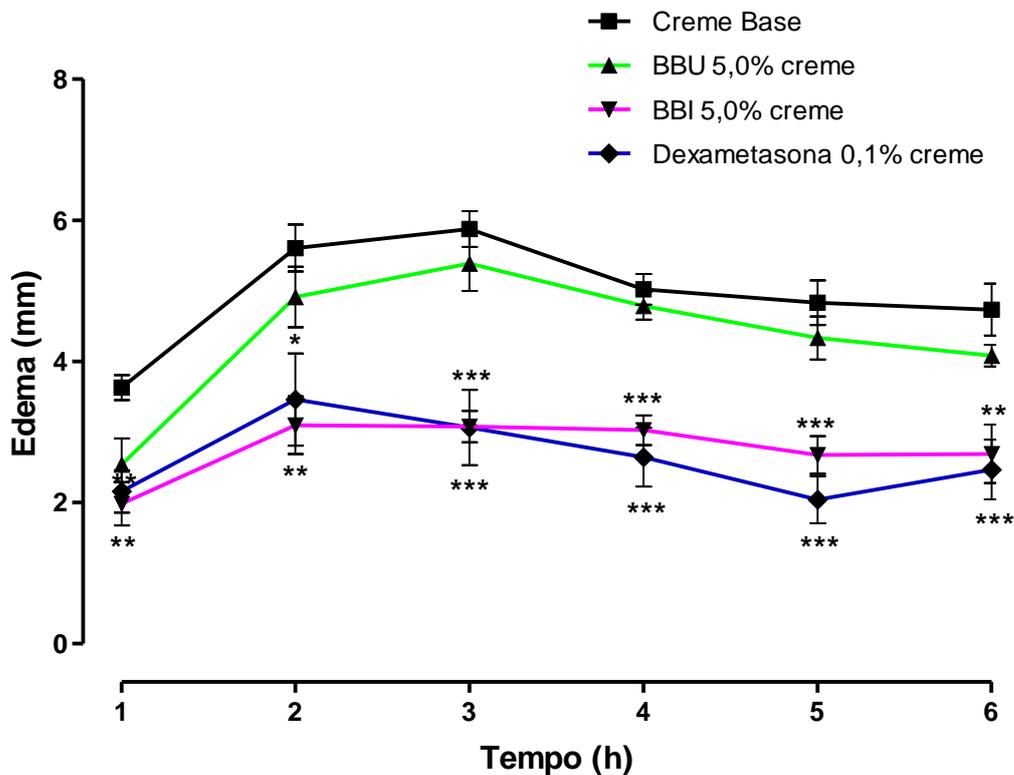
Tabela 10: Efeito da Manteiga de Bacuri Industrializada (BBI) sobre o edema de pata induzido por carragenina 0,1% em ratos.

Tratamento (mg/kg)	Volume do edema (mm) após a injeção de carragenina					
	1h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h
Veículo	2,89 ± 0,25	5,16 ± 0,18	5,16 ± 0,07	5,28 ± 0,17	4,74 ± 0,11	4,71 ± 0,21
BBI 50	2,29 ± 0,29	4,10 ± 0,45	4,41 ± 0,27	<b>4,15 ± 0,29 *</b>	4,45 ± 0,27	3,86 ± 0,34
BBI 100	3,09 ± 0,30	4,79 ± 0,31	4,46 ± 0,28	<b>3,99 ± 0,27 *</b>	4,57 ± 0,18	3,94 ± 0,17
BBI 200	2,57 ± 0,14	4,42 ± 0,19	4,61 ± 0,21	<b>4,08 ± 0,34 *</b>	4,48 ± 0,16	3,96 ± 0,23
BBI 400	2,69 ± 0,13	4,45 ± 0,17	4,76 ± 0,11	<b>4,08 ± 0,22 *</b>	<b>3,78 ± 0,27 *</b>	4,14 ± 0,16
Indometacina	<b>0,91 ± 0,06***</b>	<b>1,42 ± 0,22***</b>	<b>1,46 ± 0,17***</b>	<b>2,25 ± 0,20***</b>	<b>2,40 ± 0,20***</b>	<b>2,30 ± 0,35***</b>

Os dados foram expressos como média ± e.p.m (n = 6). Os valores assinalados em negrito representam diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$ ) quando comparados com o controle. ANOVA One-way seguido do teste de Tukey.

O pré-tratamento tópico com a formulação à base de BBI 5,0% inibiu a formação do edema de modo estatisticamente semelhante ao pré-tratamento tópico com acetato de dexametasona 0,1% (Figura 39). Em contraste, o pré-tratamento tópico com a formulação a base de BBU 5,0% não foi capaz de reduzir a formação do edema.

Figura 39: Efeito de duas formulações tópicas à base de BBU 5,0% e BBI 5,0% sobre o edema de pata induzido por carragenina (0,1 mL/pata, i.pl.) em ratos. Os dados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m.  $p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$ ;  $p < 0,001^{***}$  quando comparados com o controle. ANOVA one-way seguido do teste de Tukey.



O pré-tratamento com BBU (50, 100 ou 200 mg/kg) por via oral atenuou a formação do edema apenas nas duas primeiras horas (Tabela 09), enquanto o pré-tratamento com BBI (100, 200 ou 400 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente a formação do edema de pata induzido por carragenina a partir da 4.<sup>a</sup> hora, com efeito na 5.<sup>a</sup> hora apenas para a dose de 400 mg/kg (Tabela 10).

As diferenças de atividade entre BBI e BBU devem está relacionadas com o maior teor de substâncias de natureza terpênicas em BBI particularmente com o ácido E-labda-8(20)-13-dien-15,19-dioico, um diterpeno com esqueleto labdano de atividade anti-inflamatória comprovada na literatura (MELO, 2001) e também com os triacilgliceróis ( tripalmitina) no caso do uso tópico, que foram retirados em BBU por refrigeração.

## ***CONSIDERAÇÕES FINAIS***

---

## 5 – Considerações Finais

A análise das manteigas de bacuri por cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR-EM) identificou que as manteigas BBI e BBU possuem em comum 23 substâncias e que a BBI possui maior número de constituintes químicos a mais que a BBU;

O método de doseamento do GFC nas manteigas é eficiente e determinou que a BBU tem uma concentração maior que a BBI;

As formulações contendo BBI e BBU não apresentaram alterações após os testes de estabilidade acelerada até o T60, indicando que são formulações estáveis.

As manteigas BBI e BBU mostraram baixa citotoxicidade em MTT e não apresentaram toxicidade aguda em ratos;

A avaliação da atividade leishmanicida *in vivo* das formulações FBBI e FBBU possuem resultado significativo no tratamento de úlceras se comparados ao placebo;

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* das manteigas BBU e BBI, segundo dois protocolos: determinação da capacidade fagocítica e determinação do volume lisossomal induzem a ativação de macrófagos;

A atividade anti-inflamatória da BBU por via oral mostrou-se ineficaz no modelo de pata induzido por carragenina; enquanto a BBI mostrou-se eficiente. Na BBI há um maior teor de substâncias terpênicas destacando o diterpeno de esqueleto labdano, cuja atividade para este tipo de composto já é relatada na literatura.

A atividade anti-inflamatória da formulação contendo BBU por via tópica mostrou-se ineficaz no modelo de pata induzido por carragenina; enquanto a formulação com BBI mostrou uma atividade superior ao medicamento de referência usado que é a dexametasona o que pode estar relacionado ao teor de tripalmitina.

## ***REFERÊNCIAS***

---

## 6 – REFERÊNCIAS

ADDOR, F. A. S'A.; AOKI, V. Barreira cutânea na dermatite atópica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 02, p. 184-194, 2010.

AKENDENGUE, B, NGOU-MILAMA E, LAURENS A, HOCQUEMILLER R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**. 1999. 6: 3-8.

ALLABI, A.C., BUSIA, K., EKANMIAN, V., BAKIONO, F. The use of medicinal plants in self-care in the Agonlin region of Benin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 234-243, 2011.

ALLEN JR., LOYD, V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármaco/** LOYD, V.; ALLEN JR.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C.; tradução Elenara Lemos Senna, 8 ed., Porto Alegre, 2007.

ALMAGRO, D. G. Leishmaniasis cutânea. **Actas Dermosifiliogr** 2005;96(1):1-24

ALVES, A. B.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C. Constituintes químicos de *Burlemarxia rodriguesii* Menezes & Semir (Velloziaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., 78-79 p., 2002.

ANSEL, H.; POPOVICH, N. G.; ALLEN, L. V. JR. Farmacotécnica. São Paulo. Editora Premier, 2007. 398-403 p

ANTONIO, M.E.C.O. Permeação Cutânea *in vitro* como ferramenta auxiliar para o estudo de formulações semi-sólidas de cetoconazol para aplicações tópicas. Paraná:UFPR, 2007. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas –PPGCF, UFPR, Paraná. 2007.

ARAICO, A.; TERCENIO, M. C.; ALCARAZ, M. J.; DOMÍNGUEZ, J. N.; LEÓN, C.; FERRÁNDIZ, M. L. Evaluation of the anti-inflammatory and analgesic activity of Me-UCH9, a dual cyclooxygenase-2/5-lipoxygenase inhibitor. **Life Sciences**, v. 80, p. 2108–2117, 2007.

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BAKER, J. T.; BORRIS, R. P.; CARTÉ, B.; CORDELL, G. A.; SOEJARTO, D. D.; CRAGG, G. M.; GUPTA, M. P.; IWU, M. M.; MADULID, D. R; TYLER, V. E. Natural products drug discovery and development: new perspectives on international collaboration. **Journal of Natural Products**, v. 58, n. 9, p. 1325– 1357, 1995.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life sciences**, v. 78, p. 431-441, 2005.

- BARBOSA-FILHO, J. M.; PIUVEZAM, M. R.; MOURA, M. D.; SILVA, M. S.; LIMA, K. V. B.; CUNHA, E. V. L.; FECHINE, I. M.; TAKEMURA, O. S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n. 1, p.109-139, 2006.
- BARTON, G. M. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 2, p. 413-420, 2008.
- BARR, M. Percutaneous absorption. **J Pharm Sci**. 1962;61:395Y409.
- BARRY, B.W. Penetration enhancers - Skin Pharmacokinetics. **Basel: Karger**, 1987.
- BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Adv. Drug Delivery Rev.**, Amsterdam, v. 56, n.5, p.603-618, 2004.
- BARROSO, G.M., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F., COSTA, C.G., GUIMARÃES, E.F., LIMA, H.C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil Minas Gerais**: Viçosa, 2002. 309p.
- BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle Rev. Bras. Epidemiol.Vol. 7, Nº 3, 2004. P.328-337.
- BEMVINDO, C. S. Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro,Rio de Janeiro, 2006.
- BENT, S. Herbal Medicine in the United States: review of efficacy, safety and regulation. **Journal of General Internal Medicine**. v, 23, n. 6, p. 854-859, 2008.
- BENTES, M. H.; SERRUYA, H.; ROCHA FILHO, G. N.; GODOY, R. L. O.; CABRAL, J. A. S.; MAIA, J. G. Estudo químico das sementes de bacuri. **Acta amazônica**, n. 16-17, 363-368 p., 1986/1987.
- BENTLEY, M. V. L. B.; MARCHETTI, J. M.. Influence of lecithin on some physical chemical properties of polaxamer gels: rheological, microscopic and in vitro permeation studes. **International Journal of Pharmaceutics** .v.193, p. 49-55, 1999.
- BEZERRA, J.L.; COSTA, G.G.; LOPES, T.C.; REBELO, J.M.; CARVALHO, I.C.D.S.; SOUSA, S.M.; AMARAL, R.N.M.; RIBEIRO,M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. *Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais*.**Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(Supl.): 631-637, Dez. 2006
- BOMMANNAN, D.; POTTS, R.O.; GUY, R.H. Examination of stratum corneum barrier funcion in vivo by infrared spectroscopy. **The Journal for Investigative Dermatology**, v.95, n. 4, p. 403-408, 1990.
- BONATTO S. J. R. Efeito da suplementação com óleo de peixe, durante oito semanas, sobre o sistema imunitário inato de pacientes, pós-remoção tumoral e efeito *in vitro* do óleo de

peixe sobre as células tumorais. 2008. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) **Universidade Federal do Paraná**, Curitiba, 2008.

BORGHETTI GS, KNORST MT. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade física de loções O/A contendo filtro solares. **Rev Bras Ciênc Farm.** v.42, n.4, p.531-7. 2006.

BOULANGER, R.; CHASSAGNE, D.; CROUZET, J. Free and bound flavour components of Amazonian fruits. 1: Bacuri. **Flavor and fragrance Journal**, v. 14, 303-311 p., 1999.

BRANCO, A.; PIZZOLATTI, M. G. CGAR e CGAR-EM na análise dos constituintes químicos do extrato hexânico de *Sebastiania argutidens* (EURPHOBIACEAE). **Química Nova**, v. 25, n .1, 15-19 p., 2002.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, 25-30 p., 1995.

BRASIL. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.

BRASIL. **Formulário Nacional** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. -- ANVISA -- Brasília: ANVISA, 2005.

BRASIL. **Resolução nº 01, de 29 de julho de 2005**. Guia para a realização de estudos de estabilidade. [Internet]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF, Diário Oficial da União, 01 ago. 2005. [citado 2009 jun 25] Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=18109&word>.

BRASIL. **Informe Técnico nº 01, de 15 de julho de 2008** - Esclarecimento sobre o item 2.9 do anexo da Resolução RE nº1 de 29/07/2005, que trata do Guia para realização dos estudos de estabilidade Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Poder Executivo, Brasília, DF. Diário Oficial da União, 15 jul. 2008. [citado jun 2009. Disponível em: <http://www.sindusfarma.org.br/informativos/BBPAF03808.doc>.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília (DF), 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral**. Brasília (DF), 2006.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J.; TRANCHANT, J-F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **Journal of Controlled Release**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BUGNOTTO, C. SOARES, G.LAPORTA, L.V.; ALVES, M.P.; SCHMIDT, C.A.; LIMBERGER, J.B. *Estudo de Estabilidade de Formulações Tópico contendo Própolis*. **Disc. Scientia**. Série: Ciências da Saúde, Santa Maria, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2006.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141– 2153, 2004.

CALVO, M.I. Anti-inflammatory and analgesic activity of the topical preparation of *Verbena officinalis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3., p. 380-382, 2006.

CARVALHO, A. L. M. **Cinética de difusão in vitro e atividade in vivo de preparações magistrais contendo cetoprofeno**. 115f. Dissertação de Mestrado. Departamento de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco – Recife, 2007.

CARVALHO, F.A.A. **Tratamento tópico da Leishmaniose cutânea experimental- Avaliação de diferentes formulações contendo sulfato de paramomicina e da associação com imunoterapia**. Belo Horizonte: UFMG, 2001. 110p. Tese de (Dotourado) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2001.

CARVALHO, F. C. ; BARBI, M. S. ; SARMENTO, V. H. V. ; CHIAVACCI, L. A. ; NETTO, F. M. ; GREMIAO, M. P. D. . Surfactant systems for nasal zidovudine delivery: structural, rheological and mucoadhesive properties. **J. Pharmacy and Pharmacol.**, v. 62, p. 430-439, 2010.

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: **Tecmedd**, 2004.

CECHINEL FILHO, V., YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, p. 99, 1998.

CHEN, X.Q., LI, Y., CHENG, X., WANG, K., HE, J., PAN, Z.H., LI, M.M., PENG, L.Y., XU, G., ZHAO, Q.S. Polycyclic polyprenylated acylphloroglucinols and chromone O-glucosides from *Hypericum henryi* subsp. *uraloides*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 196-204, 2010.

CHORILLI, M.; BRIZANTE, A. C.; RODRIGUES, C. A.; SALGADO, H. R. N. Aspectos gerais em sistemas transdérmicos de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, p. 7-13, 2007.

Ciclo biológico de *Leishmania* nos hospedeiros vertebrado e invertebrado.  
Adaptado de [HTTP://www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx).

CLARK, R. A. F.; GHOSH, K.; TONNESEN, M. G. Tissue engineering for cutaneous wounds. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 127, p. 1018-1029, 2007.

CORRÊA, A.D., BATISTA, R.S., QUINTAS, L.E. **Plantas Medicinais: Do cultivo à terapêutica-Contém formulação e modo de preparo de cosméticos**. Petrópolis: Vozes. 6. Petrópolis-RJ, 2003. 103p.

CORRÊA, M.P. **Dicionário de Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro. Ed. IBDF, 1984.

- COSTA JUNIOR, J.S. **Análise Fitoquímica e Toxicológica das Sementes de *Platonia insignis* Mart (Bacuri)**. Canoas: ULBRA, 2011.217p. Tese (Dotourado) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Canoas, 2011a.
- COSTA JÚNIOR, 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 antioxidant effects in vitro of Garcinielliptona FC (GFC) isolated from *Platonia insignis* Mart. **Journal of Medicinal Plants Research.**, v. 5, n. 2, 293-299 p., 2011b.
- DANTAS, V. S.; DANTAS, I. C.; CHAVES, T. P.; FELISMINO, D. C.; SILVA, H.; DANTAS, G. D. S.; Análise das garrafadas indicadas pelos raizeiros na cidade de Campina Grande-PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, v. 03, n. 1, ISSN 1983-4209, 2008.
- DARLENSKI, R.; SASSNING, S.; TSANKOV, N.; FLUHR, J. W. Non-invasive *in vivo* methods for investigation of the skin barrier physical properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, p. 295-303, 2009.
- DE VOS, P. European materia medica in historical texts: Longevity of a tradition and implications for future use. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, p. 28-47, 2010.
- DESJEUX, P.; ALVAR, J. Leishmania/HIV co-infection: epidemiology in Europe. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 4–15, 2003.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-28, 1971.
- DUNAISKI, M. **Epidemiologia da Leishmaniose Tegumentar Americana na região do vale do ribeira – paraná: Cães reservatórios ou hospedeiros acidentais?**. Dissertação de mestrado, universidade federal do paraná. Curitiba, 2009.
- ELIAS, P.M. Epidermal lipids, barrier function and desquamation. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, p. 44s-49s, 1983.
- ELIAS, P. M.; WILLIAMS, M. L.; MALONEY, M. E.; BONIFAS, J. A.; BROWN, B; E.; GRAYSON, S.; ESPSTEIN, E. H. Stratum corneum lipids in disorders of cornification: steroid sulfatase and cholesterol sulfate in normal desquamation and the pathogenesis of recessive x-linked ichthyosis. **Journal of Clinical Investigation**, São Francisco, v. 74, p. 1414-1421, 1984.
- FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1996. pt.2, p.16.1
- FARNSWORTH, N. R.; AKERELE, O.; BINGEL, A. S.; SOEJARTO, D.D; GUO, Z. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965-981, 1985.
- FEGHALI, C. A.; WRIGHT, T. M. Cytokines in acute and chronic inflammation. **Frontiers in Bioscience**, v. 2, p. 12-26, 1997.

FERREIRA, A. O. **Guia prático da farmácia magistral**. 2 ed. Juiz de Fora, 2000.

FERREIRA, A. O. **Guia pratico de Farmácia Magistral**. 3 ed. Vol. I. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

FERREIRA, M.S.G. **Manejo da espécie *Platonia insignis* Mart – Bacurizeiro, em florestas secundárias da Amazônia Oriental: proposta para uma produção sustentável**. Tese de Doutorado, Centro de Desenvolvimento Sustentável, Universidade de Brasília, Brasília, DF. Brasília, 2008. 246p. : il.

FERREIRA, I. C. P.; LONARDONI, M. V. C.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L.L.; FILHO, L. G.; PINTO, L. H. B.; OLIVEIRA, A. J. Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biomechanical Pharmacology**, v. 62, p. 1433, 2001.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. **Acta Dermatologica Venereologica**, v. 74, p. 1-6, 1994.

FRIEDRICH, M.; PRIMO, F. P.; FUNCK, J.A.B.; LAPORTA, L.V.; ALVES, M.P.; BITTENCOURT, C.F.; ESCARRONE, A.L.V. Avaliação da Estabilidade Físico-Química de Creme Não Iônico Inscrito no Formulário Nacional. **Latin American Journal of Pharmacy**, 26 (4): 558-62 (2007).

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE- FUNASA. Guia de vigilância epidemiológica. 5ª ed. Brasília: Funasa; 2001.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE- FUNASA. Manual de controle da leishmaniose tegumentar americana. 5. ed. Brasília: Ministério da Saúde/Coordenação de Vigilância Epidemiológica. Centro Nacional de Epidemiologia; 2000. [62 p.]. Disponível em: [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu\\_leishman.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/manu_leishman.pdf)

GEERLINGS, M.; PETERS, G. W. M.; ACKERMANS, P. A. J.; OOMENS, C. W. J.; BAAIJENS, F. P. T. Linear viscoelastic behavior of subcutaneous adipose tissue. **Biorheology**, v. 45, p. 677-688, 2008.

GEYSEN, H. M.; SCHOENEN, F.; WAGNER, D.; WAGNER, R. Combinatorial compound libraries for drug discovery: an ongoing challenge. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 3, p. 222– 230, 2003.

GHAZANFARI, T.; HASSAN, Z. M.; KHAMESIPOUR, A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium Sativum*) treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, p.333–337, 2006.

GONÇALVES, G. M. S.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Aplicação de métodos de biofísica no estudo de eficácia de produtos dermocosméticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 1, 2009

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

GRIMALDI, G.; TEST, R.B. Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**, julho 1993, p. 230-250

GUPTA, M.; MAZUMDAR, U. K.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M.; KARKI, S. S.; SAMBATHKUMAR, R.; MANIKANDAN, L. Evaluation of Anti-inflammatory Activity of Chloroform Extract of *Bryonia laciniosa* in Experimental Animal Models. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 9, p. 1342-1344, 2003.

HADGRAFT J. Passive enhancement strategies in topical and transdermal drug delivery. **Int J Pharm.** 1999;184:1Y6.

HUANG, X.; TANOJO, H.; LENN, J.; DENG, C. H.; KROCHMAL, L. A novel foam vehicle for delivery of topical corticosteroids. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 1; p. s26-s38,2005.

IELPO, M.T.; BASILE, A.; MIRANDA, R.; MOSCATIELLO, V.; NAPPO, C.; SORBO, S.; LAGHI, E.; RICCIARDI, M. M. Immunopharmacological properties of flavonoids. **Fitoterapia**, v. 71, p. 101-109, 2000.

ISAAC, V.L.B.; CEFALI L.C.; CHIARI, B.G.; OLIVEIRA, C.C.L.G.; SALGADO H.R.N.;vCORRÊA, M.A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n.1, p. 81-96, 2008.

JUNIOR, A. G; FERREIRA, I.C.P.; NAKAMURA, C.B; FILHO, B.P.D; JACOMASSI, E.; YOUNG, M.C.M.; CORTEZ, D.A.G. Estudo morfo-anatômico das folhas e caule da *Calophyllum brasiliense* (Clusiaceae), uma contribuição ao estudo farmacognóstico da droga vegetal. **Acta Farm. Bonaerense** 24 (3): 371-6 (2005)

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging skin: histology, physiology, and pathology. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, v. 19, p. 229-234, 2011.

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

LARSEN, G. L.; HOLT, P. G. The concept of airway inflammation. **American Journal. Respiratory and Critical Care Medicine**, v.162, 2000, p. S2-S6.

LEONARDI, G. R. **Cosmetologia aplicada**. São Paulo: Medfarma Livraria e Editora, 2004.

LEONARDI, G. R.; GASPAR, L. R.; CAMPOS, P. M. B. G. M. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou ceramida, por metodologia não invasiva. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, n. 5, 2002.

LEONTI, M.; CABRAS, S.; WECKERLEC, C.S.; SOLINAS, M.N; CASU, L. The causal dependence of present plant knowledge on herbals—Contemporary medicinal plant use in Campania (Italy) compared to Matthioli (1568). **Journal of Ethnopharmacology**.v.130 p.379-391,2011.

LEY, S. V.; BAXENDALE, I. R. New tools and concepts for modern organic synthesis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 8, p. 573– 586, 2002.

LIEBERMAN, P. Histamine, antihistamines, and the central nervous system. **Allergy Asthma Proceedings**. v.30, n.5, p. 482-6, 2009.

LOGARAJ, T. V; BHATTACHARYA S; UDAYA SANKAR K.; VENKATESWARAN, G. Rheological behaviour of emulsions of avocado and watermelon oils during storage. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 937-943, 2008.

LOFTSSON, T.; OLAFSSON, J. H. Cyclodextrins: new drug delivery systems in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v. 37, p. 241-246, 1998.

LOMBARDINO, J. G.; LOWE III, J. A. The role of the medicinal chemist in drug discovery—then and now. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 10, p. 853–862, 2004.

LOOSDRECHT, V.; NENNIE, E.; OSSENKOPPELE, G. J.; BEELEN, R. H. J.; LANGENHUIJSEN, M. M. A. C. Cell mediated cytotoxicity against V937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. **The Journal of Immunological Methods.**, v. 141, p. 15-22, 1991.

LOVKOVA, M. Y.; BUZUK, G. N.; SOKOLOVA, S. M.; KLIMENT'EVA, N. I. Chemical features of medicinal plants (review). **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 37, n. 3, p. 229-237, 2001.

MACIEL, M.A.M., PINTO, A.C., VEIGA JR, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, p. 429-438, 2002

MANDELL, G.L.; BENNETT, J. E.; DOLIN M.; BENNETTS, M.P.. Principles and Practice of Infectious Diseases, 6 ed. Philadelphia : **Elsevier Churchill Livingstone**, 2005: 2428-42.

MARINHO, L. **A importância da Pele.** Disponível em:<  
<http://irmasgg.blogspot.com/2010/08/importancia-da-pele.html>>. Acesso em: 30 mar. 2011.

MARINHO, L. **A importância da Pele.** Disponível em:<  
<http://www.google.com.br/imgres?imgurl=http://projetoferidas.zip.net/images/epiderm1.jpg&imgrefurl=http:>> Acesso em: 28 mar. 2011

- MARTINS, E.R., CASTRO, D.M., CASTELLANI, D.C., DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. 5 REIMPRESSÃO. Viçosa, MG, 2003.
- MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, p. 33-53, 2002.
- MATSUDA, H.; ARIMA, H. Cyclodextrins in transdermal and rectal delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 36, p. 81-99, 1999.
- MELO, A. C.; COTA, B.B.; OLIVEIRA, A.B.; BRAGA, F. C. HPLC quantification of kaurene diterpenes in *Xylopi* species. **Fitoterapia**, 72 ; p.40-45, 2001
- MELO NETO, B. **Efeito do extrato e frações de *Zanthoxylum rhoifolium* lam. e da resina de *Protium heptaphilum* March. sobre a infecção de macrófagos por *Leishmania amazonensis***.Piauí: UFPI, 2011.n 73f. Dissertação, Mestrado em Farmacologia. Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2011.
- MIGUEL, M.D. e MIGUEL, O.G., **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. 1ª Ed. Robe editorial, 2000.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Disponível em:  
<[http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa\\_Nacional\\_de\\_Plantas\\_Medicinais\\_e\\_Fitoterápicos..pdf](http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoterápicos..pdf)>. Acesso em 03 fev. 2012.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Disponível em:  
<[http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa\\_Nacional\\_de\\_Plantas\\_Medicinais\\_e\\_Fitoterápicos..pdf](http://portal.mda.gov.br/portal/saf/arquivos/view/Programa_Nacional_de_Plantas_Medicinais_e_Fitoterápicos..pdf)>. Acesso em 03 fev. 2012.
- MONTEIRO, A. R.; MEIRELES, M. A. A.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J. Extraction of the soluble material from shells of the bacuri fruit (*Platonia insignis* Mart) with pressurized CO<sub>2</sub> and other solvents. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 11, 91-102 p., 1997.
- MONZOTE, L.; GARCÍA, M.; MONTALVO, A. M.; SCULL, R.; MIRANDA, M. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p. 168-173, 2010.
- MORAES, R.L.B.; GUTJAHN, E. **Química de Oleogenos - Valorização da Biodiversidade Amazônica**. Agência de Cooperação Técnica Alemã, 2009.
- MORAES, S. L.; REZENDE, M. O. O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Quím. Nova**. Brasil, vol. 27, n. 5, p. 701-705, 2004.
- MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Passive skin penetration enhancement and its quantification *in vitro*. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-112, 2001.

MOSTEFA, N. M.; SADOK, A. H.; SABRI, N.; HADJI, A. Determination of optimal cream formulation from long-term stability investigation using a surface response modeling. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 28, n. 3, p. 211-218, 2006.

MOURA, M.C.C.L., HOMMA, A.K.O., MENEZES, A.J.E.A., CARVALHO, A.C.P.P., FERREIRA, A., BENBADIS, A.K., MULLER, C.H., FERREIRA, C.A.P., CRUZ, C.D., ARAÚJO, E.C.E., MATOS, G.B., ALMEIDA, H.J., CARVALHO, J.E.U., COSTA, J.T.A., ARAÚJO, J.R.G., MASCARENHAS, K.M., VASCONCELOS, L.F.L., ALOUFA, M.A.I., MARTINS, M.R., INNVECCO, R., SOUZA, V.A.B. *Bacuri: Agrobiodiversidade*. 1. São Luis, 2007. 210p.

MURDAN, S. A review of pluronic lecithin organogel as a topical and transdermal drug delivery system. **Hospital Pharmacist**, London, v.12, p.267-270, 2005.

NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.

NETO, F. X. Otorhinolaryngologic Manifestations Relating American Tegumentary Leishmaniasis: Literature Review. **Intl. Arch. Otorhinolaryngol.**, São Paulo, v.12, n.4, p. 531-537, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215– 234, 2000.

NGURE, P. K.; KIMUTAI, A.; NG'ANG'A, Z. W.; RUKUNGA, G.; TONUI, W. K. A review of Leishmaniasis in Eastern Africa. **Journal of Nanjing Medical University**, 2009-23(2):79-86.

NOGUEIRA, I. A. L.; LEÃO, A. B. B.; VIEIRA, M. S.; BENFICA, P. L.; BOZINIS, M. C. V. Efeito Citotóxico do *Synadenium umbellatum*. **Revista eletrônica de Farmácia**, v. 2, p. 50-53, 2007.

NWAKA, S; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v. 5, p. 941-955. 2006.

OLIVEIRA, D. A. G. C.; DUTRA, E. A.; SANTORO, M. I. R. M.; HACKMANN, E. R. M. K. Protetores Solares, Radiações e Pele. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, v.16, p.68-72, 2004.

OLIVEIRA, D. M. Avaliação de Modelos de Infecção Visceral Causada por *Leishmania (Leishmania) Chagasi* em Camundongos Balb/C: detecção do Parasita no Parênquima Cerebral dos Animais. Dissertação de Mestrado. **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, 2010.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630–635, 2007.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxigenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v. 28, p. 2375-2382, 2001.

- PATITUCCI, M. L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; ZOGHBI, M. G. SILVA, J. R. A. Utilização de cromatografia gasosa de alta resolução na detecção de classe de terpenos em extratos brutos vegetais. **Química Nova**, v. 18, n .3, 262-266 p., 1995.
- PAUL, W. F. *Fundamental Immunology*. 4. ed. New York: **Lippencott-Raven Publishers**, 1998.
- PEYREFITTE, G.; MARTINI, M-C.; CHIVOT, M. **Cosmetologia Biologia Geral Biologia da pele**. São Paulo: Andrei, 1998.
- PICCINELLI, A.L., CAMPONE, L., DAL PIAZ, F., CUESTA-RUBIO, O., RASTRELLI, L. Fragmentation pathways of polycyclic polyisoprenylated benzophenones and degradation profile of nemorosone by multiple-stage tandem mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, p. 1688-1698, 2009.
- PISCOPO, T.V.; MALLIA, A.C.;. *Leishmaniasis*. **Postgrad Med J**. 2006;82(972):649-57.
- POTTS, R.O.; FRANCOEUR, M.L. The influence of stratum corneum morphology on water permeability. **The Journal for Investigative Dermatology**, v. 96, n. 4, p. 495-499, 1991.
- PRISTA, L. N.; BAHIA, M. F. G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. Vol. I. Associação Nacional das Farmácias, 1992.
- PRISTA, L. N.; BAHIA, M. F. G.; VILAR, E. **Dermofarmácia e Cosmética**. Vol. II. Associação Nacional das Farmácias, 1995.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Exp Dermatol.**, v. 17(12), p.1063-72, 2008
- QUEIROZ, N.; NASCIMENTO, M. G. Organo-gel de heptano: diagram de fases e aplicações sintéticas. **Química Nova**, v. 22, n. 3, 1999.
- RAWLINGS, A. V.; MATTS, P. J.; ANDERSON, C. D.; ROBERTS, M. S. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 05, n. 02, p. 127-136, 2008.
- RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE DO SUS.  
Disponível em < <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf> >. Acesso, em 03 fev. 2012.
- REITHINGER, R, Dujardin J-C, LOUZIR H, PIRMEZ C, ALEXANDER B, BROOKER S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet** 2007;7:581-596.
- ROBERTS MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br Med Bull** 2006;75 and 76:115-30.
- ROBERTS, J.C. Naturally Occurring Xanthones. **Chemical Reviews**, v. 61, p. 591-605, 1961.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L. R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S.; SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROGEZ, H.; BRUXANT, R.; MIGNOLET, E.; SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; LARONDELLE, Y. Chemical composition of the pulp of three typical Amazonian fruits: araçá-boi (*Eugenia stipitata*), bacuri (*Platonia insignis*) and cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Eur. Food Technol.**, v. 218, p.380-384 2004.

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 1895-1901, 2003.

ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v 48, p 601-606, 2003.

ROUGIER, A.; DUPUIS, D.; LOTTE, C.; ROQUET, R.; SCHAEFER, H. In vivo correlation between stratum corneum reservoir function and percutaneous absorption. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 81, n. 3, p. 275-278, 1983.

ROKAYA, M.B., MÜNZBERGOVÁ, Z., TIMSINA, B. Ethnobotanical study of medicinal plants from the Humla district of western Nepal. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 485-504, 2010.

SANTOS-JÚNIOR, R. Q.; SOARES, L. C.; MAIA-FILHO, A. L. M.; ARAÚJO, K. S.; SANTOS, I. M. S. P.; COSTA-JÚNIOR, 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.

SATO, M. E. O.; GOMARA, F.; PONTAROLO, R.; ANDREAZZA, I.F.; ZARONI, M. Permeação cutânea *in vitro* do ácido kójico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 43, n. 2, abr./jun., 2007

SCARTAZZINI R, LUISI PL. Organogels from lecithins. **J Phys Chem**. 1988;92:829Y833.

SCHEUPLEIN, R.J.; BLANK, I.H. Permeability of skin. **Physiology Reviews**, v. 51, p. 702-747, 1985.

SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Is mPEGS-1 a promising target for pain therapy? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, n.8, p. 399-401, 2006.

SCHWARTZ, C. A lecitina vegetal KM+ induz a ativação de Neutrófilos humanos com consequente aumento na capacidade fagocítica e microbicida. Dissertação de mestrado. **Pontifícia Universidade Católica do Paraná**, Curitiba, 2007.

SCHURTENBERGER P, SCARTAZZINI R, MAGID L.J., LESER M.E., LUISI PL. Structural and dynamic properties of polymer-like reverse micelles. **J Phys Chem**. 1990;94:3695Y3701).

SHAH, V. P. et al. In vivo percutaneous penetration / absorption. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 74, p. 1-8, 1991

SHANLEY, P., MEDINA, G. **Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica**. Pará: Belém, 2005. 300p

SHCHIPUNOV, Y. A. Lecithin organogel – a micellar system with unique properties. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 183-185, p. 541-554, 2001.

SIDDIG, M. A.; RADIMAN, S.; JAN, L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucohone (APG) surfactant. **Colloid Surface A: Physicochemical Eng. Aspects.**, v. 276, p. 15-21, 2006.;

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SILVA, R. A. C.; SOUSA, T. O.; CAVALCANTE, M. V. S.; CITÓ, A. M. G. L.; LIMA, S. G.; Saffi, J.; COSTA JÚNIOR, J. S. Análise por espectrometria de massas do óleo da semente da *Platonia insignis* Mart. Resumo da 32º **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza, 2009.

SILVA, K.E.R.; ALVES, L.D.S.; SOARES, M.F.R.; PASSOS, R.C.S.; FARIA, A.R.; ROLIM NETO, P.J. Modelos de Avaliação da Estabilidade de Fármacos e Medicamentos para a Indústria Farmacêutica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2009;30(2):129-135.

SINKO, P. M. J. **Físico farmaco e ciencias farmaceuticas**/Patrick J. Sinko, tradução George Gonzales Ortega et al. – 5 ed, Porto Alegre: Artmed, 2008.

SOARES- BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

SOUSA, C. M. M.; CARVALHO, A. A.; CHAVES, M. H Constituintes químicos voláteis e não voláteis de cascas do fruto do bacuri (*Platonia insignis*). **Resumo da 32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Fortaleza, 2009.

TABORIANSKI AM. **Validação de métodos para análise e estudos de estabilidade de anti-retrovirais em preparações farmacêuticas** [Dissertação] São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2003

TANG, S.Y., HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and Caenorhabditis elegans studies? **Biochemical and biophysical research communications**, v. 394, p. 1-5, 2010.

TAVARES, N.M.; SANTOS, D.M.; OLIVEIRA, C.I.; BRODSKY, C.I. Estratégias de vacinação contra Leishmaniose visceral e cutânea: Lições dos modelos experimentais **Gaz. méd. Bahia** 2009;79 (Supl.3):110-121

VEHABOVIC M, HADZOVIC S, STAMBOLIC F, HADZIC A, VRANJES E, HARACIC E. Stability of ranitidine in injectable solutions. **Int J Pharm.** 2003; 256:109–15

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VENTRE, M.; MOLLICA, F.; NETTI, P. A. The effect of composition and microstructure on the viscoelastic properties of dermis. **Journal of Biomechanics**, v. 42, p. 430-435, 2009.

VINTILOIU, A.; LEROUX, J-C. Organogels and their use in drug delivery – a review. **Journal of Controlled Release**, v. 125, p. 179-192, 2008.

ZATZ, J. L. **Skin Permeation - Fundamentals and Application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, 1993.

ZHANG, B.; LI, J. B.; ZHANG, D. M.; DING, Y.; DU, G-H. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 465-469, 2007

WEN-CHI, W.; SU, Y. H.; CHEN, S. S.; SHEU, J. H.; YANG, N. S. GM-CSF plays a key role in zymosan-stimulated human dendritic cells for activation of Th1 and Th17 cells. **Cytokine**, 2011.

WIESENAUER, M e WAGNER, H.; **Fitoterapia- Fitofármacos, Farmacologia e Aplicações Clínicas**. 2ª Ed. Pharmabooks 2006

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1960.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO report on neglected tropical diseases 2010: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Geneva, WHO, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Provisional agenda item 12.3. Sixtinth world health assembly**. Geneva: WHO, 2006.

YING, S.; DONG, S.; KAWADA, A.; KOJIMA, T.; CHAVANAS, S.; MÉCHIN, M-C.; ADOUE, V.; SERRE, G.; SIMON, M.; TAKAHARA, H. Transcriptional regulation of peptidylarginine deiminase expression in human keratinocytes, **Journal of Dermatological Sciences**, v. 53, p. 2-9, 2009.

