



Determinação da atividade fotoprotetora e antioxidante em emulsões contendo extrato de *Malpighia glabra* L. – Acerola

Franciele Piovesana de Souza^{1,*}; Gabriela Rached Campos¹; Janaina Fernanda Packer²

¹ Pós-graduanda na Pós Graduação Especialização Profissionalizante em Manipulação Magistral Alopática. Instituto Racine. São Paulo, SP.

² Docente na Pós Graduação Especialização Profissionalizante em Manipulação Magistral Alopática. Instituto Racine. São Paulo, SP.

RESUMO

O emprego de extratos vegetais na tentativa de proteger a pele contra o fotoenvelhecimento vem crescendo muito, uma vez que muitos destes extratos apresentam compostos com atividade fotoprotetora ou sinérgica em associação a filtros solares, além do alto potencial antioxidante. Esta pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* do extrato seco de acerola veiculada em emulsões do tipo O/A e emulsões acrescidas de filtros solares químicos. Ensaios físico-químicos e microbiológicos foram realizados durante a avaliação de sua estabilidade. A emulsão composta pelo extrato de acerola apresentou absorção na região UVB com absorvância máxima em 290 nm. Na concentração utilizada, a acerola não apresentou FPS_D ≥ 2, assim não pode ser considerado planta com potencial fotoprotetor, porém foi confirmada atividade antioxidante na formulação. A associação do extrato de acerola com os filtros químicos apresentou-se estável frente aos ensaios de estabilidade e ação sinérgica na proteção da pele contra os danos induzidos pela radiação UV.

Palavras-chave: *Malpighia glabra* L. Fotoproteção. Atividade Antioxidante.

INTRODUÇÃO

A aplicação de matérias-primas de origem vegetal em cosméticos é uma das tendências promissoras do mercado consumidor que busca cada vez mais produtos que aproveitem os benefícios que a natureza proporciona, com qualidade científica, comprovando sua segurança e eficácia, além do comprometimento com o desenvolvimento sustentável (Ferrari et al., 2007; Franquilino, 2006; Iha et al., 2008).

A exposição às radiações UV (ultravioleta) é responsável por alterações cutâneas relacionadas ao envelhecimento precoce, sendo que a maioria destas é resultante da ação da redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) que são extremamente danosas aos tecidos. Uma vez que desencadeiam redução brusca da quantidade dos antioxidantes endógenos, atacam lipídeos de membranas celulares, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos, causando oxidação e alteração dessas moléculas. Esses danos são considerados pontos chave nos processos de envelhecimento (Dal' Belo, 2008; Velasco et al., 2008).

Segundo Damiani et al (2006 apud Dal' Belo 2008) muitas formulações contendo filtros químicos não proporcionam proteção total, principalmente quando são considerados efeitos crônicos como: fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese.

Assim, extratos vegetais ricos em constituintes fenólicos, como flavonoides, vêm sendo empregados em formulações fotoprotetoras associadas aos filtros UV. Uma vez que, comprovada sua capacidade de absorver a radiação solar e antioxidante podem intensificar a proteção final do produto e ou neutralizar os radicais livres produzidos na pele após exposição ao sol (Nascimento et al., 2009; Chiu & Kimball, 2003 apud Dal' Belo 2008; F' Guyer et al., 2003; Kim et al., 2002; Aquino et al., 2002; Bonina et al., 2000).

Dentre as substâncias ativas presentes nos vegetais que podem ser empregadas a fim de proporcionar uma fotoproteção cutânea mais ampla à formulação, estão os antioxidantes como as vitaminas C e E, os taninos, alcaloides e flavonoides (Simões et al., 2004 apud Rosa et al., 2008; Violante et al., 2009).

De acordo com Ramos et al. (1996) existe uma analogia estrutural entre filtros químicos sintéticos e os princípios ativos extraídos de plantas, já que a absorção ultravioleta tem sido verificada quando se utiliza extrato vegetal em produtos farmacêuticos e cosméticos, apontando uma possível ação anti-solar.

Os flavonoides, quando dispersos em etanol, apresentam dois picos de absorção sendo um entre 240-280nm e o outro no comprimento de 300-550nm, sinalizando um potencial para a absorção da radiação UV, cujo comprimento de onda está compreendido entre 290-320 (UVB) e 320-400 (UVA) (Bobin et al., 1994 apud Violante et al., 2009). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm

Autor correspondente: Franciele Piovesana de Souza - Instituto Racine, São Paulo - SP - R. José Siqueira, nº 91 - Osvaldo Cruz - SP - CEP.17700-000 e-mail:franpiovesana@hotmail.com.- telefone:(18) 3528-3848

demonstrado que os flavonoides inibem enzimas que estão envolvidas na produção de EROs, atuam como agentes quelantes contra metais envolvidos no metabolismo do oxigênio que aumenta a produção de EROs e são capazes de reduzir os radicais livres gerados por meio da doação de elétrons a estes radicais (Hanasaki et al., 1994 apud Dal'Belo 2009; Korina & Afana'ev, 1997; Brown et al., 1998).

Segundo Velasco et al. (2008) os flavonoides não apresentam tendência à absorção cutânea, assim interpreta-se que a atividade seria exercida nas camadas superficiais da pele, ação desejada para os filtros solares.

Dentre os extratos vegetais antioxidantes e com possível ação fotoprotetora tem-se o extrato de acerola (*Malpighia glabra L.*). A acerola é uma planta originária da América Central, apresenta em sua composição compostos como: malvidina-3,5-diglicosilada, cianidina-3-monoglicosilada, pelargonidina, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido cumárico, ácido ferúlico, quercetina, caempferol, α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina (Vendramini & Trugo, 2004; Cavalcante & Rodriguez-Amaya, 1992 apud Rosso 2006).

O fruto tem sido amplamente utilizado em suplementos alimentares, medicamentos fitoterápicos e produtos cosméticos para cuidados da pele e cabelo devido a sua rica composição em flavonoides (Teske & Trentini, 1995).

Neste estudo, a acerola foi veiculada em um sistema emulsionado e submetida aos ensaios de estabilidade acelerada a fim de verificar possíveis sinais de instabilidade em suas características físico-químicas, determinação de FPS *in vitro* através da metodologia de Mansur et al. (1986) e determinação do potencial antioxidante da formulação *in vitro*, de acordo com o método de depleção do radical DPPH (Brand-Williams et al., 1995).

Logo, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante e o potencial fotoprotetor do extrato de acerola veiculada em emulsões do tipo O/A. Além das emulsões acrescidas com filtros químicos ou ação sinérgica relacionada a este extrato que proporcione uma ampla proteção à pele contra os danos causados pela radiação ultravioleta.

MATERIAL E MÉTODOS

Instrumentação

A água utilizada foi proveniente do destilador (Quimis – Q341-12). Todas as substâncias foram pesadas na balança digital semianalítica (Gehaka BG 2000). Os ensaios de estabilidade foram realizados em refrigerador (Electrolux RE32) e estufa (Fanem 315 SE). Os parâmetros avaliados durante esses ensaios foram realizados com auxílio do medidor de pH (Marconi PA 200), viscosímetro (Brookfield LVDV-II+), centrífuga (Fanem 206R Excelsa BABYII), espectrofotômetro (U-3010 ROM version 2520 04) e câmara climática (SP Labor Q315UC),

Materiais: Para o preparo das emulsões em estudo foram utilizadas as seguintes matérias-primas: água destilada; AMP95 (Deg; CAS: 124-68-5; L: YC2531LAH2#2; Val: 25/03/2011); BHT (Nutrifarma; CAS: 128-37-0; L: 81; Val: 07/2010); Dimeticone DC 200/350 (Purifarma; CAS: 63148-62-9; L: 0005169878; Val: 01/2011); EDTA dissódico (Deg; CAS: 139-33-3; L: 070227#10; Val: 02/2012); Extrato seco de acerola (Viafarma; *Malpighia glabra* DC; CAS: 223747-63-5; L: 032626; Val: 02/2013); Metilparabeno (Purifarma; CAS:99-76-3; L: M081004; Val: 03/10/2011); 2-ethylhexyl p-methoxycinnamate - Neo heliopan AV (Galena; CAS: 5466-77-3; L: 89634; Val: 03/2010); 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone - Neo heliopan BB (Galena; CAS: 131-57-7; L: 0809049004; Val: 11/2010); Nostrabase loção não iônica (Pharma Nostra; L: 09103570; Val: 10/2011); Phenylbenzimidazole Sulfonic Acid - Neo heliopan hydro (Galena; CAS: 27503-81-7; L: 1195; Val: 05/2011); Dimetil dimetilhilol hidantoin - Nipaguard DCB (Pharmaspecial; L: 171642; Val: 24/11/2011); álcool cetosteárilico e seu derivado etoxilado - Paramul J (Galena; CAS: 67762-27-0/8005-44-5; L: 629346; Val: 30/06/2010); Propilenoglicol (Galena; CAS: 57-55-6; L: XC1142GT03; Val: 19/03/2011); Propilparabeno (Genix; CAS: 94-13-3; L: P080526; Val: 05/2011); Trietanolamina (Volp; CAS: 102-71-6; L: 10971; Val: 09/2010).

Métodos

Metodologia de preparo das emulsões

Formulação 1 (Tabela 1): foi preparada incorporando o extrato seco de acerola 10%, previamente solubilizado em água destilada, em loção não iônica mantendo agitação para fornecer uniformidade. O pH da emulsão não foi corrigido.

Formulação 2 (Tabela 1): foi preparada através do aquecimento, em separado, dos componentes da fase oleosa (70°C) e da fase aquosa (75°C). Com agitação constante, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação até atingir a temperatura de 25°C. Incorporou-se o extrato seco de acerola 10%, previamente solubilizado em água destilada. Corrigiu-se o pH para 6,0 com a AMP95.

Formulação 3 (Tabela 1): foi preparada através do aquecimento, em separado, dos componentes da fase oleosa (70°C) e da fase aquosa (75°C). Com agitação constante, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação até atingir a temperatura de 25°C. Incorporou-se o extrato seco de acerola 10%, previamente solubilizado em água destilada. Corrigiu-se o pH para 6,8 com trietanolamina. .

Formulação 4 e 5 (Tabela 1): foi preparada através do aquecimento, em separado, dos componentes da fase oleosa (70°C) e da fase aquosa (75°C). Com agitação constante, verteu-se a fase aquosa sobre a oleosa, mantendo a agitação até atingir a temperatura de 25°C. Incorporou-se o extrato seco de acerola 10% e o conservante (Nipaguard), previamente solubilizados em água destilada. Corrigiu-se o pH para 7,5 com AMP95.

Tabela 1 - Componentes das formulações.

Componentes da emulsão	Formulação 1	Formulação 2	Formulação 3	Formulação 4	Formulação 5
Extrato seco de acerola	10%	10%	10%	10%	10%
Água destilada	qsp	qsp	qsp	qsp	qsp
Aminometilpropanol		qsp		qsp	qsp
BHT		0,1%		0,1%	0,1%
Dimeticone DC 200/350		3%		3%	3%
EDTA dissódico		0,1%		0,1%	0,1%
Metilparabeno		0,02%	0,02%	0,02%	
2-ethylhexyl p-methoxycinnamate			5%	5%	5%
2-hydroxy-4-methoxybenzophenone			3%	3%	3%
Nostrabase loção não iônica	qsp 100g		qsp 100g		
álcool cetó-estearílico e seu derivado etoxilado		12%		12%	12%
Propilenoglicol		5%		5%	
Propilparabeno		0,01%		0,01%	
dimethyl dimethylol hydantoin (55% aqueous)					0,3%
Triethanolamine			qsp		

Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro*

A metodologia empregada para realização da determinação do FPS *in vitro* foi desenvolvida por Mansur et al. (1986). O método demonstrou ser rápido e eficaz além de apresentar boa correlação com os resultados *in vivo* e ser empregado com frequência em vários trabalhos (Barth, 2000; Garcia, 1990).

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em tempo determinado: inicial (t_0) e 21 dias (t_{21}). As absorbâncias obtidas foram adicionadas na equação a seguir e obtidos os FPS *in vitro* (Mansur et al, 1986).

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot I(\lambda) \cdot abs(\lambda)$$

Em que: FPSE= Fator de proteção solar espectrofotométrico; FC = fator de correção igual a 10; $\sum_{290}^{320} EE(\lambda)$ = efeito eritemogênico da radiação de comprimento de onda (λ) nm; $I(\lambda)$ = intensidade da radiação solar no comprimento de onda (λ) nm; $abs(\lambda)$ = leitura espectrofotométrica da absorvância da solução do filtro solar no comprimento de onda (λ) nm.

Determinação do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método DPPH (Brand-Williams et al., 1995) é baseado na captura do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) por antioxidantes, produzindo um decréscimo da absorbância a 515 nm. Foi modificado por Sánchez-Moreno (1998) para medir os parâmetros cinéticos. A porcentagem da captura dos radicais livres foi calculada conforme a equação:

$$\% \text{ de Inibição} = \left[\frac{(Abs_{Controle} - Abs_{Amostra})}{Abs_{Controle}} \right] \times 100$$

Em que: SRL= Sequestro de radicais livres; Abs controle= Absorbância do controle (solução de DDPH sem antioxidante); Abs amostra= Absorbância da amostra a ser testada. Comprimento de onda: 517nm.

Determinação microbiológica do produto em análise de estabilidade

Foi utilizada a metodologia estabelecida pela British Pharmacopoeia (2008).

Avaliação da estabilidade das emulsões em estudo

Os parâmetros avaliados no estudo de estabilidade acelerada foram análise macroscópica, físico-química e microbiológica. Foram acondicionados em frascos plásticos de polietileno tipo bisnaga, cem gramas (100 g) das emulsões submetidas a condições variáveis de temperatura: $5 \pm 2^\circ\text{C}$ (refrigerador), $25^\circ\text{C} \pm 2$ (temperatura ambiente controlada) e $45^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (estufa) (Anvisa, 2004).

As formulações foram avaliadas nos intervalos de tempo determinados: 0, 1, 3, 7, 14, 21 dias. Os parâmetros físico-químicos monitorados foram os elencados a seguir.

Análise macroscópica das emulsões

Realizada inicialmente e durante todas as avaliações observando visualmente as características físicas das amostras, verificando se ocorreram modificações, tais

como: alteração nas características organolépticas e homogeneidade da formulação (Ferrari, 1998; USP, 2008).

Ensaio físico-químicos

Centrifugação

Em tubo de ensaio cônico graduado foram adicionados 10 g das amostras, pesados em balança semianalítica e submetidas ao ciclo de 3000 rpm, durante trinta minutos à temperatura ambiente (Anvisa, 2004).

Determinação do pH

A determinação do pH foi baseada no método proposto pela Farmacopeia Brasileira (1988). Os resultados correspondem à média de três determinações.

Determinação da viscosidade

A viscosidade das amostras em estudo de estabilidade foi determinada utilizando o viscosímetro Brookfield LVDV – II acoplado ao spindle 5 na velocidade de rotação progressiva 1- 10 RPM. Os resultados apresentam a média de três leituras (USP, 2008).

RESULTADOS

Determinação do Fator de Proteção Solar *in vitro*

Os resultados do FPS *in vitro* das formulações nos períodos determinados estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 - Determinação do FPS *in vitro* das formulações em estudo.

Formulação	T ₀	T ₂₁
1	0,14	NR
2	NR	0,08
3	13,65	NR
4	NR	10,04
5	15,62	15,03

Sendo t₀: Análise inicial; t₂₁: Análise após decorridos 21 dias; NR: Não realizado.

Determinação do DPPH

Tabela 3 – Avaliação da atividade antioxidante da formulação 5 utilizando o método de sequestro de radicais DPPH.

Padrões	T ₀	T ₂₁
Controle	13% - ácido ascórbico	12,7% - ácido ascórbico
Branco	Abaixo do limite de sensibilidade do teste	Abaixo do limite de sensibilidade do teste
Formulação 5	120eq.BHT/grama	110 eq. BHT/grama

Sendo T₀: Análise inicial; T₂₁: Análise após decorridos 21 dias.

Avaliação microbiológica

As Tabelas 4 e 5 apresentam os resultados das análises microbiológicas frente a contagem de microrganismos totais aeróbicos e patogênicos nas Formulações 4 e 5.

Tabela 4 – Avaliação microbiológica da formulação 4.

Análise	Especificação	T ₀	T ₁	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₂₁
Contagem de bactérias mesófilas	<10 ² UFC/g	NR	NR	NR	NR	NR	>10 ⁶ UFC/g
Contagem de bolores leveduras	<10 ² UFC/g	NR	NR	NR	NR	NR	>10 ⁶ UFC/g
Pesquisa de microrganismos patogênicos							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Ausência/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Ausência/g
<i>Escherichia coli</i>	NR	NR	NR	NR	NR	NR	Presença

Fonte: BRITISH PHARAMACOPOEIA, 2008.

Sendo T₀: Análise inicial; T₁: Análise após decorridas 24 horas; T₃: Análise após decorridos 3 dias; T₇: Análise após decorridos 7 dias; T₁₄: Análise após decorridos 14 dias; T₂₁: Análise após decorridos 21 dias e NR: Não realizado.

Tabela 5 – Avaliação microbiológica da formulação 5.

Análise	Especificação	T ₀	T ₁	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₂₁
Cont. de bactérias mesófilas	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g
Cont. de bolores e leveduras	<10 ² UFC/g	<10 ¹ UFC/g	<10 ¹ UFC/g	<10 ¹ UFC/g	<10 ¹ UFC/g	<10 ² UFC/g	<10 ² UFC/g
Pesquisa de microrganismos patogênicos							
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g	Ausência/g

Fonte: BRITISH PHARAMACOPOEIA, 2008.

Sendo T₀: Análise inicial; T₁: Análise após decorridas 24 horas; T₃: Análise após decorridos 3 dias; T₇: Análise após decorridos 7 dias; T₁₄: Análise após decorridos 14 dias; T₂₁: Análise após decorridos 21 dias e NR: Não realizado.

Estudos de estabilidade acelerada

Avaliação macroscópica das emulsões

Os parâmetros avaliados através da análise macroscópica das emulsões envolvem alterações físicas e físico-químicas, tais como: o aspecto, a cor e o odor. As emulsões submetidas ao ensaio demonstraram semelhança no que se refere à cor, odor e aparência e permaneceram estáveis durante todo o período em estudo independente das condições de armazenamento.

Determinação de pH

As médias dos valores de pH frente às condições propostas pelo estudo estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Determinação dos valores de pH das formulações estudadas.

Temperatura	Formulação	T ₀	T ₁	T ₃	T ₇	T ₁₄	T ₂₁
Ambiente	1	2,23	NR	2,21	NR	NR	NR
	2	6,0	NR	6,0	5,82	5,5	NR
	3	6,8	NR	3,67	NR	NR	NR
	4	7,5	NR	7,19	7,13	6,19	5,51
	5	7,5	7,5	7,46	7,44	7,46	7,44
Geladeira	1	2,23	NR	NR	NR	NR	NR
	2	6,0	NR	5,97	5,83	5,27	NR
	3	6,8	NR	3,58	NR	NR	NR
	4	7,5	NR	7,12	7,04	6,21	5,47
	5	7,5	7,48	7,44	7,45	7,47	7,44
Estufa	1	2,23	NR	NR	NR	NR	NR
	2	6,0	NR	5,97	5,65	5,06	NR
	3	6,8	NR	3,63	NR	NR	NR
	4	7,5	NR	6,19	6,16	5,61	5,38
	5	7,5	7,46	7,42	7,33	7,21	7,15

Sendo T₀: Análise inicial; T₁: Análise após decorridas 24horas; T₃: Análise após decorridos 3 dias; T₇: Análise após decorridos 7 dias; T₁₄: Análise após decorridos 14 dias e T₂₁: Análise após decorridos 21 dias. NR: Não realizado.

Determinação da viscosidade

Os resultados dos valores de viscosidade expressos em centipoise (cP) encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7 - Valores da viscosidade aparente, em cP, das formulações.

Temperatura	Formulação	T0	T1	T3	T7	T14	T21
Ambiente	1	2441	NR	2447	NR	NR	NR
	2	2536	NR	2546	2539	2542	NR
	3	2441	NR	5180	NR	NR	NR
	4	2408	NR	2419	2415	2418	2421
	5	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Geladeira	1	2441	NR	NR	NR	NR	NR
	2	2536	NR	2682	2689	2701	NR
	3	2443	NR	5193	NR	NR	NR
	4	2408	NR	2429	2432	2432	2427
	5	NR	NR	NR	NR	NR	NR
Estufa	1	2441	NR	NR	NR	NR	NR
	2	2536	NR	2511	2517	2515	NR
	3	2443	NR	5093	NR	NR	NR
	4	2408	NR	2410	2413	2417	2411
	5	NR	NR	NR	NR	NR	NR

Sendo T₀: Análise inicial; T₁: Análise após decorridas 24horas; T₃: Análise após decorridos 3 dias; T₇: Análise após decorridos 7 dias; T₁₄: Análise após decorridos 14 dias e T₂₁: Análise após decorridos 21 dias. NR: Não realizado.

Ensaio de Centrifugação

As emulsões em estudo de estabilidade mantiveram-se estáveis nos ensaios de centrifugação, não apresentando cremeação e separação de fases.

DISCUSSÃO

A busca pela proteção solar se intensificou nas últimas décadas quando os efeitos nocivos do sol tornaram-se mais conhecidos e divulgados. O aumento da procura pela fotoproteção tem crescido juntamente com a busca por novos produtos que possam satisfazer o mercado, trazendo a proteção ideal (Milesi & Guterres, 2002).

As emulsões são os veículos mais indicados para a preparação de filtros solares, pois apresentam uma série de vantagens das quais podemos citar: a afinidade ao manto epicutâneo, formação de película espessa sobre a pele garantindo assim maior fixação dos fotoprotetores aumentando a resistência à água, compatibilidade com diferentes faixas de pH, possibilidade para incorporação de filtros hidrossolúveis e lipossolúveis que atuam em sinergia e sensorial agradável (Dahms, 1996; Morrison, 2002;

Oliveira et al., 2004 apud Frange & Garcia, 2009; Flor et al., 2007; Chorilli et al., 2006).

Nesta pesquisa os filtros químicos utilizados foram selecionados por apresentarem estudos significativos frente à eficácia, sinergia, proteção UVA/UVB, serem amplamente utilizados em fotoprotetores industrializados e apresentarem faixas de pH compatíveis entre si, garantindo a estabilidade da formulação (Velasco et al., 2008).

Através do método espectrofotométrico desenvolvido por Mansur e colaboradores foi possível verificar que a presença do extrato seco de acerola em formulações fotoprotetoras, associada ou não aos filtros químicos metoxicinamato de octila, benzofenona-3 e ácido fenilbenzimidazol sulfônico em concentrações distintas, apresentou atividade fotoprotetora em diferentes níveis de sucesso.

Após análise dos perfis de absorção das amostras em estudo, visíveis na Tabela 2, foi possível observar que a formulação 5 apresentou a melhor performance quando comparada as demais formulações (3, 4 e 5). Sendo que a variação para os valores encontrados de FPS em t_0 e t_{21} foi de 3,77%, estando dentro dos limites de desvio padrão aceitável, abaixo de 10% (Anvisa, 2004).

Ao compararmos as formulações constituídas por extrato seco de acerola associada aos filtros químicos (3, 4 e 5) foi possível verificar valores distintos entre si. Acredita-se que essa variação na formulação 3 possa ter ocorrido por erros em dois momentos: pH final da formulação incompatível com a faixa de pH de estabilidade dos filtros químicos (pH 7,2 a 7,5); interação quimicamente negativa entre os compostos presentes na fórmula e o agente neutralizante utilizado diminuindo a estabilidade da mesma como mostra os resultados descritos na Tabela 9 (Milesi & Guterress, 2002). Também pode ser observada contaminação microbiológica (*Escherichia coli*) na Formulação 4, conforme resultados descritos na tabela 4, levando a uma possível degradação dos filtros químicos resultando na diminuição do potencial e eficácia dos produtos em relação ao FPS.

Por mais que os compostos flavonoídicos apresentem semelhança estrutural aos filtros químicos e absorção na região da radiação UV (Souza et al., 2005; Velasco et al., 2008; Rosa et al., 2008; Violante et al., 2009; Nascimento et al., 2009), a acerola não pode ser considerado uma planta com potencial fotoprotetor pois o valor do FPS encontrado foi menor que 2 (Violante et al., 2009). Porém, a presença desses compostos associados ao ácido ascórbico proporciona ao vegetal uma atividade antioxidante interessante como demonstrado por Duarte-Almeida (2006).

Para avaliação da atividade antioxidante do ativo associado aos filtros químicos, em estudo foi realizada análise qualitativa, em triplicata nos períodos pré-determinados, por meio do método de depleção do radical DPPH. Este método se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, DPPH, que ao se reduzir, perde sua coloração púrpura. Deste modo, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron oxida-se, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes.

Inicialmente foram testadas solução padrão à 50Mm para o ácido ascórbico obtendo a porcentagem de

sequestro de radicais de DPPH 13%. Os resultados foram apresentados em equivalência ao BHT/grama por este antioxidante sintético ser mais estável, frente à oxidação, quando comparado ao ácido ascórbico.

Observou-se na tabela 3 que a formulação em estudo apresentou atividade antioxidante, com sequestro de radicais livres igual a 120eq.BHT/grama em t_0 e 110eq. BHT/grama em t_{21} . Esta capacidade antioxidante deve-se, exclusivamente, aos ativos presentes na acerola, já que a emulsão constituída apenas pelos filtros químicos apresentou resultados abaixo do limite de sensibilidade do teste. Foi observada uma diminuição dos valores encontrados para análise inicial, t_0 e final, acredita-se que essa variação é decorrente de um desvio de metodologia. Assim conclui-se que a presença dos filtros químicos na formulação não gera depleção da atividade antioxidante evidenciada na acerola.

Neste estudo, optou-se por avaliar, também, a estabilidade das formulações objetivando antever possíveis alterações das amostras avaliando a capacidade do produto em manter características organolépticas, físico-químicas e microbiológicas frente às diferentes formas de armazenamento (Anvisa, 2004; Dal'Bel, 2008).

As emulsões foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerada por um período de 21 dias em condições de armazenamento segundo protocolo (Anvisa, 2004), avaliando os parâmetros organolépticos, físico-químicos e microbiológicos.

Das emulsões estudadas a que apresentou aparentemente melhor estabilidade frente ao ensaio organoléptico foi a Formulação 5, já que manteve estável as características referentes à cor, odor e homogeneidade em diferentes temperaturas de armazenamento, como descritos anteriormente. Os resultados da avaliação da estabilidade acelerada por centrifugação das formulações demonstraram que as amostras não apresentaram sinais de instabilidade (Anvisa, 2004).

O avaliação do pH é um dos parâmetros utilizados para monitorar alterações na estrutura da formulação que nem sempre são perceptíveis visualmente. Esta análise físico-química pode indicar problemas de estabilidade entre os ingredientes da formulação podendo ser reações de hidrólise e oxidação ou alterações decorrentes do processo de fabricação, como contaminação bacteriana, comprometendo a qualidade, eficácia e segurança do produto final. (Anvisa, 2004; Aulton, 2005; Masmoudi et al., 2005 apud Frange & Garcia, 2009).

Optou-se por trabalhar com diferentes pHs durante o estudo a fim de avaliar o mais apropriado para garantir estabilidade à formulação frente aos diferentes componentes e faixas de pH que eles apresentam, a compatibilidade da formulação com o pH fisiológico da pele, evitando assim, possíveis degradações dos componentes da formulação e desencadeamento de processos alérgicos durante a aplicação.

Justifica-se a escolha de pHs diferenciados para as formulações para avaliação da influência do mesmo sobre a formulação. Na Formulação 1 somente foi realizada aditivação do extrato em base pronta, sem correção do pH para 6,0. A escolha do valor de pH 6,0 foi feita, baseando-se em pH médio de compatibilidade com a pele. Verificou-se que sem a correção de pH a formulação apresentou-se

fora do limiar de compatibilidade e instável durante a análise. Na Formulação 2, foi realizada a manipulação da formulação com correção de pH. Pode ser observada maior estabilidade da formulação, neste quesito, para esta faixa de pH, na qual base e ativo tiveram comportamento melhor com o passar do tempo em comparação com a Formulação 1.

Para as formulações com os filtros solares, a escolha na Formulação 3 de pH fora do limiar ideal para um dos filtros em questão, foi idealizada para que se pleiteasse formulação de pH de maior compatibilidade com a pele. A questão apontada seria a possível instabilidade que seria ocasionada perante a estabilidade e fotoproteção desencadeada pelo pH 6,8. Sabe-se que o 2-ethylhexyl p-methoxycinnamate e a 2-hydroxy-4-methoxybenzophenone apresentam pH de estabilidade entre 4,0 a 8,0, porém o phenylbenzimidazole sulfonic acid apresenta pH de estabilidade entre 7,0 a 7,5. Verificou-se que a instabilidade foi confirmada na Formulação 3 quando comparada com as Formulações 4 e 5 (ajustadas ao pH ideal para estabilização dos filtros elencados) possivelmente desencadeada pelo último filtro citado, o phenylbenzimidazole sulfonic acid.

Uma falha nas boas práticas de fabricação comprometeu a qualidade da formulação 4. Observou-se uma redução de aproximadamente 17,5% no valor de pH entre t_0 e t_{14} que é resultado da acidificação do meio pela formação de ácidos produzido pela *Escherichia coli*, como pode ser observado na tabela 4. (Carturan & Hansen, 1998). A formulação apresentava condições favoráveis à proliferação microbiana, tais como os insumos que se tornaram substratos, valor de pH (7,5) adequado para o crescimento, já que geralmente os microrganismos preferem ambientes com pH neutro ou próximo a neutralidade e elevada concentração de água na formulação disponível para ser utilizada pelos microrganismos.

Através dos resultados da análise de viscosidade notou-se variação de valores para ambas as formulações em diferentes condições de temperatura, pelo fato da temperatura influenciar na viscosidade e comportamento reológico das formulações (Corrêa et. al., 2005).

Não é possível determinar o período exato da contaminação microbiológica, pois os processos de produção e análise de estabilidade foram terceirizados. Entretanto podemos concluir que falhas nas boas práticas de fabricação desencadeiam alterações significativas nas propriedades físico-químicas dos produtos levando a degradação dos componentes da formulação comprometendo a sua qualidade, eficácia e segurança. (Beltrami et al., 2008).

A partir dos resultados do ensaio de estabilidade acelerada foi possível verificar que a Formulação 5 apresentou maior estabilidade durante o período de 21 dias não evidenciando alterações macroscópicas, físico-químicas e microbiológicas.

Nas condições experimentais deste estudo pode-se concluir que: a *Malpighia Glabra L* (acerola) não apresenta potencial fotoprotetor, mas a presença dos compostos flavonoidicos proporciona atividade antioxidante *in vitro*. A associação do extrato seco de acerola em formulações cosméticas fotoprotetoras é de grande valia, uma vez que ambos atuam em sinergismo e se complementam na proteção contra os danos induzidos pelas radiações UV.

ABSTRACT

Determination of photoprotective and antioxidant activities in emulsions containing extract of fruit of Malpighia glabra L. (acerola)

The use of plant extracts in an attempt to protect the skin against photoaging has increased considerably, since many of these extracts have compounds with photoprotective activity or which act synergistically with sunscreens, and also have a high antioxidant potential. The aim of this study was to assess the *in vitro* antioxidant and photoprotective activities of dry acerola extract incorporated into O/W emulsions, with or without chemical sunscreen. Physicochemical and microbiological analyses were performed during stability evaluations. The emulsion containing extracts of acerola showed absorption in the UVB region, with maximum absorbance at 290nm. At the concentration used, the acerola did not exhibit $SPF \geq 2$ and thus cannot be considered a fruit with photoprotective potential, but antioxidant activity was confirmed in the formulation. The combined emulsion of acerola extract and chemical filters performed well in the stability tests and showed synergistic action in protecting the skin from being damaged by UV irradiation.

Keywords: *Malpighia glabra L.* Photoprotection. Antioxidant Activity

REFERÊNCIAS

- Aquino R, Morelli S, Tomaiano A, Pellegrino M, Saya A, Grumetto L, Puglia C, Ventura D, Bonina F. Antioxidant and photoprotective activity of a crude extract of *Calcitium reflexum* H.B.K. leaves and their major flavonoids. *J Ethnopharmacol.* 2002; 79 (2):189-91.
- Aulton ME. Delineamento de formas farmacêuticas. 2nd ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- Barth AL. Fator de proteção solar versus coeficiente de carga de filtros solares químicos: avaliação fotobiológica de uma mistura de filtros solares químicos [Dissertação]. Rio de Janeiro: Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.
- Beltrami MC, Basso R, Silva MAS, Cardoso S, Stulzer HK. Estudos de estabilidade acelerada de emulsões manipulados contendo antiviral. *Visão Acad.* 2008; 9(2):13-23.
- Bobin MF, Raymond M, Martini MC. UVA/UVB absorption properties of natural products. *Cosmet Toiletries.* 1994; 109:63-78.
- Bonina F, Puglia C, Tomaiano A, Saya A, Mulinacci N, Romani A, Vincieri FF. *In vitro*-antioxidant and *in-vivo* photoprotective effect of three lyophilized extracts of *Sedum telephium L.* leaves. *J Pharm pharmacol.* 2000; 52(10):1279-85.

- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*. 1995; 28(1):25-30.
- Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos [Internet]. Brasília: ANVISA; 2004 [citado 2010 ago 18]. Disponível em: www.anvisa.gov.br/cosméticos/guia_series.htm.
- British Pharmacopoeia. London: The Department of Health, Social Services and Public Safety; 2007. Vol. 4. Appendix XVI B.
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans C. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions; implications for their antioxidant properties. *Biochem J*. 1998; 330(Pt 3):1173-8.
- Carturan G, Hansen JA. Guia ABC – Controle Microbiológico na Indústria de Produtos de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumes; Parâmetros, metodologia analítica e orientações. São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia; 1998.
- Cavalcante ML, Rodriguez-Amaya DB. Carotenoid composition of the tropical fruits *Eugenia uniflora* and *Malpighia glabra*. In: Charalambous G (ed). *Food Science and Human Nutrition*. Amsterdam: Elsevier; 1992. p. 643-50.
- Chiu AE, Kimball AB. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. *Br J Dermatol*. 2003;149(4):681-91.
- Chorilli M, Udo MS, Cavallini ME, Leonardi GR. Desenvolvimento e estudos preliminares de estabilidade de formulações de estabilidade de formulações fotoprotetoras contendo Granlux GAI-45 TS. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2006; 27(3):237-46.
- Corrêa NM, Camargo Junior FB, Ignácio RF, Leonardi GR. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 2005; 41(1):73-8.
- Dahms GH. Escolha de emolientes e emulsificantes para produtos solares. *Cosmet Toiletries*. 1996; 8(4):63-8.
- Dal' Belo SE. Avaliação da eficácia fotoprotetora, penetração cutânea e segurança de formulações cosméticas contendo extratos de Chá Verde e *Ginkgo Biloba*. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 2008.
- Damiani E, Rosati L, Castagna R, Carloni P, Greci L. Changes in ultravioleta absorbance and hence in protective efficacy against lipid peroxidation of organic sunscreens after UVA irradiation. *J Photochem Photobiol B*. 2006;18(3):204-13.
- Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MJ, Lajolo FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciênc Tecnol Alimentos*. 2006; 26(2):446-52.
- Farmacopeia Brasileira. 4 ed. Parte 1. São Paulo: Atheneu, 1988.
- Ferrari M. Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo; 1998.
- F'Guyer S, Afaq F, Mukhtar H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2003; 19(2):56-72.
- Ferrari M, Oliveira MSC, Nakano AK, Rocha-Filho PA. Determinação do fator de proteção solar (FPS) *in vitro* e *in vivo* de emulsões com óleo de andiroba (*Carapa guianensis*). *Rev Bras Farmacogn*. 2007; 17(4):626-30.
- Flor J, Davolos MR, Correa MA. Protetores Solares. *Quim Nova*. 2007; 30 (1):153-8.
- Frange RCC, Garcia MJJ. Desenvolvimento de emulsões óleo de oliva/água: avaliação da estabilidade física. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2009; 30(3):263-71.
- Franquilino, E. Ativos amazônicos. *Cosmet Toiletries*. 2006;18:65-8.
- Garcia S, Santos EP. Avaliação FPS de produtos comerciais por método *in vitro*. *Rev Bras Farmacogn*. 1990; 71(4):99.
- Hanasaki Y, Ogawa S, Fukui S. The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Radic Biol Med*. 1994;16(4):845-50.
- Iha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro RCLR, Isaac VLB, Brunetti IL, Corrêa MA, Salgado HRN. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev Bras Farmacogn*. 2008; 18(3):387-93.
- Kim SJ. Effect of biflavones of Ginkgo Biloba against UVB-induced cytotoxicity *in vitro*. *J Dermatol*. 2001; 30:193-9.
- Korina LG, Afana'ev IB, Korina LG. Antioxidant and chelating properties of flavonoids. *Adv Pharmacol*. 1997; 38:151-63
- Mansur JS, Breder MNR, Mansur MCA, Azulay RD. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *An Bras Dermatol*. 1986; 61(3):121-4.
- Masmoudi H, Le Dréau Y, Piccerelle P, Kister J. The evaluation of cosmetic and pharmaceutical emulsions aging process using classical techniques and a new method: FTIR. *Int J Pharm*. 2005;289(1-2):117-31.
- Milesi SS, Guterress SS. Fatores determinantes da eficácia de fotoprotetores. *Cad Farm*. 2002;18(2):81-87.
- Morrison LD, Ross S. Emulsions: Colloidal dispersions – Suspensions, Emulsions and Foams. New York: John Wiley & Sons Ltda; 2002.

- Nascimento CS, Nunes LCC, Lima AAN, Júnior SG, Neto PJR. Incremento do FPS em formulação de protetor solar utilizando extratos de própolis verde e vermelha. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;90(4):334-9.
- Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quím Nova.* 2004;7(1):131-8.
- Ramos MFS, Santos EP, Bizarri CHB, Mattos HA, Padilha MRS, Duarte HM. Preliminary studies towards utilization of various plant extracts as antisolar agents. *Int J Cosmet Sci.* 1996; 18(3):87-101. DOI: 10.1111/j.1467-2494.1996.tb00140.x.
- Rosa MB, Oliveira TG, Carvalho CA, Silva FD, Carvalho LM, Nascimento PC, Peres RL. Estudo espectrofotométrico da atividade fotoprotetora de extratos aquosos de *Achillea millefolium*, *Brassica oleracea var. capitata*, *Cyperus Rotundus*, *Plectranthus barbatus*, *Porophyllum ruderale (JACQ) cass* e *Sonchus Oleraceus*. *Rev Eletr Farm.* 2008;1:101-10.
- Rosso VV. Composição de carotenóides e antocioninas em acerola. Estabilidade e atividade antioxidante em sistemas-modelo de extratos antociânicos de acerola e açaí [Dissertação]. Campinas: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2006.
- Sánchez-Moreno C, Larrauri JA, Saura-Calixto F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric.* 1998; 76(2):270-6.
- Simões CO, et al. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento.* 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/ Editora UFSC; 2004.
- Souza TM, Moreira RRD, Rangel VLBI, Pietro RCLR. Avaliação da atividade fotoprotetora de *Achillea Millefolium L.* *Rev Bras Farmacogn.* 2005; 151):36-8.
- Teske M, Trentini MMA. *Compêndio de Fototerapia.* 4th ed. Curitiba: Herbarium Laboratório Botânico; 1995.
- USP. *The United States Pharmacopeia.* 31st revision. 26th edition. Vol. 1. Washington: U.S. Pharmacopeia; 2008
- Velasco MVR, Balogh TS, Pedriali CA, Sarruf FD, Pinto CASO, Kaneko TM, Baby AR. Associação da Rutina com *p*-Metoxicinamato de Octila e Benzofenona-3: Avaliação *In Vitro* da Eficácia Fotoprotetora por Espectrofotometria de Refletância. *Lat Amer J Pharm.* 2008; 27(1):23-7.
- Vendramini ALA, Trugo LC. Phenolic Compounds in Acerola Fruit (*Malpighia puniceifolia, L.*). *J Braz Chem Soc.* 2004; 15(5):664-8.
- Violante IMP, Souza IM, Venturini CL, Ramalho AFS, Santos RAN, Ferrari M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. *Rev Bras Farmacogn.* 2009;1(2A):452-57.

Recebido em 25 de abril de 2012

Aceito em 03 de dezembro de 2012

