

***Alternanthera maritima*: PREPARO DE FORMULAÇÕES TÓPICAS PARA AVALIAÇÃO DO SEU EFEITO COMO FOTOSSENSIBILIZADOR EM PDT**

Adriana Gasparetto^{1,2}, Sônia Khouri¹, Stella Regina Zamuner¹, Marcos José Salvador^{1*}.

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos–SP, e-mail: dricagasparetto@yahoo.com.br mjsalvador1531@yahoo.com.br. ²UNOCHAPECÓ, Chapecó - SC, Brasil

Resumo - Muitas plantas, incluindo espécies da família Amaranthaceae, são utilizadas na medicina popular devido suas propriedades biológicas, tais como antiinflamatória, analgésica e antimicrobiana. Neste estudo procedeu-se o preparo de formulações semi-sólidas (creme e gel creme) contendo extratos vegetais de *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae) para avaliação do seu efeito como fotossensibilizador em PDT. O creme e o gel creme base obtidos possibilitaram a incorporação dos extratos em diferentes concentrações (5, 50 e 100 mg/mg, v/v), mostrando-se homogêneos e com pH (5,0 a 5,5) adequado para emprego na pele humana.

Palavras chaves: *Alternanthera maritima*, Amaranthaceae, formulações farmacêuticas semi-sólidas, *terapia fotodinâmica*.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia

Introdução

Vários metabólitos secundários de plantas são investigados como sendo fontes alternativas de potenciais agentes antibacterianos eficazes contra microrganismos patogênicos ao ser humano. Dentre estes se destacam os flavonóides, que provavelmente apresentam atividade antimicrobiana devido à capacidade de complexar proteínas extracelulares solúveis da parede bacteriana, as quinonas e os taninos devido, provavelmente, a presença de radicais livres, que agem sobre as adesinas, polipeptídeos e enzimas presentes na célula bacteriana (COWAN, 1999; PEREIRA, 2004; SALVADOR, 2003).

A espécie *Alternanthera maritima* pertence a família Amaranthaceae e apesar de não ser utilizada na medicina popular, em estudo fitoquímico prévio dos extratos hexano e etanólico da planta *in natura*, biomonitorado pelas atividades antibacteriana, antifúngica, tripanocida e leishmanicida (SALVADOR, 2005), foi possível se estabelecer quais frações ou substâncias foram determinantes para estas atividades (esteróides, saponinas, flavonóides e alcalóides) o que sugere que a partir dos seus extratos bioativos é possível se desenvolver formulações farmacêuticas tópicas com potencial aplicação terapêutica.

Considerações gerais sobre Laser, Terapia fotodinâmica (PDT) e fotossensibilizadores

LASER, acrônimo para *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (amplificação da luz por emissão estimulada de radiação) é um

aparelho que gera ou amplifica radiação óptica coerente na região do infravermelho, visível e ultravioleta do espectro eletromagnético. Os feixes de radiação emitidos pelos lasers possuem importantes características de direcionalidade, pureza espectral e intensidade (BRUGNERA, 1998).

A terapia fotodinâmica – PDT baseia-se na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico sensível à luz seguida de irradiação em baixas doses com luz visível de comprimento de onda adequado (FUCHS; THIELE, 1998, PERUSSI, 2007).

Microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras, vírus, também podem ser mortos aplicando-se luz visível depois do tratamento com um fotossensibilizador (FS) apropriado e luz, em um processo denominado “inativação fotodinâmica” (PDI – Photodynamic Inactivation) (GAD *et al.*, 2004) ou quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana (PACT – Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy) (PERUSSI, 2007).

Considerações gerais sobre formulações farmacêuticas

Emulsão de modo geral aplica-se a todas as preparações de aspecto leitoso, com características de sistema disperso constituído por duas partes líquidas imiscíveis, no qual uma das partes está intimamente dividida em gotículas no outro, com ajuda de um agente emulsificante, que são tensoativos capazes de reduzir a tensão interfacial entre óleo e água, permitindo a estabilização da emulsão, formando um sistema

termodinamicamente estável (ALLEN JR., 2004; ANTUNES JR., 2002 THOMPSON, 2006).

Material e Métodos

Coleta, classificação e obtenção do material vegetal

Alternanthera maritima, partes aéreas, foi coletada no seu habitat natural, Restinga de Marica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em dezembro de 1998 sendo identificada pelo Professor Dr. Josafá Carlos de Siqueira ("Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil"). Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário do "Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil". (sob número de registro SPFR 02968).

Preparação dos extratos brutos

Para a preparação dos extratos brutos o material vegetal (partes aéreas) passou por secagem em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C, em seguida foi pulverizado em moinho de faca. O pó obtido foi submetido ao processo de maceração com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano para baixa polaridade e etanol para alta polaridade), na proporção massa de pó/solvente 1:20 (massa/volume). Das soluções obtidas, foram removidos os solventes (sob pressão reduzida), obtendo-se os extratos brutos em hexano (Ampah) e em etanol (Ampae).

Preparação das formulações farmacêuticas

Os experimentos para a elaboração de formulações farmacêuticas semi-sólidas contendo os extratos vegetais bioativos foram desenvolvidas na Farmácia Escola da UNOCHAPECO (Chapecó, SC, Brasil), determinando-se a estabilidade e o pH das preparações obtidas (GEORGETTI *et al.*, 2006; ANVISA 2004; ANSEL *et al.*, 1999; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; PRISTA & ALVES, 1967).

Avaliação das características organolépticas

Os cremes e géis cremes contendo os extratos foram analisados quanto às propriedades organolépticas através da visualização e do olfato, observando qualquer alteração da coloração, odor ou separação de fases.

Medida do pH

A medida do pH foi realizada com fita de pH para cada amostra.

Centrifugação

Para o teste de centrifugação utilizou-se centrífuga, com velocidade de 2.800 rpm durante cinco (5) minutos.

Espectro de Absorção na região do visível

Os extratos etanólico e hexânico de *A. maritima* foram analisados quanto à sua capacidade de absorção de luz na região do visível (400 a 700nm), bem como as formulações creme e gel creme contendo os extratos. Como controle analisaram-se formulações de creme e gel creme onde os extratos não foram incorporados. Os espectros de absorção (400 a 700nm) foram obtidos no Laboratório de Lasers de Alta Potência do IP&D/UNIVAP, determinando-se a região de absorção dos extratos hexânico e etanólico e das formulações de creme e gel creme contendo os extratos. A luz coletada foi acoplada a um espectrômetro de ¼ m (Oriol Instruments, modelo MS257), com grade de difração de 300 linhas/mm. Um detector tipo CCD (*Charge Coupled Device*) intensificado com 256 x 1024 pixels foi conectado à saída de detecção do monocromador. Cada medida foi realizada com a acumulação de 100 aquisições, e foram realizadas 10 medidas para cada amostra.

Resultados e Discussões

Seguindo as exigências das boas práticas em farmácia magistral, procedeu-se o preparo das formulações creme e gel creme (Tabela 1, 2 e Figura 1) contendo os extratos vegetais. As formulações farmacêuticas semi-sólidas não iônicas, por serem menos irritantes à pele, foram preparadas utilizando um agente emulsionante para reduzir a tensão interfacial entre óleo e água, permitindo a estabilização da emulsão (ANTUNES JR., 2002). No creme base (CB) e gel creme base (GCB), incorporou-se os extratos etanólico (Ampae) e hexânico (Ampah) de *A. maritima* (partes aéreas) em diferentes concentrações (Tabela 3), mantendo suas características organolépticas.

Os valores de pH das formulações prontas encontrados ficaram entre 5,0 e 5,5, o que é compatível para emprego na pele. Em média, o pH da pele situa-se em torno de 4,5 e contribui de modo importante nos mecanismos de defesa da pele (ANTUNES JR., 2002).

Emulsões (O/A, A/O) são bem tolerados pela pele, desde que a pele esteja íntegra assim a diferença de penetrabilidade não é significativa (AULTON, 2001, FONSECA, 2000).

Em relação à centrifugação, não houve separação de fases visível ao olho nu dos cremes e géis creme base (Figura 2), dos cremes, géis creme contendo extrato hexânico (Figura 3), bem

como do creme contendo extrato etanólico, porém, apresentou separação de fases no gel creme com extrato etanólico (Ampae 50mg/mL, Figura 4) e nas amostras dos extratos hexânico e etanólico, o que indica perda de estabilidade da formulação gel creme Ampae, acelerando reações de degradação (MONTAGNER, 2004);

Os extratos hexânico e etanólico de *A. maritima* diluído em etanol, na análise preliminar absorveu luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700 nm, formando duas bandas de absorção, uma em 664nm e outra em 700 nm. O que indica a possibilidade de emprego desses extratos como fotossensibilizadores naturais capazes de auxiliar na terapia fotodinâmica.

Tabela 1: Formulação controle Creme base (sem extrato)

Emulsão	Componentes	Formulação Creme Base
Fase oleosa	Polawax	10%
	Vaselina líquida	3%
	BHT	0,02%
	Álcool cetosteárico	5%
	Óleo de macadâmia	2%
	Ciclometicone volátil	2%
Fase aquosa	Phenonip	0,1%
	EDTA	0,14%
	Propilenoglicol	6%
	Água destilada	q.s.p. 30g

Tabela 2: Formulação controle Gel creme base (sem extrato)

Emulsão	Componentes	Formulação Gel Creme Base
Fase oleosa	Polawax	6%
	Vaselina líquida	10%
	BHT	0,05%
	Álcool cetosteárico	3%
	Óleo de macadâmia	2%
	Ciclometicone volátil	2%
Fase aquosa	Phenonip	0,04%
	EDTA	0,19%
	Propilenoglicol	2,4%
Gel	Água destilada	q.s.p. 12g
	Carbopol	1%
	Propilenoglicol	3,6%
	Phenonip	0,06%
	Água destilada	q.s.p. 18 g



Fig. 1: Formulações Base de Creme e Gel Creme

Tabela 3: Formulações contendo diferentes concentrações de extratos hexânico e etanólico incorporados em base Creme ou Gel creme

Formulações	Concentração (mg/mL)
CB + Ampah	5 mg/g
CB + Ampah	50 mg/g
CB + Ampah	100 mg/g
GCB + Ampah	5 mg/g
GCB + Ampah	50 mg/g
GCB + Ampah	100 mg/g
CB + Ampae	5 mg/g
CB + Ampae	50 mg/g
CB + Ampae	100 mg/g
GCB + Ampae	5 mg/g
GCB + Ampae	50 mg/g
GCB + Ampae	100 mg/g



Fig. 2: Teste de centrifugação sem separação de fases no creme e gel creme base (controles)

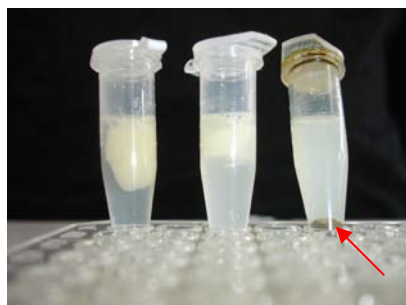


Fig. 3: Teste de centrifugação sem separação de fases no creme e gel creme contendo extrato hexânico e com separação de fase no extrato hexânico



Fig. 4: Teste de centrifugação sem separação de fases no creme contendo extrato etanólico e com separação de fases no extrato etanólico e no gel creme contendo extrato etanólico.

Conclusão

Foram obtidos extratos em hexano e etanol das partes aéreas de *A. maritima*, que foram utilizados no desenvolvimento de formulações (creme e gel creme) contendo estes extratos nas concentrações de 5, 50 e 100 mg/g (extrato:base, m/m).

As formulações farmacêuticas tópicas obtidas apresentaram pH = 5 a 5,5, verificando-se separação de fase somente para o gel-creme contendo o extrato etanólico;

O extrato hexânico apresentou duas bandas de absorção em 664 e 700nm, observando-se a tendência de manutenção destas bandas para as formulações contendo o extrato hexânico. Estes resultados encorajam a pesquisa para possíveis aplicações destas preparações farmacêuticas como fotossensibilizadores naturais em terapia fotodinâmica, visando a inativação de microrganismos.

Agradecimentos

À FAPESP pelo apoio financeiro e ao Engenheiro Leandro Procópio Alves pelo auxílio técnico na obtenção dos espectros de absorção.

Referências

ALLEN JR., L. V. Manipulando emulsões. **International Journal of Pharmaceutical Compounding**, v. 6, n. 3, 2004.

ANVISA, **Séries temáticas, Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. V. 1, 2004.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. São Paulo: 2 ed., 2001.

BRUGNERA JUNIOR, A.; PINHEIRO, A.L.B. **Lasers na odontologia moderna**. São Paulo: Pancast, 1998.

COWAN, M.M. Plant Products as antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, out.1999.

DA FONSECA, A., PRISTA, L. N. **Manual de terapêutica dermatológica e cosmetologia**. São Paulo: Roca, 1 ed., 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV- 4ª Ed, São paulo: Atheneu, 1988.

FUCHS, F.D.; WANNMACHER, L. Farmacologia Clínica: Fundamentos da Terapia Racional. Editora Ganabara Koogan, 2004.

GAD, F.; ZAHRA, T.; HASAN, T.; HAMBLIN, M. R. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 2173, 2004.

GEORGETTI ET AL. 2006. **GEORGETTI et al. Evaluation of the antioxidant activity of soybean extract by different in vitro methods and investigation of this activity after its incorporation in tropical formulations**. European Journal of Pharmaceutics and biopharmaceutics, v. 64, p. 99-106, 2006.

MONTAGNER D.; CORRÊA, G. M. **Avaliação da estabilidade de cremes com uréia em diferentes pHs**. Rev. Bras. Farm., 85(3): 69-72, 2004.

PEREIRA, R.S.; SUMITA, T.C.; FURLAN, M.R.; JORGE, A.O.C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. **Revista Saúde Pública**. Volume 38. Número 2. São Paulo, 2004.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1-7, 2007.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. **Técnica Farmacêutica e farmácia galênica**, 1ª Ed Liboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1967.

SALVADOR, M.J.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. Comparative study of antibacterial and antifungal activity of callus culture and adults plants extracts from *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). **Braz. J. Microbiol.**, 34: 131-136, 2003.

SALVADOR, M.J. *Estudo químico, biológico e biotecnológico de Alternanthera maritima e Alternanthera tenella (Gomphreneae, Amaranthaceae)*. 2005. 410p. Doutorado (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.