

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOEMULSÕES O/A A PARTIR DE EXTRATOS DE *BROSIMUM*
GAUDICHAUDII (MAMA-CADELA) COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VITILIGO**

BRASÍLIA, 2018

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOEMULSÕES O/A A PARTIR DE EXTRATOS DE *BROSIMUM*
GAUDICHAUDII (MAMA-CADELA) COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VITILIGO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de mestrado em Ciências da Saúde pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso
Co-orientadora: Prof^a Dra. Livia Cristina Lira de Sá Barreto

BRASÍLIA, 2018

WANESSA DE SOUZA CARDOSO QUINTÃO

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE
NANOEMULSÕES O/A A PARTIR DE EXTRATOS DE *BROSIMUM*
GAUDICHAUDII (MAMA-CADELA) COMO ALTERNATIVA
PARA O TRATAMENTO TÓPICO DE VITILIGO**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre pelo programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Martins Gelfuso

Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra. Maria de Fátima Borin

Universidade de Brasília (UnB)

Prof^a. Dra. Juliana Lott de Carvalho

Universidade Católica de Brasília (UCB)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades que tive até aqui, pelos desafios que serviram de grandes lições, e pelas vitórias que me estimulam a buscar sempre o melhor de mim.

Agradeço de todo coração à família que amo, aos meus pais, pelo incentivo, pelo apoio, pela compreensão. À minha melhor amiga, irmã e farmacêutica mais linda, Tatyane. Ao meu amigo, companheiro e namorado Diego, agradeço por ser tão prestativo, pelo carinho, pela ajuda braçal neste trabalho, pelos mimos que salvaram meus dias cheios inúmeras vezes, e principalmente por ser minha inspiração de disposição. Com vocês compartilho toda a minha trajetória.

Dedico a vocês também meus agradecimentos aos meus amigos e aos parceiros de trabalhos e de vida, amizades dessa convivência LTMAC. Em especial um super agradecimento ao meu amigo Ricardo Nunes, irmão que ganhei nesse caminho, e que está sempre ao meu lado. Você já é parte da minha família.

Bom, tenho muito a dizer ao meu orientador. Professor Guilherme, agradeço muito pelas oportunidades que me ofereceu. Eu bem me lembro do dia em que fui à sua salinha saber se me aceitaria na iniciação científica. Eu não imaginava que dali sairia com um artigo publicado. Obrigada pela confiança, por ser acessível, por orientar. Muito além de uma orientação científica, quero que saiba que sou grata pela orientação vocacional. Honestamente, você não foi meu orientador, mas sim o guia desse caminho chamado “farmacotécnica”, que hoje quero seguir. Muito obrigada.

Agradeço à professora Lívia, por auxiliar tanto no desenvolvimento desse trabalho, por ser prestativa e por ter abraçado a causa de ser minha co-orientadora. Parte da satisfação que sinto do que aprendi ao longo desse trabalho, devo a essa doutora. Obrigada pela boa convivência, pelo material que me presenteou e pelas orientações.

Ao professor Christopher Fagg, pela disponibilidade e colaboração. Agradeço também aos técnicos do laboratório da UnB-FCE, pelo auxílio durante o trabalho, em especial ao Leo, por ser sempre solícito.

E não poderia deixar de agradecer à professora Juliana e à Thuany, que tanto auxiliaram no aprendizado em uma área que eu pouco conhecia. Muito obrigada pela ajuda e colaboração.

RESUMO

Brosimum gaudichaudii é uma planta do Cerrado brasileiro que possui furanocumarinas com potencial terapêutico para tratamento do vitiligo, com destaque ao bergapteno e psoraleno. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo desenvolver nanoemulsões, formulações capazes de incorporar ativos vegetais e modular a permeação através da pele, a partir de extratos de *Brosimum gaudichaudii*, para tratamento tópico do vitiligo. Os compostos bergapteno e psoraleno foram quantificados por Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (HPLC). Extratos etanólicos do pó (EXT1) e da casca da raiz (EXT2) de *Brosimum gaudichaudii* foram preparados e caracterizados por triagem fotoquímica. Apresentaram poucas diferenças na detecção de compostos, mas houve formação de diferentes cristais. Nanoemulsões óleo-em-água (O/A) de cada extrato foram preparadas utilizando Labrasol® e Plurol® para incorporar o EXT1 e o EXT2, obtendo NE1 e NE2. O tamanho de gotícula, o potencial zeta, pH e teor de ativos nas nanoemulsões foram avaliados. Os efeitos dos extratos e padrões sobre a viabilidade, migração e proliferação celular foram analisados em melanócitos e queratinócitos humanos. Além disso, o potencial de irritabilidade das nanoemulsões foi avaliado por ensaio de HET-CAM. No estudo de estabilidade, as nanoemulsões apresentaram pH em torno 4,0. As nanoemulsões apresentaram tamanho de gotícula tamanho ideal, entre 50 e 200 nm. Houve aumento do tamanho de gotícula das nanoemulsões armazenadas em câmara climática, o que pode ser atribuído ao aumento da temperatura. O potencial zeta das nanoemulsões foi negativo, menor que -10 mV. Nos estudos de permeação *in vitro*, as nanoemulsões reduziram a permeação dos ativos bergapteno e psoraleno. Os extratos demonstraram certa citotoxicidade em melanócitos e queratinócitos, mas estimularam migração celular. As duas nanoemulsões foram classificadas como irritantes leves nos ensaios de HET-CAM e adequadas para uso tópico. As nanoemulsões desenvolvidas nesse trabalho, portanto, apresentaram-se estáveis, com aspectos físicos e características organolépticas adequadas para aplicação tópica, e foram capazes de concentrar os ativos na pele, reduzindo a permeação através da pele, o que poderia causar um impacto negativo na segurança do tratamento do vitiligo.

Palavras-chave: nanoemulsões, *Brosimum gaudichaudii*, bergapteno, psoraleno, vitiligo

ABSTRACT

Brosimum gaudichaudii is a Brazilian Cerrado plant which has furanocoumarins with therapeutic potential for vitiligo treatment, like bergapten and psoralen. Considering its therapeutic potential, this work aimed to develop nanoemulsions, which are formulations capable of incorporating plant compounds and regulate the permeation through the skin, using *Brosimum gaudichaudii* extracts, for topical treatment of vitiligo. Bergapten and psoralen compounds were quantified by high efficiency liquid chromatograph (HPLC). Ethanol extracts of the Powder (EXT1) and the root bark (EXT2) of *Brosimum gaudichaudii* were prepared and characterized by photochemical screening. They showed few differences in the detection of compounds, but they produced different crystals conformations. Oil-in-water nanoemulsions (O/A) of each extract were prepared using Labrasol® and Plurol® to incorporate EXT1 and EXT2, obtaining NE1 and NE2. The droplet size, the zeta potential, pH and content of bergapten and psoralen in the nanoemulsions were evaluated. The effects of the extracts and standards on the viability, migration and cellular proliferation were analyzed in human melanocytes and keratinocytes. In addition, the irritability potential of the nanoemulsions was evaluated by HET-CAM assay. In the stability study, the nanoemulsions presented PH around 4.0. The nanoemulsions presented an optimal droplet size between 50 and 200 nm. There was an increase in the droplet size of the nanoemulsions stored in the climate chamber, which can be attributed to the increase in temperature. The nanoemulsions' zeta potential was negative, less than -10 mV. In the in vitro permeation studies, nanoemulsions reduced the permeation of bergapten and psoralen compounds. The extracts demonstrated a certain cytotoxicity in melanocytes and keratinocytes, but they stimulated cellular migration. The nanoemulsions were classified as mild irritants in the HET-CAM assay and suitable for topical use. The nanoemulsions developed in this work, therefore, were stable, with physical aspects and organoleptic characteristics suitable for topical application, and were able to concentrate the compounds on the skin, reducing the permeation through the skin, that could cause a negative impact on the safety of vitiligo treatment.

Key words: nanoemulsions, *Brosimum gaudichaudii*, bergapten, psoralen, vitiligo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Adaptado de Alexander <i>et al.</i> (2012)(30).....	3
Figura 2. Camadas da epiderme e estruturas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. Fonte: Adaptado de http://mimvet.blogspot.com.br/2015/10/mcac-ii-fisiologia-da-pele.html	4
Figura 3. Esquema que representa as vias de permeação do fármaco por via intercelular e por via transcelular. Fonte: Adaptado de Barry (1987) (38).	5
Figura 4. Desenhos esquemáticos de melanócitos. A) Célula localizada no estrato basal e com prolongamentos no estrato espinhoso. B) Processo de melanogênese no melanócito. Fonte: Adaptado de https://tattootraining.wordpress.com/2016/01/04/	6
Figura 5. Esquema simplificado da rota biossintética que conduz a formação dos dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina. Adaptado de Sulaimon e Kitchell (2003) (44).....	7
Figura 6. Paciente com manchas características do vitiligo na porção anterior das duas pernas. Fonte: Huggins <i>et al.</i> (2005) (47).	8
Figura 7. Fotografias da planta <i>Brosimum gaudichaudii</i> : 1) A planta 2) Raiz pivotante 3) Parte aérea e frutos. 4) Semente do fruto maduro. Autoria própria.	12
Figura 8. Estruturas químicas do bergapteno e do psoraleno.	13
Figura 9. Desenhos esquemáticos das estruturas das nanoemulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O).....	17
Figura 10. Preparação da pele de orelha de suínos para estudo de permeação: (A) e corte (B) dos pedaços de pele com aproximadamente 2 cm de diâmetro, após a retirada do tecido adiposo.	21
Figura 11. Corte transversal da raiz de <i>Brosimum gaudichaudii</i> mostrando a casca externa e cerne antes e após a separação das partes.....	22
Figura 12. Ilustração do aparato para realização da técnica de microsublimação empregada para análise do pó e da casca da raiz de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	25
Figura 13. Célula de difusão do tipo Franz modificada, com pele de porco entre os compartimentos doador e receptor.....	32
Figura 14. Fotografia de linhagens de (A) melanócitos e (B) queratinócitos observadas por microscopia óptica (aumento 40x).	33

- Figura 15.** Visualização da membrana cório-alantoide após remoção de parte da casca do ovo.36
- Figura 16.** Avaliação da presença de triterpenos no extrato da droga vegetal obtida comercialmente: (A) EXT1 e (B) EXT1 após reação de Liebermann-Burchard.38
- Figura 17.** Presença de triterpenos e esteroides na droga vegetal coletada: (A) EXT2 e (B) EXT2 após reação de Liebermann-Burchard., com coloração avermelhada indicada pela seta de cor preta; e positiva para esteroides, com coloração verde indicada pela seta de cor vermelha.39
- Figura 18.** Avaliação da presença de alcaloides nos extratos 1 e 2 das drogas vegetais obtidas comercialmente (A) e coletada (B). Por reação de precipitação com reativos gerais: Mayer, Bouchardat e Dragendorff, da esquerda para a direita, respectivamente.40
- Figura 19.** Fotografias ilustrativas da reação de Borntragen positiva indicando presença de antraquinonas nos extratos de *Brosimum gaudichaudii*: (A) Extrato do pó da raiz comercial - EXT1 e (B) Extrato da raiz coletada - EXT2.41
- Figura 20.** Fotografias ilustrativas do desenvolvimento de fluorescência em meio alcalino e luz UV das cumarinas presentes nos extratos (A) EXT1 e (B) EXT2. Nota-se o desenvolvimento de forte fluorescência amarelo esverdeada, indicado pelas setas.42
- Figura 21.** Fotografia de cristais formados em béqueres após a secagem em estufa (60 °C) das drogas vegetais utilizadas: A) Pó da raiz obtido comercialmente e B) Raiz coletada.42
- Figura 22.** Análise de cristais obtidos pela técnica de microsublimação da droga vegetal em pó utilizada para o preparo do EXT1: Microscopia óptica dos cristais (A) Aumento 40x e (B) Aumento 100x. (C) Cromatograma obtido por CLAE da lâmina da técnica de microsublimação da droga vegetal em pó. Condições: Coluna C18; fase móvel H₂O/ACN/MeOH 50:25:25 (v/v/v); vazão de 0,6 mL/min; temperatura do forno a 35 °C e $\lambda = 340$ nm.43
- Figura 23.** Análise de cristais obtidos pela técnica de micro-sublimação da casca da raiz coletada e utilizada para o preparo do EXT2: Microscopia óptica dos cristais (A) Aumento 40x e (B) Aumento 100x. (C) Cromatograma obtido por CLAE da lâmina da técnica de micro-sublimação da casca da raiz. Condições: Coluna C18; fase móvel H₂O/ACN/MeOH 50:25:25 (v/v/v); fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno a 35 °C e $\lambda = 340$ nm.44

- Figura 24.** Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de Bergapteno e Psoraleno, em etanol absoluto a 25 µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 500 nm. ...46
- Figura 25.** Cromatogramas (CLAE) referente à injeção de soluções de: (A) Etanol absoluto; (B) Pele extraída em etanol; (C) Labrasol® e Pluro® 4:1 (v/v) diluídos em etanol na proporção 1:50 (v/v); (D) bergapteno padrão a 5 µg/mL; (E) psoraleno padrão a 5 µg/mL; (F) EXT1; (G) EXT2. Condições: coluna C18; fase móvel Água MilliQ/Acetonitrila/Metanol 50:25:25 (v/v/v); 35 °C; fluxo 0,6 mL/min e injeção 10 µL; $\lambda = 340$ nm.48
- Figura 26.** Representação gráfica da curva analítica obtida para o bergapteno (a e b) e psoraleno (c e d) por CLAE. Concentrações diluídas em: (a e c) Etanol absoluto. Equações de reta: (a) $y = 31516x - 3008,2$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9998$ e (c) $y = 29312x - 2735,8$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$; (b e d) tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v). Equações de reta: (b) $23463x - 1979$ com coeficiente de correlação linear: $r = 1$ e (d) $y = 25458x - 3515,9$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9996$49
- Figura 27.** Diagrama de fases pseudo-ternário para obtenção de nanoemulsões O/A. Em vermelho: nanoemulsão com 50% de água, 40% de tensoativos e 10% de oleato de etila.54
- Figura 28.** Nanoemulsões O/A: (NEC) sem extrato, (NE1) com extrato etanólico de *Brosimum gaudichaudii* do pó da raiz comercial e (NE2) com extrato etanólico da planta coletada.55
- Figura 29 -** Variação de pH das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão.58
- Figura 30.** Variação de potencial zeta das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão.60
- Figura 31.** Representação gráfica da variação de tamanho de gotícula (nm) das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão.62

- Figura 32.** Representação gráfica da variação do PDI das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão.63
- Figura 33.** Gráficos da variação de teor (%) de (A) Bergapteno e (B) Psoraleno da formulação NE1 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente - $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Geladeira - $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e Câmara climática - $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$64
- Figura 34.** Gráficos da variação de teor (%) de (A) Bergapteno e (B) Psoraleno da formulação NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente - $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Geladeira - $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e Câmara climática - $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$65
- Figura 35.** Porcentagens de bergapteno e psoraleno recuperadas após estudos de permeação de 24 horas a partir das formulações controle (50% EXT1/EXT2 e 50% água) CT1, CT2, NE1 e NE2: (A) Porcentagem recuperada da solução receptora e (B) porcentagem recuperada da pele.....67
- Figura 36.** Estruturas do processo de redução do MTT (cor amarela), com formação do produto Formazan (cor roxo).....70
- Figura 37.** Porcentagem de viabilidade celular após tratamentos com EXT1 ($3,83 \pm 0,06 \mu\text{M}$ de bergapteno e $10,99 \pm 0,28 \mu\text{M}$ de psoraleno), EXT2 ($12,79 \pm 0,25 \mu\text{M}$ de bergapteno e $3,15 \pm 0,01 \mu\text{M}$ de psoraleno), bergapteno a $0,02 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e psoraleno a $0,05 \pm 0,03 \mu\text{M}$ em: (A) Melanócitos (B) Queratinócitos. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$71
- Figura 38.** Proliferação dos melanócitos tratados com psoraleno, bergapteno, EXT1 ou EXT2, após 1, 2 e 3 dias, em porcentagem. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$73
- Figura 39.** Proliferação dos queratinócitos tratados com psoraleno, bergapteno, EXT1 ou EXT2 após 1, 2 e 3 dias, em porcentagem. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$73
- Figura 40.** Ensaio de migração dos melanócitos tratados com o controle; com os extratos EXT1 e EXT2 e com os padrões bergapteno e psoraleno. Tempos: 0h, após 24h e após 48h. Contagem das células que migraram para a arranhadura pelo programa Image J.75

- Figura 41.** Análise quantitativa dos efeitos dos extratos EXT1 e EXT2 e dos padrões bergapteno e psoraleno na migração dos melanócitos. Tempos: 0h, após 24h e após 48h. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$76
- Figura 42.** Migração dos queratinócitos tratados com o controle; com os extratos EXT1 e EXT2 e com os padrões bergapteno e psoraleno. Tempos: 0h e após 24h. Contagem das células que migraram para a arranhadura pelo programa Image J.77
- Figura 43.** Análise quantitativa dos efeitos dos extratos EXT1 e EXT2 e dos padrões bergapteno e psoraleno na migração queratinócitos. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$78
- Figura 44.** Sequência de imagens ilustrando o efeito dos controles positivo (NaOH 1M) e negativo (NaCl 0,9%), e das nanoemulsões NE1 e NE2 na membrana após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos.79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 minutos.....	36
Tabela 2. Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM, de acordo com a escala cumulativa.	37
Tabela 3. Resultados dos ensaios fitoquímicos para os extratos etanólicos de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (mama-cadela).	45
Tabela 4. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o bergapteno diluído em etanol absoluto.	50
Tabela 5. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o bergapteno diluído em tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v).....	50
Tabela 6. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o psoraleno diluído em etanol absoluto.....	51
Tabela 7. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o psoraleno diluído em tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v).	52
Tabela 8. Porcentagem de recuperação de bergapteno e psoraleno da pele utilizando etanol como solvente extrator.	53
Tabela 9. Características organolépticas observadas a partir das nanoemulsões NEC, NE1 e NE2 O/A obtidas.....	55
Tabela 10. Resultados da avaliação dos parâmetros pH, tamanho de gotícula, PDI e Potencial zeta das formulações NEC, NE1 e NE2 O/A obtidas.....	56
Tabela 11. Concentrações estimadas de bergapteno e psoraleno das formulações aplicadas, obtidas a partir de análise por CLAE dos controles CT1, CT2 e das nanoemulsões NE1 e NE2.	66
Tabela 12. Quantidade estimada de bergapteno e psoraleno em relação às concentrações iniciais aplicadas na pele, dos controles CT1, CT2 e das nanoemulsões NE1 e NE2, por CLAE.....	68
Tabela 13. Concentração estimada de bergapteno e psoraleno obtida a partir de análise por CLAE dos extratos etanólicos EXT1 e EXT2.	71
Tabela 14. Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM, de acordo com a escala cumulativa.....	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A/O	Água-em-óleo
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coeficiente de Variação
DMSO	Dimetilsulfóxido
EXT	Extrato
g	Gramma
HPLC	Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mg	Miligramma
mL	Mililitro
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio
µg	Microgramma
NB-	Narrow-band-UVB
NE	Nanoemulsão
NEC	Nanoemulsão controle
NE1	Nanoemulsão do extrato do pó da raiz de Brosimum
NE2	Nanoemulsão da casca da raiz coletada de Brosimum
nm	Nanômetro
O/A	Óleo-em-água
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial hidrogeniônico
PUVA	Psoralenos associado a exposição com radiação ultravioleta
UV	Ultravioleta
UVA	Radiação ultravioleta tipo A
UVB	Radiação ultravioleta tipo B

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Pele.....	3
1.1.1	Vias de penetração epidérmica	5
1.2	Melanogênese	6
1.3	Vitiligo	8
1.3.1	Tratamentos	9
1.3.2	Corticoesteroides.....	10
1.3.3	Tratamento cirúrgico.....	10
1.3.4	Psoralenos e fototerapia.....	10
1.4	A espécie <i>Brosimum gaudichaudii</i>	11
1.4.1	Toxicidade.....	13
1.4.2	Ensaio in vivo.....	14
1.4.3	Produtos registrados contendo <i>Brosimum gaudichaudii</i>	15
1.5	Nanoemulsões.....	15
2	JUSTIFICATIVA	19
3	OBJETIVOS	19
3.1	Gerais.....	19
3.2	Específicos	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Material.....	20
4.1.1	Reagentes	20
4.2	MÉTODOS	21
4.2.1	Pele de porco	21
4.2.2	Coleta de material vegetal	21
4.3	Preparo dos extratos etanólicos	22
4.4	Prospecção dos constituintes da planta (triagem fitoquímica preliminar)	23
4.5	Padronização e validação do método analítico por CLAE	25

4.5.1 Seletividade	26
4.5.2 Linearidade	26
4.5.3 Precisão e exatidão	27
4.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	27
4.5.5 Estudos de recuperação do bergapteno e do psoraleno da pele	28
4.6 Nanoemulsões.....	29
4.6.1 Diagrama de fases pseudo-ternário.....	29
4.6.2 Preparo das nanoemulsões O/A com extratos etanólicos de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	29
4.7 Caracterização das nanoemulsões.....	30
4.7.1 Características organolépticas	30
4.7.2 Teste de centrifugação	30
4.7.3 Análise de pH	30
4.7.4 Tamanho de gotícula, potencial zeta PDI	31
4.7.5 Teor de bergapteno e psoraleno	31
4.8 Estudos de estabilidade das nanoemulsões.....	31
4.9 Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea do bergapteno e do psoraleno a partir das formulações NE1 e NE2 e controles NC1 e NC2	32
4.10 Ensaio <i>in vitro</i> com linhagens de melanócitos e queratinócitos	33
4.10.1 Avaliação da viabilidade de células - ensaio de MTT	34
4.10.2 Proliferação celular.....	34
4.10.3 Migração celular	35
4.11 Avaliação <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanoemulsões (HET-CAM)	35
4.12 Análises dos dados.....	37
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1 Prospecção dos constituintes da planta (triagem fitoquímica preliminar)	38
• Triterpenos e esteroides	38
• Alcaloides	39

• Antraquinonas	40
• Cumarinas por aumento de fluorescência em meio básico e exposição à luz UV.....	41
• Microsublimação e obtenção de cristais	42
5.2 Padronização e validação de metodologia analítica para quantificação de bergapteno e psoraleno a partir dos extratos vegetais, formulações e em experimentos de permeação cutânea	46
5.2.1 Determinação do comprimento de onda de absorção de máxima para o bergapteno e para o psoraleno	46
5.2.2 Seletividade	47
5.2.3 Linearidade	48
5.2.4 Precisão e exatidão	49
5.2.5 Limite de detecção (LQ) e limite de quantificação (LQ)	52
5.2.6 Recuperação do bergapteno e do psoraleno da pele	53
5.3 Desenvolvimento das nanoemulsões O/A e análises preliminares	53
5.3.1 Formação das nanoemulsões O/A com extratos etanólicos de <i>Brosimum gaudichaudii</i>	53
5.3.2 Características organolépticas e centrifugação	55
5.3.3 Análise dos parâmetros iniciais das nanoemulsões	56
5.4 Estudos de estabilidade acelerada das nanoemulsões	57
5.4.1 pH e potencial zeta	58
5.4.2 Tamanho das gotículas e PDI	61
5.4.3 Análise do teor de bergapteno e psoraleno nas nanoemulsões NE1 e NE2	64
5.5 Estudos <i>in vitro</i> de permeação cutânea dos marcadores a partir das nanoemulsões.....	66
5.6 Ensaios <i>in vitro</i> em cultura celular de melanócitos e queratinócitos com EXT1 e EXT2.....	70
5.6.1 Efeito dos extratos sobre a viabilidade celular de melanócitos e queratinócitos.....	70

5.6.2	Efeito dos extratos sobre a proliferação de melanócitos e queratinócitos	72
5.6.3	Efeito dos extratos sobre a migração celular	74
5.7	Ensaio <i>in vitro</i> do potencial irritativo das nanoemulsões (HET-CAM).....	78
6	CONCLUSÃO	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

O vitiligo é uma hipomelanose, ou seja, uma desordem de pigmentação caracterizada por uma baixa produção de melanina, que é a substância que dá pigmento à pele. Pode ser causado por uma redução no número ou pela ausência de melanócitos, as células produtoras de melanina (1). A doença se apresenta sob a forma de manchas com ausência de cor, geralmente localizadas em uma ou mais partes do corpo, que podem se apresentar de forma uni ou bilateral (2).

Na pele humana, os melanócitos são encontrados na camada basal da epiderme e organizam-se com os queratinócitos em unidades funcionais, denominadas unidades epidermais de melanina ou melano-epidérmicas, na proporção de 1:36. O equilíbrio dessas unidades determina a regulação da divisão dos melanócitos e transferência de melanosomas para os queratinócitos (3–6).

O mecanismo da patogênese do vitiligo ainda não é bem estabelecido. Algumas teorias sugerem que a patologia possa ter origem autoimune, celular, genética ou uma combinação de fatores. Contudo, a manifestação da doença varia entre os indivíduos, de forma que estabelecer a causa torna-se um desafio (7,8).

O maior impacto causado pelo vitiligo é psicossocial, tendo em vista que o aparecimento das manchas tende a afetar a autoestima dos indivíduos. Contudo, existem estudos que correlacionam o vitiligo à incidência de doenças inflamatórias ou autoimunes, como por exemplo Lúpus Eritematoso Sistêmico, diabetes *mellitus* tipo 1, dermatite atópica, entre outras (9–11). O vitiligo não se caracteriza como uma doença contagiosa e também ainda não tem cura. Porém, existem diferentes alternativas para tratar a patologia, que devem ser avaliadas de acordo com observações clínicas, como a característica das manchas, número, tipo de pele do paciente, entre outras (12,13).

Com o intuito de estimular a síntese de melanina nas áreas da pele que apresentam a perda do pigmento, uma das alternativas de tratamento para o vitiligo consiste no uso de furocumarinas. Essas substâncias podem ser encontradas em diversas espécies de plantas, como por exemplo na espécie *Brosimum gaudichaudii*, com destaque ao bergapteno e psoraleno.

No Brasil, um medicamento fitoterápico produzido a partir dos compostos da espécie *Brosimum gaudichaudii* (Viticromin[®]) foi registrado, com comprovação terapêutica na categoria melanizante destinado ao tratamento de vitiligo e discromias.

O Viticromin® estava disponível nas formas de comprimidos, solução tópica e pomadas (14–16). Contudo, em 2009 foi publicada a Resolução - RE N° - 2.078, de 4 de janeiro de 2009, na qual consta o cancelamento de Registro do Medicamento (17). Dessa forma, o uso seguro de extratos derivados dessa espécie requer estudos que forneçam os requisitos mínimos de eficácia, qualidade e segurança do produto final.

Apesar do registro de derivados de *Brosimum gaudichaudii*, não há estudos que comprovem a concentração de componentes do extrato que penetram a pele. Além disso, soluções e pomadas são formas farmacêuticas convencionais que apresentam algumas desvantagens no tratamento de manchas causadas pelo vitiligo. As soluções são formas farmacêuticas líquidas que geralmente contém água em sua composição (18), o que pode dificultar a estabilidade de ativos vegetais. Já as pomadas, são formas farmacêuticas pouco aceitas pelos pacientes, por serem associadas a um efeito gorduroso, cheiro forte e dificuldade de se lavar. Estudos também sugerem que pomadas podem ser menos eficazes que emulsões, por exemplo, na penetração de princípios ativos na pele, devido à composição basicamente lipídica (18–20).

Em contraposição às formas farmacêuticas tradicionais, a nanotecnologia apresenta inúmeras vantagens para a produção de fitoterápicos e fitocosméticos, como o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, redução da toxicidade, melhora da atividade farmacológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada, proteção contra degradação física e química, entre outras (21,22). Nanoemulsões por exemplo, são sistemas coloidais líquidos, transparentes e extremamente estáveis, com tamanho de gotículas em escala nanométrica (50 - 200 nm). Além disso, são adequadas para substâncias pouco solúveis em sistemas transdérmicos. Essas características fazem delas sistemas altamente desejáveis para aplicação dermatológica (23–25).

Nesse sentido, esse trabalho tem como proposta desenvolver nanoemulsões contendo extrato de *Brosimum gaudichaudii* para o tratamento tópico de vitiligo. Esse tipo de formulação tem como vantagens: (i) estabilidade; (ii) melhor penetração de ativos através da pele, devido ao tamanho de gotícula e composição; (iii) possibilidade de controle de permeação; (iv) a transparência característica facilita a visualização de processos de instabilidade (26). Ademais, na via tópica há um grande benefício em relação a outras vias de administração. Por essa via, não há redução da biodisponibilidade do fármaco devido ao metabolismo de primeira passagem (27).

1.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano. É formada por três camadas distintas: derme, epiderme e hipoderme (Figura 1). A hipoderme encontra-se sob a derme e consiste de tecido adiposo ou células de gordura com uma parte constituída de colágeno. A derme situa-se abaixo da epiderme e possui a função de fornecer apoio estrutural e nutricional à epiderme. Ela contém os vasos sanguíneos, nervos, folículos pilosos, glândulas sebáceas, músculo eretor de pelo e glândulas sudoríparas. Já a epiderme constitui a camada mais superficial da pele, formada por quatro camadas celulares distintas (Figura 2): basal, espinhosa, granulosa e córnea (28,29).

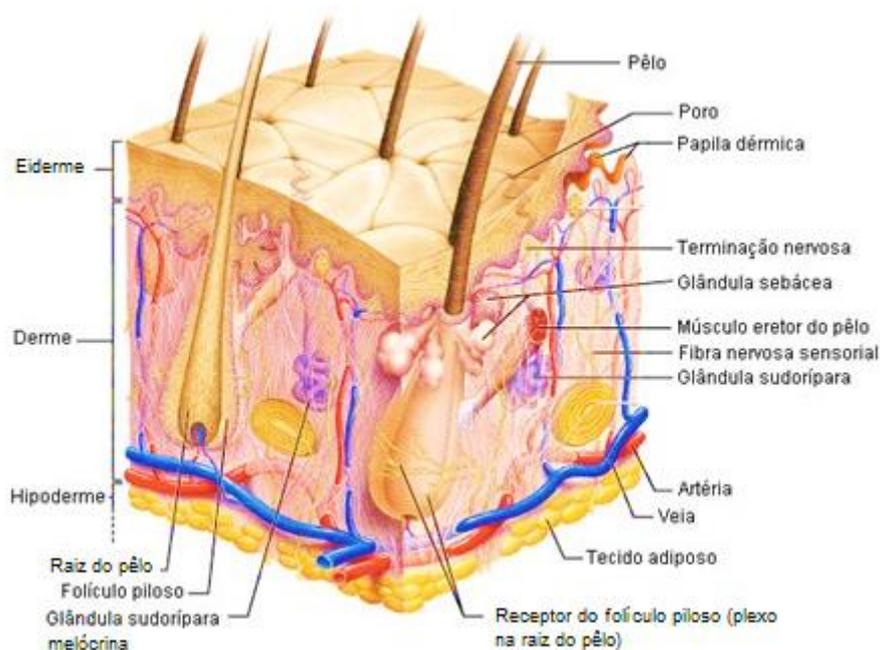


Figura 1. Camadas da pele: epiderme, derme e hipoderme. Fonte: Adaptado de Alexander *et al.* (2012)(30).

A camada basal da epiderme é a mais profunda e caracteriza-se por uma única camada de células com núcleos mitóticos. Nessa camada podem ser encontradas diferentes tipos de células, como as células produtoras de melanina, os melanócitos; e as células de Merkel, responsáveis pela resposta sensorial (31).

Na camada espinhosa, podem ser encontrados nas células os grânulos de melanina e as células de Langerhans, importantes fagócitos que auxiliam na ativação da resposta imunológica contra substâncias estranhas. Logo acima, encontra-se a camada granulosa, formada por camadas de células achatadas, com dois tipos de grânulos oriundos da desintegração do núcleo e das organelas: grânulos de querato-

hialina e lamelares. Esses grânulos são responsáveis pela formação de queratina, síntese de lipídeos e redução da perda de água (31).

A camada mais externa da epiderme é a camada córnea, também chamada de estrato córneo. É formada por células mortas queratinizadas, os corneócitos, organizados em estruturas lamelares, achatadas. Além dessas células, o estrato córneo é composto por uma matriz lipídica. Devido à estrutura e composição, essa camada é a principal barreira à penetração de fármacos pela pele (32,33).

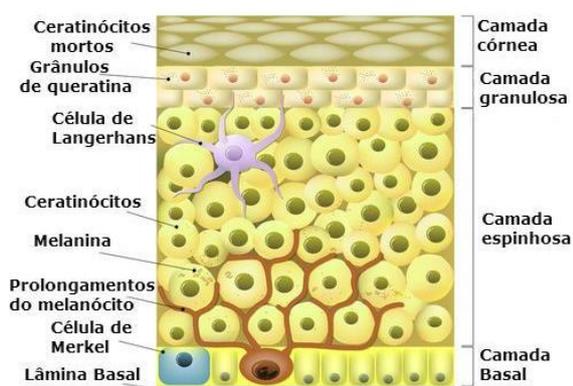


Figura 2. Camadas da epiderme e estruturas: camada basal, camada espinhosa, camada granulosa e camada córnea. Fonte: Adaptado de <http://mimvet.blogspot.com.br/2015/10/mcac-ii-fisiologia-da-pele.html>

A sequência de eventos que culmina na formação de corneócitos tem início na proliferação das células na camada basal da epiderme. Ao deixar a camada basal, as células começam a se diferenciar e migrar para a parte mais externa da epiderme, através da camada espinhosa e camada granulosa. Nessa camada, as células começam a perder seus núcleos e finalmente atingem a camada córnea, na qual tornam-se achatadas, preenchidas com queratina e glicolipídeos nos espaços intercelulares (29,33).

A pele é um órgão complexo e apresenta inúmeras funções biológicas. A principal delas consiste na função barreira, pois sua estrutura impede a entrada de muitos microrganismos, diversas substâncias químicas, e também fornece proteção contra a radiação ultravioleta (UV) e a perda de água. Outras funções importantes desempenhadas pela pele são: homeostase térmica, suporte mecânico, secreção de substâncias pelas glândulas e atividade metabólica (32,34).

Dependendo da região do corpo, a pele apresenta diferenças quanto à espessura, distribuição de anexos como unhas, pelo e cabelos, conteúdo de melanina,

entre outros. Mudanças podem ser provocadas na fisiologia da pele quando há exposição a fatores externos como radiação UV, ou quando há atuação de fatores genéticos e/ou do envelhecimento. O surgimento de rugas ou manchas e perda de elasticidade estimulam a busca por tratamentos estéticos ou farmacológicos. Nesse contexto, busca-se melhorar o aspecto da pele e contribuir para a saúde e autoestima (31,35,36).

1.1.1 Vias de penetração epidérmica

Um fármaco para ter ação tanto local quanto sistêmica deve conseguir atravessar as camadas da epiderme, a começar pelo estrato córneo, principal barreira contra a entrada de substâncias na pele (33).

Na administração por via epidérmica, o fármaco deve migrar através da pele atingindo a corrente sanguínea, sem permanecer nas camadas dérmicas. Para que um fármaco possa penetrar na pele, devem ser analisadas suas propriedades químicas e físicas, o tipo de veículo da formulação e as condições da pele na qual será aplicada. Esse tipo de administração é aplicável à pele intacta, pois em pele cortada ou escoriada, o fármaco teria acesso direto à corrente sanguínea, o que descaracteriza o sistema transdérmico (28,30).

A permeação através da pele da maioria dos fármacos ocorre por três vias, a via intercelular, na qual a substância se difunde pelas camadas epidérmica imersa na matriz lipídica e contornando os corneócitos; a via transcelular, na qual o fármaco atravessa diretamente os corneócitos e a matriz lipídica; ou a via folicular, na qual o fármaco penetra através do folículo piloso (Figura 3) (30,37,38).

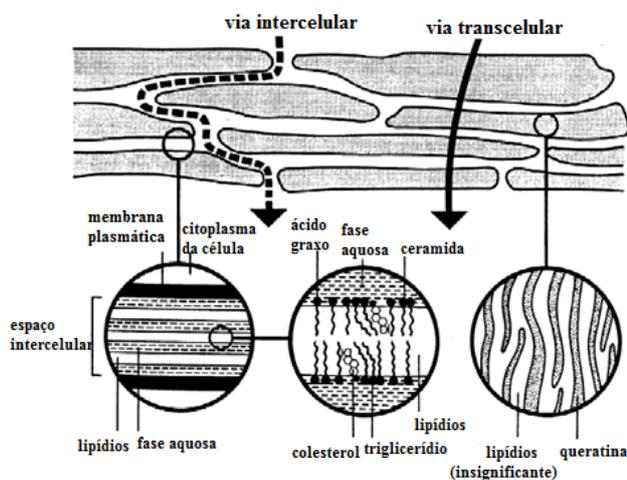


Figura 3. Esquema que representa as vias de permeação do fármaco por via intercelular e por via transcelular. Fonte: Adaptado de Barry (1987) (38).

1.2 Melanogênese

Os melanócitos (Figura 4) são células dendríticas que se originam na crista neural e migram para outros locais, como a epiderme, onde localizam-se entre o estrato espinhoso e o estrato basal. São responsáveis pela produção do pigmento melanina, que confere cor à pele. Quando estão desenvolvidos, distribuem-se em tecidos, órgãos e anexos cutâneos (31,39).

Os melanócitos são responsáveis pela síntese, armazenamento e transporte dos pigmentos de melanina para os queratinócitos. Na pele, estão localizados na camada basal da epiderme e organizam-se com os queratinócitos em unidades funcionais, denominadas unidades epidérmicas de melanina ou melano-epidérmicas, na proporção de 1:36. O equilíbrio dessas unidades determina a regulação da divisão dos melanócitos e transferência de melanossomas para os queratinócitos (3–6).

Nas unidades ocorre a síntese da melanina (polímero constituído de aminoácidos tirosina) a partir da ação enzimática da tirosinase. A enzima é sintetizada e glicosilada no retículo endoplasmático rugoso e transferida para o complexo de Golgi, onde formará vesículas denominadas melanossomas (40,41).

Após reações bioquímicas provocadas principalmente pela enzima tirosinase, que converte a tirosina em melanina, os melanossomas transportam os grânulos de melanina para a superfície nuclear dos queratinócitos (42). O transporte ocorre por ramificações dendríticas (Figura 4), formando uma barreira de pigmento que protege o núcleo dos efeitos prejudiciais da radiação solar ultravioleta (43).

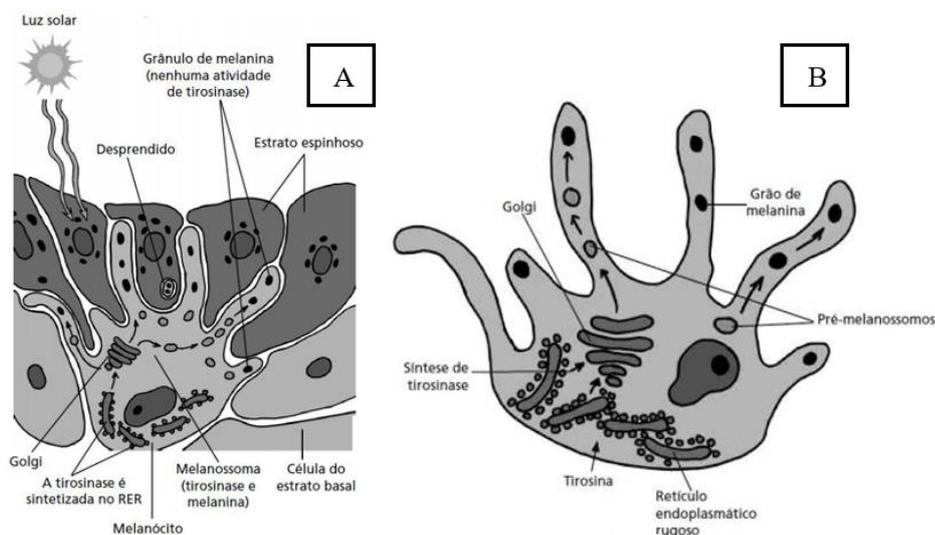


Figura 4. Desenhos esquemáticos de melanócitos. A) Célula localizada no estrato basal e com prolongamentos no estrato espinhoso. B) Processo de melanogênese no melanócito. Fonte: Adaptado de <https://tattootraining.wordpress.com/2016/01/04/>

O tipo de melanina a ser produzido depende da disponibilidade de substratos. A melanina pode ser classificada de acordo com a rota de biossíntese em eumelanina, caracterizada por pigmentos de coloração preta e marrom, e feomelanina, que tem por característica pigmentos de cor amarela e vermelha. A enzima envolvida na produção dos dois tipos de melanina é a tirosinase. Resumidamente, a tirosinase converte a tirosina em DOPA, e a DOPA em DOPAquinona e esta é então transformada em eumelanina ou feomelanina (44,45).

A rota de biossíntese da melanina (Figura 5) inicia-se dentro dos melanossomos, com a oxidação da tirosina e conversão em DOPA, pela enzima tirosinase. Em seguida, a DOPA é convertida em dopaquinona e esta sofre reações para originar eumelanina ou feomelanina. Na ausência de tiois, como a cisteína e a glutatona, inicia-se uma série de reações que originam o DOPAcromo e este pode ser então convertido em eumelanina por duas vias. Uma delas é a reação de descarboxilação espontânea com formação de DHI (dihidroxi-5,6-indol), e conversão deste em eumelanina; e a outra consiste na tautomerização pela ação da TRP2 (Proteína relacionada à tirosinase 1 ou DOPAcromotautomerase) com formação de DHICA (dihidroxi-5,6- indol 2-carboxilato). Atuando com a tirosinase, as proteínas relacionadas à tirosinase 1 (TRP1) oxidam DHICA e dão origem à eumelanina (44,45). Já na presença de tiois, a DOPAquinona é convertida em DOPAcisteína e esta dá origem à feomelanina.

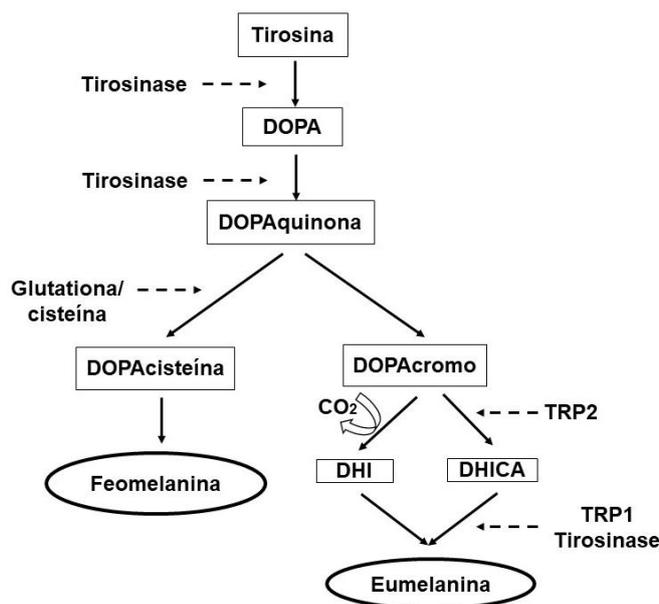


Figura 5. Esquema simplificado da rota biossintética que conduz a formação dos dois tipos de melanina, eumelanina e feomelanina. Adaptado de Sulaimon e Kitchell (2003) (44).

1.3 Vitiligo

Vitiligo é uma doença caracterizada pela perda da melanina, pigmento natural da pele (Figura 6). A despigmentação é atribuída à redução de número ou de função dos melanócitos, células que produzem melanina (46). A desordem afeta entre 1 a 2% da população mundial, (47) e em países como a África, a prevalência é maior em adultos e em mulheres (48). As manchas características podem surgir em vários locais do corpo, como na face, na superfície das mãos, nas axilas, nariz, olhos, entre outros.



Figura 6. Paciente com manchas características do vitiligo na porção anterior das duas pernas. Fonte: Huggins *et al.* (2005) (47).

O vitiligo pode ser classificado clinicamente em três diferentes tipos (2,43,49,50): universal, localizado ou generalizado. O tipo universal caracteriza-se pela presença de lesões em quase todo o corpo. No tipo localizado, as manchas caracterizam o vitiligo como (i) focal, com lesões pontuais; (ii) segmentar, quando as manchas estão localizadas em um único lado do corpo; (iii) não segmentar, quando as manchas se manifestam nos dois lados do corpo; ou (iv) mucoso, quando atingem apenas as mucosas. Quanto ao tipo generalizado, as lesões podem estar presentes de forma a classificar o vitiligo em: vulgar, com distribuição simétrica das manchas em diferentes partes do corpo; acrofacial, com áreas da face ou extremidades distais despigmentadas ou misto, quando há manchas dos dois tipos (51).

O maior impacto do vitiligo na qualidade de vida dos pacientes está atrelado à visibilidade estética, à falta de conhecimento da natureza da doença e ao desafio de um tratamento seguro e eficaz, tendo em vista a cronicidade da patologia. Apesar de não ser contagiosa, a doença pode afetar o bem-estar psicológico e a capacidade de adaptação social. Nesse sentido, os pacientes tendem a apresentar sintomas de baixa

autoestima, discriminação, ansiedade, sentimento de rejeição e depressão (11,52–54).

Diferentes hipóteses têm sido estudadas na tentativa de compreender o processo de despigmentação característico da doença, como mecanismos autoimunes, genéticos, emocionais, entre outros (55,56). Três teorias destacam-se: autoimunidade, autocitotoxicidade e hipótese neural. Contudo, a etiologia e a patogênese do vitiligo variam de indivíduo para indivíduo e, por isso, ainda não são bem estabelecidas (43). Sabe-se que a doença pode afetar membros de uma mesma família, o que também sugere a existência de um componente genético (7,57).

A teoria de autoimunidade considera o envolvimento da imunidade celular e humoral e tem suporte associado na presença de anticorpos contra os melanócitos, detectados em níveis séricos e nas manchas (58–60). Além disso, há uma relação de prevalência de comorbidades autoimunes, como por exemplo psoríase (61), doenças relacionadas a tireoide (58,62), alopecia areata (62), dermatite atópica (10), síndrome de Sjögren (63), entre outras.

Na teoria bioquímica, considera-se que os melanócitos sofrem destruição por substâncias autotóxicas liberadas durante o processo de síntese de melanina (50). Já de acordo com a hipótese neural, os melanócitos possuem a mesma linhagem embriológica que o sistema nervoso, ou seja, derivam da crista neural. Dessa forma, qualquer processo que cause destruição dessas células também pode afetar outras células do sistema nervoso (1,39,64).

1.3.1 Tratamentos

As manchas características do vitiligo já eram alvo de terapias muito antes da doença ser descoberta. Até o século XIX, ainda não havia conhecimento a respeito da doença e tampouco do tratamento adequado (65). Ainda hoje, século XXI, o tratamento do vitiligo é um desafio, visto que diferentes teorias tentam explicar a etiologia da doença, que se apresenta com grande variabilidade entre os indivíduos. Contudo, o foco principal do tratamento consiste em estimular a síntese de melanina nas áreas da pele que apresentam a perda do pigmento. Nesse contexto, terapias medicamentosas e associações com terapias alternativas têm sido propostas.

1.3.2 Corticoesteroides

O uso de corticosteroides tópicos é uma opção eficaz para evitar a progressão do vitiligo (66,67). Podem ser utilizados em monoterapia, em combinação com fototerapia ou com outros medicamentos tópicos, como calcipotriol (68,69). As vantagens dessa terapia consistem basicamente em baixo custo e fácil aplicação.

Kwiter *et al.* (66) avaliaram os efeitos clínicos e a segurança do tratamento com corticosteroides tópicos em crianças. Os autores observaram que 64% dos 70 pacientes apresentaram repigmentação das lesões, 11% tiveram piora do estado e em 25% observou-se algum efeito colateral, como atrofia, estria e telangiectasia.

Quanto ao uso sistêmico de corticoides, prioriza-se o tratamento com os medicamentos por via oral devido à associação da etiologia da doença com a ação de anticorpos contra os melanócitos. No entanto, o tratamento pode acarretar em efeitos colaterais significativos, como aumento de peso, acne, insônia, ou hipertricose (70). Com o intuito de reduzir esses efeitos e retardar a progressão da doença, o uso de terapia oral com minipulso de betametasona ou dexametasona surge como uma alternativa mais eficaz (67).

1.3.3 Tratamento cirúrgico

Nos casos de pacientes que dificilmente respondem ao tratamento clínico, seja terapia oral seja fototerapia, geralmente a cirurgia é indicada. Pacientes que apresentam vitiligo estável tendem a responder melhor à intervenção cirúrgica (71). O tratamento cirúrgico inclui enxertos finos, enxerto de pele parcial, enxertos com *punchs*, enxertia epidérmica por bolhas de sucção, transplante de melanócitos. Contudo, um pré-requisito importante para a indicação de terapia cirúrgica é a estabilização da despigmentação característica da doença (72–74).

1.3.4 Psoralenos e fototerapia

Os psoralenos são furocumarinas encontrados em muitas espécies de plantas. Essas substâncias quando estimuladas pela radiação UV são capazes de iniciar reações fotoquímicas na pele, pela ligação às bases pirimidínicas do DNA das células. Os psoralenos utilizados com fins terapêuticos mais conhecidos são: 5-metoxipsoraleno (5-MOP, bergapteno), 8-Metoxipsoraleno (8-MOP, metoxaleno) e 4,5,8-trimetoxipsoraleno (trioxaleno) (75,76). Pelas características de ligação às

bases de DNA, os psoralenos têm sido estudados como inibidores de células cancerígenas em modelos animais com câncer de mama (77).

Uma alternativa bastante empregada na terapêutica do vitiligo é a fototerapia para estimular a melanogênese. A radiação ultravioleta tipo B (UVB), o UVB *narrow-band* (NB-UVB), a luz *excimer* e laser *excimer*, e o uso de psoralenos associado a exposição com radiação ultravioleta tipo A (PUVA) são os principais tipos (47). Este último consiste na combinação de psoraleno administrado de forma oral ou tópico com exposição à radiação ultravioleta tipo A (UVA). O tempo de tratamento varia conforme a técnica utilizada, o tipo de vitiligo, o número de manchas, entre outros fatores.

A terapia com PUVA e o NB-UVB são as principais escolhas para o tratamento do vitiligo (78–81). Inicialmente, PUVA era um tratamento que consistia na aplicação tópica ou ingestão de extratos brutos de plantas (ex.: *Psoralea corylifolia* e *Ammi majus*) contendo psoralenos, compostos da família das furocumarinas, seguida de exposição à luz solar. Entretanto, os efeitos adversos eram graves e muitas vezes levavam à morte (13). Por isso, outros estudos surgiram na tentativa de isolar os compostos ativos das plantas e realizar testes clínicos.

El-Mofty na década de 1940 conseguiu isolar furocumarinas da planta *Ammi majus* Linnaes, como o 8-MOP, o TMP, e o bergapteno, substância também encontrada em espécies de *Brosimum* (1,82).

Recente metanálise demonstrou que a fototerapia NB-UVB ou PUVA deve ser indicada por um período mínimo de seis meses para aumentar a resposta ao tratamento. Contudo, é preciso avaliar as limitações de cada tipo, como por exemplo efeitos fototóxicos, náusea, dor ou eritema. O tratamento com PUVA apresenta mais limitações que NB-UVB, contudo, mostra-se eficaz em casos de vitiligo generalizado ou universal (83). Além disso, o tratamento com PUVA tem se mostrado bastante promissor em pacientes com outras patologias, principalmente a psoríase (76).

1.4 A espécie *Brosimum gaudichaudii*

Brosimum gaudichaudii (Figura 7) é uma espécie de planta da família Moraceae (84). Dependendo da localização, a espécie *Brosimum gaudichaudii* pode ser conhecida popularmente como mama-cadela, algodão, algodãozinho, inharé, mamica-de-cadela, manacá, manacá-do-campo, entre outros (85–91).



Figura 7. Fotografias da planta *Brosimum gaudichaudii*: 1) A planta 2) Raiz pivotante 3) Parte aérea e frutos. 4) Semente do fruto maduro. Autoria própria.

A mama-cadela é uma planta considerada dominante na flora do Cerrado (84). Segundo levantamento de espécies lenhosas do Cerrado, realizado por Ratter *et al.* (92), a espécie *Brosimum gaudichaudii* se apresenta amplamente distribuída e está entre as 38 plantas com maior distribuição nesse bioma. Distribui-se no Cerrado *sensu stricto*, Cerradão, também sendo encontrada em Campo Sujo, Mata Atlântica, Caatinga e Floresta decídua. Pode ser encontrada nos Estados do Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Amazonas, São Paulo, Pará, Goiás, Maranhão e ainda nos países Paraguai e Bolívia (92,93).

O uso da espécie na medicina popular é atribuído ao potencial terapêutico para tratamento de vitiligo (94). O extrato produzido pela decocção das cascas do caule e raízes ou infusão e folhas da espécie e o extrato alcoólico são utilizados também para o tratamento de outras doenças de pele, como psoríase (95–97). Contudo, o contato com a espécie da planta pode causar fitodermatites, e por isso, o uso deve ser supervisionado (98).

Fitoquimicamente, as espécies do gênero *Brosimum* dividem-se em dois grupos, caracterizados pela presença predominante de piranocumarinas ou de furanocumarinas. A espécie *Brosimum gaudichaudii* apresenta os compostos bergapteno e psoraleno (Figura 8), que pertencem ao grupo das furanocumarinas

(82). Esses compostos podem ser encontrados na casca do tronco e nas raízes e são os principais princípios ativos utilizados para o tratamento do vitiligo (91,99).

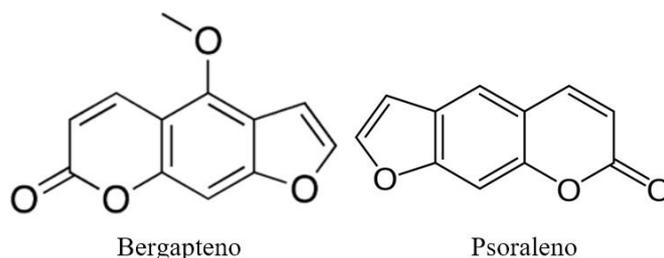


Figura 8. Estruturas químicas do bergapteno e do psoraleno.

Monteiro *et al.* (100) analisaram as cascas das raízes de *Brosimum gaudichaudii* e identificaram três novos derivados dos ácidos cinâmico e diidrocinâmico: ácido 3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2H-6-cromenil)-(E)-propanoico, ácido 3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2H-6-cromenil) propanoico e ácido propanoico 3-(6-metoxibenzo[b]furan-5-il); cumarinas e piranocumarinas, como o psoraleno, gaudichaudina, xantiletina e luvangetina; a chalcona 2',4','-triidroxi-3',3'-diprenilchalcona; os esteroides β -sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol; e o triterpeno β -amirina.

Neves *et al.* (101) analisaram extratos da casca e do caule de *Brosimum gaudichaudii* para detecção de bergapteno através da produção de melanina em actinomicetos. Os autores demonstraram que etanol foi o melhor solvente para extração de compostos furocumarínicos e que o extrato da casca teve maior quantidade desses compostos que o do caule. Além disso, o estudo mostrou que houve indução de pigmentação nas cepas de actinomicetos (22).

1.4.1 Toxicidade

Pozetti *et al.* (102) analisaram o efeito da administração em ratos de extrato etanólico seco do córtex da raiz de *Brosimum gaudichaudii* a 50 mg/mL, diluído em solução fisiológica isotônica, para avaliação da atividade hepatotóxica. Os resultados foram comparados com um grupo controle e foi verificado que os animais que receberam o extrato apresentaram lesão hepática.

Varanda *et al.* (103) analisaram efeitos genotóxicos de extratos metanólicos (0,4 a 1,2 mg/mL) e aquoso das raízes *Brosimum gaudichaudii* em *Salmonella typhimurium* e em culturas de células ovarianas de hamster chinês (CHO). Os autores

observaram que o extrato metanólico, que apresentou cerca de 60% de bergapteno e psoraleno em sua composição, exibiu maior efeito mutagênico do que o extrato aquoso. Isso ocorreu provavelmente pela baixa concentração de furanocumarinas no extrato aquoso (3%). De acordo com o estudo, a capacidade genotóxica da espécie sugere que o uso dessa planta para o tratamento de vitiligo deve ser restrito, tendo em vista a segurança do paciente. Assim, a via tópica dermatológica, em que a absorção sistêmica é mínima, surge como a rota preferível para a administração do extrato natural de *Brosimum gaudichaudii*.

A reação dos psoralenos com o DNA das células começa por um processo de intercalação do composto químico entre as bases do DNA. Na ausência de luz, nenhuma ligação covalente é formada. Porém, a absorção de luz UV (320/400 nm) permite a reação de bergapteno com a base pirimidina (como timina) na fita de DNA, produzindo monoadutos. Além disso, a absorção de luz permite a reação de alguns monoadutos formados com outras bases pirimidinas localizadas em posição adjacente à fita oposta de DNA, formando ligações cruzadas entre as fitas (104).

1.4.2 Ensaio *in vivo*

A partir de soluções alcoólicas de psoraleno e bergapteno a 0,25% (p/v) e 0,01% (p/v), foram realizadas provas de fotossensibilização dérmica com doze voluntários, sendo 6 homens e 6 mulheres. Todos foram expostos à irradiação com luz fluorescente por 15, 30, 45 e 60 minutos. Após 60 minutos de exposição à irradiação com luz fluorescente, houve observação de hiperpigmentação mais consistente com o psoraleno do que com o bergapteno na maioria dos voluntários (102).

Foi encontrado também na literatura um relato de caso de tratamento de hipocromia pós-uso de laser CO₂ fracionado, utilizando *Brosimum gaudichaudii* por via oral e tópica, em uma mulher de 21 anos. Segundo o documento, foram prescritas formulações de cápsulas de 400 mg da espécie para serem administradas por via oral, duas vezes ao dia, e uma formulação tópica *roll-on* a 5% para ser aplicada 1 hora e 30 minutos antes da exposição à luz do dia. O tratamento foi acompanhado durante um ano, e após esse período, a paciente não apresentou mais hipocromia (105).

1.4.3 Produtos registrados contendo *Brosimum gaudichaudii*

O medicamento Viticromin® da indústria SAUAD Farmacêutica (15) foi registrado no Ministério da Saúde nas formas farmacêuticas: comprimidos para administração por via oral - 400mg (nº de Registro: 1.0590.0017.001-1); solução tópica - 0,2 g.mL⁻¹, frasco de 60mL (nº de Registro: 1.0590.0017.002-0); e pomada dermatológica - 0,2 g.g⁻¹ (nº de Registro: 1.0590.0017.003-0). Contudo, em 2009 foi publicada a Resolução - RE Nº - 2.078, de 4 de janeiro de 2009, na qual consta o cancelamento de Registro do Medicamento (17).

Esse fitoterápico era elaborado a partir de cascas da porção inferior do caule e das raízes de mamacadela (*B. gaudichaudii*), que são colhidas, dessecadas, descascadas, trituradas e preparadas em formas farmacêuticas para uso interno (comprimidos) e externo (pomada e loção) (106).

Alves *et al.* (2000) observaram atividade fungicida e atividade parcial contra *Staphylococcus aureus* do extrato em diclorometano a 5,7% das raízes de *Brosimum gaudichaudii*. O extrato da espécie foi considerado ativo no teste de avaliação antimicrobiana, inibindo esporos de *Cladosporium sphaerospermum* e parcialmente ativo no teste de difusão em ágar, inibindo o crescimento de *Staphylococcus aureus* (107).

Os extratos etanólicos e hexânicos do córtex da raiz apresentaram atividade anti-helmíntica contra desenvolvimento larvar de *Strongyloides stercoralis* e *Ancilostomideos*. Em ensaios de culturas puras com extratos benzênicos e hidroalcolícos, não foi comprovada atividade antimicrobiana contra *Salmonella typhimurium* (102).

1.5 Nanoemulsões

Formulações e sistemas que utilizam nanotecnologia apresentam inúmeras vantagens em relação às formas farmacêuticas convencionais, para a produção de fitoterápicos e fitocosméticos. Nanopartículas poliméricas e nanocápsulas, lipossomas, Nanoemulsões, entre outras, são tecnologias inovadoras capazes de promover o aumento da solubilidade e biodisponibilidade, redução da toxicidade, melhora da atividade farmacológica, aumento da estabilidade, liberação sustentada, proteção contra degradação física e química, entre outras (21,22,108).

Devido ao tamanho reduzido de gotículas, as nanoemulsões são formulações que apresentam excelente estabilidade e que permitem a distribuição de ativos de

forma uniforme na pele (24,25). A incorporação de fármacos ou compostos bioativos em nanoemulsões, requer estudos que comprovem a concentração de componentes do extrato que penetram a pele, além da estabilidade da formulação e ensaios de toxicidade. Esses critérios permitem avaliar o local de ação dos compostos e a segurança no uso da formulação (109).

As emulsões são dispersões macroscópicas opacas formadas pela mistura, normalmente por meio de agitação, de dois líquidos imiscíveis, sendo um de natureza hidrofílica e outro lipofílica, e de agentes emulsionantes que irão conferir estabilidade a esta dispersão. Elas podem ser classificadas de acordo com a característica da fase interna (dispersa ou descontínua) e da fase externa (dispersante ou contínua). Dessa forma, quando a fase interna é hidrofílica e a fase externa é lipofílica, a emulsão é denominada água-em-óleo (A/O). Do contrário, é classificada como óleo-em-água (O/A) (Figura 9). As emulsões podem ainda ser preparadas na forma de sistemas de fases múltiplas, do tipo O/A/O ou A/O/A (110–113).

Embora apresentem características de composição semelhantes às emulsões, as nanomulsões são sistemas coloidais líquidos, transparentes e translúcidos devido ao tamanho de gotículas estarem em escala nanométrica (normalmente entre 20 e 200 nm). Esses sistemas possuem maior estabilidade em relação às emulsões convencionais, quanto à sedimentação e cremeação das fases, são transparentes e podem ter a espalhabilidade bastante aumentada devido à baixa tensão interfacial que existe entre as fases. Todas essas características fazem delas sistemas altamente desejáveis para aplicação tópica (114,115).

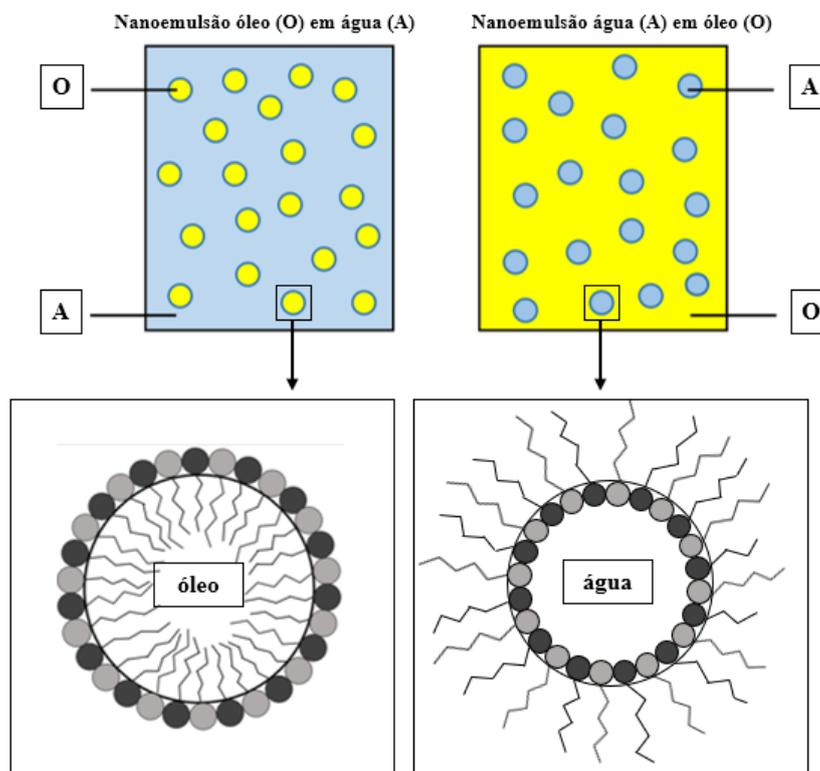


Figura 9. Desenhos esquemáticos das estruturas das nanoemulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O)

Vários processos podem ser aplicados para a formação de nanoemulsões. Apesar de serem cineticamente estáveis, esses sistemas nem sempre são termodinamicamente estáveis e por isso, podem necessitar de energia para a sua formação. Os principais processos utilizados são o de alta energia e o de baixa energia de emulsificação, dependendo da natureza e concentração dos componentes da nanoemulsão. O método de alta energia consiste em utilizar homogeneizadores de alta pressão ou ultrassom para promover cisalhamento e redução do tamanho das gotículas. Esse método costuma ser empregado em nível industrial, e requer um investimento mais elevado, além de técnicas mais complexas de preparo. Por outro lado, quando se utiliza o processo de baixa energia para formação de nanoemulsões, tem-se como principais vantagens o custo mais baixo, fácil técnica de execução e ainda o uso de equipamentos mais simples (116).

Para produção em pequena escala, o método de baixa energia apresenta-se mais atrativo. Ele permite a formação de nanoemulsões em temperatura ambiente sem a necessidade de se utilizar solventes orgânicos. Basicamente, consiste na adição da fase aquosa a uma solução anidra composta pela fase oleosa, tensoativos e o fármaco de interesse, sob condições de agitação e temperatura constantes (111).

O processo pode ser sistematizado por meio de construção de um diagrama de fases pseudo-ternário, método que permite identificar a melhor combinação de componentes da formulação bem como suas quantidades, para obtenção de um sistema estável (26,117).

As nanoemulsões apresentam diversas potencialidades como sistemas de liberação e permeação de fármacos, em especial para aqueles que apresentam maior lipossolubilidade. Esses sistemas são descritos em diversos estudos como alternativa para reduzir a toxicidade, aumentar a liberação de fármacos para a pele, melhorando a biodisponibilidade e também direcionar a ação farmacológica. O uso de nanoemulsões como sistemas carreadores de fármacos tem sido apresentado como vantajoso não apenas para tratamento tópico, como também para administração por via oral, parenteral, intranasal, oftálmica, pulmonar (117–121).

Uma grande preocupação a respeito de nanoemulsões e formulações cosméticas em geral é a estabilidade do produto final, caracterizada por uma baixa coalescência da fase interna, ausência de separação de fases e manutenção das características físicas e organolépticas, como aparência, cor, odor, sensação ao tato, entre outras. Além disso, deve haver uniformidade de tamanho e distribuição entre as gotículas (122,123).

Neste trabalho, as nanoemulsões serão utilizadas para incorporar extratos de *Brosimum gaudichaudii*, que contém os compostos bioativos bergapteno e psoraleno (102,124). As formulações serão caracterizadas quanto às características físicas e organolépticas, teor, estabilidade e toxicidade *in vitro*. Além disso, espera-se que as nanoemulsões permitam melhor penetração dos compostos, avaliada por meio de estudos de permeação, a fim de oferecer uma alternativa terapêutica para o tratamento tópico de vitiligo.

2 OBJETIVOS

2.1 Gerais

Desenvolver nanoemulsões contendo furocumarinas presentes na raiz de *Brosimum gaudichaudii*, de modo a se obter uma alternativa terapêutica mais atrativa, segura e eficaz no tratamento tópico do vitiligo.

2.2 Específicos

O objetivo geral do trabalho foi alcançado seguindo-se as seguintes metas:

- Obter dois extratos etanólicos de *Brosimum gaudichaudii* e caracterizá-los em ensaios de prospecção fitoquímica;
- Padronizar e validar de um método analítico seletivo e confiável para análise dos marcadores bergapteno e psoraleno de extrato da espécie *Brosimum gaudichaudii*;
- Obter nanoemulsões contendo os extratos de *Brosimum gaudichaudii* e caracterizá-las quanto ao tamanho de gotículas, índice de polidispersão, potencial zeta e pH;
- Avaliar a estabilidade das nanoemulsões em condições ambiente, geladeira e câmara climática durante 90 dias;
- Estudar *in vitro* a permeação cutânea de ativos dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* a partir das nanoemulsões desenvolvidas;
- Avaliar *in vitro* a viabilidade, migração e proliferação celular dos extratos em linhagens primárias de melanócitos e queratinócitos;
- Estudar a toxicidade das formulações por avaliação *in vitro* do potencial irritativo (HET-CAM).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Reagentes

Os padrões analíticos de bergapteno e o psoraleno utilizados neste trabalho foram obtidos da FLUKA (Sigma-Aldrich); a droga vegetal em pó da raiz de *Brosimum gaudichaudii* foi obtida de Cactus Comércio de Alimentos Ervanaria e Conveniências LTDA (Goiás, Brasil); solventes como metanol e acetonitrila grau HPLC foram obtidos da J.T. Baker (EUA). Para preparação do tampão fosfato foram utilizados fosfato de sódio nas formas monobásica e dibásica (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e cloreto de sódio (Serva, Rio de Janeiro, Brasil) e correções de pH foram realizadas com hidróxido de sódio (Dinâmica Química Contemporânea Ltda. São Paulo, Brasil). Álcool etílico absoluto grau UV/HPLC e dimetilsulfóxido (DMSO) foram obtidos de Dinâmica Química Contemporânea Ltda (São Paulo, Brasil). Oleato de etila foi obtido de Merck (Alemanha). Para preparo das nanoemulsões, foram utilizados os tensoativos Labrasol® e Plurol® oleique gentilmente cedidos pela Gattefossé (França). Tween® 20 P.A. foi comprado de Dinâmica Química Contemporânea Ltda. (São Paulo, Brasil). Filtros pré-limpos, de diâmetro 25 mm e poro 0,45 µm hidrofóbicos foram comprados de Analítica (Brasil). Todas as análises foram realizadas com água tipo Milli-Q (Millipore, França).

Para os testes *in vitro* com linhagens de células, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio) foi obtido de Sigma Chemicals (Co., St. Louis, EUA); melanócitos de linhagem imortalizada, obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (2017); linhagens de queratinócitos foram obtidas a partir de pacientes saudáveis de 35-55 anos de idade, com autorização do comitê de ética: UFMG ETIC344/07. Iodeto de propídeo e placa de 96 poços TPP foram obtidos de Sigma-Aldrich. Os meios de cultura: Meio livre de soro de queratinócitos (KSFM), meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e Soro fetal bovino foram obtidos de Thermo Fisher Scientific (Estados Unidos).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 *Pele de porco*

As orelhas de porco utilizadas para remoção da pele foram cedidas pelo Frigorífico Bonasa (Brasília, Brasil). Os fragmentos de pele foram retirados da cartilagem, limpos e foram cortados em círculos de aproximadamente 1cm².

Foram utilizadas orelhas de porco obtidas logo após o abate do animal e antes do processo de esquila. A pele inteira foi removida da região externa da orelha com auxílio de um bisturi, separada de sua camada adiposa adjacente com o auxílio de uma tesoura, cortada em círculos de aproximadamente 2 cm de diâmetro (Figura 10) e armazenada a -4°C por um período máximo de 2 meses antes do uso.

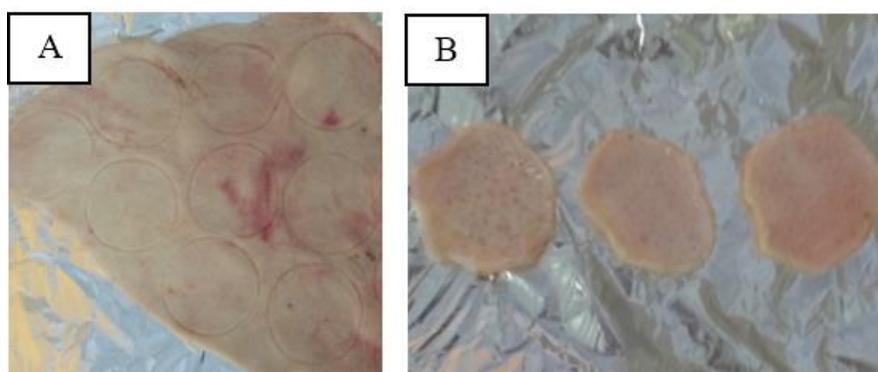


Figura 10. Preparação da pele de orelha de suínos para estudo de permeação: (A) e corte (B) dos pedaços de pele com aproximadamente 2 cm de diâmetro, após a retirada do tecido adiposo.

3.2.2 *Coleta de material vegetal*

Para realização do trabalho, além do pó da raiz obtido do fornecedor Cactus (GO), foi coletada a raiz de *Brosimum gaudichaudii* em uma propriedade localizada na Rodovia DF 330, Quinhão 8, área Fazenda Velha, Sobradinho, Brasília-DF. A área pertence ao bioma Cerrado e tem a seguinte localização: 15° 43' 47.1'' S, 47° 42' 14.4'' O. A coleta foi realizada no dia 30 de abril de 2017 às 10 horas da manhã. Foi depositado um *voucher* para estudos farmacológicos no herbário da Universidade de Brasília (Brasil), de nº 1, sob o nome de Sá Barreto, L C L.

A planta coletada consistia em um arbusto com cerca de 3m de altura, sem flores ou frutos no dia da coleta. As folhas mediam entre 3 a 10 cm, com nervuras bem visíveis, glabra na superfície superior e pubescente na inferior. Foi observada a presença de látex de coloração branca leitosa exudante da planta ao provocar lesões no caule, na raiz e ao retirar suas folhas. A raiz era profunda, pivotante, com cerca de

6 kg e medindo aproximadamente 3 m de comprimento. Moradores locais informaram que a presença de flores e frutos ocorre entre os meses de setembro e outubro.

3.3 Preparo dos extratos etanólicos

A raiz coletada foi cortada em pedaços menores e a parte externa da casca foi então separada do cerne (Figura 11). A droga vegetal foi dessecada, com o uso de estufa de secagem com temperatura controlada a 40°C. Após a secagem, as cascas foram moídas com auxílio de moinho de rotor tipo Wiley, modelo LSW 5000, Logen Scientific (Londres, Reino Unido).

O pó de raízes de *Brosimum gaudichaudii* obtido comercialmente foi submetido à extração pelo método de maceração em etanol absoluto. A concentração utilizada foi 1:20 (p/v). Quanto à planta coletada, tanto o cerne quanto a casca da raiz foram utilizados no preparo de extratos etanólicos na proporção 1:10 (p/v). Contudo, o cerne apresentou um número maior de compostos não identificados e uma menor concentração de bergapteno e psoraleno em relação às cascas externas da raiz. Por esse motivo, o extrato utilizado dessa planta para o desenvolvimento do trabalho foi obtido a partir das cascas da raiz.



Figura 11. Corte transversal da raiz de *Brosimum gaudichaudii* mostrando a casca externa e cerne antes e após a separação das partes.

O macerado (EXT1) foi armazenado em repouso e ao abrigo de luz por 7 dias e após esse período, o extrato foi filtrado com auxílio de papel filtro. O extrato das cascas da raiz coletada (EXT2) foi preparado pelo mesmo método, porém na concentração 1:10 (p/v).

3.4 Prospecção dos constituintes da planta (triagem fitoquímica preliminar)

Os métodos de prospecção dos constituintes de *Brosimum gaudichaudii* (triagem fitoquímica) obtida comercialmente e coletada em propriedade particular foram adaptados de parâmetros estabelecidos pelo capítulo 9 - padronização e controle de qualidade de plantas medicinais, da Organização Mundial de Saúde (WHO) (125).

- *Sólidos totais*

Foram pesadas cápsulas vazias. A concentração de sólidos totais foi determinada em triplicata para os extratos da droga vegetal obtidas comercialmente (EXT1) e coletada (EXT2). Transferiu-se 2 mL de EXT1 ou EXT2 para cada uma das cápsulas. O solvente foi evaporado em estufa ($105 \pm 2^\circ\text{C}$) por 6 horas e resfriado em dessecador por 30 minutos antes da pesagem. O método foi aplicado no EXT1 e no EXT2. A concentração de sólidos totais pode ser obtida de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Sólidos totais (mg/L)} = \frac{(A - B) \times 1000 \text{ (mg)}}{\text{Volume da amostra (L)}} \quad (\text{Eq. 1}),$$

onde: A: peso da amostra mais da cápsula, em mg;

B: peso da cápsula vazia em mg.

- *Triterpenos e esteroides: reação de Liebermann Buchard*

Em placa de Petri foram colocados 2 mL de extrato. A placa foi aquecida até a completa evaporação do solvente e o resíduo seco foi lavado com 3 mL de clorofórmio. A solução apolar foi transferida para um tubo de ensaio e a esse tubo adicionaram-se 2,5 mL de ácido acético e 0,5 mL de ácido sulfúrico. O mesmo procedimento foi realizado para análise tanto do EXT1 quanto do EXT2, em triplicata para cada extrato. A reação para triterpenos é considerada positiva se a coloração for marrom ou vermelha, e positiva para esteroides se a coloração for verde ou azul.

- *Saponinas: teste de afrogenicidade*

O teste de afrogenicidade indica a presença de saponosídeos em solução aquosa, quando há formação de espuma abundante e persistente após agitação vigorosa.

Adicionou-se ao resíduo restante da placa, 3 mL de água destilada e esse volume foi transferido para um tubo de ensaio. Após agitação vigorosa, observou-se se houve formação de espuma abundante e persistente (pelo menos 5 minutos). O teste foi realizado para os dois extratos, em triplicata para cada um.

- *Cumarinas: teste de fluorescência em meio básico*

Para analisar a presença de cumarinas de forma qualitativa, foi realizado ensaio de fluorescência com os EXT1 e EXT2. Uma alíquota do extrato foi colocada sobre filtro de papel e a amostra foi então observada em câmara escura dotada de luz UV ($\lambda = 254 \text{ nm}$) para ocorrência de fluorescência. Adicionou-se ao papel sobre a amostra de extrato algumas gotas de solução aquosa de NaOH 0,1 N e um anteparo sobreposto à metade do traço formado, para analisar novamente sob exposição à luz UV. A análise consiste na lenta retirada do anteparo, enquanto observa-se a formação ou intensificação de fluorescência, caso haja a presença de cumarinas.

- *Alcaloides: reações de coloração e precipitação com reativos gerais para alcaloides*

Para determinação de alcaloides no EXT1, foram adicionados 2 mL de cada extrato em 3 placas de Petri. Acrescentou-se 3 gotas de ácido clorídrico 0,1 N e em seguida, 2 gotas dos reagentes, um para cada placa: Mayer, Bouchardat e Dragendorff. O mesmo procedimento foi realizado para o EXT2. A presença desse metabólito é considerada positiva se houver duas ou três formações de precipitado. Entretanto, se apenas dois reativos provocarem precipitação, ensaios adicionais devem ser realizados. Na ocorrência de precipitação em apenas um reagente, a presença do metabólito não é considerada.

- *Taninos: reação com gelatina e reação com cloreto férrico*

Adicionou-se 2 mL de extrato a um tubo de ensaio e 10 mL de água destilada. Em seguida, foram acrescentadas 4 gotas de cloreto férrico a 1%. A formação de precipitado de coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis. Para taninos condensados, há formação de precipitado verde. Caso haja os dois tipos, forma-se

precipitado cinza ou preto. Os testes foram realizados em triplicata para cada um dos dois extratos.

- *Antraquinonas: reação de Borntrager*

Para pesquisa de antraquinonas, foram adicionados 2,5 mL de extrato a um tubo de ensaio e 5 mL de água destilada. Acrescentou-se 5 mL de amônia. Se houver presença de antraquinonas, ocorre a formação de fenatos de amônia e visualiza-se a reação pela coloração laranja/vermelha.

- *Microsublimação e CLAE*

A técnica de microsublimação foi realizada utilizando-se um anel metálico entre duas lâminas de microscopia (Figura 12). No interior do anel, foi colocada uma pequena quantidade de droga vegetal (obtida comercialmente ou coletada), suficiente para cobrir a área inferior da lâmina dentro do anel. Esse conjunto foi colocado sobre uma chapa de aquecimento, onde observou-se, em alguns minutos, a formação ou não de cristais na lâmina superior com auxílio de microscópio óptico (126).

Para identificação dos compostos obtidos na técnica de micro-sublimação, foi utilizado 1 mL de etanol absoluto para solubilizar o material retido na lâmina. A solução foi filtrada e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

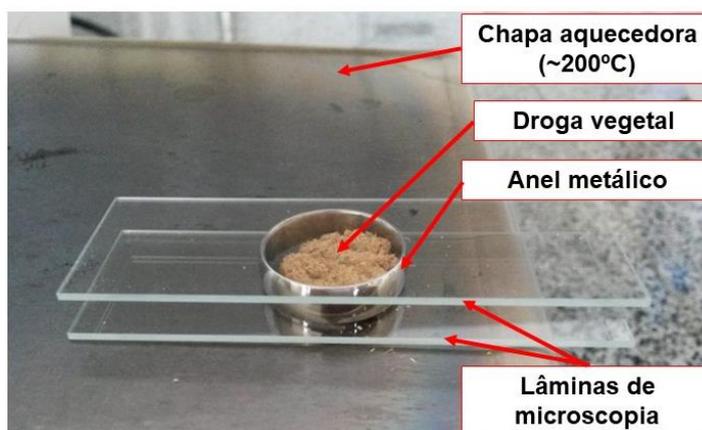


Figura 12. Ilustração do aparato para realização da técnica de microsublimação empregada para análise do pó e da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

3.5 Padronização e validação do método analítico por CLAE

O bergapteno e o psoraleno foram analisados por meio de método analítico otimizado a partir de método proposto por Pires *et al.* (2004)(127), utilizando

equipamento de CLAE, modelo Shimadzu LC 20-AD, composto por duas bombas (modelo LC 20-AT), um injetor automático (modelo 9SIL-20AD) e forno (modelo CTO-20AS), acoplados a um detector espectrofotométrico (modelo SPD-M20A) e a um computador equipado com o programa de análise cromatográfica Shimadzu LC. Foi utilizada uma coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm) e fase móvel composta por uma mistura de Água deionizada:Acetonitrila:Metanol (50:25:25) (v/v/v). A vazão foi da fase móvel foi igual a 0,6 mL/min, o volume de injeção das amostras foi de 10 µL, o forno foi utilizado à 35°C.

Para facilitar a análise dos extratos e formulações e reduzir leitura de compostos interferentes, a detecção dos dois padrões foi padronizada em comprimento de onda igual a 340 nm. O tempo de retenção foi equivalente a 9 min para o psoraleno e 13 min para o bergapteno. O método padronizado foi validado em termos de especificidade/seletividade, linearidade, precisão, exatidão, e limites de quantificação e detecção, segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (128) e de acordo com diretrizes preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation* (ICH) (129).

3.5.1 Seletividade

Para a análise da seletividade do método foram analisadas amostras de etanol absoluto, epiderme extraída com etanol por agitação durante 24h (500 rpm), e uma solução de tensoativos Labrasol®/Plurol® 4:1 (v/v) diluídos em etanol na proporção 1:50 (v/v). Amostras de bergapteno padrão e psoraleno padrão, ambos a 5 µg/mL, e amostras de EXT1 e EXT2 também foram preparadas, utilizando etanol como diluente. Todas as amostras foram então contaminadas com extratos de pele, para verificar a capacidade do método de quantificar o bergapteno e o psoraleno na presença de outros compostos.

3.5.2 Linearidade

A linearidade do método foi analisada a partir de diluições de padrões de bergapteno e psoraleno em etanol absoluto, separadamente, a partir de soluções padrão preparadas a 250 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. Para a construção da curva analítica, foram utilizados etanol e tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 com 5% (p/v) de Tween® 20. As amostras foram preparadas em triplicata para cada uma das seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5 e 10,0 µg/mL.

A curva foi plotada em forma de gráfico, relacionando a concentração de bergapteno ou psoraleno obtida com a área do pico fornecida pelo equipamento após injeção das amostras. Procedeu-se com a análise estatística dos dados, utilizando método de regressão linear, que fornece uma reta no formato $y = ax + b$, onde (a) corresponde ao coeficiente angular e (b) coeficiente linear. A linearidade foi então determinada estatisticamente por meio do coeficiente de correlação linear (r), sendo aceitáveis valor de r superior a 0,99, de acordo com a legislação estabelecida pela ANVISA (128).

3.5.3 Precisão e exatidão

O método foi avaliado quanto à precisão por meio do estudo de repetibilidade (precisão intra-corridas) e precisão intermediária (precisão inter-corridas). Os resultados foram expressos pelo valor do coeficiente de variação (CV%), calculado por meio da seguinte equação:

$$CV\% = (\text{Desvio Padrão}/\text{Concentração Média}) \times 100 \text{ (Eq. 2)},$$

onde: CV% = coeficiente de variação;

Desvio Padrão = estimativa do desvio padrão da média;

Concentração Média = média das medidas em triplicata para cada concentração analisada.

A partir das concentrações que contemplaram o intervalo linear do método (1,0; 1,5 e 3,0 $\mu\text{g/mL}$), avaliou-se a repetibilidade, em triplicata para cada concentração, considerando a dispersão dos valores das áreas dos picos, obtidos a partir dos cromatogramas. O mesmo intervalo foi utilizado para análise da exatidão e precisão intermediária, sendo a última realizada em dois dias diferentes, com o mesmo analista e equipamento. Os resultados da análise de exatidão foram expressos em função da porcentagem do erro relativo:

$$E\% = \text{Concentração teórica}/\text{Concentração experimental} \times 100 \text{ (Eq. 3)},$$

onde: E% = porcentagem de erro relativo

Concentração teórica = obtida corresponde ao valor obtido após a análise

Concentração experimental = corresponde ao valor do padrão

3.5.4 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Para verificar o limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), foram preparadas concentrações decrescentes (1,0; 0,5; 0,3; 0,05 e 0,01 $\mu\text{g/mL}$) tanto de

bergapteno quanto de psoraleno, diluídos em etanol absoluto. O LD corresponde à menor quantidade de analito em uma amostra que pode ser detectada, mas não necessita de quantificação. Todavia, em análise por CLAE, a linha de ruído pode ser utilizada para estimar o LD, baseando-se no desvio-padrão na relação de 3 vezes o ruído da linha de base, conforme a equação:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{IC} \times 3 \text{ (Eq. 4),}$$

onde: DPa = Desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação

IC = Inclinação da curva de calibração

A estimativa do LQ foi feita pela análise das concentrações dos padrões até o menor valor quantificado com precisão e exatidão aceitáveis, com base na equação (128):

$$LQ = \frac{DP \times 10}{IC} \text{ (Eq. 5),}$$

onde: DP = Desvio Padrão

IC = inclinação da curva de calibração

3.5.5 Estudos de recuperação do bergapteno e do psoraleno da pele

Foram utilizados dez pedaços de pele de aproximadamente 2 cm de diâmetro, picotados em frascos de vidro âmbar. Três concentrações (baixa, média e alta) da curva analítica tanto de bergapteno quanto de psoraleno foram aplicadas: 0,5 µg/mL, 5,0 µg/mL e 10,0 µg/mL. Para isso, adicionou-se o volume correspondente a cada concentração – 0,1 mL, 1 mL e 2 mL, respectivamente - de solução etanólica padrão (a 25 µg/mL) de bergapteno ou psoraleno em frascos contendo a pele.

O etanol foi evaporado e em seguida foram adicionados 5 mL de etanol absoluto para extração dos compostos da epiderme e avaliação da recuperação. Os frascos foram vedados e mantidos sob agitação por 24 h e as amostras foram filtradas para quantificar os compostos bergapteno e psoraleno por CLAE.

3.6 Nanoemulsões

3.6.1 Diagrama de fases pseudo-ternário

Foi preparada previamente uma mistura de tensoativos Labrasol®:Plurol® oleique na proporção 4:1 (p/p), mantida sob agitação por 12 horas. Os tensoativos e a fase oleosa composta de oleato de etila, foram misturados sob agitação (500 rpm) em um béquer, em diferentes proporções, variando de 10:1 a 1:10 (p/p). Alíquotas de 1 mL da fase aquosa (água milliQ) foram adicionadas a cada uma das misturas, até atingir um volume de 20 mL. Seguiu-se com a titulação até que a mistura se tornasse turva, para estabelecer a região de misturas isotrópicas ao longo do eixo água-tensoativo no diagrama pseudo-ternário. Alíquotas de 1 mL de oleato de etila foram adicionadas à mistura de tensoativos-água para estabelecer as regiões isotrópicas ao longo do eixo da linha de base tensoativos-água em direção ao ápice/pico da fase oleosa. A agitação foi mantida para acelerar o tempo de equilíbrio.

Após cada adição, a mistura foi mantida em repouso por 1 minuto e examinada visualmente para análise e definição dos pontos de formação de nanoemulsões óleo em água (O/A). As características esperadas para as formulações consistiram em observar a formação de uma mistura clara, translúcida e monofásica. A partir dos dados obtidos, o diagrama de fases pseudo-ternário foi construído com o auxílio do software ORIGIN 8.

3.6.2 Preparo das nanoemulsões O/A com extratos etanólicos de *Brosimum gaudichaudii*

A proporção ideal de fases escolhida a partir do diagrama obtido foi: 50% de fase aquosa, 40% de tensoativos e 10% de fase oleosa. Para obtenção das nanoemulsões a partir dos extratos etanólicos EXT1 e EXT2, foi padronizada a concentração de 2:1 (v/v) de extrato para cada formulação. Antes do preparo das formulações, cada extrato foi concentrado em rotaevaporador Heidolph, modelo Hei-VAP (Schwabach, Alemanha), à temperatura $\leq 40^{\circ}\text{C}$. Os extratos foram acondicionados em estufa, Odontobras, modelo EL 1.2 (São Paulo, Brasil) a 50°C para evaporação do etanol restante.

A cada um dos extratos secos, foi adicionada a mistura de tensoativos e a fase oleosa. Os sistemas foram colocados sob agitação a 500 rpm e então, a fase aquosa foi acrescentada a cada um, formando a nanoemulsão O/A de EXT1, denominada

NE1 e a nanoemulsão O/A de EXT2, denominada NE2. Seguindo a mesma metodologia, foram preparadas nanoemulsões sem extrato (NEC) para uso como controles no estudo de estabilidade, utilizando água milliQ. As nanoemulsões formadas foram mantidas em agitação por um período de 12 horas, para garantia de homogeneidade da formulação.

3.7 Caracterização das nanoemulsões

Após o preparo, as nanoemulsões foram submetidas a testes de centrifugação, análise do pH, tamanho de gotícula, índice de polidispersão (PDI), potencial zeta e do teor de bergapteno e psoraleno para as formulações com extratos.

3.7.1 Características organolépticas

De acordo com o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos, os atributos necessários para a amostra padrão, a ser utilizada nos ensaios, devem ser determinadas pelo fabricante (130). Diante disso, as características organolépticas das formulações foram analisadas com base nos seguintes parâmetros: aspecto, cor, odor, sensação de tato e processos de instabilidade como turbidez e separação de fases após 2 horas de repouso.

3.7.2 Teste de centrifugação

Com a finalidade de avaliar a estabilidade física das formulações preparadas, foi realizado o teste de centrifugação. Amostras de 1 mL de cada nanoemulsão foram centrifugadas em tubos do tipo *ependorf* a uma velocidade de 3000 x g por 30 minutos em temperatura ambiente. Foram consideradas aprovadas nesta análise as amostras que não apresentaram instabilidade como separação de fases (131).

3.7.3 Análise de pH

O valor de pH está relacionado a três diferentes aspectos: estabilidade dos ingredientes da formulação, eficácia e segurança do produto (131). Para aferição de pH das nanoemulsões desenvolvidas (NEC, NE1 e NE2), foi utilizado eletrodo de amostras semissólidas do equipamento pHmetro Digimed, modelo DM-22 (São Paulo, Brasil).

3.7.4 Tamanho de gotícula, potencial zeta PDI

O diâmetro médio das gotículas foi analisado por espalhamento de luz dinâmica e o potencial zeta por mobilidade eletroforética. Também foi avaliada a distribuição de tamanho das gotículas por meio do valor do PDI. Para conduzir os ensaios, foram realizadas diluições das NEC, com EXT1 e com EXT2 em água milliQ na proporção 1:100 (v/v). As amostras foram então levadas diretamente ao equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern, EUA), operando tanto em modo tamanho de partícula quanto em modo potencial zeta.

3.7.5 Teor de bergapteno e psoraleno

No intuito de quantificar o bergapteno e o psoraleno nas formulações com extratos, amostras de NE1 e NE2 foram diluídas em etanol absoluto nas proporções 1:40 (v/v) e 1:50 (v/v), respectivamente. Todas as amostras foram filtradas com o auxílio de seringas acopladas a filtros de membrana de porosidade de 0,22 µm e analisadas por CLAE. As análises foram realizadas em triplicata e o teor de bergapteno e psoraleno nas formulações foi calculado a partir da equação de reta da linearidade do método, utilizando os dados obtidos dos cromatogramas.

3.8 Estudos de estabilidade das nanoemulsões

Os estudos de estabilidade das formulações foram conduzidos em conformidade com as diretrizes estabelecidas pela ANVISA, por meio do Guia para Realização de Estudos de Estabilidade publicado pela RE nº 1, de 29 de julho de 2005 (132); o Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos (131); o Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos (130); e pelas diretrizes preconizadas pelo *International Conference on Harmonisation (ICH)* (133).

Amostras de NE1 e NE2 foram acondicionadas em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados, e submetidas a três diferentes condições de temperatura por um período de 90 dias: ambiente, a 25 °C ± 2°C; geladeira a 4 °C ± 2°C e câmara climática a 40 °C ± 2 °C. As análises foram realizadas, em triplicata, nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Para verificar a estabilidade, os parâmetros estabelecidos foram os estabelecidos no item 3.6.

3.9 Estudos *in vitro* de permeação cutânea do bergapteno e do psoraleno a partir das formulações NE1 e NE2 e controles NC1 e NC2

Os estudos *in vitro* de permeação cutânea foram conduzidos utilizando células de difusão do tipo Franz modificadas, montadas com pedaços (2 x 2 cm) de pele de orelha de porco, separando os compartimentos doador do compartimento receptor (Figura 13). Foi adicionado 500 µL de cada uma das formulações NE1 ou NE2 a serem testadas ou das formulações controle de cada nanoemulsão, CT1 ou CT2. O compartimento receptor foi preenchido com uma solução receptora preparada com tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 e 5% (p/v) de Tween® 20. Para todos os experimentos, as células foram mantidas sob agitação a 500 rpm, em banho-maria a 32°C ± 2.

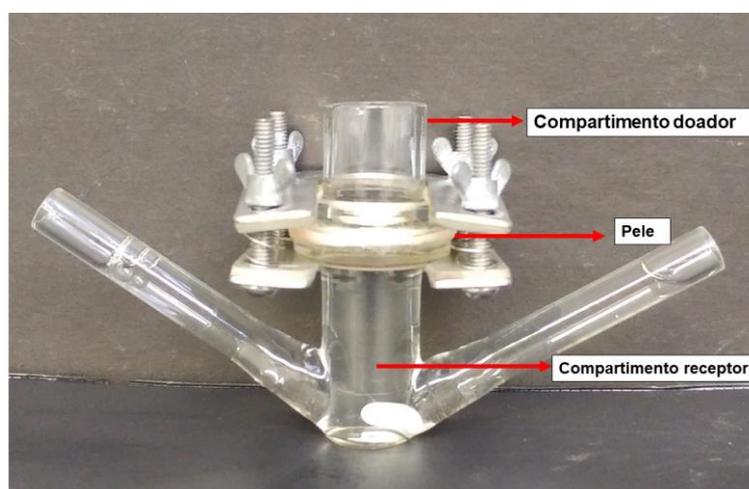


Figura 13. Célula de difusão do tipo Franz modificada, com pele de porco entre os compartimentos doador e receptor.

Os ensaios foram conduzidos em quintuplicata para cada formulação e por um período de 24 h. Após este período, uma alíquota da fase receptora foi retirada do compartimento receptor para análise por CLAE do bergapteno e o psoraleno que permearam a pele. A pele de porco então foi retirada da célula de difusão, lavada com água milliQ, cortada em pequenos pedaços e colocada em frascos do tipo âmbar, adicionado do solvente extrator dos compostos. Após 24 h de agitação a 500 rpm, as amostras foram filtradas em filtros com porosidade de 0,45 µm e quantificadas por CLAE.

Foram preparadas soluções contendo extrato concentrado (concentração próxima à da nanoemulsão) e água MilliQ na proporção 1:1 (v/v) dos EXT1 e EXT2

para serem aplicadas nos estudos de permeação *in vitro*, como controles CT1 e CT2 das formulações NE1 e NE2, respectivamente.

3.10 Ensaios *in vitro* com linhagens de melanócitos e queratinócitos

Para os ensaios de viabilidade, proliferação e migração celular, foram utilizados melanócitos de linhagem imortalizada, obtida no Banco de Células do Rio de Janeiro (2017). A linhagem é derivada de melanoma maligno surgido na pele, porém coletado em metástase no linfonodo, de paciente homem, caucasiano e com 78 anos. Foi isolada em 1974 e já caracterizada como uma linhagem não contaminada por células HeLa.

Além dos melanócitos, foram utilizados também queratinócitos, sendo as células primárias obtidas a partir de pacientes saudáveis de 35-55 anos de idade. Autorização do comitê de ética: UFMG ETIC344/07. A população demonstrou-se mais de 90% positiva para Citoqueratina 5. Foram congeladas alíquotas de células em tanque de nitrogênio.

As células foram cultivadas com meio de cultura KSFM suplementado com soro fetal bovino, mantidas a 37°C em estufa por 48 horas. As linhagens de células (Figura 14) foram observadas com auxílio de microscópio invertido ZEISS AXIOVERT 40 CFL.

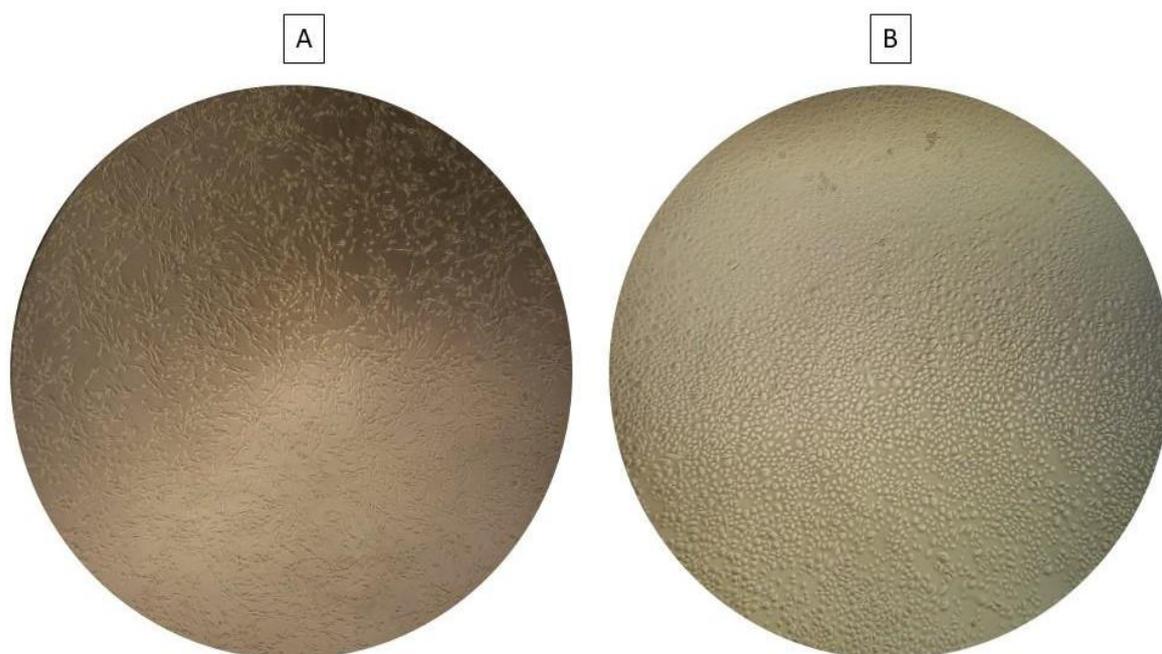


Figura 14. Fotografia de linhagens de (A) melanócitos e (B) queratinócitos observadas por *microscopia óptica* (aumento 40x).

3.10.1 Avaliação da viabilidade de células - ensaio de MTT

Para os testes in vitro, foram testadas diferentes concentrações de extratos e padrões. Para os extratos, foram testadas diluições de: 1:50; 1:100; 1:200; 1:300 e 1:400 (v/v). Para os padrões bergapteno e psoraleno, foram testadas as concentrações: 0,5; 1,0; 3,0; 5,0; 7,0 e 10 µg/mL. Pela avaliação de contagem celular, foram selecionadas as diluições de EXT1 a 1:100 (v/v), EXT2 a 1:300 (v/v), bergapteno a 1,0 µg/mL e psoraleno a 3,0 µg/mL

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o intuito de avaliar se os extratos e seus padrões apresentavam efeitos citotóxicos quando aplicados aos melanócitos e queratinócitos humanos. Os experimentos foram realizados por meio de ensaio de MTT, e o método foi adaptado a partir de metodologia proposta por Mosmann (1985) (134).

Os grupos do experimento consistiram em poços com (I) células e meio de cultura, representando o controle; (III) células, meio de cultura e o EXT1 (IV) células, meio de cultura e o EXT2 (V) células, meio de cultura e bergapteno (VI) células, meio de cultura e psoraleno. Foram plaqueadas 1×10^4 células em poços de placa de 96 poços. Passadas 24 h após o plaqueamento, o meio de todos os poços foi trocado e os tratamentos com os extratos e os padrões foram adicionado aos poços (100 µL). Após o período de incubação de 48 h, o sobrenadante de cada poço foi removido, o poço foi lavado com PBS (Tampão fosfato-salino), depois adicionou-se 90 µL de meio novo, aos quais foram acrescentados 10 µL de MTT (5 mg/mL, totalizando 50 µg por poço).

As placas de cultura foram então incubadas por 4 h protegidas da luz, a 37 °C (5 % de CO₂ e 95 % de umidade). Após esse período, os cristais de formazan foram solubilizados e homogeneizados com a adição de DMSO em volume de 100 µL por poço. A leitura foi realizada com OD 595 nm em Espectrofotômetro de microplacas (Bio-Tec PowerWave, HT, EUA).

3.10.2 Proliferação celular

A análise de proliferação foi realizada inicialmente da mesma forma que a análise de viabilidade, usando o MTT. Porém, 10×10^3 células foram plaqueadas em três placas, sendo que cada tratamento foi plaqueado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C e analisadas nos tempos 1, 2 e 3 dias. O primeiro grupo de células foi usado para o teste do MTT e a segunda replicata foi fixada com 4% de formaldeído

por 10 min para corroborar os resultados do MTT. Adicionou-se PBS ao poço e iodeto de propídeo. A partir de então, as placas foram levadas ao microscópio e as células foram contadas.

3.10.3 Migração celular

Os ensaios de migração celular foram conduzidos de acordo com protocolo padronizado de Liang *et al.* (2007)(135). Foram semeadas 5×10^4 células/mL de cada linhagem, em placas de 6 poços. As placas foram marcadas com 2 traços paralelos ao centro de cada poço. Após atingirem confluência total, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. Foi colocado no meio soro fetal bovino e com o auxílio de ponteiros de 200 μ L, foram feitas arranhaduras transversais nos traços previamente delimitados. Depois de realizadas as arranhaduras, as células cresceram em meio acrescido de EXT1 ou EXT2, ou dos padrões bergapteno e psoraleno. Como controle, foram utilizadas células tratadas em meio.

As células foram incubadas a 37°C e fotografadas no início, após 24 horas e após 48 horas, com auxílio de câmera acoplada a um microscópio. As imagens foram analisadas para contagem das células que migraram para os espaços das arranhaduras realizadas. A migração das células foi avaliada com o auxílio do programa Image J (Wayne Rasband, NIMH, NIH, USA), considerando a contagem de células que migraram para a área da arranhadura corresponde ao índice de migração celular. As células foram marcadas em amarelo para contagem e os ensaios foram conduzidos em triplicata para cada tratamento.

3.11 Avaliação *in vitro* do potencial irritativo das nanoemulsões (HET-CAM)

No intuito de avaliar o potencial irritativo das formulações, foi realizado ensaio de membrana cório-alantoide de ovos de galinha embrionados (HET-CAM), no décimo dia de incubação. O ensaio corresponde a uma modificação do método descrito por Luepke em 1985 (136), utilizado pela legislação europeia (137), e também indicado no Brasil pela ANVISA (138), para avaliação de segurança de diferentes produtos cosméticos e farmacêuticos.

Para cada formulação avaliada, foram utilizados três ovos fecundados. No décimo dia de incubação, foi removida a casca do ovo ao redor da câmara de ar, evidenciando, assim, a membrana da casca (Figura 15). Esta foi removida cuidadosamente fazendo com que a membrana cório-alantoide fosse exposta, e foram

aplicados sobre essa membrana 300 μ L de cada nanoemulsão ou dos controles positivo e negativo. Foram utilizados soro fisiológico como controle negativo e uma solução de NaOH 1M, como controle positivo.



Figura 15. Visualização da membrana cório-alantoide após remoção de parte da casca do ovo.

Este ensaio foi adaptado conforme a metodologia descrita por Luepke (1985) e pela ANVISA (136,138). A classificação final das nanoemulsões NE1 e NE2, de acordo com seu potencial de irritabilidade no ensaio HET-CAM, foi realizada de acordo com as Tabelas 1 e 2.

A membrana cório-alantoide foi examinada durante 5 minutos e as observações fisiológicas como hiperemia, hemorragia e coagulação/opacidade foram observadas nos tempos 0,5; 2 e 5 minutos. O tempo necessário (em minutos) para provocar qualquer um desses eventos foi anotado e o índice de irritabilidade foi avaliado conforme as tabelas abaixo:

Tabela 1. Escala para teste de HET-CAM conforme efeitos observados ao longo de 5 minutos.

Efeito	Tempo (minutos)	Escala		
		0,0 – 0,5	0,5 – 2,0	2,0 – 5,0
Hiperemia		5	3	1
Hemorragia		7	5	3
Coagulação		9	7	5

Tabela 2. Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM, de acordo com a escala cumulativa.

Índice de irritabilidade	Classificação
0 – 0,9	Não irritante (NI)
1 – 4,9	Irritante leve (IL)
5 – 8,9	Irritante moderado (IM)
9 – 21	Irritante severo (IS)

3.12 Análises dos dados

Para análise de regressão linear, foi utilizado programa Microsoft Excel 2010. A construção do diagrama de fases pseudo-ternário foi realizada com o uso do programa Origin 8. Para a análise estatística dos dados foi utilizado o programa GraphPad Prism 6, admitindo nível de significância $p < 0,05$. Diferenças significativas entre conjuntos de dados foram verificadas por teste de normalidade por análise de variância *one way*, seguido de teste de Tukey com comparação múltipla dos dados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção dos constituintes da planta (triagem fitoquímica preliminar)

- *Triterpenos e esteroides*

Os terpenos são um grupo de compostos formados por uma unidade de isopreno (C_5H_8) e classificados de acordo com o número de unidades em: hemi- (C_5), mono- (C_{10}), sesqui- (C_{15}), di- (C_{20}), sester- (C_{25}), tri- (C_{30}), tetra- (C_{40}) e politerpenos ($(C_5)_n$; $n > 8$). Há inúmeros derivados de terpenos, como os glicosilados; os oxigenados; os esteroides; as saponinas e os meroterpenos, entre outros (139).

Os triterpenos são compostos encontrados em muitos vegetais, e apresentam em sua estrutura seis unidades de isopreno, biossintetizados pela ciclização do esqualeno (como os esteroides). Biologicamente, desempenham papel importante por possuírem propriedades anti-inflamatória, antifúngica, antitumoral, antiviral e neuroprotetora (139,140).

Os resultados para triterpenos foram positivos para os dois extratos, uma vez que após a adição de ácido acético e ácido sulfúrico houve o desenvolvimento de coloração avermelhada (Figuras 16 e 17). A positividade desta reação decorre da observação da formação de cor avermelhada, que indica a presença da função carbonila na posição 3 e dupla ligação entre os carbonos 5 e 6 (141). Já o resultado da pesquisa de esteroides foi positivo apenas no EXT2 (Figura 17), evidenciado pela observação da coloração verde.

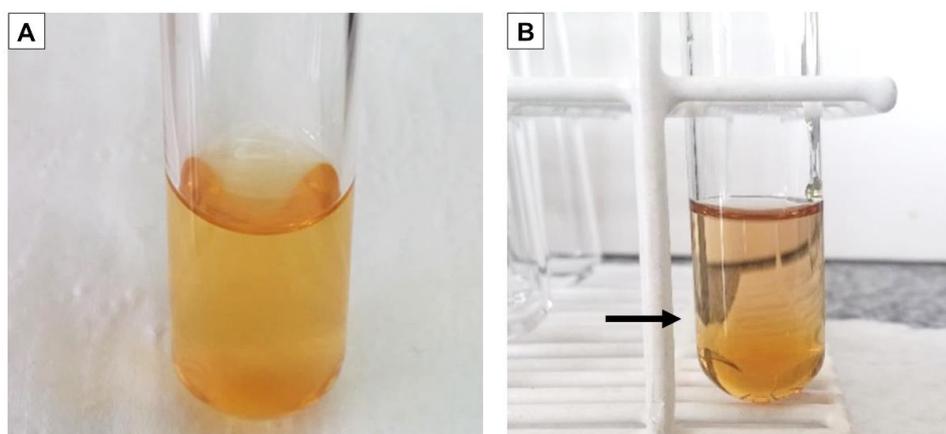


Figura 16. Avaliação da presença de triterpenos no extrato da droga vegetal obtida comercialmente: (A) EXT1 e (B) EXT1 após reação de Liebermann-Burchard.

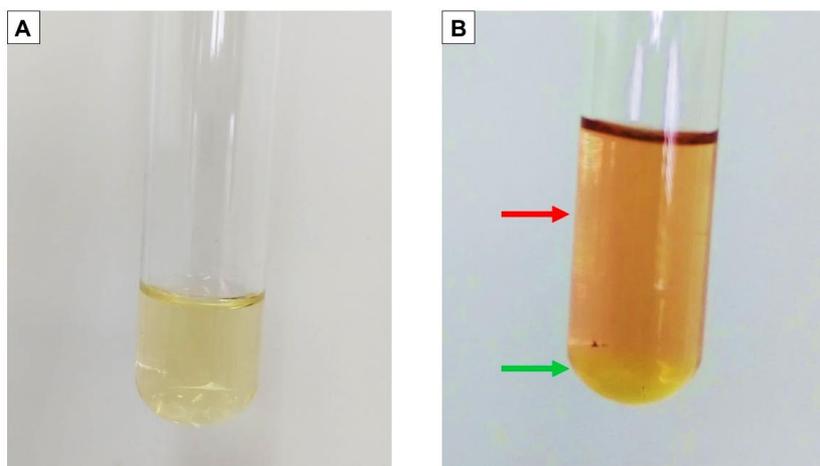


Figura 17. Presença de triterpenos e esteroides na droga vegetal coletada: (A) EXT2 e (B) EXT2 após reação de Liebermann-Burchard., com coloração avermelhada indicada pela seta de cor preta; e positiva para esteroides, com coloração verde indicada pela seta de cor vermelha.

- *Alcaloides*

Os alcaloides são compostos nitrogenados, de caráter predominantemente básico, encontrados em vegetais. Geralmente podem ser detectados pela observação de turvação ou formação de precipitado em meio ácido, após o uso de reativos de alcaloides. Três reativos de alcaloides usualmente utilizados para identificar presença de alcaloides são os reagentes de Mayer (iodo mercurato de potássio), Bouchardat (iodo-iodeto de potássio) e Dragendorff (iodo bismutato de potássio) (142,143).

Para identificação positiva de alcaloides após o uso desses reagentes, observa-se formação de precipitado nas cores: branco, marrom e alaranjado, respectivamente. A formação de precipitado apenas com o uso de um dos reativos é inconclusiva, pois alguns desses reagentes podem interagir com outros compostos além dos alcaloides.

A Figura 18 ilustra os resultados obtidos das reações com EXT1 e EXT2. Houve reação positiva com formação de precipitado apenas no EXT2, que reagiu com os três reativos de alcaloides utilizados, formando precipitados característicos de cada reativo. O EXT1 reagiu apenas com o reativo de Dragendorff, e por esse motivo o resultado foi considerado negativo para presença de alcaloides nesse extrato.

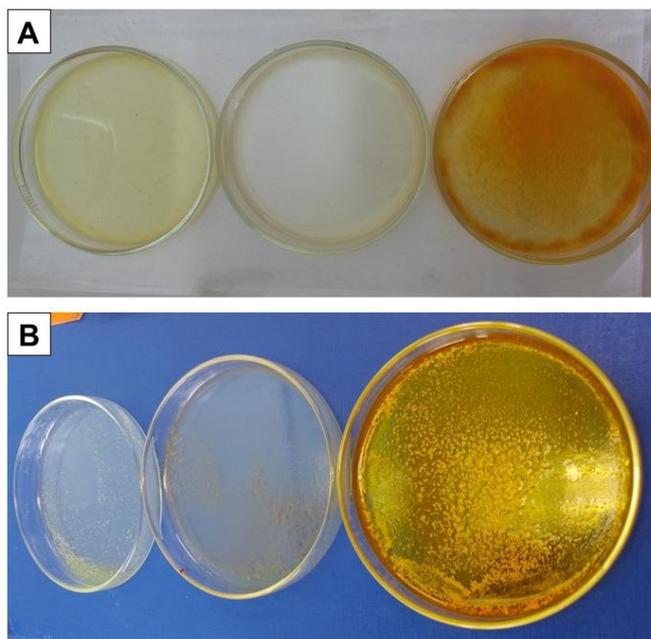


Figura 18. Avaliação da presença de alcaloides nos extratos 1 e 2 das drogas vegetais obtidas comercialmente (A) e coletada (B). Por reação de precipitação com reativos gerais: Mayer, Bouchardat e Dragendorff, da esquerda para a direita, respectivamente.

- *Antraquinonas*

As antraquinonas formam a maior subclasse constituinte do grupo das quinonas. Geralmente apresentam-se como substâncias que apresentam pigmentos de coloração laranja ou vermelha, e podem ser encontradas em diversos vegetais, nos fungos e também em animais (144). O ácido carmínico, por exemplo, é composto por uma antraquinona. Extraído das fêmeas da cochonilha (*Dactylopius coccus*), até hoje é empregado na indústria alimentícia e cosmética como corante natural (145).

Em testes fitoquímicos, a alteração da cor ocasionada pelas antraquinonas em meio básico pode ser utilizada como reação de identificação, permitindo diferenciá-las. As 1,8-di-hidróxi-antraquinonas apresentam cor vermelha a alaranjada, enquanto as 1,2-di-hidróxi-antraquinonas apresentam coloração azul-violeta em meio alcalino. Antronas e diantronas produzem inicialmente cor amarela que muda rapidamente para laranja/vermelho com a formação, por oxidação, das correspondentes antraquinonas (141). A reação de antraquinonas foi positiva para os dois extratos, como foi observado pelo desenvolvimento de coloração alaranjada (Figura 19).

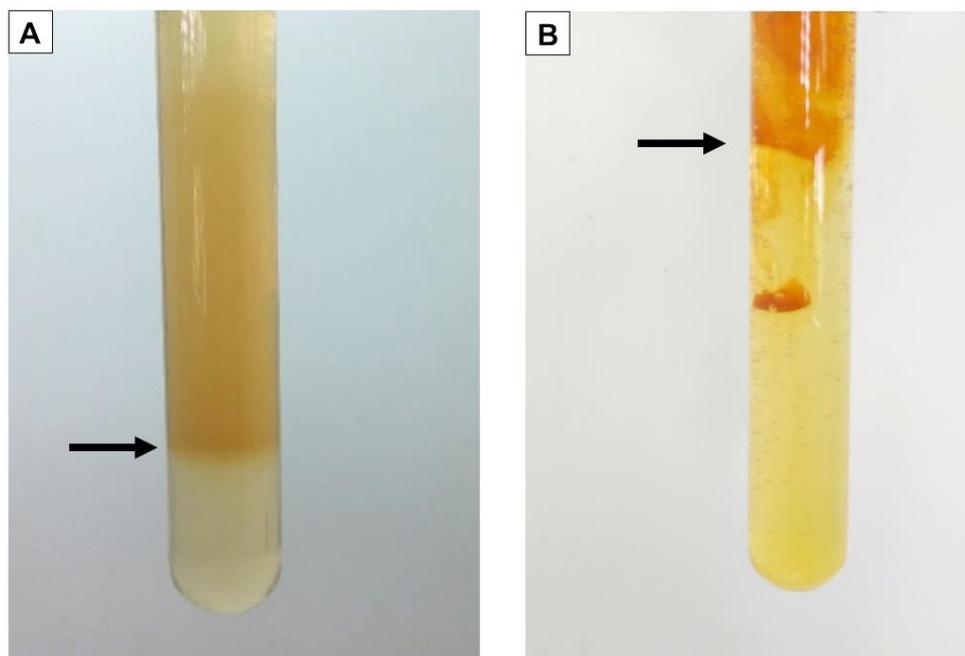


Figura 19. Fotografias ilustrativas da reação de Borntragen positiva indicando presença de antraquinonas nos extratos de *Brosimum gaudichaudii*: (A) Extrato do pó da raiz comercial - EXT1 e (B) Extrato da raiz coletada - EXT2.

- *Cumarinas por aumento de fluorescência em meio básico e exposição à luz UV*

Cumarinas são lactonas do ácido-hidroxicinâmico (2H-1-benzopirano-2-onas), sendo a 1,2-benzopirano mais comumente encontrada em produtos vegetais. Esses compostos possuem um espectro UV característico, o qual é fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes. Desse modo, elas emitem fluorescência e são facilmente visualizadas sob luz UV (141,146).

Ao analisar o EXT1 e o EXT2, segundo metodologia descrita anteriormente, foi observado que a reação foi positiva para cumarinas nos dois extratos, pois houve o desenvolvimento de forte fluorescência de coloração amarela/esverdeada em luz UV (254 nm) (Figura 20). A identificação positiva de fluorescência pode ser atribuída à predominância dos compostos cumarínicos bergapteno e psoraleno nos dois extratos, cuja quantificação será realizada a seguir.

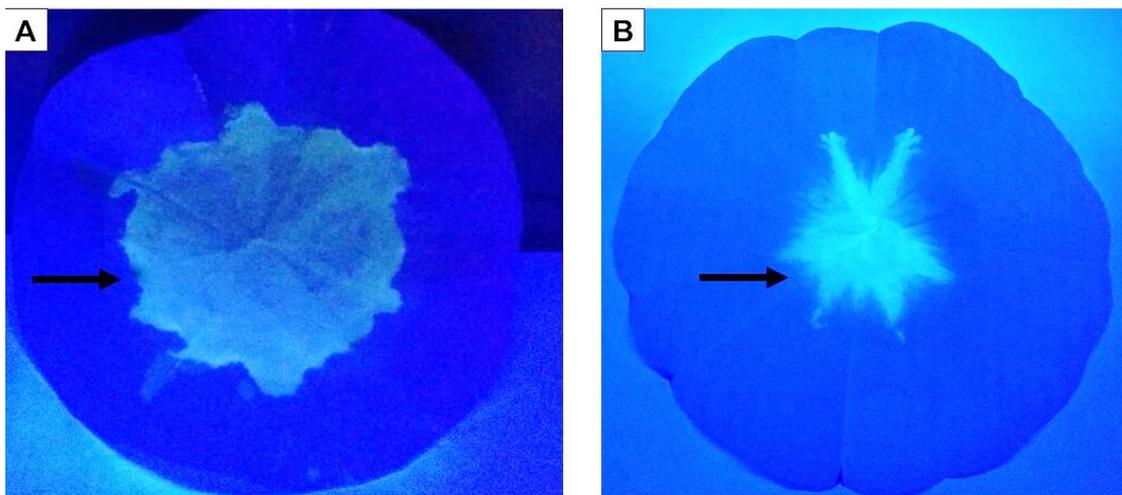


Figura 20. Fotografias ilustrativas do desenvolvimento de fluorescência em meio alcalino e luz UV das cumarinas presentes nos extratos (A) EXT1 e (B) EXT2. Nota-se o desenvolvimento de forte fluorescência amarelo esverdeada, indicado pelas setas.

- *Microsublimação e obtenção de cristais*

Após a secagem completa dos extratos para análise dos sólidos totais, observou-se a formação de cristais característicos dos compostos de maior predominância em cada extrato (Figura 21). A Figura 21A ilustra cristais com formato de drusas, e refere-se ao EXT1, o extrato que possui uma concentração maior de psoraleno do que de bergapteno (Figura 22). Já na Figura 21B, observa-se que a conformação dos cristais foi diferenciada, evidenciando formas mais retas e pontiagudas. Esta figura refere-se ao EXT2, que apresentou como característica uma concentração maior de bergapteno do que de psoraleno (Figura 23), em contraposição ao EXT1.

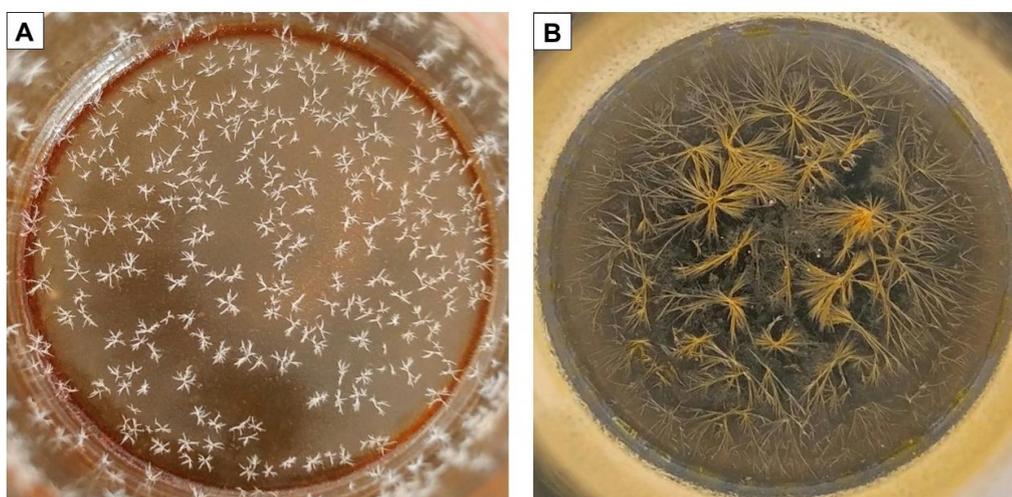


Figura 21. Fotografia de cristais formados em béqueres após a secagem em estufa (60 °C) das drogas vegetais utilizadas: A) Pó da raiz obtido comercialmente e B) Raiz coletada.

Após a visualização desse fenômeno de formação cristalográfica dos compostos dos extratos, foi realizada a técnica de micro-sublimação da droga vegetal utilizada para preparo do EXT1 (Figura 22) e do EXT2 (Figura 23). Em seguida, procedeu-se análise dos materiais de cada lâmina por microscopia óptica e por CLAE, de acordo com metodologia descrita no item 3.4.

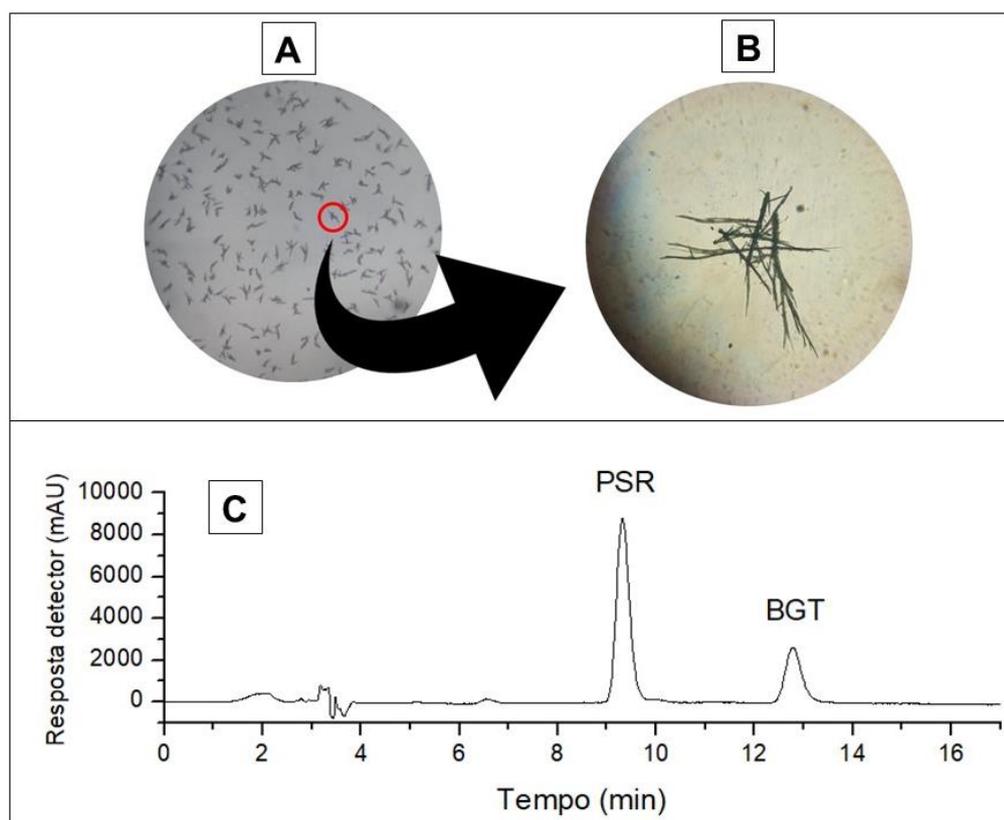


Figura 22. Análise de cristais obtidos pela técnica de microsublimação da droga vegetal em pó utilizada para o preparo do EXT1: Microscopia óptica dos cristais (A) Aumento 40x e (B) Aumento 100x. (C) Cromatograma obtido por CLAE da lâmina da técnica de microsublimação da droga vegetal em pó. Condições: Coluna C18; fase móvel H₂O/ACN/MeOH 50:25:25 (v/v/v); vazão de 0,6 mL/min; temperatura do forno a 35 °C e $\lambda = 340$ nm.

A figura acima ilustra o tipo de cristal predominante no EXT1 e o cromatograma obtido a partir da análise do material da lâmina. De acordo com o resultado obtido pela análise cromatográfica, sugere-se que o tipo de cristal observado constitui a conformação característica do psoraleno. Essa conformação difere de forma significativa da encontrada no EXT2 (Figuras 21B e 23). A partir da análise de microscopia óptica, observou-se que o tipo de cristal predominante no EXT2 possui formas retas e pontiagudas, diferente do formato estrelado característico do EXT1.

A partir da Figura 23, ao observar os cristais e o cromatograma obtido com a análise do material da lâmina, sugere-se que o tipo de cristal obtido constitui a conformação característica do bergapteno, tendo em vista a predominância dessa cumarina em relação ao psoraleno no EXT2.

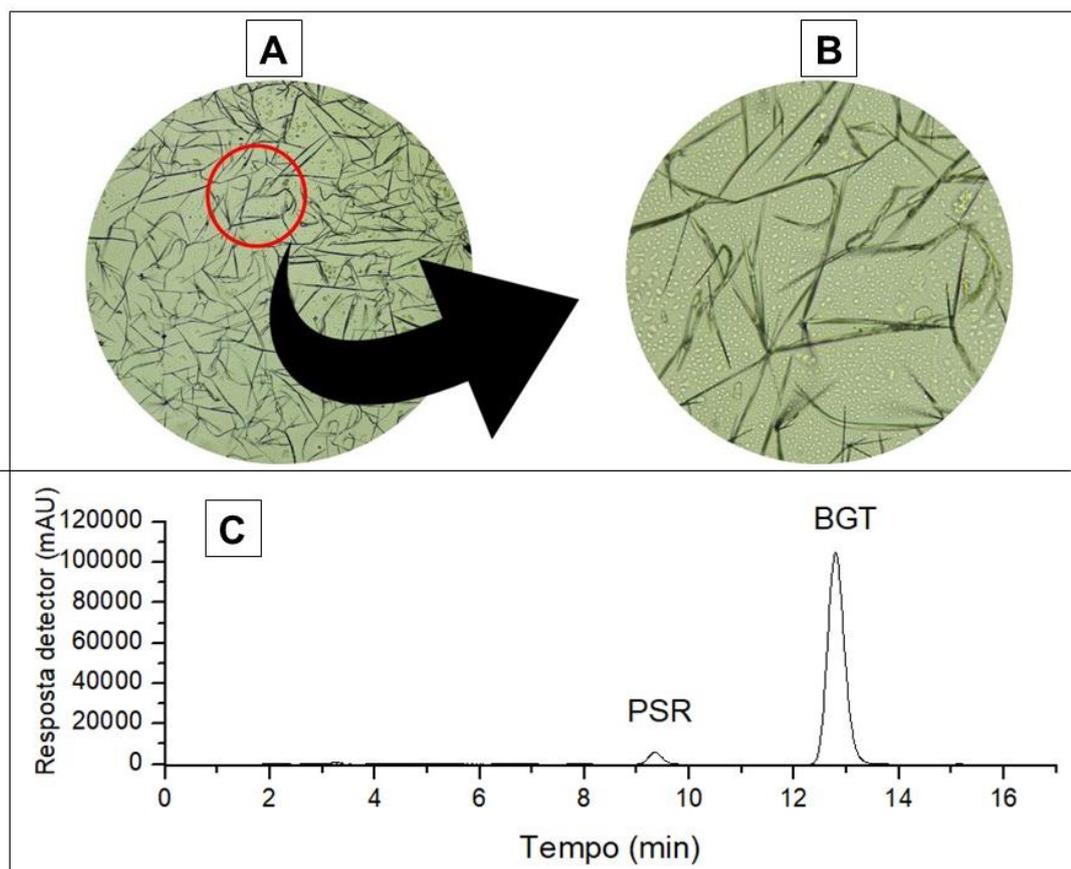


Figura 23. Análise de cristais obtidos pela técnica de micro-sublimação da casca da raiz coletada e utilizada para o preparo do EXT2: Microscopia óptica dos cristais (A) Aumento 40x e (B) Aumento 100x. (C) Cromatograma obtido por CLAE da lâmina da técnica de micro-sublimação da casca da raiz. Condições: Coluna C18; fase móvel H₂O/ACN/MeOH 50:25:25 (v/v/v); fluxo de 0,6 mL/min; temperatura do forno a 35 °C e $\lambda = 340$ nm.

De acordo com a triagem fitoquímica preliminar, houve diferenças nas análises dos dois extratos, apesar de pertencerem à mesma espécie. Os dois extratos apresentam quantidade semelhante de sólidos totais, com $5,20 \pm 1,00$ $\mu\text{g/mL}$ no EXT1 e $7,03 \pm 0,17$ $\mu\text{g/mL}$ no EXT2. O EXT2 apresentou uma sutil diferença na análise de sólidos totais e revelou a presença de esteroides e alcaloides, diferente do EXT1. Além disso, foi possível obter cristais das duas amostras de *Brosimum gaudichaudii*, mas com diferença de conformação. O pó da raiz, utilizado para o EXT1, apresentou uma concentração maior de psoraleno do que de bergapteno. O inverso ocorreu com a raiz coletada, utilizada para o EXT2.

A Tabela 3 apresenta o resumo dos resultados da análise fitoquímica preliminar da raiz de *Brosimum gaudichaudii* de caráter qualitativo a partir dos extratos etanólicos. Os resultados positivos foram ilustrados a seguir.

Tabela 3. Resultados dos ensaios fitoquímicos para os extratos etanólicos de *Brosimum gaudichaudii* (mama-cadela).

Metabólito	Extrato	Resultado	Observações
Triterpenos	EXT1	+	Coloração marrom a avermelhada
	EXT2	+	
Esteroides	EXT1	-	Não houve mudança de coloração
	EXT2	+	Coloração verde
Saponinas	EXT1	-	Sem observação de espuma
	EXT2	-	
Cumarinas	EXT1	+	Desenvolvimento de fluorescência no UV
	EXT2	+	
Alcaloides	EXT1	-	Formação de precipitado apenas na reação de Mayer
	EXT2	+	Formação de precipitado na reação de Mayer, Bouchardat e Dragendorff
Taninos	EXT1	-	Não houve mudança de coloração
	EXT2	-	
Antraquinonas	EXT1	+	Mudança de coloração para um tom alaranjado
	EXT2	+	
Furanocumarinas por microsublimação e CLAE	<i>Brosimum gaudichaudii</i> comercial	+	Formação de cristais com formato de drusas
	<i>Brosimum gaudichaudii</i> coletada	+	Formação de cristais aciculares

EXT1: Extrato etanólico 1:20 (p/v) do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*

EXT2: Extrato etanólico 1:10 (p/v) da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*

Os metabólitos secundários são substâncias propensas a variações qualitativas e quantitativas dependendo da origem genética, condições fisiológicas, época de coleta, bem como do método analítico e do preparo das amostras (147,148). Por isso, é importante investigar a composição da espécie a ser utilizada.

As amostras apresentaram algumas diferenças de detecção de compostos, o que pode ser atribuído às diferenças nos locais de coleta e também às diferenças entre as drogas vegetais utilizadas. O pó da raiz comercial foi obtido a partir da raiz

inteira, diferente da raiz coletada utilizada neste trabalho, da qual foi utilizada apenas a casca externa da raiz.

4.2 Padronização e validação de metodologia analítica para quantificação de bergapteno e psoraleno a partir dos extratos vegetais, formulações e em experimentos de permeação cutânea

4.2.1 Determinação do comprimento de onda de absorção de máxima para o bergapteno e para o psoraleno

Foram preparadas soluções de bergapteno e psoraleno e a partir dessas soluções, foi realizada uma varredura de cada padrão, dissolvido em etanol absoluto a 25 µg/mL. O espectro de varredura de cada um dos padrões na região do UV visível (UV/Vis) está apresentado na Figura 24.

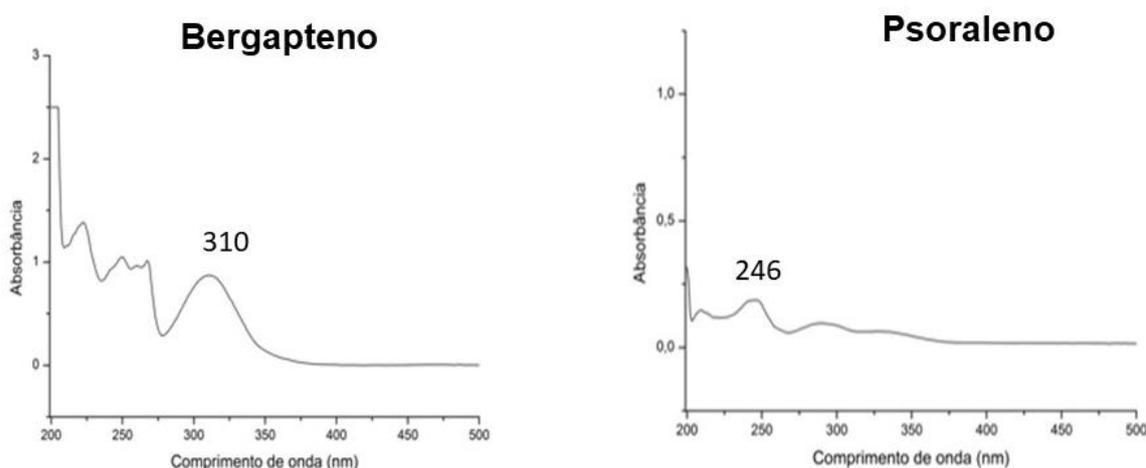


Figura 24. Espectro de absorção na região do UV/Vis de uma solução de Bergapteno e Psoraleno, em etanol absoluto a 25 µg/mL. Faixa de varredura: 200 a 500 nm.

Os valores de comprimentos de onda de absorção máxima encontrados para os padrões foram de 310 nm para o bergapteno e de 246 nm para o psoraleno, mas nesse comprimento de onda houve absorção de diversos interferentes dos extratos e da pele principalmente, e por isso, após diversas análises, foi padronizado 340 nm para os dois ativos, sem comprometer a detecção e quantificação dos compostos. Outros estudos obtiveram resultados próximos, como 223 nm (127,149) para o psoraleno e 310 nm (150) ou 320 nm (151) para o bergapteno. Esta variação pode estar relacionada com diferenças de solventes e de processos de extração.

Pela análise cromatográfica preliminar dos extratos, observou-se que em comprimentos de onda menores, houve absorção de interferentes dos solventes e dos extratos nos cromatogramas analisados e por essa razão, foi padronizado apenas um valor de absorção para os dois compostos. Para facilitar a análise, a padronização de apenas um comprimento de onda para os dois compostos também foi realizada por Chunyan *et al.* (152). Os autores determinaram o valor 254 nm para análise de bergapteno e psoraleno na espécie *Ficus Carica* L. A análise de bergapteno e psoraleno também foi realizada por Pires *et al.* (127), em soluções fitoterápicas para uso oral, e os autores determinaram 223 nm para detecção dos compostos por CLAE. Neste estudo, contudo, após análise de diferentes faixas de comprimento de onda por CLAE, foi selecionado 340 nm para detecção dos dois compostos de maneira concomitante.

O método analítico padronizado por CLAE utilizou como fase móvel Água MilliQ/Acetonitrila/Metanol na proporção 50:25:25 (v/v/v), com temperatura do forno a 35°C, fluxo de 0,6 mL/min, volume de injeção de 10 µL e $\lambda = 340$ nm. Como fase estacionária, foi utilizada coluna de fase reversa C₁₈ (150 mm x 4,6 mm). O método foi capaz de separar os compostos bergapteno e de psoraleno entre si e de outros interferentes da amostra, conforme será descrito no item abaixo. O bergapteno foi detectado após 9 min da injeção e o psoraleno após 13 min.

4.2.2 Seletividade

A seletividade de um método, também chamada de especificidade, corresponde à capacidade de detectar e quantificar uma substância na presença de outros compostos, como impurezas, solventes, produtos de degradação, etc (128,129).

A Figura 25 apresenta os cromatogramas de soluções de Etanol absoluto, homogeneizado de pele de suínos extraídos com etanol e tensoativos Labrasol® e Plurol® 4:1 (v/v), usados no preparo das nanoemulsões. e os cromatogramas referentes à injeção e leitura por CLAE de soluções de bergapteno e psoraleno em etanol, ambas a 5 µg/mL, e dos extratos etanólicos EXT1 e EXT2.

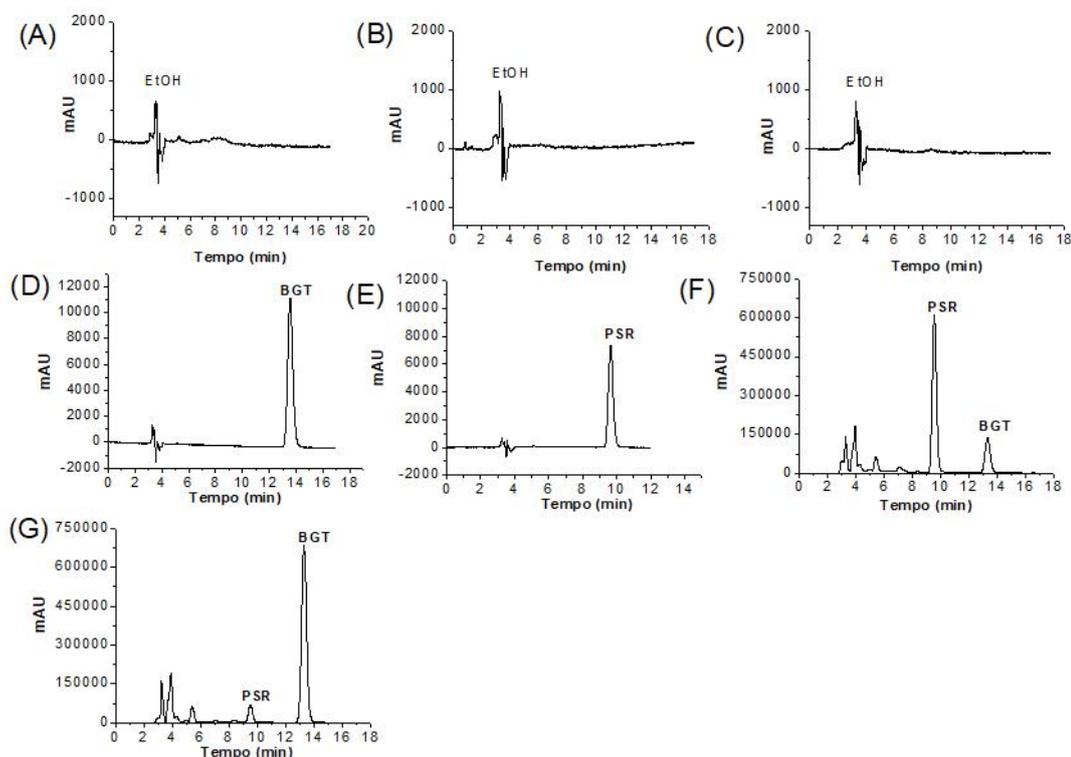


Figura 25. Cromatogramas (CLAE) referente à injeção de soluções de: (A) Etanol absoluto; (B) Pele extraída em etanol; (C) Labrasol® e Plurol® 4:1 (v/v) diluídos em etanol na proporção 1:50 (v/v); (D) bergapteno padrão a 5 µg/mL; (E) psoraleno padrão a 5 µg/mL; (F) EXT1; (G) EXT2. Condições: coluna C18; fase móvel Água MilliQ/Acetonitrila/Metanol 50:25:25 (v/v/v); 35 °C; fluxo 0,6 mL/min e injeção 10 µL; $\lambda = 340$ nm.

De acordo com os resultados obtidos, não houve qualquer interferência de nenhum dos contaminantes na análise dos compostos. Dessa forma, o método cromatográfico poderá ser utilizado para doseamento dos marcadores psoraleno e bergapteno tanto nos extratos, quanto nas formulações desenvolvidas e após sua extração da pele durante os ensaios de permeação cutânea.

4.2.3 Linearidade

As curvas analíticas obtidas para bergapteno e psoraleno estão representadas na Figura 26, na faixa de concentração de 0,5 a 10,0 µg/mL, utilizando etanol e solução de tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v) como diluentes.

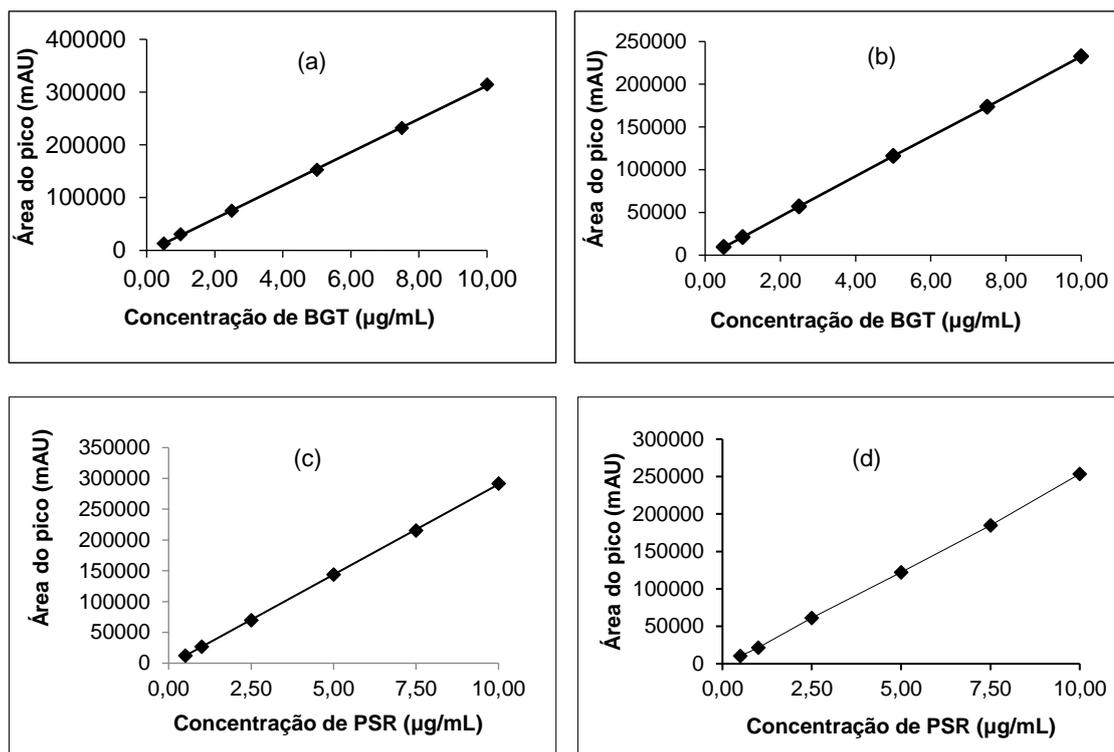


Figura 26. Representação gráfica da curva analítica obtida para o bergapteno (a e b) e psoraleno (c e d) por CLAE. Concentrações diluídas em: (a e c) Etanol absoluto. Equações de reta: (a) $y = 31516x - 3008,2$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9998$ e (c) $y = 29312x - 2735,8$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9999$; (b e d) tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v). Equações de reta: (b) $23463x - 1979$ com coeficiente de correlação linear: $r = 1$ e (d) $y = 25458x - 3515,9$ com coeficiente de correlação linear: $r = 0,9996$.

A partir da análise da regressão linear é possível afirmar que o método apresentou linearidade na faixa de concentração entre 0,5 µg/mL e 10,0 µg/mL. O coeficiente de correlação linear obtido nas quatro curvas foi acima de 0,999 tanto com etanol absoluto, como com a solução de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 com 5% (p/v) de Tween® 20 como diluente, estando de acordo com o estabelecido pela ANVISA (128).

4.2.4 Precisão e exatidão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Já a exatidão refere-se à proximidade dos valores obtidos no experimento em relação ao valor de referência (128).

O método foi avaliado quanto à precisão por meio do estudo de repetibilidade (precisão intracorridas) e precisão intermediária (precisão intercorridas). As tabelas a seguir representam os valores obtidos de precisão e exatidão intracorrida e intercorrida do bergapteno na faixa de concentração de 0,5; 5,0 e 10,0 µg/mL. O

padrão foi diluído em etanol absoluto (Tabela 4) e em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 com 5% (p/v) de Tween® 20 (Tabela 5).

Tabela 4. Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para o bergapteno diluído em etanol absoluto.

Concentração Teórica bergapteno (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrida (n = 9)			
0,5	0,49 ± 0,11	3,64	98,48
5,0	4,92 ± 0,12	0,52	98,48
10,0	9,71 ± 0,26	1,78	97,08
Intercorrida (n = 9)			
0,5	0,49 ± 0,11	4,19	97,48
5,0	4,94 ± 0,16	1,49	98,89
10,0	9,59 ± 0,31	2,25	95,90

Os dados são médias de 9 determinações ± desvio padrão.

Tabela 5. Análise da precisão e da exatidão intracorrida e intercorrida do método de quantificação para o bergapteno diluído em tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v).

Concentração Teórica bergapteno (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrida (n = 9)			
0,5	0,48 ± 0,11	3,61	96,79
5,0	5,03 ± 0,11	0,32	100,69
10,0	9,97 ± 0,32	2,33	99,68
Intercorrida (n = 9)			
0,5	0,49 ± 0,10	1,49	101,60
5,0	5,08 ± 0,10	0,21	101,32
10,0	9,78 ± 0,11	0,19	98,14

Os dados são médias de 9 determinações ± desvio padrão.

A partir dos dados, é possível observar que os resultados obtidos para o método de análise de bergapteno por CLAE estão dentro da faixa estabelecida pela ANVISA (128). A variação dos valores obtidos de exatidão e precisão para as concentrações de 0,5; 5,0 e 10,0 µg/mL foi menor que 15%, limite máximo preconizado pela agência regulatória.

As tabelas a seguir representam os valores obtidos de precisão e exatidão intracorrída e intercorrída psoraleno, diluídos em etanol absoluto (Tabela 6) e em tampão fosfato 0,01 M, pH 7,4 com 5% (p/v) de Tween® 20 (Tabela 7).

Tabela 6. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o psoraleno diluído em etanol absoluto.

Concentração Teórica bergapteno (µg/mL)	Concentração Experimental (µg/mL)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrída (n = 9)			
0,5	0,52 ± 0,11	4,67	103,19
5,0	5,24 ± 0,29	3,88	104,78
10,0	10,31 ± 0,42	3,24	103,06
Intercorrída (n = 9)			
0,5	0,50 ± 0,11	3,62	100,47
5,0	5,04 ± 0,12	0,59	100,87
10,0	9,88 ± 0,13	0,41	98,76

Os dados são médias de 9 determinações ± desvio padrão.

Tabela 7. Análise da precisão e da exatidão intracorrída e intercorrída do método de quantificação para o psoraleno diluído em tampão fosfato (pH 7,4) com 5% de Tween® 20 (p/v).

Concentração Teórica psoraleno ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração Experimental ($\mu\text{g/mL}$)	Precisão CV (%)	Exatidão (%)
Intracorrída (n = 9)			
0,5	0,51 \pm 0,12	4,04	101,10
5,0	5,15 \pm 0,28	3,73	103,08
10,0	10,19 \pm 0,31	2,18	101,92
Intercorrída (n = 9)			
0,5	0,51 \pm 0,10	1,37	102,10
5,0	5,04 \pm 0,13	0,68	100,89
10,0	9,88 \pm 0,12	0,30	98,76

Os dados são médias de 9 determinações \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos para o método de análise de psoraleno por CLAE também estão dentro da faixa estabelecida pela ANVISA (128). A variação dos valores obtidos tanto para exatidão quanto para precisão foi menor que 15%, nas concentrações de 0,5; 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$.

4.2.5 Limite de detecção (LQ) e limite de quantificação (LQ)

O bergapteno apresentou LD e LQ teóricos equivalentes a 0,02 $\mu\text{g/mL}$ e 0,07 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e o psoraleno 0,04 $\mu\text{g/mL}$ e 0,13 $\mu\text{g/mL}$. O teste experimental demonstrou que o LQ real tanto de bergapteno quanto de psoraleno foi de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, com precisão e exatidão aceitáveis. Assim, concentrações abaixo desse valor foram detectadas, mas não foi possível quantificar por CLAE.

As condições de análise por CLAE proporcionaram sensibilidade ao método. Os valores obtidos estão de acordo com o que era esperado, visto que consistem na capacidade de analisar valores mínimos dos padrões (0,5 $\mu\text{g/mL}$), com nível de incerteza aceitável. Isso oferece suporte aos experimentos de desenvolvimento e avaliação de novas formulações contendo o extrato de *Brosimum gaudichaudii*, dado que a espécie apresenta tanto bergapteno quanto psoraleno, como identificado na triagem fitoquímica.

4.2.6 Recuperação do bergapteno e do psoraleno da pele

Na Tabela 8 estão apresentados os resultados da porcentagem recuperada de bergapteno e psoraleno após processo de extração das camadas da pele de suínos com 5 mL de etanol absoluto, contaminadas com concentrações 0,5; 5,0 e 10,0 µg/mL dos marcadores.

Tabela 8. Porcentagem de recuperação de bergapteno e psoraleno da pele utilizando etanol como solvente extrator.

Furanocumarina	Concentração	% Recuperada pele
Bergapteno (µg/mL)	0,5	96,59 ± 0,10
	5,0	88,64 ± 0,23
	10,0	90,69± 0,07
Psoraleno (µg/mL)	0,5	103,85± 0,16
	5,0	97,21± 0,18
	10,0	97,3± 0,08

Os dados são médias de 3 repetições ± desvio padrão.

Como pode ser observado, o processo de extração de bergapteno e psoraleno das camadas pele foi eficiente dentro do intervalo de linearidade (0,5 a 10,0 µg/mL) do método analítico validado por CLAE. A recuperação do fármaco foi realizada com porcentagens de erro que estão dentro do limite aceito para a validação de métodos envolvendo processos extrativos, que é de ±15% (128). Assim, garante-se que o método validade é eficiente para ser utilizado nos ensaios envolvendo permeação cutânea dos compostos dos extratos a partir das formulações desenvolvidas.

4.3 Desenvolvimento das nanoemulsões O/A e análises preliminares

4.3.1 Formação das nanoemulsões O/A com extratos etanólicos de *Brosimum gaudichaudii*

Para formação das nanoemulsões, foi aplicado método de emulsificação de baixa energia, que consiste na formação espontânea de gotículas de óleo em sistemas mistos de óleo, água e tensoativo, quando a composição ou as condições ambientais são alteradas. Nesse método, as propriedades físico-químicas do sistema são empregadas para preparar formulações por inversão de fases ou por emulsificação espontânea (24,153,154).

A mudança na estrutura do tensoativo durante o processo de preparação da nanoemulsão estabelece a diferenciação entre os métodos de emulsificação de baixa energia. Se o tensoativo se difundir rapidamente da fase dispersa para a fase contínua, sem alterar sua curvatura, o método é de emulsificação espontânea. Do contrário, quando o tensoativo sofre alteração em sua curvatura, o método é classificado como inversão de fase (24,155).

Neste trabalho, foram preparadas nanoemulsões por método de emulsificação de baixa energia por inversão de fases, à temperatura constante. A transição da curvatura do tensoativo foi obtida alterando a fração volumétrica, pela adição sucessiva da fase aquosa na fase oleosa, formando glóbulos na fase contínua. Nesse ponto, obtém-se uma nanoemulsão A/O, e inicia-se a adição de volume de fase aquosa para que ocorra modificação espontânea da curvatura do tensoativo, o que acarreta na inversão da nanoemulsão A/O para O/A (156,157).

Foi construído um diagrama de fases pseudo-ternário (Figura 27) com base nas observações realizadas durante a adição da fase aquosa, conforme descrito na metodologia. Os pontos em que se obteve nanoemulsão, ou seja, formulações líquidas, homogêneas, transparentes e translúcidas estão marcados no diagrama, bem como o ponto de formação de nanoemulsão escolhido a partir do diagrama, que está em destaque na Figura 27.

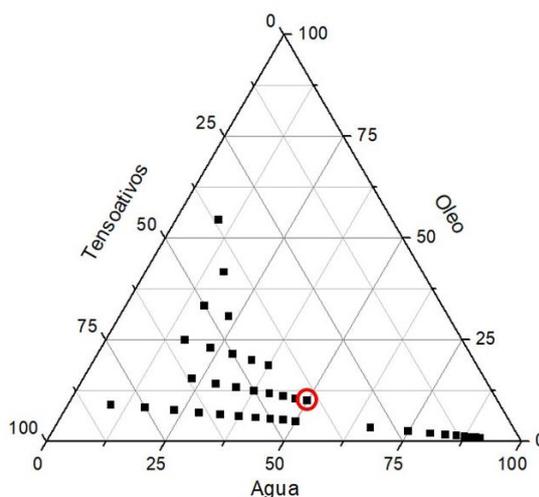


Figura 27. Diagrama de fases pseudo-ternário para obtenção de nanoemulsões O/A. Em vermelho: nanoemulsão com 50% de água, 40% de tensoativos e 10% de oleato de etila.

Assim, a formulação selecionada corresponde à seguinte composição: 50% água milliQ, 40% de tensoativos Labrasol®:Plurol® (4:1 p/p) e 10% de oleato de etila.

A partir dessa composição, foram obtidas três nanoemulsões O/A (Figura 28): a NEC, obtida sem uso de extrato, e duas nanoemulsões obtidas a partir dos extratos etanólicos EXT1 e EXT2, denominadas NE1 e NE2. A NE1 foi preparada a partir do extrato do pó da raiz comercial e a NE2 a partir do extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

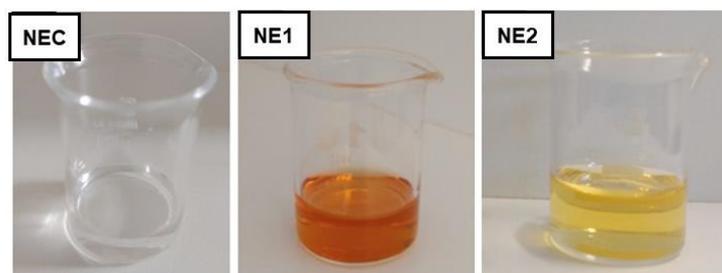


Figura 28. Nanoemulsões O/A: (NEC) sem extrato, (NE1) com extrato etanólico de *Brosimum gaudichaudii* do pó da raiz comercial e (NE2) com extrato etanólico da planta coletada.

4.3.2 Características organolépticas e centrifugação

Os parâmetros organolépticos avaliados nas formulações foram: aspecto, cor, odor, sensação de tato e processos de instabilidade como turbidez e separação de fases, e os resultados dessa avaliação estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9. Características organolépticas observadas a partir das nanoemulsões NEC, NE1 e NE2 O/A obtidas.

Formulação	NEC	NE1	NE2
Aspecto	Translúcido	Translúcido	Translúcido
Cor	Ausência de cor	Laranja	Amarela
Odor	Característico dos tensoativos	Característico dos tensoativos	Característico dos tensoativos
Sensação de tato	Untuosa	Untuosa	Untuosa
Turbidez	-	-	-
Separação de fases após centrifugação	-	-	-

Nota: NEC – Nanoemulsão sem extrato; NE1 – Nanoemulsão com extrato etanólico de *Brosimum gaudichaudii* do pó da raiz comercial e NE2 - Nanomulsão com extrato etanólico da planta coletada.

Todos os aspectos foram avaliados antes e após a centrifugação das formulações obtidas. As nanoemulsões formadas apresentaram características semelhantes, conforme descrito na Tabela 9, com exceção do parâmetro cor (Figura 28).

4.3.3 Análise dos parâmetros iniciais das nanoemulsões

Foram realizadas as primeiras análises das formulações, com base nos parâmetros de pH, potencial zeta, tamanho e PDI, a fim de caracterizá-las como nanoemulsões. Os resultados podem ser observados na Tabela 10.

Tabela 10. Resultados da avaliação dos parâmetros pH, tamanho de gotícula, PDI e Potencial zeta das formulações NEC, NE1 e NE2 O/A obtidas.

Formulação	pH	Potencial zeta (mV)	Tamanho (nm)	PDI
NEC	4,28 ± 0,01	-11,8 ± 0,7	141,4 ± 4,37	0,09 ± 0,03
NE1	4,68 ± 0,01	-15,1 ± 2,3	139,3 ± 11,7	0,16 ± 0,03
NE2	4,15 ± 0,01	-13,1 ± 2,0	110,4 ± 2,3	0,13 ± 0,01

Os dados são médias de 3 determinações ± desvio padrão.

Sabe-se que em meio alcalino ocorre a abertura do anel lactona, característico de cumarinas, modificando a estrutura do ativo (158). Nesse sentido, as formulações NEC, NE1 e NE2 desenvolvidas apresentaram pH levemente ácido, adequado para manter a estabilidade química das cumarinas bergapteno e psoraleno.

O tamanho das gotículas, em conjunto com o PDI, pode afetar as propriedades das nanoemulsões, como estabilidade, reologia, aparência, coloração e textura. Idealmente, as nanoemulsões apresentam tamanho médio de gotículas entre 110 e 142 nm (159). O PDI fornece informações sobre distribuição do diâmetro das gotículas em torno de uma média. Admite-se que valores de PDI menores que 0,20 indicam uma distribuição do diâmetro das partículas dentro de uma faixa estreita, ou seja, maior homogeneidade no sistema (160). Os resultados obtidos a partir das três formulações demonstraram que as gotículas possuem tamanho característico de nanoemulsões e apresentaram-se monodispersas, considerando que as três nanoemulsões tiveram PDIs menores que 0,2.

Outro parâmetro importante a ser avaliado consiste no potencial zeta. Trata-se de uma medida da magnitude da diferença de potencial entre a superfície das partículas e um meio, ou da repulsão ou atração eletrostática entre elas. O potencial positivo ou negativo confere à partícula ou gotícula estabilidade devido ao grau de repulsão entre elas. Dessa maneira, quanto maior for o valor do potencial zeta, maior será a estabilidade da formulação, uma vez que se evitará a fusão de gotículas que poderia resultar em uma separação de fases da nanoemulsão (161). Considerando os valores negativos obtidos com a NEC, NE1 e NE2, a formação de carga negativa confirma que há repulsão entre as gotículas, e por isso, as nanoemulsões são mais propensas a permanecerem estáveis ao longo do estudo de estabilidade.

As análises foram conduzidas com base na caracterização inicial das formulações. Como pode ser observado, não houve nesta análise amostras que apresentaram instabilidade, como separação de fases ou cremação. Todas as formulações apresentaram-se translúcidas, sem turbidez. Além disso, as nanoemulsões apresentaram pH, potencial zeta, tamanho e PDI dentro dos limites apropriados. Considerando essas características iniciais, as formulações foram classificadas como adequadas para a análise de estabilidade acelerada durante 90 dias, em condições climáticas variadas.

4.4 Estudos de estabilidade acelerada das nanoemulsões

Para que uma nanoemulsão seja considerada estável, as gotículas dispersas devem manter as características iniciais de tamanho e potencial zeta e uma distribuição uniforme na fase contínua, ao longo de um determinado período de análise. Contudo, ao longo do tempo podem ocorrer processos de instabilidade, comprometendo as condições ideais do sistema (24).

As formulações NEC, NE1 e NE2 foram submetidas a três diferentes condições de temperatura (ambiente, geladeira e câmara climática) por um período de 90 dias. As amostras foram analisadas nos tempos 0, 7, 15, 30, 60 e 90 dias. Em cada um dos tempos, foram verificados os parâmetros: pH, tamanho de gotícula, PDI, potencial zeta e teor (para NE1 e NE2), além dos parâmetros organolépticos descritos na Tabela 9.

Durante todo o tempo de estudo, não foram verificadas mudanças nas características organolépticas das formulações, indicando uma possível estabilidade física de todas elas em todas as condições de temperatura estudadas.

4.4.1 pH e potencial zeta

A análise de pH de formulações é um parâmetro importante nos estudos de estabilidade, pois permite avaliar mudanças de composição química dos constituintes. Além disso, o pH pode ser ajustado de acordo com o local de aplicação e de maneira a garantir compatibilidade entre os compostos ativos nas formulações (131).

A variação de pH das formulações ao longo do estudo de estabilidade está representada na Figura 29.

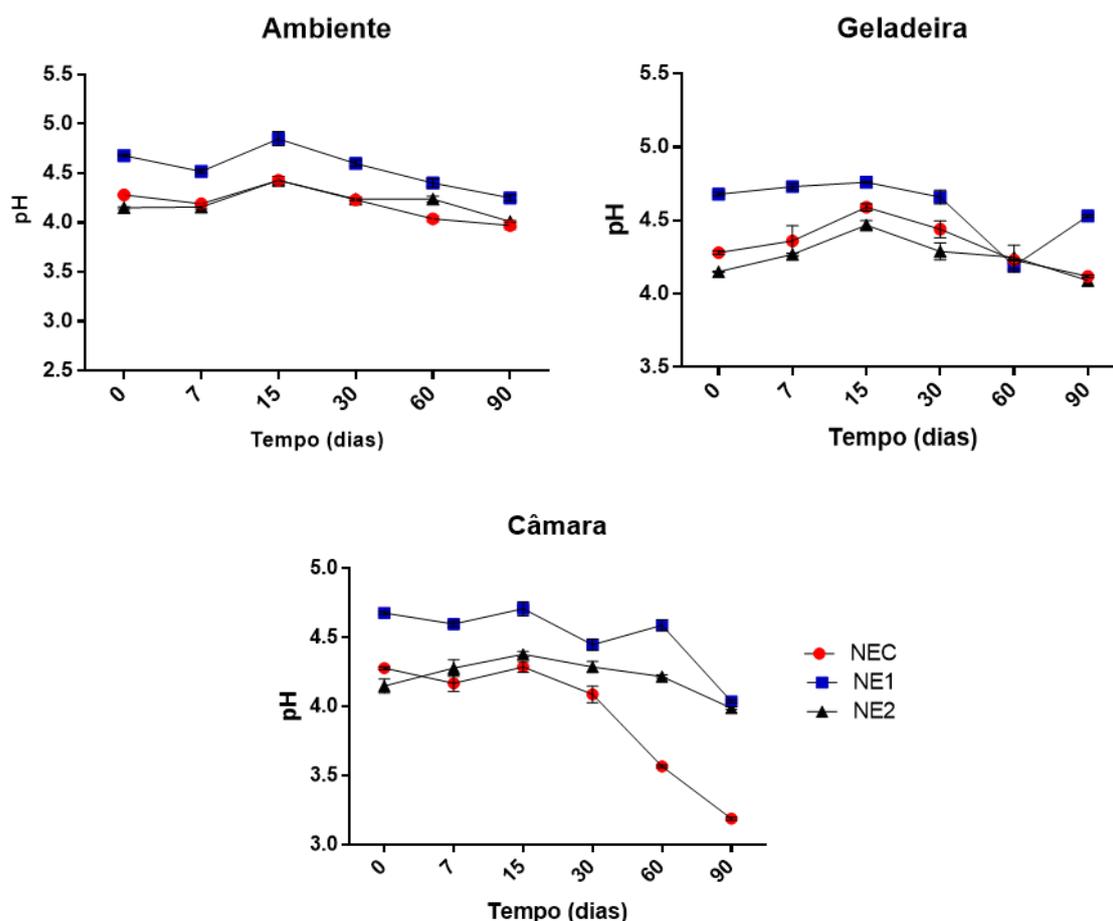


Figura 29 - Variação de pH das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. NEC: Nanoemulsão Controle; NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

No tempo 0, as formulações NEC, NE1 e NE2 apresentaram valores médios de pH equivalentes a $4,28 \pm 0,01$; $4,68 \pm 0,01$; $4,15 \pm 0,01$, respectivamente. No tempo 90, as formulações armazenadas em temperatura ambiente apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) apenas nas formulações NEC e NE1, com pH de $3,97 \pm 0,04$ e $4,25 \pm 0,03$, respectivamente. Já em temperatura de geladeira, houve redução

significativa ($p < 0,05$) de pH em NEC, NE1 e NE2, com valores de $4,12 \pm 0,01$; $4,53 \pm 0,01$ e $4,09 \pm 0,01$. O mesmo ocorreu com as formulações armazenadas em câmara climática, que apresentaram valores de pH $3,19 \pm 0,01$; $4,04 \pm 0,01$ e $3,99 \pm 0,01$ referentes às formulações NEC, NE1 e NE2, respectivamente.

Observou-se, portanto, que a tendência das formulações NEC, NE1 e NE2, armazenadas nas três condições de temperatura, foi de redução do pH ao longo dos 90 dias de análise. A redução do pH foi significativa ($p < 0,05$) ao considerar a variação de pH nas três formulações entre os tempos 0 e 90 dias. Isso pode ser atribuído em grande parte à presença do oleato de etila, visto que consiste em um éster ácido graxo formado a partir da condensação do ácido oleico com etanol. A presença de água na formulação pode ter causado reações de hidrólise de alguns ésteres de ácidos graxos derivados do oleato de etila. Isso aumentaria a concentração de íons hidrogênio (H^+) no meio, diminuindo o pH da formulação (162,163).

Apesar de ter havido redução de pH, isso não deve contribuir para a desestabilização do sistema, nem colocar em risco a segurança do paciente. Além disso, observou-se que as formulações com extratos de *Brosimum gaudichaudii* apresentaram menor variação de pH em relação à nanoemulsão sem extrato, quando armazenadas em temperatura ambiente. Isso indica que os compostos podem ter oferecido maior estabilidade à formulação. Outros parâmetros de estabilidade, portanto, ainda precisam ser avaliados.

O potencial zeta, por exemplo, é um dos parâmetros fundamentais, pois confere estabilidade física ao sistema (143). Na Figura 30 estão apresentados os resultados da variação de potencial zeta ao longo dos 90 dias de estudo de estabilidade, considerando as três condições de temperatura e as três formulações desenvolvidas.

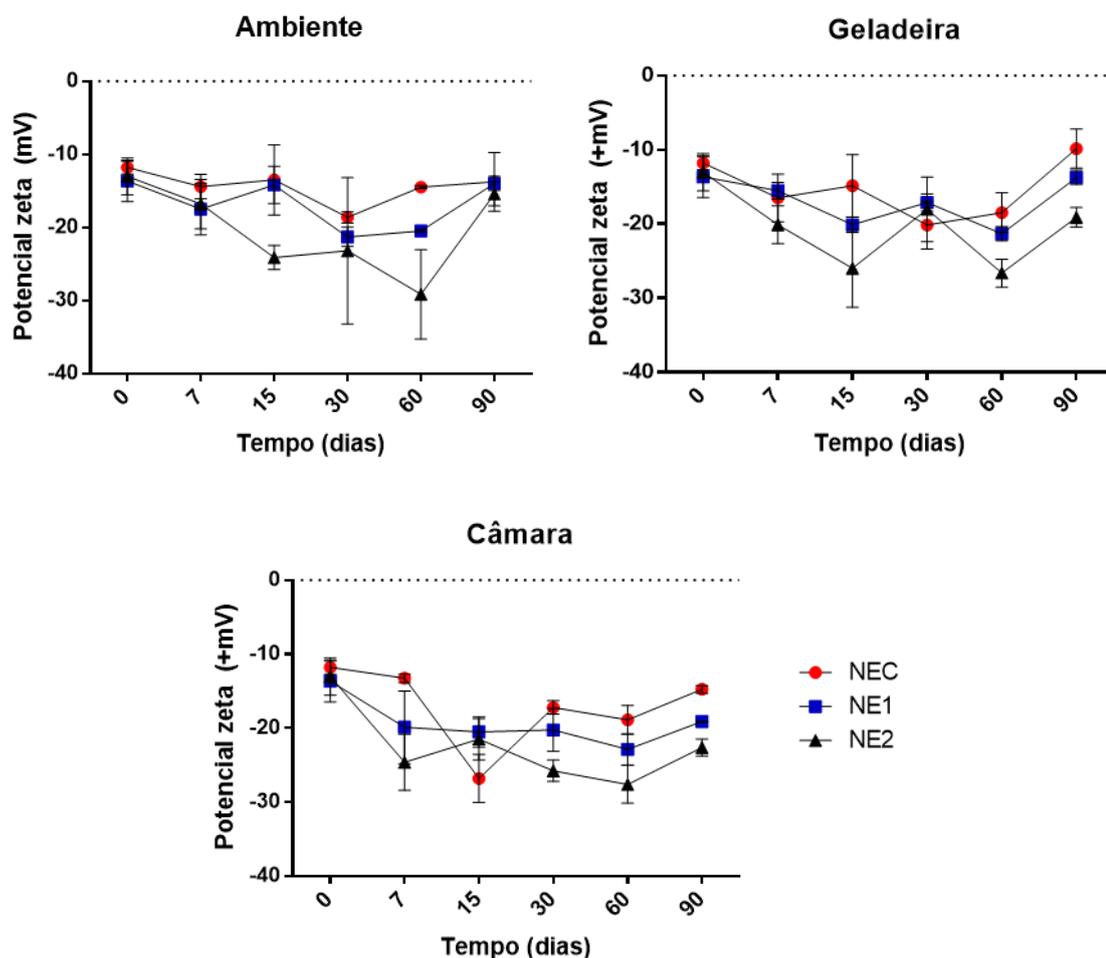


Figura 30. Variação de potencial zeta das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. NEC: Nanoemulsão Controle; NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

As formulações armazenadas em temperatura ambiente não apresentaram variações significativas ($p > 0,05$) de potencial zeta ao longo de todo o período de estudo de estabilidade. Em temperatura de geladeira, houve variação significativa ($p < 0,05$) no tempo 30 para a formulação NEC, com potencial zeta de $-20,1 \pm 1,1$ mV. Ainda em temperatura de geladeira, no tempo 60 dias, houve aumento significativo ($p < 0,05$) do potencial zeta nas três formulações NEC, NE1 e NE2, com $-18,4 \pm 0,2$ mV; $-21,3 \pm 0,1$ mV e $-26,6 \pm 5,0$ mV, respectivamente. Entretanto, não houve mudança significativa entre o tempo 0 e o tempo 90 dias, para as formulações NEC e NE1, considerando as três condições de temperatura.

Em contraposição às outras formulações, a NE2 armazenada em câmara climática apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em todos os tempos de análise,

sendo que no tempo 90 dias, houve redução considerável do potencial zeta, de cerca de -10 mV, se comparado ao potencial zeta inicial da amostra.

Com base neste parâmetro, portanto, a condição de armazenamento em temperatura ambiente foi a que não ocasionou alteração de potencial zeta em nenhuma das formulações avaliadas. Além disso, para as outras condições de armazenamento avaliadas, apesar das alterações ocorridas neste parâmetro, observou-se que todos os valores obtidos se mantiveram negativos e com um valor superior a 10 mV em módulo. O potencial negativo é atribuído majoritariamente aos tensoativos utilizados na formulação. Há ainda uma relação direta entre o pH e o potencial zeta de sistemas dispersos, de forma que o decréscimo no pH tende a reduzir o potencial zeta do produto (164).

Essa carga superficial negativa das gotículas que foi mantida durante os 90 dias de experimento, independente da condição de armazenamento e apesar das variações, deve conferir estabilidade física às formulações, uma vez que impede a aproximação entre as gotículas, que costumam resultar em fusão para posterior separação de fases.

4.4.2 Tamanho das gotículas e PDI

O tamanho de gotícula relaciona-se diretamente com as propriedades da formulação, e torna-se parâmetro fundamental para garantir a estabilidade. Mudanças relevantes no tamanho das gotículas podem significar agregação ou coalescência, gerando instabilidade no sistema, resultando inclusive em separação entre as fases (165).

A Figura 31 apresenta a variação de tamanho médio de gotícula das formulações NEC, NE1 e NE2, durante análise de estabilidade de 90 dias, nas três condições climáticas: ambiente, geladeira e câmara climática.

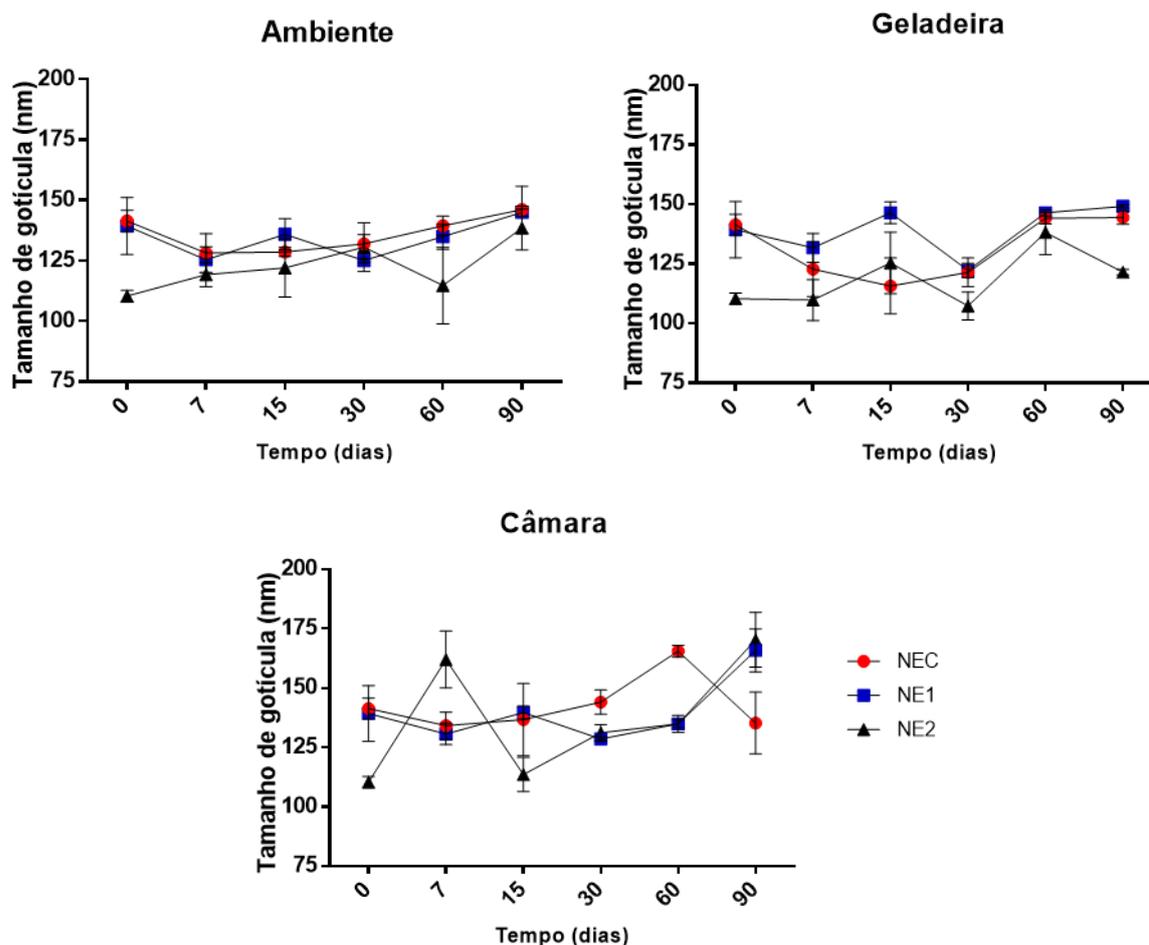


Figura 31. Representação gráfica da variação de tamanho de gotícula (nm) das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. NEC: Nanoemulsão Controle; NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

No tempo 0, as formulações NEC e NE1 apresentaram tamanho médio de gotícula maior ($p < 0,05$) que a NE2, com $141,4 \pm 4,37$ nm, $139,3 \pm 11,79$ nm e $110,4 \pm 2,31$ nm, respectivamente. Essa diferença se manteve ao longo dos 90 dias de estudo, na condição de armazenamento em geladeira. Em temperatura ambiente, também houve aumento significativo ($p > 0,05$) do tamanho de gotículas na NE2 ao longo do estudo.

Já as gotículas das formulações NE1 e NE2 armazenadas em câmara climática aumentaram de diâmetro de forma significativa ($p < 0,05$) entre o tempo 0 e 90 dias. Essa diferença era esperada, uma vez que o aumento da temperatura normalmente favorece a agregação entre as gotículas, provocando coalescência (166,167).

Os processos de instabilidade como agregação ou coalescência também podem provocar variações nos valores de PDI das formulações. Valores altos e

formação de populações distintas de partículas com diâmetros que não existiam inicialmente são resultados desses processos (161).

Os valores de PDI obtidos a partir do estudo de estabilidade estão representados na Figura 32.

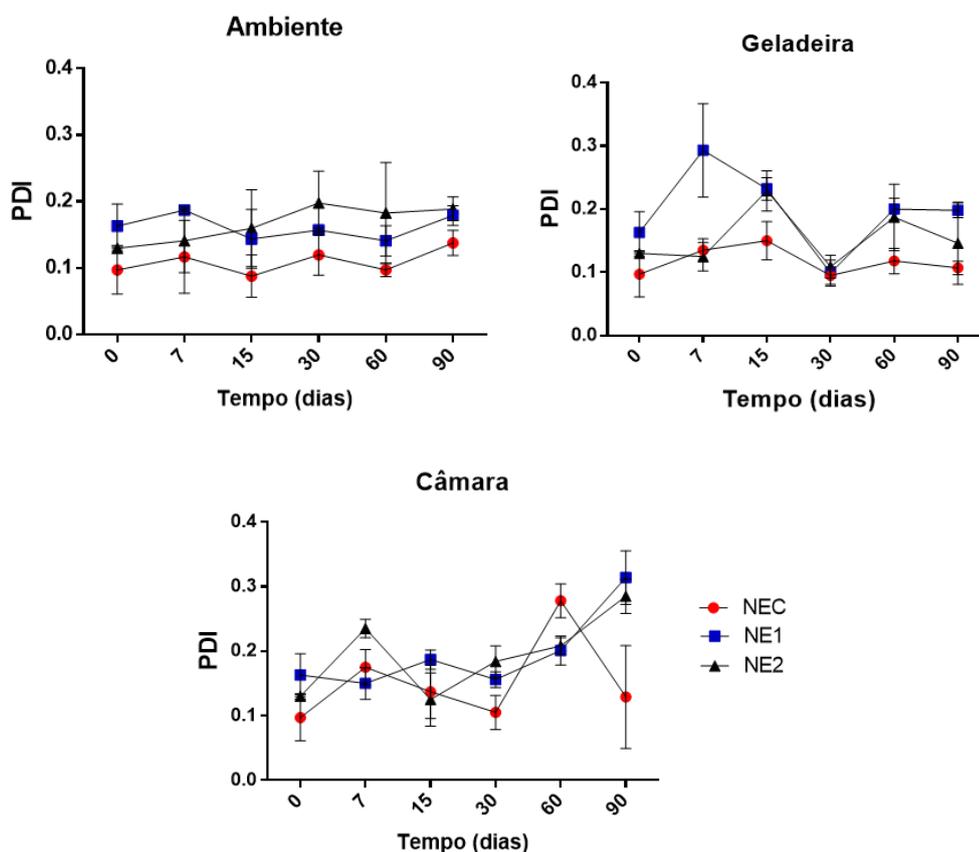


Figura 32. Representação gráfica da variação do PDI das formulações NEC, NE1 e NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$), Geladeira ($4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e Câmara climática ($40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$). Os dados são médias de 3 repetições \pm desvio padrão. NEC: Nanoemulsão Controle; NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

No tempo 0, as formulações NEC, NE1 e NE2 tiveram PDI de $0,09 \pm 0,03$, $0,16 \pm 0,03$ e $0,13 \pm 0,01$, respectivamente. Ao longo do estudo, houve variação entre a distribuição dos diâmetros das gotículas das nanoemulsões; contudo, no tempo 90 dias, a variação foi significativa ($p < 0,05$) apenas nas formulações NE1 e NE2 armazenadas em câmara climática, com PDIs chegando a $0,31 \pm 0,04$ e $0,28 \pm 0,02$. Essa alteração já esperada ao considerar-se a alteração significativa que também houve no diâmetro médio das gotículas das formulações armazenadas nesta mesma condição. Isso indica instabilidade física das formulações a esta temperatura mais drástica.

Cabe ressaltar que diferente de NE1 e NE2, entre as formulações armazenadas na câmara climática, a NEC teve maior homogeneidade entre as gotículas ($p < 0,05$), com PDI mantido a $0,12 \pm 0,07$. Essa maior estabilidade pode ser atribuída pela ausência de outros compostos advindos de extratos, como em NE1 e NE2.

Com base nos parâmetros avaliados até aqui, portanto, as três formulações demonstraram possuir estabilidade física durante os 90 dias estudados, quando armazenadas em temperatura ambiente ou temperatura de geladeira. O estudo também apontou que o armazenamento das formulações em temperaturas drásticas, muito acima da ambiente, pode causar desestabilização dos sistemas nanoemulsionados.

4.4.3 Análise do teor de bergapteno e psoraleno nas nanoemulsões NE1 e NE2

A avaliação de teor dos compostos bergapteno e psoraleno também foi conduzida ao longo dos 90 dias de estudo de estabilidade por meio de quantificação de amostras por CLAE para verificação da estabilidade química das formulações.

A Figura 33 mostra as análises realizadas no estudo nas três condições de temperatura para a formulação NE1. As amostras foram analisadas em porcentagem de decaimento de teor, e por isso, partiu-se de 100% no tempo 0 dias.

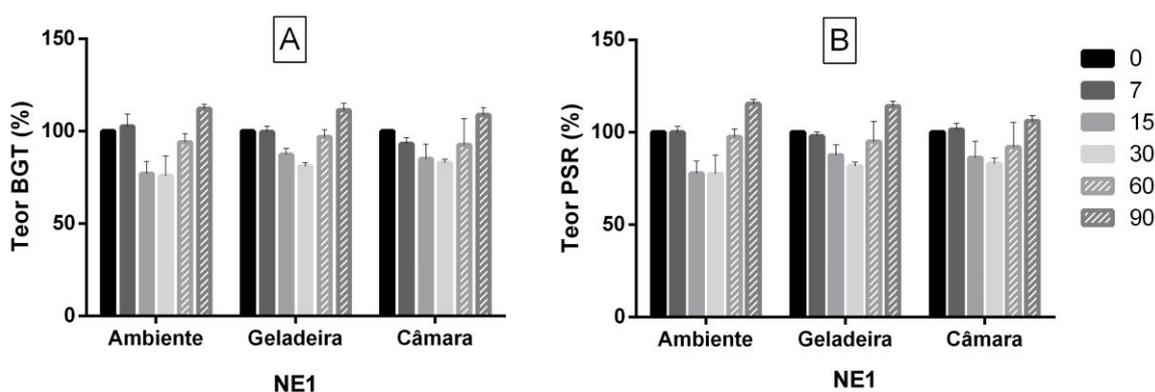


Figura 33. Gráficos da variação de teor (%) de (A) Bergapteno e (B) Psoraleno da formulação NE1 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente - $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Geladeira - $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e Câmara climática - $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

De acordo com a literatura, o teor pode sofrer uma variação durante o período de estabilidade de até 10% em relação ao dosado inicialmente (131,133,168). Dessa

forma, a partir do momento em que for detectado alteração acima do estabelecido, considera-se que há instabilidade na formulação.

Para a formulação NE1 (Figura 33), houve decaimento significativo ($p < 0,05$) de teor, de aproximadamente 20%, tanto do bergapteno quanto do psoraleno, considerando as três condições de temperatura no tempo 30 dias. Após esse período, foi observado um aumento do teor dos dois ativos. Contudo, essa alteração final foi significativa e maior que 10% apenas após 90 dias para o psoraleno proveniente da formulação armazenada em geladeira.

A Figura 34 a seguir mostra as análises realizadas no estudo nas três condições de temperatura para a formulação NE2. Aqui também as amostras foram analisadas em porcentagem de decaimento de teor, e por isso, partiu-se de 100% no tempo 0 dias.

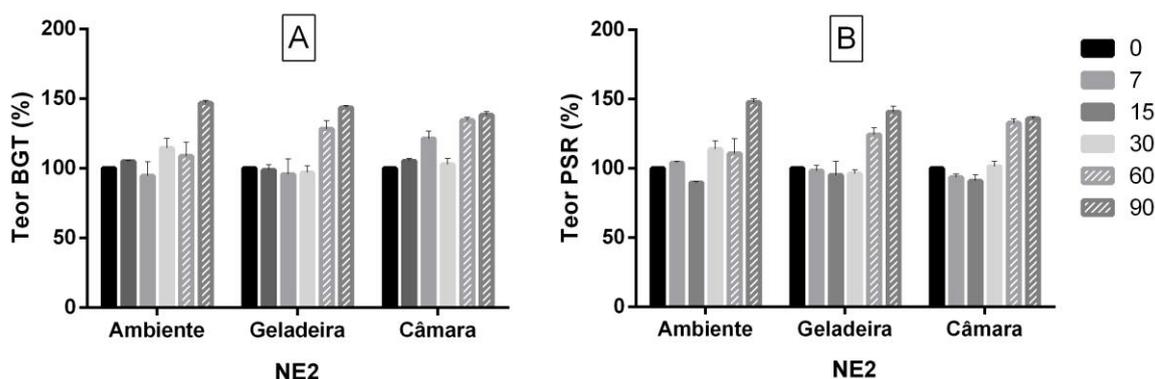


Figura 34. Gráficos da variação de teor (%) de (A) Bergapteno e (B) Psoraleno da formulação NE2 nos tempos 0, 7, 15, 30 e 90 dias nas três diferentes condições de temperatura: Ambiente - $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$; Geladeira - $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ e Câmara climática - $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. NE1: Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2: Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

A formulação NE2 (Figura 34) começou a apresentar alteração do teor a partir do tempo 60 dias, nas três condições de temperatura. Diferente do que houve em NE1, o psoraleno e o bergapteno oriundos da NE2 sofreram aumento significativo ($p < 0,05$) da concentração em relação ao tempo inicial, com aumento de 30 a 40% em relação ao tempo inicial após os 90 dias.

Esses aumentos de teor observados para as duas formulações devem estar relacionados a uma perda da água presente na formulação, o que leva a uma concentração dos ativos (168). Assim, com base nos dados, pode-se afirmar que a estabilidade química das formulações pode ser garantida por apenas 15 dias para a

NE1 e por 60 dias para a NE2. No entanto, a realização de um novo estudo promovendo-se uma melhor vedação e pesagem dos frascos contendo as formulações poderá fornecer resultados mais animadores de estabilidade química das formulações.

4.5 Estudos *in vitro* de permeação cutânea dos marcadores a partir das nanoemulsões

Para realização dos estudos de permeação cutânea, o teor de bergapteno e psoraleno dos controles CT1 e CT2, bem como das NEs NE1 e NE2 foram quantificados. Com a finalidade de estabelecer uma comparação fidedigna entre os controles e as formulações, o teor de cada controle com sua respectiva formulação foi calculado com base em estimativas de análise por CLAE antes do preparo. Como pode ser observado na tabela a seguir, os resultados foram bem próximos entre as nanoemulsões e os controles correspondentes.

Tabela 11. Concentrações estimadas de bergapteno e psoraleno das formulações aplicadas, obtidas a partir de análise por CLAE dos controles CT1, CT2 e das nanoemulsões NE1 e NE2.

Composto	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	
	Bergapteno	Psoraleno
CT1	504,70 \pm 6,08	1720,57 \pm 17,10
NE1	555,31 \pm 8,50	1658,66 \pm 10,01
CT2	1947,04 \pm 13,09	304,67 \pm 8,24
NE2	1925,68 \pm 12,43	437,92 \pm 9,07

Nota: Os dados são médias de 3 determinações \pm desvio padrão. CT1 e CT2 = 50% EXT1/EXT2 e 50% água NE1 = Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2 = Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

Os estudos *in vitro* de permeação cutânea utilizando pele de orelha de suíno foram realizados por um período de 24 horas. Após esse período, o bergapteno e o psoraleno que penetraram a pele ou que atingiram o meio receptor das células de difusão foram recuperados e quantificados. Os resultados estão representados na Figura 35 e na tabela

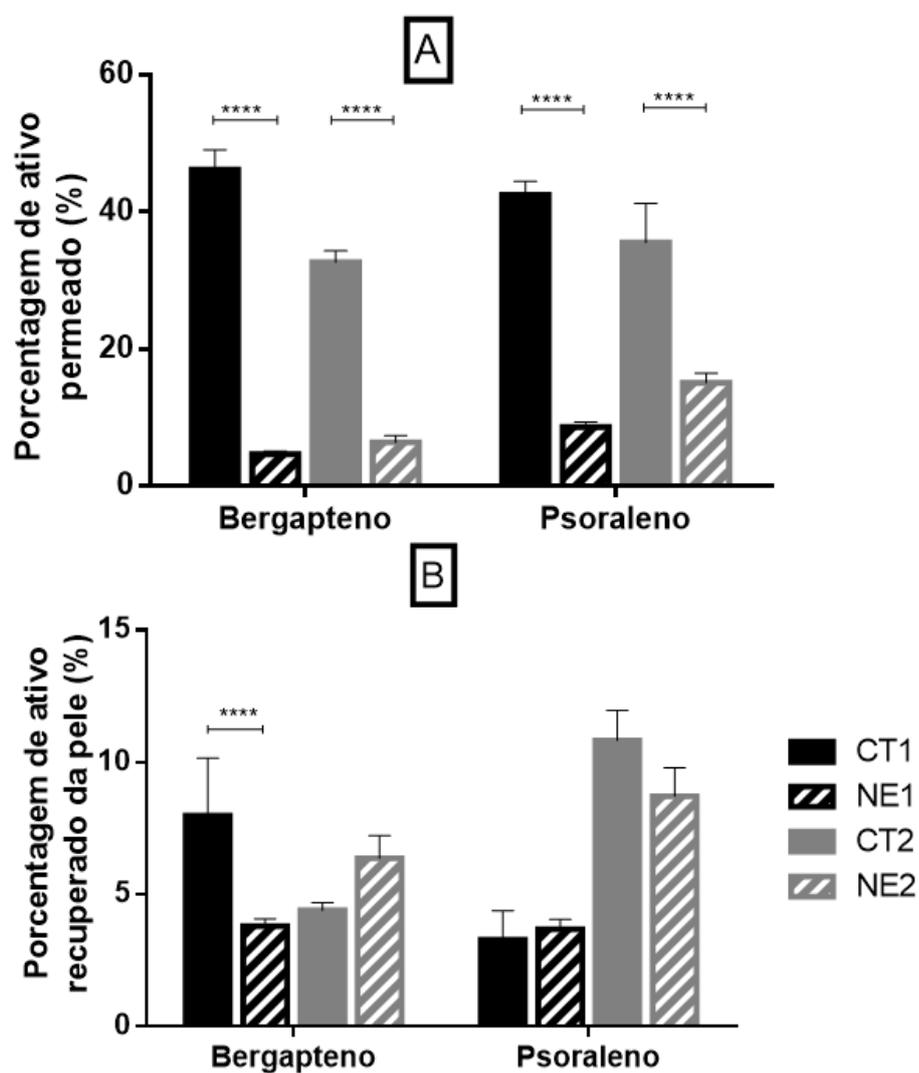


Figura 35. Porcentagens de bergapteno e psoraleno recuperadas após estudos de permeação de 24 horas a partir das formulações controle (50% EXT1/EXT2 e 50% água) CT1, CT2, NE1 e NE2: (A) Porcentagem recuperada da solução receptora e (B) porcentagem recuperada da pele. NE1 = Nanoemulsão do extrato etanólico (1:20 p/v) da da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2 = Nanoemulsão do extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

Tabela 12. Quantidade estimada de bergapteno e psoraleno em relação às concentrações iniciais aplicadas na pele, dos controles CT1, CT2 e das nanoemulsões NE1 e NE2, por CLAE.

Furanocumarina	Formulação	Concentração permeada solução receptora ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração recuperada pele ($\mu\text{g/mL}$)
Bergapteno ($\mu\text{g/mL}$)	CT1	233,09 \pm 14,46	40,26 \pm 11,02
	NE1	26,02 \pm 2,57	143,47 \pm 10,87
	CT2	636,52 \pm 3,42	85,57 \pm 5,68
	NE2	122,32 \pm 5,38	122,50 \pm 7,47
Psoraleno ($\mu\text{g/mL}$)	CT1	730,94 \pm 13,90	56,55 \pm 18,84
	NE1	21,09 \pm 1,53	60,91 \pm 6,10
	CT2	107,80 \pm 17,32	32,84 \pm 3,43
	NE2	65,96 \pm 6,19	38,14 \pm 4,68

Nota: Os dados são médias de 3 determinações \pm desvio padrão. CT1 e CT2 = 50% EXT1/EXT2 e 50% água NE1 = Nanoemulsão contendo extrato do pó da raiz comercial de *Brosimum gaudichaudii*; NE2 = Nanoemulsão contendo extrato da casca da raiz coletada de *Brosimum gaudichaudii*.

Tanto o bergapteno quanto o psoraleno apresentam-se como substâncias apolares ($\text{Log } P_{\text{bergapteno}} = 2,12$ e $\text{Log } P_{\text{psoraleno}} = 1,67$). Essa característica confere às substâncias boa interação com o estrato córneo. Apresentam também um peso molecular baixo (Bergapteno = 216,192 g/mol; psoraleno = 186,16 g/mol) (169,170), o que deve resultar em um coeficiente de difusão facilitado através da pele. Assim, o principal impacto esperado para as nanoemulsões sobre a permeação dos princípios ativos dos extratos foi no sentido de reduzir o transporte desses ativos através da pele, o que poderia significar uma exposição sistêmica desnecessária, ou até mesmo uma absorção cutânea desses ativos em concentrações acima da necessária para desempenhar suas atividades melanogênicas na pele. Considerando que esses compostos possuem certa toxicidade em altas concentrações, como será mostrado no item a seguir, um controle na permeação dos extratos e concentração de seus marcadores na pele seria adequado ao tratamento em termos de segurança (171).

De fato, na Figura 35A pode ser verificado que ambas as formulações foram capazes de reduzir significativamente as porcentagens tanto de bergapteno quanto de psoraleno que atravessaram os tecidos cutâneos e atingiram a solução receptora. Para a NE1, essa redução foi de 12 vezes para o bergapteno e de 11 vezes para o psoraleno em relação ao CT1, que era composto apenas de uma solução hidroetanólica do EXT1. Já para a NE2, a redução de permeação foi de 5 vezes para

o bergapteno e de 2 vezes para o psoraleno em relação à formulação controle CT2. Todas essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

Com referência à retenção dos princípios ativos na pele total, a NE1 promoveu uma redução de aproximadamente 2 vezes na quantidade de bergapteno retido na pele e uma retenção de psoraleno na pele estatisticamente igual ($p > 0,05$) ao promovido pelo controle CT1. Já a NE2 não teve um efeito de retenção diferente estatisticamente de bergapteno ou psoraleno em relação ao CT2.

A redução da taxa de liberação dos ativos a partir das nanoemulsões pode ser explicada tanto pelos extratos estarem concentrados na fase interna oleosa da emulsão, de modo que sua liberação para a fase externa aquosa demanda um certo tempo, quanto com o fato de o potencial zeta das nanogotículas das nanoemulsões serem de carga semelhante às cargas da superfície da pele, ou seja, negativa (172–174). Essa repulsão de cargas, de certa forma, dificulta a interação entre as nanogotículas e o estrato córneo, reduzindo a permeação dos ativos.

Nesse contexto, como foi mencionado anteriormente, a baixa permeação das substâncias na pele, provocada em parte pela composição das nanoemulsões, é interessante para o tratamento do vitiligo, considerando que a absorção sistêmica de psoralenos pode ocasionar efeitos tóxicos e até carcinogênicos (175). Cabe ressaltar que para o preparo das nanoemulsões, o etanol utilizado nos extratos foi evaporado, o que pode também ter contribuído para a menor permeação dos compostos, tendo em vista que solventes como o etanol atuam como promotores de absorção cutânea (176). Isso explica a alta permeação conferida pelos extratos hidroalcoólicos usados como controle (CT1 e CT2) em relação às nanoemulsões. Um estudo anteriormente publicado, por exemplo (177), mostrou que o efeito do bergapteno diluído em acetona (solvente de rápida evaporação) foi de alta absorção transdérmica do ativo ($58,4 \pm 11,8\%$ da dose inicial) na pele de macacos *rhesus* e a detecção de bergapteno foi realizada pela coleta da urina do animal durante 7 dias, mostrando o efeito tóxico de uma formulação contendo solvente orgânico.

As formulações desenvolvidas nesse trabalho, portanto, além de serem estáveis e possuírem um aspecto físico e características organolépticas adequadas para uma aplicação tópica e serem livres de solventes orgânicos, foram capazes de concentrar a liberação dos princípios ativos para a pele, impedindo sua rápida absorção sistêmica, o que poderia causar um impacto negativo na segurança do tratamento do vitiligo.

4.6 Ensaios *in vitro* em cultura celular de melanócitos e queratinócitos com EXT1 e EXT2

4.6.1 Efeito dos extratos sobre a viabilidade celular de melanócitos e queratinócitos

O primeiro teste biológico a ser realizado foi o de viabilidade celular, também conhecido como teste do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil-2)-2,5-difenil-tetrazólio). O ensaio é colorimétrico e baseia-se na conversão do reagente MTT, sal de coloração amarela e solúvel em água, em um composto de coloração roxa, insolúvel em água (Figura 36). As células metabolicamente viáveis possuem desidrogenases mitocondriais, que clivam o anel de tetrazólio e geram formazan (E,Z-1-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-1,3-difenilformazan). Dessa forma, a redução do MTT a formazan é proporcional à atividade de mitocôndrias e à viabilidade celular. A intensidade da coloração roxa é então diretamente proporcional ao número de células, e conseqüentemente à viabilidade celular (134,178).

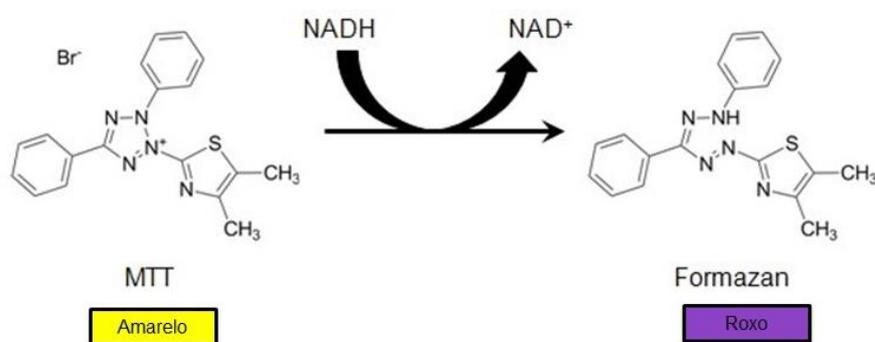


Figura 36. Estruturas do processo de redução do MTT (cor amarela), com formação do produto Formazan (cor roxo).

Com a finalidade de estimar a concentração de bergapteno e psoraleno em 100 μL de extrato para os ensaios *in vitro* descritos adiante, foi realizada análise por CLAE. Os resultados encontram-se na Tabela 12.

Tabela 13. Concentração estimada de bergapteno e psoraleno obtida a partir de análise por CLAE dos extratos etanólicos EXT1 e EXT2.

Concentração		
	µg/mL	
Cumarina	Bergapteno	Psoraleno
Padrão	1,0 ± 0,02	3,0 ± 0,05
EXT1 1:100	44,39 ± 2,99	147,98 ± 11,83
EXT2 1:300	393,58 ± 15,34	56,42 ± 0,34

Os dados são médias de 3 determinações ± desvio padrão.

A Figura 37 apresenta os dados referentes à viabilidade de melanócitos e queratinócitos tratados com tanto com os extratos EXT1, EXT2, bem como com os padrões de bergapteno e psoraleno.

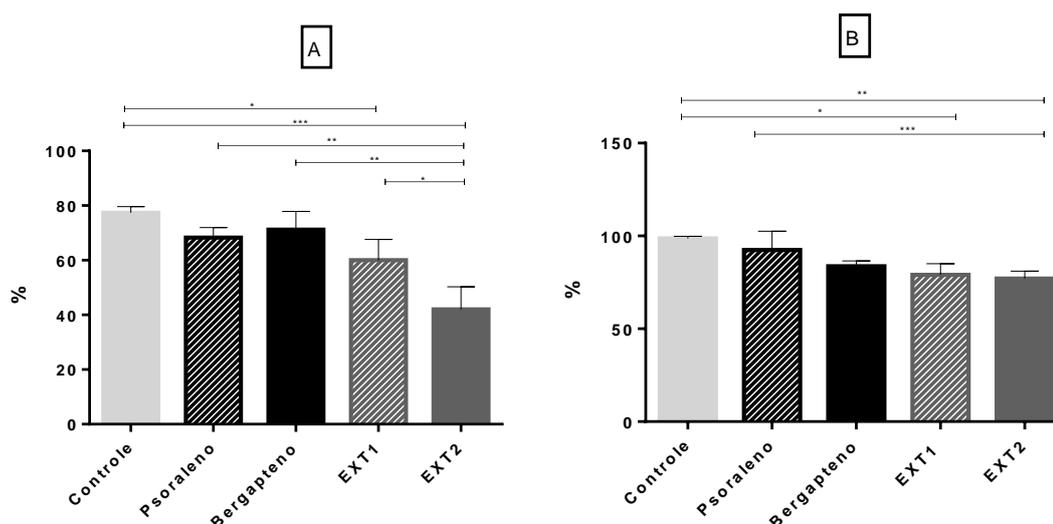


Figura 37. Porcentagem de viabilidade celular após tratamentos com EXT1 ($3,83 \pm 0,06 \mu\text{M}$ de bergapteno e $10,99 \pm 0,28 \mu\text{M}$ de psoraleno), EXT2 ($12,79 \pm 0,25 \mu\text{M}$ de bergapteno e $3,15 \pm 0,01 \mu\text{M}$ de psoraleno), bergapteno a $0,02 \pm 0,01 \mu\text{M}$ e psoraleno a $0,05 \pm 0,03 \mu\text{M}$ em: (A) Melanócitos (B) Queratinócitos. Os dados representam médias de 3 determinações ± desvio-padrão. (*) $P < 0,05$. Controle = células + meio DMEM; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

É possível observar que o controle reduziu cerca de 33% a viabilidade dos melanócitos. E em relação ao controle, nos grupos tratados a viabilidade foi de aproximadamente 70%, com exceção do EXT2, que apresentou viabilidade próxima a 50%. Nos experimentos com queratinócitos, a única diferença estatística significativa entre os grupos ocorreu entre os grupos tratados com psoraleno e EXT2, onde o

extrato foi capaz de provocar maior redução da viabilidade. Porém, em relação ao controle, os dois extratos todos reduziram de forma significativa (cerca de 10%) a viabilidade. Embora os testes tenham sido conduzidos com os ativos em etanol, estudos realizados com linhagens de queratinócitos demonstram que esse solvente é bem tolerado pelas células (181).

Outros estudos descritos na literatura também destacam a toxicidade *in vitro* dose e tempo dependentes do psoraleno e bergapteno frente a melanócitos (182,183). Em estudos realizados por Pozetti (2005) (184) por exemplo, a concentração de extrato etanólico que causou efeitos hepatotóxicos foi de 50 mg/mL, bastante superior em relação às concentrações utilizadas neste estudo. Este ensaio, portanto, mostrou ambos os extratos exibiram certa citotoxicidade, principalmente frente à linhagem de melanócitos, que é alvo do tratamento contra o vitiligo (78,185,186).

Contudo, segundo a literatura, os efeitos tóxicos ocorrem em concentrações de até 1000 vezes (em miligramas por mililitro) maiores que as utilizadas neste estudo (em microgramas por mililitro) (14,103,104), o que indica que os extratos podem oferecer segurança no tratamento do vitiligo. Ainda assim, os resultados mostram que o bergapteno e o psoraleno devem ser administrados em doses controladas, o que justifica o uso das nanoemulsões, que foram capazes de controlar a absorção dos princípios ativos.

4.6.2 Efeito dos extratos sobre a proliferação de melanócitos e queratinócitos

Três classes de mediadores químicos estão envolvidos com o estímulo da migração e proliferação melanocítica: fatores de crescimento de receptores de tirosina quinase, como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF); fator de transformação de crescimento alfa (TGF- α), leucotrienos LTD4 e LTC4; e proteína-G acoplada com receptor de fator de crescimento como endotelina-1 (187).

Fisiologicamente, a homeostase determina se a célula permanece quiescente, prolifera, diferencia, ou entra em apoptose (6). Na infância, há uma necessidade contínua de estimular a proliferação de melanócitos, pois isso mantém um equilíbrio com os queratinócitos basais. A exposição solar e o processo de cicatrização após ferimentos são estímulos para a proliferação e migração de melanócitos (188–190).

Para proliferar na pele humana, os melanócitos necessitam se dissociar da membrana basal e dos queratinócitos, retrair seus dendritos, dividir e migrar pela membrana basal. Durante a vida adulta, a densidade de melanócitos (número de

células por área de pele) tende a diminuir progressivamente a cada década, embora não haja prejuízo na síntese de melanina (189,191,192).

As Figuras 38 e 39 referem-se aos resultados obtidos dos ensaios de proliferação celular dos melanócitos e queratinócitos tratados com bergapteno; psoraleno; EXT1 ou EXT2.

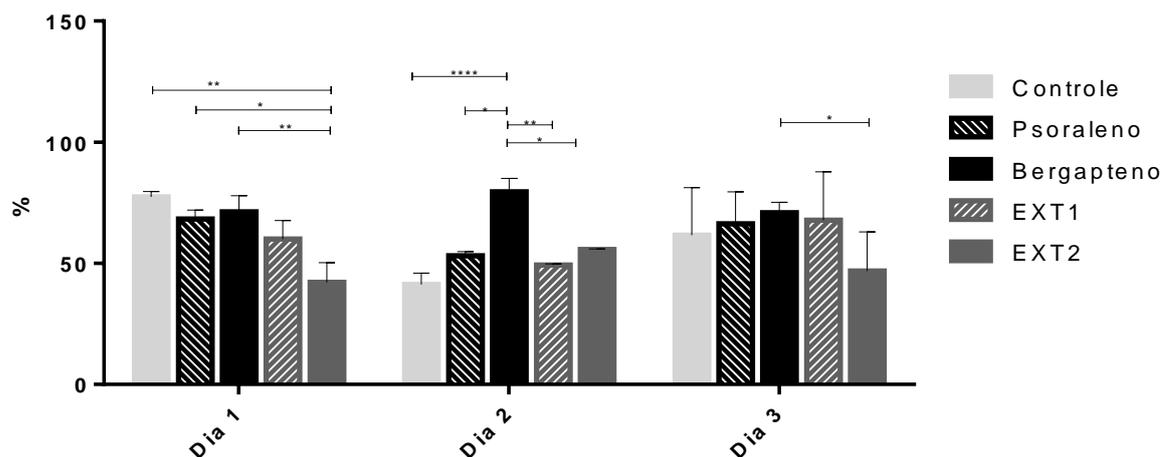


Figura 38. Proliferação dos melanócitos tratados com psoraleno, bergapteno, EXT1 ou EXT2, após 1, 2 e 3 dias, em porcentagem. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$. Controle = células + meio DMEM; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

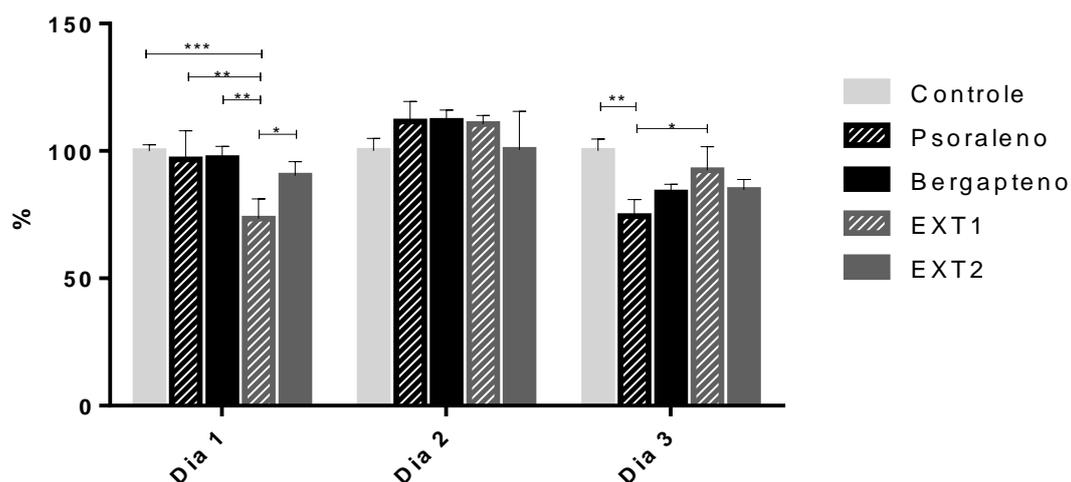


Figura 39. Proliferação dos queratinócitos tratados com psoraleno, bergapteno, EXT1 ou EXT2 após 1, 2 e 3 dias, em porcentagem. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$. Controle = células + meio KSMF; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

Quanto maior a proliferação, maior o número de mitocôndrias provenientes das células. Dessa forma, se o tratamento das células com os compostos causar a morte celular, esse fenômeno pode ser observado por meio do decréscimo da proliferação das células (178). Nos melanócitos (Figura 38), é possível observar que em todos os grupos tratados, apesar da toxicidade inicial, os extratos e os padrões levaram à sobrevivência das células ao longo do período de ensaio.

O potencial antiproliferativo de extratos hidroalcoólicos de *Brosimum gaudichaudii*, *Dorstenia brasiliensis* e dos padrões psoraleno, bergapteno e 8-MOP (combinados ou não com UVA) também foi verificado em estudos anteriormente publicados realizados por Quevedo (2011) (2011) (193,194).

Nos ensaios com os queratinócitos (Figura 39), notou-se que no primeiro dia, em comparação ao controle, houve redução significativa de aproximadamente 26% da proliferação apenas no grupo tratado com EXT1. Já no dia 2, a proliferação aumentou cerca de 20% em relação ao primeiro dia, em todos os grupos tratados.

No dia 3, somente nas células tratadas com o psoraleno houve redução significativa da proliferação (cerca de 20%), em comparação ao controle. Nos grupos tratados com os extratos e com o bergapteno, não houve diferença significativa na proliferação de queratinócitos em relação ao controle.

4.6.3 Efeito dos extratos sobre a migração celular

A divisão celular dos melanócitos provavelmente começa com a estimulação (*upregulation*) de fatores de crescimento produzidos por fibroblastos ou queratinócitos, que levam a modulação negativa (*downregulation*) de caderinas e à dissociação de melanócitos dos queratinócitos (195–197).

A mitogênese é impulsionada por outros fatores de crescimento da derme ou da epiderme. Para manter uma relação de equilíbrio com os queratinócitos, os melanócitos devem completar um ciclo de migração para reposicionamento, fixação na membrana basal, reacoplamento a queratinócitos e extensão dendrítica nas camadas superiores da célula. O controle de crescimento é realizado pelos queratinócitos e completa o ciclo homeostático de formação das unidades melano-epidérmicas (198,199).

Para determinar o tempo e a intensidade de migração dos melanócitos para área cortada, os ensaios de arranhadura foram analisados em diferentes tempos de cultura: 0 h, 24 h e 48 h. A Figura 40 ilustra o efeito dos tratamentos com os extratos

a migração dos melanócitos para a área de arranhadura da placa nos tempos de cultura determinados. Os pontos em amarelo representam as células que migraram, marcadas pelo programa Image J. Mesmo após 48 h, não houve migração de melanócitos suficiente para cobrir completamente a área de arranhadura, em nenhum dos grupos tratados.

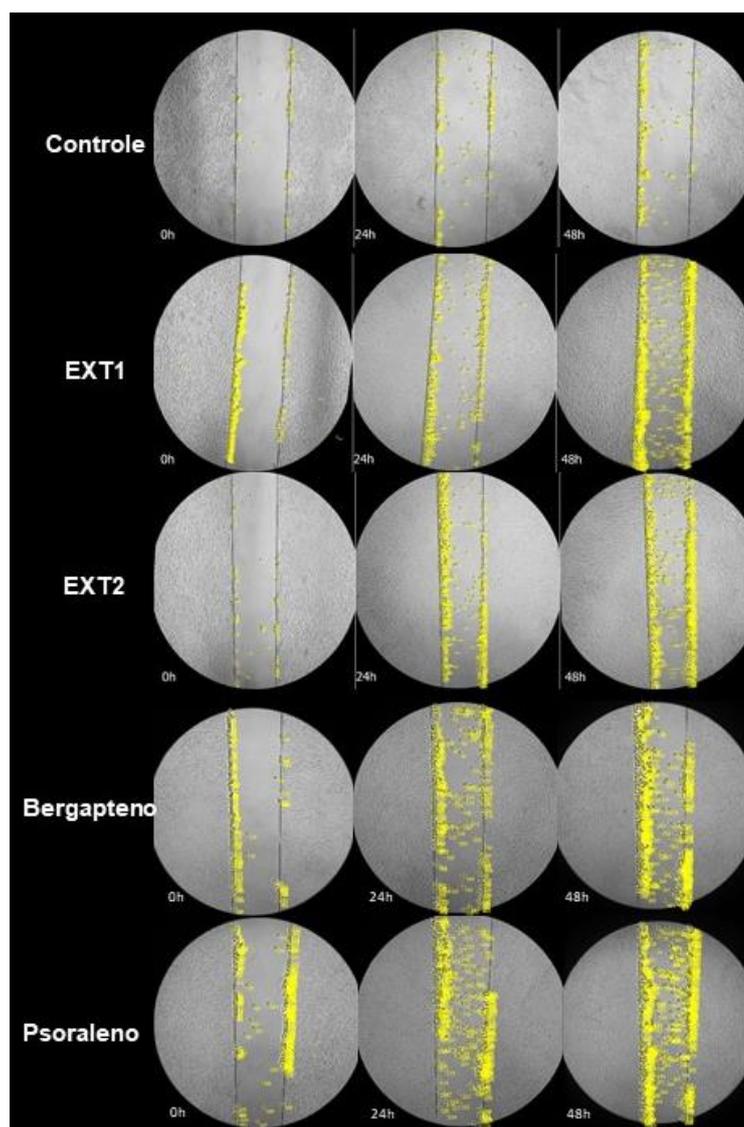


Figura 40. Ensaio de migração dos melanócitos tratados com o controle; com os extratos EXT1 e EXT2 e com os padrões bergapteno e psoraleno. Tempos: 0h, após 24h e após 48h. Contagem das células que migraram para a arranhadura pelo programa Image J. Controle = células + meio de cultura; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

Já a Figura 41 representa a análise quantitativa do ensaio de migração dos melanócitos tratados com os extratos e com os padrões, nos tempos 0 h, 24 h e 48 h.

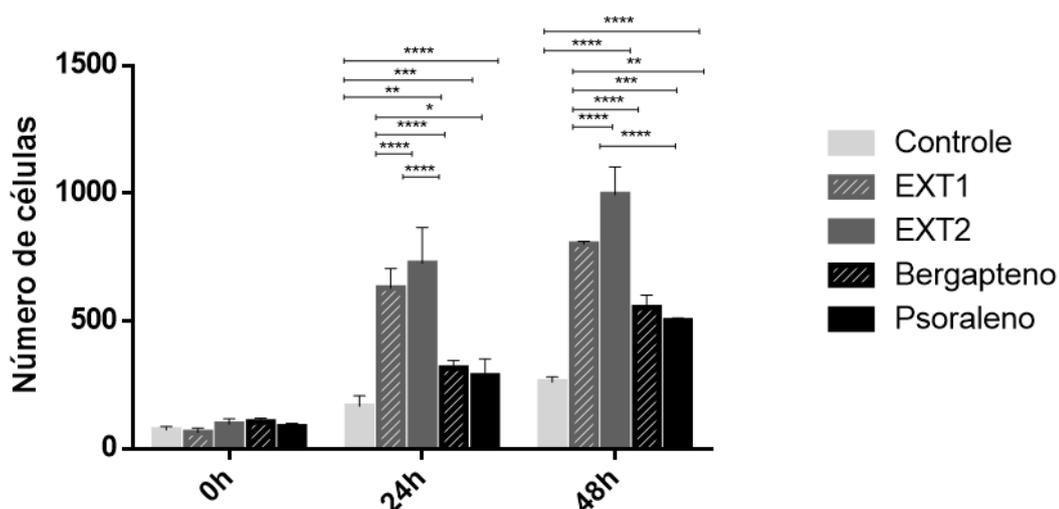


Figura 41. Análise quantitativa dos efeitos dos extratos EXT1 e EXT2 e dos padrões bergapteno e psoraleno na migração dos melanócitos. Tempos: 0h, após 24h e após 48h. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$. Controle = células + meio de cultura; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

Como pode ser observado na Figura 41, no tempo 0 h, não houve diferença na contagem de células entre os grupos tratados e não tratados. Já após 24 h, no grupo do controle positivo, aproximadamente 500 células migraram para a área de arranhadura e após 48 h, cerca de 700 células. Em relação a esse controle, nos grupos tratados com os padrões psoraleno e bergapteno, houve padrão de migração estatisticamente inferior.

O grupo tratado com o EXT1 apresentou migração celular ao nível do controle positivo, e maior do que o padrão psoraleno. Já o EXT2 demonstrou melhor capacidade de estimular a migração dos melanócitos em relação a todos os outros grupos, tanto em 24 h quanto após 48 h.

Considerando a ausência ou prejuízo da função de melanócitos no vitiligo, estimular a proliferação e migração dos melanócitos das regiões adjacentes para o local da mancha é alvo da terapia de repigmentação (46,78,185,186,200). Nesse sentido, os extratos demonstraram potencial em estimular a migração das células, mostrando-se promissores para a terapia de repigmentação no vitiligo.

Wu *et al.* (2007) (197) analisaram os efeitos de PUVA em linhagens humanas de melanócitos. Aplicaram nas células solução de 8-MOP em meio de cultura MCDB 153 na concentração 0,5 μ M e após incubação, as células foram expostas a irradiação UVA ou NB-UVB. Os resultados indicaram que o tratamento com PUVA não foi capaz de estimular a proliferação e nem a migração de maneira significativa. No entanto, o

tratamento criou uma supressão imunológica e um ambiente favorável para o crescimento de melanócitos em pacientes com vitiligo, o que pode ser vantajoso para abrandar a destruição dessas células.

A Figura 42 está ilustrado o efeito dos tratamentos com os extratos a migração dos queratinócitos para a área de arranhadura da placa nos tempos de cultura determinados. Em 24 h, os queratinócitos tratados com os extratos ou com os padrões migraram de forma a fechar a área cortada, em todos os grupos tratados. Assim, a migração dos queratinócitos foi mais intensa que a migração dos melanócitos.

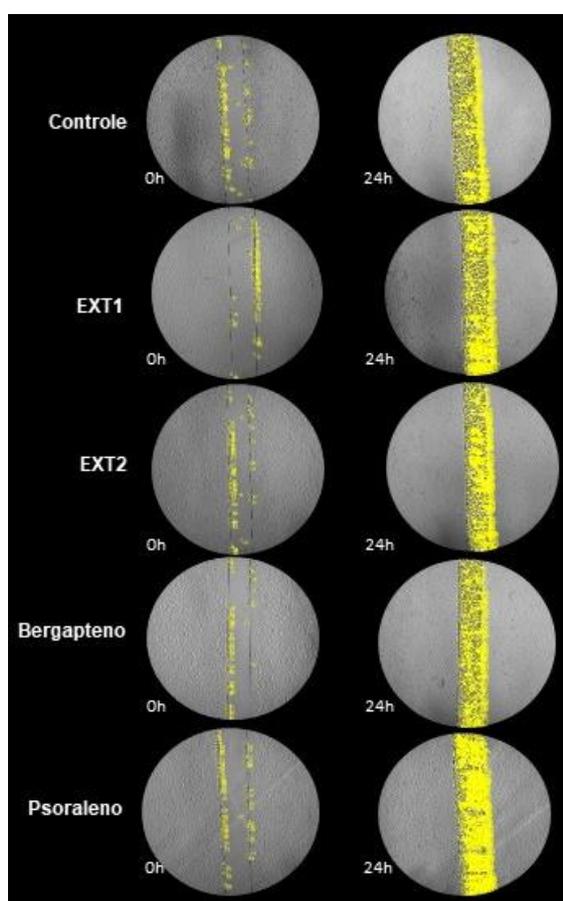


Figura 42. Migração dos queratinócitos tratados com o controle; com os extratos EXT1 e EXT2 e com os padrões bergapteno e psoraleno. Tempos: 0h e após 24h. Contagem das células que migraram para a arranhadura pelo programa Image J. Controle = células + meio de cultura; EXT1 = Extrato etanólico (1:20 p/v) da da raiz em pó comercial de *Brosimum gaudichaudii*; EXT2 = Extrato etanólico (1:10 p/v) da casca da raiz de *Brosimum gaudichaudii*.

De forma quantitativa, não houve diferença significativa na migração dos queratinócitos entre os grupos tratados (Figura 43). Embora os grupos tenham apresentado migração inferior ao controle positivo, todos mostraram capacidade semelhante de estimular a migração dos queratinócitos após 24 h. O ensaio mostrou

que os extratos e os padrões estimularam a migração das células características da pele.

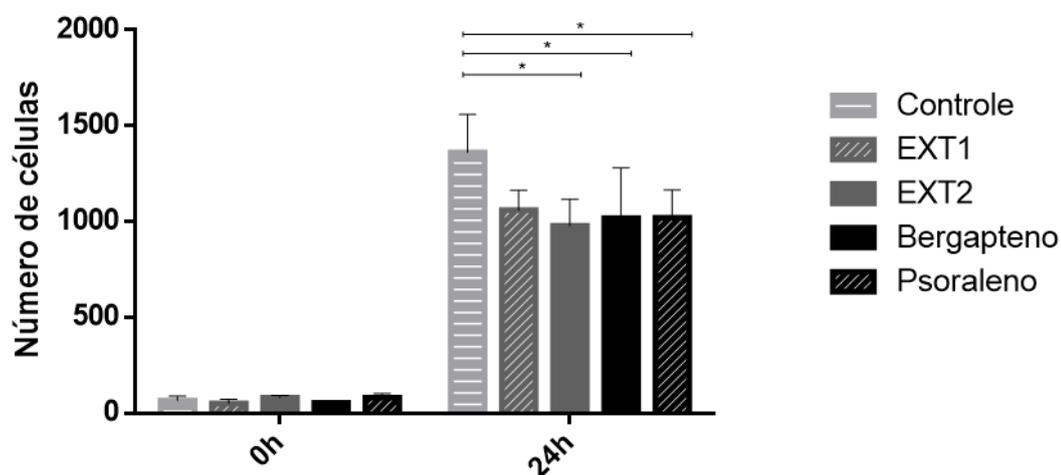


Figura 43. Análise quantitativa dos efeitos dos extratos EXT1 e EXT2 e dos padrões bergapteno e psoraleno na migração queratinócitos. Os dados representam médias de 3 determinações \pm desvio-padrão. (*) $P < 0,05$.

Resultados positivos na migração também foram encontrados por Anbar *et al.* (2012) (201) que avaliaram o efeito da terapia PUVA nos melanócitos e queratinócitos. O estudo foi realizado com pacientes com vitiligo, por análise histopatológica das áreas perilesionais antes após 12 meses de tratamento. O tratamento permitiu a migração de melanócitos e queratinócitos ativos nas áreas lesionadas. Além disso, houve redução da atividade degenerativa nos dois tipos de células.

O crescimento e migração dos queratinócitos é de extrema importância para atividade melanogênica, pois essas células estão envolvidas no controle do crescimento e atividade dos melanócitos (190,202). Além disso, as unidades melano-epidérmicas formadas pelos melanócitos e queratinócitos são formadas durante processos de migração das células (198,199).

4.7 Ensaio *in vitro* do potencial irritativo das nanoemulsões (HET-CAM)

As nanoemulsões possuem em sua composição tensoativos que podem causar irritação na pele (203). Tendo a observação de atividade antiproliferativa dos extratos nos melanócitos, foi realizado ensaio HET-CAM para avaliar potencial irritativo das formulações. Esse teste permite prever se as nanoemulsões podem causar alguma toxicidade para a pele.

O teste HET-CAM é um ensaio bastante empregado para avaliar o potencial de irritabilidade de formulações para administração ocular (204–206). Seu uso, no entanto, também pode ser estendido para avaliar a irritação de formulações para uso tópico como alternativa ao teste de Draize (207), que necessita da aprovação do comitê de ética em pesquisa no uso de animais. Apesar de ter a desvantagem de ser pouco sensível para classificar substâncias que são moderadamente irritantes, o HET-CAM é um ensaio bastante eficiente na detecção de irritabilidade de substâncias irritantes (208,209).

Na Figura 44 estão apresentados os resultados do ensaio HET-CAM para caracterização do potencial irritante das nanoemulsão desenvolvidas. As fotografias das membranas foram tiradas durante 30 s, 2 e 5 min após exposição às amostras. Para a correta interpretação das imagens das formulações, faz-se necessário verificar que o controle negativo manteve a vascularização praticamente inalterada quanto ao calibre dos vasos e coloração. Não houve rompimento de nenhum vaso, nem extravasamento de sangue. Em contraposição, o controle positivo ocasionou todos esses fenômenos nos primeiros segundos de exposição. Já as formulações NE1 e NE2, tiveram efeito semelhante ao do controle negativo.

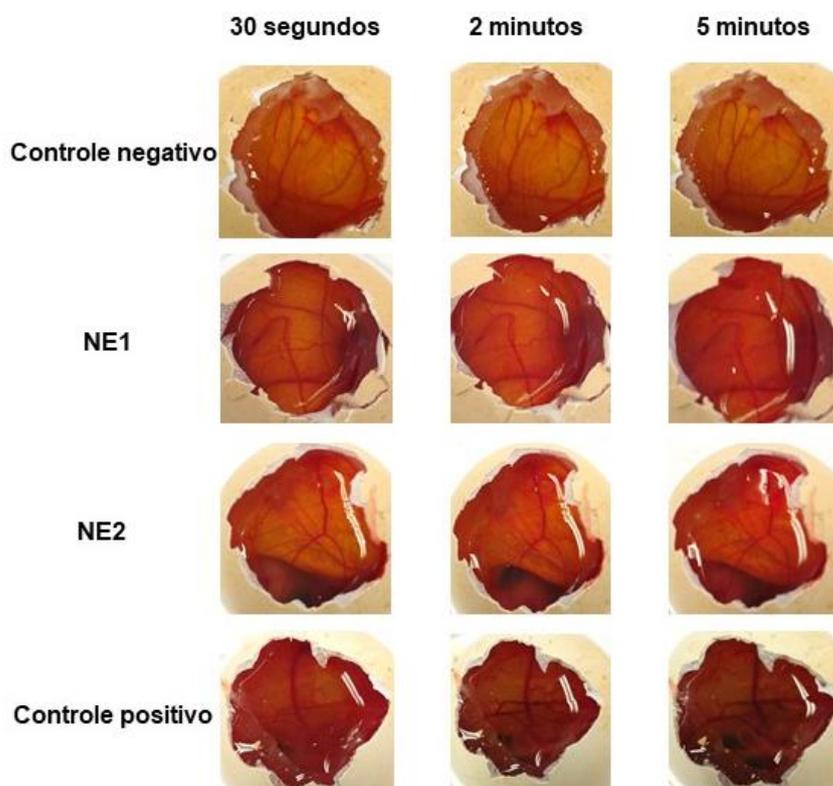


Figura 44. Sequência de imagens ilustrando o efeito dos controles positivo (NaOH 1M) e negativo (NaCl 0,9%), e das nanoemulsões NE1 e NE2 na membrana após 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos.

Na Tabela 13 estão apresentados os índices de irritabilidade e a classificação final das formulações. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos nos três ovos analisados para cada formulação.

Tabela 14. Classificação final das formulações quanto ao seu potencial de irritabilidade no HET-CAM, de acordo com a escala cumulativa.

Formulação testada	Índice de irritabilidade	Classificação
Controle negativo	0	Não irritante (NI)
NE1	3	Irritante leve (IL)
NE2	3	Irritante leve (IL)
Controle positivo	19	Irritante severo (IS)

Após 5 minutos de observação da membrana cório-alantoide, o índice de irritabilidade foi de 0 (controle negativo), 19 (controle positivo), 3 (NE1), e 3 (NE2). Assim, as duas nanoemulsões foram classificadas quanto ao potencial como irritantes leves. Isso significa que foram sutilmente mais irritantes que o soro fisiológico usado como controle negativo, mas muito menos irritantes que a solução básica utilizada como controle positivo. Um potencial levemente irritante já era esperado para as nanoemulsões, uma vez que as duas formulações apresentam 40% de tensoativos (Labrasol® e Plurol® oleique) em sua composição.

Os resultados obtidos neste teste são semelhantes aos descritos na literatura para outras formulações nanoemulsionadas. Por exemplo, nanoemulsões O/A contendo óleo de farelo de arroz mostraram leve potencial irritante (210), assim como nanoemulsões O/A preparadas com óleo de cúrcuma (211). Em ensaios realizados por Maruno (212), nanoemulsões formadas com tensoativos derivados de óleo de rícino etoxilado em diferentes graus (15, 30, 40 e 54 OE), monooleato de sorbitano e óleo de gergelim ou framboesa, também mostraram-se levemente irritantes, demonstrando segurança para o uso em cosméticos.

Muitos autores concordam que os tensoativos são as substâncias com maior potencial irritativo (203,211,213) nas formulações e que o potencial irritante varia de acordo com o número de grupamentos de óxidos de etileno nas moléculas (214). Além disso, o potencial de irritabilidade parece depender também da concentração e da estrutura dos tensoativos, bem como a composição química e do pH da formulação (215).

5 CONCLUSÃO

Dois extratos de *Brosimum gaudichaudii* foram preparados a partir de pó da raiz obtido comercialmente e da casca da raiz coletada. Foi validado método analítico para análise dos ativos bergapteno e o psoraleno por CLAE, a fim de possibilitar a análise de teor dos ativos dos padrões isolados, dos extratos e das formulações. Além disso, após a obtenção dos extratos, ensaios de prospecção fitoquímica foram realizados, e demonstraram pequenas diferenças entre os extratos de cada indivíduo.

Foram desenvolvidas duas nanoemulsões contendo extratos etanólicos de *Brosimum gaudichaudii* para o tratamento tópico do vitiligo e avaliadas quanto à estabilidade por 90 dias. Além de serem estáveis, as nanoemulsões apresentaram aspecto físico e características organolépticas adequadas para a aplicação tópica. Os estudos de permeação permitiram observar que as formulações foram capazes de concentrar os princípios ativos na pele, reduzindo a permeação através desse órgão, o que poderia causar um impacto negativo na segurança do tratamento do vitiligo. Além disso, as duas nanoemulsões foram classificadas como irritantes leves nos ensaios de HET-CAM e adequadas para uso tópico.

Por fim, os extratos demonstraram certa citotoxicidade em melanócitos e queratinócitos, mas estimularam a migração celular nas duas linhagens.

Os resultados sugerem, portanto, que as nanoemulsões são sistemas promissores aplicação tópica para estimular a melanogênese no tratamento do vitiligo.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jimbow K. Vitiligo. *Dermatol Ther.* 1998;16(2):399–407.
2. Hercogová J, Schwartz RA, Lotti TM. Classification of vitiligo: A challenging endeavor. *Dermatol Ther.* 2012;25:10–7.
3. Jimbow K, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, Szabo G. Some aspects of melanin biology: 1950-1975. *J Invest Dermatol.* 1976;67(1):72–89.
4. Lee E, Han J, Kim K, Choi H, Cho EG, Lee TR. CXCR7 mediates SDF1-induced melanocyte migration. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(1):58–66.
5. Herane MI. Vitiligo and leukoderma in children. *Clin Dermatol.* 2003;21(4):283–95.
6. Bissel MJ, Radisky D. Putting tumors in context. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):46–54.
7. Nath SK, Majumder PP, Nordlund JJ. Genetic epidemiology of vitiligo: multilocus recessivity cross-validated. *Am J Hum Genet.* 1994;55(5):981–90.
8. Alkhateeb A, Fain PR, Thody A, Bennett DC, Spritz R a. Epidemiology of vitiligo and associated autoimmune diseases in Caucasian probands and their families. *Pigment Cell Res.* 2003;16:208–14.
9. Elbuluk N, Ezzedine K. Quality of Life, Burden of Disease, Co-morbidities, and Systemic Effects in Vitiligo Patients. *Dermatol Clin.* 2017;35(2):117–28.
10. Mohan GC, Silverberg JI. Association of Vitiligo and Alopecia Areata With Atopic Dermatitis: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA dermatology.* 2014;151(5):522–8.
11. Sampogna F, Raskovic D, Guerra L, Pedicelli C, Tabolli S, Leoni L, et al. Identification of categories at risk for high quality of life impairment in patients with vitiligo. *Br J Dermatol.* 2008;159(2):351–9.
12. Mandel AS, Haberman HF, Pawlowski FD, Goldstein E. Non PUVA nonsurgical therapies for vitiligo. *Clin Dermatol.* 1997;15(6):907–19.
13. Nordlund JJ. The Medical Treatment of Vitiligo: An Historical Review Vitiligo Medical treatments Psoralens Ultraviolet light. *Dermatol Clin.* 2017;35:107–16.
14. Cunha, L. C.; Paula, J. R.; Sá, V. A.; Amorim, M. E. P.; Barros, I. C. M.; Brito, L. A. B.; Silveira N. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. *Brazilian J Pharmacogn.* 2008;18(4):532–8.

15. SAUAD Farmacêutica. Viticromin® medicamento fitoterápico [acesso em 10 mai 2015]. Disponível em: <http://www.sauad.com.br/produtos.php>.
16. Carvalho AB, Balbino EE, Maciel A PJ. Divulgação Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn*. 2008;18:314–9.
17. Brasil. RE Nº - 2.078, de 4 de janeiro de 2009. *Diário Oficial da União, Brasília, DF*, n. 102, 28 maio 2009, p.8.
18. BRASIL M das SAN de VS. *Farmacopeia Brasileira*. 5º ed. Saúde A-M da, organizador. Vol. 1, *Farmacopeia Brasileira*, 5ª edição. Brasília; 2010. 523 p.
19. Berth-Jones J, Damstra RJ, Golsch S, Livden JK, Van Hooteghem O, Allegra F, et al. Twice weekly fluticasone propionate added to emollient maintenance treatment to reduce risk of relapse in atopic dermatitis: randomised, double blind, parallel group study. *BMJ*. 2003;326(7403):1367.
20. Wirén K, Frithiof H, Sjöqvist C, Lodén M. Enhancement of bioavailability by lowering of fat content in topical formulations. *Br J Dermatol*. 2009;160(3):552–6.
21. Ajazuddin, Saraf S. Applications of novel drug delivery system for herbal formulations. *Fitoterapia*. 2010;81(7):680–9.
22. Ansari S, Sameem M, Islam F. Influence of nanotechnology on herbal drugs: A Review. *J Adv Pharm Technol Res*. 2012;3(3):142.
23. Shafiq-un-Nabi S, Shakeel F, Talegaonkar S, Ali J, Baboota S, Ahuja A, et al. Formulation development and optimization using nanoemulsion technique: a technical note. *AAPS PharmSciTech*. 2007;8(2):Article 28.
24. Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. 2004;109:303–18.
25. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimisation. *Int J Pharm*. 2004;280:241–51.
26. Shafiq S, Shakeel F. Stability and self-nanoemulsification efficiency of ramipril nanoemulsion containing labrasol and plurool oleique. *Clin Res Regul Aff*. 2010;27(1):7–12.
27. Borowska K, Wołowicz S, Głowniak K, Sieniawska E, Radej S. Transdermal delivery of 8-methoxypsoralene mediated by polyamidoamine dendrimer G2.5 and G3.5 - In vitro and in vivo study. *Int J Pharm*. 2012;436(1–2):764–70.
28. Tang W, Bhushan B. Adhesion, friction and wear characterization of skin and

- skin cream using atomic force microscope. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2010;76(1):1–15.
29. Menon GK. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002;54(1):S3–7.
 30. Alexander A, Dwivedi S, Ajazuddin, Giri TK, Saraf S, Saraf S, et al. Approaches for breaking the barriers of drug permeation through transdermal drug delivery. *J Control Release*. 2012;164(1):26–40.
 31. Khavkin J, Ellis DAF. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2011;19(2):229–34.
 32. Madison KC. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Être” of the Epidermis. *JID*. 2003;121(2):231–41.
 33. Baroni A, Buommino E, Gregorio V De, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol*. 2012;30:257–62.
 34. Lopes LB. Overcoming the Cutaneous Barrier with Microemulsions. *Pharmaceutics*. 2014;6:52–77.
 35. Naylor EC, Watson REB, Sherratt MJ. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*. 2011;69(3):249–56.
 36. Robert L, Labat-Robert J, Robert AM. Physiology of skin aging. *Clin Plast Surg*. 2012;39(1):1–8.
 37. Hansen S, Lehr C-M, Schaefer UF. Improved input parameters for diffusion models of skin absorption. *Adv Drug Deliv Rev*. fevereiro de 2013;65(2):251–64.
 38. Barry BW. Mode of action of penetration enhancers in human skin. *J Control Release*. 1987;6:85–97.
 39. Lotti T, D’Erme AM. Vitiligo as a systemic disease. *Clin Dermatol*. 2014;32(3):430–4.
 40. Lim YJ, Lee EH, Kang TH, Ha SK, Oh MS, Kim SM, et al. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of melanocyte stimulating hormone-induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. *Arch Pharm Res*. 2009;32(3):367–73.
 41. Jiménez M, Kameyama K, Maloy WL, Tomita Y, Hearing VJ. Mammalian tyrosinase: biosynthesis, processing, and modulation by melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988;85(June):3830–4.
 42. Ando H, Niki Y, Ito M, Akiyama K, Matsui MS, Yarosh DB, et al. Melanosomes

- are transferred from melanocytes to keratinocytes through the processes of packaging, release, uptake, and dispersion. *J Invest Dermatol.* 2012;132(4):1222–9.
43. Mohammed GF. Highlights in pathogenesis of vitiligo. *World J Clin Cases.* 2015;3(3):221.
 44. Sulaimon SS, Kitchell BE. Review article the biology of melanocytes. *Vet Dermatol.* 2003;14(2):57–65.
 45. Sugumaran M. Reactivities of quinone methides versus o-Quinones in catecholamine metabolism and eumelanin biosynthesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(9):1–23.
 46. Le Poole IC, van den Wijngaard RM, Westerhof W, Dutrieux RP, Das PK. Presence or absence of melanocytes in vitiligo lesions: an immunohistochemical investigation. *J Invest Dermatol.* 1993;100(6):816–22.
 47. Huggins RH, Schwartz RA, Janniger CK. Vitiligo. *Acta Dermatoven APA.* 2005;14(4).
 48. Zhang Y, Cai Y, Shi M, Jiang S, Cui S, Wu Y, et al. The prevalence of vitiligo: A meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(9):1–17.
 49. Esmat S, Mostafa W, Hegazy RA, Shalaby S, Sheth V, Youssef R, et al. Phototherapy: The vitiligo management pillar. *Clin Dermatol.* 2016;34(5):594–602.
 50. Ongenaes K, Geel NVAN, Naeyaert J-M, Van Geel N, Naeyaert J-M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. *Pigment Cell Res.* 2003;16(2):90–100.
 51. Menezes AF, Oliveira de Carvalho F, Barreto RSS, de Santana Silva B, Shanmugam S, Gurgel RQ, et al. Pharmacologic Treatment of Vitiligo in Children and Adolescents: A Systematic Review. *Pediatr Dermatol.* 2017;34(1):13–24.
 52. Krüger C, Schallreuter KU. Stigmatisation, Avoidance Behaviour and Difficulties in Coping are Common Among Adult Patients with Vitiligo. *Acta Derm Venereol.* 2015;95(5):553–8.
 53. Parsad D, Dogra S, Kanwar AJ. Quality of life in patients with vitiligo. *Health Qual Life Outcomes.* 2003;1:58.
 54. Lai YC, Yew YW, Kennedy C, Schwartz RA. Vitiligo and depression: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Br J Dermatol.* 2017;177(3):708–18.

55. Schallreuter KU, Bahadoran P, Picardo M, Slominski A, Ellassiuty YE, Kemp EH, et al. Vitiligo pathogenesis: Autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? *Exp Dermatol*. 2008;17(2):139–40.
56. Schallreuter KU, Salem MAEL, Gibbons NCJ, Martinez A, Slominski R, Ludemann J, et al. Blunted epidermal L-tryptophan metabolism in vitiligo affects immune response and ROS scavenging by Fenton chemistry, part 1: epidermal H₂O₂/ONOO⁻-mediated stress abrogates tryptophan hydroxylase and dopa decarboxylase activities, leading to low serotonin. *FASEB J*. 2012;26(6):2457–70.
57. Bin Saif GA, Al-Balbeesi AO, Binshabaib R, Alsaad D, Kwatra SG, Alzolibani AA, et al. Quality of life in family members of vitiligo patients: A questionnaire study in Saudi Arabia. *Am J Clin Dermatol*. 2013;14(6):489–95.
58. Colucci R, Lotti F, Arunachalam M, Lotti T, Dragoni F, Benvenga S, et al. Correlation of serum thyroid hormones autoantibodies with self-reported exposure to thyroid disruptors in a group of nonsegmental vitiligo patients. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2015;69(2):181–90.
59. Bystryn JC. Serum antibodies in vitiligo patients. *Clin Dermatol*. 1989;7(2):136–45.
60. Naughton GK, Reggiardo D, Bystryn JC. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. *J Am Acad Dermatol*. 1986;15(5):978–81.
61. Sharquie KE, Salman HA, Yaseen AK. Psoriasis and vitiligo are close relatives. *Clin Cosmet Investig Dermatol*. 2017;10:341–5.
62. Saylam Kurtipek G, Cihan FG, Erayman Demirbaş Ş, Ataseven A. The frequency of autoimmune thyroid disease in alopecia areata and vitiligo patients. *Biomed Res Int*. 2015;2015.
63. Gill L, Zarbo A, Isedeh P, Jacobsen G, Lim HW, Hamzavi I. Comorbid autoimmune diseases in patients with vitiligo: A cross-sectional study. *J Am Acad Dermatol*. 2016;74(2):295–302.
64. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A. Heterogeneity of neural crest-derived melanocytes. *Cent Eur J Biol*. 2013;8(4):315–30.
65. Brito PS. On Leucoderm, Vitiligo, Ven Kuttam (Tamil) or Cabbare (Singhalese), and Several New Methods of Treatment. *Br Med J*. 1885;1:834.

66. Kwinter J, Pelletier J, Khambalia A, Pope E. High-potency steroid use in children with vitiligo: A retrospective study. *J Am Acad Dermatol*. 2007;56(2):236–41.
67. Singh H, Kumaran MS, Bains A, Parsad D. A Randomized Comparative Study of Oral Corticosteroid Minipulse and Low-Dose Oral Methotrexate in the Treatment of Unstable Vitiligo. *Dermatology*. 2015;231(3):286–90.
68. Arca E, Taştan HB, Erbil AH, Sezer E, Koç E, Kurumlu Z. Narrow-band ultraviolet B as monotherapy and in combination with topical calcipotriol in the treatment of vitiligo. *J Dermatol*. 2006;33(5):338–43.
69. Travis LB, Silverberg NB. Calcipotriene and Corticosteroid Combination Therapy for Vitiligo. 2004;21(4):495–8.
70. El Mofty M, Essmat S, Youssef R, Sobeih S, Mahgoub D, Ossama S, et al. The role of systemic steroids and phototherapy in the treatment of stable vitiligo: a randomized controlled trial. *Dermatol Ther*. 2016;29(6):406–12.
71. Mohammad TF, Hamzavi IH. Surgical Therapies for Vitiligo. *Dermatol Clin*. 2017;35(2):193–203.
72. Zhang DM, Hong WS, Fu LF, Wei XD, Xu AE. A randomized controlled study of the effects of different modalities of narrow-band ultraviolet B therapy on the outcome of cultured autologous melanocytes transplantation in treating vitiligo. *Dermatologic Surg*. 2014;40(4):420–6.
73. Mulekar S V., Isedeh P. Surgical interventions for vitiligo: An evidence-based review. *Br J Dermatol*. 2013;169(SUPPL. 3):57–66.
74. Falabella R. Surgical therapies for vitiligo and other leukodermas, part 1: Minigrafting and suction epidermal grafting. *Dermatol Ther*. 2001;14(1):7–14.
75. Zarębska Z, Waszkowska E, Caffieri S, Dall'Acqua F. Photoreactions of psoralens with lecithins. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1998;45(2–3):122–30.
76. Doppalapudi S, Jain A, Chopra DK, Khan W. Psoralen loaded liposomal nanocarriers for improved skin penetration and efficacy of topical PUVA in psoriasis. *Eur J Pharm Sci*. 2017;96:515–29.
77. Wu C, Sun Z, Ye Y, Han X, Song X, Liu S. Psoralen inhibits bone metastasis of breast cancer in mice. *Fitoterapia*. 2013;91:205–10.
78. Esmat S, Hegazy RA, Shalaby S, Chu-Sung Hu S, Lan CCE. Phototherapy and Combination Therapies for Vitiligo. *Dermatol Clin*. 2017;35(2):171–92.
79. El Mofty M, Bosseila M, Mashaly HM, Gawdat H, Makaly H. Broadband ultraviolet A vs. psoralen ultraviolet A in the treatment of vitiligo: A randomized

- controlled trial. *Clin Exp Dermatol*. 2013;38(8):830–5.
80. Gupta A, Anderson T, Arbor A. Continuing medical education (Therapy). *J Am Acad Dermatol*. 1987;17(5):703–34.
81. Xiao B-H, Wu Y, Sun Y, Chen H-D, Gao X-H. Treatment of vitiligo with NB-UVB: A systematic review. *J Dermatolog Treat*. 2015;26(4):340–6.
82. GOTLIEB OR, SILVA L MJ. Distribution of coumarins in amazonian *Brosimum* species. *Phytochemistry*. 1972;11:3479–80.
83. Hexsel CL, Huggins RH, Lim HW. Phototherapy for vitiligo. *Light Ther Ski Color*. 2009;153(7):171–87.
84. Bridgewater S, Ratter JA RJ. Biogeographic patterns, β -diversity and dominance in the cerrado biome of Brazil. *Biodivers Conserv*. 2004;13:2295–318.
85. Baleroni CRS, Mario LTM, Selma MBM, Cidinei SS ME. Composição química de sementes das espécies florestais mamica-de-cadela (*Brosimum gaudichaudii* Trec), marolo arbóreo (*Annona crassiflora* Mart.), marolo rasteiro (*Annona dióica* St. Hil.), chichá-do-cerrado (*Sterculia a* St. Hil. Ex Turpin) e imbuia (*Ocotea* . *Ciênc Agr Saúde FEA*,. 2002;2:28–32.
86. Botrel RT, Rodrigues LA, Gomes LJ, Carvalho DA FM. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. *Acta Bot Brasilica*. 2006;20:143–56.
87. Carneiro MRB. A flora medicinal no Centro-oeste do Brasil: um estudo de caso com abordagem etnobotânica em campo limpo de Goiás. Anápolis (GO). Dissertação [Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente] - Centro Universitário de Anápolis – UniEVANGÉL.
88. Figueiredo MAP. Critérios e indicadores de sustentabilidade para manejo do Cerrado. Viçosa (MG). Dissertação [Magister Science] - Universidade Federal de Viçosa; 2003.
89. GG N. O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental. *Rev Eletrônica do Mestr em Edcução Ambient*. 2006;17:71–89.
90. Araújo FS, Costa RC, Lima JR, Vasconcelos SF, Girão LC, Sobrinho MS, Bruno MMA, Souza SSG, Nunes EP, Figueiredo MA, Lima-Verde LW LM. Floristics and life-forms along a topographic gradient, To test whether the flora is organized in discrete or continuous units along a topographic gradient, central-western Ceará, Brazil. *Rodriguésia*. 2011;62:341–66.
91. VILEGAS, W.; POZETTI GL. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*.

- 1993;36(3):416–7.
92. Ratter JA, Bridgewater S RJ. Analysis of the Floristic Composition of the Brazilian Cerrado Vegetation Iii : Comparison of the Woody Vegetation of 376 Areas. 2003;60:57–109.
 93. Burn MJ, Mayle FE. Palynological differentiation between genera of the Moraceae family and implications for Amazonian palaeoecology. 2008;149:187–201.
 94. FARIA, R. A. P. G.; COELHO, M. F. B.; ALBUQUERQUE, M. C. F.; AZEVEDO RAB. Fenologia de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. (Moraceae) no Cerrado de Mato Grosso. *Ciência Florest.* 2015;25(1):67–75.
 95. Agra, MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF B-FJ. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. *Rev Bras Farm.* 2008;18:472–508.
 96. Rodrigues VEG C DA. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. *Ciênc agrotec.* 2001;25:102–23.
 97. Pereira EBC, Pereira AV, Silva DB VR. Seedling growth of mamacadela (*Brosimum gaudichaudii* Trec.) on six different substrates. *Rev Bras Pl Med.* 2006;8:190–2.
 98. Veiga, Valdir F.; Pinto, Angelo C.; Maciel MAM. Plantas medicinais: Cura segura? *Quim Nova.* 2005;28(3):519–28.
 99. MONTEIRO, V. F. F.; MATHIAS, L.; VIEIRA, J. S.; BRAZ-FILHO R. Prenylated Coumarins, Chalcone and New Cinnamic Acid and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. 2002;13(2):281–7.
 100. Monteiro VFF, Mathias L, Vieira IJC, Schipsema J B-FR. Prenylated Coumarins, Chalcone and New Cinnamic Acid and Dihydrocinnamic Acid Derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *J Braz Chem Soc.* 2002;13:281–7.
 101. Neves MLP, Neto PGF, Silva SMS. Ensaio para detectar bergapteno na casca e no caule de *Brosimum gaudichaudii* Trec através da produção de melanina em actinomicetos. 2002;53–4.
 102. Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): Da planta ao medicamento. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2005;26(3):159–66.
 103. Varanda EA, Pozetti GL, Lourenço MV, Vilegas W RM. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. 2002;81:257–64.

104. Aparecida E, Luiz G, Lourenc MV, Vilegas W, Gonc MS. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. 2002;81:257–64.
105. Rocha ACNC, Luz FB SM. Post-Therapeutic Hypochromia after Fractional CO₂ Laser treated with Bromisum Gaudchii trécul. *J Pigment Disord*. 2014;1:1–3.
106. Leão AR, Cunha LC, Parente LML, Castro LCM, Chaul A, Rodrigues VB BM. Avaliação clínica toxicológica preliminar do Viticromin® em pacientes com vitiligo. *Rev Eletrônica Farmácia*. 2005;2:15–23.
107. Aves TMA, Silva AF, Mitzi B. Grandi TSM, Smânia EFA, Júnior AS ZC. Biological Screening of Brazilian Medicinal Plants. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 2000;95:367–73.
108. Chanchal D, Swarnlata S. Novel approaches in herbal cosmetics. *J Cosmet Dermatol*. 2008;7(2):89–95.
109. Narang JK, Narang RS, Ali J, Baboota S, Nagpal N, Kaur S, et al. Nanoemulsions for Improved Efficacy of Phytotherapeutics- A Patent Perspective. *Recent Pat Nanotechnol*. 2017;11(3):194–213.
110. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent , oil and surfactant optimisation. 2004;280:241–51.
111. Forgiarini A, Esquena J, González C, Solans C. Formation of nano-emulsions by low-energy emulsification methods at constant temperature. *Langmuir*. 2001;17(7):2076–83.
112. Schwarz JC, Klang V, Karall S, Mahrhauser D, Resch GP, Valenta C. Optimisation of multiple W/O/W nanoemulsions for dermal delivery of aciclovir. *Int J Pharm*. 2012;435(1):69–75.
113. Schmidts T, Dobler D, Nissing C, Runkel F. Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions. *J Colloid Interface Sci*. 2009;338(1):184–92.
114. Solans C, Izquierdo P, Nolla J, Azemar N. Nano-emulsions. 2005;10:102–10.
115. Fernandez P, Rieger J, Angelika K. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. 2004;251:53–8.
116. Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *J Agric Food Chem*. 2013;61(37):8906–13.

117. Ghosh PK, Majithiya RJ, Umrethia ML, Murthy RSR. Design and development of microemulsion drug delivery system of acyclovir for improvement of oral bioavailability. *AAPS PharmSciTech*. 2006;7(3):77.
118. Đorđević SM, Santrač A, Cekić ND, Marković BD, Divović B, Ilić TM, et al. Parenteral nanoemulsions of risperidone for enhanced brain delivery in acute psychosis: Physicochemical and in vivo performances. *Int J Pharm*. 2017;533(2):421–30.
119. Gallarate M, Chirio D, Bussano R, Peira E, Battaglia L, Baratta F, et al. Development of O/W nanoemulsions for ophthalmic administration of timolol. *Int J Pharm*. 2013;440(2):126–34.
120. Nasr M, Nawaz S, Elhissi A. Amphotericin B lipid nanoemulsion aerosols for targeting peripheral respiratory airways via nebulization. *Int J Pharm*. 2012;436(1–2):611–6.
121. Pangen R, Kang SW, Oak M, Park EY, Park JW. Oral delivery of quercetin in oil-in-water nanoemulsion: In vitro characterization and in vivo anti-obesity efficacy in mice. *J Funct Foods*. 2017;38:571–81.
122. Prinderre P, Piccerelle P, Cature E, Kalantzis G, Reynier JP, Joachim J. Formulation and evaluation of o/w emulsions using experimental design. *Int J Pharm*. 1998;163(1–2):73–9.
123. Gué E, Since M, Ropars S, Herbinet R, Le Pluart L, Malzert-Fréon A. Evaluation of the versatile character of a nanoemulsion formulation. *Int J Pharm*. 2016;498(1–2):49–65.
124. Vilegas W PG. Coumarins from *Brosimum Gaudichaudii*. *J Nat Prod*. 1993;36:416–7.
125. Zeng J, Tan M, Peng X, Luo Q. Standardization and Quality Control of Herbal Extracts and Products. In: *Traditional Herbal Medicine Research Methods: Identification, Analysis, Bioassay, and Pharmaceutical and Clinical Studies*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 377–427.
126. Brasil. BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; 2011. Available at: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterpicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf.
127. Pires AE, Honda NK, Cardoso CAL. Short communication A method for fast

- determination of psoralens in oral solutions of phytomedicines using liquid chromatography. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;36:415–20.
128. Adjunto O, Colegiada D, Vigilância N De. Ministério da Saúde RESOLUÇÃO - RE Nº 899 , DE 29 DE MAIO DE 2003. 2003;1–11.
 129. Group IEW. ICH Harmonised tripartite guideline. Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2 (R1). 2005;
 130. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos [Internet]. Anvisa. 2007. 130 p. Available at: http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf
 131. Anvisa. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Vol. 1. 2004. 52 p.
 132. Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Resolução nº 1 de 29 de julho de 2015. Publicação do Guia para a Realização de Estudos de Estabilidade, 2005.
 133. ICH Expert Working Group. ICH Guideline Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products. International Conference on Harmonization. 2003. p. 1–17.
 134. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1–2):55–63.
 135. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: A convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329–33.
 136. Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol.* 1985;23(2):287–91.
 137. Agency EC. Guidance on the Application of the CLP Criteria. 5º ed. Finland; 2017. 1-644 p.
 138. Anvisa. Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos. 2º ed. Brasília; 2012. 74 p.
 139. Martins MAR, Silva LP, Ferreira O, Schröder B, Coutinho JAP, Pinho SP. Terpenes solubility in water and their environmental distribution. *J Mol Liq.* 2017;241:996–1002.
 140. Kiyama R. Estrogenic terpenes and terpenoids: Pathways, functions and applications. *Eur J Pharmacol.* 2017;815:405–15.

141. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA PP. Farmacognosia, da planta ao medicamento. 5º ed. Florianópolis: Ed. UFRGS; 2004. 821 p.
142. Brandão GHA, Rigo G, Roque AA, Souza ACD, Scopel M, Nascimento CAO, et al. Extraction of bioactive alkaloids from *Melocactus zehntneri* using supercritical fluid. *J Supercrit Fluids*. 2017;129:28–35.
143. Kumar V, Gupta M, Gandhi SG, Bharate SS, Kumar A, Vishwakarma RA, et al. Anti-inflammatory chromone alkaloids and glycoside from *Dysoxylum binectariferum*. *Tetrahedron Lett*. 2017;58(42):3974–8.
144. Manojlović NT, Solujić S, Sukdolak S, Krstić L. Isolation and antimicrobial activity of anthraquinones from some species of the lichen genus *Xanthoria*. Vol. 65, *Journal of the Serbian Chemical Society*. 2000. p. 555–60.
145. Borges MR. Conhecimento Popular sobre plantas do Cerrado como subsídio para propostas de Educação Ambiental. Uberlândia (MG). Dissertação [Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais] - Universidade Federal de Uberlândia; 2009.
146. Borges F, Roleira F, Milhazes N, Santana L, Uriarte E. Simple Coumarins and Analogues in Medicinal Chemistry: Occurrence, Synthesis and Biological Activity. *Curr Med Chem* [Internet]. 2005;12(8):887–916. Available at: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=0929-8673&volume=12&issue=8&spage=887>
147. Couceiro MA, Afreen F, Zobayed SMA, Kozai T. Variation in concentrations of major bioactive compounds of *St. John's wort*: Effects of harvesting time, temperature and germplasm. *Plant Sci*. 2006;170(1):128–34.
148. Hosni K, Msaada K, Ben Taârit M, Marzouk B. Phenological variations of secondary metabolites from *Hypericum triquetrifolium* Turra. *Biochem Syst Ecol*. 2011;39(1):43–50.
149. Vilegas W, Honda NK. Rapid determination of furanocoumarins in creams and pomades using SPE and GC. 2000;22:203–14.
150. Desmortreux C, Rothaupt M, West C, Lesellier E. Improved separation of furocoumarins of essential oils by supercritical fluid chromatography. 2009;1216:7088–95.
151. Chu J, Li S, Yin Z, Ye W, Zhang Q. Simultaneous quantification of coumarins , flavonoids and limonoids in *Fructus Citri Sarcodactylis* by high performance

- liquid chromatography coupled with diode array detector. *J Pharm Biomed Anal.* 2012;66:170–5.
152. Chunyan C, Bo S, Ping L, Jingmei L, Ito Y. Isolation and Purification of Psoralen and Bergapten from *Ficus carica* L. Leaves by High-Speed Countercurrent Chromatography. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2009;32(1):136–43.
 153. Yang Y, Marshall-Breton C, Leser ME, Sher AA, McClements DJ. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocoll.* 2012;29(2):398–406.
 154. Solans C, Solé I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. *Curr Opin Colloid Interface Sci.* 2012;17(5):246–54.
 155. Porras M, Solans C, González C, Martínez A, Guinart A, Gutiérrez JM. Studies of formation of W/O nano-emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.* 2004;249(1–3):115–8.
 156. Salager JL, Forgiarini A, Márquez L, Peña A, Pizzino A, Rodriguez MP, et al. Using emulsion inversion in industrial processes. *Adv Colloid Interface Sci.* 2004;108–109:259–72.
 157. Morales D, Solans C, Gutiérrez JM, Garcia-Celma MJ, Olsson U. Oil/Water droplet formation by temperature change in the Water/C1E6/mineral oil system. *Langmuir.* 2006;22(7):3014–20.
 158. Nemeryuk MP, Dimitrova VD, Anisimova OS, Sedov AL, Solov'eva NP, Traven VF. Conversion of coumarins accompanied by opening and recyclization of the lactone ring. 1. Study of the reaction of 3-ethoxycarbonyl(3-acyl)coumarins with cyanoacetylhydrazine and its derivatives. *Chem Heterocycl Compd.* 2003;39(11):1454–65.
 159. Hwang TL, Fang CL, Chen CH, Fang JY. Permeation enhancer-containing water-in-oil nanoemulsions as carriers for intravesical cisplatin delivery. *Pharm Res.* 2009;26(10):2314–23.
 160. Izquierdo P, Feng J, Esquena J, Tadros TF, Dederen JC, Garcia MJ, et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. *J Colloid Interface Sci.* 2005;285(1):388–94.
 161. Wu L, Zhang J, Watanabe W. Physical and chemical stability of drug nanoparticles ☆. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(6):456–69.
 162. Li WN, Chen BQ, Tan TW. Esterification synthesis of ethyl oleate in solvent-free system catalyzed by lipase membrane from fermentation broth. *Appl Biochem*

- Biotechnol. 2011;163(1):102–11.
163. Zhang F, Wu WM, Parker JC, Mehlhorn T, Kelly SD, Kemner KM, et al. Kinetic analysis and modeling of oleate and ethanol stimulated uranium (VI) bio-reduction in contaminated sediments under sulfate reduction conditions. *J Hazard Mater* [Internet]. 2010;183(1–3):482–9. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.07.049>
 164. Bruxel F, Laux M, Wild LB, Fraga M, Koester LS. Revisão. 2012;35(9):1827–40.
 165. Constantinides PP, Scalart JP. Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. *Int J Pharm*. 1997;158(1):57–68.
 166. Rao J, McClements DJ. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. *J Agric Food Chem*. 2010;58(11):7059–66.
 167. Lee L, Hancocks R, Noble I, Norton IT. Production of water-in-oil nanoemulsions using high pressure homogenisation: A study on droplet break-up. *J Food Eng*. 2014;131:33–7.
 168. Bajaj S, Sakhuja N, Singla D, Bajaj Principal S. Stability Testing of Pharmaceutical Products. *J Appl Pharm Sci*. 2012;2(2012):129–38.
 169. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=2355, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2355> (accessed Jan. 2, 2018).
 170. National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Database; CID=6199, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6199> (accessed Jan. 2, 2018).
 171. Saïd A, Makki S, Muret P, Humbert P, Millet J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci*. 1997;14(2):136–44.
 172. Youenang Piemi MP, Korner D, Benita S, Marty JP. Positively and negatively charged submicron emulsions for enhanced topical delivery of antifungal drugs. *J Control Release*. 1999;58(2):177–87.
 173. Hoeller S, Sperger A, Valenta C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. *Int J Pharm*. 2009;370(1–2):181–6.

174. Baspinar Y, Borchert H-H. Penetration and release studies of positively and negatively charged nanoemulsions--is there a benefit of the positive charge? *Int J Pharm.* 2012;430(1–2):247–52.
175. Varanda, E. A.; Pozetti, G. L.; Lourenço, M. V.; Vilegas, W.; Raddi MSG. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. *J Ethnopharmacol.* 2002;81:257–64.
176. Karande P, Mitragotri S. Enhancement of transdermal drug delivery via synergistic action of chemicals. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 2009;1788(11):2362–73.
177. Konda S, Maibach HI. Percutaneous penetration of 5-methoxypsoralen in rhesus monkeys. *Food Chem Toxicol [Internet].* 2011;49(5):1092–5. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2011.01.018>
178. Lü L, Zhang L, Wai MSM, Yew DTW, Xu J. Exocytosis of MTT formazan could exacerbate cell injury. *Toxicol Vitro.* 2012;26(4):636–44.
179. Marwan MM, Jiaang J, Castrucci AM de L, Hadley ME. Psoralen Stimulate Mouse Melanocyte and Melanoma Tyrosinase Activity in the Absence of Ultraviolet Light. *Pigment Cell Res.* 1990;3(4):214–21.
180. Mengeaud V, Ortonne JP. PUVA (5-Methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes. *J Invest Dermatol.* 1996;107(1):57–62.
181. Cartner T, Brand N, Tian K, Saud A, Carr T, Stapleton P, et al. Effect of different alcohols on stratum corneum kallikrein 5 and phospholipase A2 together with epidermal keratinocytes and skin irritation. *Int J Cosmet Sci.* 2017;39(2):188–96.
182. Doppalapudi S, Mahira S, Khan W. Development and in vitro assessment of psoralen and resveratrol co-loaded ultradeformable liposomes for the treatment of vitiligo. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2017;174(April):44–57.
183. Carneiro Leite V, Ferreira Santos R, Chen Chen L, Andreu Guillo L. Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2004;76(1–3):49–53.
184. Pozetti GL. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): Da planta ao medicamento. *Rev Ciencias Farm Basica e Apl.* 2005;26(3):159–66.
185. Ree JH, Youn JI. The effects of Psoralen and UVA (PUVA) on epidermal melanocytes of the Tail in C57BL mice. *Korean J Dermatology.* 1992;30(4):484–

- 91.
186. Birlea SA, Goldstein NB, Norris DA. Repigmentation through Melanocyte Regeneration in Vitiligo. *Dermatol Clin*. 2017;35(2):205–18.
187. Crittenden D, Kim H. New and emerging therapies for gout. *Clin* 2011;18(1):79–89.
188. Dreßler J, Busuttill A, Koch R, Harrison DJ. Sequence of melanocyte migration into human scar tissue. *Int J Legal Med*. 2001;115(2):61–3.
189. Gilchrest BA, Blog FB, Szabo G. Effects of aging and chronic sun exposure on melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol*. 1979;73(2):141–3.
190. Haass NK, Herlyn M. Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma. *J Investig dermatology Symp Proc*. 2005;10(2):153–63.
191. Abdel-Naser MB. Differential effects on melanocyte growth and melanization of low vs. high calcium keratinocyte-conditioned medium. *Br J Dermatol*. 1999;140(1):50–5.
192. Hyter S, Coleman DJ, Ganguli-Indra G, Merrill GF, Ma S, Yanagisawa M, et al. Endothelin-1 is a transcriptional target of p53 in epidermal keratinocytes and regulates ultraviolet-induced melanocyte homeostasis. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013;26(2):247–58.
193. QUEVEDO AEP. Atividades melanogênica , genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2011.
194. Niu C, Pang GX, Li G, Dou J, Nie LF, Himitt H, et al. Synthesis and biological evaluation of furocoumarin derivatives on melanin synthesis in murine B16 cells for the treatment of vitiligo. *Bioorganic Med Chem*. 2016;24(22):5960–8.
195. Halaban R, Langdon R, Birchall N, Cuono C, Baird A, Scott G, et al. Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol*. 1988;107(4):1611–9.
196. Hirobe T. Keratinocytes regulate the function of melanocytes. *Dermatologica Sin*. 2014;32(4):200–4.
197. Wu CS, Lan CCE, Wang LF, Chen GS, Wu CS, Yu HS. Effects of psoralen plus ultraviolet A irradiation on cultured epidermal cells in vitro and patients with vitiligo in vivo. *Br J Dermatol*. 2007;156(1):122–9.

198. Gordon PR, Mansur CP, Gilchrest BA. Regulation of human melanocyte growth, dendricity and melanization by keratinocyte derived factors. *J Invest Dermatol.* 1989;92:565–72.
199. De Luca M, D’Anna F, Bondanza S, Franzi AT, Cancedda R. Human epithelial cells induce human melanocyte growth in vitro but only skin keratinocytes regulate its proper differentiation in the absence of dermis. *J Cell Biol.* 1988;107(5):1919–26.
200. Ortonne J-P. Psoralen Therapy. *Clin Dermatol.* 1989;7(2):120–35.
201. Anbar TS, El-Sawy AE, Attia SK, Barakat MT, Moftah NH, El-Ammawy TS, et al. Effect of PUVA therapy on melanocytes and keratinocytes in non-segmental vitiligo: Histopathological, immuno-histochemical and ultrastructural study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2012;28(1):17–25.
202. Lee AY. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. *Ann Dermatol.* 2012;24(2):115–25.
203. Barany E, Lindberg M, Loden M. Biophysical characterization of skin damage and recovery after exposure to different surfactants. *Contact Dermatitis.* 1999;40(2):98–103.
204. Derouiche MTT, Abdennour S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. *Toxicol Vitro.* 2017;45(June):393–6.
205. McKenzie B, Kay G, Matthews KH, Knott RM, Cairns D. The hen’s egg chorioallantoic membrane (HET-CAM) test to predict the ophthalmic irritation potential of a cysteamine-containing gel: Quantification using Photoshop® and ImageJ. *Int J Pharm.* 2015;490(1–2):1–8.
206. Scheel J, Kleber M, Kreutz J, Lehringer E, Mehling A, Reisinger K, et al. Eye irritation potential: Usefulness of the HET-CAM under the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS). *Regul Toxicol Pharmacol.* 2011;59(3):471–92.
207. Vinardell MP, Macián M. Comparative study of the HET-CAM test and the Draize eye test for assessment of irritancy potential. *Toxicol Vitro.* 1994;8(3):467–70.
208. L. Gilleron, s. Coecke, M. Sysmans, E. Hansen, S. Van Oproy, D. Marzin, H. Van Cauteren V. Evaluation of the HET-CAM-TSA as an Alternative to the Draize Irritation Test. *Toxicol Vitro.* agosto de 1997;11:641–4.
209. Steiling W, Bracher M, Courtellemont P, De Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations

- and ingredients. *Toxicol Vitro*. 1999;13(2):375–84.
210. Bernardi DS, Pereira TA, Maciel NR, Bortoloto J, Viera GS, Oliveira GC, et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: In vitro and in vivo assessments. *J Nanobiotechnology*. 2011;9(1):44.
 211. Ali MS, Alam MS, Imam FI, Siddiqui MR. Topical nanoemulsion of turmeric oil for psoriasis: Characterization, ex vivo and in vivo assessment. *Int J Drug Deliv*. 2012;4(2):184–97.
 212. Maruno M. Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de gergelim aditivadas de óleo de framboesa para queimaduras da pele. 2009.
 213. Lémery E, Briançon S, Chevalier Y, Bordes C, Oddos T, Gohier A, et al. Skin toxicity of surfactants: Structure/toxicity relationships. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2015;469:166–79.
 214. Rocha-Filho P, Ferrari M, Maruno M, Souza O, Gumiero V. In Vitro and In Vivo Evaluation of Nanoemulsion Containing Vegetable Extracts. *Cosmetics*. 2017;4(3):32.
 215. Mehling A, Kleber M, Hensen H. Comparative studies on the ocular and dermal irritation potential of surfactants. *Food Chem Toxicol*. 2007;45:747–58.