

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**VALÉRIA MARIA DE SOUZA ANTUNES**

**ESTUDO DOS PROCESSOS FOTOINDUZIDOS DE EXTRATOS DO *Brosimum*  
*Gaudichaudii* EM CREME DERMATOLÓGICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**MESTRADO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU**

**São José dos Campos, junho 2022**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**VALÉRIA MARIA DE SOUZA ANTUNES**

**ESTUDO DOS PROCESSOS FOTOINDUZIDOS DE EXTRATOS DO *Brosimum gaudichaudii* EM CREME DERMATOLÓGICO**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Adjaci Fernandes Uchoa

**São José dos Campos, junho 2022**

**UNIVERSIDADE ANHEMBI MORUMBI**

**VALÉRIA MARIA DE SOUZA ANTUNES**

**ESTUDO DOS PROCESSOS FOTOINDUZIDOS DE EXTRATOS DO *Brosimum gaudichaudii* EM CREME DERMATOLÓGICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Biomédica – Mestrado, da Universidade Anhembi Morumbi, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica aprovada pela seguinte Banca Examinadora:

**Prof. Dr. Adjaci Uchoa Fernandes**  
Orientador  
Mestrado em Engenharia Biomédica  
Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Ovidiu C. Baltatu**  
Universidade Anhembi Morumbi

**Profa. Dra. Valéria Petri**  
Universidade Federal de São Paulo

**Prof. Dr. Renato Amaro Zângaro (coordenação)**  
Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dra. Elizabeth Lourenço Costa**  
Universidade Anhembi Morumbi

**Prof. Dr. Divinomar Severino**  
Universidade São Paulo

**São José dos Campos, 08/2022**

Todos os direitos reservados. É proibida a reprodução total ou parcial do trabalho sem autorização da Universidade, do autor e do orientador.

**Valéria Maria de Souza Antunes**

Farmacêutica formada pela Faculdade de Farmácia e Bioquímica Oswaldo Cruz. Pós-graduada em Homeopatia (USP). Acupuntura (CBES). Cosmetologia Avançada (Instituto Racine) Manipulação Magistral (ANFARMAG). Autora da série Ativos Dermatológicos; Tricologia Capilar: das alterações aos tratamentos; Manipulação Magistral na Estética. Docente em pós-graduação e palestrante internacional nas áreas de Cosmetologia (P&D) Fitocosméticos, Prescrição farmacêutica e Osmologia.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca UAM  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

627e Antunes, Valéria Maria de Souza  
Estudo dos processos fotoinduzidos de extratos do  
Brosimum gaudichaudii em creme dermatológico / Valéria  
Maria de Souza Antunes. - 2022.  
131f. : il.; 30cm.

Orientador: Adjaci Uchoa Fernandes .  
Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) -  
Universidade Anhembi Morumbi, São José Dos Campos,  
2022.  
Bibliografia: f.117

1. Engenharia biomédica. 2. Brosimum gaudichaudii  
Trécul. 3. Fotofísica. 4. Lipossomas. 5. Creme dermatológico.  
CDD 610.28

Aleksandra Oliveira - CRB 8/6302

## DEDICATÓRIA

Meu pai Dr Francisco Juarez de Souza, farmacêutico formado em 1956 pela Universidade de São Paulo, nortista orgulhoso de sua terra, primeiro filho de sua família que cursou uma universidade, casado com Edmea Vasques, espanhola brava, dizia mais ou menos assim:

*“Se minha opinião importar*

*Nunca é tarde ou cedo demais para ser quem você quer ser.*

*Não há limite de tempo.*

*Comece quando quiser.*

*Mude ou continue sendo a mesma pessoa.*

*Não há regras para isso.*

*Pode tirar o máximo proveito ou o mínimo.*

*Espero que tire o máximo...*

*Espero que você veja coisas surpreendentes...*

*Espero que sinta coisas que nunca sentiu antes.*

*Espero que conheça pessoas com pontos de vistas diferentes.*

*Espero que tenha uma vida da qual se orgulhe.*

*E, se não se orgulhar dela, que você tenha forças para recomeçar tudo de novo.*

*Porque também é fato: algumas pessoas vieram nesta vida a passeio; outras, à trabalho.*

*Algumas são atingidas por raios da sorte;*

*Outras tem ouvido para música.*

*Algumas são artistas; outras são dentistas.*

*Algumas tem o dom da cura através dos medicamentos que produzem*

*E, porque não dizer, das mãos.*

*Alguns conhecem Shakespeare e algumas são mães.*

*Mas todos, sem exceção, deveriam aprender a dançar, mas sempre, conforme a música”.*

Portanto,

Dedico este trabalho à Deus Pai todo poderoso.

À minha família: Daniel, Isabela, Marya Clara e Ana Rosa.

Ao meu filho peludo, Paco Rabanne, presente em todas as aulas em que estive como professora e como aluna no período de pandemia, anjo de inocência que distribui amor em nossas vidas...

Aos meus antepassados, imensa gratidão.

E, claro, antes de tudo e de todos, dou graças a Deus pela vida, pelas inúmeras oportunidades, pelos milagres operados em minha vida através de muitos anjos que passaram por mim, onde meus queridos pais Francisco Juarez de Souza e Edmea Vasques de Souza, minha família, cada mestre e cada amigo verdadeiro, foram pontes para chegar aonde cheguei.

A vida conspirou ao meu favor... gratidão!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Adjaci Uchoa Fernandes, não somente pelo convite para integrar o corpo de mestrandos, mas por todo o incentivo para continuidade do estudo, durante os períodos mais sombrios causados pela pandemia e depois dela...

Agradeço ao Prof. Dr. Divinomar Severino, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pela disposição em ajudar no projeto, cedendo horas pessoais preciosas para que este trabalho fosse concretizado.

Agradeço ao Prof. Dr. Mauricio Baptista da Silva da Bioquímica da Universidade de São Paulo pelo apoio técnico.

Agradeço ao Prof. Dr. Paulo T. Sano do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Agradeço à Farmácia Alecrim, pela disposição em me ajudar no desenvolvimento do veículo aqui usado.

Todos os procedimentos foram realizados nos laboratórios: Alecrim Farmácia de Manipulação em São Paulo; Laboratório de Química, associado ao Redoxoma; CITÉ, Parque Tecnológico de São José dos Campos e Laboratório de Processo Fotoinduzido do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP).

Aos técnicos, agradeço a ajuda e a disponibilidade.

Agradeço o apoio de todos os amigos do mestrado que compartilharam generosidade e afetividade ao longo dos últimos dois anos.

Agradeço imensamente o apoio dos meus familiares, em especial, meu marido Daniel que está ao meu lado incondicionalmente para tudo e por tudo, você é a melhor pessoa que conheci!

Agradeço minhas filhas Isabela e Marya Clara, que são o sentido maior da minha vida.

Tudo vale a pena quando a alma não é pequena.

## RESUMO

Estudo dos processos fotoinduzidos dos extratos do *Brosimum gaudichaudii* em creme dermatológico

*Brosimum gaudichaudii* Trécul (*B. gaudichaudii*), popularmente conhecida como mamacadela, é um arbusto com propriedades medicinais, rico em furanocumarinas que apresentam fluorescência e ação fototerapêutica, pois contém fotossensibilizadores comumente usados nas desordens dermatológicas como a psoríase. Os extratos das partes da planta, folha, casca, galhos e raiz foram produzidos por extração com etanol hidratado e posteriormente incorporados em lipossomos. Cada lipossoma resultante da incorporação dos extratos, foi adicionado a uma emulsão cujos componentes são derivados da oliva. Uma análise dos espectros ultravioleta visível mostrou a presença de bandas de absorção em 315 nm, em 400 nm e em 667 nm. O espectro de emissão fluorescente apresenta uma banda em 674 nm, atribuída a clorofila e seus derivados, que estão presentes em todos os extratos. Os processos redox fotoinduzidos foram determinados por métodos diretos. Foi observado que os extratos da casca e das raízes, além de serem supressoras de  $^1\text{O}_2$ , também são potenciais supressores de triplete. O creme desenvolvido foi analisado quanto ao poder foto-oxidativo, utilizando a sonda difenilbenzofenona (DPBF) como detectora de espécies reativas. Os ensaios com o creme foram realizados com irradiação em 315 nm, região onde ocorrem fortes bandas de absorção dos bergaptenos; em 400 nm, banda solet dos tetrapirrólicos, e em 667 nm, banda Q4 de compostos clorínicos (clorofila e seus derivados). Os ensaios com irradiação em 315 nm apresentam incremento na intensidade das bandas de emissão do DPBF para os ensaios do creme na ausência dos extratos e, também, na presença de alguns deles. O extrato do galho e da raiz mostraram-se pobres em compostos clorínicos. O extrato da folha apresenta a maior atividade de supressão, o que foi atribuída à presença dos compostos clorínicos (clorofila e seus derivados). Para irradiação em 400 nm, foi observado uma maior atividade por ser região da absorção da banda mais intensa dos tetrapirrólicos (banda solet). O ensaio com irradiação em 667 nm excita exclusivamente os compostos clorínicos e contribuições para o processo fotoinduzido. Assim, os extratos de *B. gaudichaudii* apresentam processos foto-oxidativos por 3 vias: Tipo I, por processos radicalares; Tipo II, onde a energia de excitação dos cromóforo que atuam como fotossensibilizadores resultam na formação de ( $^1\text{O}_2$ ) e ainda, o que consideramos o Tipo III, onde o cromóforo é a furanocumarina, que participa de uma reação periclíca (ciclo adição 2 +2) por ação da luz ultravioleta, reação que ainda não havia sido considerada para tratamentos dermatológicos a base de extratos de *B. gaudichaudii*, que envolvem tanto a TFD como o PUVA.

**Palavras-chave:** Engenharia biomédica. *Brosimum gaudichaudii* Trécul. Fotofísica. Lipossomas. Creme dermatológico.

## ABSTRACT

Study of photoinduced processes of *Brosimum gaudichaudii* extracts in dermatological cream

*Brosimum gaudichaudii* (*B. gaudichaudii*), popularly known as mamacadela, is a medicinal bush, rich in furanocoumarins that present fluorescence and phototherapeutic action, as they contain photosensitizers commonly used in dermatological disorders such as psoriasis. The extracts of the plant parts, leaf, bark, branches, and root were produced by extraction with hydrated ethanol and later incorporated into liposomes. Each liposome resulting from the incorporation of the extracts, was added to an emulsion whose components are derived from olive. An analysis of the visible ultraviolet spectra showed the presence of absorption bands at 315 nm, at 400 nm and at 665 nm. The fluorescence emission spectrum shows a band at 674 nm, attributed to chlorophyll and its derivatives, which are present in all extracts. The photoinduced redox processes were determined by direct methods. It was observed that the bark and root extracts, in addition to being  $^1\text{O}_2$  suppressors, are also potential triplet suppressors. The developed cream was analyzed for photo-oxidative power using diphenylbenzophenone probe (DPBF) as a reactive species detector. The assays with the cream were performed with irradiation at 315 nm, the region where strong absorption bands of bergaptenes; at 400 nm, the Soret band of tetrapyrrolics, and at 667 nm, the Q4 band of chlorinic compounds (chlorophyll and its derivatives). The assays with irradiation at 315 nm show an increase in the intensity of the DPBF emission bands for the cream assays in the absence of the extracts and, also, in the presence of some of them. The branch and root extracts were poor in chlorinic compounds. The leaf extract showed the highest suppression activity, which was attributed to the presence of chlorinic compounds (chlorophyll and its derivatives). For irradiation at 400 nm, a higher activity was observed because it is the absorption region of the most intense band of tetrapyrrolics (Soret band). The assay with irradiation at 667 nm excites exclusively the chlorinic compounds and make it possible to isolate the contributions from photoinduced processes. Thus, the extracts of *B. gaudichaudii* present photo-oxidative processes by 3 ways: Type I, by radical processes; Type II, where the excitation energy of the chromophores that act as photosensitizers result in the formation of ( $^1\text{O}_2$ ) and, yet, what we consider Type III, where the chromophore is furanocoumarin, which participates in a

pericyclic reaction (addition cycle 2 +2) by ultraviolet light action, reaction that had not yet been considered for dermatological treatments based on *B. gaudichaudii* extracts, involving both PDT and PUVA.

**Keywords:** Biomedical engineering. *Brosimum gaudichaudii* Trécul. Photophysics. Liposomes. Dermatological cream.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>1.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>22</b>
<b>1.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1</b>	<b>Considerações sobre a fitoterapia, sua aplicação e importância.....</b>	<b>24</b>
2.1.1	Considerações sobre o cerrado brasileiro e seu bioma.....	26
2.1.2	Família <i>Moraceae</i> , o gênero <i>Brosimum</i> e a espécie <i>Brosimum gaudichaudii</i> ....	29
<b>3</b>	<b>PELE.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Importância da pele como via de administração cutânea e as formas farmacêuticas ideais para incorporação do extrato lipossomado de <i>B. gaudichaudii</i>.....</b>	<b>38</b>
<b>4</b>	<b>LIPOSSOMAS.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Lipossomas feitos de lecitina de soja.....</b>	<b>43</b>
4.1.1	Mecanismo de permeação dos lipossomas na pele.....	45
<b>5</b>	<b>PSORÍASE E A TERAPIA FOTODINÂMICA.....</b>	<b>46</b>
<b>6</b>	<b>MECANISMO DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA.....</b>	<b>51</b>
<b>6.1</b>	<b>Agentes fotossensibilizantes.....</b>	<b>53</b>
<b>6.2</b>	<b>Novos fotossensibilizantes de origem natural.....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DAS PLANTAS E A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>58</b>
<b>8.1</b>	<b>Material e reagentes.....</b>	<b>58</b>
8.1.1	Material vegetal.....	59
8.1.2	Obtenção de Lipossomas.....	60
8.1.3	Laboratório.....	62
8.1.4	Modo de preparo da emulsão.....	62
8.1.5	Preparação de creme fitodermatológico.....	63
8.1.6	Determinação da atividade pró-oxidativa do <i>B. gaudichaudii</i> .....	64
8.1.7	Determinação da emissão de oxigênio singlete - método direto.....	64
8.1.8	Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROs).....	64

<b>9</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>66</b>
<b>9.1</b>	<b>Material vegetal.....</b>	<b>66</b>
<b>9.2</b>	<b>Preparação da formulação lipossomal.....</b>	<b>68</b>
<b>9.3</b>	<b>Desenvolvimento de emulsão .....</b>	<b>68</b>
<b>9.4</b>	<b>Emissão de oxigênio singlete - método direto.....</b>	<b>69</b>
<b>9.5</b>	<b>Tempo de vida .....</b>	<b>77</b>
<b>9.6</b>	<b>Deteção de oxigênio singlete pelo método indireto com DPBF .....</b>	<b>81</b>
9.6.1	Caracterização do creme base em 315 nm.....	81
9.6.2	Caracterização do extrato da casca incorporado ao creme com irradiação em 315 nm .....	83
9.6.3	Caracterização do extrato do galho incorporado ao creme em 315 nm.....	84
9.6.4	Caracterização do extrato da folha incorporado ao Creme em 315 nm.....	85
9.6.5	Caracterização do extrato da raiz incorporado ao Creme em 315 nm.....	87
9.6.6	Cinética de supressão fluorescente de DPBF de intensidade de emissão fluorescente em 315 nm.....	88
9.6.7	Estudos por irradiação em 400 nm. ....	90
9.6.8	Estudo do creme sem extratos da planta <i>B. gaudichaudii</i> irradiado em 400 nm	90
9.6.9	Estudo do creme incorporado ao extrato da casca irradiado em 400 nm .....	91
9.6.10	Estudo do creme incorporado ao extrato do galho irradiado em 400 nm .....	92
9.6.11	Estudo do creme incorporado ao extrato da folha irradiado em 400 nm.....	94
9.6.12	Estudo do creme incorporado ao extrato da raiz irradiado em 400 nm .....	96
9.6.13	Cinética de supressão fluorescente de DPBF .....	98
9.6.14	Comparativo entre os extratos da planta <i>B. gaudichaudii</i> .....	100
9.6.15	Estudo da deteção de oxigênio singlete pelo método químico do DPBF com irradiação em 667 nm. ....	100
9.6.15	Cinética de supressão fluorecente de DPBF por irradiação em 667 nm.....	107
<b>10</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>116</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>118</b>
	<b>ANEXO A – Study of the Photo Oxidative Action of <i>Brosimum gaudichaudii</i> Extract.....</b>	<b>129</b>

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Estrutura química do bergapteno. ....	31
Esquema 2 – Rota Biosintética das furanocumarinas.....	33
Esquema 3 – Estrutura molecular de fosfolipídio. ....	43
Esquema 4 – Estrutura química da fosfatidilcolina. ....	45
Esquema 5 – Estrutura química da clorofila a e b. ....	55
Esquema 6 – Esquema representativo de fotossensibilização e produção de oxigênio singlete, e supressão por processos físicos e químicos. ....	80
Esquema 7 – Esquema de foto-oxidação de DPBF por ataque de oxigênio singlete, via reação pericíclica [4 +2] .....	112
Esquema 8 – Diagrama de Jabloski modificado, ilustrando os mecanismos de ataque fotoquímico: Tipo I, Tipo II, Tipo III para os extratos do <i>B. gaudichaudii</i> . .....	114

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fisionomias do Cerrado. (a) cerrado aberto; (b) floresta seca; (c) pequenas árvores características do Cerrado; (d) veredas – apresentando alta umidade e solo argiloso, com palmeiras.....	27
Figura 2 – Folhas, caule, galhos, raiz e frutos da planta <i>B. gaudichaudii</i> .....	28
Figura 3 – Arbusto de <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.....	30
Figura 4 – Camadas celulares da epiderme.....	36
Figura 5 – Estrutura lamelar normal e interrompida do estrato córneo.....	37
Figura 6 – Estruturas da epiderme e derme com anexos cutâneos.....	38
Figura 7 – Estrutura molecular de um lipossoma.....	42
Figura 8 – Arranjo estrutural micelar dos lipídios em solução aquosa. A) micela globosa; B) bicamada lipídica; C) bicamada lipídica em forma de membrana separando dois ambientes líquidos distintos.....	44
Figura 9 – Apresentação da história da Terapia Fotodinâmica.....	50
Figura 10 – Curva de potencial dos três estados eletrônicos do oxigênio.....	52
Figura 11 – Mecanismos da TFD.....	53
Figura 12 – Diagrama de Jablosky.....	56
Figura 13 – Ultrassom aparelho Maxsonic D-409 XA da empresa CTA do Brasil.....	60
Figura 14 – Extrato de folha do <i>B. gaudichaudii</i> .....	61
Figura 15 – Lipossoma de extrato da folha do <i>B. gaudichaudii</i> .....	61
Figura 16 – Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da USP.....	62
Figura 17 – Equilíbrio das atividades pró-oxidativas e antioxidativas.....	81

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Espectro UV-vis de fenalenona e dos extratos de diferentes partes de *B. gaudichaudii*, todos em clorofórmio, mostrando bandas intensas em 315 nm, 400 nm e 667 nm ..... 67
- Gráfico 2 – Espectro de emissão fluorescente do extrato das raízes de *B. gaudichaudii* em clorofórmio excitado em 400 nm. .... 68
- Gráfico 3 – Espectro de emissão de  $^1\text{O}_2$  obtido por excitação de solução do extrato etanólico das folhas de *B. gaudichaudii* e ressuspendidos em clorofórmio, por excitação com laser em 400 nm (-) e 660 nm(-) 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo. .... 70
- Gráfico 4 – Decaimentos Transiente de  $^1\text{O}_2$  em água (-), etanol (-) e clorofórmio (-). Gerados por fenalenona. Excitação com laser em 400 nm 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo. .... 71
- Gráfico 5 – Decaimento transiente de  $^1\text{O}_2$  em clorofórmio. Gerados por fenalenona (-) e para os extratos: Casca (-) Galho (-) Folha (-) Raiz (-). Excitação a 400 nm. .... 72
- Gráfico 6 – Decaimentos transiente de  $^1\text{O}_2$  em etanol. Gerados por fenalenona (-) e extratos: Casca (-) Galho (-) Folha (-) Raiz (-). Excitado em 400 nm.... 73
- Gráfico 7 – Intensidade de emissão a 1270 nm, para os extratos em clorofórmio, excitado em 400 nm. .... 75
- Gráfico 8 – Intensidade de emissão a 1270 nm, para os extratos em etanol, excitado à 400 nm. .... 75
- Gráfico 9 – Eficiência quântica de produção de oxigênio singlete determinado em clorofórmio. Intensidade de emissão a 1270 nm. .... 76
- Gráfico 10 – Eficiência quântica de produção de oxigênio singlete determinado em etanol. Intensidade de emissão em 1270 nm. .... 77
- Gráfico 11 – Tempo de vida de emissão de oxigênio singlete em clorofórmio. Excitação a 400 nm. .... 78
- Gráfico 12 – Tempo de vida de emissão de oxigênio singlete em etanol. Excitação a 400 nm ..... 78

- Gráfico 13 – Espectros de emissão fluorescente do creme na ausência de DPBF (A) creme base; (B) referência escuro sem a placa; (C) referência escuro sem a placa com a íris fechada; todos com 13,16 n mol DPBF. Excitação a 400 nm, após cada intervalo de irradiação a 315 nm (D) 0 s; (E) 90 s; (F) 180 s;(G) 270 s e (H) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*..... 82
- Gráfico 14 – Espectros de emissão fluorescência do creme com extrato da casca na ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato da casca do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação à 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*. ..... 84
- Gráfico 15 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato do galho e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato do galho de *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm. (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*. ..... 85
- Gráfico 16 – Espectros de emissão fluorescência do creme com extrato da folha de *B. gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato do folha do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*..... 87
- Gráfico 17 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da raiz. *gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato da raiz do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*..... 88
- Gráfico 18 – Variação da intensidade de fluorescência de DPBF (sonda de oxigênio singlete, excitação a 315 nm, emissão a 484 nm) com o tempo de irradiação do creme à 315 nm na presença dos extratos de *B. gaudichaudii*. ..... 89

Gráfico 19 – Espectros de emissão de fluorescência do creme sem extratos do <i>B. gaudichaudii</i> e com a sonda DPBF. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> .....	91
Gráfico 20 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da casca. <i>gaudichaudii</i> com DPBF na presença de extrato da casca do <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> . ....	92
Gráfico 21 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato do galho do <i>B. gaudichaudii</i> com DPBF. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> . ....	93
Gráfico 22 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da folha. <i>gaudichaudii</i> e ausência de DPBF (A) com DPBF na presença de extrato da folha do <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> .....	95
Gráfico 23 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da raiz. <i>gaudichaudii</i> e ausência de DPBF (A) com DPBF na presença de extrato do raiz do <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s e (E) 270 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> . ....	97
Gráfico 24 – Curvas cinéticas de decaimento da intensidade de fluorescência do DPBF referentes aos extratos do galho, raiz, folha e caule do <i>B. gaudichaudii</i> . .	98
Gráfico 25 – Curvas cinéticas de decaimento da intensidade de fluorescência do DPBF normalizada, referentes aos extratos do galho, raiz, folha e caule do <i>B. gaudichaudii</i> . ....	99
Gráfico 26 – Poder foto-oxidativo em porcentagem referente a autossupressão e a autossupressão + extratos de <i>B. gaudichaudii</i> .....	100

Gráfico 27 – Espectros de emissão fluorescente do creme na presença de DPBF. Excitação a 400 nm, após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s;(D) 180 s; (E) 240 s (F) 300 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh <i>Instruments</i> . ....	101
Gráfico 28 – Espectros de emissão fluorescência do creme com DPBF na presença de extrato da casca da <i>B. gaudichaudii</i> , excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s; 240 (E); (F) 240 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio_Edinburgh <i>Instruments</i> .....	102
Gráfico 29 – Espectros de emissão fluorescência com DPBF na presença de extrato do galho de <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm. (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s (E) 240; (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio_Edinburgh <i>Instruments</i> .....	103
Gráfico 30 – Espectros de emissão fluorescência do creme sem e com DPBF na presença de extrato da folha do <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s e (E) 240 s; (F) 360s. Irradiação e análise no sistema Microscópio_Edinburgh <i>Instruments</i> . ....	105
Gráfico 31 – Espectros de emissão fluorescência do creme com DPBF na presença de extrato da raiz do <i>B. gaudichaudii</i> . Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s; (E) 240 s;(F) 360s. Irradiação e análise no sistema Microscópio_Edinburgh <i>Instruments</i> .....	106
Gráfico 32 – Apresenta a variação da intensidade de fluorescência de DPBF a 456 nm em função do tempo de irradiação (dados originais e normalizados) com excitação a 400 nm e irradiação a 667 nm.....	107
Gráfico 33 – Apresenta a variação de intensidade de fluorescência de DPBF a 456 nm em função do tempo de irradiação (dados normalizados) com excitação a 400nm e irradiação a 667nm.....	108
Gráfico 34 – Espectro de excitação/emissão fluorescente do extrato da folha o <i>B.</i> <i>gaudichaudii</i> em clorofórmio. ....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
5 - MOP	5-Metoxipsoraleno
8- MOP	8 -metoxiproaleno
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APG II	<i>Angiosperm Phylogeny Group</i>
<i>B. Gaudichaudii</i>	<i>Brosimum Gaudichaudii</i>
UV-BE	Ultravioleta banda estreita
BHT	Butil hidroxi tolueno
UV-BL	Ultravioleta banda larga
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CRF-SP	Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo
DFBF	Difenilbenzofurano
DHp	Hematoporfirina derivada
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FS	Fotossensibilizadores
IFAS	Insumos farmacêuticos ativos
LUV	Lipossomas grandes unilamelares
MAL	Metil aminolevulinato
MEC	Matriz extracelular
MLV	Lipossomas multilamelares
MS	Ministério da Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PASI	Índice de Área e Gravidade da Psoríase
PI	Portaria Interministerial
PNPMF	Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos
PUVA	Psolareno + UVA.
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA	Ácido ribonucleico

ROs	Espécies reativas de oxigênio
SUS	Sistema Único de Saúde
SUV	Lipossomas unilamelares
TEWL	<i>Transepidermal water loss</i> (perda de água transepidermal)
TFD	Terapia Fotodinâmica
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UV-vis	Ultravioleta visível
WHO	World Health Organization

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza possui uma gama completa e diversificada no que diz respeito à flora, que está à disposição da humanidade e da ciência para diversos fins, incluindo os terapêuticos (YUNES *et al.*, 2001). O uso de plantas no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Sabe-se que, desde a antiguidade, o ser humano aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais em favor da saúde, aumentando assim, suas chances de sobrevivência (BRASIL, 2006).

O Brasil é considerado detentor de uma das mais ricas e importantes floras (BRASIL, 2006; YUNES *et al.*, 2001). Também contamos com influência das três grandes raças que constituem a nossa nação (africana, indígena e europeia), com ênfase nas duas primeiras.

Nas últimas décadas, as plantas medicinais têm sido estudadas de forma sistemática, por pesquisadores interessados no conhecimento das potencialidades e riquezas da nossa flora. O desenvolvimento da medicina parece remeter-nos ao uso da fitoterapia, reafirmando o conhecimento dos nossos ancestrais.

Há décadas a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda o uso da fitoterapia nos programas voltados para cuidados primários de saúde (BRASIL, 2006; TOMAZZONI *et al.*, 2006).

Várias áreas estão envolvidas na pesquisa de novas substâncias derivadas de plantas, como a fitoquímica (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). A constituição química das espécies vegetais passa por inúmeras reações anabólicas e catabólicas que compõem o metabolismo vegetal, sendo este dividido em primário e secundário (MACIEL *et al.*, 2002).

*Brosimum gaudichaudii* Tétrul (*B.gaudichaudii*), popularmente conhecida como “mamacadela,” é um arbusto bem difundido na fitoterapia. Este arbusto possui muitas propriedades medicinais. As raízes, por exemplo, são utilizadas como diuréticos, no tratamento de hepatite, como depurativo do sangue e para desintoxicação; a casca da raiz é rica em furanocumarinas (ABDEL-KADER, 2003; CESTARI; PESSATO; CORREA, 2007; PAVANI, 2009).

As cumarinas e seus derivados, naturais e sintéticos, são muito explorados devido às suas propriedades biológicas, químicas e físicas. Suas propriedades

fluorescentes também são amplamente exploradas (MENEZES; GALLARDO; ZUCCO, 2010).

Os psoralenos exibem atividade fotobiológica e fototerapêutica. Absorvem energia na região do ultravioleta (UV) na faixa de comprimento de onda entre 300 e 400nm (UVA). Após a absorção do fóton, as furanocumarinas formam um estado tripleto excitado, que pode reagir com moléculas, tais como o ácido desoxirribonucleico (DNA), intercalando-se com as bases pirimídicas do DNA formando fotoadutos; pode reagir com o oxigênio, formando radicais livres como o radical superóxido que pode, então, reagir com DNA, ácido ribonucleico (RNA), proteínas e lipídios (MONTAGNER, 2007; QUEVEDO, 2011). Tais processos, são desencadeados por irradiação de um fóton, e se propagam de forma dinâmica. Quando utilizado em benefício da saúde é denominado terapia fotodinâmica (TFD) e tem sido utilizado no tratamento de diversas doenças dermatológicas, como a psoríase, vitiligo, micoses, acne e eczemas (PAVANI, 2009).

Os agentes químicos que desencadeiam estes processos são denominados fotossensibilizadores (FS), geralmente exógenos, em sua maioria. Os FS possuem origem sintética ou natural, e absorvem luz em comprimento de onda específicos. São administrados por via tópica, intralesional e sistêmica antes da subsequente exposição à luz. A técnica de exposição à luz é reconhecida como TFD. A molécula do FS é capaz de absorver luz em um comprimento de onda específico (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018; CESTARI; PESSATO; CORRÊA, 2007).

A TFD oferece a vantagem de ser um método eficiente (CASTANHO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; STRAKHOVSKAYA *et al.*, 2002). O dano ao tecido normal é minimizado pelo acúmulo seletivo do fotossensibilizador no tecido-alvo e aplicação da luz em um espaço confinado e de forma focada (CASTANHO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

Segundo a OMS (2016), a psoríase é uma doença crônica, inflamatória e que chega a atingir 11,43% da população, tornando-a uma doença global de impacto na saúde pública. Embora sua origem seja desconhecida, algumas evidências sugerem a relação da doença com a genética e o sistema imune, impulsionada por influências externas (problemas ambientais, emocionais, drogas, estresse) e internas, como as relações com outras comorbidades, entre elas a artrite, doença celíaca, a obesidade e as doenças

cardiovasculares. Normalmente o tratamento baseia-se em terapias para o controle dos sintomas, agregando produtos de uso tópico, de uso sistêmico, e a recomendação da TFD.

Diante de situação mundial e o aumento do número de pacientes afetados pela doença, no intuito de orientar o corpo médico, inúmeras ferramentas classificam a gravidade da psoríase, entre elas o Índice de Área e Gravidade da Psoríase (PASI), que leva em consideração o grau de descamação, eritema, espessura da lesão, entre outras manifestações.

O desenvolvimento de formulações de origem natural em adição aos extratos das partes planta *B. gaudichaudii* podem potencializar a atuação da TFD, melhorando a permeação do extrato, e evitando a perda de água transepidermal que normalmente ocorre nos casos de psoríase, pois o veículo é composto de substâncias derivadas de oliva, tais como tensoativos primários e secundários, e óleo vegetal.

Os tratamentos populares com plantas ricas em furanocumarínicos como o *B. gaudichaudii*, incluem exposição à radiação solar conhecida como puvaterapia (PUVA), que levam à processos inflamatórios graves, como queimaduras. As furanocumarinas lineares, psoraleno e bergapteno, são os principais compostos responsáveis por esse efeito. O mecanismo químico de ação dos seus compostos, quando em exposição à luz, não é totalmente esclarecido. O desconhecimento em relação à este mecanismo de ação leva ao comprometimento permanente da pele e exclusão do uso dos extratos em procedimentos dermatológicos pela agressividade do tratamento.

## **1.1 Objetivo geral**

Estudar os mecanismos dos processos fotoinduzidos decorrentes da ação dos extratos da planta *B. gaudichaudii* em soluções e em cremes dermatológicos.

## **1.2 Objetivos específicos**

- a) Obter extratos das partes da planta *B. gaudichaudii*, desenvolver formulações cosméticas para atuação dermatológica;

- b) Caracterizar a fotofísica de extratos das diferentes partes da planta *Brosimum gaudichaudii* e da formulação dermatológica;
- c) Determinar os mecanismos de ação dos processos fotoinduzidos dos extratos da planta *Brosimum gaudichaudii* e da formulação dermatológica.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Considerações sobre a fitoterapia, sua aplicação e importância

Existe uma conexão entre o homem e a natureza. Desde os tempos mais remotos da história do homem, o uso de plantas supria necessidades alimentares, de cura medicinal e de enfrentamento com os inimigos, através do uso de plantas tóxicas e mortais. Este conhecimento sempre foi transmitido de geração para geração e sobrevive até hoje graças as descobertas e desenvolvimento da ciência e da tecnologia (ŠANTIĆ *et al.*, 2017).

Relatos do uso de plantas medicinais ou mesmo da implantação do uso nas civilizações egípcias, chinesas, indiana, grega, romana e na velha civilização slava, foram transmitidos através de invasões que passam pelo imaginário do nosso conhecimento, levando a planta a sofrer modificações para que pudesse se adaptar a este ou aquele clima. Deste conhecimento, surgiram vários manuais e compêndios que mostram a finalidade e o modo de usar desses fitomedicamentos (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO – CRF, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) definiu os medicamentos fitoterápicos como substâncias obtidas pelo uso exclusivo de matérias-primas ativas de origem vegetal. A etnofarmacologia, assim como documentações tecnocientíficas, além de evidências clínicas, dão suporte para a informação sobre eficácia e segurança das plantas medicinais (BRASIL, 2010a).

Para tanto o governo, através do Ministério da Saúde (MS), realiza ações para implementação de programas voltados ao uso da fitoterapia. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos estabelecem normas para que o Sistema Único de Saúde (SUS) possa implantar plantas medicinais e da fitoterapia contribuindo, desta forma, para o desenvolvimento do setor, uma vez que metabólitos secundários das plantas podem atuar como fármacos e no desenvolvimento de outros fármacos (BRASIL, 2012).

Através do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 foi, então, criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), que dispõe sobre a implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da

população brasileira através do uso de fitoterapia. Para que o objetivo do decreto fosse atingido, a Portaria Interministerial (PI) nº 2.960/2008 instituiu o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (ANVISA, 2008).

Ao longo de alguns anos várias outras atualizações e regulamentações foram realizadas. A mais recente é a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n. 69 de 8 de dezembro de 2014, revogando a RDC n. 249/2005 que atualiza as Boas Práticas de Fabricação (BPF) de insumos farmacêuticos ativos (IFAS) (BRASIL, 2014).

A OMS em documento nomeado “Estratégia para medicina tradicional 2014-2023” revela a importância da medicina baseada em conhecimento na prática e experiências de diferentes culturas, para manutenção da saúde e prevenção de doenças através do uso da fitoterapia. Incentiva e dá suporte às políticas de implantação, garantia de segurança e efetividade para promover saúde nos sistemas públicos ou particulares. Identifica um aumento significativo do uso de fitoterápicos em todo mundo e mostra que os dois sistemas de tratamentos médicos, oriental e ocidental, podem compensar e complementar fraquezas que ambos possuem a partir das políticas públicas que incentivem o conhecimento, a divulgação e implantação destes, gerando oportunidades e desafios (WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO, 2009, 2014).

Entre 70 e 90% das plantas medicinais são utilizadas como medicamento em países desenvolvidos, e este número cresce com as tendências mundiais de consumo de fitoterápicos. Este fato deve-se ao produto fitoterápico ser de baixo custo e o desejo do paciente em consumir produtos menos agressivos ou, ainda, que sejam compatíveis com sua identidade cultural. Mais do que isso, muitas famílias rurais ou urbanas ganham seu sustento vivendo da plantação, venda ou mesmo como terapêutas, mostrando números para este mercado que ultrapassam a avaliação de US\$ 138.350 milhões em 2020 e que pode chegar a US\$ 218.940 milhões até o final de 2026, especialmente na América do Norte, Europa e Ásia-Pacífico, América do Sul, Oriente Médio e África (APPLEQUIST, 2019; GLOBAL..., 2021).

Apesar dos fatos apresentados, cientistas alertam sobre as questões das mudanças climáticas em todo mundo afetando a viabilidade e a extinção de algumas espécies. Enfatizam que as mudanças climáticas podem diminuir o acesso ao produto, assim como a produtividade. Alertam que, com as mudanças climáticas, os constituintes fitoquímicos das populações sobreviventes podem mostrar modificações quanto as suas

propriedades farmacológicas, afetando, portanto, o poder terapêutico dos fitoterápicos (APPLEQUIST, 2019).

Sendo o Brasil, um país de dimensões continentais, que detém grande parte da Amazônia e extensas áreas de cerrado, a riqueza de sua flora chega a 20% das espécies de plantas conhecidas no mundo, representa um imenso potencial para a descoberta de novas moléculas com potencial terapêutico (DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2019).

A população acredita, portanto, que os produtos vindos da natureza não apresentam efeitos tóxicos ou mesmo efeitos colaterais significativos. No entanto, as fitofotodermite causadas pelas furanocumarinas manifestam-se como reações específicas de hiperpigmentação, eritema e formação de vesículas. As respostas para esclarecer como estas fitofotodermite acontecem não são claras, assim como o seu mecanismo de ação.

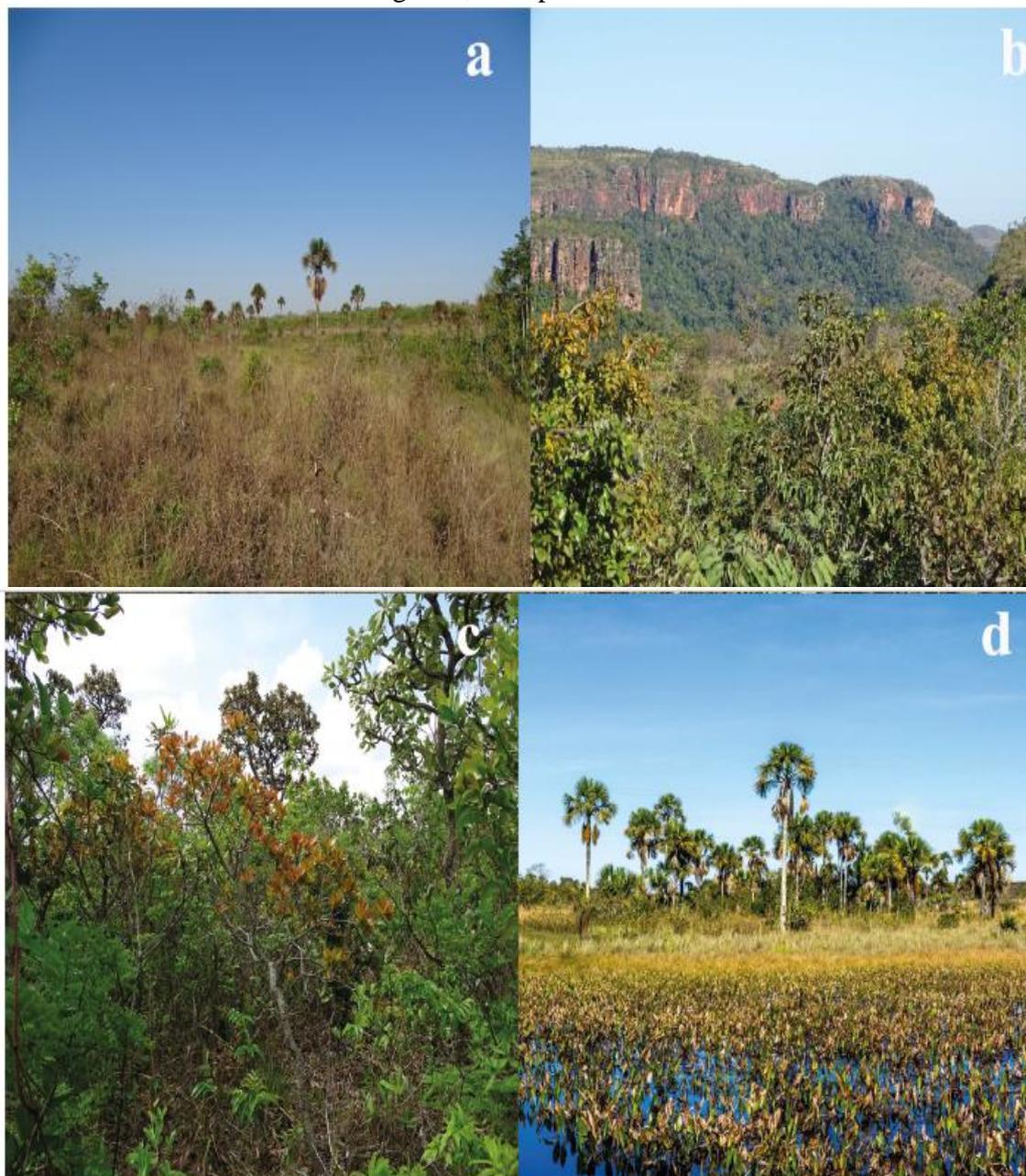
### 2.1.1 Considerações sobre o cerrado brasileiro e seu bioma

O cerrado é o segundo maior bioma que o Brasil possui e está em cerca de 22% do território central com cerca de 2.036.448 Km<sup>2</sup> de extensão. Conhecido como savana brasileira, o cerrado possui extensa biodiversidade com 11.667 espécies de plantas nativas e 4400 plantas endêmicas, muitas apresentando grande potencial econômico e de pesquisa (DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2019).

Em 1994, Kaplan, Figueiredo e Gottlieb (1994) e Ratter e Ribeiro (1997) afirmaram que 40% do bioma já estava devastado (e que apenas 1,5% de sua extensão é protegida por lei). Afirmam que espécies do Cerrado apresentam grande número de compostos desconhecidos, quando comparados às espécies amazônicas ou as do Pantanal. Peixoto *et al.* (2019) afirma que até 2050, entre 31 e 34% das regiões do Cerrado podem desaparecer. A degradação ambiental não afeta somente a biodiversidade, mas a herança cultural das populações que habitam esta região e que detêm o conhecimento sobre os benefícios das plantas locais de forma, muitas vezes, empírica. O empirismo, quando malconduzido, pode levar ao extrativismo insustentável. Deve haver, portanto, equilíbrio entre tecnologia, conhecimento e biodiversidade. Os autores sugerem que os estudos de plantas desta região devem ser

priorizados, de forma multidisciplinar, chamando a atenção da importância desta flora e a necessidade de preservação das riquezas do Cerrado.

Figura 1 – Fisionomias do Cerrado. (a) cerrado aberto; (b) floresta seca; (c) pequenas árvores características do Cerrado; (d) veredas – apresentando alta umidade e solo argiloso, com palmeiras.



Fonte: Adaptado de Del-Claro e Torezan-Silingardi (2019).

Dentre as inúmeras plantas que podem ser estudadas originárias do Cerrado brasileiro, *B. gaudichaudii*, conhecida popularmente como mama-cadela, mamica de

cadela ou algodão, algodãozinho, inharé, manacá e ainda, manacá do campo, apresenta características interessantes para uso dermatológico, pois contém agentes fotossensibilizantes indicados para a TFD, quando incorporados nos desenvolvimentos de produtos para o tratamentos de vitiligo, psoríase, dermatite atópica, acne, e em câncer de pele, como a ceratose actínica e doença de Bowen (MANSOORI *et al.*, 2019; VILEGAS; VILEGAS; POZETTI, 1994).

Somente duas espécies do gênero *Brosimum*, da região do Cerrado, vêm sendo estudadas quanto a fitoquímica: *B. rubescens* e *B. gaudichaudii*. Estudos sugerem que a casca, a raiz, as folhas e o galho do *B. gaudichaudii* apresentam propriedades interessantes para uso em desenvolvimentos para a área dermatológica (DEL-CLARO; TOREZAN-SILINGARDI, 2019).

Figura 2 – Folhas, caule, galhos, raiz e frutos da planta *B. gaudichaudii*.



Fonte: Adaptado de Del-Claro e Torezan-Silingardi (2019).

Já existem no mercado farmacêutico alguns congêneres sintéticos dos derivados de furocumarínicos de *B. gaudichaudii* como a xantiletina, o bergapteno, a luvangetina e a gaudichaudina, para o tratamento de psoríase e vitiligo (MIRANDA, 2014).

A população utiliza a flora do Cerrado em procedimentos médicos, para questões inestéticas e para manutenção da saúde. No entanto, é de extrema relevância a necessidade de dados científicos e avaliações da indicação das plantas a partir de estudos que possam garantir segurança e doses adequadas, tornando-a útil para grande quantidade de pessoas que dela necessitem.

### 2.1.2 Família *Moraceae*, o gênero *Brosimum* e a espécie *Brosimum gaudichaudii*

*B. gaudichaudii* pertence à família *Moraceae*, caracterizada por dois estiletos e óvulos apicais. Algumas de suas espécies apresentam látex entre caule e casca. No entanto, a presença do látex não determina a classificação, porque algumas espécies do seu gênero não apresentam este látex. A família *Moraceae* também pertence à família *Urticaceae*. O limite entre as duas famílias não é exatamente preciso. A nova classificação de 2003 da *Angiosperm Phylogeny Group II/ 2003 (APG II)* ou (Grupo para a Filogenia das Angiospermas) preconiza que a Família *Moraceae* e a *Urticaceae*, entre outras famílias, pertencem ao gênero *Rosales*. Para família *Moraceae* são identificados 50 gêneros e 1500 espécies presentes no bioma brasileiro, em regiões tropicais ou subtropicais, seja de forma cultivada ou encontrada naturalmente (SOUZA; LORENZI, 2005); outros autores chegam a referenciar a identificação de 61 gêneros e 1000 espécies (BARROSO *et al.*, 2002), distribuídos entre vários estados passando pelo norte, nordeste, região central e sudeste brasileiro.

Trata-se de um arbusto que pode chegar até 4 m, com frutos amarelos e carnudos, formados a partir do receptáculo que passa a ter cor amarela, avermelhada e marrom avermelhada, normalmente colhidos de setembro a início de dezembro, consumido como goma de mascar. Sua reprodução é monoica. Encontram-se dois tipos de raízes no *B. gaudichaudii*: raiz primária, cuja origem é o embrião da semente e, também, raízes cuja origem são os nódulos do caule. A raiz do *B. gaudichaudii* mostra adaptação que a espécie sofreu para as agressões do meio ambiente, o que mostra elevado potencial de auto-regeneração da espécie. Neste quesito, podemos incluir os laticíferos presentes na planta e que promovem processos de cicatrização. A florescência ocorre de junho a outubro. A casca do *B. gaudichaudii* é rica em duas

substâncias furanocumarínicas nomeadas bergapteno e psoraleno, que apresentam características fotossensibilizantes, além de sesquiterpenos (SOUZA; LORENZI, 2005).

Figura 3 – Arbusto de *Brosimum gaudichaudii* Trécul.



Fonte: Adaptado de Del-Claro e Torezan-Silingardi (2019).

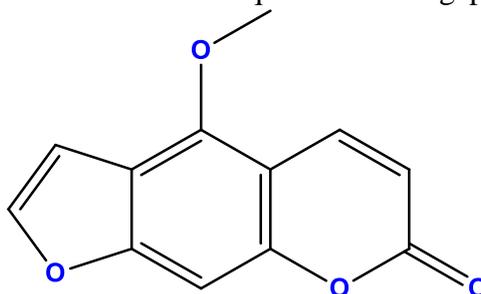
*B. gaudichaudii* possui particular interesse para a indústria farmacêutica, de desenvolvimento de dermocosméticos e de perfumaria. O chá das cascas da raiz é usado para vitiligo; as folhas são usadas como depurativo; há relatos do uso em casos de gripes, resfriados e bronquite. A decoção das cascas, do caule, e raízes é usada para psoríase. Pesquisas mostram que extratos feitos da raiz, caule, casca e frutos da mamacadela, quando aplicados na pele exposta ao sol, provocam a repigmentação da pele acometida por vitiligo. No entanto, o córtex da raiz é onde as furanocumarinas se apresentam em maior quantidade (JACOMASSI, 2006; POZETTI, 2005).

Na casca do tronco e nas raízes encontram-se as duas substâncias tradicionalmente usadas na puvaterapia para a psoríase: os compostos bergaptenos e psoralenos, uma família de fotoativos. Os psoralenos possuem 3 anéis que podem ser colocados em diferentes posições, resultando em diferentes compostos. Já o tricíclico é o responsável pelo processo fotoconversor.

Constituem uma classe de metabólitos secundários derivados do ácido cinâmico, amplamente distribuídos no reino vegetal (MENEZES; GALLARDO; ZUCCO, 2010). Podem ser classificados de acordo com as substituições do anel de benzeno e do anel pirano em cumarinas simples (MONTAGNER, 2007; QUEVEDO, 2011). Segundo Monteiro *et al.* (2002), o gênero *Brosimum* produz cumarinas prénilatadas, o que inclui as furanocumarinas lineares, conhecidas como psoralenos, ricamente distribuídas pela planta e que são usadas nos tratamentos de pigmentação da pele e outras lesões dermatológicas.

Os psoralenos apresentam uma vasta variedade de aplicações na medicina, seja de origem vegetal ou de origem sintética. A simples mudança em determinadas pontas da estrutura química da molécula pode determinar uma mudança em sua funcionalidade biológica: ação citotóxica, fotossensibilizante, antibacteriana, antifúngica e inseticida. Basicamente compostos heterocíclicos são adicionados aos núcleos cuja origem são substâncias cumarínicas. No plano da fotoquimioterapia, a puvaterapia é reconhecida no meio médico para o tratamento de várias doenças da pele, e aprovada pelas agências reguladoras, apesar de apresentar alguns efeitos colaterais como eritema, fototoxicidade e até a possibilidade de desenvolvimento de câncer. Substâncias psoralênicas como 5-metoxipsoraleno (5-MOP) E 8-metoxipsoraleno (8-MOP), derivados furanocumarínicos lineares, são usados nos tratamentos de psoríase, vitiligo, dermatite atópica e várias outras doenças da pele (JAMALIS *et al.*, 2020).

Esquema 1 – Estrutura química do bergapteno.



Fonte: a autora.

A estrutura química dos bergaptenos mostra que apresenta duplas conjugadas ao anel benzênicos, o que lhe confere uma grande estabilidade. No entanto, estas duplas quando irradiadas no UV, são susceptíveis a reações pericíclicas de ciclo adição [2 + 2], onde a timina é a molécula mais frequente. Nas cicloadições ocorre a quebra de duas

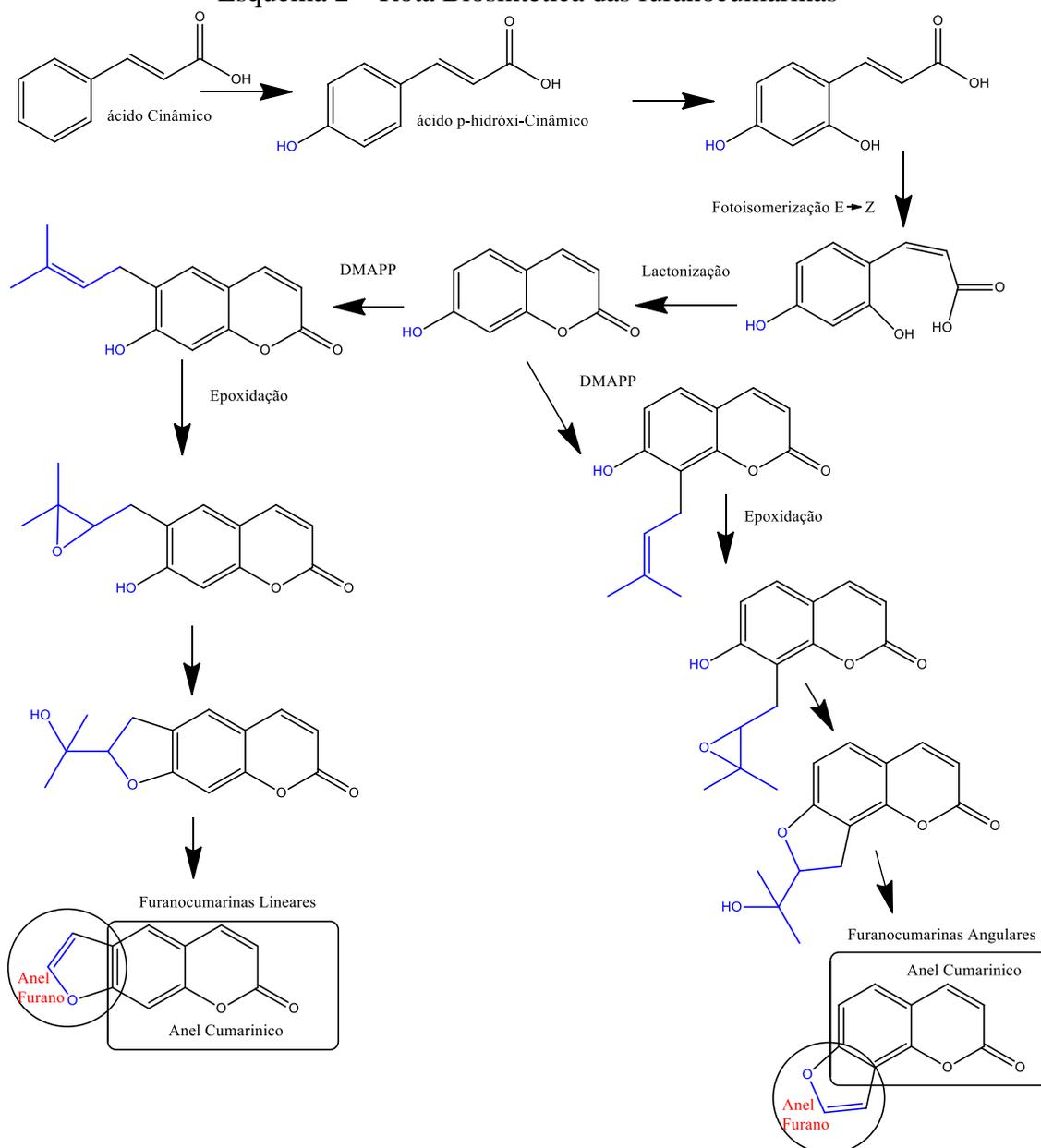
ligações  $\pi$  e a formação de duas novas ligações  $\sigma$ , mostrando transformação estrutural, pois seus elétrons se reorganizam, envolvem energia sob a forma de radiação e a formação de um aduto. Esta configuração pode levar a formação de um fotoproduto, caso esta irradiação ocorra frente a um reagente tal como as bases pirimidinas constituintes do DNA (PEREIRA, 2014).

Esta importante reação implica na fotoligação entre o fotossensibilizador, os monômeros de DNA e a formação de furanocumarinas – nucleobase, o que impede que as células lesadas se multipliquem. Como descrito, o mecanismo é conhecido como fotoreação de cicloadição [2+2]. Segundo Woodward-Hoffmann, as condições cíclicas são reações pericíclicas que termicamente não acontecem, mas permitidas quando em fotoexposição (SERRANO-PEREZ; MERCHÁN; SERRANO-ANDRÉS, 2008).

As moléculas de psoraleno formam complexos com DNA através da mistura entre furanocumarinas e pares de bases de ácido nucleico. Ao serem irradiadas por UVA [2+2] ocorre fotocicloadição com as bases pirimidinas, especialmente com a timina já citada, envolvendo uma ou as duas fitas de DNA. Podem ocorrer lesões de curto e longo prazo. As angelinas, substâncias psoralênicas, podem reduzir efeitos colaterais do tratamento e até mesmo a genotoxicidade (VIOLA *et al.*, 2004).

O Esquema 2 mostra a rota biossintética das furanocumarinas.

Esquema 2 – Rota Biosintética das furanocumarinas



Fonte: a autora.

Desta forma, evidencia-se a necessidade de tornar possível o desenvolvimento de produtos de uso tópico com o extrato do *B. Gaudichaudii* enquanto fotossensibilizante, de forma a tornar o tratamento mais efetivo e vantajoso para o paciente, uma vez que a via tópica evita efeito de primeira passagem pelo fígado, o que pode alterar ou modificar a ação desejada do FS. Assim, torna-se importante o reconhecimento das questões anatomofisiológicas da pele e o seu mecanismo de permeação.

### 3 PELE

A pele é o órgão mais extenso do corpo humano com superfície média de 2 m<sup>2</sup>, perfazendo 15% do peso corporal. Recobre uma complexa rede de vasos, artérias, ligamentos, proteínas de sustentação e nervos. Comunica-se com o exterior sem deixar de mostrar as manifestações de órgãos interno, tais como fígado, intestino, rins, entre outros, além de manifestar doenças, relacionadas ao hipotireoidismo e doença de Cushing, por exemplo (WONG *et al.*, 2016). Apresenta uma estrutura que possui uma microbiota e bioquímica próprias. Possui capacidade antioxidante contra a radiação UV, através da síntese de melanina; sintetiza vitamina; protege o organismo de traumas, toxinas, bactéria e, também, de extremos de temperatura que podem causar desequilíbrios pela perda significativa de fluídos corporais, de forma a manter a homeostase, inclusive imunológica. Pela riqueza de receptores cutâneos, podemos manifestar sensações de dor (terminações nervosas livres); calor (corpúsculo de Ruffini); frio (Corpúsculo de Krause); tato leve (Corpúsculo de Messner), e pressão profunda (Corpúsculo de Vater-Paccini) (GOULD, 2018).

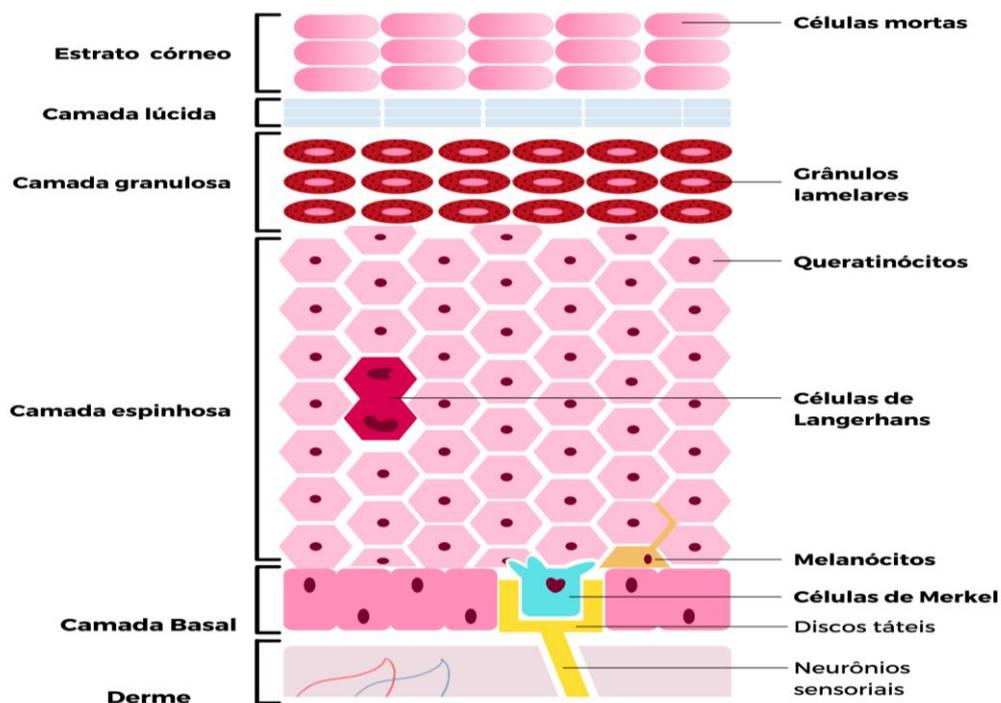
Possui um ritmo circadiano próprio e individual relacionado e que influi na pigmentação cutânea, no crescimento dos cabelos e na qualidade das células progenitoras da epiderme (*stem cells*). Da mesma forma, a farmacocinética e a toxicologia são temas importantes que estão relacionados às questões que envolvem produtos aplicados na pele, auxiliando em diagnósticos e tratamentos (MATSUI *et al.*, 2016; SOUZA; ANTUNES JUNIOR, 2020).

A epiderme, camada mais externa, apoia-se na derme. Composta por um tecido escamoso estratificado, promove a barreira entre o meio externo e o meio interno. Encontram-se células em constante diferenciação. É através da camada ou estrato mais profundo, estrato basal, que as células são encaminhadas para a camada mais externa, o estrato córneo, onde percebemos a descamação. Neste percurso, logo após o estrato basal, encontra-se o estrato espinhoso, granuloso, lúcido (encontrado na região palmar e plantar) e, finalmente, o córneo. Estudos mostram que existe, ainda, uma população biótica, considerada uma sexta camada na epiderme. A microbiota local, rica em vários tipos de microrganismos (ZEEUWEN *et al.*, 2013), está associada ao sistema imune,

cuja alteração pode causar várias doenças inflamatórias, entre elas a psoríase (CHANG *et al.*, 2018).

O estrato basal está em contato com a junção dermo-epidérmica; rico em células com intensa atividade mitótica e que promovem a renovação celular, entre 21 à 35 dias. Em doenças descamativas, como a psoríase, esta renovação celular pode chegar a ser efetivada entre 4 à 7 dias, promovendo lesões características, como uma casca esbranquiçada. Encontram-se, na região basal, melanócitos que produzem melanina relacionada a proteção antioxidante natural da pele e a ao fototipo cutâneo. Neste estrato também são encontradas as células de Merkel (percepção de toque). Acima do estrato basal está o estrato espinhoso que produz queratina e dá sustentação ao tecido. Seus principais tipos celulares são as células de Langerhans (células imunológicas) e as células de Malpighi. Posteriormente ao estrato espinhoso temos o estrato granuloso, onde observa-se ausência de núcleo na célula e citoplasma granular, basicamente pelo aumento de queratina local, mas onde há significativa quantidade de água e nutrientes, situação ausente em casos de psoríase. Finalmente, o estrato córneo se apresenta rico em corneócitos, células que fazem a proteção contra a perda de água transepidermal por camadas, usando o manto hidrolipídico como recurso, e onde visualizamos a descamação natural da pele. Na psoríase, o estrato córneo se apresenta sem a função barreira, a camada córnea mostra-se dilatada de forma a perder significativamente a água endógena, dando aparência esbranquiçada na região da pele onde a psoríase se manifesta (GOULD, 2018; SOUZA; ANTUNES JUNIOR, 2020).

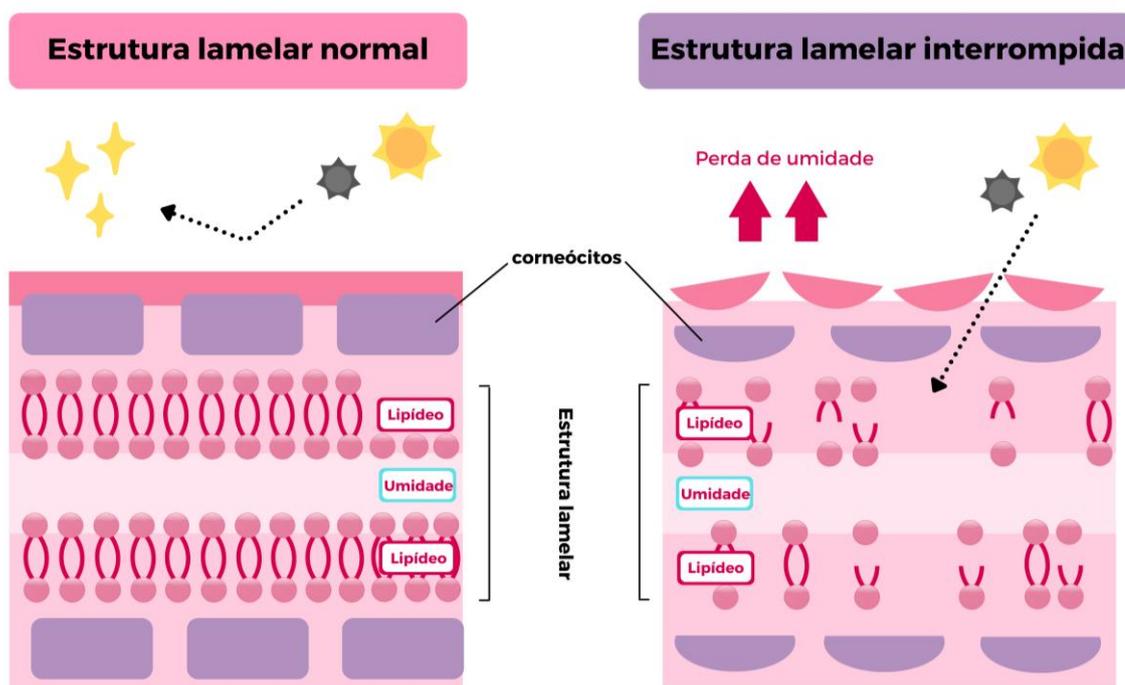
Figura 4 – Camadas celulares da epiderme.



Fonte: a autora.

São justamente as células da camada córnea que com o material lipídico e hídrico das glândulas sebáceas e sudoríparas compõem a barreira da pele, apresentando microbiota própria. Este material hidrolipídico está organizado em estruturas lamelares como mostra a Figura 5. Esta barreira cutânea, normalmente muito eficaz, pode ser influenciada por agentes poluentes, excesso de radiação ultravioleta, uso de cosméticos ou produtos domissaniantes, medicamentos, além de várias doenças, muitas causadas pela questão da mudança da biota da pele. A desestabilização das bactérias que são imunoreguladoras, tais como *Staphylococcus epidermidis* e *Propionibacterium acnes*, promovem o aumento de patógenos como o *Staphylococcus aureus* que podem promover ações inflamatórias ao tecido cutâneo e, em algumas doenças como a psoríase, exacerbar linfócitos Th 17 e as citocinas pró-inflamatórias IL-17 (CHANG *et al.*, 2018).

Figura 5 – Estrutura lamelar normal e interrompida do estrato córneo



Fonte: a autora.

Dando continuidade as relações anatômicas da pele temos a derme, que está dividida em derme papilar, próxima a camada basal da epiderme, e a derme reticular, próxima a hipoderme. Sua riqueza celular são os fibroblastos, produtores de fibras colágeno e elastinas, ácido hialurônico, que dão estrutura e flexibilidade, resistência, elasticidade à pele. No meio das fibras está a Matriz Extra Celular (MEC), substância gelatinosa rica em glucosaminoglicanas, ácido hialurônico, sulfato de condroitina, entre outras substâncias e que garantem a hidratação da pele, fundamental para evitar inúmeras doenças da pele que se manifestam por ressecamento, como a psoríase (LANE, 2013).

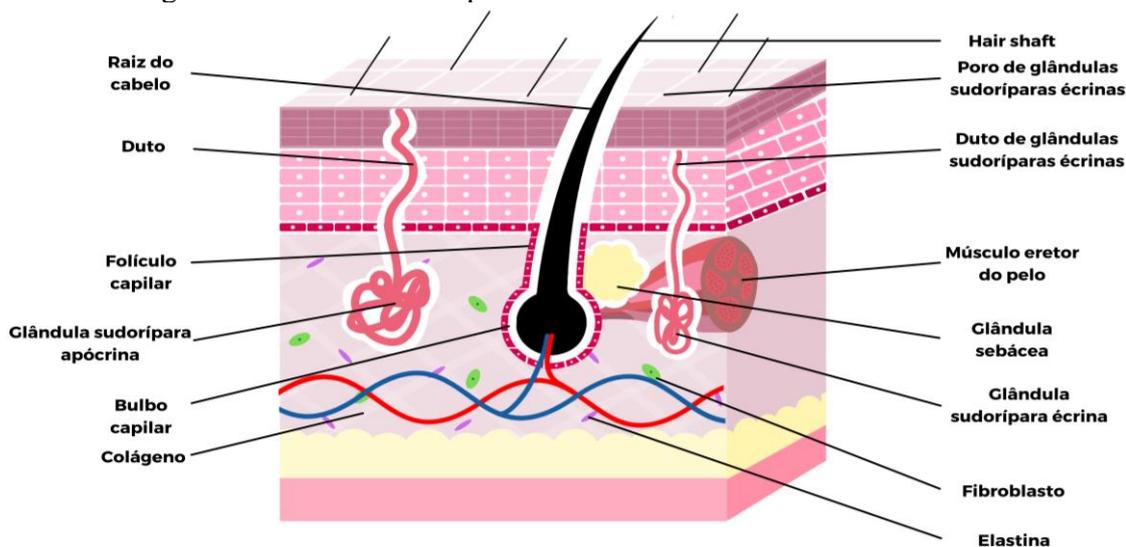
É na derme que encontramos os anexos cutâneos, glândulas sebáceas e sudoríparas (apócrinas e écrinas) folículo piloso e as unhas. O folículo piloso, músculo eretor do pelo e as terminações nervosas, juntos, formam a unidade pilosebácea envolvida na manutenção e regulação da temperatura da pele (LOSQUADRO, 2017).

Apesar de emergirem da derme, como mostra a Figura 6, os folículos pilosos atravessam a epiderme até a superfície. Estão intimamente relacionados ao músculo eretor e as glândulas sebáceas que, através de um ducto, liberam uma mistura de colesterol e triglicerídeos denominado sebo cutâneo, cuja finalidade é proteger a pele,

além de proteger contra danos bacterianos. É regulada por estímulos hormonais androgênicos. Em associação as glândulas sudoríparas que liberam o suor, constroem o manto hidrolipídico, agente que mantém a epiderme protegida contra agressões externas e a perda de água transepidermal (no inglês, *TEWL – transepidermal water lose*). Glândulas sudoríparas écrinas estão espalhadas por todo o organismo, e as apócrinas espalhadas na região axilar, genital e mamária. As glândulas apócrinas possuem estimulação hormonal. Porém, não estão associados somente a construção do manto hidrolipídico, mas a manutenção da temperatura (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Finalmente, a hipoderme, considerada anexo subcutâneo da pele. Nesta camada, assentam-se a epiderme e a derme. Aqui os adipócitos são formados para armazenar energia e proteger o organismo de choques e traumas, além da questão do isolamento térmico que a camada promove (WONG *et al.*, 2016).

Figura 6 – Estruturas da epiderme e derme com anexos cutâneos.



Fonte: a autora.

### 3.1 Importância da pele como via de administração cutânea e as formas farmacêuticas ideais para incorporação do extrato lipossomado de *B. gaudichaudii*

A pele, como visto anteriormente, é a grande barreira protetora e seletiva do organismo humano. Normalmente, os anexos cutâneos e a epiderme íntegra permitem a

difusão de algumas substâncias ativas. São reconhecidas 3 vias de penetração de substâncias. São elas:

Via intracelular, onde a substância ativa penetra através das células queratinosas. A passagem, neste caso, é dificultada pela queratinização celular; via intercelular, onde a substância ativa passa e se difunde pela matriz lipídica; via folicular, ou seja, através dos folículos pilosos, das glândulas sebáceas e sudoríparas. Considerada uma via de grande importância para permeação de substâncias ativas, pois é uma região rica em capilares sanguíneos, onde estão as células progenitoras (*stem cells*), além da região ser cercada por células dendríticas. Toda essa configuração pode facilitar a permeação sistêmica (LADEMANN, 2011).

A via de administração cutânea é bastante pesquisada quando se pensa no desenvolvimento de cosmeceuticos ou medicamentos. A via tópica é uma das vias mais atrativas, mesmo que a pele seja considerada uma barreira bastante eficaz. Apresenta algumas vantagens quando comparada com outras vias de administração de agentes fotossensibilizantes: não há diminuição da disponibilidade do agente fotossensibilizante, pois não há efeito de metabolismo de primeira passagem. Pode apresentar efeito sistêmico, caso o veículo seja transdérmico (absorção percutânea) e, neste caso, a pele não é o único órgão-alvo. Para o desenvolvimento de formulações transdérmicas usamos agentes promotores de absorção, como dimetilsulfóxido (DMSO), etanol, propilenoglicol, glicerina, polietilenoglicol, ureia, lecitina, terpenos e polaxamer. (ALLEN; POPOVICH; HOWARD, 2013). Soluções e pomadas podem não ser a melhor forma farmacêutica para a disponibilização de ativos para a pele (BRASIL, 2010b).

As emulsões apresentam dispersão de pequenos glóbulos de um líquido (normalmente lipossolúvel) que estão distribuídos em um veículo (normalmente hidrossolúvel), pelo qual não apresenta miscibilidade. Para que isso seja possível, utilizamos surfactantes ou tensoativos que quebram a tensão superficial entre os líquidos imiscíveis de modo a reduzir a tensão superficial entre eles. Desta forma, os tensoativos transformam substâncias em micelas, diminuindo a tendência a agregação e a coalescência, o que pode favorecer a quebra da emulsão (ALLEN; POPOVICH; HOWARD, 2013).

Formulações emulsionadas permitem incorporação de substâncias lipo ou hidrossolúveis e as lipossomadas. Com base em sua composição de ingredientes, podem apresentar ainda mais afinidade pelo manto hidrolipídico. Podem ser O/A (fase interna oleosa/fase externa aquosa, que fornece sensação refrescante ao ser aplicada na pele além de ser fácil de remover quando desejado, ou A/O (fase interna aquosa/ fase externa oleosa), que fornece sensação de untuosidade ao ser aplicada na pele, dependendo dos agentes terapêuticos incorporados, assim como do efeito emoliente dos ingredientes listados, e das condições da pele que irá receber a formulação. A absorção percutânea pode ser aumentada com a redução do tamanho das micelas na formulação e com o uso de lipossomas (THOMPSON; DAVIDOW, 2013).

O desenvolvimento de emulsificantes derivados de óleo de oliva é um movimento internacional e que atende aos conceitos de desenvolvimento de produtos naturais ou fitocosméticos. A afinidade pelas estruturas da pele (biomimetividade) e os benefícios adicionais como manutenção da hidratação e sensorial adequado, promovem adesão por parte do paciente, além de atender aos conceitos de sustentabilidade e aprovação regulatória (SOUZA; ANTUNES JUNIOR, 2020).

Ativos lipossomados, quando incorporados em emulsões cujos ingredientes são de origem natural, podem colaborar com o desenvolvimento de fitocosméticos ou fitomedicamentos, pois os lipossomados evitam a degradação do ativo, reduzem toxicidade, e apresentam afinidade por membranas celulares que também são constituídas de camadas bilipídicas. Por outro lado, promovem aumento da solubilidade do ativo e a sua disponibilidade na base, além de melhorar a liberação do ativo na pele (SARAF *et al.*, 2015).

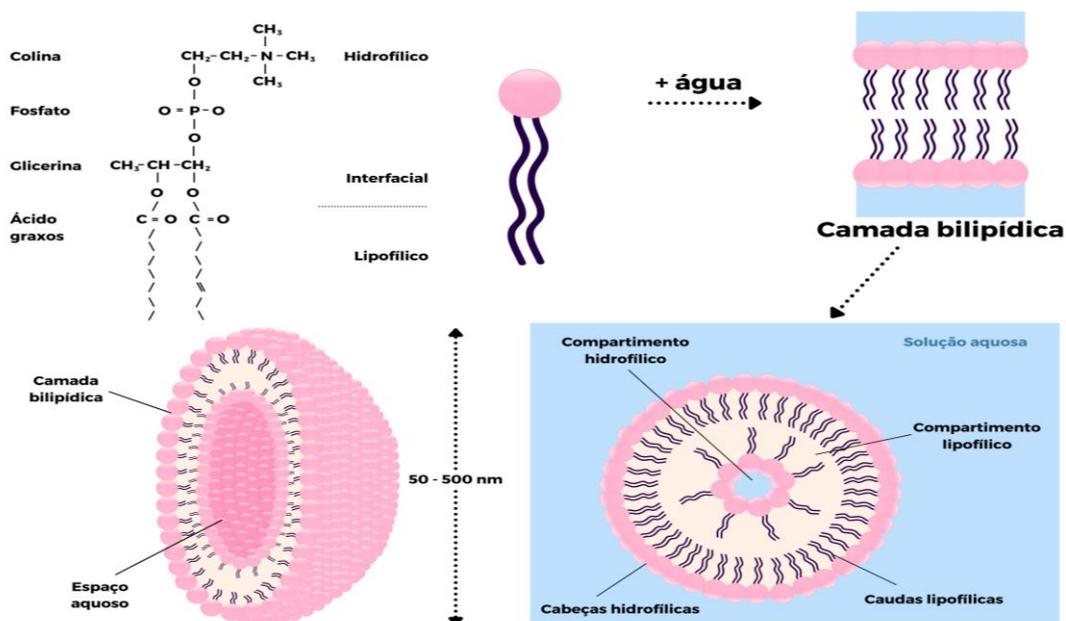
## 4 LIPOSSOMAS

Os últimos 30 anos mostraram avanços consideráveis nas ciências da pele. Considerada uma barreira eficiente, hoje é percebida como uma via de aplicação de medicamento elegível para inúmeras necessidades. O sistema lipossomado deve ser considerado nos desenvolvimentos onde se pretende a permeação de substâncias para camadas mais profundas da pele (CARITA *et al.*, 2018).

Lipossomas são sistemas biomiméticos de constituição simples, normalmente fosfolipídios de origem sintética ou natural. Os fosfolipídios também constituem as membranas biológicas, em dupla camada bilipídica (DETANICO; TEIXEIRA; SILVA, 2010).

Grande número de ativos dermatológicos, principalmente os fotossensibilizantes, são questionados quanto a sua segurança e estabilidade e, por isso, passam pelo processo de transformação em lipossomas. Lipossomas são vesículas microscópicas compostas por moléculas anfifílicas de dupla configuração, possuem estrutura que apresenta cabeça polar e hidrofílica, com o outro posterior apolar, portanto, lipofílica, e cercada por compartimentos. Possibilita a inserção de material hidrossolúvel e lipossolúvel no seu interior esférico, como mostra a Figura 7.

Figura 7 – Estrutura molecular de um lipossoma.



Fonte: Adaptado de De Leeuw *et al.* (2009).

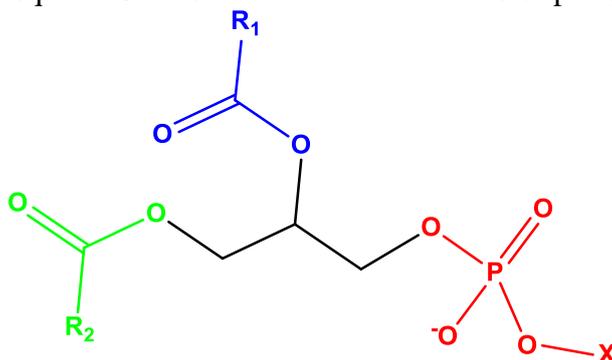
Foi somente nos anos 80 que os lipossomas foram usados como *drug delivery* para aplicação tópica, no tratamento de disfunções da pele, concluindo que a lipossomagem dos ativos modifica a absorção percutânea, diminuindo a concentração do ativo na epiderme e na derme, onde a atividade é desejada, o que pode significar mais segurança ao uso (MEZEI; GULASEKHARAN, 1980). Não são tóxicos, são biodegradáveis, compatíveis com a pele, além de reduzir possíveis irritações. Podem carregar em suas vesículas substâncias hidrossolúveis no seu interior e lipossolúveis em sua bicamada, promovendo estabilidade ao ativo, mostrando eficácia na permeação cutânea (MERTINS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2019).

Os lipossomas são classificados em três grupos: lipossomas multilamelares (MLV), unilamelares (SUV) e grandes unilamelares (LUV). O MLV possui camadas concêntricas onde há compartimentos aquosos e que apresentam diâmetros variados, entre 400 à 3500 nm. SUV possui somente uma bicamada e um espaço para substâncias hidrossolúveis bem reduzido, sendo o diâmetro entre 20 e 50 nm. Finalmente, LUV possui somente uma bicamada, grande espaço para substâncias hidrossolúveis e diâmetro entre 200 e 1000 nm (CHORILLI *et al.*, 2007).

#### 4.1 Lipossomas feitos de lecitina de soja

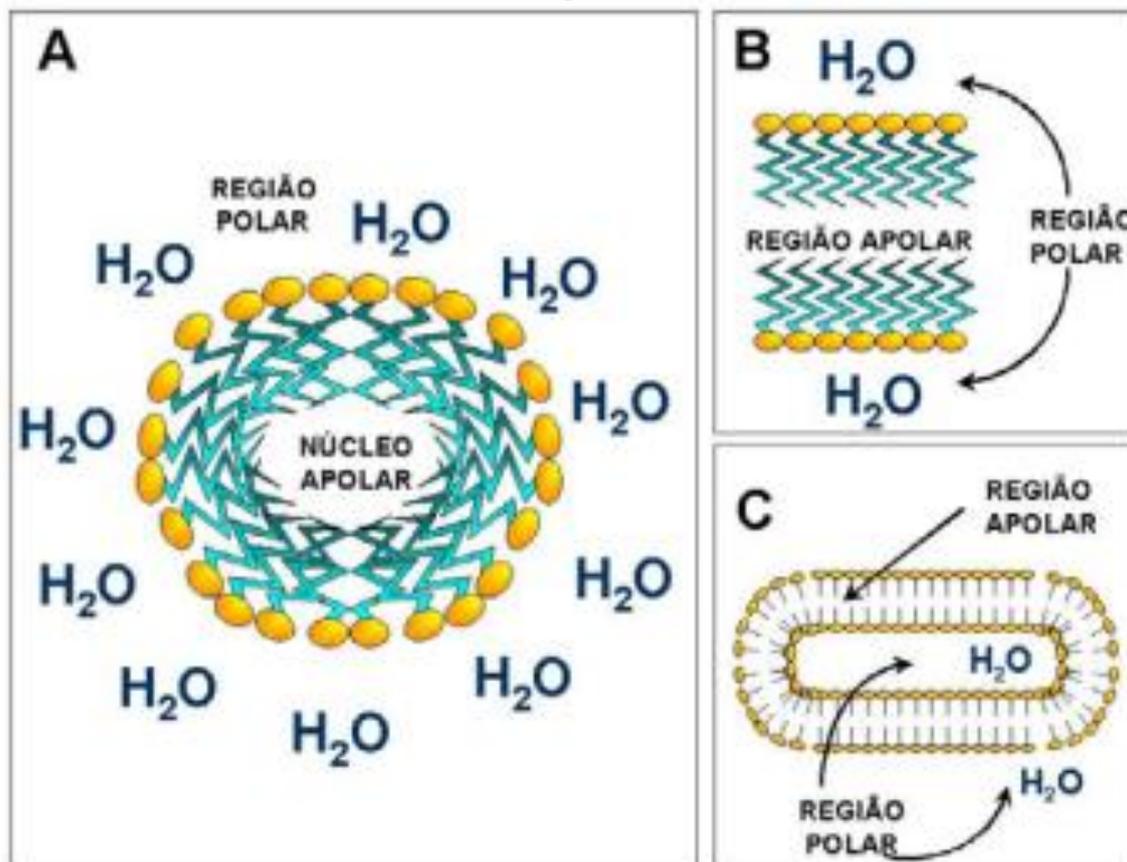
Fosfolipídios constituem a maioria das membranas biológicas. Por possuir cabeça polar, a comunicação entre o líquido intracelular e extracelular é viabilizado pela camada bilipídica. Graças as proteínas, a membrana celular associa-se a fração polar e apolar dos fosfolipídios. Possuem estrutura semelhante aos triglicerídeos. São moléculas com características zwitteriônicas, onde temos cabeça polar e cauda apolar. O grupo X, como está representado no Esquema 3, pode ser  $-H$ , sendo o mais comum é o ácido fosfatídico; porém, a etanolamina, a colina, serina, inositol, glicerol ou fosfatidilglicerol também podem estar no grupo X. Desta forma, a nomenclatura será fosfatidil mais o nome de outro componente. A lecitina pode se referir a vários materiais graxos como os fosfolipídios derivados de inositol, colina, etanolamina, e ainda, triglicerídeos e glicolipídios.

Esquema 3 – Estrutura molecular de fosfolipídio.



Fonte: a autora.

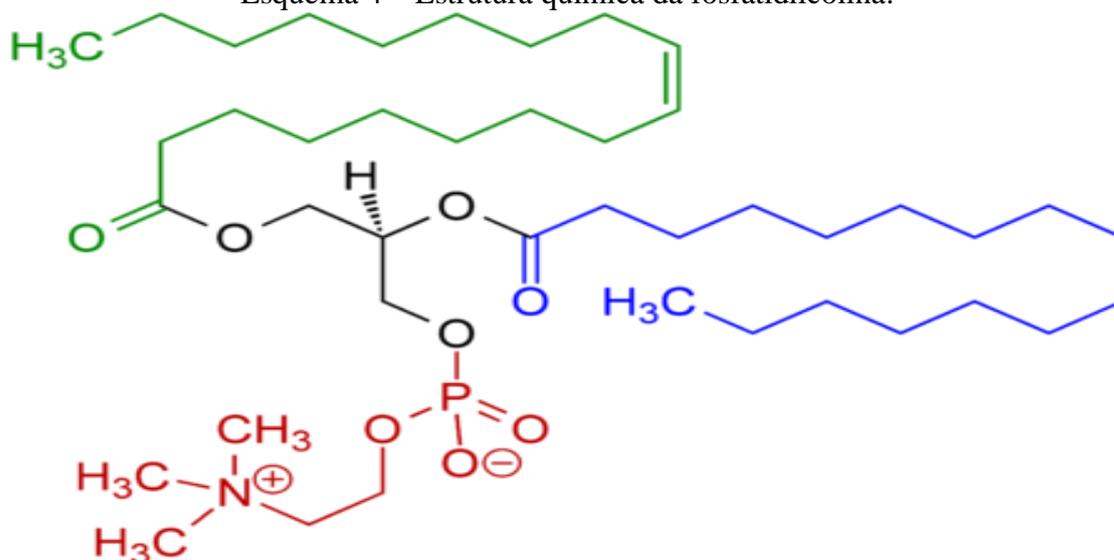
Figura 8 – Arranjo estrutural micelar dos lipídios em solução aquosa. A) micela globosa; B) bicamada lipídica; C) bicamada lipídica em forma de membrana separando dois ambientes líquidos distintos.



Fonte: adaptado de Nelson e Cox (2011).

Bioquimicamente falando, lecitina refere-se a fosfatidilcolina pura. Os sistemas de administração que se utilizam de lipossomas derivados da lecitina são promissores, não só pela compatibilidade cutânea, mas pela estabilidade que promove do ponto de vista da produção do lipossoma (LE *et al.*, 2019).

Esquema 4 – Estrutura química da fosfatidilcolina.



Fonte: a autora.

#### 4.1.1 Mecanismo de permeação dos lipossomas na pele

Três mecanismos podem explicar a permeação dos lipossomas na pele:

- a) a via de difusão lateral justifica que a estrutura dos lipossomas é muito similar ao do estrato córneo, rico em fosfolipídios endógenos, que por semelhança e afinidade facilita a difusão entre estratos da camada epidérmica, em grandes extensões. Pode resultar em aumento da absorção da droga e na diminuição da eliminação da droga, o que pode explicar que os lipossomas agem como transporte e, também, podem ser usados como localizadores, pois ao se fundirem com membranas celulares conseguem colocar a droga exatamente no citoplasma celular;
- b) a via transepidermal é explicada pelo gradiente osmótico e a força de hidratação do tecido. Desta forma, os lipossomas são enviados às camadas profundas da epiderme. Em formulação oclusiva, onde ocorre a concentração máxima de hidratação, a permeação dos lipossomas é dificultada, o que explica a importância do veículo na formulação de lipossomas;
- c) a via unidade pilosebácea, considerada pela sua riqueza em capilares sanguíneos (DE LEEUW *et al.*, 2009).

## 5 PSORÍASE E A TERAPIA FOTODINÂMICA

Psoríase é uma doença ainda não totalmente elucidada e que acomete aproximadamente 125 milhões de pessoas no mundo. Apresenta-se como uma doença imunomediada, genética e epigenética, associada a disfunções outras como as doenças cardiometabólicas, doenças mentais, depressão, doença celíaca, doenças intestinais inflamatórias e artrite, que se caracteriza por ter queratinócitos hiperproliferados mediados por citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina IL-17A, IL-17C, IL-17F, IL-22, interferon IFN- $\gamma$ , entre outras citocinas, neutrófilos e mastócitos, células inatas que ativadas manifestam eritema e placas descamativas esbranquiçadas ou avermelhadas; descamação excessiva na pele, com pápulas, com manifestações de pruridos e dor (BHATIA *et al.*, 2014; WEIGLE; MCBANE; PSORIASIS, 2013). Pode acometer qualquer parte do corpo, com predominância nos joelhos e cotovelos, couro cabeludo, tronco, nádegas, axilas, unhas, região plantar dos pés e área genital. Esta situação é causada pela perda de água transepidermal excessiva, perda do manto hidrolipídico, aumento do pH cutâneo e a ruptura na estrutura das células da camada córnea, que torna a pele altamente permeável à água. O aumento do pH cutâneo promove aumento de descamação da pele. Lembrando que o pH ideal da pele gira em torno de 5,0 a 6,0, portanto mais ácido. Apesar da doença não ser contagiosa, influencia o psicológico do portador, seja ele criança ou adulto (BLAUVELT; CHIRICOZZI, 2018).

Segundo a OMS, em documento nomeado “Relatório global sobre a psoríase” (2016), a evolução é imprevisível e impacta a saúde pública e econômica, sugerindo a elaboração de políticas públicas para elaboração de cuidados de saúde e elaboração da inclusão social dos indivíduos acometidos. O não comprometimento das autoridades públicas leva não somente às questões acima descritas, mas ao ônus sócio-econômico-educacional. Pacientes psoriáticos perdem pelo menos 5 dias de trabalho ao ano em virtude da doença; pacientes em idade escolar relatam ausência da escola quando acometidos em fase aguda. Desta forma, percebemos a importância destas ausências para os contribuintes de impostos, para educação, pacientes e a sociedade como um todo. Estes fatos fazem a psoríase ser um assunto de interesse médico e científico

quando falamos do desenvolvimento de novas possibilidades de tratamento (AUGUSTIN *et al.*, 2008).

As opções de tratamento são diferentes para os diferentes graus de psoríase, sejam sistêmicos ou tópicos. Dentre os de uso tópico, os corticoides são considerados padrão ouro de tratamento. Porém, a que se observar que os corticoides possuem potências variadas e apresentam afinamento típico na pele, inviabilizando a continuidade do uso após curtos espaços de tempo, além de sensibilizarem o tecido cutâneo promovendo perda de água transepidermal. Os medicamentos análogos da vitamina D podem ser uma opção, desde que o paciente não apresente problemas renais; ácido salicílico, usado como queratolítico e a TFD também são opções. Substâncias psoralênicas como 5- metoxipsoraleno e 8- metoxipsoraleno são amplamente usados em casos de psoríase e outras manifestações cutâneas. Todos os tratamentos, isolados ou combinados, apresentam limitações. A TFD *narrowband* UV-B, psoralen e UVA (PUVA) foi bastante usada antes do surgimento desses medicamentos. O tratamento com UV-B é ainda superior ao PUVA porque, segundo Armstrong e Read (2020), consegue diminuir a síntese de DNA e, também, a produção de citocinas pró-inflamatórias realizada pelas células T.

A TFD baseia-se no uso tópico ou sistêmico de um agente atóxico, fotossensibilizante e que, seguido por irradiação não ionizante, em determinado tempo e comprimento de onda, pode originar espécies reativas como oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). O oxigênio singlete afeta o tecido de modo a causar apoptose somente no ponto foco de tratamento (BRUSCH; DA SILVA; ROSSETO, 2019).

Envolve a parte ultravioleta do espectro eletromagnético:

- a) UVA, atua entre 320 e 400 nm;
- b) UVA-1 atua entre 340 -400 nm;
- c) UVA utilizado com um sensibilizador psoralênico ou não (PUVA) considerada banda estreita; parece ser mais eficaz que UVB- Banda larga, e pode ser reconsiderada quando não houve resposta ao UVB.
- d) UVB atua entre 280 - 320 nm;
- e) Ultravioleta banda larga (BL) atua entre 270 – 350 nm,
- f) Ultravioleta banda estreita (BE) atua entre 311 – 313 nm, recomendado para pacientes grávidas (CAMPBELL, 2020).

Prasad e colaboradores (2020) afirmam que a TFD é segura o bastante para atender vários tipos de patologias, entre elas a psoríase, não somente pelo baixo custo, mas pela eficácia quando comparada ao tratamento tópico e oral tradicionalmente usados, pelas múltiplas contraindicações que possuem. É preciso um fotossensibilizante para que o processo ocorra. Em UV- BE temos a ação da luz em 313 nm, onde ocorre o máximo de absorção do bergapteno, principal componente do *B. gaudichaudii*. A associação de um produto natural rico em cromóforos com a TFD pode ser benéfico para o portador de várias doenças de pele.

A TFD vem atraindo interesse de várias especialidades médicas. A área dermatológica usa a TFD como recurso terapêutico no tratamento de câncer de pele, queratose actínicas, vitiligo, dermatite atópica e psoríase, além de várias outras condições inestéticas da pele, tais como acne, fotoenvelhecimento, rosácea e comprometimento fúngico nas unhas ou onicomicoses. Vários trabalhos mostram a efetividade do tratamento, comparando fotossensibilizantes, técnicas e tempo de aplicação nos diferentes tipos de lesões. No entanto, esta não é uma ciência nova, pois os egípcios do Antigo Egito, já conheciam a prática da exposição à luz do sol associada a plantas fotossensibilizantes, ricas em psoralenos, para o tratamento de vitiligo e psoríase. Mas, foi somente no início do século XX, na Alemanha, que as pesquisas envolvendo a TFD evoluíram. Estas pesquisas, realizadas por Oscar Raab e Herman Von Tappeiner, envolviam protozoários (*Paramecium caudatum*) expostos à luz e corados por corante acridina, um antisséptico tradicionalmente usado em farmácia. A luz emitida acidentalmente modificou a ação do corante, identificando-o como um fotossensibilizante (DEPRY *et al.*, 2015). Posteriormente, os pesquisadores descobriram que havia a necessidade de oxigênio para que a reação acontecesse, dando início ao que conhecemos ação fotodinâmica, que promove processo de sensibilização dependente de oxigênio. A eosina a 5% também foi testada posteriormente pelos pesquisadores, supondo que depois de incorporada ao sistema celular, a substância poderia reagir com citotoxicidade à exposição de luz determinada, e em presença de oxigênio (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Em 1911 os efeitos fototóxicos e fotossensibilizantes da hematoporfirina foram descritos e, dois anos mais tarde, a porfirina foi testada em humanos. Consta que Friedrich Meyer-Betz aplicou em suas próprias mãos o produto.

Entre as décadas de 1950/1970 os derivados do fotossensibilizante hematoporfirina foram sintetizados (acetilação e redução de hematoporfirina, duas vezes mais fototóxicos quando comparados ao hematoporfirina (nomeada Hematoporfirina derivada – DHp). Na sequência das pesquisas, foram sintetizadas duas substâncias fotossensibilizantes que vieram a ampliar o uso e o conhecimento sobre a TFD: ALA (ácido 5-aminolevulínico) e a MAL (Metil aminolevulinato) um éster lipofílico, que ao ciclizar enzimaticamente, ambos produzem protoporfirinas. Outras drogas surgiram, como os derivados de benzoporfirinas, fitalocianinas, clorinas e porfírenos, além das drogas vegetais ricas em psoralenos (FERNANDES, 2007).

Do início do século XX até os anos 90, a TFD esteve restrita à poucos tratamentos dermatológicos e alguns tratamentos de câncer. Foi somente no final dos anos 90 que os benefícios da TFD alcançaram de modo exponencial às outras áreas médicas, pois apresenta uma possibilidade não invasiva de melhora do quadro, como é o caso das quimioterapias e radioterapias propostas para a área oncológica (MARRELLI *et al.*, 2014).

A evolução histórica até o presente demonstra não somente o crescimento da TFD mas, também, dos sensibilizantes utilizados, como mostra a Figura 9.

Figura 9 – Apresentação da história da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: adaptado de Dolmans, Fukumura e Jain (2003).

## 6 MECANISMO DE AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA

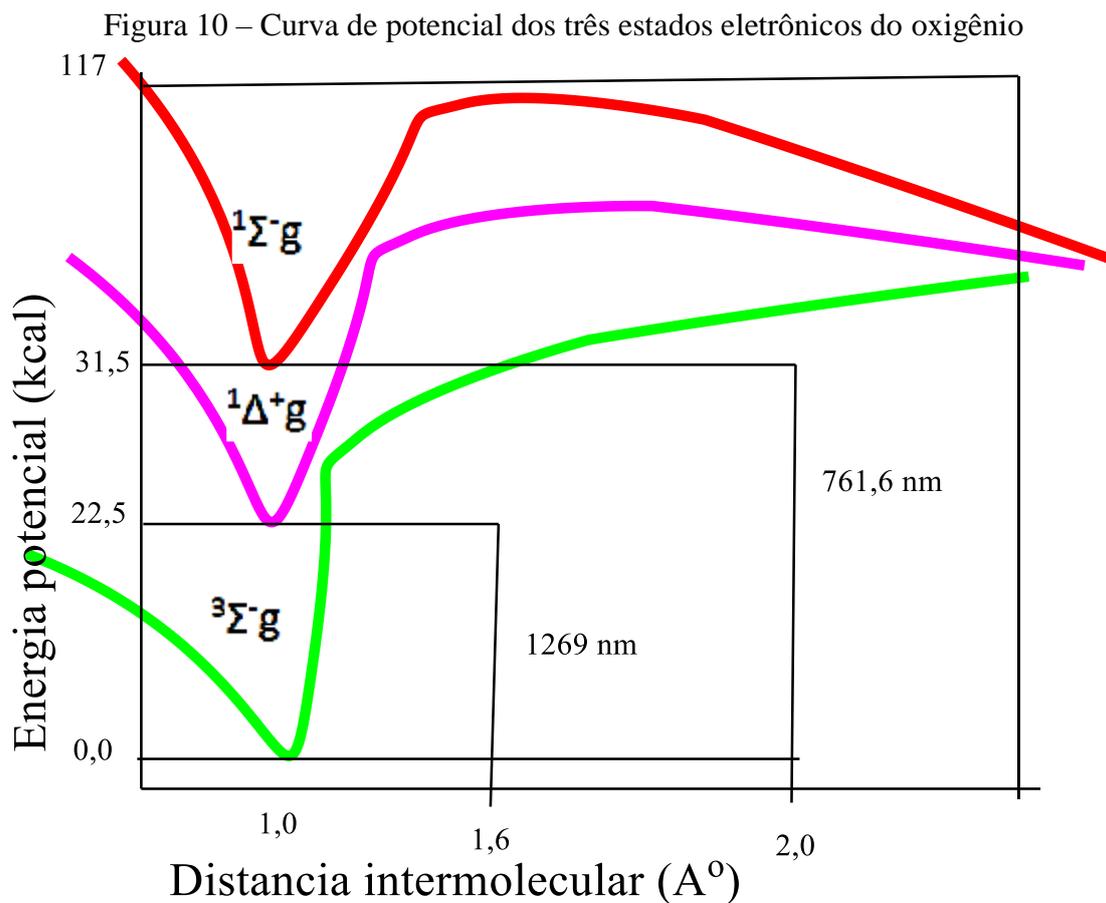
A TFD tem como premissa a aplicação sistêmica ou tópica de um fotossensibilizante não tóxico, natural ou não, que ao ser sensibilizado por determinado comprimento de onda se acumula no tecido alvo, provocando a destruição celular. Após a permeação a membrana celular, o FS é irradiado com determinado comprimento de onda que correspondente a uma banda de absorção do FS, promovendo o estado excitado (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

Existem dois mecanismos conhecidos que evidenciam a reação à sensibilização de biomoléculas. São chamados de tipo I e tipo II.

Tipo I – desencadeia cascata de reações oxidativas, por processos radicalares, que levam a morte celular. No estado excitado triplete (T1), o FS transfere energia para o tecido alvo de forma que um hidrogênio ou elétron leva a formação de radicais livres e ânions que interagem com O<sub>2</sub> que ficam no estado energético inicial, levando a formação de espécies reativas de O<sub>2</sub> (ROS), na forma de superóxidos, O<sup>2-</sup> no meio intracelular (ZHANG, *et al.*, 2018).

Tipo II – O fotossensibilizador, quando irradiado, atinge o estado excitados singlete, sofre cruzamento intersistema, por inversão de spin, atingindo o estado excitado triplete. O triplete apresenta maior tempo de vida, e pode transferir energia para a molécula de oxigênio pela secção de choque, produzindo oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), espécie de alta reatividade oxidativa (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

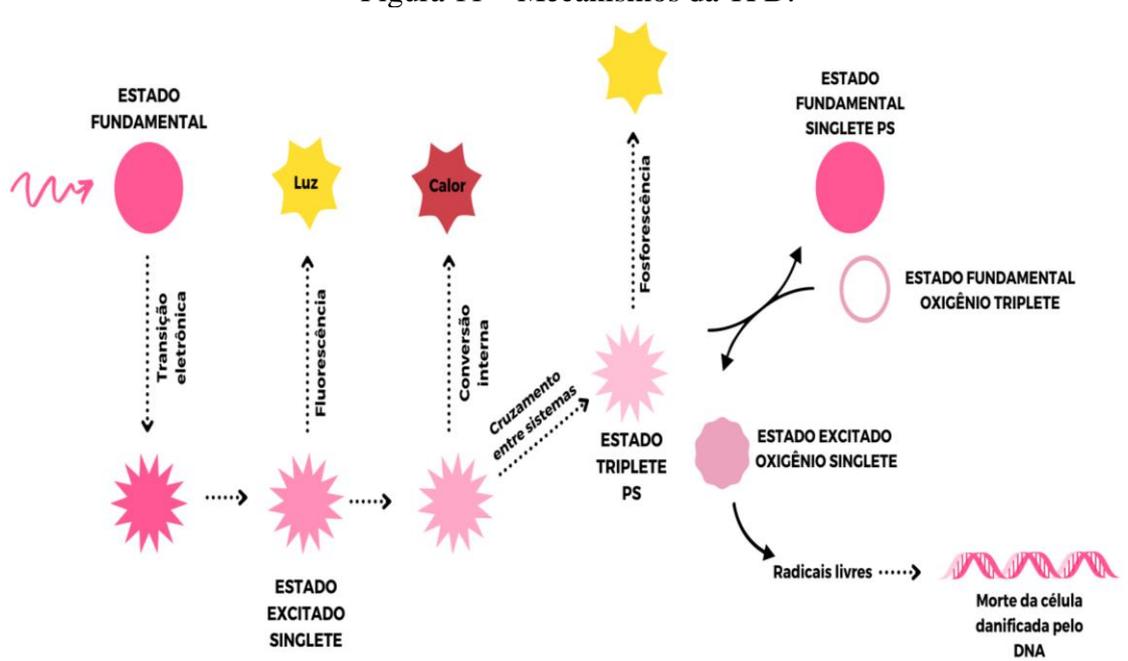
O oxigênio singlete possui dois estados eletronicamente excitados acima do oxigênio molecular no estado fundamental triplete, os estados <sup>1</sup>Δg e <sup>1</sup>Σg<sup>+</sup> (Figura 10). O estado fundamental triplete (<sup>3</sup>Σg<sup>-</sup>) apresenta os dois elétrons desemparelhados ocupando orbitais π de mesma energia, apresentando molécula birradical com uma ligação simples, enquanto que os estados excitados singlete, apresentam os dois últimos elétrons com spins opostos no mesmo orbital π (<sup>1</sup>Δg) ou em orbitais π diferentes (<sup>1</sup>Σg<sup>+</sup>) tendo assim uma ligação dupla entre oxigênio, como mostra a Figura 10. O estado <sup>1</sup>Δg possui um tempo de vida de 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-3</sup> s em meio aquoso e sua transição para o estado <sup>3</sup>Σg<sup>-</sup> é proibida por spin. O estado <sup>1</sup>Σg<sup>+</sup> apresenta um tempo de vida entre 10<sup>-9</sup> e 10<sup>-11</sup> s, sendo este desativado para o estado <sup>1</sup>Δg, já que sua transição é permitida por spin (DE ROSA, 2002)



Em decorrência do processo de transição em que o fotossensibilizador se encontra para o estado excitado tripleto, e por possuírem o mesmo spin, a energia é enviada para a molécula de  $O^2$ . A molécula de oxigênio no estado excitado é extremamente reativa. O Tipo I e o Tipo II ocorrem de forma simultânea, ou seja, quando um esgota o outro se inicia, sendo que o tempo de duração deles depende do agente que é usado para a fotossensibilização, assim como é importante a concentração do oxigênio e o material celular. A meia vida das espécies reativas e sua alta reatividade atacam somente células próximas perto de onde o ROS é gerado (ZHANG *et al.*, 2018).

Com o desenvolvimento da TFD e o interesse de pesquisadores pelo tema, crescem notadamente o número de substâncias fototóxicas de origem vegetal disponíveis para uso como fotossensibilizante para a terapia.

Figura 11 – Mecanismos da TFD.



Fonte: adaptado de Kwiatkowski *et al.* (2018).

## 6.1 Agentes fotossensibilizantes

O agente fotossensibilizante acumula-se em células lesadas após a administração tópica ou sistêmica. Posteriormente, o tecido sensibilizado é exposto a um comprimento de onda que coincide exatamente com o comprimento de onda de absorção do FS. Quando o estado de excitação é atingido, a energia se manifesta na forma de calor ou de fluorescência, ou seja, forma luminosa. Pode chegar ao estado triplete e ser desativado por fosforescência. O oxigênio singlete pode ser detectado por emissão luminosa ou por calor gerado; é citotóxico, faz falhas na membrana celular, altera permeação e libera fatores inflamatórios (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

## 6.2 Novos fotossensibilizantes de origem natural

De 2005 até 2010 mais de 19 drogas derivadas de plantas foram aprovadas para uso na TFD. Feoforbide A, derivado da clorofila comprimento de onda 410-668 nm, atua em diversos tipos de câncer; cúrcuma (*Curcuma longa*), comprimento de onda 300-500 nm, atua como anti-inflamatório, antioxidante e em diversos casos de câncer; antraquinonas, família das Rubiaceae, comprimento de onda 220-440 nm, atua em

câncer de mama (MANSOORI *et al.*, 2019). Outras fontes naturais de antraquinonas são *Poligonium cuspidatum*, *Heterophyllaea pustulata*, *H. Lycioides*, *Aloe vera*, *Rheum palmatum*, *Rumex crispus*, *Hipericum perforatum*, *Fagopyrum esculentum*. Tiofeno, isolado da planta *Echinops latifolius Tausch*, comprimento de onda 225-400 nm, possui efeito citotóxico e atua em câncer cervical e de pele. Outras fontes naturais de Tiofenos são *Asteraceae spp*, *Heliopsis*, *Arnica*, *Echinop Bidens*, *E. latifolius*, *Rhaponticum uniflorum* (IBRAHIM *et al.*, 2015). Hipericim, classe das perilenequinonas, derivada da naftodiantrona, possui propriedade fotossensibilizante gerada por processo oxidativo, no comprimento de onda entre 550-593 nm (JENDŽELOVSKÁ; KUCHÁROVÁ; FEDOROČKO, 2019).

Os alcaloides, que atuam em 360 nm, produzem foto-oxidação tipo I para TFD. Outras fontes naturais de alcaloides estão presentes em *Guatteria blepharophylla*, *Berberis vulgaris*, *Sanguinaria canadenses*, *Indigofera tinctoria*. Alguns alcaloides são ativados em pHs específicos. Estudos com as berberinas e seus alcaloides comprovam efeitos poucos efeitos colaterais; efetividade na geração de radicais livres na presença de luz (MUNIYANDI *et al.*, 2020).

As furanocumarinas atuam em 212 -303 nm. Muitos tratamentos com PUVA são feitos com furanocumarinas e luz UV-A. Algumas famílias botânicas apresentam componentes furanocumarínicos, tais como Umbelliferae (*Cicuta virosa*), Rutaceae (*Citrus aurantium bergamia*, *Syzygium aromaticum*, *Ruta graveolens*), Moraceae (*Brosimum gaudichaudii*, *Ficus carica*), entre outros (SIEWERT; STUPPNER, 2019).

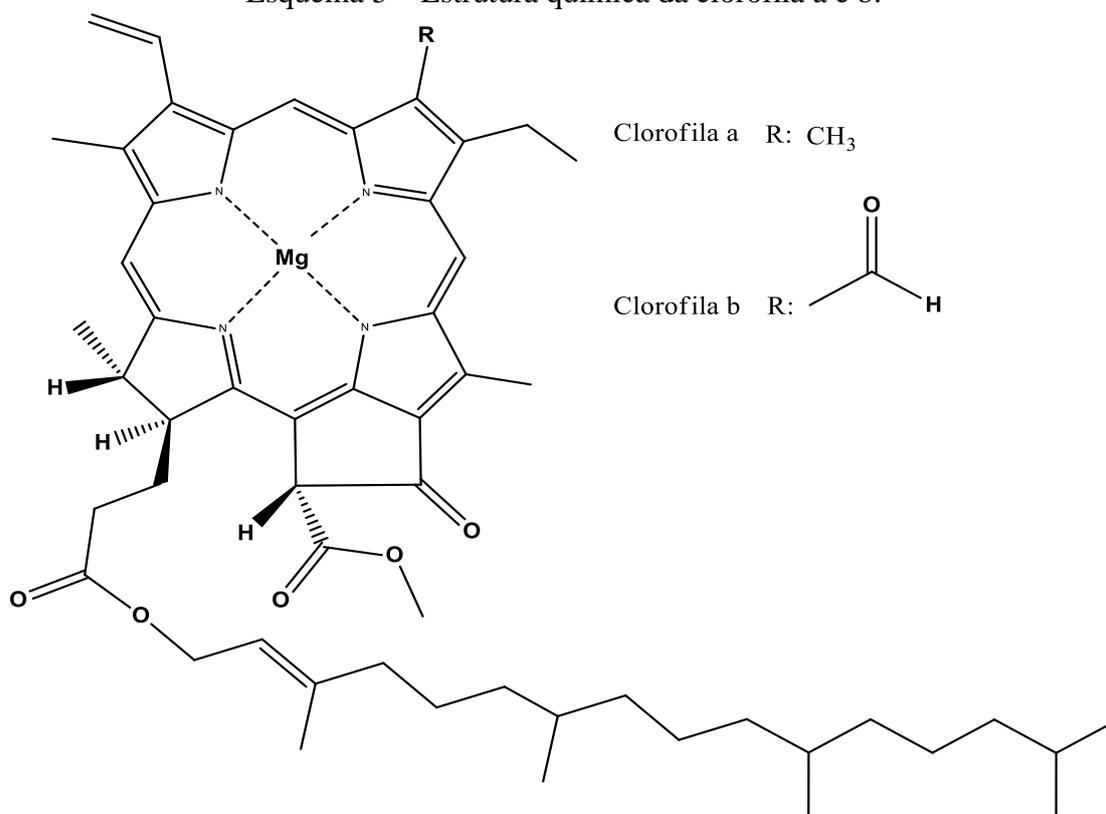
O cerrado brasileiro contém uma vasta riqueza em plantas que podem contribuir com a TFD. Além do *B. gaudichaudii*, razão deste estudo, temos *Tryphnodendron adstringens* (barbatimão); *Campomanesia adamantium* (Guavira) e *Senna velutina* (CARVALHO *et al.*, 2019).

## 7 EFICIÊNCIA FOTOSSINTÉTICA DAS PLANTAS E A FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA

Todos os vegetais verdes possuem clorofila, relacionada ao crescimento e à adaptação das plantas nos diversos habitats, e que determinam a ação fotossintética das plantas.

Pertencentes a classe das porfirinas, são divididas em clorofila a e b. A clorofila a é formada por anéis, todos ligados por pontes metilênicas, apresentando 4 anéis pirrólicos, um anel isocíclico que está ao lado do terceiro anel pirrólico, além de magnésio central. Representa 75% dos pigmentos verdes presentes nos vegetais. Já a clorofila b possui em sua estrutura um grupo aldeído no anel pirrólico 2, e converte-se em clorofila a através da enzima clorofila oxigenase (ENGEL; POGGIANI, 1991; XU *et al.*, 2001).

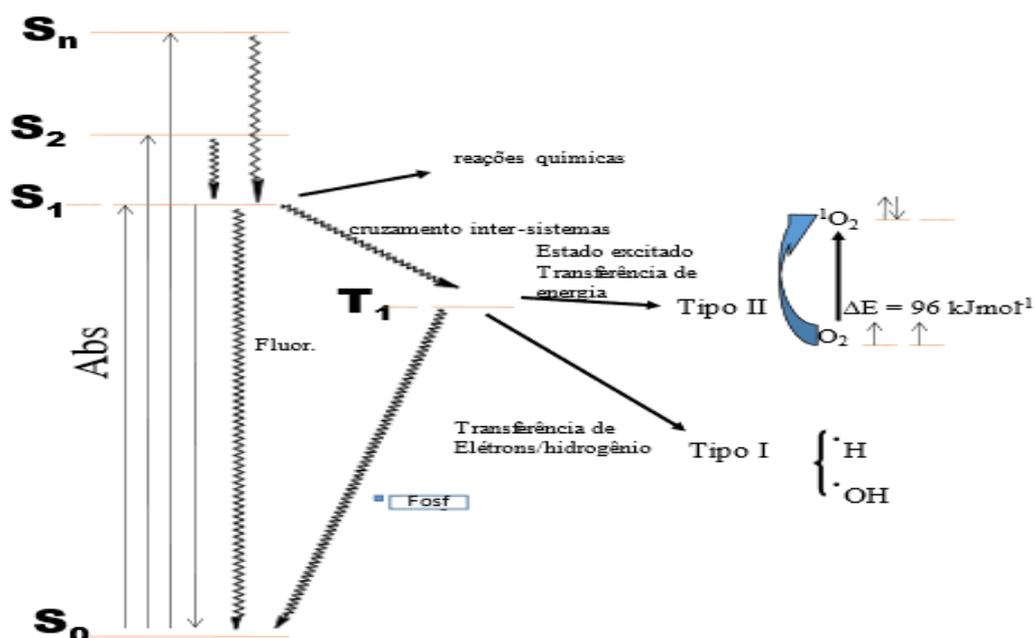
Esquema 5 – Estrutura química da clorofila a e b.



Fonte: a autora.

A luminescência é um fenômeno que ocorre quando uma substância é submetida a um tipo de luz, reação química ou mesmo uma radiação ionizante. Envolve a emissão de fótons das radiações UVA, visível ou infravermelho a partir de uma molécula eletronicamente excitada, e a esta reação damos o nome de fluorescência ou fosforescência. Quando uma molécula busca estabilidade, absorve um fóton e dissipa energia. A dissipação de energia pode ocorrer por decaimento radioativo. Decaimento radiativo está relacionado a emissão dos fótons, que pode acontecer por fluorescência (nanossegundos, sem alteração de spin) ou fosforescência (em segundos, com multiplicidade de spin). Processos não radiativos ocorrem por relaxamento vibracional, como explica o diagrama de Jablonski. Desta forma, os processos fotossintéticos da clorofila, em especial a fluorescência, podem orientar estudos analíticos (QUEIROZ, 2014).

Figura 12 – Diagrama de Jablonsky.



Fonte: adaptado de Foote (1968).

O Diagrama de Jablonsky explica estados energéticos de uma molécula e as transições entre eles. Os estados são reunidos verticalmente por energia e horizontalmente por multiplicidade de spin. Portanto, ao aplicar uma fonte de luz, o fóton é absorvido provocando excitação eletrônica. Consequência do spin eletrônico, os

estados eletrônicos são representados por  $S_n$  (singleto) e o estado tripleto é representado por  $T_n$ . O estado singleto excitado tem curta duração (nanossegundos) e está relacionado ao fotossensibilizante Ts. Com a absorção de um simples fóton de luz, a molécula é levada ao estado excitado  $S_1$ . Do estado excitado inicia-se a fotoquímica a partir do FS e do comprimento de onda ou, então, submete-se a voltar para um outro estado excitado, como o  $T_1$  que tem maior duração que o primeiro estado singleto excitado. Outra possibilidade é a molécula relaxar e retornar ao  $S_0$  por decaimento não radioativo e gerar aquecimento ou ainda, reemitir radiação fluorescente.  $T_1$  pode produzir reações fotoquímicas e gera radicais livres ou transfere a energia para as moléculas de oxigênio da fase inicial ( $^3O_2$ ) dando origem as moléculas de  $^1O_2$ , agente citotóxico (MARTINS; RONCONI, 2017).

## 8 MATERIAIS E MÉTODOS

### 8.1 Material e reagentes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram acetona, obtida da empresa LabSynth; água destilada (destilador osmose reversa marca GEHAKA disponibilizado pela farmácia de manipulação Alecrim); clorofórmio da empresa LabSynth; etanol anidro e etanol hidratado 92,8% da empresa LabSynth; metanol puro da empresa LabSynth; fenalenona da empresa ACS Científica; DPFb usado como sonda da empresa ACS Científica. Partes aéreas da planta *Brosimum Gaudichaudii* foram coletadas nas proximidades do aeroporto de Dourados -MS. Para o preparo dos lipossomas foi utilizado lecitina de soja marca Quimisol SC Brasil – Produtos Químicos e de Laboratório; solução salina 0,9% Sigma-Aldrich. Para o desenvolvimento da emulsão usada como veículo para os extratos lipossomados de *B. gaudichaudii* foi utilizado EDTA dissódico da marca LabSynth na concentração de 0,01%; (e) copolímer de sódio acrilato (e) poligliceril-4 olivato da empresa AQUIA, na concentração de uso 10%; glicerina vegetal USP da empresa LabSynth na concentração de 1,0%; óleo do fruto da *Olea Europea* (Oliva) da empresa AQUIA, na concentração de uso 3,0%; xilitol (e) ácido caprílico (e) sorbato de potássio (e) glicerina (e) água, da empresa AQUIA na concentração de uso 1,5%. Butil hidroxil tolueno (BHT), da empresa LabSynth na concentração de 0,1%; água destilada qsp 100%. Os frascos de 30g utilizados para o armazenamento da emulsão são da empresa Vepakum. As vidrarias utilizadas foram: cubeta de quartzo (Hellma, Brasil); tubos de ensaio de vidro; gral de cerâmica; os aparelhos utilizados: moinho de 4 facas (Asteca); espectrofotômetro Micronal B582 (Micronal, Brasil); espectrofotômetro UV-visível UV-240 1PC (Shimadzu Co, EUA); microscópio Nikon Edinburgh *Instruments* com e sem sonda DPBF; ultrassom aparelho Maxsonic D-409 XA da empresa CTA do Brasil; fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu H01330C-75 resfriada à 60°C por sistema peltier com sistema de SHB-NIR de filtros.

### 8.1.1 Material vegetal

O material vegetal – *Brosimum gauduchaudii* Trécul (*Moraceae*) – foi coletado nas proximidades do aeroporto de Dourados -MS, Francisco de Matos Pereira, localizado à avenida Guaicurus, início da rodovia Dourados-Itaum, Km 12 com latitude 22° 11' 52 S e longitude 54° 55' 21 W. Localizado a 458 metros acima do nível do mar, no fuso horários UTC -4 (-3DT). A identificação foi realizada pelo professor Prof. Dr. Paulo T. Sano do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

O material vegetal foi fracionado em partes aéreas (folhas, cascas, galhos e raiz). Este material foi triturado em moinho de quatro facas e as massas foram determinadas como sendo 20g para cada fração. O processo de extração foi realizado em álcool etílico 92,8% para todas as amostras. Para acelerar o processo de extração, as amostras imersas no respectivo solvente e foram submetidas a agitação ultrassônica no aparelho Maxsonic D-409 XA da empresa CTA do Brasil por um período de 30 minutos. Após a agitação ultrassônica, as imersões permaneceram em repouso sob abrigo da luz por um período de 28 dias, segundo a Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010). Decorrido tal período, foram filtradas e o líquido foi eliminado por evaporação rotacional a pressão reduzida. A massa obtida em cada extrato foi: 0,200g folhas; 0,215g cascas; 0,220g dos galhos e 0,270 para raiz. Todos os extratos foram caracterizados por espectroscopia no ultravioleta visível em um espectrofotômetro ultravioleta visível UV-240 1PC (Shimadzu Co, EUA), utilizando cubeta de quartzo com caminho óptica de 1,0 cm (Hellma, Brasil). O espectro foi registrado no intervalo de 300-800 nm a cada 0,5 nm. Também foi determinado os espectros de fluorescência de cada extrato em um microscópio Nikon Edinburgh *Instruments* com e sem sonda. Os espectros de emissão de fluorescência foram determinados em solução etanólica pelo espectrofotômetro Micronal B582 (Micronal, Brasil).

Figura 13 – Ultrassom aparelho Maxsonic D-409 XA da empresa CTA do Brasil.



Fonte: a autora.

### 8.1.2 Obtenção de Lipossomas

A preparação dos lipossomas foi obtida a partir de lecitina de soja, composto por fosfaditilcolina que, por ser um fosfolipídio zwitterônico, possibilita a obtenção de vesículas estáveis. Possui polaridade mostrando duas cadeias hidrocarbônicas longas, sendo uma saturada e outra insaturada. A solução de fosfaditilcolina e o extrato da planta foram transformados em prolipossomas através da secagem usando um fluxo de argônio e agitação rotacional. Assim, cada 100 mg de cada extrato foi ressuspensionado em etanol  $\approx$  1 ml e adicionado a um tubo de ensaio contendo 500 mg de lecitina de soja dissolvida em  $\approx$  5 ml de clorofórmio. O tubo de ensaio foi submetido a agitação ultrassônica por um período de 10 minutos até obtenção de uma solução/dispersão homogênea. Na sequência, os solventes foram eliminados por fluxo de argônio e agitação rotacional. Após a eliminação total dos solventes, foi obtido um filme sobre as paredes do tubo. Ao tubo contendo o filme foi adicionado 10 ml de solução salina 0,9% e submetido a agitação ultrassônica por 20 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 segundos entre os ciclos. Apresentaram-se estáveis, secos e que formam, quando

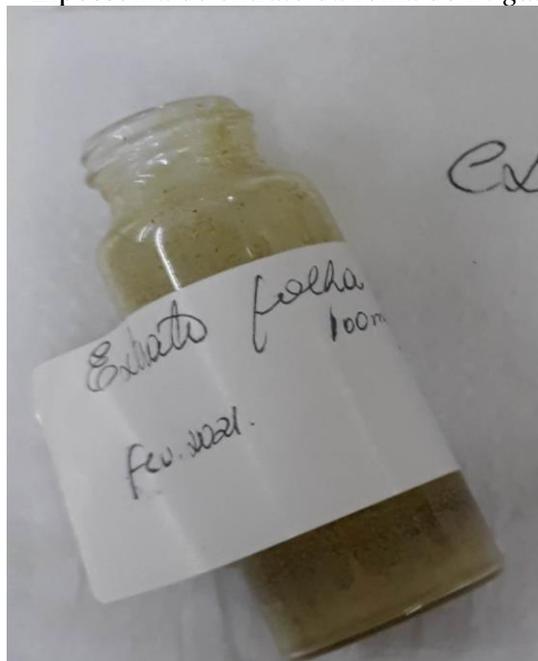
dispersos em fase aquosa, compósitos granulares que contém o lipossomado dos extratos da planta, tornando-se um transportador que pode conter a droga, formando vesículas lipossomadas (PATIL; JADHAV, 2014; HAS; SUNTHAR, 2020).

Figura 14 – Extrato de folha do *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

Figura 15 – Lipossoma de extrato da folha do *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

### 8.1.3 Laboratório

Laboratório de química equipado com rota- evaporados, colunas e placas cromatográficas, espectrofotômetro ultravioleta visível com varredura de 190 a 1100 nm. Sistema de detecção de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) com resolução temporal. Também contamos com o apoio da central analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP).

Figura 16 – Laboratório de Química Analítica do Instituto de Química da USP.



Fonte: a autora.

### 8.1.4 Modo de preparo da emulsão

Os ingredientes da emulsão foram divididos em hidrossolúveis, lipossolúveis e a fase conservante, nomeados de fase A, B e C respectivamente. As duas fases (A e B) foram aquecidas até 80°C. A fase A foi vertida na fase B e homogeneizada até completa incorporação das fases. A fase C foi incorporada a temperatura de 40°C, após completo resfriamento. Foi armazenada em embalagem opaca e longe de umidade e calor.

Tabela 1 – Emulsão desenvolvida para o projeto

Fase / Temperatura	Ingrediente	Concentração
A – 80°C	Edta dissódico	0,1%
	Glicerina vegetal	1%
	Água destilada qsp	100%
	Etilexil olivato (e) copolimer de sódio acrilato (e) poligliceril-4 olivato.	10%
B – 80°C	Óleo do fruto da Olea Europea (Oliva)	3%
	BHT (butil hidroxi tolueno)	0,1%
C – 40°C	Xilitol (e) ácido caprílico (e) sorbato de potássio (e) glicerina (e) água	1%

Fonte: a autora.

#### 8.1.5 Preparação de creme fitodermatológico

O creme fitodermatológico foi preparado por incorporação simples, juntando o creme com os extratos lipossomados das partes do *B. gaudichaudii* à temperatura ambiente para não haver perda de efetividade dos extratos. Foi adicionado 1ml da dispersão lipossomal das partes da planta (folhas, cascas, galhos e raiz) em 25 ml da emulsão base. As amostras foram perfeitamente homogeneizadas e estocadas em um recipiente tipo bisnaga a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Os lipossomos permitiram a incorporação de moléculas de maior polaridade em uma emulsão. Desta forma, a forma lipossomada viabiliza a permeabilidade cutânea de fotossensibilizante de origem natural, como o *B. gaudichaudii*, para os vários tipos de tratamentos fitodermatológicos.

#### 8.1.6 Determinação da atividade pró-oxidativa do *B. gaudichaudii*

A atividade pró-oxidativa, foi determinada por método direto, através do espectro de emissão no infravermelho próximo, na região de 1200 a 1350 nm, e por método indireto, utilizando a difenilbenzofurano (DPBF) como sonda detectora de espécies reativas de oxigênio (ROs).

#### 8.1.7 Determinação da emissão de oxigênio singlete - método direto.

A determinação de oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ) foi realizada por método direto em soluções de clorofórmio e etanol, em um sistema composto por fotomultiplicadora (PMT) Hamamatsu H01330C-75, resfriada a  $-60^\circ\text{C}$  por um sistema peltier. O equipamento é composto por um sistema SHB-NIR de filtros, o qual impede a passagem de outros comprimentos de onda, permitindo apenas a transmissão de 1270 nm entre a amostra e a PMT. Este sistema foi testado e padronizado utilizando-se a fenalenona, que foi excitada em 400 nm. Foi determinado com precisão a emissão de  $^1\text{O}_2$  em 1270 nm. As excitações foram realizadas de forma ortogonal em tubos cilíndricos de quartzo contendo 500  $\mu\text{l}$  de solução (KRASNOVSKY, 2004). A caracterização da espécie foi determinada tanto pelo seu espectro de emissão como máximo característico em 1270 nm, como pelo decaimento temporal, onde determinou-se os tempos de vida (meia vida) característicos da espécie nos respectivos solventes. Os transientes de emissão das amostras foram obtidos por excitação do composto em condições previamente estabelecidas (laser, densidade óptica, solvente e aberturas de fendas) (SCHWEITZER; SCHMIDT, 2003).

#### 8.1.8 Determinação de espécies reativas de oxigênio (ROs)

A análise foi realizada em um Microscópio Nikon Edinburgh *Instruments* com fendas de 5nm, onde a fonte de luz do equipamento foi utilizada também como fonte de irradiação em 315 nm, 400 nm e 660 nm, com fendas de 20 nm. As amostras (creme, creme + DPBF e creme + DPBF + extrato) foram irradiadas por até 5 ciclos de 90

segundos. Foi determinado o espectro inicial de cada amostra, e a cada ciclo foi monitorado o decréscimo ou incremento de cada banda.

As leituras das amostras foram realizadas em placas de 24 poços. Foram analisados o creme base, o fitocreme e o fitocreme com 10  $\mu$ l DPBF à 35  $\mu$ M. Após a adição de 10 $\mu$ l DPBF no creme o conjunto foi perfeitamente homogeneizado. Cada poço de análise continha 1 grama da massa.

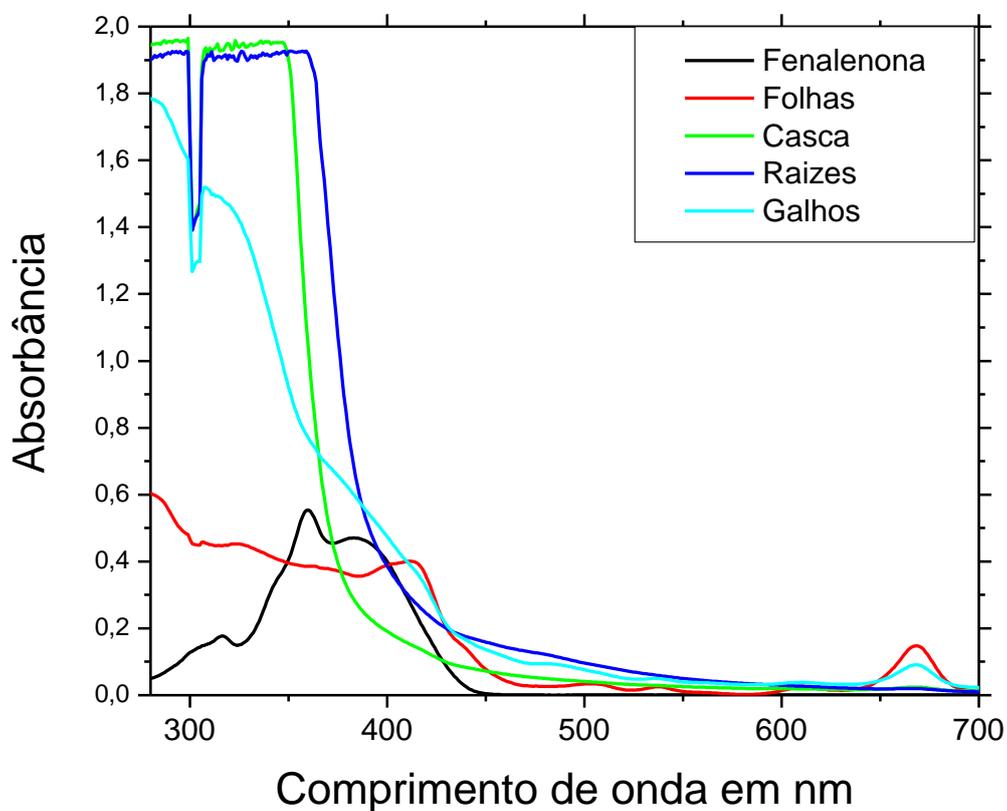
## 9 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 9.1 Material vegetal

O material vegetal da planta *B. gaudichaudii* foi coletado, caracterizado, estocado ao abrigo da luz. Após ser triturado, 20g de cada parte da planta foi submetido a extração com etanol hidratado que, segundo Neves *et al.* (2002), é o melhor solvente para extração de compostos furanocumarínicos. Após eliminação do solvente, o extrato bruto rendeu 0,200g folhas; 0,215g cascas; 0,220g dos galhos e 0,270 para raiz.

Foi observado que os extratos forneceram quantidades similares de massa, sendo ligeiramente superior a massa do extrato das raízes. Visto que, a extração foi realizada em etanol hidratado, conforme literatura (MARTINS *et al.*, 2015), observa-se que as raízes são relativamente mais ricas em compostos de maior polaridade. Após a determinação de cada massa, uma pequena quantidade foi ressuspensa em clorofórmio e determinado o espectro ultravioleta visível. O Gráfico 1 ilustra as curvas espectrais, onde estão apresentadas bandas intensas em 315 nm (bergaptenos), 400 nm (tetrapirrolícos) e 667 nm (clorinas).

Gráfico 1 – Espectro UV-vis de fenalenona e dos extratos de diferentes partes de *B. gaudichaudii*, todos em clorofórmio, mostrando bandas intensas em 315 nm, 400 nm e 667 nm

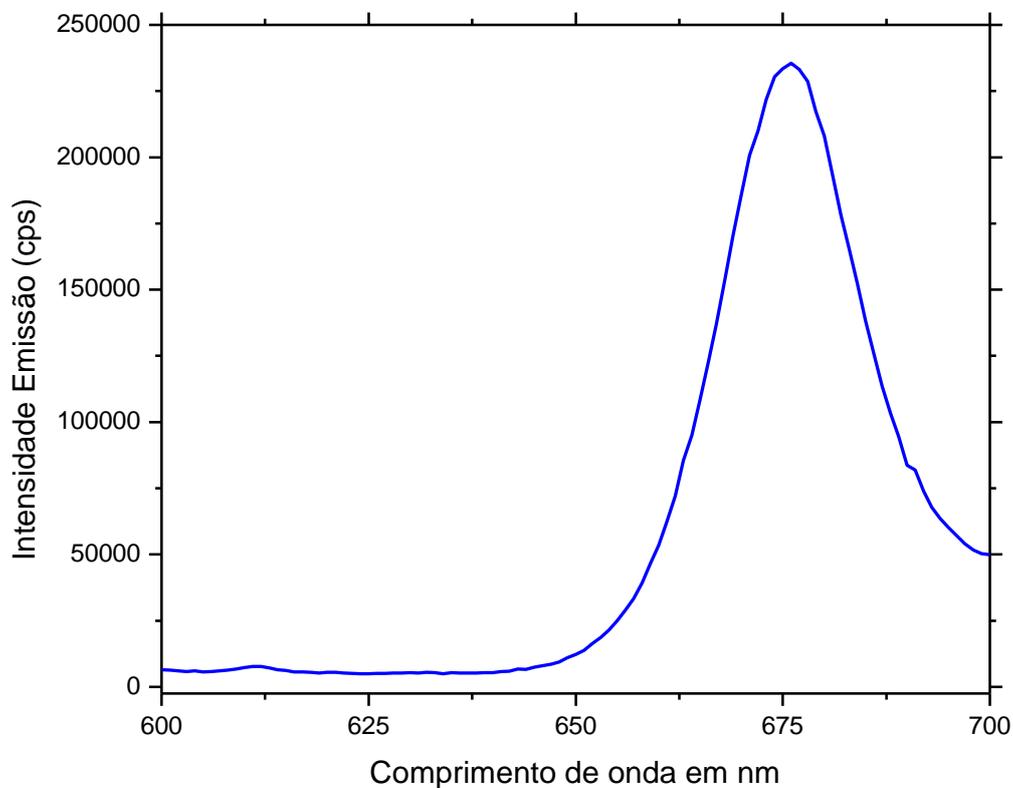


Fonte: a autora.

Estas bandas foram tomadas como referência e são relativas aos seus principais cromóforos, demandando a excitação para determinação da emissão de  $^1\text{O}_2$ .

O Gráfico 2 apresenta o espectro de emissão fluorescente do extrato da raiz, onde pode ser confirmado o espectro característico de clorofila.

Gráfico 2 – Espectro de emissão fluorescente do extrato das raízes de *B. gaudichaudii* em clorofórmio excitado em 400 nm.



Fonte: a autora.

## 9.2 Preparação da formulação lipossomal

A formulação lipossomal apresentou estabilidade aparente e excelente miscibilidade quando foram incorporados na emulsão, não mostrando ao longo do uso extemporâneo do produto, alterações visíveis de cor ou odor.

## 9.3 Desenvolvimento de emulsão

Foi desenvolvida uma emulsão onde os extratos foram incorporados. Esta emulsão é compatível com o tecido cutâneo por apresentar riqueza de fosfolipídeos vegetais, como mostra a literatura (THOMPSON, 2013).

Foi identificado visualmente que as propriedades físicas dos extratos lipossomados se mantiveram no creme, não apresentando separação e/ou mudança de cor na formulação, enquanto usada para este estudo. A formulação foi suficiente e adequada para os propósitos do estudo.

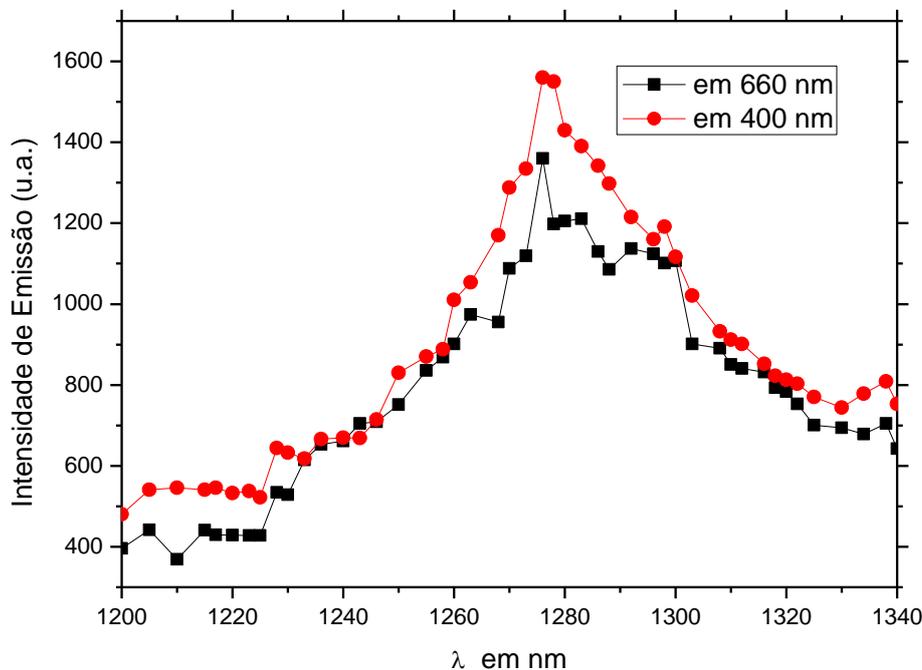
#### **9.4 Emissão de oxigênio singlete - método direto**

Os extratos foram analisados quanto sua atuação como agentes fotossensibilizantes por excitação nos comprimentos de onda relativos aos máximos de absorção no espectro ultravioleta visível.

Os espectros apresentados no Gráfico 1 mostraram bandas intensas em 315 nm, 400 nm e 660 nm. Estas bandas foram tomadas como referência e são relativas aos seus principais cromóforos, demandando a excitação em tais bandas para determinação da emissão de  $^1\text{O}_2$ . Os estudos de produção de  $^1\text{O}_2$  foram realizados em soluções de clorofórmio e etanol.

O Gráfico 3 apresenta os espectros de emissão de  $^1\text{O}_2$  por excitação em 400 nm e 660 nm.

Gráfico 3 – Espectro de emissão de  $^1\text{O}_2$  obtido por excitação de solução do extrato etanólico das folhas de *B. gauduchaudii* e ressuspendidos em clorofórmio, por excitação com laser em 400 nm (-) e 660 nm(-) 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo.

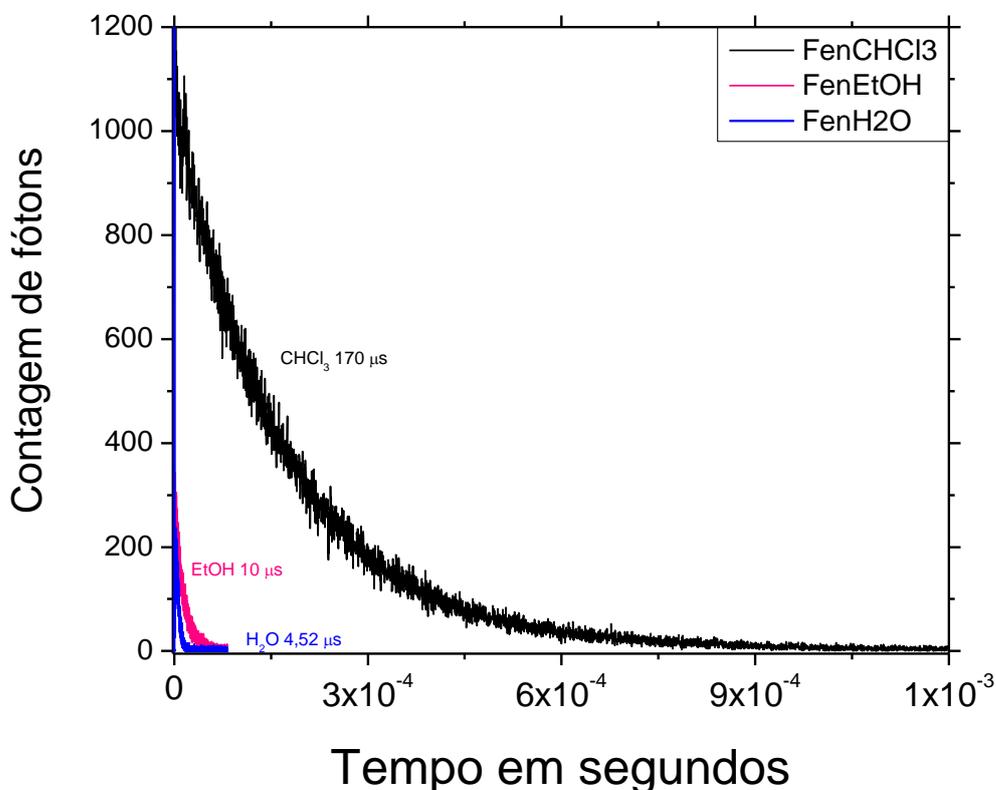


Fonte: a autora.

Além da caracterização de  $^1\text{O}_2$  pelo espectro de emissão, a espécie reativa também foi caracterizada pelo seu tempo de meia vida (tempo de vida). Para isto, o sistema foi previamente calibrado utilizando fenalenona como padrão. A fenalenona é estabelecida como o melhor padrão por apresentar solubilidade em vários solventes, além de apresentar rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  ( $\phi_{\Delta}$ ) = 1, ou seja, 100% (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993).

O Gráfico 4 apresenta as curvas de decaimento temporal (transientes) para a fenalenona em três diferentes solventes (clorofórmio, etanol e água).

Gráfico 4 – Decaimentos Transiente de  $^1\text{O}_2$  em água (-), etanol (-) e clorofórmio (-). Gerados por fenalenona. Excitação com laser em 400 nm 5 mJ/pulso, 10 pulsos/segundo.



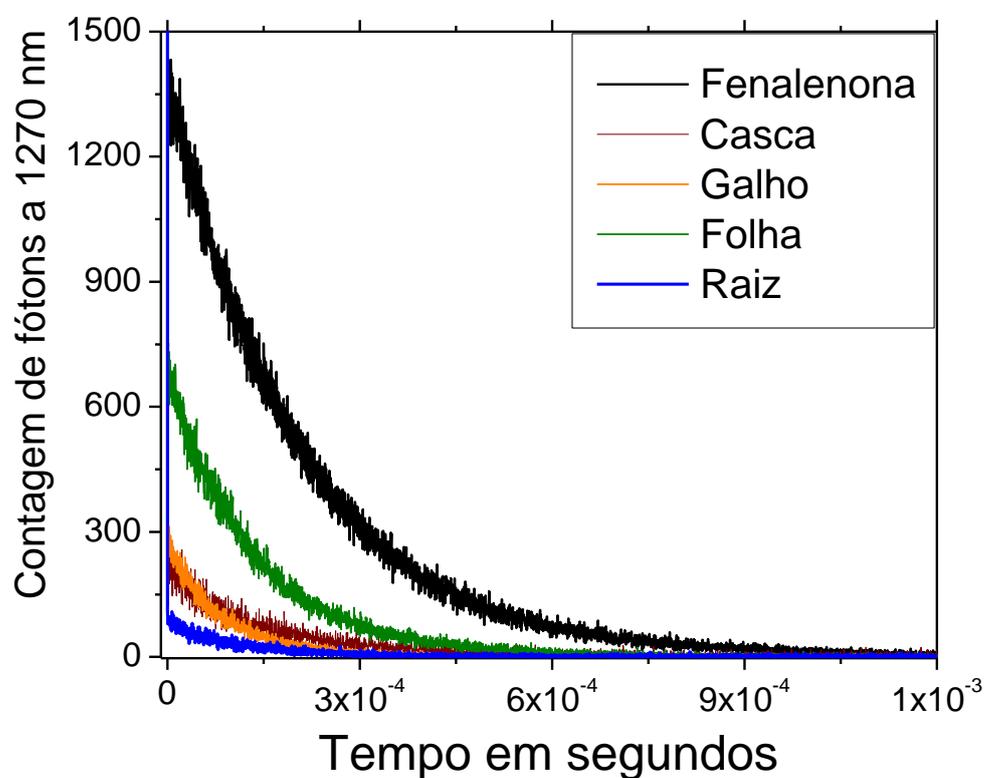
Fonte: a autora.

Os transientes de  $^1\text{O}_2$  obtidos por fotossensibilização de fenalenona mostram tempos de meia vida de 4,5 μs para água, 10 μs para etanol e 170 μs para clorofórmio. Vale lembrar que o tempo de vida de  $^1\text{O}_2$  é dependente do solvente, visto que, estes podem ser desestabilizados por interações intermoleculares com a molécula do solvente (OGILBY; FOOTE, 1983). Os tempos aqui determinados estão condizentes com aqueles determinados na literatura (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993). Estas medidas, além de serem base para os cálculos de eficiência quântica ( $\phi \Delta$ ), também certificam que as condições experimentais são adequadas, e confirmam a eficiência do sistema de determinação da espécie reativa de oxigênio.

O Gráfico 5 apresenta os transientes de decaimento para a fenalenona para os 4 extratos. Todos ressuspendidos em clorofórmio e em etanol como mostra o Gráfico 6. A determinação do rendimento quântico ( $\phi \Delta$ ) é aqui tratado como eficiência quântica, visto que os extratos apresentam composição indefinida.

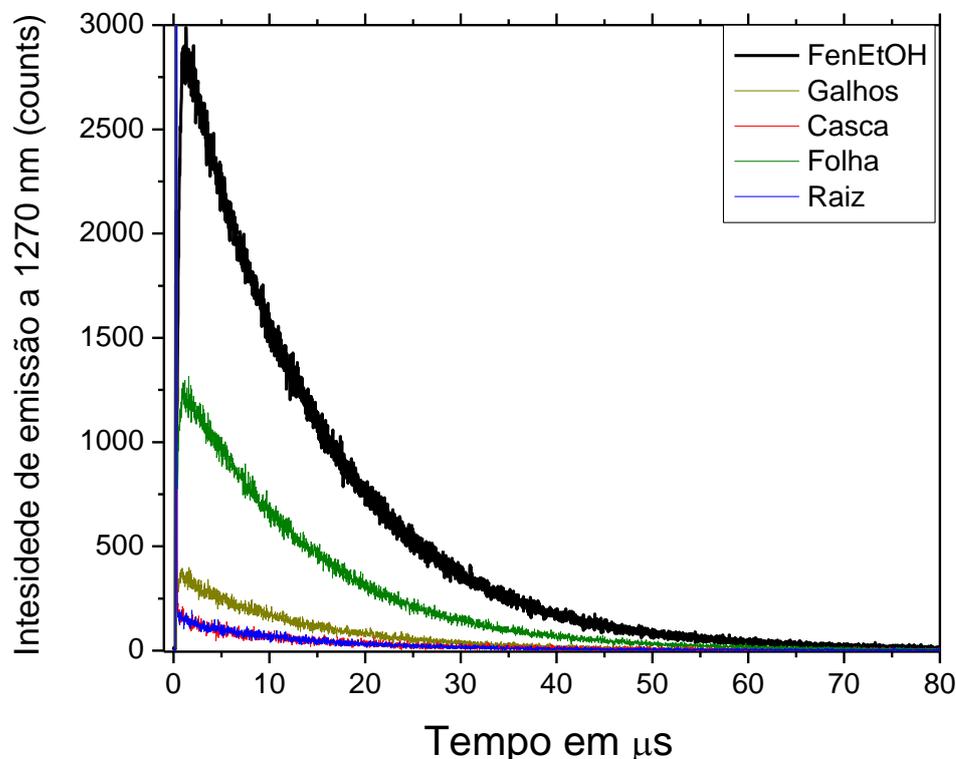
A quantificação de oxigênio singlete foi realizada a partir das intensidades dos transientes emitidos a 1270 nm (gráficos 5 e 6), obtidas alguns nanossegundos após o pulso do laser, sempre utilizando as mesmas condições (laser, densidade óptica, solvente e aberturas de fendas). A inspeção foi aferida cuidadosamente sempre no mesmo tempo para todos os transientes relacionados. Para a determinação da eficiência quântica foi tomado como referência o maior número de fótons nos instantes iniciais da curva.

Gráfico 5 – Decaimento transiente de  $^1\text{O}_2$  em clorofórmio. Gerados por fenalenona (-) e para os extratos: Casca (-) Galho (-) Folha (-) Raiz (-). Excitação a 400 nm.



Fonte: a autora.

Gráfico 6 – Decaimentos transiente de  $^1\text{O}_2$  em etanol. Gerados por fenalenona (-) e extratos: Casca (-) Galho (-) Folha (-) Raiz (-). Excitado em 400 nm.



Fonte: a autora.

Em análise preliminar podemos observar que os transientes obtidos em clorofórmio (Gráfico 5), é onde encontram-se ressuspensos os compostos de menor polaridade, de forma majoritária. Os transientes apresentam a seguinte ordem de intensidade: fenalenona (-) > folha (-) > galho (-)  $\approx$  casca (-) > raiz (-). Já para os extratos ressuspensos em etanol, onde foram ressuspensos preferencialmente aqueles metabólitos de polaridade mais elevada (Gráfico 6), foi observado um comportamento análogo, onde as intensidades apresentam-se na seguinte ordem: fenalenona (-) > folha

(-) > galho (-) > casca (-)  $\approx$  raiz (-). Esta variação na ordem indica que a quantidade de  $^1\text{O}_2$  gerados devem estar relacionados com quantidade/tipo de metabólitos presentes na solução, que é diretamente proporcional a solubilidade em cada extrato.

Para estes transientes foi observado que os decaimentos referentes aos extratos ocorrem em tempos de vida inferiores àquele decaimento registrado para o padrão

(fenalenona). Estes resultados ficaram evidentes tanto nos ensaios em clorofórmio como em etanol.

Para uma análise quantitativa, os dados foram tratados segundo a equação 1 e expressos de forma quantitativa nos gráficos 7 e 8.

A fenalenona foi tomada como referência na quantificação ( $\phi_{\Delta=1}$ ) (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993). Os cálculos foram realizados tanto para os extratos ressuspensos em clorofórmio, como para os ressuspensos em etanol. Os transientes dos extratos foram comparados com aqueles obtidos para a fenalenona no mesmo solvente e nas mesmas condições experimentais. A absorção no comprimento de onda de excitação foi determinada pelo espectro UV-Vis. As amostras foram excitadas com pulso de *laser* 400 nm e em 660 nm.

A eficiência quântica foi determinada através de seguinte Equação 1:

$$\frac{I_a}{I_p} = \frac{\phi_a}{\phi_p} \quad \phi_a = \phi_p \frac{A_p}{A_a} \frac{I_a}{I_p} \quad (1)$$

$$\phi_{\Delta a} = (I_a \times A_p / I_a \times A_p) \times \phi_{\Delta p}$$

$\phi_{\Delta a}$  – Eficiência de formação de oxigênio singlete da amostra.

$\phi_{\Delta p}$  – Rendimento quântico de formação de oxigênio singlete do padrão.

$I_a$ - Intensidade de emissão de oxigênio singlete da amostra.

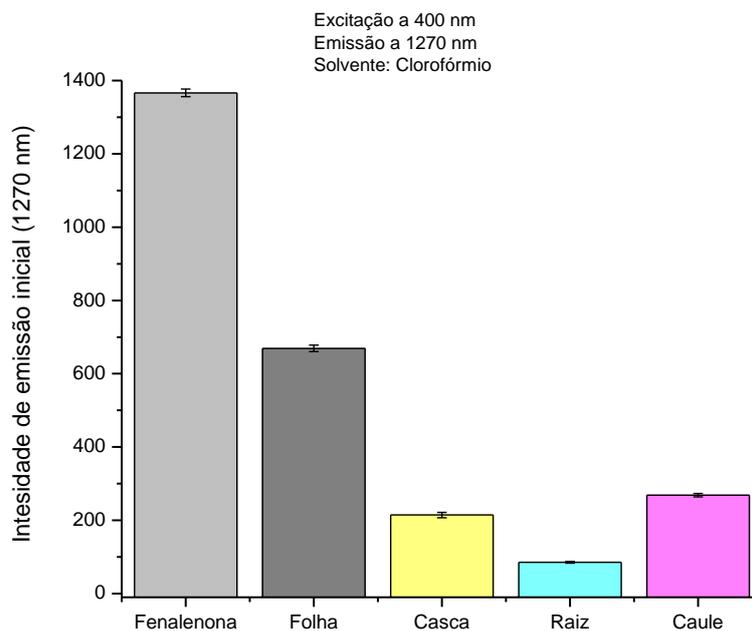
$I_p$ - Intensidade de emissão de oxigênio singlete do padrão.

$A_a$  – Absorbância da amostra no comprimento de onda em análise.

$A_p$  – Absorbância do padrão no comprimento de onda em análise.

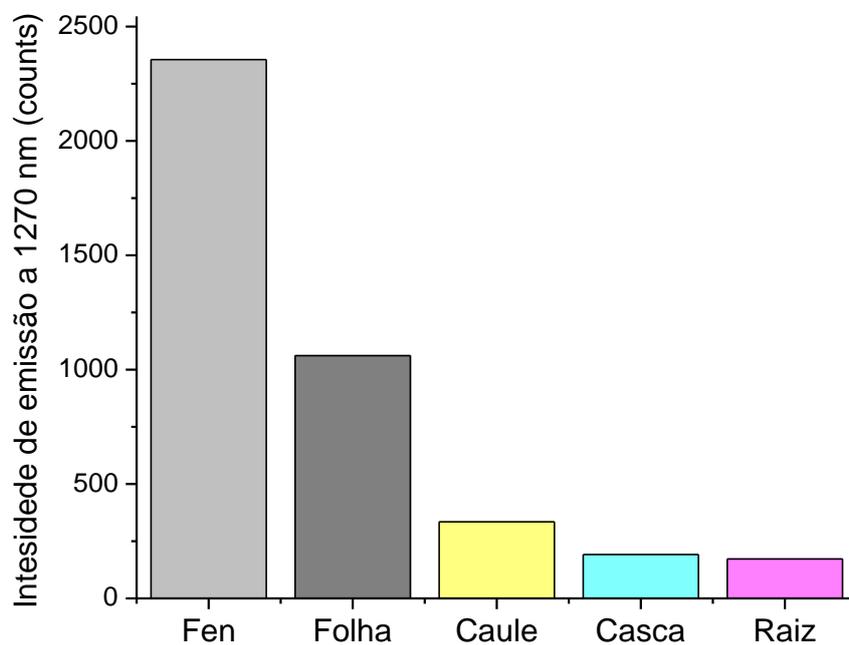
Quando comparadas as intensidades de emissão logo após o pulso, ou seja, nanosegundos iniciais, foi observado que em ambos os solventes o extrato da folha foi o que apresentou maior intensidade, sendo seguido pelo galho, casca e raiz.

Gráfico 7 – Intensidade de emissão a 1270 nm, para os extratos em clorofórmio, excitado em 400 nm.



Fonte: a autora.

Gráfico 8 – Intensidade de emissão a 1270 nm, para os extratos em etanol, excitado à 400 nm.



Fonte: a autora.

Neste sentido, o efeito de solubilidade das espécies fotossensibilizadoras não apresentam maiores divergências. No entanto, para uma quantificação precisa, estes valores precisam ser corrigidos pela absorção de cada amostra no comprimento de

onda de excitação (400 nm). Estabelecendo-se a razão entre a absorção do padrão ( $A_p$ ) e a absorção da amostra ( $A_a$ ), encontra-se o fator de correção, que quando aplicado na Equação 1, é diretamente proporcional ao rendimento quântico, neste caso eficiência quântica, pois trata-se de uma solução de composição indefinida. A Tabela 2 avalia os parâmetros de ajuste na determinação da eficiência quântica do  $^1O_2$ .

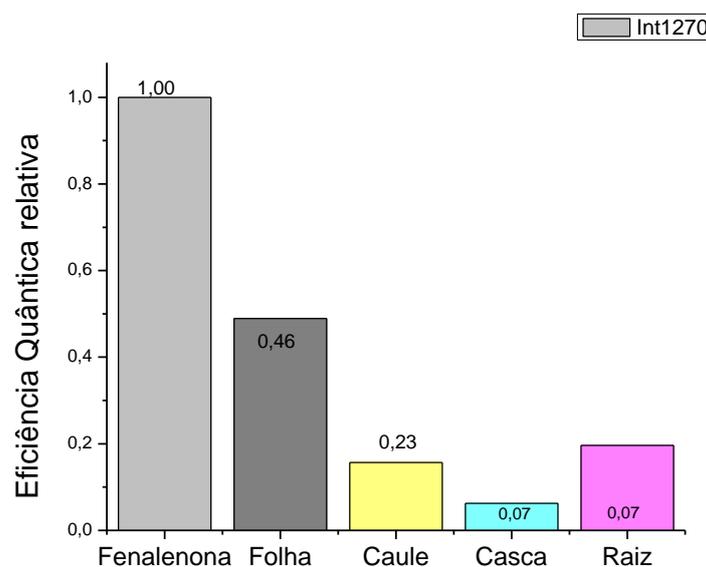
Tabela 2 – Parâmetros de ajuste na determinação da eficiência quântica de  $^1O_2$ .

	<b>Abs 400 nm</b>	<b>Fator de correção</b>
Fenalenona	0,40	1,000
Folha	0,53	0,754
Caule	0,43	0,930
Casca	0,23	1,739
Raiz	0,38	1,0526

Fonte: a autora.

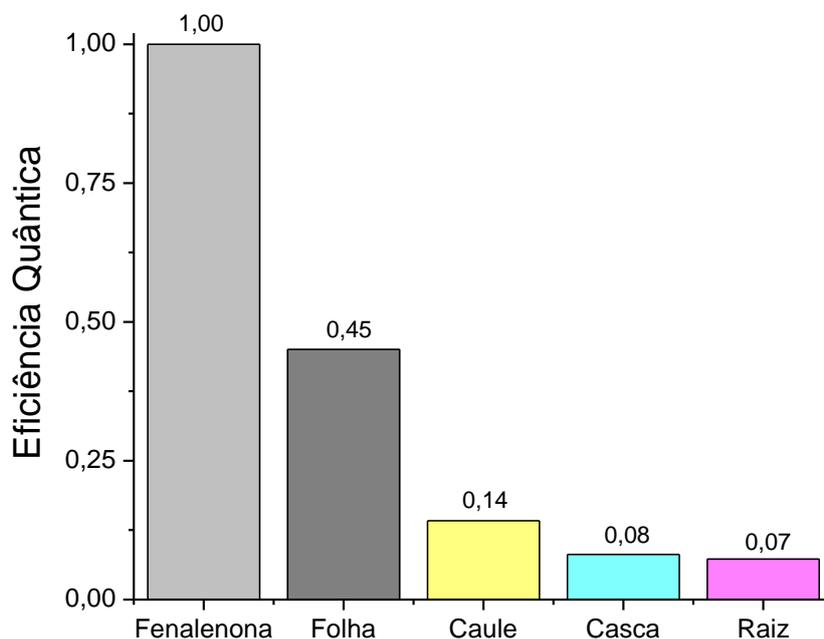
Utilizando-se da Equação 1, podemos estabelecer a eficiência quântica em cada solvente, com apresentado nos gráficos 9 e 10.

Gráfico 9 – Eficiência quântica de produção de oxigênio singlete determinado em clorofórmio. Intensidade de emissão a 1270 nm.



Fonte: a autora.

Gráfico 10 – Eficiência quântica de produção de oxigênio singlete determinado em etanol. Intensidade de emissão em 1270 nm.



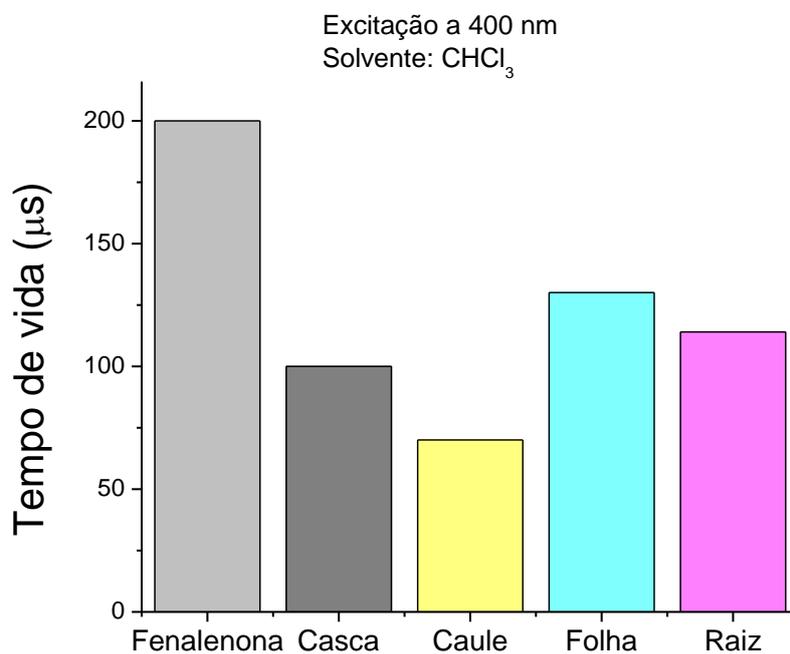
Fonte: a autora.

Os valores encontrados, quando utilizado clorofórmio como solvente, foram reproduzidos em etanol. Esta mesma tendência foi observada para os extratos da casca e das raízes. Ambos solventes mostraram valores análogos. Já quando comparamos os valores referentes ao galho, encontramos uma certa discrepância, visto que, em clorofórmio a eficiência quântica do extrato do galho foi de 0,23 e em etanol foi de 0,14. Analisando os espectros UV-vis, pode-se observar que os perfis espectrais são semelhantes. Assim, esta diferença na eficiência foi atribuída a uma maior presença de espécies supressoras de triplete no extrato do galho ressuspensionado em etanol. Entre as prováveis espécies supressoras de triplete, podemos destacar resíduos de celulose (DA HORA MACHADO *et al.*, 2004).

### 9.5 Tempo de vida

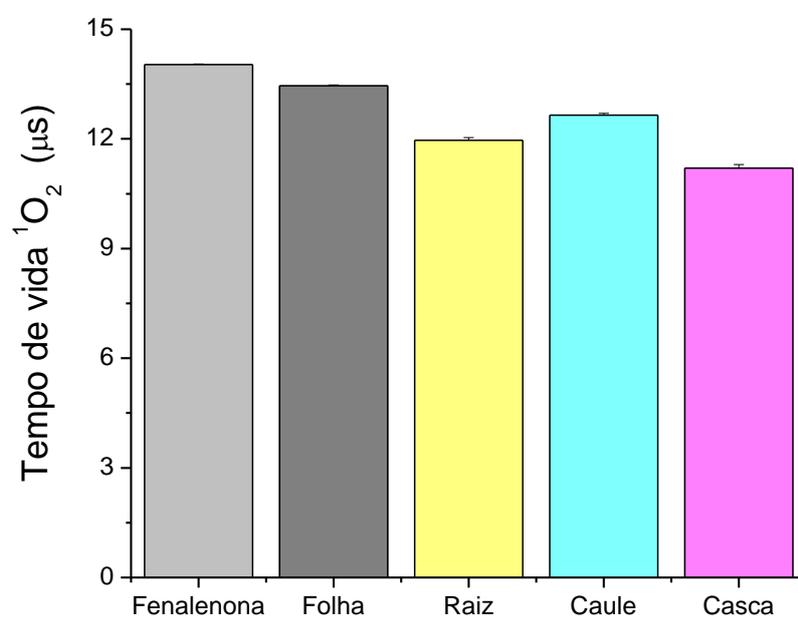
Foi observado nas curvas transientes do Gráfico 11, que o oxigênio singlete gerado pelos extratos ressuspensionado em clorofórmio apresentam tempos de vida inferiores àquele gerado pela fenalenona. Neste ensaio, os tempos de vida apresentam-se na seguinte ordem: fenalenona > folha > raiz > casca > galho.

Gráfico 11 – Tempo de vida de emissão de oxigênio singlete em clorofórmio. Excitação a 400 nm.



Fonte: a autora.

Gráfico 12 – Tempo de vida de emissão de oxigênio singlete em etanol. Excitação a 400 nm



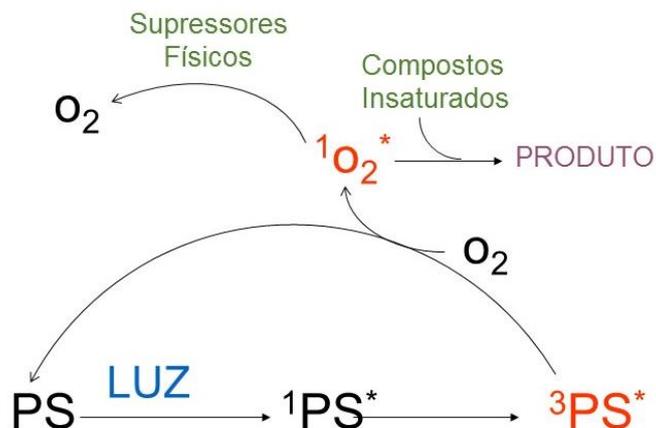
Fonte: a autora.

Já para os ensaios onde os extratos foram ressuspensos em etanol, o tempo de vida apresenta-se na seguinte ordem: fenalenona > folha > galho > raiz > casca. Pode-se

observar um comportamento análogo aos ressuspendidos em clorofórmio. No entanto, a redução no tempo de vida mostra-se menos intensa, havendo também uma alteração na ordem de intensidade desta supressão.

O tempo de vida é uma característica da espécie ( $^1\text{O}_2$ ) sendo dependente do meio no qual está solvatado, visto que a espécie excitada de oxigênio  $^1\text{O}_2$  apresenta como seu principal mecanismo de decaimento a transferência de energia por modos vibracionais com a molécula do solvente (DA HORA MACHADO *et al.*, 2004). Neste sentido é esperado que todos os ensaios em um mesmo solvente, apresentem o mesmo tempo de vida. No entanto, os ensaios mostrados nos gráficos 11 e 12 apresentam-se de forma diferente deste princípio. É necessário lembrar que os ensaios não se referem à compostos puros, mas sim, à extratos vegetais. Estamos nos referindo à soluções complexas, as quais apresentam simultaneamente compostos com atividade fotossensibilizante, como é o caso da clorofila e seus derivados tetrapirrólicos, além de metabólitos secundários, dos quais muitos são conhecidos por apresentarem atividades supressoras (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989; UCHOA *et al.*, 2013). A atividade supressora pode ocorrer tanto por processo físicos, desativando o estado excitado, como por processos químicos, onde ocorre a formação de compostos oxidados. O poder de supressão é determinado por constante de supressão ( $K_s$ ), uma característica da molécula que é dependente do mecanismo de supressão, seja por processo físicos, processos químicos ou ambos. O esquema apresentado na Esquema 5 ilustra a integração do processo fotoinduzido e a atividade supressora dos constituintes nos extratos.

Esquema 6 – Esquema representativo de fotossensibilização e produção de oxigênio singlete, e supressão por processos físicos e químicos.

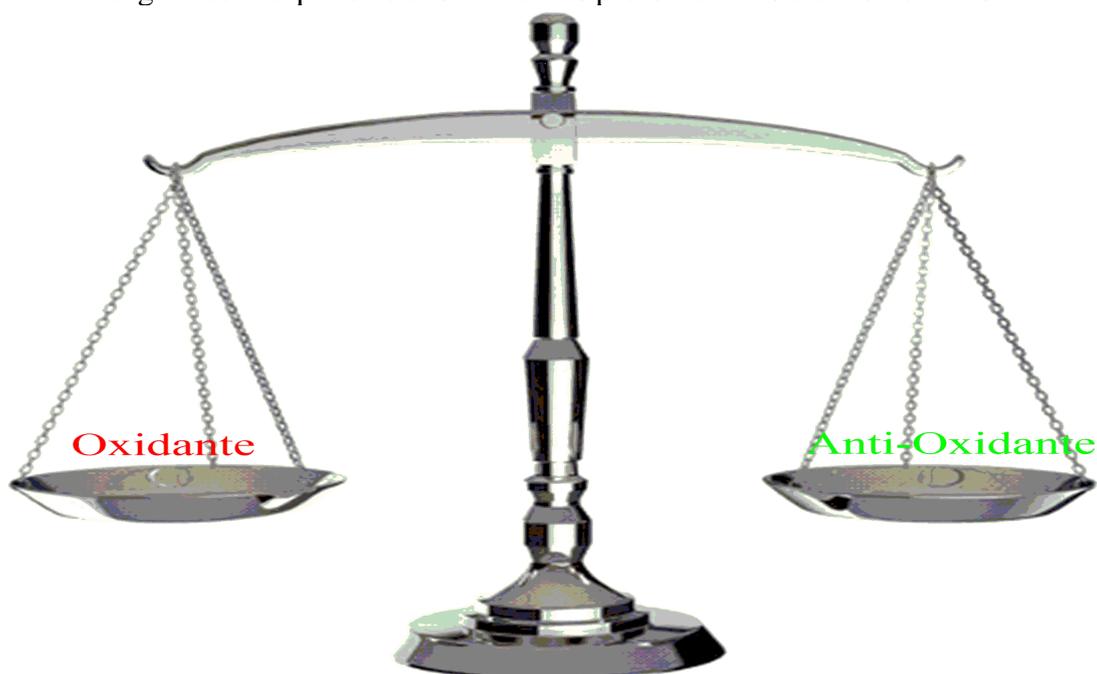


Fonte: a autora.

Quando comparado os resultados dos gráficos 11 e 12, pode-se observar que os ensaios realizados em clorofórmio ocorrem uma supressão mais acentuada. Esta maior supressão em clorofórmio está relacionada principalmente a dois fatores:

- os tipos de metabólitos prioritariamente ressupendidos, visto que, o clorofórmio apresenta menor polaridade, os compostos menos polares devem estar solvatados em maior abundância;
- como o  $^1\text{O}_2$  apresenta maior tempo de vida em clorofórmio, este apresenta-se por um maior período susceptível a ação supressora dos metabólitos presentes.

Figura 17 – Equilíbrio das atividades pró-oxidativas e antioxidativas.



Fonte: a autora.

Desta forma, ficou demonstrado a atividade fotossensibilizante dos extratos de *B. gauduchaudii*, assim como sua ação supressora de  $^1\text{O}_2$ . Tais resultados enfatizam o equilíbrio das atividades anti e pro-oxidativa presente na natureza. Este resultado é evidenciado tanto no reino animal (DEMASI *et al.*, 2021; KOWALTOWSKI, 2019) como no reino vegetal (UCHOA *et al.*, 2013).

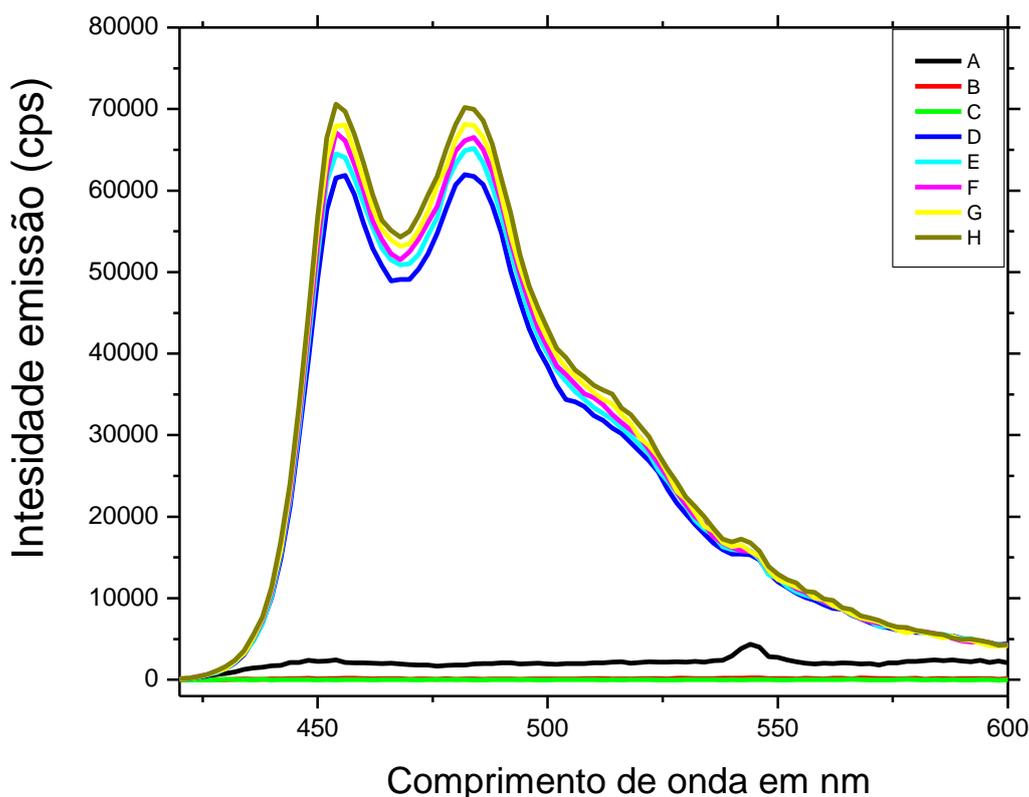
## 9.6 Detecção de oxigênio singlete pelo método indireto com DPBF

### 9.6.1 Caracterização do creme base em 315 nm

A determinação de emissão de oxigênio singlete por método direto ocorre por emissão em 1270nm. Assim, o sistema de detecção e quantificação está restrito a soluções, uma vez que para sistemas coloidais a aplicação de método direto torna-se inviável devido ao espalhamento de luz. Deste modo, a produção de oxigênio singlete foi determinado por método indireto, onde foram utilizados DPBF como sonda, e a sua fluorescência como detecção. O estudo foi realizado utilizando-se irradiação em 315nm, 400nm e 667 nm. O Gráfico 13 apresenta os estudos prévios realizados com a

formulação (creme) na ausência dos extratos. Neste estudo, a amostra foi irradiada por períodos múltiplos de 90 segundos.

Gráfico 13 – Espectros de emissão fluorescente do creme na ausência de DPBF (A) creme base; (B) referência escuro sem a placa; (C) referência escuro sem a placa com a íris fechada; todos com 13,16 n mol DPBF. Excitação a 400 nm, após cada intervalo de irradiação a 315 nm (D) 0 s; (E) 90 s; (F) 180 s; (G) 270 s e (H) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*.



Fonte: a autora.

Para uma análise fidedigna dos espectros de emissão fluorescente, foram realizadas medidas prévias da placa suporte (B) e da placa com o “Shutter” fechado (C). Nestes ensaios não foram observadas emissões entre a área varrida (400-700 nm). Em ensaios subsequentes, foi depositado em um dos poços da placa um (1) grama do creme de incorporação e determinado o espectro de fluorescência (A), onde foi observado uma banda discreta centrada em 540 nm. Esta emissão é atribuída aos componentes do creme. Na sequência foi adicionado DPBF e tudo foi perfeitamente homogeneizado.

Subsequentemente a amostra foi excitada em 400 nm e realizado uma varredura de 400-700 nm para a obtenção do espectro (D). Para as próximas leituras, a amostra foi irradiada em 315 nm por ciclos de 90 segundos e foi realizada a leitura nas mesmas condições anteriores. Sendo determinados os espectros 90 s (E) < 180 s (F) < 270 s (G) < 360 s (H). O espectro de emissão apresenta a curva característica do DPBF com máximos de em 456 nm e 484 nm, com intensidades equivalentes, além do ombro em 540 nm, que é referente a emissão do creme base. Quando analisada a evolução temporal da irradiação, foi observado um incremento sistemático para a banda do DPBF. Este incremento foi atribuído a desestabilização do sistema lipossomal e, conseqüentemente, redução do espalhamento de luz. O sistema lipossomal pode, ainda, ter sido afetado por calor.

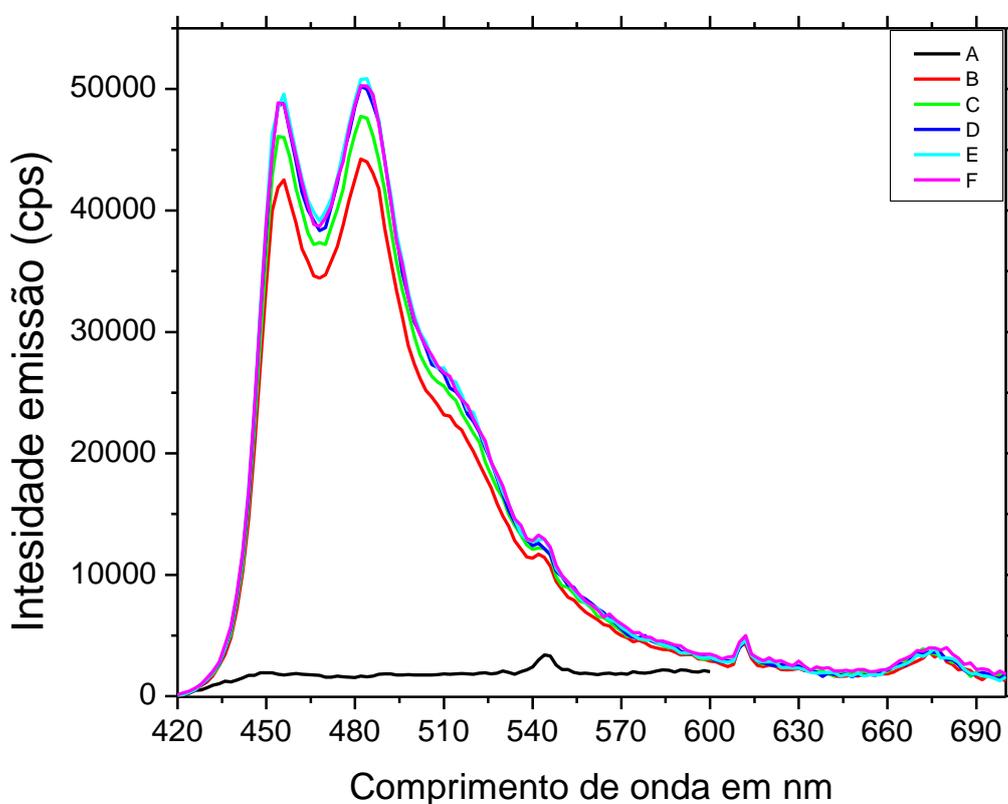
#### 9.6.2 Caracterização do extrato da casca incorporado ao creme com irradiação em 315 nm

Para a caracterização dos extratos de *Brosimum gauduchaudii* foram adotados rigorosamente as mesmas condições estabelecidas nos ensaios de caracterização do creme base. A cada poço da placa foi adicionado 1 (um) grama de creme incorporado com extratos de diferentes partes de *B. gauduchaudii*. Em cada poço com o creme foi adicionado DPBF e foi perfeitamente homogeneizado. Na sequência foram determinados os espectros de emissão fluorescência, os quais estão apresentados nos gráficos 14, 15, 16 e 17.

No ensaio para a caracterização do creme com extrato da casca foi tomado como referência o espectro de emissão fluorescente do creme base (A), onde foi observado que a curva espectral não sofreu alterações que venham a diferir daquela obtida inicialmente no Gráfico 13. Para os demais espectros do creme com extrato da casca, foi observado uma emissão própria do DPBF, o qual é perfeitamente identificada por suas duas bandas características em 456 nm e 484 nm. A intensidade de emissão, foi determinada na seguinte ordem: 90 s (C) < 180 s (D) < 270 s (E)  $\approx$  360 s (F). Todas as curvas espectrais estão apresentadas no Gráfico 14. Neste ensaio também foi observado que ocorre um incremento da intensidade de emissão com o tempo, confirmando assim, o resultado já obtido na caracterização do creme base na presença de DPBF. No entanto,

aqui foi observado que o incremento temporal foi reduzido ao se prolongar o período de irradiação. Isto mostra que não ocorre linearidade temporal, fato que parece estar presente nos ensaios de caracterização do creme na ausência do extrato.

Gráfico 14 – Espectros de emissão fluorescência do creme com extrato da casca na ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato da casca do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação à 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.



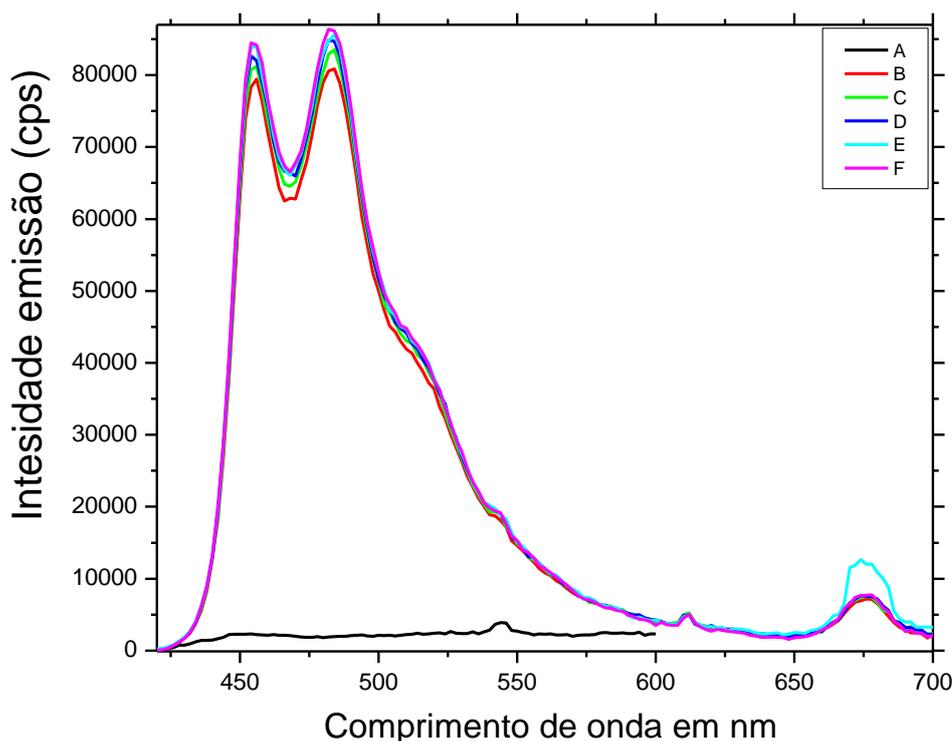
Fonte: a autora.

### 9.6.3 Caracterização do extrato do galho incorporado ao creme em 315 nm

Os estudos de caracterização de atividade pró-oxidativa/antioxidante do creme com extrato do galho foram realizados tomando-se como referência o espectro de emissão fluorescente do creme base (A). Nestes ensaios, foi observado a manutenção da curva espectral de emissão fluorescente. Os demais ensaios onde o DPBF está presente

foi perfeitamente caracterizado pelo perfil espectral destas curvas, já bem definida neste estudo. Todas as curvas estão apresentadas no Gráfico 15. As intensidades de emissão são apresentadas na seguinte ordem: 90 s (C) < 180 s (D) < 270 s (E) < 360 s (F). Esta ordem de intensidade do sinal é similar aquelas apresentada para o creme base na ausência dos extratos. Neste sentido, a presença do extrato do galho de *B. gaudichaudii* parece não apresentar atividades pró-oxidante e/ou antioxidantes frente ao DPBF quando irradiado em 315 nm.

Gráfico 15 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato do galho e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato do galho de *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm. (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh Instruments.



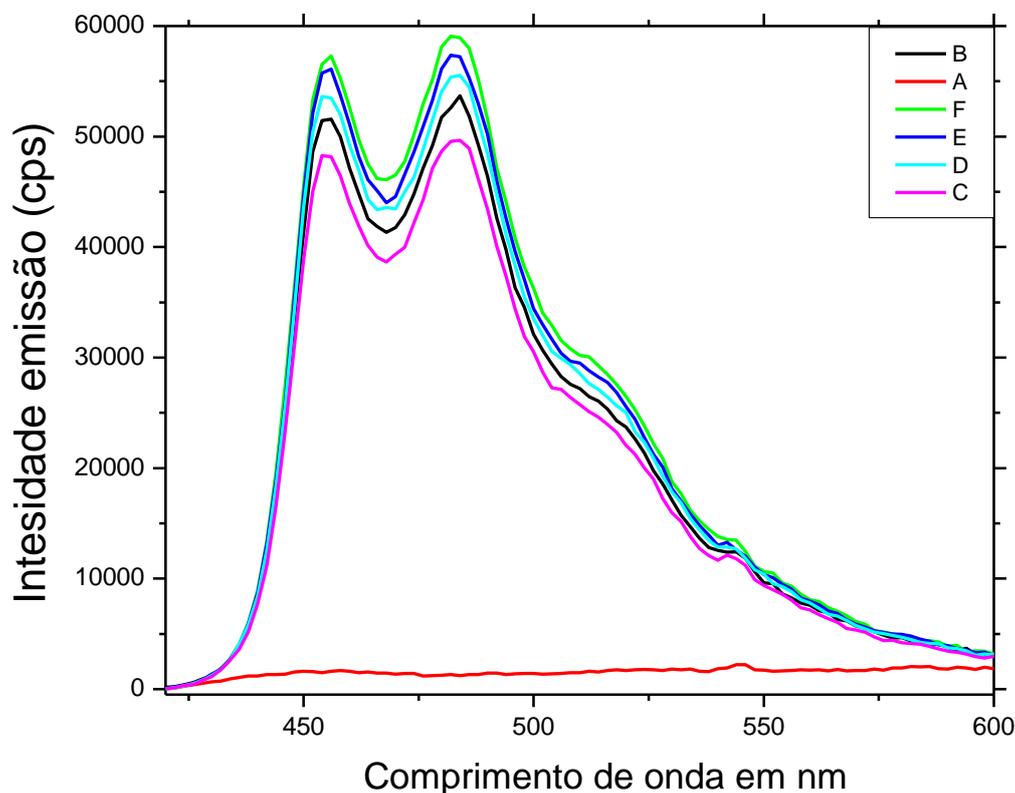
Fonte: a autora.

#### 9.6.4 Caracterização do extrato da folha incorporado ao Creme em 315 nm

De forma análoga foram realizados os ensaios para o creme com extrato da folha. Estes ensaios estão apresentados no Gráfico 16. Quando as curvas de emissão

fluorescente foram analisadas, foi observado que a curva de emissão do creme base se manteve inalterada. Já quando analisada a intensidade da curva de emissão referente a DPBF em 484 nm, foi observado a seguinte ordem: 0s < 90 s (C) > 180 s (D) > 270 s (E) > 360 s (F). Assim, foi verificado que a evolução temporal da intensidade em 484 nm diverge daquela do Gráfico 13, onde foi observado a emissão fluorescente da sonda (DPBF) na ausência de extratos da planta. Para os primeiros 90s de irradiação foi observado um incremento na intensidade de emissão, do mesmo modo que para os ensaios referentes ao creme base. Já para as curvas espectrais subsequentes 180 s, 270 s e 360 s, observou-se um decréscimo não linear na intensidade de emissão. Visto que a intensidade de emissão é diretamente proporcional a quantidade de matéria (concentração de DPBF), equação 1, foi determinado que quando excitado em 315 nm o extrato da folha de *B. gauduchaudii* produz espécies reativas de oxigênio que atacam o DPBF.

Gráfico 16 – Espectros de emissão fluorescência do creme com extrato da folha de *B. gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato do folha do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.

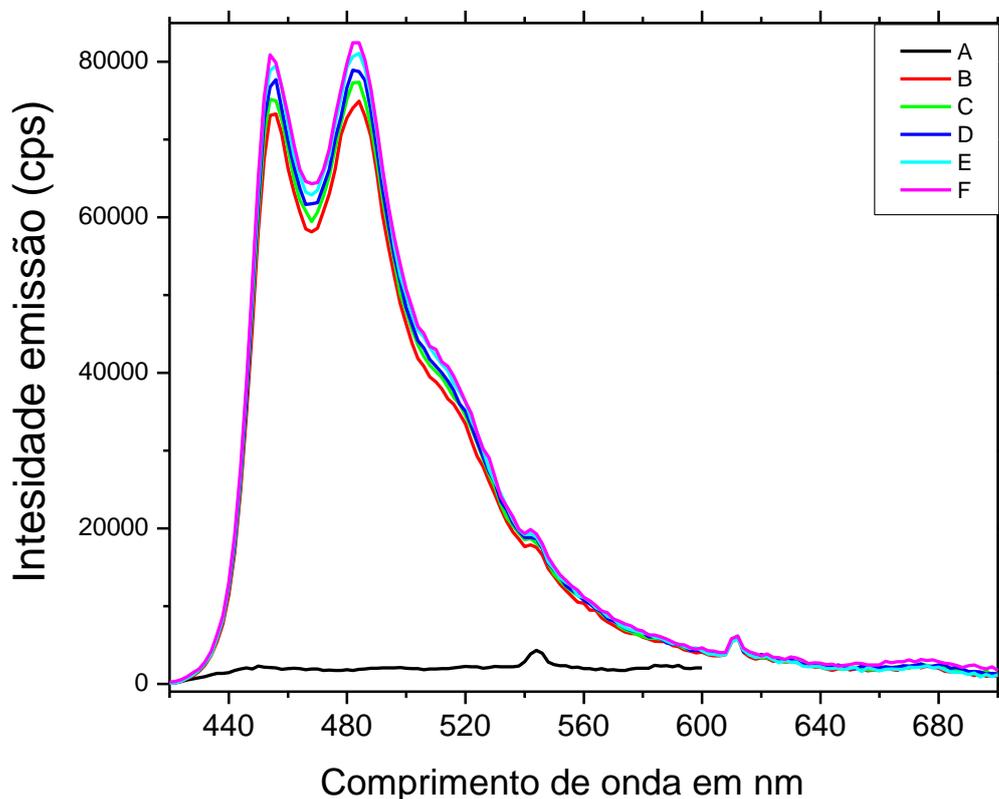


Fonte: a autora.

#### 9.6.5 Caracterização do extrato da raiz incorporado ao Creme em 315 nm

O Gráfico 17 apresenta as curvas espectrais referentes a emissão fluorescente do creme com extrato da raiz. Mostra uma evolução temporal do espectro análogo aquela apresentada para a curva no Gráfico 13 para o creme. Desta forma, ficou demonstrado que os extratos da raiz, quando irradiado a 315 nm, não apresentam atividades relevantes frente ao DPBF.

Gráfico 17 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da raiz *B. gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) e com DPBF na presença de extrato da raiz do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 315 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*.



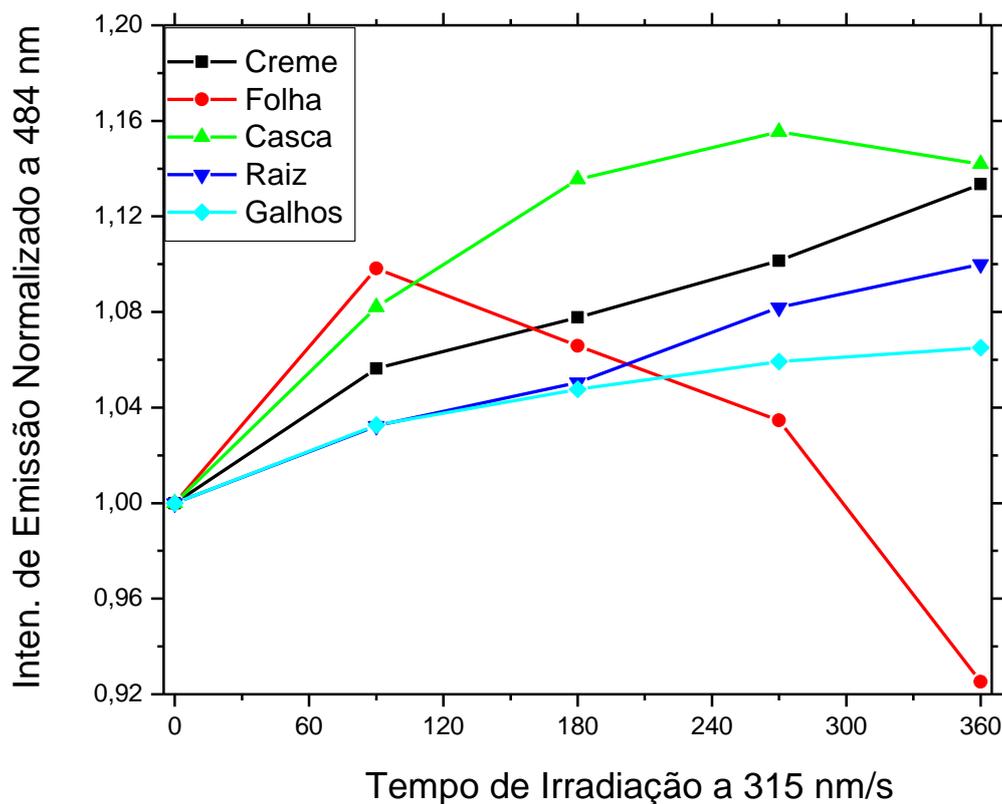
Fonte: a autora.

#### 9.6.6 Cinética de supressão fluorescente de DPBF de intensidade de emissão fluorescente em 315 nm

Quando comparadas as curvas temporais de intensidade de emissão fluorescente (cinética), Gráfico 18, foi observado que as curvas referentes ao creme do galho e da raiz apresentam perfis semelhantes ao creme base, onde foram observados incrementos temporais de intensidade com tendência a linearidade. Estes incrementos foram atribuídos a desestabilização do creme e, conseqüentemente, redução no espalhamento da luz, potencializando a intensidade de emissão. Já para a curva cinética referente ao creme com extrato do galho, foi observado que a cinética distancia da linearidade. Para

o creme com o extrato da folha foi observado redução da intensidade de emissão, mostrando o consumo da sonda quando o extrato da folha foi irradiado em 315 nm. Este fato indica que a irradiação, neste comprimento de onda, conduziu à formação de espécies reativas e houve consumo da sonda por ataque destas espécies.

Gráfico 18 – Variação da intensidade de fluorescência de DPBF (sonda de oxigênio singlete, excitação a 315 nm, emissão a 484 nm) com o tempo de irradiação do creme à 315 nm na presença dos extratos de *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

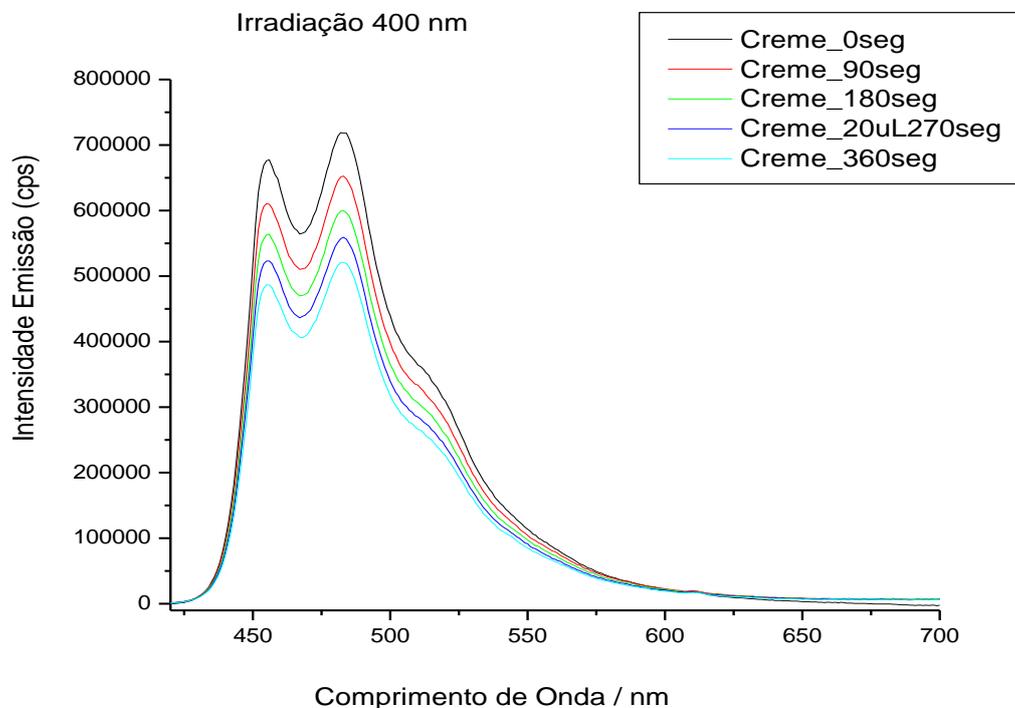
#### 9.6.7 Estudos por irradiação em 400 nm.

Para a análises das atividades pró e antioxidantes, os extratos foram estudados conforme o perfil espectral de absorção, onde foi observado a presença de bandas intensas em 400 nm e 660 nm, o que indicou a possibilidade de estudos nestes comprimentos de onda. Nesta etapa foram analisados os cremes incorporados com os diferentes extratos de *B. gaudichaudii*.

#### 9.6.8 Estudo do creme sem extratos da planta *B. gaudichaudii* irradiado em 400 nm

O estudo com o creme sem os extratos da planta *B.gaudichaudii* com a sonda DPBF, irradiado em 400 nm foi realizado e observa-se, pelo Gráfico 19, que o creme não apresenta nenhuma atividade relacionada à clorofila. Porém, percebe-se aumento e queda de intensidade de emissão com o tempo de irradiação, porque a sonda tem espécies reativas que promovem a autodestruição.

Gráfico 19 – Espectros de emissão de fluorescência do creme sem extratos do *B. gaudichaudii* e com a sonda DPBF. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*

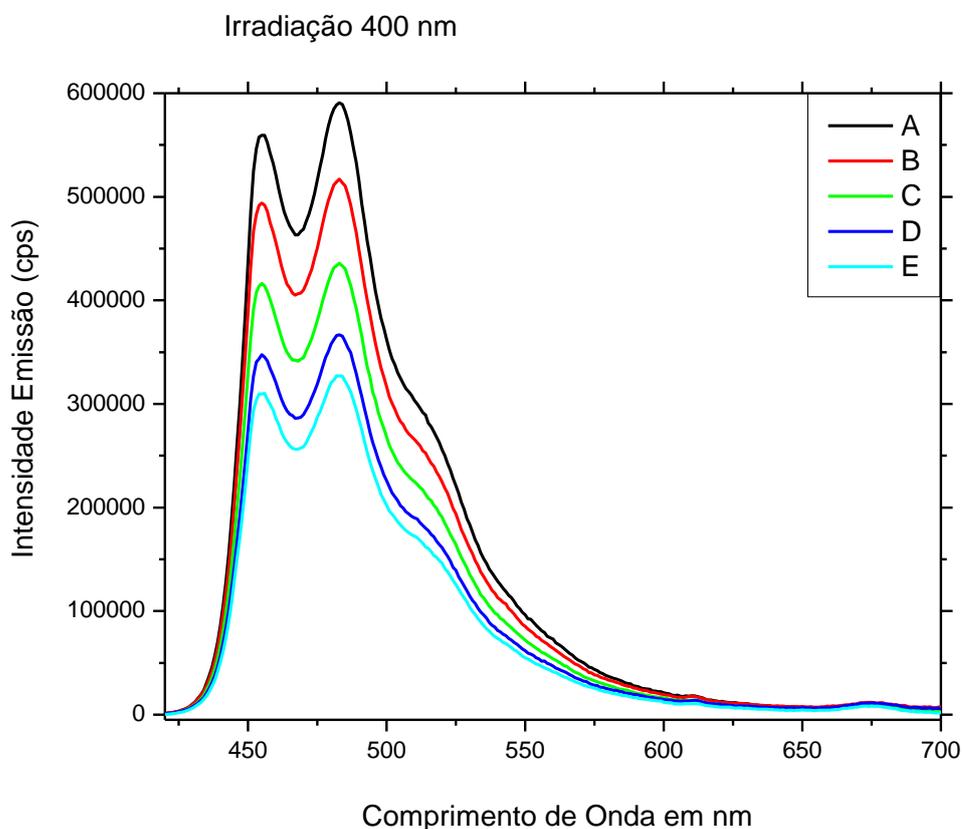


Fonte: a autora.

#### 9.6.9 Estudo do creme incorporado ao extrato da casca irradiado em 400 nm

O Gráfico 20 mostra o espectro do creme com extrato da casca do *B. gaudichaudii*. As curvas de emissão fluorescente apresentam o perfil espectral da sonda com máximos em 456 nm e 482 nm. Já em 676 nm foi observado uma pequena banda, atribuída a clorofila e seu derivados, assim como nos ensaios anteriores.

Gráfico 20 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da casca. *gaudichaudii* com DPBF na presença de extrato da casca do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*.



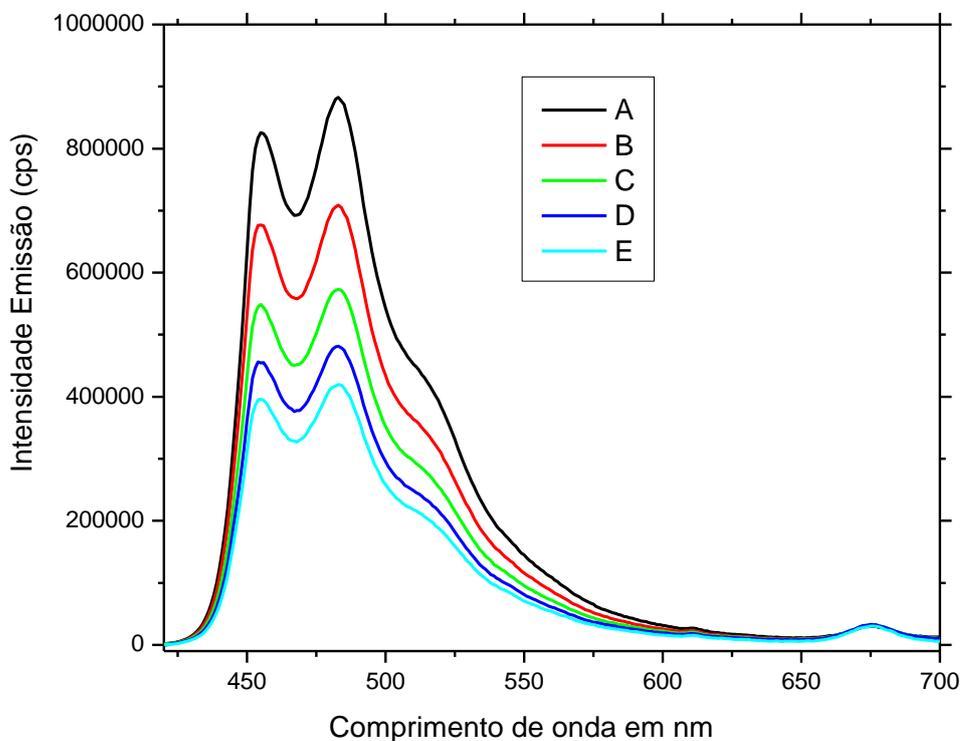
Fonte: a autora.

De forma análoga aos demais ensaios com irradiação em 400 nm, foi observado um decréscimo temporal com a irradiação. Este decréscimo mostra que a sonda está sendo consumida, sendo proporcional ao tempo de irradiação.

#### 9.6.10 Estudo do creme incorporado ao extrato do galho irradiado em 400 nm

Este mesmo estudo foi realizado com o creme contendo os demais extratos. O Gráfico 21 apresenta os resultados para o creme contendo o extrato do galho. Tais resultados são semelhantes àqueles obtidos com o creme do extrato da folha.

Gráfico 21 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato do galho do *B. gaudichaudii* com DPBF. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (A) 0 s; (B) 90 s; (C) 180 s; (D) 270 s e (E) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*.



Fonte: a autora.

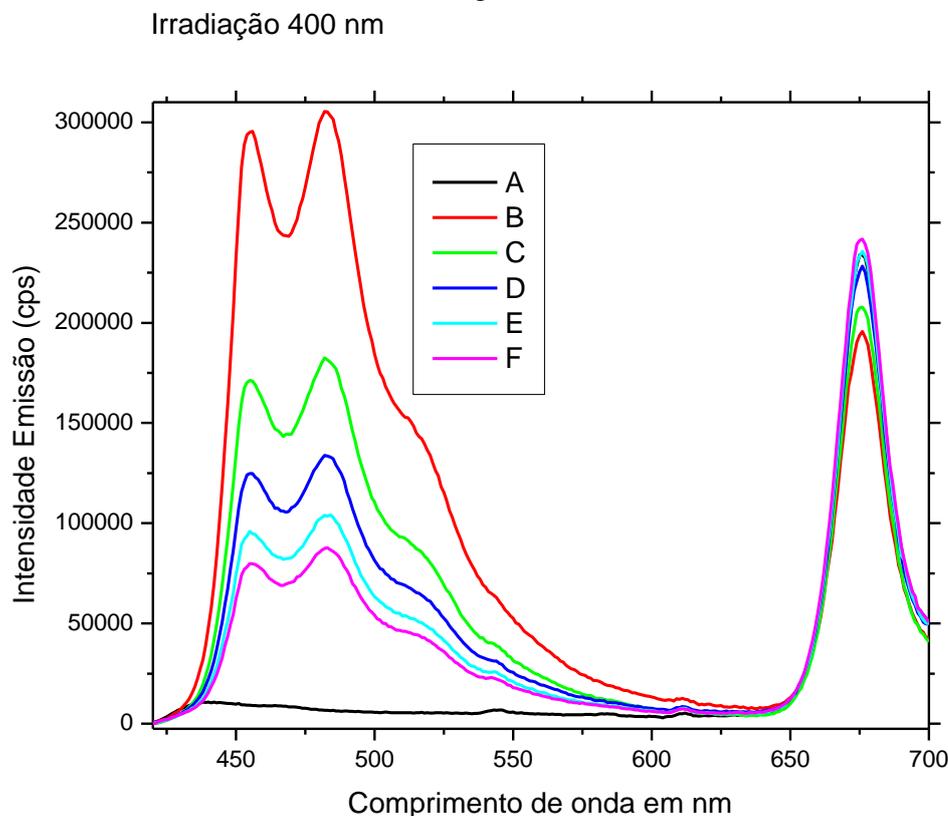
No creme com o extrato do galho foi observado um decréscimo das bandas referentes ao DPBF da mesma forma que no creme com extrato da folha (Gráfico 22). Já em 676 nm encontra-se uma banda de baixa intensidade atribuída a emissão fluorescente de clorofila e seus derivados tetrapirrólicos. A baixa intensidade desta banda indica quantidades reduzidas de clorofila, o que impossibilitou uma diferenciação nas intensidades das curvas de emissão fluorescente em 676 nm. No entanto, foi verificado que ocorre uma redução temporal nas intensidades das bandas em 456 nm e 482 nm, o que indica um consumo temporal da sonda.

Ao analisar o espectro de absorção da sonda DPBF verifica-se uma banda de forte absorção em 400 nm, região de sobreposição com a banda Soret dos tetrapirrólicos. Também é conhecido que, quando irradiada nesta região, o DPBF apresenta ação fotossensibilizante e, conseqüentemente, produção de  $^1\text{O}_2$ , o que causa danos foto-oxidativos à própria sonda. Assim, deve-se admitir que, quando os ensaios são irradiados em 400 nm ocorre uma múltipla fotossensibilização (ZHANG; LI, 2011).

#### 9.6.11 Estudo do creme incorporado ao extrato da folha irradiado em 400 nm

O Gráfico 22 apresenta as curvas de emissão fluorescente para o extrato da folha incorporado ao creme. Foi observado que o espectro de fluorescência do creme (A) não difere da curva espectral obtida em experimento análogo, quando os estudos foram realizados com irradiação em 315 nm. Para os estudos das atividades pró-oxidativas e antioxidantes por irradiação em 400 nm, foi adicionado ao creme base a sonda fluorescente DPBF, perfeitamente caracterizada na literatura por sua curva espectral, característica com duas bandas de emissão fluorescentes centrada em 456 nm e 482 nm (ZHANG; LI, 2011). Os demais espectros foram determinados em função do tempo de irradiação e estão apresentados no Gráfico 22.

Gráfico 22 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da folha *B. gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) com DPBF na presença de extrato da folha do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s; (E) 270 s e (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh Instruments



Inicialmente foi determinado o espectro de emissão fluorescente do creme incorporado com extrato da folha de *B. gaudichaudii* por irradiação em 400 nm (A). Para esta curva espectral foram observadas duas pequenas bandas de emissão centradas em 545 nm e em 623 nm. Já em 676 nm foi observado uma banda intensa característica da clorofila e seus derivados tetrapirrólicos, já referenciados em literatura (PUCCI *et al.*, 2021), confirmando a presença destes derivados na formulação.

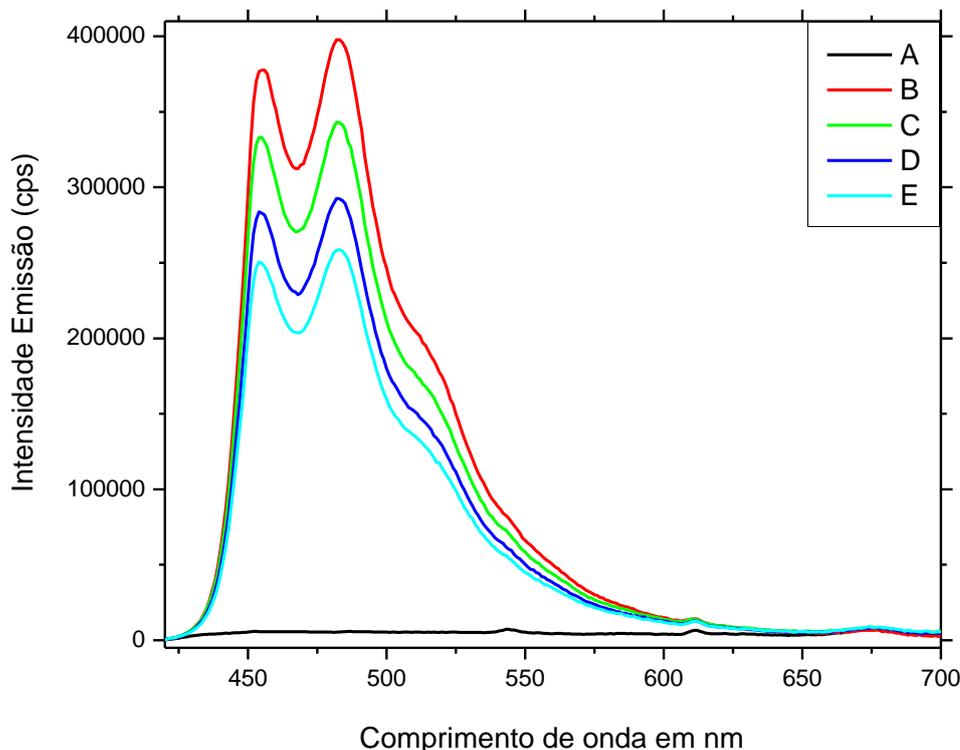
Após a adição de DPBF e uma perfeita homogeneização, foi obtido um novo espectro (B) que também está apresentado no Gráfico 22. A curva espectral do DPBF é perfeitamente caracterizada pelas bandas em 456 nm e 482 nm. Já banda em 676 nm é característica da clorofila e seus derivados. Também foram observados que a banda em 676 nm apresenta intensidade inferior àquela obtida inicialmente para o creme contendo apenas o extrato da folha. A redução na intensidade da banda em 676 nm foi atribuída

ao fato de que, após adição da sonda (DPBF), o creme passa a ser plural quanto aos cromóforos que absorvem em 400 nm (DPBF e os tetrapirrólicos). Assim, sabe-se que a emissão é diretamente proporcional aos fótons absorvidos. Como ocorre mais de um cromóforo com absorção em em 400 nm, foi verificado que a intensidade de emissão em 676 nm foi afetada negativamente, uma vez que os fótons incidentes na amostra são distribuídos aos diferentes cromóforos presentes na amostra (BALZANI; SCANDOLA, 1991). Após os primeiros 90s de irradiação, foi observado uma nova curva de emissão (D). Nesta curva o perfil espectral foi mantido. No entanto, foi observado um decréscimo nas bandas referentes a DPBF e um incremento na banda referente aos derivados tetrapirrólicos em 676 nm. Esta mesma tendência, incremento da banda em 676 nm, e decréscimo das bandas em 456 nm e 482 nm, foi observada para os espectros onde a amostra foi irradiada por períodos superiores. Assim, a ordem de emissão em 482 nm, foi a seguinte: 0s > 90 s (C) > 180 s (D) > 270 s (E) > 360 s (F), sendo o inverso para a banda em 676 nm. Este mesmo estudo foi realizado com o creme contendo os demais extratos.

#### 9.6.12 Estudo do creme incorporado ao extrato da raiz irradiado em 400 nm

O Gráfico 23 corresponde ao espectro de emissão fluorescente da emulsão com extrato da raiz do *B. gaudichaudii*.

Gráfico 23 – Espectros de emissão de fluorescência do creme com extrato da raiz. *gaudichaudii* e ausência de DPBF (A) com DPBF na presença de extrato do raiz do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 400 nm (B) 0 s; (C) 90 s; (D) 180 s e (E) 270 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh *Instruments*.



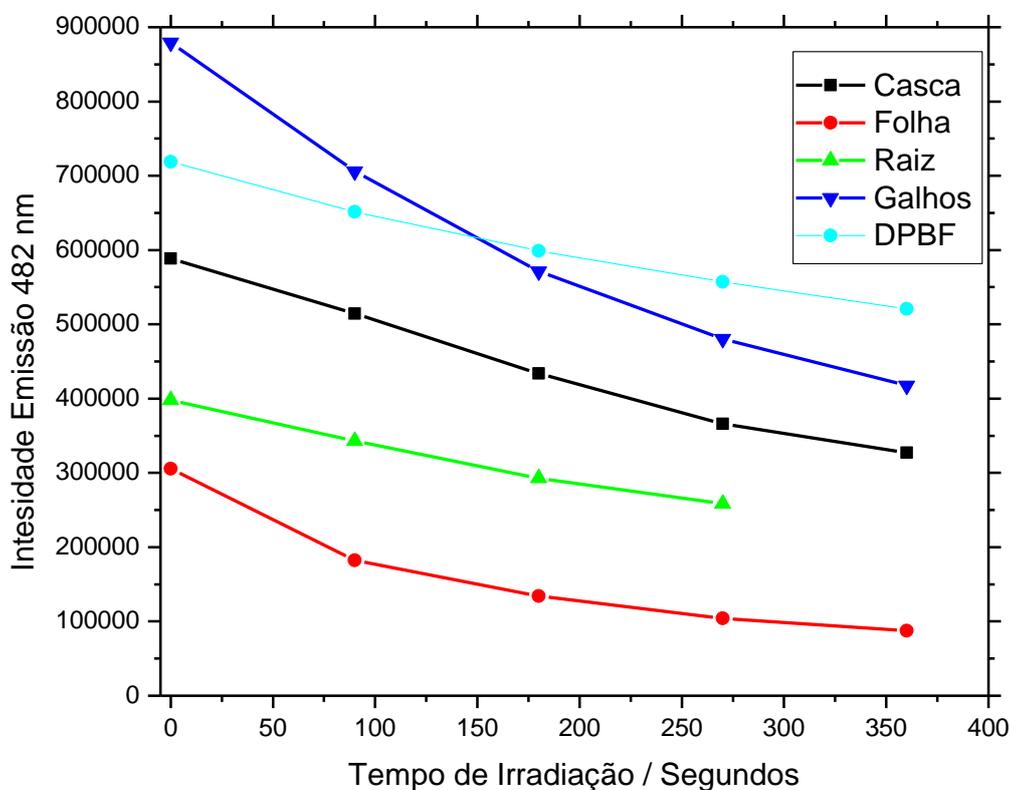
Fonte: a autora.

A curva espectral é referente a emissão do extrato da raiz incorporado à emulsão. Apresenta-se inalterada. Uma banda em 676 nm de baixa intensidade pode ser percebida, a qual apenas permite ser diferenciada pelo ruído. Esta banda indica a presença de compostos tetrapirrólicos, precursores e/ou derivados de clorofila. Após a adição do DPBF e excitação em 400 nm, foi observado espectro característico com bandas centradas em 456 nm e 482 nm. Após a irradiação em 400 nm, por um período de 90 s, foi determinado um novo espectro de emissão, no qual foi observado um decréscimo na intensidade das respectivas bandas. Para os próximos ciclos de irradiação, ficou determinado que a intensidade das bandas de emissão são inversamente proporcionais ao período de irradiação.

## 9.6.13 Cinética de supressão fluorescente de DPBF

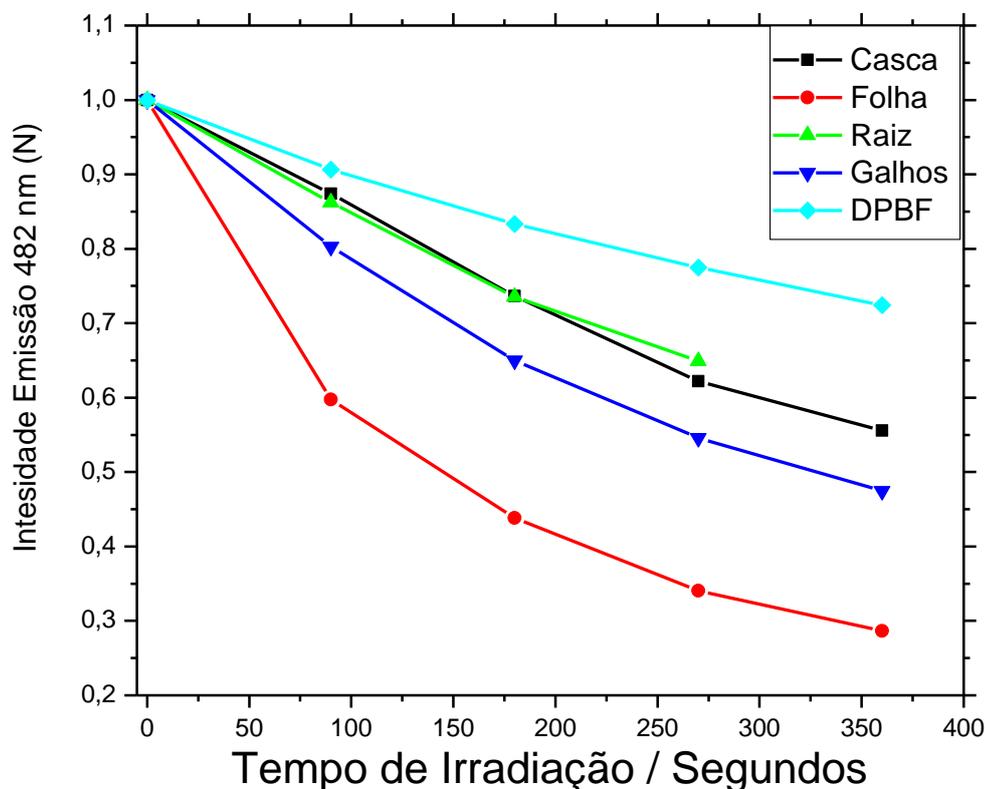
O Gráfico 24 apresenta as curvas cinéticas de decaimento da intensidade de fluorescência do DPBF em 482 nm referentes aos quatro diferentes extratos, sendo apresentada em valores absolutos (unidade adimensional) no Gráfico 25. Para uma melhor interpretação dos resultados, os valores foram normalizados no tempo zero, e estão apresentados no Fráfico 25.

Gráfico 24 – Curvas cinéticas de decaimento da intensidade de fluorescência do DPBF referentes aos extratos do galho, raiz, folha e caule do *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

Gráfico 25 – Curvas cinéticas de decaimento da intensidade de fluorescência do DPBF normalizada, referentes aos extratos do galho, raiz, folha e caule do *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

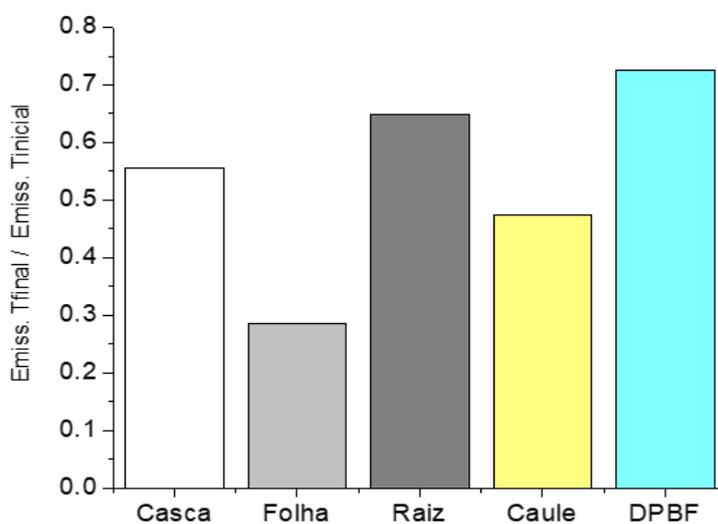
Analisando o Gráfico 25 normalizado (-), foi observado que ocorre uma redução na intensidade de emissão fluorescente do DPBF com o tempo de irradiação. Este decréscimo na intensidade, quando irradiada em 400 nm, está relacionado a ação fotossensibilizante do DPBF, que leva a produção de espécies reativas de oxigênio, responsáveis pela degradação do fluoróforo (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993; ZHANG; LI, 2011). Tendências superiores de supressão da fluorescência foram observadas para os demais ensaios com os extratos de *B. gaudichaudii*, na seguinte ordem: casca (-)  $\approx$  raiz (-) < galho (-) < folha (-). Foi observado que esta ordem confere com a intensidade das bandas em 400 nm e 666 nm no espectro de absorção dos extratos que, por sua vez, também é a mesma na 676 nm no espectro de emissão. Estas bandas são características da clorofila e seus derivados tetrapirrólicos. Sendo assim, a ação foto-oxidativa, responsável pela degradação do DPBF, foi atribuída a clorofila e seus derivados, além da auto-supressão da sonda DPBF que, quando irradiada na região de 350 nm a 450 nm também pode produzir espécies reativas por fotossensibilização (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993; ZHANG; LI, 2011).

A grande ação acontece nos primeiros 90 segundos visto que, nos instantes iniciais ocorre concentração máxima das espécies fotossensibilizantes e, devido à auto oxidação, estas espécies são consumidas com o período de irradiação.

#### 9.6.14 Comparativo entre os extratos da planta *B. gaudichaudii*

Os extratos foram analisados quanto a seu poder foto-oxidativo durante o período de irradiação (360 s).

Gráfico 26 – Poder foto-oxidativo em porcentagem referente a autosupressão e a autossupressão + extratos de *B. gaudichaudii*



Fonte: a autora.

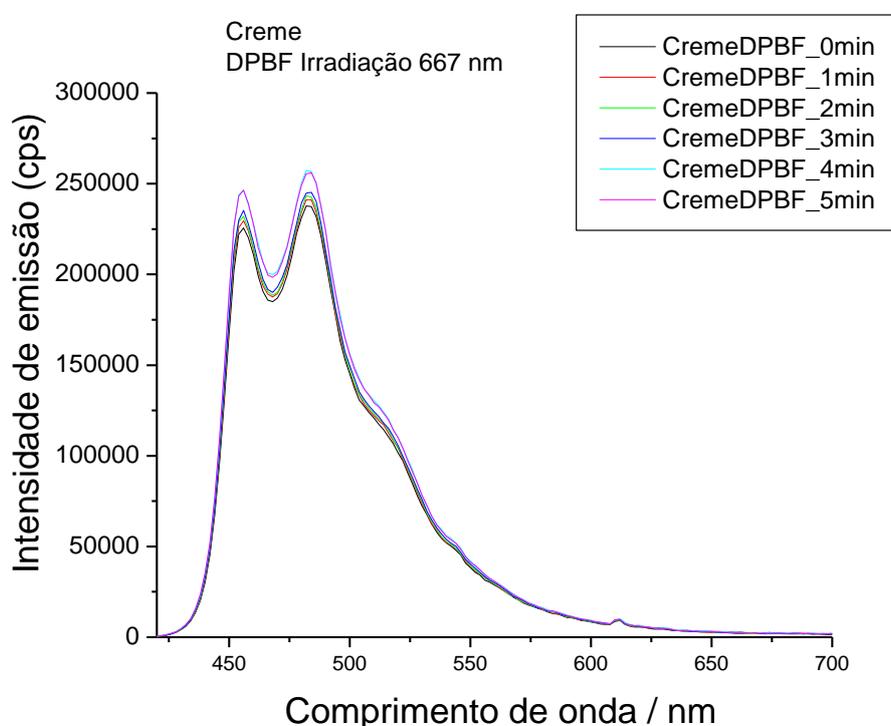
Esta análise foi determinada tomando como referência a auto-supressão da sonda ( $\approx 28\%$ ). Na sequência foi realizado um estudo quantitativo/comparativo, onde foi observado que o extrato da raiz apresentou uma supressão de  $\approx 35\%$ ; casca  $\approx 45\%$ ; galho  $\approx 48\%$ ; folha  $71\%$ . Sendo determinado, assim, um maior poder foto-oxidativo dos extratos da folha que, por sua vez, também é o extrato mais rico em clorofila.

#### 9.6.15 Estudo da detecção de oxigênio singlete pelo método químico do DPBF com irradiação em 667 nm.

Uma breve análise do espectro UV-vis (Gráfico 27) mostra uma banda intensa em 667 nm, demandando a presença de cromóforos nesta região e, conseqüentemente,

demandando estudos por irradiação neste comprimento de onda, para mais uma avaliação da atividade pró/antioxidantes dos extratos. Para tal avaliação foi adotado a mesma sistemática, realizando estudos do creme na ausência e presença dos extratos. No Gráfico 27 estão apresentados os espectros de emissão para o creme na presença de DPBF e ausência dos extratos. Mostra os espectros obtidos para o creme em função do tempo.

Gráfico 27 – Espectros de emissão fluorescente do creme na presença de DPBF. Excitação a 400 nm, após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s; (E) 240 s (F) 300 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio Edinburgh Instruments.



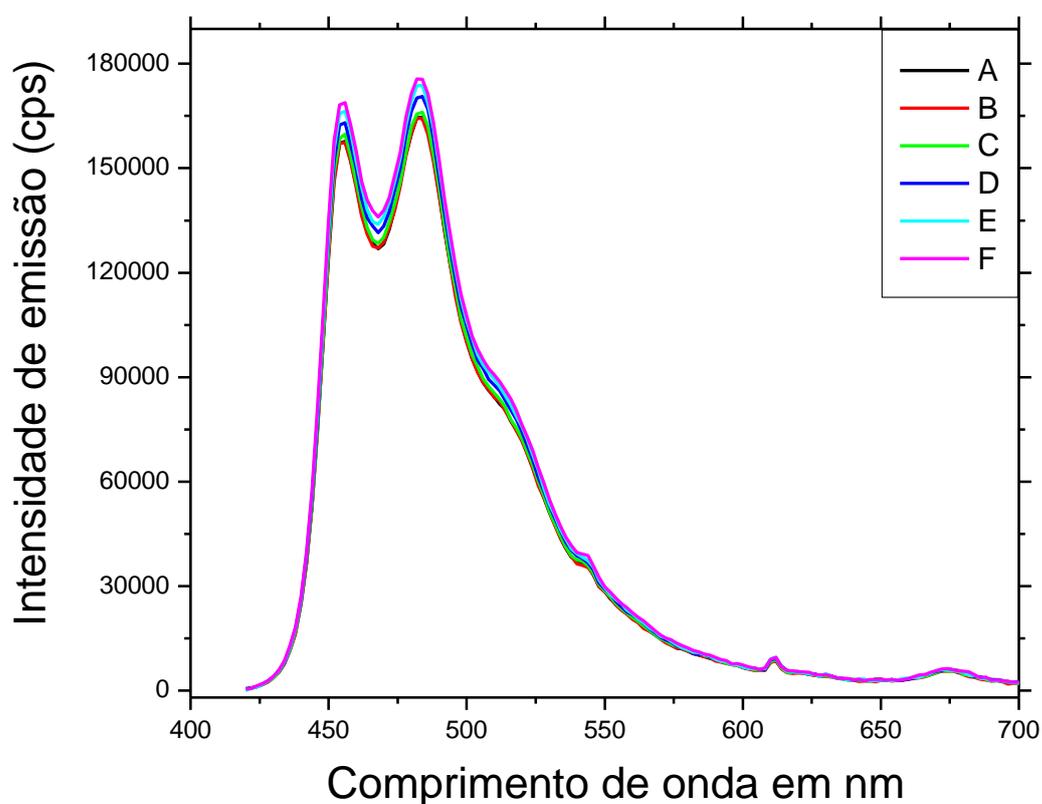
Fonte: a autora.

Foi observado que a intensidade da banda em 482 nm, determinado experimentalmente, apresenta a seguinte ordem: 0 segundos (A) < 60 segundos (B) < 120 segundos (C) < 180 segundos (D) < 240 segundos (E)  $\approx$  300 segundos (F). Esta sequência apresenta uma evolução positiva na intensidade do sinal com o tempo de irradiação. O incremento temporal da intensidade de emissão fluorescente, já observado para irradiação em 315 nm, foi atribuído a desestabilização do sistema lipossomal e consequentemente redução do espalhamento de luz. É importante lembrar que a

estabilidade deste sistema está sujeita a parâmetros físico-químicos tais como calor e luz.

O Gráfico 28 mostra o espectro de emissão fluorescência do creme sem e com DPBF na presença de extrato da casca da *B. gaudichaudii*.

Gráfico 28 – Espectros de emissão fluorescência do creme com DPBF na presença de extrato da casca da *B. gaudichaudii*, excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s; 240 (E); (F) 240 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.



Fonte: a autora.

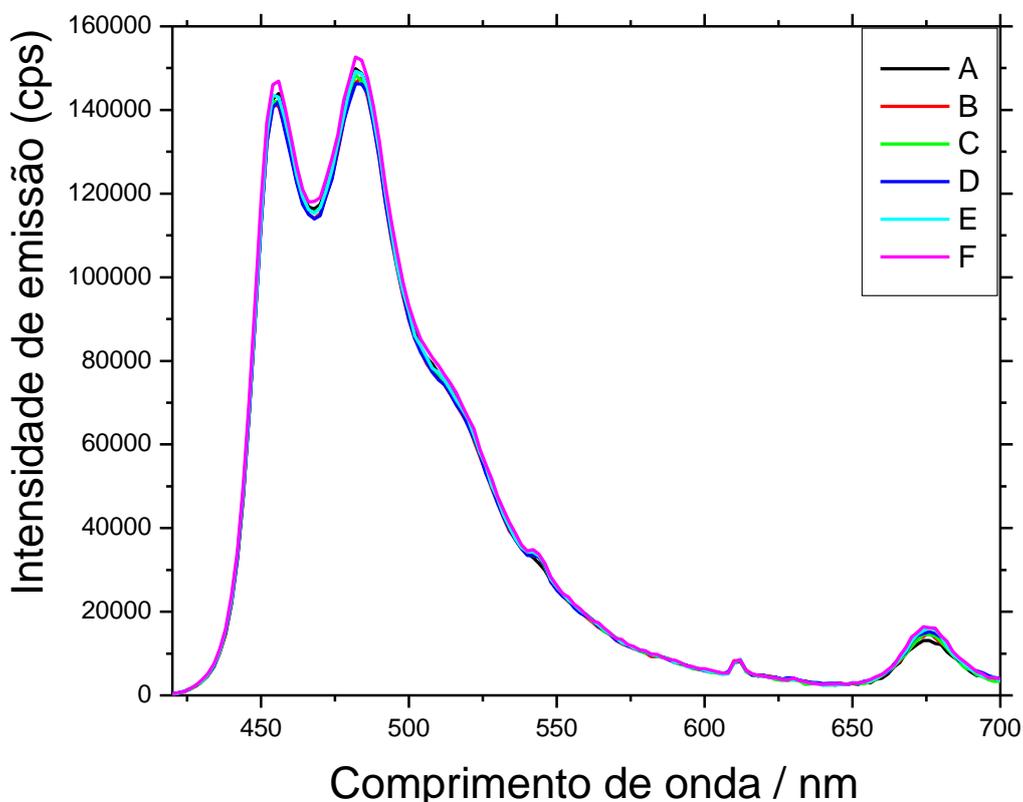
Para o creme com extrato da casca também foi observado incremento reduzido na intensidade do sinal em 482 nm com o período de irradiação em 667 nm. Este resultado é análogo ao obtido nos ensaios com o creme base e aqueles contendo extratos da raiz e caule.

Neste sentido, ficou evidente que os efeitos foto-oxidativos por irradiação em 667 nm foram relevantes apenas para o extrato da folha do *B. gaudichaudii*. Podemos

observar tanto nos espectros de absorção como nos espectros de emissão, que o extrato da folha, como esperado, apresenta clorofila em sua composição. A presença do pigmento foi perfeitamente caracterizada pelas bandas de absorção em 400 nm referentes a banda solet e pela band Q4 que absorve em 665nm. Já a emissão fluorescente da clorofila e seus derivados tetrapirrólicos ocorre em 674 nm. Foi observado uma quantidade expressiva de clorofila para o extrato da folha. Para os demais extratos foram observadas bandas de emissão fluorescente em 674nm de baixa intensidade, sendo que, em alguns casos, esta banda pode ser diferenciada apenas pelo ruído por uma proporção 5:1.

O Gráfico 29 apresenta os espectros obtidos para o creme com extrato do galho em função do tempo.

Gráfico 29 – Espectros de emissão fluorescência com DPBF na presença de extrato do galho de *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm. (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s (E) 240; (F) 360 s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.

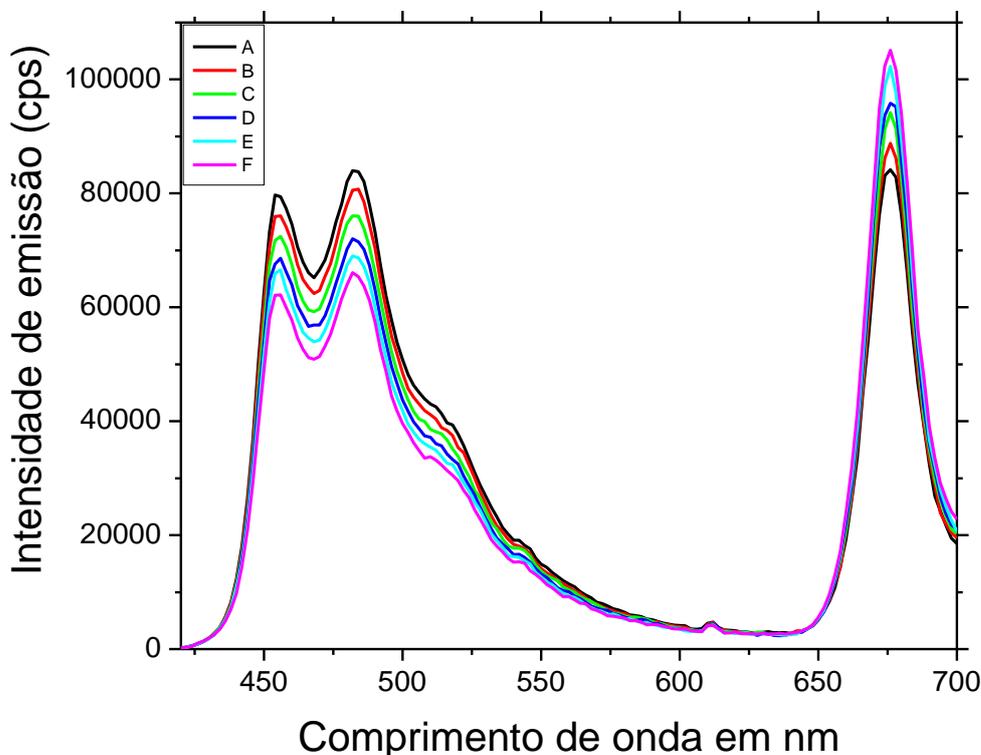


Fonte: a autora.

Para o creme com extrato do galho não foram observadas diferenças relevantes no que se refere a intensidade de emissão em função do período de irradiação. É provável que esta “estabilidade” não seja decorrente da ausência de processos fotoinduzidos, mas sim de atividades múltiplas e opostas. Pode ser observado, no espectro de absorção, uma banda em 665 nm, referente à banda Q4 da clorofila e/ou aos seus derivados tetrapirrólicos. Já o espectro de emissão apresenta uma banda em 674 nm, o que confirma a presença da clorofila e seus derivados tetrapirrólicos no extrato. Desta forma, como foi verificado em ensaios anteriores (gráficos 28 e 29) que a intensidade da banda de emissão da sonda DPBF sofre incremento temporal. E ainda, que frente a ação fotossensibilizante da clorofila à sonda DPBF, ocorre um decréscimo nas mesmas bandas. Neste sentido, os efeitos parecem ter ocorrido em proporções equivalentes, aparentando ser de forma compensatória. No entanto, os ensaios indicam que processos fotoinduzidos múltiplos estão presentes no referido experimento.

O Gráfico 30 apresenta os espectros obtidos para o creme com extrato da folha em função do tempo.

Gráfico 30 – Espectros de emissão fluorescência do creme sem e com DPBF na presença de extrato da folha do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s e (E) 240 s; (F) 360s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.



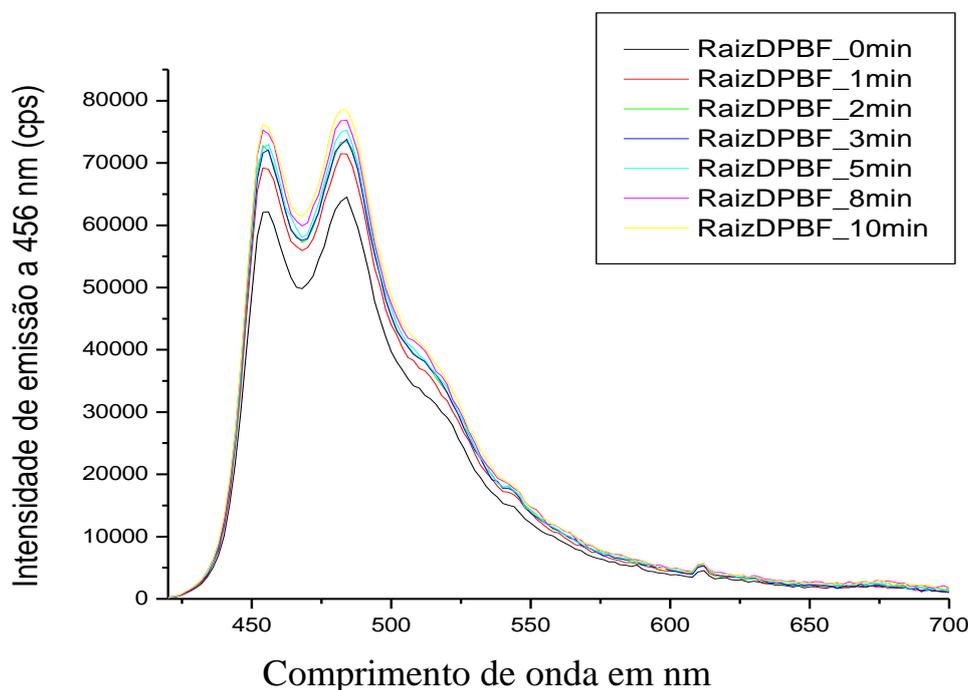
Fonte: a autora.

Para os ensaios do creme com o extrato da folha irradiado em 667 nm, foi observado que a intensidade da banda de emissão em 484 nm apresenta-se na seguinte ordem: 0 segundos (A) > 60 segundos (B) > 120 segundos (C) > 180 segundos (D) > 240 segundos (E). Neste sentido, ficou evidenciado um decréscimo sistemático da intensidade da banda em 484 nm com o período de irradiação. Já a banda de emissão da clorofila 674 nm apresenta-se bastante intensa, inclusive superando as bandas referentes a emissão da sonda DPBF. Está elevada intensidade confirma a concentração de clorofila neste extrato, dados já observados no espectro UV-vis. Por outro lado, foi observado incremento temporal de emissão fluorescente em 674 nm. Este incremento é inversamente proporcional ao decréscimo em 482 nm. Esta correlação entre as bandas decréscimo/incremento confirma os resultados já observados nos gráficos anteriormente, apresentados em 315 nm e 400 nm.

A intensidade da fluorescência é proporcional a quantidade de matéria e a quantidade de fótons incidentes (equação 1). Nestes ensaios, a irradiação foi mantida constante e não ocorre produção de fluoróforos. A correlação entre as bandas é decorrente do decréscimo da concentração da sonda, que é degradada por processos foto-oxidativos durante os períodos de irradiação. Já o incremento para 674 nm é decorrente de uma maior fração de fótons absorvidos pelos tetrapirrólicos. Desta forma, mesma a concentração dos tetrapirrólicos se mantendo constante ou sofrendo um reduzido decréscimo, ocorre uma elevação na intensidade da banda correspondente a este cromóforo.

O Gráfico 31 apresenta os espectros obtidos para o creme com extrato da raiz em função do tempo.

Gráfico 31 – Espectros de emissão fuorescência do creme com DPBF na presença de extrato da raiz do *B. gaudichaudii*. Excitação a 400 nm após cada intervalo de irradiação a 667 nm (A) 0 s; (B) 60 s; (C) 120 s; (D) 180 s; (E) 240 s;(F) 360s. Irradiação e análise no sistema Microscópio\_Edinburgh *Instruments*.



Fonte: a autora.

Para os ensaios do creme com o extrato da raiz foi observado incremento da intensidade de emissão com a evolução do tempo de irradiação. Estes efeitos, além de serem considerados discretos, não estão relacionados a atividade foto-oxidativa, visto

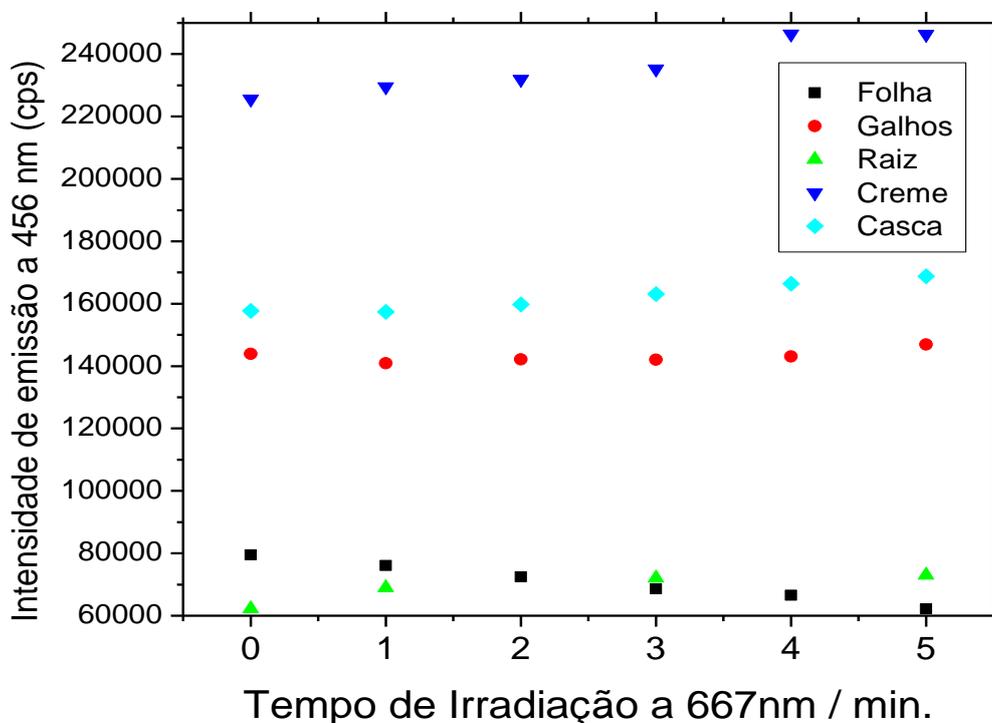
que são opostos aqueles esperados para tal atividade. Neste sentido, a elevação na intensidade de fluorescência foi atribuída a uma possível desestabilização dos cremes e consequente redução das perdas de captação do sinal de luz emitida por redução no espalhamento de luz. Este efeito também foi observado para o creme na presença da sonda e ausência do material de origem vegetal em 667 nm.

#### 9.6.15 Cinética de supressão fluorescente de DPBF por irradiação em 667 nm

A cinética de emissão fluorescente em 482 nm, esta representada no Gráfico 32 para todos os extratos e para o creme base, sendo apresentada em valores absolutos (unidade adimensional) no Gráfico 33, normalizada no tempo zero.

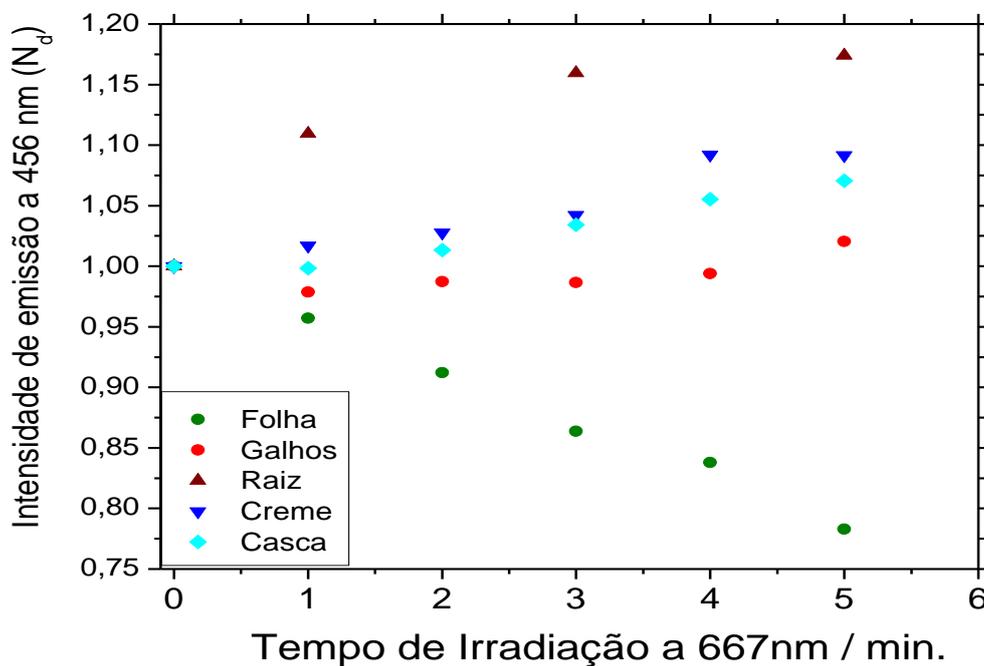
O Gráfico 33 apresenta a variação da intensidade de fluorescência de DPBF a 456 nm em função do tempo de irradiação, apresentando os dados originais e normalizados com excitação a 400 nm e irradiação a 667 nm.

Gráfico 32 – Apresenta a variação da intensidade de fluorescência de DPBF a 456 nm em função do tempo de irradiação (dados originais e normalizados) com excitação a 400 nm e irradiação a 667 nm.



Fonte: a autora.

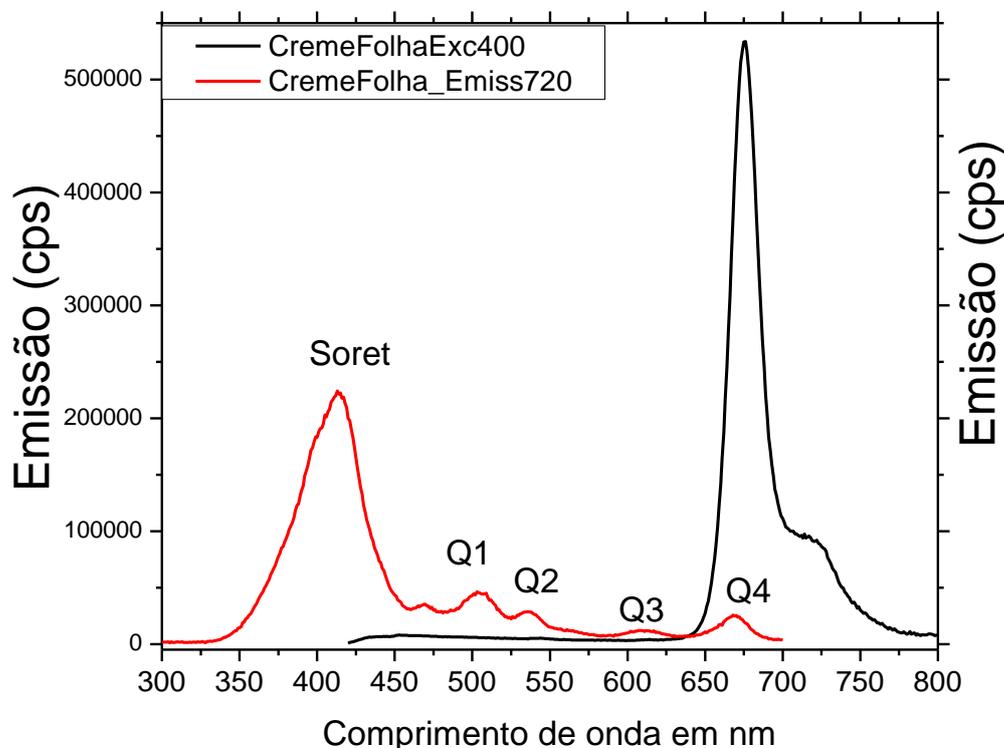
Gráfico 33 – Apresenta a variação de intensidade de fluorescência de DPBF a 456 nm em função do tempo de irradiação (dados normalizados) com excitação a 400nm e irradiação a 667nm



Fonte: a autora.

No Gráfico 33 os dados estão apresentados em valores absolutos. Estas curvas, indicam uma evolução temporal descendente na intensidade de emissão para o creme contendo extrato da folha, enquanto as demais curvas indicam uma evolução positiva na intensidade do sinal. As inclinações das curvas cinéticas são mais bem visualizadas quando apresentadas de forma normalizada no Gráfico 33. Todas as curvas apresentam uma evolução temporal com linearidade, coerente com a Equação 1.

Gráfico 34 – Espectro de excitação/emissão fluorescente do extrato da folha o *B. gaudichaudii* em clorofórmio.



Fonte: a autora.

Neste estudo foi obtido um único tipo de extrato etanólico. Tal procedimento está fundamentados na literatura, pois já foi demonstrado que os psoralenos de *B. gaudichaudii* são extraídos em solução etanólica. A literatura relata a aplicação direta de extratos etanólicos contendo psoralenos irradiados com luz UVA (PUVA) para inúmeros tratamentos dermatológicos, mas há relatos de hipersensibilidade aos extratos utilizados.

O espectro de absorção dos extratos apresenta forte absorção na região UV, mostrando um ombro com o máximo em 315 nm, fato que pode ser atribuído à presença de furanocumarinas. Por outro lado, as fortes absorções em 400 nm e 665 nm, assim como a emissão fluorescente em 674 nm, comprovou a presença de clorofila em todos os extratos, sendo as intensidades destas bandas relacionadas com a concentração da espécie. Ficou evidente, como esperado, elevados níveis de clorofila no extrato das folhas; já para os extratos da casca e raiz, foram determinados apenas quantidades traços do referido pigmento, como já mencionado. A presença de clorofila em quantidades

traços nas raízes, só foi viabilizado graça ao elevado  $\epsilon$  do pigmento e a grande sensibilidade do método de fluorescência. É importante mencionar que os elevados  $\epsilon$  destas moléculas e a alta sensibilidade do espectro de fluorescência contribuiu para a triagem destes cromóforos e fluoróforos em produtos com estes compostos em suas composições.

Sobre a emissão de oxigênio singlete pelo método direto, podemos afirmar que a contribuição de  $^1\text{O}_2$  no potencial foto-oxidativo dos extratos foram perfeitamente caracterizados pelo método direto, onde foi determinado, tanto pelo perfil espectral da curva com máximo em 1270nm, como pelos decaimentos transientes. O tempo de vida de  $^1\text{O}_2$  para solução contendo os extratos foi determinado como sendo inferior ao padrão (fenalenona). Estes resultados foram determinados em clorofórmio e confirmados em etanol. O decréscimo no tempo de vida está relacionado a presença de supressores de  $^1\text{O}_2$ . A presença de espécies supressoras, popularmente conhecidas como antioxidantes, desestabilizam a espécie ( $^1\text{O}_2$ ). A desestabilização pode ocorrer tanto por processos químicos, onde o  $^1\text{O}_2$  ataca uma ligação dupla levando a inúmeros processos foto-oxidativos, incluindo os processos de peroxidação lipídica (BARREIROS *et al.*, 2006) e (WEBER *et al.*, 2014) ou a processos físicos de desestabilização de  $^1\text{O}_2$  (CARNEIRO *et al.*, 2010). Entre os supressores por processos físicos podemos destacar os carotenoides e licopenos (DI MASCIO; KAISER; SIES, 1989) os quais tem como função, inclusive, a fotoproteção do centro fotossintéticos de reação (UCHOA *et al.*, 2008). Quando comparado os tempos de vida em clorofórmio e em etanol, ficou evidente que o fator de supressão aparenta ser superior em clorofórmio. Tal fato, está relacionado com o tempo de vida da espécie no respectivo solvente, visto que, quanto maior o tempo de vida da espécie, maior será a exposição a espécie supressora, maior susceptibilidade ao ataque, conseqüentemente maior a contribuição do supressor para a extinção da espécie (BALZANI; SCANDOLA, 1991). Desta forma, os fatores de supressão são mais bem evidenciados em um solvente onde o  $^1\text{O}_2$  apresenta um maior tempo de vida, clorofórmio.

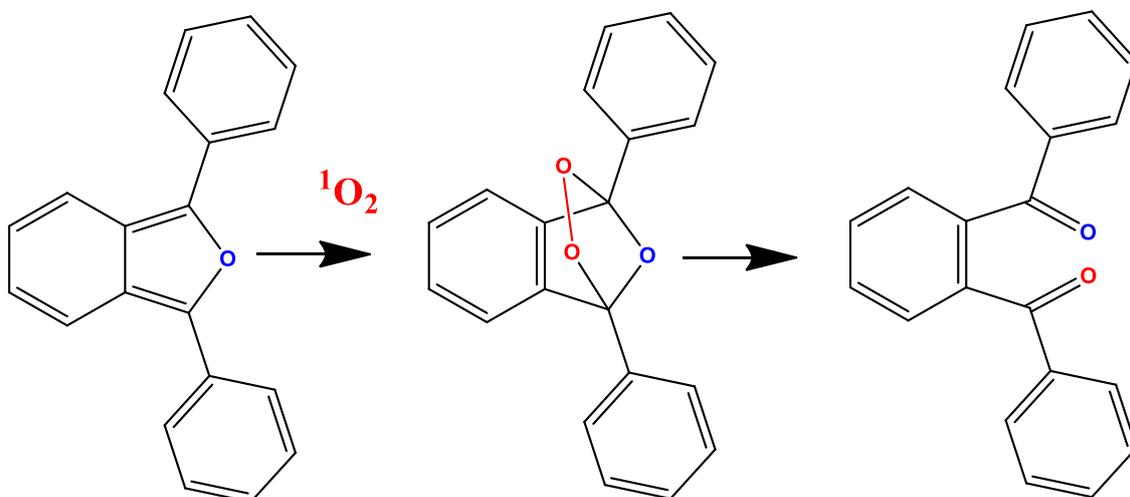
A intensidade de emissão, quando se trata de um composto puro, está relacionada ao rendimento quântico da espécie ( $\phi \Delta$ ) que atua como fotossensibilizador (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993), ou seja, o “poder” de produção de  $^1\text{O}_2$  pela respectiva molécula quando devidamente excitada. No entanto, além dos supressores de

$^1\text{O}_2$  também podemos destacar as espécies que são supressoras do processo de fotossensibilização, ou seja, espécies que podem suprimir o estado excitado dos fotossensibilizadores (single e triplete), sendo mais comum e mais detectáveis aquelas supressoras do estado triplete, uma vez que este apresenta um maior tempo de vida, e consequentemente, está mais susceptível a ação supressora.

A clorofila apresenta rendimento quântico de  $^1\text{O}_2$  em clorofórmio de 0,72. Se tomarmos este como sendo o principal ou único fotossensibilizador, uma vez que os berceptenos não absorvem em 400 nm e 667 nm, seria esperado que a eficiência quântica se aproximasse do rendimento quântico. Para os ensaios com o extrato da folha foi observado uma eficiência quântica de 0,46 em clorofórmio e 0,45 em etanol. Estes resultados são inferiores àqueles mencionados na literatura para o rendimento quântico de clorofila, o que indica a presença de espécies supressoras de triplete no extrato. Para os demais extratos, foi observado uma redução pronunciada (gráficos 3, 5 e 6), onde a eficiência quântica chega a atingir valores que diferem da clorofila por até uma ordem de grandeza. Esta redução foi atribuída a espécies supressoras de triplete, que constam estarem mais acentuadas nos extratos da casca e das raízes.

O poder foto-oxidativo do creme foi determinado por método indireto utilizando a sonda DPBF como detectora de espécies reativas de oxigênio. A opção por tal método foi motivada pela impossibilidade de usar o método direto por fatores de espalhamento de luz. Neste método, a sonda é consumida por espécies reativas de oxigênio, como apresentado no Esquema 7, e sua quantificação em solução pode ser determinada tanto pela sua absorção com máximo  $\approx 410$  nm (WILKINSON; HELMAN; ROSS, 1993) sua emissão fluorescente em 456 nm e 484 nm. No entanto, a fluorescência confere sensibilidade superior à absorção por até duas ordens de grandeza, sendo assim, o método de escolha.

Esquema 7 – Esquema de foto-oxidação de DPBF por ataque de oxigênio singlete, via reação pericíclica [4 +2]



Fonte: a autora.

Adotando o método indireto com DPBF e tomando a fluorescência como detecção do fluoróforo, foi viabilizada uma análise quantitativa/comparativa da ação foto-oxidativa dos extratos no creme. Por ser conhecido que os extratos são constituídos por mais de um tipo espécies fotossensibilizante, procedeu-se a análise com excitação em múltiplas regiões espectrais, sendo as amostras irradiadas em 315 nm, região de forte absorção para os bercaptenos; em 400 nm, onde ocorre absorção de compostos tetrapirrólicos, e em 667 nm, onde ocorre absorção seletiva de clorofila e seus derivados.

Quando comparados os ensaios com irradiação em 315 nm, pode-se observar uma evolução temporal na intensidade do sinal de emissão florescente 484 nm (Gráfico 13), para o ensaio de referência feito com o creme na ausência dos extratos. Este incremento foi atribuído à desestabilização da formulação coloidal. Esta mesma tendência foi observada para o creme com os extratos do caule e da raiz. Analisando o espectro UV-vis, pode-se comprovar que estes também são os extratos mais pobres em compostos clorínicos; já o extrato da casca foi observado estabilização assíntota. No extrato da folha foi detectado um incremento para o primeiro ciclo de 90s, e que para os demais ciclos de irradiação, ocorre um decréscimo que é acentuado com tempo. O comportamento desta curva indica presença de fatores antagônicos, que apresentam evolução temporal distintas.

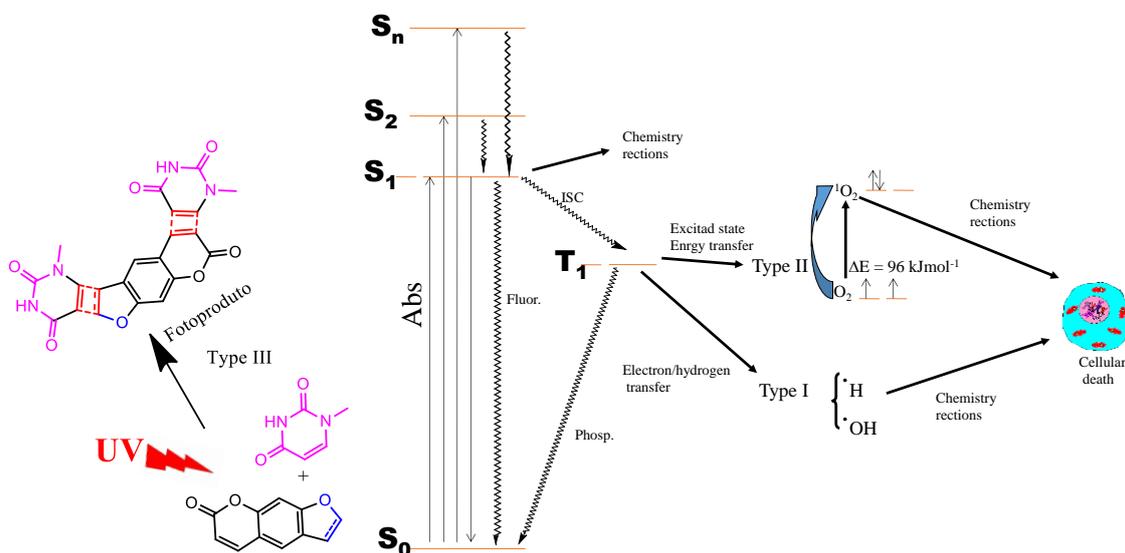
Já para os ensaios onde a irradiação ocorreu em 400 nm, foi observado um decréscimo sistemático na intensidade dos sinais referente a emissão dos DPBF. Este decréscimo também está presente para a nossa curva de referência, creme base na presença do DPBF. Este fato ocorre devido a auto-supressão do DPBF, que por apresentar absorção em 400 nm, pode ser excitado nesta banda, e conseqüentemente, desencadeia processos fotoinduzidos (BALZANI; SCANDOLA, 1991). A Contribuição do auto supressão do DPBF pode ser mensurada pela curva de 400 (Gráfico 25) onde os valores se encontram normalizados. A determinação da auto-supressão para cada tempo possibilita determinar os valores da contribuição do processo foto-oxidativo para cada extrato. Este processo foi determinado por subtração do valor de referência para cada extrato, e confirmando que o extrato da folha é o que apresenta a maior atividade foto-oxidativa frente ao DPBF.

A irradiação em 667 nm define a contribuição dos diferentes cromóforos no processo foto-oxidativo. A banda em 667 nm para extratos de plantas é característica de compostos clorínicos, assim, os valores aqui obtidos estão isentos da contribuição da auto-supressão do DPBF e possível participação de bercaptenos neste processo. O Gráfico 33 apresenta os valores da supressão de DPBF normalizado. É importante mencionar que as curvas apresentam linearidade, estando de acordo com a Equação 1. Esta linearidade, indica singularidade na contribuição dos processos fotooxidativos. O Gráfico 33 também mostra que quando irradia em 667 nm induz processos foto-oxidativos significativo apenas para o extrato da folha, rico em clorofila, uma vez que este é o único que apresenta evolução temporal descendente para a fluorescência do DPBF. Os demais extratos apresentam evolução temporal ascendente, indicando que o fluoróforo não foi afetado de forma significativa. A ascendência temporal destas curvas está relacionada com a desestabilização do creme base, e conseqüentemente, menor espalhamento de luz.

Entre os processos foto-oxidativos decorrente da fotossensibilização de metabólitos presente nos extratos, foi determinado a participação de oxigênio siglete por processo direto com resolução temporal. Já o método indireto, é fundamentado no processo foto-oxidativo de DPBF. Este método engloba oxigênio siglete e outros processos por espécies ROS. Desta forma, podemos definir que os extratos de *B.*

*gaudichaudii* apresentam processos foto-oxidativos por mecanismos múltiplos, os quais são representados no diagrama de Jablonski modificado, como mostra o Esquema 8.

Esquema 8 – Diagrama de Jablonski modificado, ilustrando os mecanismos de ataque fotoquímico: Tipo I, Tipo II, Tipo III para os extratos do *B. gaudichaudii*.



Fonte: a autora.

Os mecanismos de ataque fotoquímico a biomoléculas por fotossensibilização dos extratos envolve os mecanismos clássicos da TFD e PUVA. Referidos como TIPO I, no qual a energia luminosa é absorvida pelos cromóforos fotoativos do extrato. Após atingir o estado excitado (singlete ou triplete) pode ocorrer transferência de energia para biomoléculas (lipídeos, proteínas, DNA) através da transferência de elétrons ou abstração de hidrogênio. TIPO II, onde a energia de excitação dos cromóforos que atuam como fotossensibilizador transfere energia para o oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete, e finalmente, o que aqui consideramos como TIPO III, onde o cromóforo atuante é uma furanocumarina. Ocorre uma reação pericíclica fotoinduzida típica, ciclo adição 2 +2 (BALZANI; SCANDOLA, 1991). Esta reação ocorre por ação da luz ultravioleta, entre elétrons  $\pi$  não aromáticos das furanocumarinas com elétrons  $\pi$  das bases nitrogenadas. Este mecanismo, apesar de ser largamente conhecido para reações fotoquímicas, sendo uma reação exclusiva de processos fotoinduzidos, ainda não tinha sido considerado na ação de tratamentos dermatológicos à base de extratos de *B. gaudichaudii*. Deste modo, ficou evidenciado que os tratamentos dermatológicos largamente utilizados com extratos de *B. gaudichaudii* e produtos contendo os mesmos,

podem atuar por três diferentes mecanismos e envolvem tanto a TFD como o PUVA. Este mesmo conceito pode ser estendido para outros extratos vegetais que contenham furanocumarinas entre seus metabólitos.

## 10 CONCLUSÃO

O metabolismo secundário e a química das plantas é um ponto interessante para o desenvolvimento de fitocosméticos e de fármacos e, notadamente, é ainda uma incógnita. O extrato puro de uma planta é uma mistura extremamente complexa que pode conter milhares de moléculas absolutamente desconhecidas. O Brasil possui no Cerrado uma fonte inesgotável de novas moléculas. A população que vive do conhecimento ancestral sobre fitoterapia se beneficia economicamente da utilização das plantas. Porém, muitas vezes, o uso inadequado baseado no desconhecimento dos compostos químicos que estão no metabolismo secundários das plantas e seus mecanismos de ação, podem gerar malefícios quanto ao uso da planta.

O *B. gaudichaudii*, planta do cerrado brasileiro, também conhecida como mamacadela, possui agentes sensibilizantes derivados de furanocumarinas e seu uso atende diversas doenças dermatológicas, entre elas a psoríase.

Cromóforos fotoativos de *B. gaudichaudii*, tais como os furanocumarinas e tetrapirrólicos, são facilmente extraídos com etanol. Se for utilizado a veiculação lipossomal, estes metabólitos podem ser inseridos em formulações dermatológicas e direcionados para diferentes tecidos dependendo do objetivo e da formulação. Extratos e formulações contendo os mesmos podem ser excitados em diferentes comprimentos de onda, por apresentarem diversas bandas centradas entre 220 nm, 260nm, 312 nm, 400 nm, 540nm e 667 nm. Desta forma, o tratamento dermatológico pode ser realizado com luz solar ou restringido a regiões específicas, onde possa ocorrer seletividade dos diferentes cromóforos. Assim, para um mesmo extrato, pode ser selecionado a região do ultravioleta e realizar o PUVA. Pode ser irradiação com led na região do violeta/azul (380nm a 460 nm) na banda solet; nas bandas intermediárias dos tetrapirrólicos e/ou no vermelho na banda Q4 de clorina em 667 nm.

Neste trabalho foi determinado que os processos fotoinduzidos são múltiplos. Podendo o fotodano ocorrer por 3 diferentes mecanismos. Sendo priorizados ataques às bases nitrogenadas quando irradiadas no ultravioleta para ciclo adição 2 + 2; processos radicalares (mecanismo tipo I) e via oxigênio singlete (mecanismo tipo II) quando irradiados na região de 400 nm. Já quando irradiados na banda Q4 dos compostos

clorínicos, 667 nm também é priorizado os processos induzidos por oxigênio singlete, mecanismo tipo II.

## REFERÊNCIAS

- ABDEL-KADER, M. S. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 48-51, Jan. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532003000100008>.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, supl., p. 678-689, dez. 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2006000500015>.
- ALLEN, L. V.; POPOVICH, N. G.; HOWARD, C. A. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 9. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.
- APPLEQUIST, W. L. *et al.* Scientists' Warning on climate change and medicinal plants. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 86, n. 1, p. 10-18, Jan. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1055/a-1041-3406>.
- ARMSTRONG, A. W.; READ, C. Pathophysiology, clinical presentation, and treatment of psoriasis. **JAMA**, Chicago, v. 323, n. 19, p. 1945-1960, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2020.4006>.
- AUGUSTIN, M. *et al.* Disease severity, quality of life and health care in plaque-type psoriasis: a multicenter cross-sectional study in Germany. **Dermatology**, Basel, v. 216, n. 4, p. 366-372, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000119415>.
- BALZANI, V.; SCANDOLA, F. **Supramolecular photochemistry**. London: Ellis Horwood Limited, 1991.
- BARREIROS, A. L. B. S. *et al.* Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000100021>.
- BARROSO, G. M. *et al.* **Sistemática de angisopermas**. Viçosa: Editora UFV, 2002. v. 1.
- BHATIA, B. K. *et al.* Diet and psoriasis, part II: celiac disease and role of a gluten-free diet. **Journal of the American Academy of Dermatology**, St. Louis, v. 71, n. 2, p. 350-358, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2014.03.017>.
- BLAUVELT, A.; CHIRICOZZI, A. The Immunologic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis pathogenesis. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, Totowa, v. 55, n. 3, p. 379-390, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12016-018-8702-3>.
- BRASIL. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: Anvisa, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. (Série B, Textos Básicos de Saúde). Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf). Acesso em: 29 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2012. (Série A, Normas e Manuais Técnicos; Cadernos de Atenção Básica, n. 31). Disponível em: [https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas\\_integrativas\\_complementares\\_plantas\\_medicinais\\_cab31.pdf](https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/praticas_integrativas_complementares_plantas_medicinais_cab31.pdf). Acesso em: 29 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **RDC nº 69 de 8 de dezembro de 2014**. Dispõe sobre as boas práticas de fabricação de insumos farmacêuticos ativos. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3637364/RDC\\_69\\_2014\\_.pdf/4e1c3d6d-120f-4801-b06f-cff4b242bbd0](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/3637364/RDC_69_2014_.pdf/4e1c3d6d-120f-4801-b06f-cff4b242bbd0). Acesso em: 29 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 14 de 31 de março de 2010**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF: Anvisa, 2010a.

BRASIL. Portaria Interministerial nº 2.960. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 240, seção 1, p. 56, 10 dez. 2008.

BRUSCHI, M. L.; DA SILVA, J. B.; ROSSETO, H. C. Photodynamic therapy of psoriasis using photosensitizers of vegetable origin. **Current Pharmaceutical Design**, Schiphol, v. 25, n. 20, p. 2279-2291, 2019. DOI: <https://doi.org/10.2174/1381612825666190618122024>.

CAMPBELL, J. Safe and effective use of phototherapy and photochemotherapy in the treatment of psoriasis. **British Journal of Nursing**, London, v. 29, n. 10, p. 547-552, May 2020. DOI: <https://doi.org/10.12968/bjon.2020.29.10.547>.

CARITA, A. C. *et al.* Recent advances and perspectives in liposomes for cutaneous drug delivery. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 25, n. 5, p. 606-635, 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/0929867324666171009120154>.

CARNEIRO, C. D. *et al.* Effect of flavonoids on 2'-deoxyguanosine and DNA oxidation caused by singlet molecular oxygen. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 8/9, p. 2380-2387, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.05.075>.

CARVALHO, J. T. G. *et al.* Medicinal plants from Brazilian Cerrado: Antioxidant and anticancer potential and protection against chemotherapy toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, New York, v. 2019, p. 3685264, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/3685264>.

CASTANHO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamics Therapy**, Amsterdam, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1572-1000\(05\)00007-4](https://doi.org/10.1016/S1572-1000(05)00007-4).

CESTARI, T. F.; PESSATO, S.; CORRÊA, G. P. Fototerapia: aplicações clínicas. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 82, n. 1, p. 7-21, fev. 2007. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0365-05962007000100002>.

CHANG, H. W. *et al.* Alteration of the cutaneous microbiome in psoriasis and potential role in Th17 polarization. **Microbiome**, London, v. 6, n. 1, p. 154, Sept. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0533-1>.

CHORILLI, M. *et al.* Estudo de estabilidade de lipossomas compostos de fosfatidilcolina de soja e fosfatidilcolina de soja hidrogenada adicionados ou não de colesterol por método turbidimétrico. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 26, n. 1, p. 31-37, 2007.

CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO (CRF-SP). **Cartilha Comissão Assessora de Fitoterapia**. São Paulo: CRF-SP, 2013.

DA HORA MACHADO, A. E. *et al.* Solvent effects on the photophysics of 3-(benzoxazol-2-yl)-7-(N,N-diethylamino)chromen-2-one. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 3, n. 1, p. 79-84, Jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1039/b308121d>.

DE LEEUW, J. *et al.* Liposomes in dermatology today. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, Amsterdam, v. 23, n. 5, p. 505-516, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2009.03100.x>.

DE ROSA, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, 233-234, 351-371, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/s0010-8545(02)00034-6)

DEL-CLARO, K.; TOREZAN-SILINGARDI, H. M. The study of biotic interactions in the Brazilian Cerrado as a path to the conservation of biodiversity. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 91, supl. 3, p. e20180768, Aug. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180768>.

DEMASI, M. *et al.* Oxidative modification of proteins: From damage to catalysis, signaling, and beyond. **Antioxidants & Redox Signaling**, Larchmont, v. 35, n. 12, p. 1016-1080, Oct. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1089/ars.2020.8176>.

- DEPRY, J. *et al.* Phototherapy-related ophthalmologic disorders. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 33, n. 2, p. 247-255, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2014.10.017>.
- DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, Amsterdam, v. 233/234, p. 351-371, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6).
- DETANICO, F. B.; TEIXEIRA, F.; SILVA, T. L. R. A biomimética como método criativo para projeto de produto. **Design e Tecnologia**, Porto Alegre, v. 1, n. 2, p. 101-113, 2010. DOI: <https://doi.org/10.23972/det2010iss02pp101-113>.
- DI MASCIO, P.; KAISER, S.; SIES, H. Lycopene as the most eficiente biological carotenoid singlet oxygen quencher. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 274, n. 2, p. 532-538, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(89\)90467-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(89)90467-0).
- DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews: Cancer**, London, v. 3, n. 5, p. 380-387, May 2003. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc1071>.
- ENGEL, V. L.; POGGIANI, F. Estudo de concentração de clorofila nas folhas e seu espectro de absorção de luz em função do sombreamento em mudas de quatro espécies florestais nativas. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras, v. 3, n. 1, p. 39-45, 1991.
- FERNANDES, A. U. **Síntese, caracterização e fotoatividade de fotossensibilizadores derivados de protoporfirina IX e de clorofilina**. 2007. 223 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. DOI: <https://doi.org/10.11606/T.46.2007.tde-02072008-160723>.
- FOOTE, C. S. Mechanisms of photosensitized oxidation: there are several different types of photosensitized oxidation which may be important in biological systems. **Science**, New York, v. 162, n. 3857, p. 963-970, 1968. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.162.3857.963>.
- GLOBAL herbal medicines market status, trends and COVID-19 impact report 2021. Maharashtra: Absolute Reports, 2021. Disponível em: <https://www.absolutereports.com/-global-herbal-medicines-market-20774066>. Acesso em: 31 maio 2022.
- GOULD, J. Superpowered skin. **Nature**, London, v. 563, n. 7732, p. S84-S85, Nov. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/d41586-018-07429-3>.
- HAS, C.; SUNTHAR, P. A comprehensive review on recent preparation techniques of liposomes. **Journal of Liposome Research**, New York, v. 30, n. 4, p. 336-365, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/08982104.2019.1668010>.

IBRAHIM, S. R. M. *et al.* Naturally occurring thiophenes: Isolation, purification, structural elucidation, and evaluation of bioactivities. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 15, p. 197-220, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-015-9403-7>.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>.

JACOMASSI, E. **Morfoanatomia e histoquímica de órgãos vegetativos e reprodutivos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)**. 2006. 81 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

JAMALIS, J. *et al.* Psoralen derivatives: Recent advances of synthetic strategy and pharmacological properties. **Anti-inflammatory & Anti-Allergy Agents in Medicinal Chemistry**, Sharjah, v. 19, n. 3, p. 222-239, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2174/1871523018666190625170802>.

JENDŽELOVSKÁ, R. Z.; KUCHAROVÁ, B.; FEDOROČKO, P. Breast cancer resistance protein is the enemy of hypericin accumulation and toxicity of hypericin-mediated photodynamic therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 109, p. 2173-2181, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.084>.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from brazilian cerrados. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 66, suppl., p. 50-55, 1994.

KOWALTOWSKI, A. J. Strategies to detect mitochondrial oxidants. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 21, p. 101065, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.101065>.

KRASNOVSKY, A. Primary mechanisms of photoactivation of molecular oxygen. History of development and the modern status of research. **Biochemistry**, Moscow, v. 72, n. 10, p. 1065-1080, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1134/s0006297907100057>.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy: mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, New York, v. 106, p. 1098-1107, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.07.049>.

LADEMANN, J. *et al.* Penetration and storage of particles in human skin: perspectives and safety aspects. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Stuttgart, v. 77, n. 3, p. 465-468, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2010.10.015>.

- LANE, M. E. Skin penetration enhancers. **International Journal of Pharmaceutics**, London, v. 447, n. 1/2, p. 12-21, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.02.040>.
- LE, N. T. T. *et al.* Soy lecithin-derived liposomal delivery systems: surface modification and current applications. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 20, n. 19, p. 4706, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms20194706>.
- LOSQUADRO, W. D. Anatomy of the skin and the pathogenesis of nonmelanoma skin cancer. **Facial Plastic Surgery Clinics of North America**, Philadelphia, v. 25, n. 3, p. 283-289, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fsc.2017.03.001>.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 3, n. 25, p. 429-438, maio 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.
- MANSOORI, B. *et al.* Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Amsterdam, v. 26, p. 395-404, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.04.033>.
- MARRELLI, M. *et al.* Applications of natural compounds in the photodynamic therapy of skin cancer. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 21, n. 12, p. 1371-1390, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2174/092986732112140319094324>.
- MARTINS, F. S. *et al.* Technical aspects on production of fluid extract from *Brosimum gaudichaudii* Trécul roots. **Pharmacognosy Magazine**, Bangalore, v. 11, n. 41, p. 226-231, 2015. DOI: <https://doi.org/10.4103/0973-1296.149742>.
- MARTINS, V.; RONCONI, C. M. Redes de coordenação: planejamento, síntese, topologia e propriedades fotofísicas. **Revista Virtual de Química**, Niterói, v. 9, n. 3, p. 1318-1341, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20170077>.
- MATSUI, M. S. *et al.* Biological rhythms in the skin. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 17, n. 6, p. 801, May 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms17060801>.
- MENEZES, F. G.; GALLARDO, H.; ZUCCO, C. Recentes aplicações sintéticas de compostos orgânicos tricloro (bromo) metila substituídos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2233-2244, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010001000037>.
- MERTINS, O. *et al.* Caracterização da pureza de fosfatidilcolina da soja através de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>31</sup>P. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1856-1859, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000700043>.
- MEZEI, M.; GULASEKHARAM, V. Liposomes: a selective drug delivery system for the topical route of administration I. Lotion dosage form. **Life Sciences**, Oxford, v. 26, n. 18, p. 1473-1477, 1980. DOI: [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90268-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90268-4).

MIRANDA, A. R. **Estudo da eficácia, segurança e tolerabilidade do *B. gaudichaudii* Trecul em indivíduos adultos portadores de vitiligo**. 2014. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

MONTAGNER, C. **Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semissintéticas**. 2007. 126 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

MONTEIRO, V. F. F. *et al.* Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 281-287, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532002000200023>.

MORAIS, M. C. *et al.* Desenvolvimento e validação de um método por CCD/densitometria para quantificação de psoraleno e bergapteno em *Brosimum gaudichaudii* Trécul. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 2, p. 165-176, 2020.

MUNIYANDI, K. *et al.* Role of photoactive phytochemicals in photodynamic therapy of cancer. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 18, p. 4102, Sept. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules25184102>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NEVES, M. L. P. *et al.* Ensaio para detectar bergapteno na casca e no caule de *Brosimum gaudichaudii* Trec através da produção de melanina em actinomicetos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 12, supl. 1, p. 53-54, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2002000300026>.

OGILBY, P. R.; FOOTE, C. S. Chemistry of singlet oxygen. 42. Effect of solvent, solvent isotopic substitution, and temperature on the lifetime of singlet molecular oxygen (1.DELTA.g). **Journal of the American Chemical Society**, Washington, DC, v. 105, n. 11, p. 3423-3430, 1983. DOI: <https://doi.org/10.1021/ja00349a007>.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Relatório global sobre a psoríase**. São Paulo: Psoríase Brasil, 2016. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204417/9789241565189-por.pdf?sequence=17&isAllowed=y>. Acesso em: 26 maio 2022.

PATIL, Y. P.; JADHAV, S. Novel methods for liposome preparation. **Chemistry and Physics of Lipids**, Amsterdam, v. 177, p. 8-18, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2013.10.011>.

- PAVANI, C. **Porfirinas tetracatatônicas alquiladas**: sistemas porfirínicos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica do câncer de pele. 2009. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.
- PEIXOTO, J. C. *et al.* Flavonoids from Brazilian Cerrado: Biosynthesis, chemical and biological profile. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 16, p. 2891, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24162891>.
- PEREIRA, N. A. M. **Reações de ciclo-adição na síntese de novos dipirrometanos e hidroporfirinas**. 2014. 241 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2014.
- POZETTI, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (*Moraceae*): da planta ao medicamento. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 26, n. 3, p. 159 -166, 2005.
- PRASAD, S. *et al.* Utilizing UVA-1 phototherapy. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v. 38, n. 1, p. 79-90, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.det.2019.08.011>.
- PUCCI, C. *et al.* Light-activated biomedical applications of chlorophyll derivatives. **Macromolecular Bioscience**, Weinheim, v. 21, n. 9, p. e2100181, Sept. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1002/mabi.202100181>.
- QUEIROZ, A. M. **Interação nanopartícula-clorofila**: uma análise via espectroscopia ótica. 2014. 104 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, 2014.
- QUEVEDO, A. E. P. **Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA**. 2011. 123 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.
- RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian Cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, Oxford, v. 80, n. 3, p. 223-230, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1006/anbo.1997.0469>.
- ŠANTIĆ, Ž. *et al.* The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. **Psychiatria Danubina**, Zagreb, v. 29, suppl. 4, p. 787-792, Dec. 2017.
- SARAF, S. *et al.* Advancements and avenues in nanophytomedicines for better pharmacological responses. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Stevenson Ranch, v. 15, n. 6, p. 4070-4079, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1166/jnn.2015.10333>.
- SCHWEITZER, C.; SCHMIDT, R. Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. **Chemical Reviews**, Easton, v. 103, n. 5, p. 1685-1757, May 2003. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr010371d>.

SERRANO-PÉREZ, J. J.; MERCHÁN, M.; SERRANO-ANDRÉS, L. Photoreactivity of furocoumarins and DNA in PUVA therapy: Formation of psoralen–thymine adducts. **The Journal of Physical Chemistry B**, Washington, DC, v. 112, n. 44, p. 14002-14010, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1021/jp805523d>.

SIEWERT, B.; STUPPNER, H. The photoactivity of natural products: An overlooked potential of phytomedicines? **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 60, p. 152985, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.152985>.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. São Paulo: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, V. M.; ANTUNES JUNIOR, D. **Ativos dermatológicos**: dermocosméticos e nutracêuticos. 2. ed. São Paulo: Daniel Antunes Júnior, 2020.

STRAKHOVSKAYA, M. G. *et al.* Fungicidal activity of klorin photosensitizers. **Doklady Biochemistry and Biophysics**, Moscow, v. 384, p. 155-158, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1016072130789>.

STREIT, N. M. *et al.* As clorofilas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 3, p. 748-755, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782005000300043>.

THOMPSON, J. E.; DAVIDOW, L. W. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TOMAZZONI, M. I. *et al.* Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto e Contexto-Enfermagem**, Florianópolis, v. 1, n. 15, p. 115-121, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0104-07072006000100014>.

UCHOA, A. F. *et al.* Singlet oxygen generation in the reaction centers of Rhodospirillum rubrum sphaeroides. **European Biophysics Journal**, Berlin, v. 37, n. 6, p. 843-850, July 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00249-008-0287-y>.

UCHOA, F. A. *et al.* Antioxidante properties of singlet oxygen suppressors. *In*: CÉSPEDES, C. L. *et al.* (ed.). **Natural antioxidants and biocides from wild medicinal plants**. Wallingford: CAB International, 2013.

VILEGAS, W.; VILEGAS, J. H. Y.; POZETTI, G. L. Furanocoumarins from Brazilian *Dorstenia* ssp. **Revista Latinoamericana de Química**, Naucalpan de Juárez, v. 23, p. 78-80, 1994.

VIOLA, G. *et al.* Differential response of linear and angular psoralens in PUVA-induced apoptosis in HL-60 cells. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 3, n. 3, p. 237-239, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1039/b313729e>.

WANG, W. *et al.* Nano-drug delivery systems in wound treatment and skin regeneration. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 17, n. 1, p. 82, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12951-019-0514-y>.

WEBER, G. *et al.* Lipid oxidation induces structural changes in biomimetic membranes. **Soft Matter**, Cambridge, v. 10, n. 24, p. 4241-4247, June 2014. DOI: <https://doi.org/10.1039/c3sm52740a>.

WEIGLE, N.; MCBANE, S. Psoriasis. **American Family Physician**, Kansas City, v. 87, n. 9, p. 626-633, May 2013.

WILKINSON, F.; HELMAN, W. P.; ROSS, A. B. Quantum yields for the photosensitized formation of the lowest electronically excited singlet-state of molecular-oxygen in solution. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, New York, v. 22, p. 113-262, 1993. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.555934>.

WONG, R. *et al.* The dynamic anatomy and patterning of skin. **Experimental Dermatology**, Copenhagen, v. 25, n. 2, p. 92-98, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/exd.12832>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Sixty-second World Health Assembly: resolutions and decisions, annexes**. Geneva: WHO, 2009. Disponível em: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/WHA62-REC1/WHA62\\_REC1-en.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA62-REC1/WHA62_REC1-en.pdf). Acesso em: 26 maio 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Tradicional Medicine Strategy 2014-2023**. Geneva: WHO, 2014.

XU, H. *et al.* Chlorophyll b can serve as the major pigment in functional photosystem II complexes of cyanobacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, DC, v. 98, n. 24, p. 14168-14173, Nov. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.251530298>.

YUNES, R. A. *et al.* Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 1, n. 24, p. 147-152, 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422001000100025>.

ZEEUWEN, P. L. J. M. *et al.* Microbiome and skin diseases. **Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology**, Hagerstown, v. 13, n. 5, p. 514-520, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1097/ACI.0b013e328364ebeb>.

ZHANG, X. F.; LI, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. **Journal of Luminescence**, Amsterdam, v. 131, n. 11, p. 2263-2266, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jlumin.2011.05.048>.

ZHANG, Y. *et al.* A case series pilot study on the combination of 5-aminolevulinic acid and photodynamic therapy (ALA-PDT) for treatment of vitiligo. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 93, n. 4, p. 539-545, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20187014>.

## ANEXO A – Study of the Photo Oxidative Action of *Brosimum gaudichaudii*

### Extract

Antunes, V.M. de S.<sup>1</sup>, Sena, C.L. de L.<sup>2</sup>, Uchoa, A. F.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Universidade Anhembi Morumbi/CITÉ, São José dos Campos – SP, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Camilo Castelo Branco (Atual Universidades Brasil)

<sup>3</sup> Universidade Anhembi Morumbi/CITÉ, São José dos Campos – SP, Brasil

**Abstract—** *Brosimum gaudichaudii* (BG) is a medicinal plant native from Brazil and popularly known as mamica-de-cadela, mamacadela, among others. It presents as main metabolites coumarins and furanocoumarins, recognized photoactive agents. There are several studies that indicate the photodynamic action of *Brosimum gaudichaudii* extracts. The purpose of this study was to perform photophysical studies of the aerial parts of the plant extract for application in photodynamic therapy. The results of this study were determined by the absorption spectrum in the ultraviolet (UV) and visible regions, as well as the emission spectrum when excited at different wavelengths. In the region of 345 nm, the stem extracts stand out, since this region is where bergaptenes and other furanocoumarins absorb light. In the region 667 nm all the extracts were found, mainly those of the leaves, and in this region chlorophyll absorbs light, which shows the contribution of chlorophyll in the process. The photodynamic potential action of the extracts by solar irradiation was attributed to a synergism by action on UV and chlorophyll and its derivatives in the photodynamic therapy.

**Keywords—** Furanocoumarines, photodynamic therapy, photosensitizer.

### I. INTRODUCTION

Since ancient times, man has used medicinal plants as a therapeutic resource to preserve health and cure diseases, in addition to their use in cosmetics. It was through the observation of animals that man developed the knowledge about plants, medicinal or not. This knowledge, passed through time, identified the species that were relevant to health and beauty. This precious legacy about nature tells the history of the continent and the different peoples that inhabited the planet [1]. Our ancestors used concentrated mixtures and extracts of plants to promote the desired effects, without thinking about isolating and understanding what, inside the plant, was effectively the main component or which had the healing power [2, 3].

For decades, the World Health Organization (WHO) has recommended the use of phytotherapy in primary health care programs [4]. Similarly, the Pan American Health Organization (PAHO), realized the importance of the use of medicinal plants for public health in the 1970s, relying on social movements of the time that challenged the valorization of technology and the devaluation of nature [5]. In Brazil, new legislation for the use of phytomedicines and phytocosmetics appears [6].

The *Moraceae* family has about 50 genera and 1500 species. In Brazil, there are 27 genera with approximately 250 species. Among the genera of this family, *Brosimum gaudichaudii* Trecul, popularly known as Mamacadela or mamica-de-cadela, a plant of the Cerrado Biome of Brazil, stands out [7].

The chemical constitution of plant species goes through numerous anabolic and catabolic reactions that make up the plant metabolism, which is divided into primary and secondary. Secondary metabolism are widely exploited due to their structural variation, and consequently shows many biological activities. Coumarins have fluorescent properties [8, 9] and can be classified according to the substitutions of the benzene ring and the pyrene ring in simple coumarins, furanocoumarins, pyranocoumarins. Depending on the position of the furan ring they are classified in angular and linear [9].

Furanocoumarins are classified into linear or psoralenes. Psoralenes have photobiological and phototherapeutic activity and absorb energy between 300 and 400 nm (UVA). The linear ones can be phototoxic. However, when excited by UVA radiation they react with nuclear DNA, cell membranes or proteins, transferring electrons or hydrogen atoms [10, 11]. The photosensitizing action by linear furanocoumarins normalizes differentiation of altered keratinocytes, decreases the expression and secretion of cytokines [11].

In addition to their therapeutic properties, they also exhibit antioxidant activity and have high fluorescence [12]; it can be enhanced by the use of Photodynamic Therapy (TFD), use of UV radiation or visible light in the treatment of various skin conditions [12, 13].

The efficacy of the technique depends on the dose of light applied, the concentration of the photosensitizer and the availability of oxygen, generating reactive oxygen species [14].

Thus, the aim of this work was to perform photophysical studies of the aerial parts of *Brosimum gaudichaudii* and to characterize the extract as a photosensitizer, showing the contribution of chlorophyll in the process.

## II. MATERIALS AND METHODS

The sample of the plant *Brosimum gaudichaudii* was collected near the Regional Airport of Dourados-MS, Francisco de Matos Pereira, located at Av. Guaicurus (beginning of the Rodovia Dourados-Itaum, km 12), with 22° 11' 52 S latitude and 54° 55' 21 W longitude. Located at 458 meters above sea level and its time zone is UTC -4 (-3DT).

The characterization of the samples as *Brosimum gaudichaudii* Trecul (*Moraceae*), was performed by Prof. Dr. Paulo T. Sano of the Department. Botany - Institute of Biosciences of the University of São Paulo.

The hydroalcoholic extracts were obtained at the Institute of Chemistry - USP, where the characterization of the extract was performed.

The samples were separated Stem, Leaf and Fruit, then individually crushed in the four knife mill, the mass was determined, 92.8 % alcohol was added, it was sonicate with ultrasound for 30 minutes, in order to make a better extraction possible in a reduced period. After 28 days, filtration was performed with Büchner funnel. The extracts were concentrated in rotary evaporator to reduce the solvent.

The spectra were obtained in a UV-visible spectrophotometer UV-240 1PC (Shimadzu Co, USA), quartz bucket (Hellma, Brazil) with optical path of 1.0 cm. Measurements were taken at intervals of 300-800 nm each 0.5nm. Micronal Spectrophotometer B582 (Micronal, Brazil) and quartz bucket (Hellma, Brazil) with optical path of 1.0 cm.

Solvents used: Anhydrous ethanol, hydrated ethanol, acetone and chloroform.

## III. RESULTS

The extracts were obtained from the aerial parts *Brosimum gaudichaudii*, leaves, stems and fruits. The plant material was dried at room temperature and away from light.

The mass of the leaf (65.7 g), stem (77.2 g) and fruit (10.3 g) was then crushed and determined.

The material was submitted to hydroalcoholic extraction for 28 days. After this period, the material was filtered and the solvent eliminated by rotaevaporation at reduced pressure. The material was resuspended in hydrated ethanol and characterized by the UV-vis spectrum. Figure 1 shows the spectral curves for the three extracts obtained.

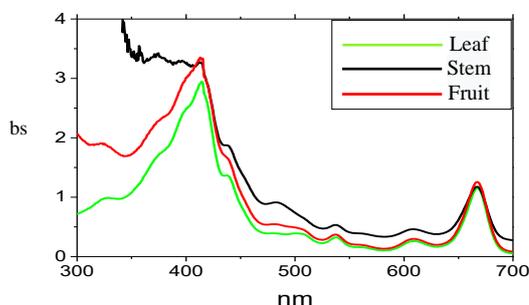


Fig. 1 Absorption spectra of *Brosimum gaudichaudii* extracts, resuspending in ethanol

It is observed that all spectral curves have a maximum at 400 and 667 nm. These maxima as well as all the spectral curves in the visible region show the chlorophylls.

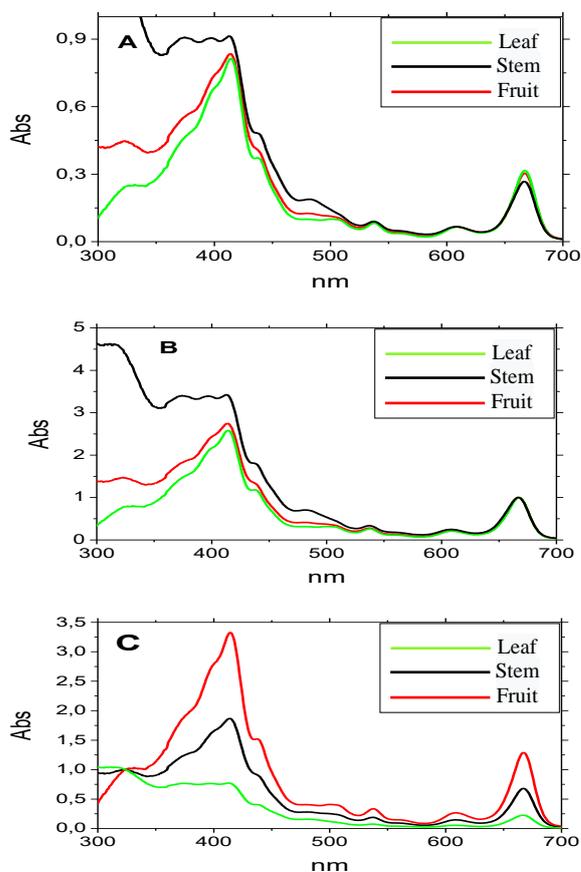


Fig. 2 (A) Absorption spectrum of *Brosimum gaudichaudii* extracts resuspending in chloroform, (B) Spectrum standardized at 667 nm (C) Spectrum standardized at 309 nm

For comparative analysis the extracts were resuspended in chloroform and again determined their UV-vis spectra. In this study, a mathematical treatment was performed, where the spectral curves were normalized at 667 nm, maximum absorption of chlorophyll and 309 nm maximum absorption of bergaptenes and other furanocoumarines [15].

These spectral curves, with and without mathematical treatment, are presented in Figure 2 (A, B and C).

Figure 2A shows a similar spectral profile in the visible region. Figure 2B shows these curves normalized at 667 nm, region where chlorophylls have a maximum absorption. In Figure C the normalization was performed at 309 nm, where the maximum absorption of bergaptenes, considered the main furanocoumarin of *Brosimum gaudichaudii*, occurs.

#### IV. DISCUSSION

It is observed that all spectral curves have a maximum at 400 and 667 nm. These maxima, as well as all spectral curves, show chlorophylls as the main chromophores they absorb in the visible region. Such pigments are responsible for skin conversion of radiant energy into chemical energy, in the process of photosynthesis. They also participate in the redox balance, and can be used as therapeutic agents. Besides chlorophyll and its derivatives, *Brosimum gaudichaudii* is known to present as secondary furanocoumarin metabolites, a compound that presents high photodynamic activities when irradiated in the ultraviolet. This can be confirmed after inspection of the bergaptenes chlorophyllase spectra [14, 15].

It can be observed in the spectral curves of Figure 2 (A, B and C) that the spectra of all the extracts are well defined both in the visible and ultraviolet regions. The mathematical treatment made possible a relative quantification of the possible chromophores present in each extract. For comparative analysis the

spectra have been standardised at 667 nm where only chlorophyll is absorbed and at 309 nm where maximum absorption of bergaptene and other possible furanocoumarins [15, 16] which are constituents of these extracts occurs.

In figure 2A, the spectral profile in the visible region is consistent with that expected for chlorophylls and their derivatives. Already figure 2B the curves have been normalized to 667 nm. Region is where the maximum absorption of the last and most intense Q-band occurs. When these curves are artificially equalized, it can be observed that they are quite differentiated in the ultraviolet region, specifically at 309 nm where it absorbs bergaptene. Thus, in this region a greater absorption of the stem is observed, followed by the fruit and the posterior of the leaf. Thus, it is inferred that the extract of the stem is more potentiated in these chromophores. It belongs to the furanocoumarine family. In the case of *Brosimum guadichaudii*, the furanocoumarins that stands out the most is bergaptene.

In Figure C, normalization was performed at 309 nm, where maximum absorption of bergaptene occurs, considered the main furanocoumarin of *Brosimum guadichaudii*. When the spectra were artificially equalized in the maximum absorption of bergaptene (309 nm), it was observed that the leaves are proportionally richer in chlorophyll, followed by the "green" fruits and finally the stem which is poor in chlorophyll and rich in bergaptene.

The bands in the absorption spectrum at 400 and 665 nm, as well as the entire spectral profile, confirm the presence of chlorophyll. Chlorophylls are green pigments found in plants and are capable of absorbing visible light, which is a converter of radiant energy into chemical energy. These pigments have been considered as excellent photosensitizers, antioxidants and as therapeutic agents in the combat of several diseases, being the chlorophylls A and B the most found and almost always together, however, chlorophyll A is more abundant in most cases. According to the literature, it is known that the absorption spectrum of chlorophyll "a" shows high absorption in the region of 660 to 670 nm, an extremely favorable fact for the application in TFD, since in this region there is a grade of light penetration in the tissue.

## V. CONCLUSION

In these studies it was demonstrated that *Brosimum guadichaudii* hydroalcoholic extract is composed of two important families of photosensitizers, furanocoumarins and chlorines, represented in the extract by bergaptene and chlorophyll respectively. It was also evidenced that furanocoumarins are in higher concentration in the stem, while chlorophyll is mostly found in the leaves. Thus, it was also evidenced that *Brosimum guadichaudii* extract can be used for dermatological treatment being irradiated in the ultraviolet region, if the objective is superficial treatment as in the visible region, if desired greater depth and/or solar irradiation, allowing irradiation in both chromophores.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENT

To Fapesp, REDOXOME project – Center for Research on Redox Processes in Biomedicine. Processo 2013/07937-8.

## REFERENCES

1. Pozzetti G L. (2005) *Brosimum guadichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. Rev Ciênc Farma Básica Apl vol. 26 3: 159-166
2. Thomford N E, Senthebane D A, Rowe A et al. (2018) Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. Int J Mol Sci 19:1578 DOI <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19061578>
3. Tomazzoni M I, Negrelle R R B, Centa M L. (2006) Fitoterapia Popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto e Contexto-enfermagem 1:115-121.
4. Ministério da Saúde (BR). A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Mediciniais da Central de Medicamentos: Série B. Textos Básicos de Saúde. At [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia\\_no\\_sus.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/fitoterapia_no_sus.pdf)
5. Alho C Jr. (2012) Importância da biodiversidade para a saúde humana: uma perspectiva ecológica. Estud. Av 26:151-166 DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-40142012000100011>

6. Ministério da Saúde (BR). Medicamentos e insumos – fitoterápicos. At <https://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-mediciniais-e-fitoterapicos-ppnmpf/plantas-mediciniais-e-fitoterapicos-no-sus>
7. Borges J D C, Perim M C, de Castro R O, et al. (2017) Evaluation of antibacterial activity of the bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trécul against multidrug resistant strains. *Nat Prod Res* 31:2931-2935 DOI <http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2017.1305379>
8. O'Connor SE. (2015) Engineering of Secondary Metabolism. *Annu Rev Genet* 49:71-94 DOI 10.1146/annurev-genet-120213-092053
9. Menezes F G, Gallardo H, Zucco C. (2010) Recentes aplicações sintéticas de compostos orgânicos tricloro (bromo) metila substituídos. *Química Nova* 33:2233-2244 DOI <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422010001000037>
10. Cestari T F, Pessato S, Correa G P. (2007) Fototerapia: aplicações clínicas. *An Bras Dermatol* 82:7-21 DOI <http://dx.doi.org/10.1590/S0365-05962007000100002>
11. Carbone A, Montalbano A, Spanò V, Musante I, Galietta L J V, Barraja P. (2019) Furocoumarins as multi-target agents in the treatment of cystic fibrosis. *Eur J Med Chem* 180:283-290 DOI <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.07.025>
12. Lajos K, Emese V, Zoltan N. (2019) Advances in phototherapy for psoriasis and atopic dermatitis. *Expert Review of Clinical Immunology* 15:1205-1214 DOI <https://doi.org/10.1080/1744666X.2020.1672537>
13. Uchoa A F, Oliveira C S, and Baptista M, S. (2010) Relationship between structure and photoactivity of porphyrins derived from protoporphyrin IX. *J. Porphyrins Phthalocyanines* 14:832–845 DOI <https://doi.org/10.1142/S108842461000263X>
14. Ramos R R, Kozusny-Andreani D I, Fernandes A U, Baptista M S. (2016) Photodynamic action of protoporphyrin IX derivatives on *Trichophyton rubrum* *An Bras Dermatol* 91:135-40 DOI <https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20163643>
15. Maestrin A P J, Neri C R, Oliveira K T. (2009) Extração e purificação de clorofila a, da alga spirulina máxima: um experimento para os cursos de química. *Química Nova* 32:1670-1672 DOI <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000600054>
16. Pedriali C A, Uchoa A F, Santos, Silva M M, Severino D, Baptista M. S. (2010) Antioxidant activity, cito- and phototoxicity of pomegranate (*Punica granatum* L.) seed pulp extract *Ciênc. Tecnol. Aliment* 30:1017-1021.

Author: Valéria Maria de Souza Antunes

Institute: Universidade Anhembí Morumbi/CITÉ

Street: Estrada Doutor Altino Bondesan, 500 Parque Tecnológico de São José dos Campos, Distrito de Eugênio de Melo CEP 12.072-270

City: São José dos Campos

Country: Brasil

Email: [contato@ativosdermatologicos.com.br](mailto:contato@ativosdermatologicos.com.br); [adjaci@hotmail.com](mailto:adjaci@hotmail.com)