

PREPARO DE CREME CONTENDO EXTRATOS PADRONIZADOS DE *Alternanthera tenella* E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.

Jáci da Rocha Coelho¹, Jemima Daniela Dias Moraes¹, Marcos José Salvador^{1,2}

¹Universidade do Vale do Paraíba, Faculdade de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos-SP; ²Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP),

²Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Curso de Farmácia, Caixa Postal 6109, CEP 13083-970, Campinas (SP), Brasil, marcosjs@unicamp.br

Resumo: Este estudo teve por objetivo o preparo de creme contendo extratos padronizados de *Alternanthera tenella*, uma planta brasileira com potencial atividade antimicrobiana e antioxidante e avaliação da atividade antioxidante da preparação obtida. Para tanto foram utilizados como líquidos extratores metanol e hexano e o processo de extração por maceração. A atividade antioxidante foi avaliada *in vitro* empregando o ensaio de redução do radical DPPH e, para o extrato e formulações ativos, procedeu-se a quantificação de fenólicos totais solúveis utilizando o ensaio Folin-Ciocalteu. Os resultados mostraram que o creme contendo o extrato etanólico de *A. tenella* obtido por maceração apresentou promissora atividade antioxidante *in vitro*.

Área do Conhecimento: Farmácia

Palavras-chave: Antioxidante, extratos padronizados, *Alternanthera tenella*, formulação creme.

Introdução

A família Amaranthaceae possui plantas promissoras quanto a atividades biológicas (antibacteriana, antifúngica, tripanocida, leishmanicida, antiinflamatória, imunomodulatória, etc) e algumas são utilizadas na medicina popular e como alimento (SIQUEIRA, 1987ab), apresentando-se, portanto, como matrizes potenciais para a busca de antioxidantes naturais uma vez que há trabalhos (KIM *et al.*, 2004; HAVSTEEN, 2002) sugerindo relação, por exemplo, entre a ocorrência de polifenóis, propriedades farmacológicas (antiinflamatória e imunomodulatória) e a capacidade de sequestrar radicais livres. Sabe-se que os radicais livres podem participar da gênese de várias patologias como: doenças degenerativas e câncer. Apesar disto, poucas espécies de Amaranthaceae têm sido estudadas a fim de se avaliar seu potencial antioxidante (SALVADOR *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2003).

Estudos fitoquímicos realizados com algumas espécies de Amaranthaceae mostraram a ocorrência de alcalóides, betalainas, betaxantina, ecdisteróides, flavonóides, saponinas e terpenóides (SALVADOR, 2005; SALVADOR & DIAS, 2004; BROCHADO *et al.*, 2003; CAI *et al.*,

2003; 1998^{a,b}; SALVADOR, 2002; POMILIO *et al.*, 1992).

Assim, neste estudo procedeu-se o preparo de extratos padronizados de *Alternanthera tenella* e o desenvolvimento de formulações de creme contendo os extratos ativos e a avaliação da atividade antioxidante das preparações obtidas.

Material e Métodos

- Preparo do extrato

Para o preparo do extrato foi utilizado o método de maceração e metanol como solvente extrator. Para tanto, utilizou-se 1,0g de pó vegetal e 20mL de solvente extrator (metanol), sendo a mistura deixada em repouso por 720 ou 1440 minutos de extração, em frasco fechado, a temperatura ambiente, seguindo metodologia descrita por (SCHINOR *et al.* 2004). Todos os procedimentos foram realizados em triplicata. Após homogeneização, filtragem e evaporação do solvente em fluxo de ar os extratos foram pesados e determinou-se a eficiência de extração em termos de massa (g) e submetidos ao ensaio antioxidante. Os extratos ativos foram incorporados em formulações de creme desenvolvidas

- Preparação das formulações creme

Na formulação farmacêutica contendo os extratos vegetais bioativos foi determinado a estabilidade e o pH das preparações obtidas (GEORGETTI *et al.*, 2006; ANVISA 2004; ANSEL *et al.*, 1999; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988; PRISTA & ALVES, 1967). Os extratos bioativos foram incorporados a formulação creme nas seguintes concentrações: 100 / 50 e 5 µg/ ml . Para o preparo da formulação foram utilizados os seguintes reagentes: **Fase oleosa**; cosmovax 12%, solan50 2%, crodalanLA 1,5%, Nipazol 0,15%, vaselina líquida 3% e propilenoglicol 5%.

Fase aquosa; sorbitol 7%, Nipagin 0,2% e água destilada q.s.p, sendo manipulado seguindo as exigências das boas práticas em farmácia magistral. Foram pesados todos os reagentes. O extrato de *A.tenella* foi adicionado ao propilenoglicol homogeneizando-se. Em dois bicos de Bunsen foram elaboradas simultaneamente as fases aquosa e oleosa da seguinte forma: fase oleosa – foi levado ao aquecimento até 70°C o Cosmovax, Solan50 e Crodalan LA, sendo adicionado fora do aquecimento a vaselina líquida, o Nipazol e o propilenoglicol contendo o extrato. Na fase aquosa foi levado ao aquecimento à mesma temperatura da fase oleosa, a água destilada e o Nipagin, sendo adicionado fora o Sorbitol. Em seguida foi vertida a fase aquosa na fase oleosa e procedido à homogeneização até obter-se a consistência necessária do creme.

- Avaliação da atividade antioxidante in vitro

O radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Para tanto, os extratos ou formulações creme (5,20 mg) foram dissolvidos em etanol (1 mL), obtendo-se uma solução estoque. Para cada amostra (10 µL) foram adicionados 100 µL de etanol, 100 µL de tampão fosfato (100 mM) e 50 µL de solução de DPPH (250 µM). Decorridos 30 min a absorbância foi medida em espectrofotômetro ($\lambda=517\text{nm}$) e a porcentagem de redução do radical foi calculada pela equação: $\% \text{redução} = 100 - [(Abs. \text{ Amostra} - Abs. \text{ controle negativo}) / Abs. \text{ controle DPPH} - Abs. \text{ controle negativo}] \times 100$ (HUANG; OU; PRIOR, 2005; CUENDET *et al.*, 1997). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras e como controle positivo o flavonóide quercetina (50 ppm). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

- Avaliação do conteúdo de fenólicos totais solúveis

Os extratos e formulações creme foram analisados quanto ao seu conteúdo de fenólicos totais solúveis utilizando o método colorimétrico Folin-Ciocalteu (PICCINELLI *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2004). Para tanto, os extratos e formulações foram solubilizados em metanol, sendo preparados na concentração de 200 ppm. Para a substância de referência (ácido gálico) foi elaborada curva analítica na concentração de 20, 40, 60, 80, 100 e 200 ppm. A absorbância das amostras e amostra-padrão foi medida em espectrofotômetro ($\lambda=730\text{ nm}$) e os resultados foram expressos como mg de ácido gálico equivalentes (AGE) por grama de extrato ou creme em base seca (mg de AGE/g). Como controle negativo foi utilizado o diluente das amostras. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Resultados

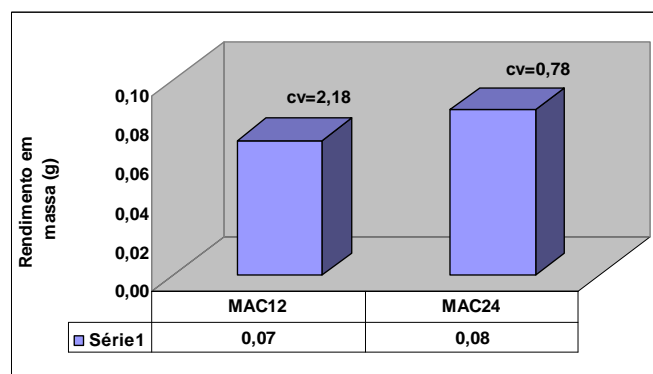


Figura 1: Rendimento em massa obtido através do método da maceração

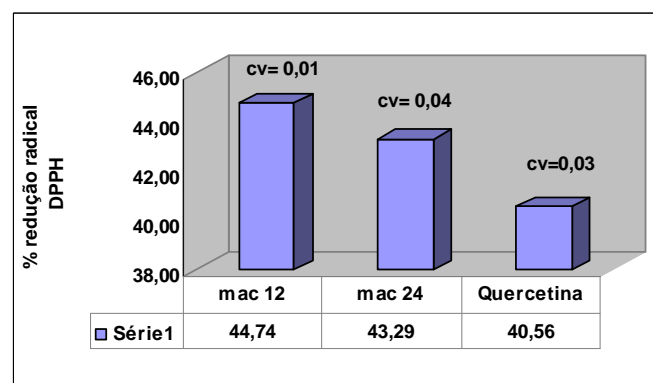


Figura 2: Redução do radical DPPH dos extratos padronizados.

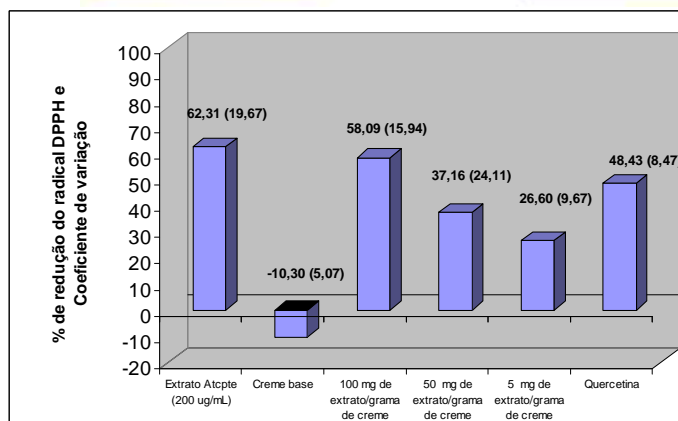


Figura 3: %de redução de DPPH e Coeficiente de variação

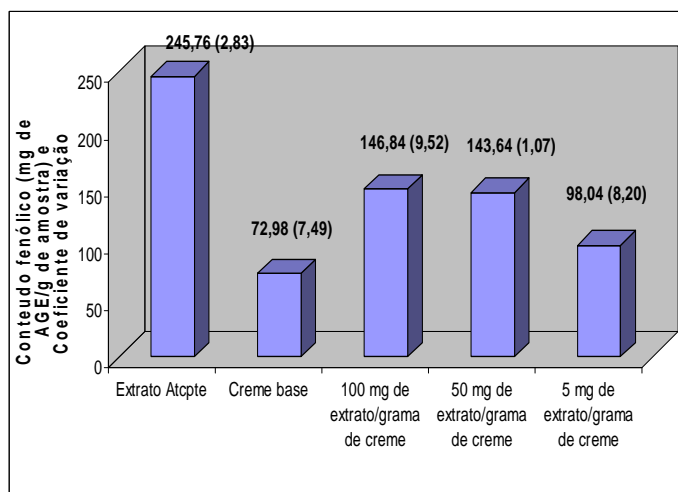


Figura 4: Conteúdo fenólico e Coeficiente de Variação.



Figura 5: Estabilidade dos cremes contendo extratos.

Discussão

Os danos oxidativos induzidos nas células e tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas e lesão ao DNA causando mutagenese e carcinogenese. Os **radicais livres** (substâncias que sofrem oxidação em detrimento de outra que seria importante que permanecesse no estado de oxidação natural) são muitas das vezes responsáveis por essas patologias. Com base nessas afirmações é relevante o estudo de substâncias com potencial atividade antioxidante. Sendo essas substâncias presentes nos vegetais, os mais ativos e frequentemente encontrados são os compostos fenólicos. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídos à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DECKER, 1997). O estudo realizado foi desenvolvido em função da comprovação da existência desses compostos fenólicos com atividade antioxidante através dos diferentes métodos já citados acima e comentados a seguir.

O experimento realizado mostrou que os rendimentos em massa obtidos na extração por maceração 12 e 24 horas apresentaram valores próximos entre si para a extração com metanol (figura 1). Quanto à atividade antioxidante, reduziram o radical DPPH os extratos metanólicos obtidos pelo método de maceração (figura 2), observando correlação entre o conteúdo de fenólicos totais do extrato e a atividade antioxidante.

O radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) é estável, de coloração púrpura, porém quando reduzido passa a ter coloração amarela. Através deste ensaio foi avaliada a capacidade das amostras-teste e amostra-padrão de reduzir o radical DPPH. Quanto a atividade antioxidante, os experimentos mostraram uma atividade maior na formulação contendo a maior concentração de extrato (100mg/g) seguido das concentrações de 50mg/g e 5mg/g obedecendo uma proporcionalidade na dose / resposta. Observou-se também que o creme base mostrou uma atividade negativa quanto à atividade antioxidante não interferindo na atividade do extrato (figura 3).

Foi verificada a ocorrência de polifenóis através do ensaio fenólicos totais com o reagente de Folin Ciocalteu (FCR) do extrato bruto e das formulações contendo extrato em diferentes concentrações. Observou-se correlação entre a atividade antioxidantes destas preparações farmacêuticas e o conteúdo de fenólicos totais solúveis (figuras 3 e 4).

Através do ensaio de estabilidade realizado com as preparações obtidas, nas concentrações

de 100mg/g, 50mg/g e 5mg/g, pode se verificar que a formulação creme contendo os extratos padronizado obtiveram a estabilidade desejada como pode ser observado através da figura 5.

Conclusão

Os resultados mostraram que o extrato metanólico (maceração) de *Alternanthera tenella* apresenta atividade antioxidante frente a redução do radical DPPH, com manutenção desta atividade quando este extrato foi incorporado em formulação farmacêutica creme, a qual se manteve estável no teste de estabilidade empregado. Foi possível observar-se também uma relação direta entre a atividade antioxidante e a ocorrência de fenólicos totais solúveis nas preparações obtidas.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira pela identificação do material vegetal e à FAPESP, FAEPEX e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- BROCHADO, C.O.; de ALMEIDA, A.P.; BARRETO, B.P.; COSTA, L.P.; RIBEIRO, L.S.; PEREIRA, R.L. da C.; GONÇALVES-KOATZ, V.L.; COSTA, S.S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. *J. Braz. Chem. Soc.*, **14**: 449-451, 2003.
- CAI, Y.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity of betalains from plants of the Amaranthaceae. *J. Agric. Food Chem.*, **51**: 2288-2294, 2003.
- CAI, Y.; SUN, M.; WU, H.; HUANG, R.; CORKE, H. Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse *Amaranthus* species. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 2063-2070, 1998^b.
- CUENDET, M.; HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; DYATMIKO, W. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. *Helectica Chimica Acta*, **80**: 1144-1152, 1997.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharm. Ther.*, **96**: 67-202, 2002.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, **53**: 1841-1856, 2005.
- KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S.S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J. Pharmacol. Sci.*, **96**: 229-245, 2004.
- POMILIO, A.B.; BUSCHI, C.A.; TOMES, C.N.; VIALE, A.A. Antimicrobial constituents of *Gomphrena martiana* and *Gomphrena boliviana*. *J. Ethnopharmacol.*, **36**: 155-161, 1992.
- SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). *Biochem. Syst. Ecol.*, **32**: 107-110, 2004.
- SALVADOR, M.J. *Estudo químico, biológico e biotecnológico de Alternanthera maritima e Alternanthera tenella* (Gomphreneae, Amaranthaceae). 2005. 410p. Doutorado (Doutorado em Ciências - Área Química), Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC Quantitative Analysis of Antioxidant Flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z. Naturforschung*, **61c**: 000-000, 2006.
- SIQUEIRA, J.C.. Flora do estado de Goiás, coleção Rizzo, V.12, Amaranthaceae. *Goiania: CEGRAF-UFG*, 1989. 44p.
- SIMÕES, C.M.O; GUERRA, M.P...[et al.]. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5^a ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.

