

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE COSMÉTICOS “ANTI-IDADE”.

ALINE TAIS FRIES¹
ANA PAULA ZANINI FRASSON²

1. Discente, Habilitação Industrial em Medicamentos, Curso de Farmácia, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul.
2. Docente, Prof. Assistente, Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, Ijuí, RS, Brasil.

Autor responsável: A.P.Z. Frasson. E-mail: afrasson@edu.unijui.br

INTRODUÇÃO

Provavelmente nenhuma das manifestações do envelhecimento seja tão visível como aquelas que envolvem a pele. Dentre os numerosos mecanismos, celulares e moleculares envolvidos no fenômeno natural do envelhecimento, outros fatores secundários (poluição, exposição à radiação UV, álcool e tabagismo) podem acelerar o processo tornando-o prematuro, com o aparecimento repentino de rugas, aspereza, falta de pigmentação e flacidez da pele. Inúmeras evidências científicas apontam os radicais livres como os principais causadores destas mudanças na pele.

Os radicais livres são moléculas ou fragmentos altamente instáveis e reativos, produzidos em pequenas quantidades durante o metabolismo celular, como na produção de energia, fagocitose, controle do crescimento celular e síntese de compostos biológicos. Os radicais livres são em sua maioria derivados do oxigênio molecular diatômico (O_2) e são conhecidos como espécies reativas de oxigênio (EROS), como por exemplo, o ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila (HO^{\cdot}), peroxila (RO_2^{\cdot}) e o óxido nítrico (NO^{\cdot}) (ABDALLA & LIMA, 2001; FONSECA et al., 2008; SOUSA et al., 2007). Contudo outros oxidantes, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio singlete (1O_2), o ácido hipocloroso ($HOCl$) e o peróxi-nitrito ($ONOO^{\cdot}$) entre outros, mesmo não sendo radicais livres, podem sofrer reações e formar radicais livres (ABDALLA & LIMA, 2001; FONSECA et al., 2008).

A existência de um desequilíbrio no organismo, com um excesso de radicais livres e/ou deficiência do sistema protetor em remover essas espécies reativas, é conhecida como estresse oxidativo e pode conduzir à oxidação das estruturas biológicas (LEITE & SARNI, 2003; MOREIRA & SHAMI, 2004; TOMINAGA, 2005). A pele está exposta a um

alto nível de estresse oxidativo causado por fontes endógenas e exógenas, pois a pele está suscetível tanto ao O_2 fornecido pela circulação sanguínea quanto ao O_2 advindo do meio ambiente (FONSECA et al., 2008).

Quando instaurado o processo de estresse oxidativo, este provoca no organismo humano uma ampla variedade de mudanças fisiológicas e bioquímicas por várias reações, principalmente com lipídios (peroxidação lipídica), DNA celular, proteínas, carboidratos e enzimas, fatores que podem ocasionar comprometimento e morte celular (ALMADA FILHO, 2002; LIU et al., 2004; LÓPEZ et al., 2001; SOUSA et al., 2007). Na pele, com o passar do tempo e a perda da capacidade do organismo de recuperar-se da ação dos radicais livres, os queratinócitos epidérmicos perdem propriedades adesivas, levando ao afinamento epidérmico e ressecamento, o que pode ser observado pela atrofia cutânea e afinamento das junções dermo-epidérmicas. Os fibroblastos da derme (colágeno e elastina) são igualmente agredidos. Com isso ocorre uma reação global que envolve o desenvolvimento de rugas de menor e maior profundidade, manchas, perda da luminosidade, perda de elasticidade e da firmeza cutânea e conseqüente flacidez, perda do viço e aumento do ressecamento da pele e nos casos mais sérios desenvolvimento de câncer basocelular ou espinocelular (BUCHLI, 2002; DUARTE, 2003; OLIVEIRA, 2002).

Para diminuir as agressões provocadas pelos radicais livres, o organismo vale-se de defesas antioxidantes endógenas usando suas próprias enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a glutationa peroxidase e a catalase, e exógenas provenientes da dieta alimentar e de produtos dermatológicos (DUARTE, 2003; OLIVEIRA, 2002; SOUSA et al., 2007). Portanto, antioxidantes são substâncias presentes no organismo que, mesmo em pequenas con-

centrações, tem a responsabilidade de inativar a formação dos radicais livres, diminuir seus efeitos e reparar o dano celular por eles provocado (ALMADA FILHO, 2002; SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999; SOUSA et al., 2007).

O desenvolvimento científico possibilitou à indústria cosmética a descoberta de vários ativos e, consequentemente, a comercialização de produtos anti-sinais, os quais propõem o combate, controle ou postergação do envelhecimento cutâneo, através principalmente da ação antioxidante contra os radicais livres (BAUMANN, 2004). Os antioxidantes tópicos empregados nos cosméticos devem ser absorvidos pela pele e liberados para o tecido-alvo na forma ativa. Sua absorção é um processo importante e dependente de fatores como a forma molecular do composto ativo, suas propriedades físico-químicas, solubilidade, pH e a base cosmética utilizada (STEINER, 2008). Muitos cosméticos anti-idade estão sendo produzidos com antioxidantes como vitamina C, vitamina E, ácido lipóico e coenzima Q10 (Ubiquinona), entre outros, sendo amplamente populares (BAUMANN, 2004).

A vitamina E e a Coenzima Q10 são antioxidantes lipossolúveis encontrados na porção lipofílica das membranas celulares (STEINER, 2008). A coenzima Q10 encontra-se em todas as células, auxiliando na produção de energia por fazer parte da cadeia de transferência de elétrons no interior das mitocôndrias (BAUMANN, 2004).

A vitamina E representa um grupo de oito substâncias lipossolúveis que compreende os tocoferóis alfa, beta, gama e delta, e os tocotrienóis alfa, beta, gama e delta, sendo a forma acetato de alfa-tocoferol tipicamente utilizada em cosméticos por se apresentar estável à temperatura ambiente e por apresentar menor probabilidade de causar dermatites de contato (ANTUNES & BIANCHI, 1999; SOUSA et al., 2007; STEINER, 2008). A vitamina E interrompe a formação dos radicais livres envolvidos na peroxidação lipídica por doar seu hidrogênio lábil, convertendo-os a uma forma menos perigosa, de fraca ou nenhuma toxicidade, protegendo da oxidação todos os lipídios e fosfolipídios da membrana (BUCHLI, 2002; DUARTE, 2003). Portanto, a vitamina E é usada topicamente para proteger as membranas celulares da peroxidação lipídica e é também, com frequência, empregada em produtos pós-sol, devido a sua ação calmante, reduzindo as queimaduras ou eritemas causados pela exposição da pele às radiações UV (BUCHLI, 2002; MAIBACH & ZHAI, 2008).

A vitamina C (ácido ascórbico) é um potente antioxidante que reage fortemente com os diversos radicais livres. Sua aplicação em produtos cosméticos possibilita níveis que não seriam possíveis alcançar com a ingestão de frutas ou suplementação oral (BAUMANN, 2004; BUCHLI, 2002; CHORILLI et al., 2007). A vitamina C pode também agir sinergicamente com a vitamina E, aumentando sua potência por doar elétrons a essa e, dessa forma,

reciclá-la para sua forma ativa (antioxidante) (BAUMANN, 2004; BUCHLI, 2002; CHORILLI et al., 2007; SOUSA et al., 2007). As preparações tópicas de ácido ascórbico podem ser formuladas em base aquosa ou oleosa. Contudo o problema dessas formulações contendo ácido ascórbico é sua instabilidade frente à exposição ao ar e à radiação UV, podendo se tornar inativas pouco tempo depois da abertura do frasco do produto. O palmitato de ascorbila, derivado lipídico da vitamina C, não causa irritação e é fotoprotetor e antiinflamatório (STEINER, 2008).

O ácido lipóico é um antioxidante solúvel em água e lipídios, absorvido na forma estável e convertido a ácido dihidrolipóico ao penetrar nas células. Dentre suas funções destacam-se a capacidade de quelar metais e eliminar radicais livres, além de regenerar antioxidantes endógenos e reparar o dano oxidante (STEINER, 2008).

Além disso, diversos estudos apontam os extratos vegetais contendo compostos fenólicos e flavonóides como detentores de atividade antioxidante sugerindo sua utilização em formulações tópicas para prevenção e tratamento dos danos causados pelos radicais livres. Diversos extratos, incorporados ou não em formulações, como própolis, *Ginkgo biloba*, *Glycyrrhiza glabra*, Isoflavin Beta, entre outros, foram avaliados e demonstraram seqüestrar diversos radicais livres (FONSECA et al., 2008; JARDINI & MANCINI FILHO, 2007; LIU et al., 2004; RAMTEKE et al., 2007; SILVA, BORGES & FERREIRA, 1999; SOUSA et al., 2007).

Muitas vezes, as indústrias preferem associar antioxidantes a ativos com diferentes funções, em seus cosméticos anti-idade, para um efeito combinado. Assim, além de combater o envelhecimento precoce com a inibição dos radicais livres, o produto pode proporcionar elasticidade e firmeza à pele. São exemplos, agentes como o colágeno e a elastina, proteínas fibrosas que proporcionam hidratação. Já o ácido glicólico é um alfa-hidróxi-ácido (AHA) com grande poder de penetração intracelular, que promove a remoção de corneócitos (células mortas), além de estimular a biossíntese das glicosaminoglicanas dérmicas e de outras substâncias intracelulares que podem ser responsáveis pela erradicação de finas rugas (GUIRRO & GUIRRO, 2004). Outros ativos utilizados no tratamento do envelhecimento cutâneo são o ácido retinóico, DMAE, retinol, Argireline®, polifenóis, entre outros.

O desenvolvimento de um produto antioxidante tópico é complexo, pois há vários fatores que podem influenciar no desempenho da formulação quando aplicado à pele. O conhecimento desses parâmetros irá permitir o desenvolvimento de formulações ideais, sendo de total responsabilidade da empresa a realização dos testes que comprovem a eficácia e a segurança de seus produtos (FONSECA et al., 2008; NEVES, 2008). A avaliação da eficácia de um produto (estudos *in vivo*) deve sempre ocorrer após as etapas de

comprovação da estabilidade físico-química, da qualidade microbiológica e da segurança clínica (NEVES, 2008).

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) não determina metodologias específicas para os testes de eficácia, sendo a escolha do método estabelecido pela própria empresa que fica sujeita à avaliação da agência. Os métodos de avaliação para os produtos com apelo antioxidante incluem muitas vezes métodos *in vitro*, baseados em modelos eletroquímicos ou modernos métodos *in vivo*, fundamentados na ressonância eletrônica paramagnética. Em contrapartida, a avaliação do tratamento dos sinais da idade, como rugas e linhas de expressão, pode ser feita por meio de técnicas de topografia digital e profilometria, através das quais avalia-se a redução da intensidade das linhas, caracterizada pelo número de linhas por unidade de área superficial da pele do rosto e por sua profundidade (NEVES, 2008).

Para a determinação da atividade antioxidante em formulações são utilizados como métodos a inibição da peroxidação lipídica, inibição da quimioluminescência e o seqüestro do radical DPPH, entre outros, sendo o método do DPPH considerado o mais prático, rápido e estável (ESPIN, 2000; FONSECA et al., 2008). Há um grande interesse das indústrias em mensurar a atividade antioxidante produzida por seus produtos, principalmente pela evidência de que os radicais livres são espécies oxidantes relacionadas às ações danosas à pele e ao envelhecimento, como uma forma de agregar valor comercial e terapêutico aos produtos (ALMEIDA et al., 2008).

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a propriedade antioxidante de cremes cosméticos anti-idade, utilizados para prevenir e tratar o envelhecimento precoce da pele, por meio da capacidade de seqüestrar o radical livre estável – DPPH. Este método baseia-se na redução do radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), em solução alcoólica na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio. Este radical captura os hidrogênios sofrendo descoloração, isto é, mudando a coloração de violeta para amarelo, e assim passando para sua forma estável DPPH-H (LIU et al., 2004; MENSOR et al., 2001; MOLYNEUX, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras: Foram utilizadas quatro amostras de cremes anti-idade, os quais são livremente comercializados em todo o país, denominados amostras 1, 2, 3 e 4.

Determinação da atividade antioxidante:

Foram pesados 2,5g de cada amostra de creme acima citados e diluídos de modo a obter as concentrações de 10; 2; 1; 0,5 e 0,25 mg/mL. A alíquotas de 2,5ml de cada uma das concentrações foi adicionado 1ml da solução metanólica de DPPH (Sigma-Aldrich) a 0,3mM. Após 30min, a absorbância foi medida no comprimento de onda de 517nm, para quantificação da descoloração, utilizando metanol para zerar o espectrofotômetro (Femto 700 Plus®). Fez-se também a comparação dos resultados com os padrões rutina e BHT (butil hidroxitolueno), nas mesmas concentrações das amostras.

A absorbância da solução de DPPH 0,3 mM, foi medida como controle para comparação e avaliação do decréscimo da atividade óptica do DPPH. Como branco utilizou-se cada diluição dos cremes sem a adição de DPPH. Os experimentos foram realizados em duplicata, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, para evitar o risco de degradação das moléculas analisadas. O percentual de inibição do radical DPPH nas amostras foi calculado pela equação: % de redução de DPPH = $[(Ab - Aa)/Ab] \times 100$, onde Ab = absorbância do branco (t = 0 min); Aa = absorbância da amostra (t = 30 min), (MENSOR et al., 2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A capacidade de seqüestrar o radical DPPH, expressa em percentual de inibição, exibida pelos cremes anti-idade em estudo, encontram-se na Tabela 1.

Com base nestes dados, evidencia-se que algum(ns) componente(s) dos cremes atua(m) como doador(es) de hidrogênio ao radical, entretanto esta ação é diferencia-

Tabela 1. Capacidade de seqüestrar o radical DPPH (% de inibição)

Concentrações das amostras	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Rutina	BHT
10 mg/ml	75,67	70,37	47,81	62,14	85,50	94,41
2 mg/ml	70,92	72,73	66,72	72,43	95,63	94,41
1 mg/ml	71,00	70,37	68,78	66,51	95,50	94,32
0,5 mg/ml	70,16	70,71	68,19	70,33	94,70	94,11
0,25 mg/ml	70,63	69,99	68,78	66,26	94,53	93,48

da e variada entre os cremes. As amostras 1 e 2 foram, respectivamente, as mais eficazes em seqüestrar o radical livre, cujo percentual de inibição foi superior a 70%, em comparação as amostras 3 e 4, que apresentaram valores inferiores. Observou-se também, uma superioridade do potencial antioxidante dos padrões BHT e rutina, acima de 85%, em comparação aos cremes testados.

O estudo da atividade antioxidante dos cremes anti-idade demonstrou uma ligeira superioridade da amostra 1, o que está relacionado aos componentes de sua fórmula, já que o método do DPPH avalia a capacidade do antioxidante de doar hidrogênio o que depende fundamentalmente da sua estrutura química.

A amostra 1 contém acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) e, segundo Maibach & Zhai (2008), este componente já foi testado em outros estudos e apresentou ação antioxidante superior ao veículo de controle *in vitro*, quando empregado em uma emulsão. A vitamina E tem demonstrado em vários estudos ser um potente seqüestrador de diversos radicais livres o que justificaria sua utilização na amostra (FONSECA et al., 2008).

A amostra 2 possui extratos vegetais o que pode ter contribuído para a sua performance, visto que estes extratos podem conter compostos fenólicos e flavonóides em sua composição, os quais têm apresentado atividade antioxidante e são considerados boas alternativas para serem empregados em formulações tópicas para a prevenção e/ou tratamento dos danos causados pelos radicais livres (FONSECA et al., 2008).

A amostra 3 possui em sua fórmula dois componentes antioxidantes o acetato de alfa-tocoferol (vitamina E) e a coenzima Q10 (Ubiquinona). A posição ligeiramente inferior da amostra 3, mesmo contendo dois antioxidantes em relação as amostras anteriores, demonstra a necessidade de estudos sobre os antioxidantes e a formulação onde estes antioxidantes serão incorporados para evitar reações químicas indesejáveis e que possam comprometer o efeito do produto.

A amostra 4 apresenta extrato de folhas de oliva como componente antioxidante na fórmula, o que possivelmente lhe rendeu resultado inferior em comparação às demais amostras. Ao trabalhar com extratos naturais, algumas dificuldades podem surgir como grande quantidade de componentes ativos presentes no extrato que podem variar dependendo da região e da época de coleta da planta e a quantidade de extrato empregado no creme ser inferior ao necessário para produzir um efeito antioxidante ideal (FONSECA et al., 2008).

Portanto, para estabelecer uma relação direta de cada grupo(s) ou composto(s) antioxidante(s) presente(s) nos cremes anti-idade avaliados é necessário um estudo específico, visto que os cremes apresentam grande varia-

bilidade quanto aos compostos antioxidantes empregados e ainda, esses não são especificados quantitativamente na rotulagem.

CONCLUSÕES

Todos os cremes estudados apresentaram propriedade antioxidante, entretanto a intensidade desta ação foi diferenciada entre eles. A amostra 1 apresentou maior efeito antioxidante do que as demais amostras analisadas, porém inferior aos padrões utilizados como referência. No entanto, frente à ação antioxidante exibida, todas as amostras podem beneficiar aos usuários no combate ao envelhecimento pela inibição dos radicais livres. Entretanto, é fundamental saber mais sobre os ativos anti-envelhecimento, conhecer intimamente o estado da pele a ser tratada e se respaldar de conselhos profissionais idôneos, antes de utilizar qualquer cosmético anti-idade. Também é de grande importância analisar se o fabricante investe na qualidade, segurança e eficácia, e se faz uma divulgação transparente dos benefícios de seus produtos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDALLA, D.S.P.; LIMA, E.S. **Peroxidação Lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, São Paulo, v. 37, n. 3, 2001.
- ALMADA FILHO, C.M. Antioxidantes e Radicais Livres. In: CANÇADO, F.A.X. et al. **Tratado de Geriatria e Gerontologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 744-748.
- ALMEIDA et al. Atividade Antioxidante de Extratos de Passiflora sp (maracujá) por ORAC. **Cosmetics & Toiletries**. São Paulo, v. 20, p. 54-59, jul./ago. 2008.
- ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, 1999.
- BAUMANN, L. **Dermatologia Cosmética: Princípios e Práticas**. Rio de Janeiro: Revinter, 2004.
- BUCHLI, L. Radicais Livres e Antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**. São Paulo, v. 14, p. 54-57, 2002.
- CHORILLI, M. et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Conceitos Fundamentais para Aplicação em Formulações Farmacêuticas e Cosméticas. **Revista Brasileira de Farmácia**. v. 88, n. 3, p. 113-118, 2007.
- DUARTE, A.C. **Semiologia Imunológica Nutricional**. Rio de Janeiro: Axcel Books, 2003. 253pag.

- ESPIN, J.C. et al. Anthocyanin-based natural colorants: A new source of antiradical activity for foodstuff. **J Agric Food Chem**, v. 48, p. 1588-1592. 2000.
- FONSECA, M.J.V. et al. Desenvolvimento de Formulações Tópicas Antioxidantes. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, p. 64-68, 2008.
- GUIRRO, E.; GUIRRO, R. **Fisioterapia Dermato-Funcional**. 3 ed. Barueri: Manole, 2004.
- JARDINI, F.A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Rev. Bras. Cienc. Farm.** v. 43, n. 1, p. 137-147, 2007.
- LEITE, H.P.; SARNI, R.S. Radicais Livres, Anti-oxidantes e Nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, São Paulo, v. 18, n. 2, abr./mai./jun. 2003.
- LIU, J; HU, L.; DONG, Z. et al. DPPH radical scavenging activity of ten natural p-terphenyl derivatives obtained from three edible mushrooms indigenous to China. **Chemistry & Biodiversity**. v.1, p. 601-605, 2004.
- LÓPEZ, J.R. M. et al. Radicales Libres en la Biomedicina y Estrés Oxidativo. **Revista Cubana de Medicina Militar**, La Habana, v. 30, n. 1, 2001.
- MAIBACH, H.I.; ZHAI, H. Antioxidante inibe eritema por UV, *in vivo*, em Humanos. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, p. 44-47, jul./ago. 2008.
- MENSOR, L.L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**. v. 15, p. 127-130. 2001.
- MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J. Sci. Technol.** v. 26, n 2, 2004.
- MOREIRA, E.A.M.; SHAMI, N.J.E. Licopeno como Agente Antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n.2, p. 227-236, abr./jun. 2004.
- NEVES, K. Cumprir o que Promete. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, p. 23-29, set./out. 2008.
- OLIVEIRA, J.M. Fundamentos dos Radicais Livres. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 14, p. 40-45, 2002.
- RAMTEKE, A.; HASNU, S.; BORAH, S. et al. In Vitro Study of DPPH Radical Scavenging Activity of Leaf Extracts of *Physalis minima* Linn. **ICFAI Journal of Biotechnology**, v. 1, n. 2, 2007.
- SILVA, F.A.M.; BORGES, M.F.M.; FERREIRA, M.A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quím. Nova**. São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.
- SOUSA, C.M.M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- STEINER, D. Antioxidantes em Cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v. 20, p. 36, 2008.
- TOMINAGA, H.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, T. et al. DPPH radical-scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives. **Yakugaku Zasshi**. V. 125, n. 4, p. 371-375, 2005.