

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**EFEITO DE BIOATIVOS NATURAIS SOBRE A INIBICAO DE
ENZIMAS-CHAVE PARA O DESENVOLVIMENTO DE
BIOCOSMÉTICOS**

Bolsista: Lorena dos Santos Santarém

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0030/2012

EFEITO DE BIOATIVOS NATURAIS SOBRE A INIBICAO DE ENZIMAS-
CHAVE PARA O DESENVOLVIMENTO DE BIOCOSMÉTICOS

Bolsista: Lorena dos Santos Santarém

Orientador: Prof^o Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2013

RESUMO

A biodiversidade amazônica é rica em recursos naturais ainda pouco explorados, principalmente do ponto de vista biotecnológico. Dentre as diversas opções biotecnológicas possíveis, a formulação de biocosméticos, contendo como princípios ativos, produtos da biodiversidade amazônica, parece ser uma das possibilidades mais viáveis para aproveitamento desses produtos. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo com extratos (58) a partir de plantas da Amazônia visando à aplicação em formulações dermocosméticas. Estes bioativos foram avaliados quanto ao potencial antioxidante por meio do teste de varredura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), dosagem de fenóis totais, flavonóides totais, caracterização da absorção na região do ultravioleta, além da inibição de enzimas-chave em processos ligados ao envelhecimento celular como tirosinase e colagenase *in vitro*. Vários dos extratos analisados apresentaram elevado conteúdo de fenóis totais e atividade antioxidante com destaque para o Piquiá e bacuri. Nenhum dos extratos testados demonstrou significativa atividade inibitória para colagenase ou tirosinase. Em relação a atividade fotoprotetora dos extratos, destacou-se o extrato de semente de Bacurizinho. Com a realização do trabalho foram identificados extratos com atividade biológica relevante para o desenvolvimento de novos biocosméticos, demonstrando que a busca de inibidores de enzimas a partir de extratos de plantas pode ser uma ferramenta importante para o desenvolvimento de cosméticos.

Palavras-chave: Amazônia, Plantas, Bioativos, Biocosméticos, Enzimas.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.....13
Tabela 2.....18
Tabela 3.....24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Componentes da pele	11
Figura 2 – Regeneração da pele após tratamento estético.....	12
Figura 3 – Concentração de fenóis totais (%).....	21
Figura 4 – Atividade antioxidante (IC ₅₀).....	22
Figura 5 – Concentração de flavonóides totais (%).....	23
Figura 6 – Espectro de absorção de extrato de semente de Bacurizinho.....	28
Figura 7 - Inibição da atividade da collagenase por zimografia.....	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	07
2	OBJETIVOS	08
2.1	Objetivo Geral	08
2.2	Objetivos Específicos	08
3	REVISÃO DA LITERATURA	09
4	MATERIAIS E METODOLOGIA	13
4.1	Escolha dos bioativos	13
4.2	Atividade sequestrante do radical DPPH	15
4.3	Determinação de fenóis totais	15
4.4	Determinação de flavonóides totais	16
4.5	Identificação de colagenase por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida	16
4.8	Ensaio da atividade inibitória sobre a tirosinase <i>in vitro</i>	17
4.9	Avaliação de fotoproteção dos extratos <i>in vitro</i>	17
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6	CONCLUSÃO	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é uma região rica em variedades de plantas, animais e espécies, sendo um ambiente de exploração do homem, buscando melhorias em fármacos, cosméticos e produtos já existentes. Atualmente, a utilização de produtos de origem vegetal tem apresentado-se promissora devido à sua composição fitoquímica, que atua sobre compostos livres e reativos e previne sinais da pele (BARREIRO, 1989; LOPES *et al.*, 2010).

O conhecimento acumulado nos últimos anos sobre o envelhecimento cutâneo tem permitido uma melhor compreensão do mecanismo de ação dos vários componentes da pele. Nesse contexto, algumas enzimas, como a tirosinase, colagenase, elastase e hialuronidase têm sido amplamente reconhecidas como alvos poderosos para a ação de agentes antienvelhecimento ou protetores das características saudáveis da pele (THRING *et al.*, 2010).

Pelo fato dessas enzimas estarem presentes na matriz extracelular e promoverem, por exemplo, a degradação de colágeno, elastina, ácido hialurônico e tirosina que são componentes cruciais da derme, elas parecem estar envolvidas na perda da firmeza, da elasticidade e do tônus da pele (THRING *et al.*, 2009). Desse modo, a inibição de algumas enzimas é tida como alvo poderoso para a ação de agentes antienvelhecimento pelo fato das enzimas colagenase, elastase, hialuronidase e tirosinase estarem presentes na matriz extracelular e promoverem a degradação de componentes da derme envolvidos na perda da firmeza, da elasticidade e do tônus da pele (JACKSON *et al.*, 2010; THRING *et al.*, 2009).

Portanto, a identificação de extratos com potencial inibitório destas enzimas para utilização no desenvolvimento de novos biocosméticos com atividade biológica relevante comprovada através de metodologia científica, contribui para o desenvolvimento da região amazônica no que se refere à exploração das suas riquezas naturais (LOPES *et al.*, 2010).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito de bioativos naturais sobre a inibição de enzimas-chave no desenvolvimento de biocosméticos.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar o teor de fenólicos e flavonóides em extratos de plantas da Amazônia.
- Avaliar o potencial antioxidante de extratos de plantas da Amazônia.
- Determinar o efeito inibitório de extratos de plantas da Amazônia sobre a atividade das enzimas tirosinase e colagenase *in vitro*.
- Estudar a relação entre o teor de fenóis e flavonóides totais com a inibição das enzimas tirosinase e colagenase.
- Avaliar a atividade fotoprotetora de extratos de plantas da Amazônia.

3 REVISÃO DA LITERATURA

A pele humana, constituída pelas camadas epiderme, derme e hipoderme, é um órgão complexo, responsável por diversas funções fundamentais à vida. Além de proteger o corpo humano da ação de agentes físicos, químicos e biológicos, a pele é responsável pela sensibilidade táctil. (MARTHO, 2006).

É uma membrana de camada dupla que envolve toda a superfície exterior do corpo, estendendo-se pelos vários orifícios naturais por meio das membranas mucosas que o revestem. Devido sua complexa estrutura, pode exercer diversas funções, como: manutenção da sua própria integridade e dos tecidos, absorção e secreção de líquidos, controle da temperatura corpórea, barreira à prova de água, absorção de luz ultravioleta, protegendo o organismo de seus efeitos nocivos, metabolismo de vitamina D, funções estéticas e sensoriais. (HARRIS, 2003).

A pele é considerada o maior órgão do corpo humano e é formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica que se arranjam em três camadas: epiderme, derme e hipoderme. Constitui uma barreira eficiente contra agressores exógenos, de natureza química ou biológica e impede a perda de água e proteínas para o meio exterior (SOUZA & VARGAS, 2004)

A derme é formada por fibras colágenas e fibras elásticas, inclusas na substância fundamental amorfa, todas produzidas pelos fibroblastos. Na derme encontram-se vasos, nervos e músculos eretores do pelo, além dos anexos cutâneos (FREEDEBERG *et al.*, 2005).

O envelhecimento da pele pode ocorrer devido ao processo natural de envelhecimento do organismo, no qual ele perde gradualmente as suas funções vitais ou então pela atuação de agentes exógenos na desorganização do funcionamento pleno desta estrutura. São exemplos: o sol, tabaco, álcool e poluição. Nestes processos verificam-se a diminuição da síntese de colágeno, elastina, menor regeneração celular, diminuição das defesas antioxidantes e outras alterações (GIANNOCARO, 2007; MAGALHÃES, 2000).

O colágeno é a proteína mais abundante na pele e tem funções relacionadas à manutenção da estrutura integral da pele, adesão celular e migração celular, remodelação recidual e é responsável pela capacidade da pele de proteger o corpo a agentes externos e cicatrização de feridas (CHOI *et al.*, 2009).

É sintetizado por diversas células, incluindo os fibroblastos e os miofibroblastos, células da musculatura lisa e várias células epiteliais. A molécula básica do colágeno é o monômero tropocolágeno e sua síntese é dependente dessa substância (um precursor insolúvel secretado pelos fibroblastos) no meio intracelular, onde é degradado pela enzima colagenase a um monômero solúvel formado por três cadeias pró-alfa. Na pele encontra-se organizado basicamente em camadas laminares de fibrilas, traçados em diversos ângulos (HARRIS, 2003).

As colagenases são metaloproteases capazes de clivar o colágeno. Tal enzima cliva a ligação X-Gli de colágeno e também peptídeos sintéticos que contêm a seqüência-Pro-X-Gli-Pro, onde X é quase nenhum ácido aminado, desde que o amino-terminal esteja bloqueado (THRING *et al.*, 2009).

A enzima colagenase da bactéria *Clostridium histolyticum* é também capaz de degradar a matriz extracelular, pois hidrolisa em tripla hélice o colágeno em condições fisiológicas e *in vitro* usando peptídeos sintéticos como substratos (THRING *et al.*, 2009).

As fibras elásticas são responsáveis pelas propriedades retráteis da pele. São formadas por dois diferentes tipos de estrutura, a elastina e as microfibrilas. A elastina é a proteína principal, encontrada na matriz extracelular. Devido às suas propriedades únicas de recolhimento elástico, é fundamental para dar elasticidade das artérias, pulmões, ligamentos e pele (HARRIS, 2003; THRING *et al.*, 2009).

A elastase é a enzima responsável principalmente pela quebra da elastina. Ela pode decompor a elastina, bem como ter uma ampla gama de substratos incluindo a capacidade de unir fibronectina, colágeno e outras proteínas da matriz extracelular. Como as metaloproteinases, em condições normais, a atividade da elastase é necessária, depois de degradar proteínas estranhas dentro da matriz extra celular durante a fagocitose por neutrófilos para permitir que o tecido seja reparado (THRING *et al.*, 2009).

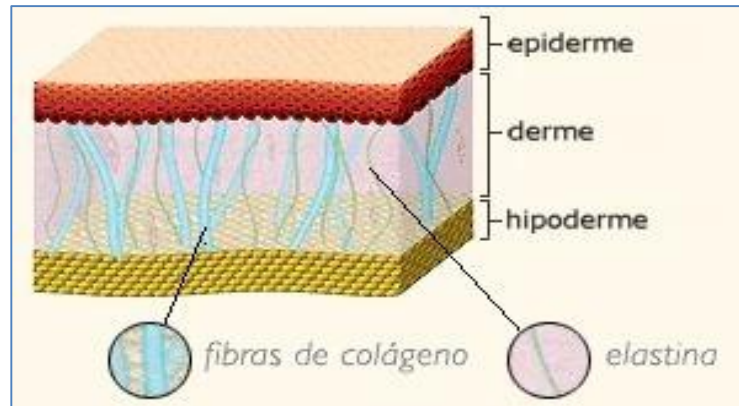


Figura 1 – Componentes da pele

Os melanócitos são células dendríticas que localizam-se na epiderme e na derme e sua função é a produção de melanina, substância responsável pela coloração da pele, cabelos e olhos, cuja biossíntese ocorre em subunidades celulares denominadas melanossomas, tendo como principal precursor a L-tirosina (HARRIS, 2003).

A melanina é produzida por um processo fisiológico denominado melanogênese, tendo a função de proteção da pele dos prejuízos induzidos pela radiação solar via absorção da luz ultravioleta e remoção das espécies reativas de oxigênio (NERYA *et al.*, 2003).

A tirosina é convertida a L-Dopa por um processo catalisado pela enzima tirosinase. Uma vez formada a L-Dopa, as demais etapas que são reações de oxidorredução e rearranjos intermoleculares podem ocorrer espontaneamente em função das condições do ambiente intracelular (HARRIS, 2003).

A enzima tirosinase é outra enzima de extrema importância presente no tecido tegumentar. Uma intensa atividade dessa enzima e aumento no número de melanócitos ocasionam a hiperpigmentação, causada por distúrbios hormonais, alergias, exposição aos raios UVA e UVB (CONCHOROSKI & CORRÊA, 2005).

Outro componente da derme, o ácido hialurônico, tem a propriedade de manter as células aderidas umas às outras. A hialuronidase, enzima que tem a capacidade de hidrolisar o ácido hialurônico, se localiza no interstício celular. Por ação da hialuronidase, esse polímero é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo sua viscosidade, facilitando a difusão dos componentes antigênicos para o interior das células. (MARCHESAN *et al.*, 2006).

Os metabólitos secundários e extratos inteiros de plantas têm sido amplamente investigados e têm sido encontradas atividades anti-colagenase e anti-elastase (THRING *et al.*, 2009).

Em termos de anti-envelhecimento, encontrar os inibidores de enzimas elastase, hialuronidase e colagenase podem ser úteis para evitar a perda de elasticidade da pele e sua flacidez tanto para fins terapêuticos, como para cosméticos (THRING *et al.*, 2009).

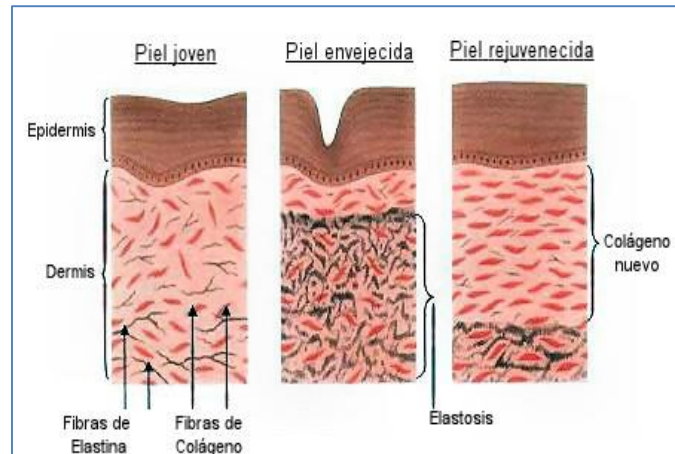


Figura 2 – Regeneração da pele após tratamento estético

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Escolha dos Bioativos

Cinquenta e oito extratos secos por spray drier após maceração estática de 48h com água, etanol ou metanol de folhas, cascas, raízes ou frutos de plantas da Amazônia foram utilizados no presente trabalho. As amostras foram cedidas a partir do banco de extratos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF – UFAM), da Coordenação de Pesquisa em Produtos Naturais (CPPN), do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) e do Departamento de Química (ICE – UFAM), conforme descrição da tabela 1.

n°	Código	Espécie	Material	Solvente	Secagem
1	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
2	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	polpa	hidroalcólico	spray drier
3	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
4	Cará	<i>Dioscorea alata L.</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
5	Cará	<i>Dioscorea alata L.</i>	polpa	hidroalcólico	spray drier
6	Tucumã	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
7	Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
8	Bacurizinho	<i>Rheedia gardneriana</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
9	Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	casca da semente	hidroalcólico	spray drier
10	Castanha do Brasil	<i>Bertholletia excelsa H.B.K</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
11	Acerola	<i>Malpighia punicifolia L.</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
12	Ingá	<i>Ingá edulis Mart</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
13	Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
14	Uxi	<i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	casca	hidroalcólico	spray drier
15	Bacurizinho	<i>Rheedia gardneriana</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
16	Guaraná	<i>Paullinia cupana Kunth</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
17	Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
18	Ingá	<i>Ingá edulis Mart</i>	semente	hidroalcólico	spray drier
19	Abiu	<i>Pouteria caimito</i>	casca	hidroalcólico	spray drier
20	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	casca	etanólico	liofilização
21	Cará	<i>Dioscorea alata L.</i>	casca	etanólico	liofilização
22	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	polpa	hidroalcólico	spray drier

23	Castanha do Brasil	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K	casca	etanólico	liofilização
24	Uxi	<i>Endopleura uchi</i> (Huber) Cuatrec.	casca	etanólico	liofilização
25	Acerola	<i>Malpighia puniceifolia</i> L.	semente	etanólico	liofilização
26	Carambola	<i>Averrhoa carambola</i>	semente	etanólico	liofilização
27	Tucumã	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	casca	etanólico	liofilização
28	Buriti	<i>Mauritia flexuosa</i>	casca da semente	etanólico	liofilização
29	Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	casca	etanólico	liofilização
30	Cupuí	<i>Theobroma subincanum</i>	caroço	etanólico	liofilização
31	Pupunha	<i>Bactris gasipaes</i>	semente	etanólico	liofilização
32	Cará	<i>Dioscorea alata</i> L.	casca	etanólico	liofilização
33	Açaí do Pará	Euterpeoleraea Mart.	emente	etanólico	liofilização
34	Açaí do AM	Euterpeoleraea Mart.	semente	etanólico	liofilização
35	Tucumã AM	<i>Astrocaryum aculeatum</i>	casca	etanólico	liofilização
36	Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i>	casca da semente	etanólico	liofilização
37	Cupuaçu	<i>Theobroma grandiflorum</i>	casca	etanólico	liofilização
38	Cará	<i>Dioscorea alata</i> L.	polpa	etanólico	liofilização
39	Açaí do AM	Euterpe oleracea Mart.	emente	etanólico	liofilização
40	Cará	<i>Dioscorea alata</i> L.	casca	hidroalcólico	spray drier
41	Piquiá	<i>Caryocar villosum</i>	polpa	hidroalcólico	spray drier
42	Açaí do Pará	Euterpe oleracea Mart.	semente	hidroalcólico	spray drier
43	Açaí do AC	Euterpe oleracea Mart.	semente	etanólico	liofilização
44	Bacuri	<i>Platonia insignis</i>	casca	etanólico	liofilização
45	Cupuí	<i>Theobroma subincanum</i>	casca	etanólico	liofilização
46	Castanha do Brasil AC	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K	casca	etanólico	liofilização
47	Graviola	<i>Annona muricata</i>	casca	etanólico	liofilização
48	Castanha do Brasil resíduo	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K	casca	hidroalcólico	spray drier
49	Biribá	<i>Eschweira ovata</i>	casca	etanólico	liofilização
50	Guaraná	<i>Paullinia cupana</i> Kunth	casca	etanólico	liofilização
51	Abiu	<i>Pouteria caimito</i>	casca	etanólico	liofilização
52	Bacurizinho	<i>Rheedia gardneriana</i>	semente	etanólico	liofilização
53	Ingá I	<i>Ínga edulis</i> Mart	casca	etanólico	liofilização
54	Ingá II	<i>Ínga edulis</i> Mart	casca		
55	Bacurizinho	<i>Rheedia gardneriana</i>	casca	etanólico	liofilização
56	Ingá	<i>Ínga edulis</i> Mart	semente	hidroalcólico	spray drier

57	Castanha do Brasil resíduo	<i>Bertholletia excelsa</i> H.B.K	casca	hidroalcolólico	spray drier
58	Biribá	<i>Eschweira ovata</i>	casca	etanólico	liofilização

Tabela 1: Características e processo de obtenção de extratos de plantas da Amazônia.

4.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

O método DPPH baseia-se na redução dos radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH^{*}) através da doação de um átomo de hidrogênio do composto em estudo (polifenol) à molécula do radical (ARUOMA *et al.*, 1997). Para essa análise utiliza-se uma solução alcoólica de DPPH, que absorve no comprimento de onda próximo de 517nm, e à medida que seu elétron deixa de ser desemparelhado, a absorção decresce ocorrendo a mudança de coloração frente às moléculas antioxidantes testadas (DI MAMBRO *et al.*, 2005). Portanto, para os testes da determinação da atividade antioxidante, foram realizados ensaios colorimétricos, segundo metodologia utilizada por MOLYNEUX (2004), com modificações. Para a realização do teste, foram adicionadas, primeiramente, em cada cavidade da microplaca, 170µL de DPPH (1 mg/mL) e 30µL das soluções das amostras, com suas respectivas diluições, feitas utilizando etanol. Como ensaio padrão foi utilizado uma solução de quecertina, na concentração de 100 µg/mL ao invés de utilizar o extrato. Para o controle negativo, foram utilizados 170µL de DPPH e 30µL de etanol. A placa foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente no escuro e será realizada a leitura em 517 nm. O ensaio foi feito em triplicata. Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente, o cálculo a seguir de todas as diluições:

$$\text{Determinação potencial antioxidante} = 100 - (\text{abs}/\text{média controle}) \times 100$$

4.3 Determinação de fenóis totais

Para os ensaios da determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras das espécies a serem estudadas, foram realizados testes por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu, com modificações, conforme o descrito por BONOLI *et al.* (2004). Os extratos foram dissolvidos em metanol, obtendo-se uma solução 0,1%. Em seguida, esta solução foi diluída novamente, com metanol, obtendo-se uma solução 0,015%. Uma alíquota de 100 µL desta última solução foi agitada com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu juntamente com 6 mL de água destilada por 1 minuto; passado este tempo, 2

mL de carbonato de Cálcio (Na_2CO_3) a 15% foram adicionados à mistura e agitados por 30 segundos. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL, com água destilada. Após 2 horas, a absorvância das amostras foi medida a 750 nm utilizando-se cubetas de vidro. Como controle negativo tivemos o reagente de Folin-Ciocalteu juntamente com Na_2CO_3 e para padrão inibitório foi utilizado o ácido gálico. O ensaio foi feito em triplicata. Os resultados foram obtidos utilizando-se o cálculo a seguir:

$$\text{Determinação fenóis totais} = \frac{(\text{abs extrato} - \text{abs branco}) \times 100}{\text{abs padrão}}$$

4.4 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais foi realizada, segundo metodologia utilizada por CHANG *et al.* (2002), com modificações. Para os ensaios, os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 1mg/mL. Em seguida, foram adicionados 30 μL de cada extrato (diluído em etanol 80% na concentração de 0,1mg/mL) e 90 μL de etanol 95% em cada cavidade da microplaca. Seguidamente, foram adicionados 6 μL de cloreto de alumínio a 10% e 6 μL de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, foram adicionados mais 168 μL de água destilada. Para o controle negativo foi utilizado etanol e para padrão inibitório foi utilizado uma solução de quercetina 1mg/mL (diluída em água destilada). A placa, então, foi incubada por 30min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorvância da leitura no comprimento de onda de 405nm, em leitor ELISA. O ensaio foi realizado em triplicata. Logo após, foi calculada a determinação da concentração de flavonóides:

$$\text{Determinação de flavonóides} = \frac{\text{Diferença extrato}}{\text{Média da diferença do padrão}} \times 10$$

4.5 Identificação de colagenase por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida

Os ensaios colorimétricos, primeiramente realizados segundo metodologia descrita por THRING *et al.* (2009), utilizando a colagenase do *Clostridium histolyticum*, dissolvida no tampão Tricina com pH 7,5 e o substrato sintético N-[3-(2-furil)acril]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA) dissolvido em tampão Tricina, com controle negativo DMSO e padrão quercetina, não apresentaram resultados satisfatórios e optamos por trocar pelo método de Zimografia.

Tal metodologia descrita por SNOEK-VAN (2005) as proteínas são separadas por eletroforese (diferença de carga) em gel de SDS e condições necessárias para a ativação das enzimas, assim como o substrato adequado, neste caso a gelatina. Através da revelação do gel, as bandas claras demonstram que ocorreu degradação do substrato pela enzima, e onde há bandas, refere-se à inativação enzimática. Neste método é preparado um gel para corrida eletroforética contendo Acrilamida, tampão Tris pH 8,0, gelatina, Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e persulfato de amônio. As amostras, em 10mg/mL foram diluídas em um eppendorf contendo 10 μ L de extrato e 900 μ L de DMSO. Posteriormente houve uma nova diluição, a partir da diluição anterior, contendo 5 μ L da mesma e 5 μ L de tampão Lower. Desta última diluição foi retirada uma alíquota de 2 μ L que foi adicionada ao gel de corrida eletroforética, onde após 2 horas de corrida, pôde-se observar a degradação do substrato.

4.6. Teste de inibição sobre a tirosinase *in vitro*

Foi avaliada a inibição da tirosinase pelos extratos segundo método descrito por CHANG *et al.* (2008). Foram preparadas diferentes soluções teste dos extratos em 20% de DMSO (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10mg/mL). Para retirar as absorbâncias dos extratos, 25 μ L de cada solução teste dos extratos foram pipetados em triplicata a uma placa de 96 poços de fundo redondo aos quais foram previamente adicionados 75 μ L de solução de tirosinase. As absorbâncias 1 (A1) foram determinadas em 475nm . A placa foi incubada por 5 minutos a 37° C e em seguida adicionou-se 100 μ L do reagente de cor DOPA (dihidroxifenilalanina). Incubou-se a placa por 15 minutos a 37° C e determinou-se as absorbâncias finais (A2) no mesmo comprimento de onda. Como controle positivo foi analisado o ácido kójico preparado da mesma forma que as amostras. A IC₅₀ foi obtida por regressão linear simples a partir de gráficos plotados utilizando o programa Origin 6.0.

4.7. Avaliação do potencial fotoprotetor dos extratos

A determinação do FPS *in vitro* de filtros químicos pode ser realizada por meio da leitura espectrofotométrica de suas soluções diluídas (também reconhecida como Método de Mansur) e posterior determinação da absorbância (VELASCO *et al.*, 2010). Para determinação do comprimento de onda máximo (λ_{max}) e da absorbância máxima (Abmax.), e absorbâncias em 240nm, 300nm e 360nm foi utilizada a metodologia descrita por SOARES (2012). As amostras foram diluídas em etanol, sendo uma solução contendo 100 μ L de extrato e 900 μ L de etanol. O referido solvente foi, também, utilizado para controle negativo. Logo

em seguida a solução de 1 mL foi vertida em uma cubeta de vidro para posteriormente ser realizada uma varredura entre os comprimentos de onda de 200 a 400nm a fim de verificar a absorção nas regiões ultravioleta A, B e C (UVA, UVB e UVC).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 58 amostras de extratos que foram submetidas aos testes estavam identificadas por nomes populares, conforme segue a tabela 2. Devido a problemas de ordem técnica não foram possíveis as realizações dos testes de inibição da enzima hialuronidase e elastase, e os mesmos foram substituídos por testes de avaliação do potencial fotoprotetor, igualmente importante como ferramenta para a busca de bioativos aplicados a biocosméticos. Após a mensuração, os resultados obtidos foram transcritos em média \pm desvio padrão para a tabela 2 abaixo relacionada:

<i>n</i> ^o	<i>Extrato</i>	<i>FT</i> (%)	<i>Fl. Totais</i> (%)	<i>DPPH</i> <i>CI</i> ₅₀ (μ g/mL)	<i>Tirosinase</i> <i>CI</i> ₅₀ (μ g/mL)	<i>Colagenase</i>
1	Piquiá (casca)	30,38 \pm 2,21	6,88 \pm 0,49	6,14 \pm 0,20	35,15 \pm 1,98	Nr
2	Piquiá (polpa)	46,34 \pm 2,58	6,01 \pm 0,30	6,39 \pm 0,26	26,97 \pm 3,57	-
3	Piquiá (semente)	9,07 \pm 0,83	4,19 \pm 0,20	53,00 \pm 0,75	18,86 \pm 5,13	-
4	Cará (casca)	4,04 \pm 0,16	1,97 \pm 0,09	>500	6,76 \pm 2,27	-
5	Cará (polpa)	3,43 \pm 0,21	1,62 \pm 0,21	>500	16,13 \pm 3,82	nr
6	Tucumã (casca)	9,84 \pm 0,41	3,23 \pm 0,17	47,56 \pm 0,17	19,65 \pm 4,90	-
7	Buriti (semente)	8,43 \pm 0,33	1,80 \pm 0,10	>500	19,86 \pm 5,83	-
8	Bacurizinho (semente)	11,18 \pm 0,09	9,09 \pm 1,85	86,44 \pm 3,28	14,55 \pm 4,18	-
9	Buriti (casca da semente)	10,47 \pm 0,40	2,63 \pm 0,14	95,40 \pm 1,97	16,89 \pm 3,98	nr
10	Castanha do Brasil (casca)	20,08 \pm 2,85	8,91 \pm 0,31	32,76 \pm 0,16	0,82 \pm 4,96	nr

11	Acerola (semente)	12,09±3,98	3,55±0,06	132,14±8,62	16,84±5,34	-
12	Ingá (casca)	16,89±0,91	2,91±0,08	29,98±0,62	23,54±2,06	-
13	Bacuri (semente)	14,230±0,16	13,69±0,72	55,61±0,94	18,49±1,56	-
14	Uxi (casca)	8,52±1,70	1,97±0,05	167,61±5,34	24,78±2,47	-
15	Bacurizinho (casca)	8,27±1,35	5,90±0,48	67,24±4,26	5,70±6,25	-
16	Guaraná (casca)	7,29±0,98	2,41±0,06	97,77±5,55	14,12±6,33	-
17	Carambola (semente)	5,05±0,76	2,15±0,19	256,88±13,78	20,68±1,20	-
18	Ingá (semente)	5,51±0,90	1,51±0,05	>500	24,87±1,98	-
19	Abiu (casca)	4,80±0,67	1,86±0,76	>500	12,43±2,31	nr
20	Piquiá (casca)	40,57±2,96	4,47±0,15	45,95±2,97	30,60±2,64	-
21	Cará (casca)	5,80±0,09	2,21±0,19	82,62±10,89		nr
22	Piquiá (polpa)	40,51±2,37	7,52±0,48	5,42±0,03	24,37±2,37	-
23	Castanha do Brasil (casca)	14,48±1,12	8,68±0,80	29,07±2,28	22,46±3,21	-
24	Uxi (casca)	5,10±0,71	1,98±0,04	>500	23,31±5,23	-
25	Acerola (semente)	5,58±0,72	3,33±0,24	>500	7,26±1,51	-
26	Carambola (semente)	4,39±0,16	2,17±0,05	>500	19,96±0,64	-
27	Tucumã (casca)	6,95±0,15	2,87±0,50	99,97±3,72	11,45±2,70	-
28	Buriti (casca da semente)	7,40±0,20	2,33±0,37	91,47±2,82	17,28±2,31	-
29	Bacuri (casca)	15,19±0,66	27,39±1,31	22,49±0,66	18,90±4,16	-

30	Cupuí (caroço)	6,47±0,32	3,03±0,24	91,31±5,53	22,23±0,32	nr
31	Pupunha (semente)	4,61±0,29	2,78±0,24	318,16±2,06	17,50±0,91	nr
32	Cará (casca)	7,48±0,27	3,40±0,03	98,84±5,07	20,67±0,78	-
33	Açaí do Pará (semente)	7,33±0,08	3,54±0,30	>500	3,69±7,04	-
34	Açaí do AM (semente)	36,59±1,13	3,26±0,21	>500	14,16±0,84	-
35	Tucumã AM (casca)	6,08±0,09	2,64±0,17	241,9±11,43	23,25±1,89	nr
36	Cupuaçu (casca da semente)	6,62±0,39	1,95±0,12	85,17±2,77	16,99±4,56	nr
37	Cupuaçu (casca)	13,10±0,25	2,44±0,11	29,01±0,84	14,89±3,23	-
38	Cará (polpa)	5,89±0,57	2,53±0,15	186,97±4,41	21,14±0,91	-
39	Açaí do AM (semente)	28,78±0,88	3,29±0,14	>500	15,19±3,72	-
40	Cará (casca)	5,80±0,09	2,21±0,19	82,62±10,89	20,34±4,88	-
41	Piquiá (polpa)	40,51±2,37	7,52±0,48	5,42±0,03	14,83±5,00	-
42	Açaí do Pará (semente)	6,77±0,29	3,10±0,13	>500	16,91±0,84	-
43	Açaí do AC (semente)	5,79±0,27	2,41±0,01	>500	18,79±2,62	nr
44	Bacuri (casca)	40,68±0,88	13,26±0,60	27,23±1,08	17,45±1,11	-
45	Cupuí (casca)	6,85±0,11	2,31±0,04	113,02±0,77	8,66±1,53	-
46	Castanha do Brasil AC (casca)	6,84±0,20	3,71±0,17	96,39±2,07	12,26±1,37	nr
47	Graviola (casca)	4,36±0,35	2,63±0,19	>500	6,82±6,82	-
48	Castanha do Brasil resíduo	5,52±0,02	2,52±0,16	173,78±13,22	12,75±1,02	-

(casca)						
49	Biribá (casca)	4,40±0,17	1,82±0,05	>500	16,60±0,86	-
50	Guaraná (casca)	9,29±0,21	2,78±0,62	>500	14,93±1,89	-
51	Abiu (casca)	5,24±0,19	2,02±0,03	>500	10,46±1,68	nr
52	Bacurizinho (semente)	22,07±0,051	13,45±0,29	25,53±0,52	9,48±0,99	-
53	Ingá I (casca)	13,34±0,62	2,17±0,13	29,46±1,24	7,51±0,36	-
54	Ingá II (casca)	11,29±0,33	2,26±0,04	41,94±1,79	4,39±3,40	-
55	Bacurizinho (casca)	10,03±0,71	9,22±0,77	124,16±3,81	11,05±1,11	nr
56	Ingá (semente)	11,53±0,27	5,07±0,14	>500	11,57±0,26	nr
57	Castanha do Brasil resíduo (casca)	11,16±0,42	4,49±0,12	>500	15,72±0,60	nr
58	Biribá (casca)	4,14±0,04	2,31±0,27	>500	9,55±1,96	nr

(-) não houve inibição enzimática

(nr) não realizado

Tabela 2 – Avaliação do potencial antioxidante, fotoprotetor e de inibição enzimática de extratos de plantas da Amazônia.

Primeiramente foi realizada uma triagem fitoquímica para avaliar a presença de compostos fenólicos e de flavonóides nas amostras. A literatura cita que quanto maior a porcentagem de fenóis totais no extrato, melhor pode ser sua atividade inibitória de enzimas. Dessa forma, quando comparados com o padrão Quercetina, que possui 100% de compostos fenólicos, as amostras com significativo teor de fenóis totais são os de Piquiá (casca*), Piquiá (polpa), Castanha do Brasil (casca), Piquiá (casca), Piquiá (polpa) e Açaí do Amazonas (semente), com porcentagens de fenóis totais de 30,38%, 46,34%, 20,08%, 40,57%, 40,51 e 36,59%, respectivamente, como pode ser claramente observado na figura 3.

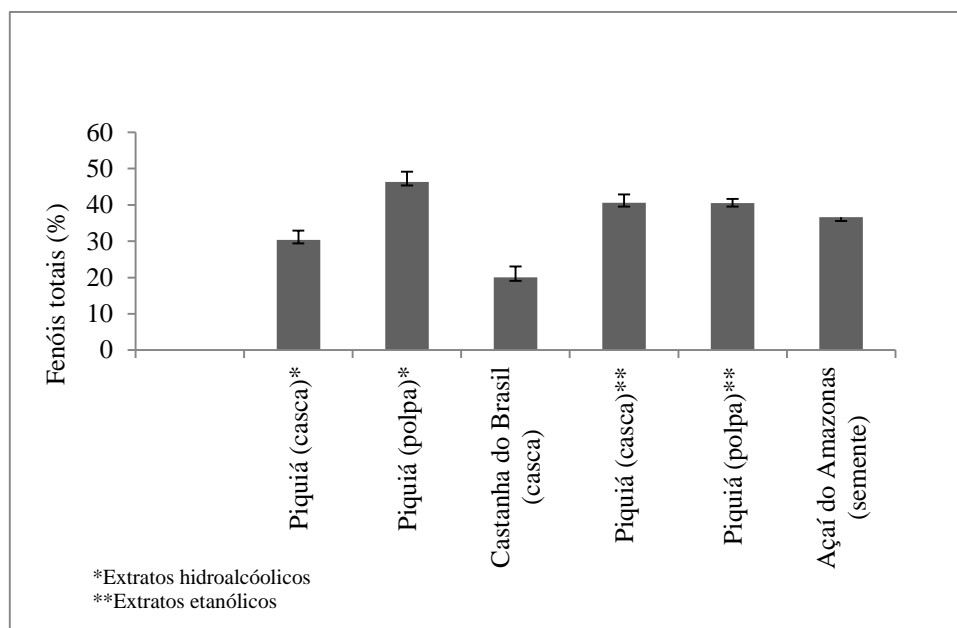


Figura 3 – Concentração de fenóis totais (%) em extratos de plantas da Amazônia.

Tais valores corroboram com a literatura, em trabalho realizado por SOUZA *et al.* (2007), onde teores semelhantes de fenóis totais foram encontrados em amostras de cinco plantas medicinais frente ao teor de fenóis totais e atividade antioxidante. Em nosso estudo, avaliamos que, em comparação com o padrão Quercetina, os extratos de Piquiá possuem presença de fenóis totais significativas, variando de 30,38% (casca) à 46,34% (polpa**), conforme pode ser observado na figura 3, o que, segundo SOUZA *et al.* (2007), sugere a existência de algum constituinte que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação sequestradora de radicais livres. Tal avaliação, proposta por SOUZA *et al.* (2007), foi feita após os autores observarem uma correlação positiva entre os fenóis totais e a CI_{50} dos extratos de *T. brasiliensis* (casca e folha), *C. macrophyllum* (folha) e *C. prunifera* (raiz) na avaliação antioxidante do DPPH.

Seguiu-se em nosso estudo, também, a avaliação do potencial antioxidante por meio do teste do radical livre DPPH, onde este pode estar intimamente ligado à presença de compostos fenólicos e flavonóides com o potencial antioxidante e, segundo SOUZA *et al.* (2007), a porcentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CI_{50} , portanto, maior a sua atividade antioxidante.

Logo, pode-se claramente observar, conforme Figura 4, que os extratos com maior potencial antioxidante foram os de Piquiá (casca), Piquiá (polpa), Piquiá (polpa) com IC₅₀ de 6,14µg/mL, 6,39 µg/mL e 5,42µg/mL, respectivamente, quando comparados com o padrão Quercetina, com IC₅₀ de 3,19µg/mL.

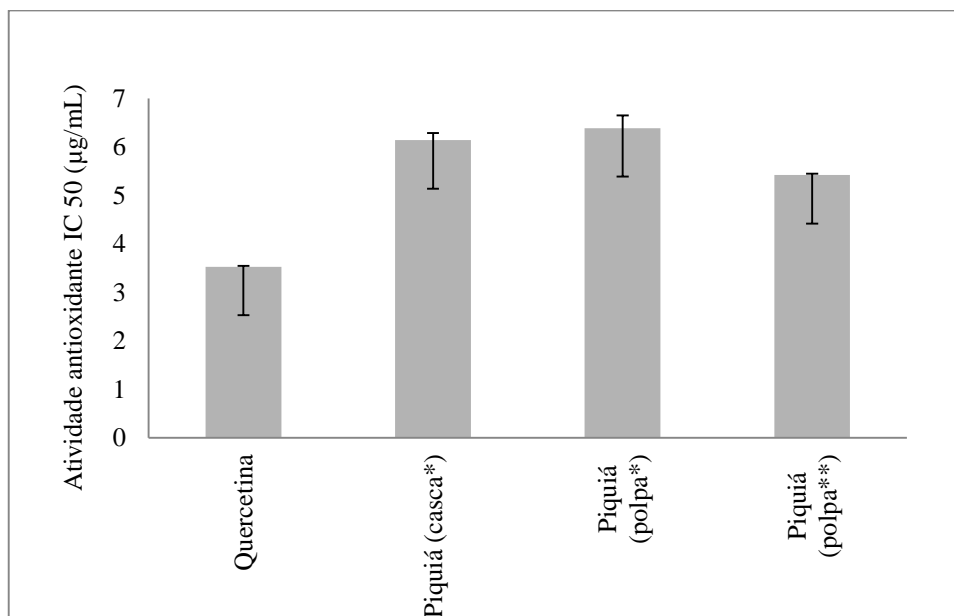


Figura 4 – Atividade antioxidante expressa como concentração inibitória de 50% (IC₅₀) em extratos de plantas da Amazônia contra o radical DPPH.

Avaliamos que, em comparação com o padrão Quercetina, os extratos de Piquiá possuem presença de fenóis totais significativas, variando de 30,38% (casca) à 46,34% (polpa), conforme pode ser observado na figura 5, o que, segundo SOUZA *et al.* (2007), sugere a existência de algum constituinte que contribui particularmente e mais efetivamente para a ação seqüestradora de radicais livres.

Tal avaliação, proposta por SOUZA *et al.* (2007), foi feita após os autores observarem uma correlação positiva entre os fenóis totais e a CI₅₀ dos extratos de *T. brasiliensis* (casca e folha), *C. macrophyllum* (folha) e *C. prunifera* (raiz) na avaliação antioxidante do DPPH.

Já com relação à presença de flavonóides totais, destaca-se o extrato de Bacuri (casca) com 27,39% de flavonóides. Entretanto, tais resultados, quando comparados com o padrão Quercetina (100% de compostos fenólicos) e, também, com a literatura em trabalho realizado por LIMA *et al.* (2002) são considerados insignificantes, pois, a maioria dos extratos avaliados não apresentaram significativa presença de tal composto, conforme pode observar-se na figura 5, sendo, respectivamente 3,53, 9,09, 13,69, 7,52, 8,68, 7,52, 13, 26 e 13,45%

para os extratos de Bacurizinho (semente), Bacuri (semente), Castanha do Brasil (casca), Piquiá (polpa), Bacuri (casca) e Bacurizinho (semente).

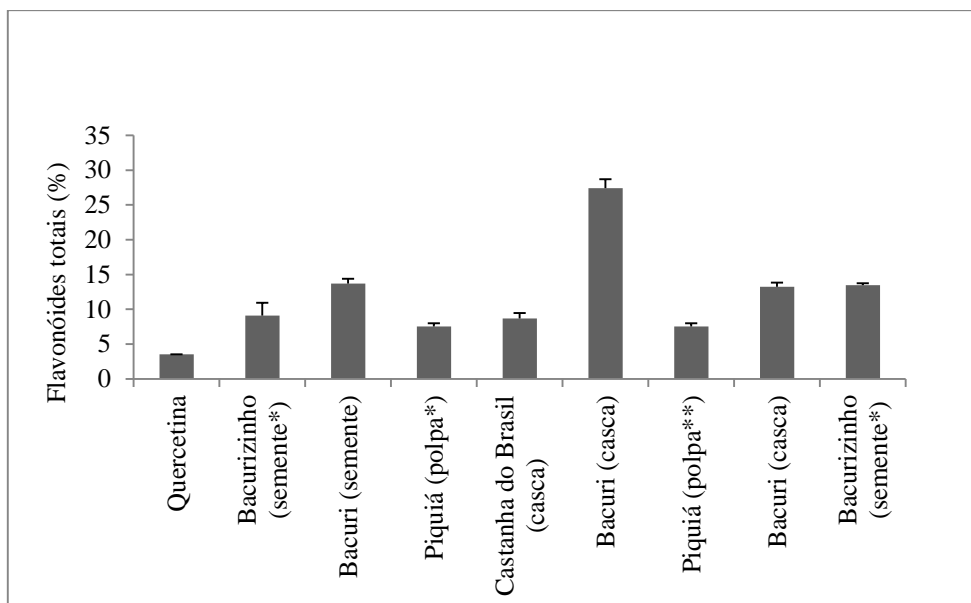


Figura 5 – Concentração de flavonóides totais (%) em extratos de plantas da Amazônia.

Nenhum dos extratos apresentou significativa ação inibitória da tirosinase, tendo em vista que o melhor resultado obtido foi o da casca do Piquiá diluído em solução hidroalcolica, com CI_{50} de $35,15 \pm 1,98$ na concentração de $100 \mu\text{g.mL}$. Fato este que pode ser justificado com o fato de substâncias fenólicas, que através da sua própria oxidação e formação de radicais livres, inibem a oxidação da L-DOPA à dopacromo pela tirosinase, ou ainda revertem essa reação, reduzindo novamente o dopacromo. E também, pelo fato de flavonóides e outras classes de substâncias fenólicas poderem atuar prevenindo a inibição da tirosinase pela inibição da oxidação não enzimática ou ainda através da captação dos radicais livres gerados pela formação de derivados *o*-quinonas. Devido o fato de os extratos testados possuírem, em grande parte, altos níveis de flavonóides totais e níveis significantes de fenóis totais, como já foi discutido anteriormente, o provável equilíbrio entre as ações justifica a inalteração da atividade da tirosinase *in vitro*. (OLIVEIRA, 2010).

Com relação à identificação da collagenase por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida, nenhum dos 58 extratos obtiveram resultados satisfatórios, tendo em vista que, pode ser observado, visualmente, a ocorrência da degradação do substrato pela enzima collagenase,

com os extratos na concentração de 1µg/mL, revelada pela forte intensidade das bandas obtidas na eletroforese, em comparação com o controle (colagenase e tampão), portanto, demonstrou-se insatisfatória a atividade inibitória dos extratos estudados pela colagenase, pois não houve diferença evidente na intensidade entre a marcação das bandas (figura 7).

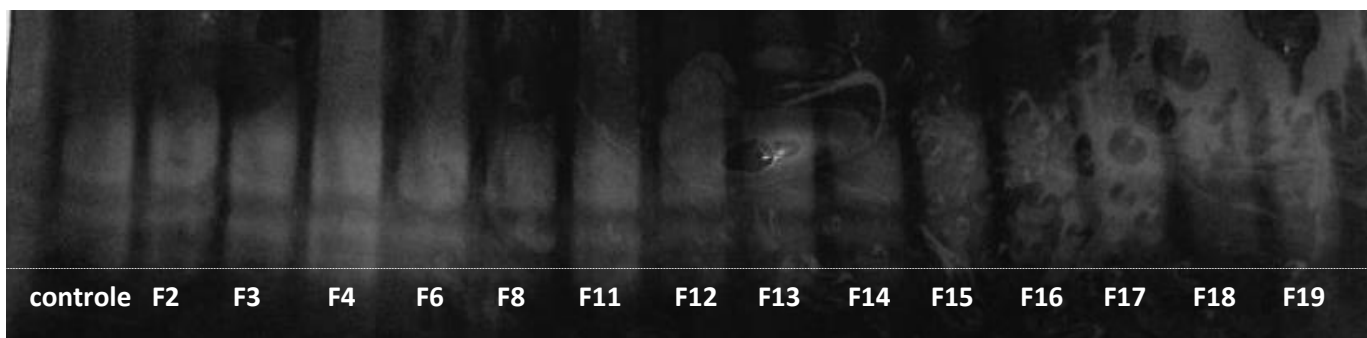


Figura 7 – Inibição da atividade da colagenase por zimografia de extratos Amazônicos

Ribeiro *et al.* (2010) realizaram um estudo semelhante com extratos aquosos de Aloe vera, *Annona muricata* e chá preto, com a finalidade de determinar a atividade inibitória destes sobre metaloproteases, sendo revelado que os extratos de Aloe vera, *A. muricata* e chá preto inibiram a atividade das Metaloproteínas 2 e 9.

Posteriormente foi avaliado o potencial fotoprotetor das amostras, como se observa na tabela 3.

n°	Extrato	λ MÁX	240nm	300nm	360nm
1	Piquiá (casca)	298 (2,822)	0,108	2,763	0,581
2	Piquiá (polpa)	297 (2,747)	0,102	2,695	0,491
3	Piquiá (semente)	258 (2,109)	0,091	1,222	0,457
4	Cará (casca)	266 (0,887)	0,091	0,558	0,198
5	Cará (polpa)	367 (0,033)	-0,010	0,131	0,041
6	Tucumã (casca)	283 (2,294)	0,091	1,374	0,451
7	Buriti (semente)	281 (0,321)	-0,049	1,267	1,092
8	Bacurizinho (semente)	325 (1,250)	0,102	1,075	0,637
9	Buriti (casca da)	245 (1,846)	-0,089	0,760	0,659

	semente)				
10	Castanha do Brasil (casca)	367 (0,662)	0,204	0,777	0,659
11	Acerola (semente)	274 (0,981)	0,086	0,777	0,395
12	Ingá (casca)	282 (0,954)	-0,083	0,603	0,215
13	Bacuri (semente)	297 (2,964)	0,097	2,774	0,895
14	Uxi (casca)	275 (1,147)	0,080	0,637	0,136
15	Bacurizinho (casca)	285 (0,832)	0,24	0,687	0,356
16	Guaraná (casca)	274 (0,844)	0,086	0,170	0,125
17	Carambola (semente)	280 (0,840)	0,069	0,423	0,102
18	Ingá (semente)	267 (0,581)	0,069	0,288	0,074
19	Abiu (casca)	367 (0,015)	0,063	0,131	0,018
20	Piquiá (casca)	308 (3,702)	0,102	3,899	0,952
20	Piquiá (casca)*	306 (5,410)	0,108	nr	0,609
20	Piquiá (casca)**	297 (3,050)	0,108	2,774	0,401
21	Cará (casca)	nr	nr	nr	nr
22	Piquiá (polpa)	275 (0,485)	0,091	0,299	0,035
22	Piquiá (polpa)*	367 (0,004)	-0,089	0,164	0,001
23	Castanha do Brasil (casca)	297 (9,999)	0,119	3,972	1,143
23	Castanha do Brasil (casca)*	297 (3,154)	0,102	3,044	0,577
24	Uxi (casca)	297 (5,347)	0,114	3,241	1,199
24	Uxi (casca)*	284 (1,957)	0,108	1,514	0,603
25	Acerola (semente)	367 (0,041)	0,041	0,181	0,046
26	Carambola (semente)	282 (1,177)	0,052	0,693	0,176

27	Tucumã (casca)	282 (1,632)	0,063	0,626	0,069
28	Buriti (casca da semente)	280 (1,282)	0,125	0,671	0,192
29	Bacuri (casca)	367 (0,030)	-0,049	0,147	0,035
30	Cupuí (caroço)	375 (2,343)	0,091	3,140	2,571
30	Cupuí (caroço)*	337 (2,148)	0,102	2,673	1,874
31	Pupunha (semente)	281 (0,235)	0,001	0,176	0,097
32	Cará (casca)	261 (0,305)	0,012	0,057	0,012
33	Açaí do Pará (semente)	263 (3,432)	0,029	1,733	0,530
33	Açaí do Pará (semente)*	262 (1,730)	0,012	0,862	0,277
34	Açaí do AM (semente)	283 (2,121)	0,024	1,210	0,479
34	Açaí do AM (semente)*	280 (1,053)	0,024	0,592	0,243
35	Tucumã AM (casca)	286 (3,048)	0,024	1,582	0,434
36	Cupuaçu (casca da semente)	282 (0,299)	-0,004	0,209	0,074
37	Cupuaçu (casca)	nr	nr	nr	nr
38	Cará (polpa)	281 (1,379)	0,029	0,451	0,136
39	Açaí do AM (semente)	280 (1,379)	0,029	0,451	0,136
40	Cará (casca)	286 (2,091)	-0,010	1,570	0,485
41	Piquiá (polpa)	276 (1,479)	0,018	0,985	0,462
42	Açaí do Pará (semente)	277 (0,950)	-0,089	0,569	0,294
43	Açaí do AC (semente)	365 (3,340)	0,018	nr	3,409
43	Açaí do AC (semente)*	339 (2,563)	0,024	3,443	2,240

43	Açaí do AC (semente)**	339 (1,782)	0,031	2,478	1,612
44	Bacuri (casca)	279 (0,863)	0,035	0,372	0,181
45	Cupuí (casca)	267 (1,155)	-0,094	0,980	0,350
46	Castanha do Brasil AC (casca)	271 (0,570)	-0,027	0,339	0,170
47	Graviola (casca)	263 (2,113)	0,024	1,632	0,496
48	Castanha do Brasil resíduo (casca)	274 (1,290)	0,012	0,440	0,181
49	Biribá (casca)	269 (0,649)	0,047	0,164	0,108
50	Guaraná (casca)	nr	nr	nr	nr
51	Abiu (casca)	nr	nr	nr	nr
52	Bacurizinho (semente)	245 (1,468)	0,024	0,597	0,181
53	Ingá I (casca)	2881 (1,542)	0,029	0,704	0,395
54	Ingá II (casca)	297 (2,678)	0,024	2,639	1,913
55	Bacurizinho (casca)	367 (0,114)	nr	0,282	0,108
56	Ingá (semente)	283 (2,204)	0,024	1,728	0,592
57	Castanha do Brasil resíduo (casca)	nr	nr	nr	nr
58	Biribá (casca)	367 (0,110)	0,001	0,204	0,097

*extratos na concentração 0,5 mg/mL

nr = não realizado

Tabela 3 - Perfil fotoprotetor de extratos de plantas da Amazônia na concentração 1mg/mL.

Dentre os extratos avaliados, destacam-se os de Piquiá (casca e polpa), com picos de Λ MÁX na região do UVB, sendo 298 (2,822) e 297 (2,747), respectivamente, para casca e polpa. Destaca-se, também, o extrato de semente de Bacurizinho, com Λ MÁX de 325

(1,250), e com picos regulares e contínuos na região UVA, UVB e UVC, conforme pode-se observar na figura 6.

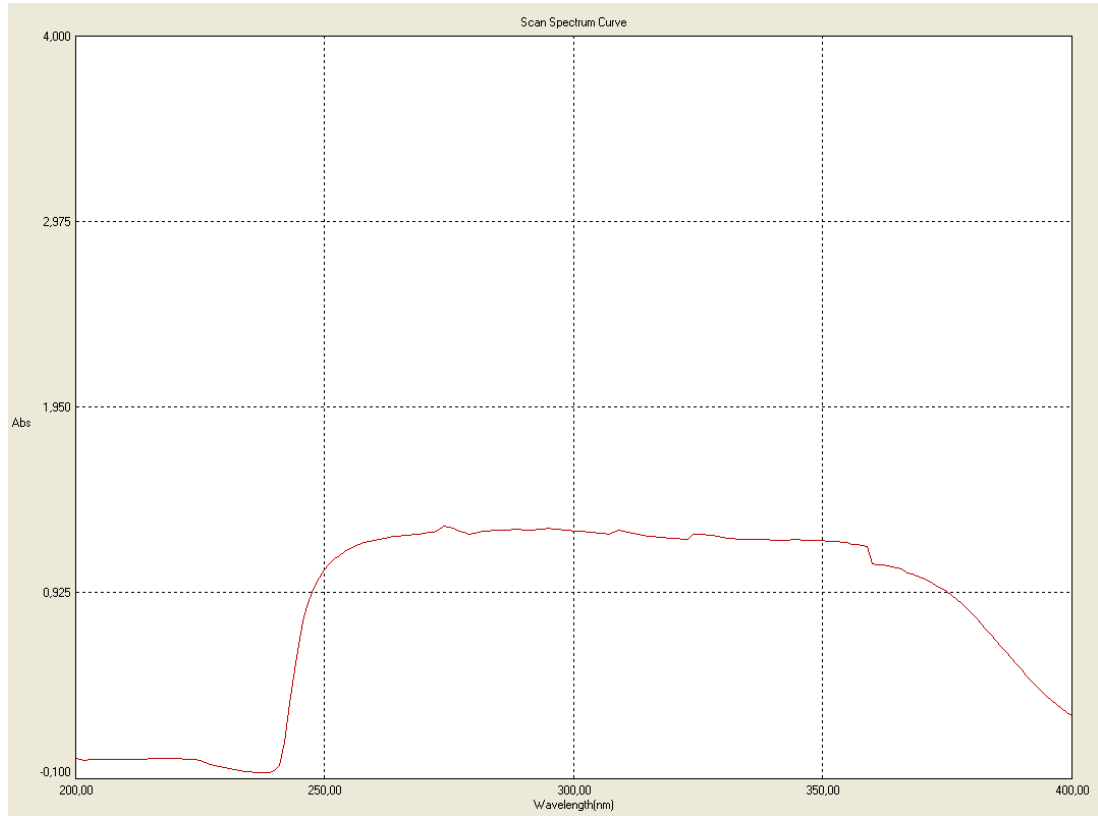


Figura 6 – Espectro de absorção de extrato de semente de Bacurizinho

6 CONCLUSÃO

Este estudo revela que a partir de um painel de 58 extratos de plantas, verificou-se que os extratos de Piquiá possuem elevado teor de compostos fenólicos e que, por isso, demonstraram boa atividade sequestrante do radical DPPH *in vitro*. Além disso, observou-se através dos resultados obtidos nas condições deste estudo que nenhum dos extratos possui a capacidade de inibir a atividade enzimática da tirosinase , ou da colagenase, de forma satisfatória. Com relação à atividade fotoprotetora dos extratos avaliados, observa-se a tendência linear do extrato da semente de Bacurizinho, com relação ao fator de proteção, que compreende as três bandas de radiações solares (UVA, UVB e UVC). Os resultados demonstram que a busca de inibidores de enzimas a partir de extratos de plantas pode ser uma ferramenta importante no desenvolvimento de biocosméticos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

ARUOMA, O.I. Characterization of Drugs as Antioxidant Prophylactics. *Free Rad. Biol. Med.*, v: 20, 675-705p, 1997.

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; J. Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Food Chem.* 52, 5195, 2004.

BARREIRO, Elieser J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos, Faculdade de Farmácia, UFRJ, 1989.

BIONECTAR, disponível em: <www.bionectar.com.br>, acessado dia 12/01/2013

CEASA CAMPINAS-SP, disponível em: <www.ceasacampinas.com.br>, acessado dia 12/01/2013.

CHOI, H.; PARK J.; *Ho-Il*; HEUNG-JAE K.; DONG-WON K. A novel L-ascorbic acid and peptide conjugate with increased stability and collagen biosynthesis. In: BMB reports. Seoul, Korea, 2009.

CLÍNICA CADERNAS, disponível em: <<http://www.clinicacardenas.com/colageno>>, acessado dia: 12/01/2013.

CONCHOROSKI, D. D. & CORRÊA, G. G. Tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras, Ijuí, Rio Grande do Sul, 2005.

FREEDBERG, I.M.; Fitzpatrick Tratado de Dermatologia. 5 ed. Rio de Janeiro. Ed Revinter, 2005. p 88-259.

FUNCIONAL FÍSIO ESTÉTICA, disponível em <<http://funcionalfisioestetica.wordpress.com/category/peeling>>, acessado dia: 15/01/2013

GARDENS NATURALS, disponível em: <www.gardenstatenaturals.com>, acessado dia: 12/01/2013.

GIANNOCARO, F. B.; FILHO, A. G.; FERREIRA, L. M. Cultivo de fibroblastos humanos com DMAE. *Cosmetics & Toiletries*. V. 19, jan.-fev. 2007.

HARRIS, M.I.N.C. Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento. Editora Senac, São Paulo, 2003.

HEARING V.J. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.* 1987; 143:154-65
JACKSON, John K.; ZHAO, Jinying; WONG, Wesley; BURT, Helen M. The inhibition of collagenase induced degradation of collagen by the galloyl-containing polyphenols tannic acid, epigallocatechin gallate and epicatechin gallate. *J Mater Sci: Mater Med* 21:1435–1443, 2010.

KIM Y.; UYAMA H.; KOBAYASHI S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. In: *Biochem Biophys Res Commun*, 320:256-261, 2004.

MARTHO; AMABIS. Fundamentos da Biologia Moderna. Editora Moderna, 4ª Edição, São Paulo, 2006.

LOPES, Rute H; CAVALCANTE, Katia V. A amazônia como apelo de mercado e estoque de matéria prima para a indústria de biocosméticos: ficção ou realidade?, São Carlos, SP, 2010.

MARCHESAN, E. D.; FERRONATTO, R.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S. M.; ONOFRE, S. B. Ação dos óleos essenciais produzidos por *baccharis dracunculifolia* D.C. e *baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar*, Umuarama, v. 10, n. 2, p. 63-66, 2006.

NERYA O.; VAYA, J.; MUSA, R.; IZRAEL S.; BEN-AIRE, R.; TAMIR, S. Glabrene and isoquiritigenin as tyrosinase inhibitors from licorice roots. *J. Agric. Food. Chem.* 51:1201-1207, 2003.

Oliveira, K.B. Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná. 62p., 2010.

RIBEIRO, R. I. M. A.; KURIBAYASHI, J. S.; JÚNIOR, P. C. B.; BELETTI, M. E.; ESPINDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Inibição de metaloproteinases por

extratos aquosos de Aloe vera, Annona muricata e Chá Preto. Biosci. J., Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 121-127, Jan./Feb. 2010.

RODRIGUES, V. Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 74p. 2009.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; JUNIOR, G. M. V.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, vol.30, n. 2, São Paulo, Mar./Apr. 2007.

THRING, Tamsyn SA; HILI, Pauline; NAUGHTON, Declan P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9:27, 2009.

VAN WART H.E.; STEINBRINK D.R. A Continuous spectrophotometric assay for Clostridium histolyticum collagenase. *Anal Biochem*, 1981, 113:356-365

VELASCO, M.V.R, BALOGH, T.S, PEDRIALI, C.A., SARRUF, F.D., PINTO, C.A.S.O., KANEKO, T,M, BABY, A.R Novas metodologias analíticas para avaliação da eficácia fotoprotetora (in vitro) – revisão. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Apl*, v. 32, 27-34p., 2011.

VISNARDI, A. R. Efeito do ultra-som de baixa intensidade no colágeno da pele sadia de ratos. 2007. 106. f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia. Escola de Engenharia de São Carlos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Instituto de Química de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.