

FOTOSENSIBILIZADORES NATURAIS EM PDT: DESENVOLVIMENTO DE FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS TÓPICAS (CREME E GEL CREME) CONTENDO EXTRATOS DE *Alternanthera brasiliana* (AMARANTHACEAE)

Tádia Fernanda Lapinski^{1,2}, Sônia Khouri¹, Egberto Munin¹, 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, Brasil e-mail: tadiafernanda@yahoo.com.br mjsalvador1531@yahoo.com.br. ²UNOCHAPECÓ, Chapecó - SC, Brasil

Resumo- *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) é conhecida popularmente como penicilina, terramicina, aspirina ou doril e muito utilizada na medicina popular para o tratamento de infecções e problemas inflamatórios. O presente trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de formulações tópicas (creme e gel) contendo os extratos hexânico e etanólico de *A. brasiliana* (planta total) 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/g, m/m), mostrando-se homogêneos (sem separação de fases) e com pH (5,0 a 5,5) adequado para emprego na pele humana. A análise da absorção de luz na região do visível demonstrou que tanto os extratos quanto as formulações farmacêuticas nas quais estes foram incorporados, apresentaram picos de absorção na região de 600 a 700 nm. Assim, firma-se a importância de se avaliar o comportamento dessas preparações farmacêuticas tópicas (creme e gel creme) contendo extratos de *A. brasiliana* para possível aplicação em PDT visando a inativação de microrganismos.

Palavras chave: *Alternanthera brasiliana*, efeito antimicrobiano, PDT, formulações farmacêuticas tópicas (creme e gel creme)

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde - Farmácia

Introdução

A *Alternanthera brasiliana* (L.) O. Kuntze é uma planta medicinal herbácea, perene, pertencente à família Amaranthaceae e à ordem Centrospermae. Popularmente é conhecida como “terramicina”, “doril”, “penicilina” sendo empregada largamente na medicina tradicional como analgésico, antiinflamatório e no tratamento de processos infecciosos (SILVA *et al.*, 2005).

Alguns estudos abordaram as propriedades farmacológicas da *A. brasiliana*, tal como a atividade analgésica de seus extratos (DE SOUZA *et al.*, 1998, MACEDO *et al.*, 1999). Brochado *et al.* (2003), relataram a ocorrência de 6 flavonóides em *A. brasiliana* e inéditos no gênero *Alternanthera*. Por inibirem a proliferação linfocitária sugeriu-se que as propriedades antiinflamatórias observadas *in vivo* poderiam ser atribuídas à ação desses flavonóides. Além disso, o efeito antiviral foi avaliado por Lagrota *et al.* (1994) e observou-se que o extrato aquoso das folhas de *A. brasiliana* produziu o maior percentual de inibição (99%) frente ao Herpes simplex vírus.

Dado ao grave problema de multirresistência de microrganismos aos quimioterápicos hoje disponíveis e o interesse em se buscar alternativas nos produtos naturais, há o interesse em se avaliar a atividade antimicrobiana da *A. brasiliana*. Estudos breves já demonstraram o

potencial de aplicação antimicrobiana de extratos desta planta (CAETANO *et al.*, 2002), o que reforça a importância de investigações que comprovem sua atividade biocida.

Microrganismos tais como bactérias, fungos, leveduras, vírus, podem ser mortos após o tratamento com um fotossensibilizador apropriado associado com a exposição a luz em determinados comprimentos de onda, em um processo denominado quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana. Na presença de oxigênio encontrado nas células, o fotossensibilizador ativado pode reagir com moléculas na sua vizinhança por transferência de elétrons ou hidrogênio, levando à produção de radicais livres ou por transferência de energia ao oxigênio, levando à produção de oxigênio singlete (PERUSSI, 2007).

Os fotossensibilizadores que têm sido estudados para a erradicação de microrganismos pertencem a diferentes grupos de compostos, tais como os xantenos halogenados (Rosa de Bengala), fenotiazídicos (Azul de toluidina, Azul de Metileno), acridinas e conjugados de clorina (e₆) (PERUSSI, 2007).

Nos últimos anos muitos estudos que analisam a atividade de diferentes fotossensibilizadores em PDT-PDI vêm sendo realizados (Zeina *et al.*, 2001, Kömerik e Wilson,

2002, Souza *et al.*, 2006). No entanto, na literatura são raros trabalhos que avaliem a atividade antimicrobiana e PDT empregando fotossensibilizadores naturais.

Estes fatos encorajaram o estudo para desenvolvimento de formulações tópicas (creme e gel creme) contendo extratos (hexânico e etanólico) de *A. brasiliiana* para avaliação de seu efeito como fotossensibilizador natural em PDT.

Material e Métodos

Coleta e classificação do material vegetal

Alternanthera brasiliiana (L.) O. Kuntze planta total foi coletada em seu habitat natural – Ribeirão Preto, SP, pelos Professores Drs. Diones Aparecida Dias (FCFRP/USP) e Marcos José Salvador, 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 “Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de SP, Brasil” (registro DAD 0027).

Preparação dos extratos brutos

O material vegetal foi seco e pulverizado, sendo o pó submetido à extração com hexano e etanol, sucessivamente, filtrado e concentrado em rotaevaporador originando os respectivos extratos brutos.

Desenvolvimento de preparações tópicas

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).

Ensaio de centrifugação

Para o ensaio de centrifugação 50 mg das amostras foram diluídos em 1 mL de água e posteriormente centrifugados a 2800 rpm por um período de 5 min.

Análise de características organolépticas

As formulações farmacêuticas foram submetidas à análise visual para observância da coloração. Além disso, a textura foi analisada e o odor definido.

Avaliação da absorção na região visível do espectro eletromagnético

O espectro de absorção (400 a 700 nm) foi obtido 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 creme e gel creme contendo os extratos. Como controle analisou-se formulações de creme e gel creme onde os extratos não foram incorporados. 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

As formulações farmacêuticas semi-sólidas foram preparadas empregando creme base (CB) e gel creme base (GCB), incorporando-se os extratos etanólico (Abpte) e hexânico (Abpth) de *Alternanthera brasiliiana* (planta total) em diferentes concentrações (Tabela 1).

Tabela 1. Formulações contendo diferentes concentrações de extratos hexânico e etanólico incorporados em base Creme ou Gel creme

Formulações	Concentração (mg/g)
CB + Abpth	5
CB + Abpth	50
CB + Abpth	100
GCB + Abpth	5
GCB + Abpth	50
GCB + Abpth	100
CB + Abpte	5
CB + Abpte	50
CB + Abpte	100
GCB + Abpte	5
GCB + Abpte	50
GCB + Abpte	100

Seguindo as exigências das boas práticas em farmácia magistral, procedeu-se o preparo das formulações creme (Tabela 2) e gel creme (Tabela 3) contendo os extratos vegetais. Após isto se determinou o pH da formulação pronta (com fita de pH), com valores entre 5,0 e 5,5.

Tabela 2: 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 3: Formulação controle Gel creme base (sem extrato)

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

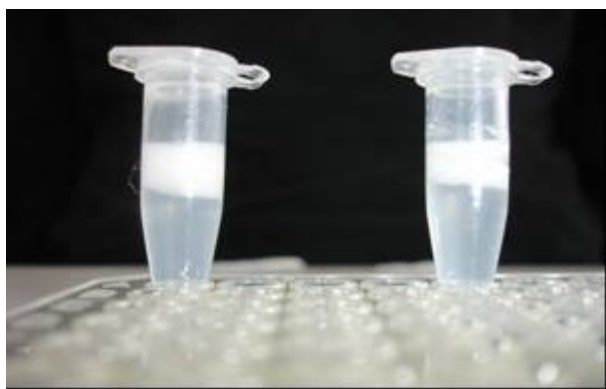


Fig. 1. Ensaio de centrifugação para avaliação de estabilidade (creme e gel creme), controles.

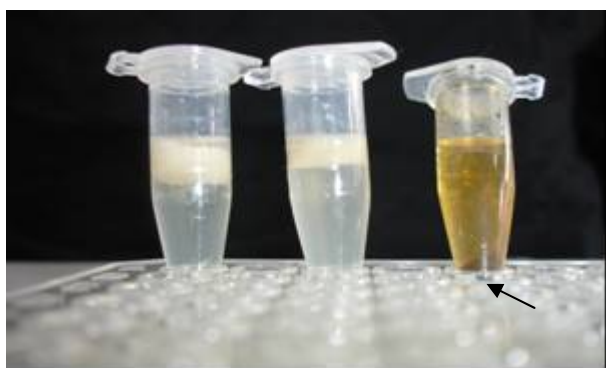


Figura 2. Ensaio de centrifugação (CB+Abpte 50mg/g, GCB+Abpte, Extrato etanólico)

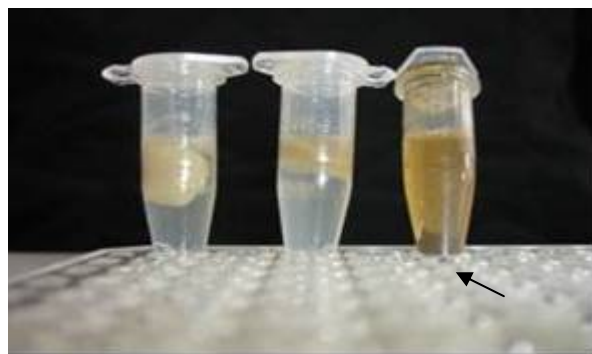


Figura 3. Ensaio de centrifugação (CB+Abpth, GCB+Abpth, extrato hexânico)

Discussão

A administração de agentes terapêuticos necessita da sua incorporação em uma forma farmacêutica, constituída de componentes farmacologicamente ativos e adjuvantes farmacêuticos (TOLEDO *et al.*, 2003). Para a incorporação dos extratos hexânico e etanólico de *A. brasiliana* (planta total) foi necessário levigar os extratos previamente com propilenoglicol, encontrando-se dificuldades na incorporação à base gel creme. Por conseguinte as formulações que empregaram o creme base apresentaram melhor aspecto em relação ao gel.

Em relação às características organolépticas pôde-se observar coloração verde clara para as formulações em que foram incorporados os extratos e odor característico. As bases (creme e gel creme) não receberam adição de corantes. As demais características mantiveram-se inalteradas.

A medida do pH da formulação é necessária para assegurar a estabilidade da formulação, necessitando ser compatível com o local de aplicação, a fim de evitar irritações (ANVISA, 2004). Na determinação do pH das emulsões os valores permaneceram na faixa de 5 e 5,5 apresentando-se compatíveis com o uso tópico e não sofrendo alteração após a incorporação dos extratos.

No ensaio de centrifugação realizado utilizando-se 50 mg da formulação (CB, GCB, CB+Abpth (50mg/mL), GCB+Abpth (50mg/mL)) e 1 mL de propilenoglicol:água (5:95) em ependorff, as amostras foram centrifugadas a 2800 rpm por 5min e não observou-se separação de fases, sendo indicativo de estabilidade da emulsão.

O espectro de absorção na região do visível foi obtido a fim de se verificar o comportamento dos extratos e formulações contendo extratos de *A. brasiliana* em relação à absorção de luz. Pelos resultados observou-se que tanto os extratos como as formulações contendo os extratos absorveram luz na região entre 600 e 700 nm, enquanto os controles não

apresentaram bandas de absorção nesta região. Esta região do espectro é de interesse em PDT o que encoraja os estudos para avaliar o efeito destas preparações farmacêuticas como fotossensibilizadores naturais.

Conclusão

Os resultados demonstraram que foi possível incorporar os extratos hexânico e etanólico de *A. brasiliana* (planta total) em formulações semi-sólidas tópicas (creme e gel creme) obtendo-se preparações adequadas do ponto de vista de estabilidade e com características organolépticas toleráveis. A faixa de pH (de 5 a 5,5) das formulações preparadas é adequada à aplicação tópica, sendo compatível com o uso na pele.

Tanto os extratos hexânico e etanólico de *A. brasiliana*, como as formulações creme e gel creme contendo extratos absorveram luz entre os comprimentos de onda de 600 e 700 nm (faixa do espectro aplicável em PDT).

Agradecimentos

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

Referências

ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN JR., L. V. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**, 6 ed. Baltimore, EUA: Premier, 2000.

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

BROCHADO, C.O.; de ALMEIDA, A.P.; BARRETO, B.P.; COSTA, L.P.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, R.L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V.L.; COSTA, S.S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal of Brazilian Chemistry Soc.**, v. 14, n. 1, p. 449-451, 2003.

CAETANO, N.; SARAIVA, A.; PEREIRA, R.; CARVALHO, D.; PIMENTEL, M. C. B., MAIA, M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como antiinflamatório. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 132-135, 2002.

DE SOUZA, M. M.; KERA, P.; FLORIANI, A. E. O.; CECHINEL-FILHO, V. Analgesic properties of a hydroalcoholic extract obtained from *Alternanthera brasiliana*. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 279-281, 1998.

DE SOUZA, S. C.; JUNQUEIRA, J. C.; BALDUCCI, I.; KOGA-ITO, C. Y.; MUNIN, E.;

JORGE, A. O. C. Photosensitization of different *Cândida* species by low power laser light. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 83, 34-38, 2006.

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

GEORGETTI, S. R.; CASAGRANDE, R.; VICENTINI, F. T. M. DE C.; VERRI JR., W. A.; FONSECA, M. J. V. 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.

KÖMERIK, N.; WILSON, M. Factors influencing the susceptibility of gram-negative bacteria to toluidine blue O-mediated lethal photosensitization. **Journal of Applied Microbiology**, v. 92, p. 618-623, 2002.

LAGROTA, M.H.C.; WIGG, M.D.; SANTOS, M.M.G.; MIRANDA, M.M.F.S.; CAMARA, F.P.; COUCEIRO, J.N.S.S.; COSTA, S.S. Inhibitory activity of extracts of *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) against the Herpes simplex virus. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 358-361, 1994.

MACEDO, A.F.; BARBOSA, N.C.; ESQUIBEL, M.A.; SOUZA, M.M.; CECHINEL, V. Pharmacological and phytochemical studies of callus culture extracts from *Alternanthera brasiliana*. **Pharmazie**, v. 54, n. 1, p. 776-777, 1999.

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

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C. **Técnica farmacêutica e farmácia galênica**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1967.

SILVA, N. C. B.; MACEDO, A. F.; LAGE, C. L. S.; ESQUIBEL, M. A. SATO, A. Developmental effects of additional ultraviolet a radiation, growth regulators and tyrosine in *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze cultured *in vitro*. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 48, n. 5, p. 779-766, 2005.

TOLEDO, A. C. O.; HIRATA, L. L.; DA CRUZ, M. B.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n. 1/2, p. 7-13, 2003.

ZEINA, B.; GREPNMAN, J.; PURCELL, W. M.; DAS, B. Killing of cutaneous microbial species by photodynamic therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, p. 274-278, 2001.