

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

EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA COMO INIBIDORES DE
TIROSINASE, ELASTASE E HIALURONIDASE

Bolsista: Edna Márcia Almeida Costa, CNPq

MANAUS

2012

EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA COMO INIBIDORES DE
TIROSINASE, ELASTASE E HIALURONIDASE

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0021/2011

EXTRATOS DE PLANTAS DA AMAZÔNIA COMO INIBIDORES DE
TIROSINASE, ELASTASE E HIALURONIDASE

Bolsista: Edna Márcia Almeida Costa, CNPq

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS

2012

Todos os direitos deste relatório são reservados
à Universidade Federal do Amazonas, ao
Laboratório de Atividade Biológica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas e aos
seus autores. Parte deste relatório só poderá ser
reproduzida para fins acadêmicos ou
científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho
Nacional de Pesquisa – CNPq, através do
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação
Científica da Universidade Federal do
Amazonas, foi desenvolvida pelo Laboratório de
Atividade Biológica da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas.

RESUMO

A elevação da atividade da enzima tirosinase pode levar ao desenvolvimento de hiperpigmentação da pele, assim como a elevação das enzimas elastase e hialuronidase, que fazem a degradação, respectivamente, de elastina e ácido hialurônico da matriz extracelular, pode acelerar o envelhecimento cutâneo, promovendo à perda de elasticidade da pele. Alguns estudos têm demonstrado a eficácia na utilização de plantas ricas em fenóis com a capacidade de inibir as enzimas tirosinase, elastase e hialuronidase. Dessa forma, o presente projeto teve como objetivo avaliar a atividade inibitória de extratos de plantas da Amazônia sobre essas enzimas. Utilizaram-se 65 extratos secos obtidos por maceração com água, etanol ou metanol de folhas, cascas ou raízes de plantas colhidas na Amazônia. Dentre os testes, realizou-se determinação do potencial antioxidante por meio do teste de varredura do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), dosagem de fenóis totais, flavonóides totais, inibição da elastase, hialuronidase e tirosinase *in vitro*. Das amostras testadas, os extratos 157-r, 234-cc, 73-cc, 157-f e *Calycophyllum spruceanum* (hidroetanólico) demonstram boa atividade inibitória tanto em relação à enzima hialuronidase, como à enzima elastase. No entanto, nenhuma das amostras estudadas demonstrou atividade inibitória satisfatória em relação à tirosinase. 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.

Palavras Chave: elastase, hialuronidase, tirosinase, plantas amazônicas.

ABSTRACT

The increase in enzyme activity can lead to the tyrosinase of skin hyperpigmentation, and the elastase enzyme elevations and hyaluronidase, which are degradation, respectively, of elastin and extracellular matrix of hyaluronic acid can accelerate the aging process by promoting the loss of skin elasticity. Some studies have demonstrated the effectiveness in use of phenol-rich plants with the capacity to inhibit the enzyme tyrosinase, elastase and hyaluronidase. Thus, this project aimed to evaluate the inhibitory activity of extracts from plants of the Amazon on these enzymes. Dried extracts were used obtained by maceration with water, ethanol or methanol leaves, bark or roots of the plants harvested Amazon. Among the tests, there was determination of antioxidant potential by means of the scanning of the radical 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), measurement of total phenols, flavonoids, inhibition of elastase, hyaluronidase and tyrosinase *in vitro*. Of the 65 samples tested, the extracts 157-r, 234-cc, 73-cc, 157-f and *Calycophyllum spruceanum* (hydroethanolic) show good inhibitory activity in relation to the enzyme hyaluronidase, such as the enzyme elastase. However, any sample shows satisfactory inhibitory activity against the tyrosinase. The results show that the search for inhibitors of enzyme from plant extracts can be an important tool in developing biocosmetics.

Key words: elastase, hyaluronidase, tyrosinase, Amazon plants,

LISTA DE TABELA

TABELA 1 - Características e processo de obtenção de extratos de plantas.....	18
TABELA 2 - Perfil químico e de inibição enzimática dos extratos de plantas da Amazônia.....	24

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - Atividade antioxidante expressa como concentração eficiente (IC 50) em extratos de plantas da Amazônia com o DPPH.....	26
FIGURA 2 - Concentração de flavonóides totais (%) em extratos de plantas da Amazônia....	27
FIGURA 3 – Concentração de fenóis totais (%) em extratos de plantas da Amazônia.....	28
FIGURA 4 – Porcentagem de inibição da hialuronidase no padrão rutina e em extratos de plantas da Amazônia.....	28
FIGURA 5 – – Porcentagem de inibição da elastase no padrão ácido gálico e em extratos de plantas da Amazônia.....	29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	12
2.1 Pele	12
2.1.1 Epiderme.....	12
2.1.2 Derme	13
2.2 Aspectos gerais da hiperpigmentação da pele	14
2.2.1 Enzima tirosinase.....	14
2.3 Aspectos gerais do envelhecimento cutâneo	15
2.3.1 Elastase e hialuronidase.....	15
2.4 Compostos fenólicos.....	16
3. METODOLOGIA	Erro! Indicador não definido.
3.1 Escolha dos extratos.....	18
3.2 Determinação do potencial antioxidante: método DPPH	20
3.3 Determinação de flavonóides totais.....	20
3.4 Determinação de fenóis totais	21
3.5 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a hialuronidase <i>in vitro</i>	21
3.6 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a elastase <i>in vitro</i>	22
3.7 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a tirosinase <i>in vitro</i>	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
5. CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32

1. INTRODUÇÃO

A hiperpigmentação e o envelhecimento cutâneo estão entre as principais manifestações que afetam o aspecto pessoal e a aparência estética da população em todo o mundo. Apesar dos avanços científicos, isso se deve a uma variedade de fatores, tanto intrínsecos, como mecanismo enzimático, bem como extrínsecos, relacionados à exposição solar, por exemplo. Portanto há uma necessidade crescente de pesquisas e desenvolvimento de novas substâncias a serem utilizadas no combate e/ou retardamento dessas manifestações.

A hiperpigmentação da pele é o resultado de algumas anormalidades no mecanismo enzimático que controla a pigmentação, como a tirosinase, podendo ser causada por uma variedade de fatores incluindo inflamação, idade avançada, fatores genéticos, distúrbios hormonais e exposição ao sol em diferentes graus. A melanina é importante para proteção contra lesão por radiação ultravioleta, mas sua produção desordenada pode levar à formação de lentigem ou manchas escurecidas de senescência (NICOLETTI et al., 2002).

Assim como a hiperpigmentação, o envelhecimento cutâneo também é o resultado de várias mudanças originadas na pele. Há a redução da síntese do colágeno, da elastina e do ácido hialurônico, assim como o aumento da degradação dos mesmos e elevação da expressão das enzimas collagenase, elastase e hialuronidase, o que contribui para a fragmentação e desorganização das fibras de colágeno e elastina na derme (GIARDINA et al., 2010; THRING et al., 2009).

Vários estudos enzimáticos mostram uma correlação entre utilização de fenóis, como flavonóides e taninos, e diminuição dos efeitos da hiperpigmentação e envelhecimento da pele, através da inibição da tirosinase, collagenase, elastase e hialuronidase, respectivamente. Neste contexto, a busca por substâncias naturais que interferem na pigmentação e no envelhecimento da pele está cada vez mais em destaque, devido à possível aplicação dermatológica dessas substâncias e a capacidade de atuarem como agentes terapêuticos e/ou cosmetológicos (JACKSON et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; SUMANTRAN et al., 2007; THRING et al., 2009).

Dessa forma, o trabalho tem o objetivo de estudar a atividade inibitória de extratos de plantas da Amazônia sobre as enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase, fazendo a determinação do efeito inibitório desses extratos, bem como identificar o teor de fenóis totais e flavonóides totais e estabelecer a relação entre o teor desses fenóis com a inibição das enzimas em questão.

Atualmente, existem vários métodos para determinar o potencial antioxidante, bem como o teor de fenóis, e avaliar a inibição enzimática. Os mais conhecidos incluem método de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila), fenóis totais, flavonóides totais, elastase, hialuronidase e tirosinase *in vitro*, utilizando microplaca.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Pele

A pele é o maior órgão do corpo humano e protege o corpo de várias agressões. Ela constitui uma barreira eficiente contra agressores exógenos e impede a perda de água e de proteínas para o exterior. Além disso, ela age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico, da regulação da temperatura corpórea, da produção de vitamina D3, da excreção de eletrólitos e outras substâncias, entre outras funções (RODRIGUES, 2009; VISNARDI, 2007). A pele compreende a epiderme, que abrange a camada mais externa dos tecidos, e a derme, que se caracteriza por ser uma camada mais interna, abrangendo a parte mais profunda da pele e do tecido conjuntivo.

2.1.1 Epiderme

Segundo Borojevic et al. (1999), a epiderme, camada estratificada, é composta essencialmente de queratinócitos e os melanócitos, as células responsáveis pela cor da pele. Os melanócitos sintetizam o pigmento natural da pele, a melanina, que é progressivamente transferida aos queratinócitos. As características genéticas do indivíduo e a exposição ao sol determinam a quantidade da melanina incorporada e, conseqüentemente, a cor da pele (BOROJEVIC et al., 1999).

A melanina é o pigmento mais bem distribuído na natureza. Ela pode ser encontrada em bactérias, fungos e plantas, e em animais ocorre principalmente na orelha interna, nos olhos, no cabelo e na pele de mamíferos. A melanina é um biopolímero heterogêneo (NICOLETTI et al., 2002) e é uma importante defesa da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta (UV) (OLIVEIRA, 2010; MACRINI, 2004).

A síntese de melanina ocorre através de uma série de reações oxidativas envolvendo a tirosina na presença da tirosinase. O envolvimento da radiação UV no estímulo a essa síntese foi comprovado por vários estudos, sendo que um deles demonstrou ocorrer um aumento da atividade da tirosinase, principalmente à sua ação DOPA oxidase, e um estímulo à síntese de melanina quando a pele sofreu sucessivas irradiações UV (OLIVEIRA, 2010).

2.1.2 Derme

A derme é responsável pela flexibilidade, elasticidade e pela capacidade de estiramento da pele. Ela é formada por fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos, como o ácido hialurônico, produzidos pelos fibroblastos, que são as células mais numerosas do tecido conjuntivo (THRING et al., 2009; VISNARDI, 2007).

O colágeno é a proteína mais abundante do organismo dos animais. É a principal estrutura protéica do tecido conjuntivo, contém os aminoácidos glicina, prolina e hidroxiprolina (RODRIGUES, 2009; VISNARDI, 2007).

Segundo Visnardi (2007), as fibras de elastina da derme são encontradas entrelaçadas entre as fibras do colágeno, porém são mais finas que as fibras do mesmo, e sua função é retornar a deformidade da rede para a condição de relaxamento, retornando a forma original após distensão. A elastina é caracterizada pela sua alta força química e física e especialmente pela sua característica elástica (RODRIGUES, 2009; THRING et al., 2009).

Como o colágeno, a elastina é rica em glicina e prolina, mas também possui resíduos de aminoácidos polares como aspartato, glutamato, entre outros. Além destes, a elastina contém dois aminoácidos incomuns, a desmosina e a isodesmosina, formados por ligações covalentes entre os quatro resíduos de lisina. Estas ligações cruzadas são responsáveis pela consistência elástica da elastina (RODRIGUES, 2009).

Outro componente da derme, o ácido hialurônico, é um glicosaminoglicano de alta massa molecular composto por unidades repetitivas de dissacarídeo de ácido D-glucurônico (GlcUA) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). O ácido hialurônico é agora reconhecido como um participante importante nos processos biológicos de motilidade, proliferação, diferenciação e migração celular (GONÇALVES, 2007; RODRIGUES, 2009; TAKAHASHI et al., 2003).

O ácido hialurônico tem a propriedade de manter as células aderidas umas às outras. Por ação da hialuronidase, o polímero é transformado em pequenos fragmentos, diminuindo significativamente sua viscosidade e facilitando a proliferação celular entre os tecidos, levando assim a uma conseqüente degradação da matriz extracelular (MARCHESAN et al., 2006).

2.2 Aspectos gerais da hiperpigmentação da pele

De maneira geral, a hiperpigmentação da pele é devida a vários fatores, como envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais e exposição ao sol em diferentes graus (MACRINI, 2004; NICOLETTI et al., 2002).

O papel fisiológico da melanina consiste, fundamentalmente, em prover a cor da pele e a fotoproteção. Como filtro solar, a melanina difrata ou reflete a radiação UV. Após a irradiação, os melanossomas se reagrupam em torno do núcleo e protegem, assim, o material genético da célula. Muitas são as modificações patológicas da cor da pele e são denominadas discromias (OLIVEIRA, 2010; NICOLETTI et al., 2002).

A melanina é importante para proteção contra lesão por UV, mas sua produção desordenada pode levar à formação de lentigem ou manchas escurecidas de senescência. O controle da hiperpigmentação está se tornando cada vez mais importante conforme a população de idosos continua a crescer (OLIVEIRA, 2010; NICOLETTI et al., 2002).

2.2.1 Enzima tirosinase

A tirosinase é uma enzima que requer cobre como co-fator e que catalisa duas etapas da síntese de melanina, convertendo a tirosina em eumelanina (preta) ou feomelanina (amarelada ou avermelhada). A primeira delas, limitante da melanogênese, é a hidroxilação da tirosina a 3,4-di-hidroxi-fenilalanina (L-DOPA) ou diretamente a *o*-dopaquinona.

Sendo a tirosinase a enzima limitante para a melanogênese, o aumento ou diminuição tanto de sua expressão como de sua atividade podem levar a alteração na síntese de melanina. Um grande número de inibidores naturais e sintéticos da tirosinase vem sendo identificados. Eles podem ser classificados como: agentes redutores, que causam redução da *o*-dopaquinona à LDOPA; sequestrantes da *o*-dopaquinona, como certos tio-derivados; substratos enzimáticos alternativos, como os compostos fenólicos, cujos produtos quinóides de reação absorvem numa diferente faixa espectral que o dopacromo; inativadores não-específicos enzimáticos, como alguns ácidos e bases que desnaturam a enzima; inativadores específicos da tirosinase, também chamados de substratos suicidas, já que se ligam irreversivelmente à enzima; e inibidores específicos da tirosinase, que se ligam reversivelmente à tirosinase reduzindo sua capacidade catalítica. Somente os inibidores específicos da enzima são considerados inibidores verdadeiros (OLIVEIRA, 2010).

2.3 Aspectos gerais do envelhecimento cutâneo

Segundo Rodrigues (2009), uma das principais causas do envelhecimento é a perda de colágeno no organismo. A firmeza da pele, a elasticidade e o tônus são gradualmente perdidos com o envelhecimento cutâneo. Há a formação de rugas, aumento da fragilidade e diminuição da cicatrização de feridas e a pele torna-se mais fina, pálida e seca. O sistema superficial capilar torna-se visível, desordens pigmentares aparecem e células cutâneas se proliferam na epiderme dando aparência irregular (HIRATA et al., 2004).

As mudanças originadas na pele, especialmente na derme, estão relacionadas com a diminuição da habilidade das células, particularmente, os fibroblastos, em regenerar moléculas que compõem a matriz extracelular. Dessa forma, além da redução da síntese do colágeno e da elastina, haverá, também, o aumento da degradação dos mesmos, com a concomitante elevação da expressão das metaloproteases, o que presumivelmente contribui para a fragmentação e desorganização das fibrilas de colágeno e elastina na derme. Essas metaloproteases constituem uma família de proteases contendo zinco que degradam os componentes das proteínas dos tecidos conectivos e a sua atividade determina o volume de colágeno na derme (GIARDINA et al., 2010; THRING et al., 2009).

2.3.1 Elastase e hialuronidase

As metaloproteases têm em comum dois íons de zinco, um localizado no sítio ativo da enzima, envolvido no processo catalítico, e o outro com função estrutural. Os inibidores da síntese das MMPs obtidos até agora são substâncias que se ligam diretamente ou indiretamente com o íon zinco catalítico (LEITE, 2009).

Outro sistema proteolítico envolvido na degradação da matriz extracelular é a elastase. Esta enzima, um membro da família de proteases quimotripsina, é responsável principalmente pela quebra da elastina, que é uma proteína com propriedades únicas de recolhimento elástico, fundamental para dar elasticidade das artérias, pulmões, ligamentos e pele. As elastases podem decompor elastina, bem como fazer a união de fibronectina, colágeno e proteínas da matriz extracelular. Como as metaloproteases, em condições normais, a atividade da elastase é necessária na degradação de proteínas estranhas dentro da matriz extracelular durante a fagocitose por neutrófilos. Em termos de antienvelhecimento, encontrar os inibidores da enzima elastase pode ser útil para evitar a perda de elasticidade da pele e, portanto, flacidez da pele (THRING et al., 2009).

Existe, ainda, outro grupo de enzimas importantes no envelhecimento cutâneo, as hialuronidases, que são capazes de romper o ácido hialurônico. Elas são comumente classificadas em três grupos de acordo com seus mecanismos de degradação: hialuronato-4 glicanohidrolase (Hialuronoglucosaminidase), hialuronato-3-glicanohidrolase (hialuronoglucuronidase), liase e hialuronato (TAKAHASHI et al., 2003).

As hialuronidases presentes em vários tecidos de mamíferos, pertencentes ao primeiro grupo, são de particular interesse biológico, uma vez que têm demonstrado estar envolvidas na promoção da flacidez da pele e na fisiopatologia de muitas doenças humanas tais como a artrite reumatóide e câncer (TAKAHASHI et al., 2003). O modo de ação desta classe de enzima tem como produto final da reação enzimática polissacarídeos tetra- e hexa-sacarídeos (GONÇALVES, 2007).

2.4 Compostos fenólicos

Os metabólitos secundários e extratos brutos de plantas têm sido amplamente investigados, pois estas apresentam grande variedade de compostos, incluindo polifenóis como os flavonóides, tocoferóis, ácidos fenólicos e taninos, que demonstram inibir a atividade das enzimas elastase, hialuronidase e tirosinase (JACKSON et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; SUMANTRAN et al., 2007; THRING et al., 2009).

Os compostos fenólicos constituem um dos grupos de compostos mais abundantes nas plantas. São considerados como uma das principais classes de metabólitos secundários com funções nas plantas que vão desde a pigmentação ao crescimento, passando pela defesa das plantas contra ataques microbiológicos e predadores (CARVALHO, 2007).

São conhecidos milhares de compostos fenólicos nas plantas que podem ser divididos em diversas classes de acordo com a sua estrutura química. Entre estas classes podem-se encontrar compostos simples com apenas um anel benzênico polihidroxilado tais como os ácidos benzóicos e compostos com estruturas mais complexas, tais como os flavonóides (CARVALHO, 2007).

A natureza polifenólica destes compostos tem caráter antioxidante, ou seja, podem neutralizar as espécies reativas de oxigênio em grande parte resultantes da peroxidação lipídica. Esta propriedade confere aos compostos fenólicos uma vasta atividade biológica, destacando-se a diminuição do risco de doença cardiovascular (através da diminuição da oxidação de LDL, descida da pressão arterial e uma diminuição do nível de colesterol plasmático), a redução do risco de desenvolvimento da doença de Alzheimer, a prevenção da

ocorrência de alguns tipos de cancro e o retardamento do envelhecimento celular (CARVALHO, 2007).

Os flavonóides, bem representados pela quercetina, geralmente causam inibição competitiva da enzima e também atuam quelando o cofator enzimático (OLIVEIRA, 2010).

Sendo assim, vários estudos têm sido realizados com várias espécies de plantas com objetivo de encontrar substâncias inibidoras de várias enzimas, tanto para fins terapêuticos, como para cosméticos (JACKSON et al., 2010; SUMANTRAN et al., 2007; THRING et al., 2009).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Escolha dos extratos

Aproximadamente 65 extratos secos obtidos por maceração com água, etanol ou metanol de folhas, cascas ou raízes de plantas colhidas na Amazônia foram previamente selecionados pela determinação do potencial antioxidante, através da metodologia de DDPH (tabela 1). Os extratos são provenientes do banco de extratos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM e do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), por colaboração da Dra. Cecília Nunes.

n°	Código	Família	Espécie	Material	Solvente	Secagem
1	031 MAGM				MeOH	Liofilização
2	162			folha	DCM	Liofilização
3	145			folha	MeOH	Liofilização
4	091			folhas	MeOH	Liofilização
5	162 Mv= 10,10g			caule	H ₂ O	Liofilização
6	1475- Mv=			semente	H ₂ O	Liofilização
7	230 Mv= 10,44g			galho	MeOH	Liofilização
8	230 Mv- 10,69g			casca P.X	MeOH	Liofilização
9	157 Mv-10,32g			raiz	MeOH	Liofilização
10	145 Mv= 10,23g			semente	MeOH	Liofilização
11	146 Mv=10,22g			galho	H ₂ O	Liofilização
12	307 Mv= 10,70g			galho P.X	MeOH	Liofilização
13	146 Mv= 10,70g			galho	MeOH	Liofilização
14	234 M=10,08mg			Casca	MeOH	Liofilização
15	152 M=10,2mg			folha	H ₂ O	Liofilização
16	230 Mv=10,580g			F.P.X	NeOH	Liofilização
17	0,91 Mv= 10g			casca	MeOH	Liofilização
18	152 m= 10,74			folha	MeOH	Liofilização
19	145 Mv= 10,28mg			galho	MeOH	Liofilização
20	234 m= 10,13mg			Galho	MeOH	Liofilização
21	102 Mv= 10,20g			folha	H ₂ O	Liofilização
22	73 Mv- 10,03g			casca	MeOH	Liofilização
23	234 m-10,15mg			folha	MeOH	Liofilização
24	24 Mv=10,31g			galho	MeOH	Liofilização
25	162 Mv=10,37g			folha	MeOH	Liofilização
26	162 Mv= 10,5g			galho das folhas	H ₂ O	Liofilização
27	157- Mv=10,50g			folhas	MeOH	Liofilização
28	146- Mv= 10,50g			folha	MeOH	Liofilização
29	125- Mv 10,56			Partes áreas	H ₂ O	Liofilização
30	162- Mv-10,26g			galho das folhas	MeOH	Liofilização
31	162 Mv 10,80g			caule	MeOH	Liofilização
32	PBP-001 M=30mg					

33	PBP-002 M=30mg			
34	PBP-003 M=30mg			
35	PBP-004 M=30mg			
36	PBP-005 M=30mg			
37	PBP-006 M=30mg			
38	PBP-007 M=30mg			
39	PBP-008 M=30mg			
40	PBP-009 M=30mg			
41	PBP-010 M=30mg			
42		<i>Calycophyllum spruceanum</i>	H ₂ O	Spray drier
43		<i>Calycophyllum spruceanum</i>	hidroetanólico	Spray drier
44		<i>Justicia acuminatissima</i>	H ₂ O	Spray drier
45		<i>Justicia acuminatissima</i>	hidroetanólico	Spray drier
46		<i>Libidibia ferrea</i> vagem		Spray drier
47		<i>Libidibia ferrea</i> casca		Spray drier
48		<i>Arrabidea chica</i>	hidroetanólico	Spray drier
49	(lote-C)	<i>Maytenus guianensis</i>	etanólico	Spray drier
50	(lote-A)	Muirapuama	etanólico	Spray drier
51		<i>Arrabidea chica</i>	etanólico	Spray drier
52		<i>Vismia guianensis</i>		Spray drier
53		<i>Passiflora nitida</i>		Spray drier
54		<i>Smilax brasiliensis</i>		Spray drier
55		<i>Derris floribuda</i>	MeOH	Spray drier
56		<i>Derris floribuda</i>	DCM	Spray drier
57		<i>Derris floribuda</i>	H ₂ O	Spray drier
58		<i>Justicia acuminatissima</i>	Etanólico	Spray drier
59		<i>Eugenia punicifolia</i>		Spray drier
60		<i>Cyssus Sicioides</i>		Spray drier
61	249- 20mg	galho	MeOH	Liofilização
62	249- 20mg	folha	H ₂ O	Liofilização
64	249- 20mg	folha	DCM	Liofilização
65	249 20mg	folha	MeOH	

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

3.2 Determinação do potencial antioxidante: método DPPH

A determinação da atividade antioxidante foi realizada por meio da capacidade dos antioxidantes presentes nas amostras sequestrarem o radical estável DPPH, segundo metodologia utilizada por Molyneux (2004), com modificações.

Para a realização do ensaio, primeiramente, os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 1mg/mL. Em seguida, foi adicionado 30µL de cada extrato e/ou padrão quercetina na mesma concentração em cada cavidade da microplaca, com suas respectivas diluições seriada. Logo após, foi adicionado 270µL do radical DPPH em todas as cavidades da microplaca. E para o controle, foram utilizados 30µL de etanol e 270µL do radical DPPH. A placa, então, foi incubada por 15min em temperatura ambiente no escuro e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância da leitura. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente, o cálculo a seguir de todas as diluições:

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

3.3 Determinação de flavonóides totais

A determinação de flavonóides totais foi realizada, segundo metodologia utilizada por Chang et al. (2002), com modificações.

Para a realização do ensaio, primeiramente, os extratos foram diluídos em etanol na concentração de 1mg/mL. Em seguida, foi adicionado 30µL de cada extrato e/ou padrão quercetina (diluída em etanol 80% na concentração de 0,1mg/mL) e 90µL de etanol 95% em cada cavidade da microplaca. Logo após, foi adicionado 6µL de cloreto de alumínio a 10% e 6µL de acetato de potássio 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, adicionou-se mais 168µL de água destilada. E para o branco, foram utilizados 30µL de extrato e/ou padrão quercetina e 270µL de etanol. A placa, então, foi incubada por 30min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 405nm, em leitor ELISA. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados foram obtidos utilizando-se, primeiramente, a diferença das absorbâncias das amostras e do padrão pela absorbância dos respectivos brancos. Logo após, foi calculada a determinação da concentração de flavonóides:

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

3.4 Determinação de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras das espécies a serem estudadas, foi feita utilizando o método de Folin–Ciocalteu, com modificações, descrito por Bonoli et al. (2004).

Para a realização do ensaio, os extratos foram diluídos, primeiramente, em etanol na concentração de 1mg/mL. Em seguida, foi adicionado 10µL de cada extrato e/ou padrão ácido gálico (diluído em etanol na concentração de 1mg/mL) em cada cavidade da microplaca. Logo após, foi adicionado 50µL Folin-Ciocalteu diluído 1/10 em água destilada. A placa foi incubada por 8min em temperatura ambiente. Para finalizar, adicionou-se mais 240µL de carbonato de sódio. E para o branco, foram utilizados 50µL de água, 10µL extrato e/ou padrão e 240µL de carbonato de sódio. A placa, então, foi incubada por 3min em temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da absorbância da leitura no comprimento de onda de 620nm, em leitor ELISA. O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados foram obtidos utilizando-se o cálculo a seguir:

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

3.5 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a hialuronidase *in vitro*

A inibição da atividade de hialuronidase será determinada conforme metodologia descrita por Marchesan et al (2006), com modificações.

Para realização do ensaio, foram adicionados, primeiramente, em cada tubo de hemólise, 30µL de cada extrato diluído em água/DMSO na concentração de 1mg/mL, 125µL sal de potássio do ácido hialurônico em tampão acetato 0,1M, pH 3,6 contendo 0,15 M de NaCl e 15µL da enzima hialuronidase dissolvida no mesmo tampão. Os tubos foram, então, incubados a 37°C por 40 minutos. Após a incubação, 40µL do tetraborato de potássio 0,8M foi adicionado na mistura de reação, que foi novamente incubada em banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida, foi adicionado 90µL de dimetilaminobenzaldeído e a mistura foi incubada a 37°C por 20 minutos.

Finalmente, a mistura de reação foi transferida para a microplaca e a absorvância foi medida em leitor ELISA a 560nm usando DMSO como controle negativo e a rutina, como padrão. O ensaio foi realizado em triplicata.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem (%) utilizando-se o cálculo a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (\text{abs extrato}) \times 100}{(\text{abs controle})}$$

3.6 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a elastase *in vitro*

O ensaio foi realizado segundo a metodologia descrita por Thring et al (2009), utilizando tampão Tris-HCL pH 7,5, elastase pancreática dissolvida em água estéril, obtendo-se uma solução na concentração de 0,4mg/mL, e o substrato N-succinil-Ala-Ala-Ala-p nitroanilida (AAPVN) a 1,6 mM dissolvido em tampão.

Para realização do ensaio, foram adicionados, primeiramente, em cada cavidade da microplaca, 10µL de cada extrato diluído em água/DMSO na concentração de 1mg/mL, o padrão ácido gálico, o diluente tampão e o controle negativo água/DMSO. Foi adicionada, então, 90µL da solução de enzima, e a placa foi incubada por 15 minutos em temperatura de 37°C. Em seguida, 100µL do substrato foi adicionado e foi realizada a medição da primeira absorvância em 405nm em leitor ELISA. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e o monitoramento da absorvância foi realizado durante 50 minutos, de 5 em 5 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem (%) de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (\text{abs2 extrato} - \text{abs1 extrato}) \times 100}{(\text{abs2 controle} - \text{abs1 controle})}$$

3.7 Ensaio da atividade inibitória dos extratos sobre a tirosinase *in vitro*

O ensaio será realizado segundo a metodologia descrita por Hering (1987), utilizando tampão fosfato pH 6,5 10mM, enzima tirosinase dissolvida em tampão, e o reagente de cor L-DOPA a 1mmol/L dissolvido em tampão.

Para realização do ensaio, foram adicionados, primeiramente, em cada cavidade da microplaca, 20µL de cada extrato diluído em água/DMSO na concentração de 1mg/mL, o padrão ácido kójico e o controle negativo água/DMSO. Foi adicionada, então, 80µL da solução de enzima, e a placa foi incubada por 5 minutos em temperatura de 37°C. Em seguida, foi realizada a primeira leitura (branco) em 405nm em leitor ELISA. Então, 100µL do reagente de cor foi adicionado e, imediatamente, foi realizada a leitura do tempo 0'. A microplaca foi incubada a temperatura ambiente e o monitoramento da absorbância foi realizado durante 20 minutos, de 5 em 5 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata.

A atividade inibitória foi expressa em percentagem (%) de acordo com o cálculo a seguir:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (abs2 \text{ extrato} - abs1 \text{ extrato}) \times 100}{(abs2 \text{ controle} - abs1 \text{ controle})}$$

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 65 amostras de extratos que foram submetidas aos testes estavam identificadas por códigos. A não revelação de algumas das espécies e a apresentação por códigos se deu propositalmente devido ao fato de alguns desses dados serem objeto de pedido de patente após confirmação das atividades em outros experimentos. Devido a problemas de ordem técnica não foi possível realizar os testes de inibição da enzima colagenase e o mesmo foi substituído pela enzima tirosina, 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 abaixo relacionada:

<i>n</i>	<i>Código</i>	<i>DPPH</i> <i>CI50</i> ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Fl. Totais</i> (%)	<i>FT</i> (%)	<i>Hialuronidase</i> (%)	<i>Elastase</i> (%)	<i>Tirosinase</i> (%)
1	031 MAGM	39,3 \pm 1,6	1,1 \pm 0,07	16,3 \pm 1,01	73,7 \pm 4,80	56 \pm 5,80	3,9 \pm 4,33
2	162-f	>100	3,8 \pm 0,65	4,7 \pm 0,06	17,6 \pm 8,80	17,5 \pm 3,0	11,1 \pm 1,75
3	145-f	38,9 \pm 2,4	1,3 \pm 0,20	13,0 \pm 0,87	67,0 \pm 5,68	30,8 \pm 4,57	8,8 \pm 1,41
4	091-f	32,6 \pm 1,5	1,4 \pm 0,11	22,7 \pm 0,72	68,1 \pm 3,56	61,5 \pm 6,46	7,2 \pm 3,71
5	162-c	40,6 \pm 0,7	0,2 \pm 0,07	11,4 \pm 0,82	66,9 \pm 5,37	22,7 \pm 3,03	11,6 \pm 5,51
6	1475-s	89,5 \pm 31,3	0,28 \pm 0,05	7,17 \pm 0,26	54,1 \pm 5,59	36,8 \pm 1,37	8,5 \pm 1,56
7	230-g	31,7 \pm 2,1	1,54 \pm 0,14	19,7 \pm 0,59	55,1 \pm 3,48	38,6 \pm 1,80	11,2 \pm 9,1
8	230-cc	30,7 \pm 1,3	1,32 \pm 0,15	21,2 \pm 2,75	60,2 \pm 9,26	44,4 \pm 2,17	6,1 \pm 0,73
9	157-r	40,03 \pm 0,62	-0,09 \pm 0,055	10,3 \pm 0,44	75,8 \pm 2,79	82,7 \pm 1,57	12,7 \pm 2,14
10	145-s	37,00 \pm 1,50	1,79 \pm 0,33	16,8 \pm 0,88	61,4 \pm 9,43	54,5 \pm 2,10	8,2 \pm 5,28
11	146-g	43,80 \pm 0,74	2,70 \pm 0,36	19,3 \pm 7,73	72,9 \pm 3,27	61,2 \pm 7,56	12,2 \pm 3,93
12	307-g	31,5 \pm 0,2	5,02 \pm 1,78	14,6 \pm 0,32	66,2 \pm 10,85	47,5 \pm 1,62	5,2 \pm 3,76
13	146-g	93,2 \pm 4,86	0,32 \pm 0,05	6,7 \pm 0,02	39,6 \pm 9,94	39,3 \pm 10,06	7,8 \pm 1,14
14	234-cc	28,4 \pm 0,9	0,41 \pm 0,03	40,9 \pm 1,4	64,3 \pm 0,88	69,4 \pm 1,24	9,9 \pm 6,29
15	152-f	44,5 \pm 2,98	2,55 \pm 0,29	12,5 \pm 1,01	67,3 \pm 3,23	22,6 \pm 1,97	6,5 \pm 6,22
16	230-FPX	37,5 \pm 1,87	4,09 \pm 0,05	15,2 \pm 0,55	53,2 \pm 5,75	51,1 \pm 8,98	6,6 \pm 2,07
17	0,91-cc	38,6 \pm 3,6	0,17 \pm 0,04	11,4 \pm 0,31	43,8 \pm 9,82	58,0 \pm 3,19	3,6 \pm 1,18
18	152-f	30,4 \pm 1,0	4,02 \pm 0,08	19,7 \pm 0,85	85,1 \pm 0,85	32,5 \pm 8,41	5,3 \pm 2,36
19	145-g	32,1 \pm 0,4	-0,52 \pm 0,03	26,1 \pm 1,58	44,8 \pm 12,30	49,7 \pm 0,98	7,1 \pm 2,09
20	234-g	32,2 \pm 0,14	0,63 \pm 0,11	18,9 \pm 0,91	58,9 \pm 5,71	64,4 \pm 0,04	3,4 \pm 4,61
21	102-f	28,1 \pm 1,4	1,89 \pm 0,35	30,3 \pm 1,53	73,7 \pm 2,12	47,4 \pm 0,45	-0,5 \pm 4,02
22	73-cc	33,2 \pm 5,7	-1,6 \pm 0,49	23,2 \pm 0,64	83,1 \pm 0,57	71,2 \pm 1,62	5,1 \pm 6,7
23	234-f	85,3 \pm 3,23	4,91 \pm 0,55	14,1 \pm 0,51	38,2 \pm 4,49	36,5 \pm 2,97	3,3 \pm 2,8

24	24 -g	28,5±1,06	0,13±0,08	35,2±2,81	65,4±9,99	48,7±1,37	8,1±7,81
25	162-f	28,7±0,68	5,71±0,18	25,7±0,8	45,7±14,2	65,6±1,25	0,9±1,78
26	162-g	41,5±2,06	0,51±0,17	8,9±0,53	25,7±7,17	18,2±3,82	1,7±0,52
27	157-f	28,6±0,57	7,78±0,56	18,5±0,45	76,3±3,73	80±4,33	7,6±3,45
28	146-f	34,0±0,26	3,13±0,17	19,9±1,82	43,3±7,59	54,6±4,0	1,3±2,95
29	125-a	>100	0,15±0,13	1,6±0,32	85,6±8,49	8,1±4,26	-0,16±2,60
30	162-g	41,7±1,17	0,72±0,07	11,3±0,34	20,5±21,66	51,0±6,70	8,00±5,66
31	162-c	36,2±3,45	0,77±0,20	13,0±0,73	19,8±24,77	45,7±4,56	2,0±4,23
32	PBP-001	34,4±1,93	1,35±0,62	15,5±0,64	70,2±4,85	20,6±4,79	3,7±1,02
33	PBP-002	28,5±0,4	0,63±0,2	21,9±0,97	56,1±4,43	27,7±4,84	6,3±3,85
34	PBP-003	97,1±1,68	-0,08±0,4	7,8±0,27	42,9±13,00	-0,07±4,46	6,3±2,61
35	PBP-004	35,7±0,24	2,29±0,49	14,5±0,35	49,0±2,76	66,6±1,89	9,3±2,73
36	PBP-005	35,0±0,88	3,85±0,31	17,2±0,84	61,9±0,38	25,8±2,87	7,8±2,68
37	PBP-006	32,4±0,35	2,25±0,33	20,2±0,32	61,4±2,94	66,4±1,37	7,4±2,16
38	PBP-007	>100	3,48±0,52	6,4±0,09	50,9±3,04	10,5±5,76	4,6±3,33
39	PBP-008	33,0±0,9	2,96±0,23	13,7±0,45	39,1±6,36	56,2±3,06	6,8±3,90
40	PBP-009	>100	2,25±0,30	6,6±0,11	34,3±24,58	17,6±5,52	6,1±3,44
41	PBP-010	47,9±2,45	-2,90±0,37	10,4±0,26	35,7±5,67	40,6±2,6	2,1±2,49
42	<i>Calycophyllum spruceanum</i>	84,5±2,38	0,05±0,10	7,4±0,23	47,6±4,94	10,6±0,89	5,7±1,21
43	<i>Calycophyllum spruceanum</i>	34,9±2,57	0,52±0,17	13,1±0,38	70,6±2,45	67,0±2,01	4,5±1,82
44	<i>Justicia acuminatissima</i>	39,7±1,9	-0,16±0,16	29,9±1,4	57,6±1,08	71,3±2,81	6,3±1,55
45	<i>Justicia acuminatissima</i>	37,4±0,92	-2,6±0,2	35,7±1,7	40,1±7,21	80,2±1,27	8,7±2,99
46	<i>Libidibia ferrea</i> vagem	28,6±7,83	3,07±0,17	34,4±0,94	77,6±0,38	17,8±2,14	11,6±1,63
47	<i>Libidibia ferrea</i> casca	27,3±0,27	3,91±0,19	41,2±1,02	78,1±1,30	15,8±3,97	10,8±2,57
48	<i>Arrabidea chica</i>	>100	5,07±0,61	5,3±0,28	25,0±6,62	-10,6±2,38	2,4±0,08
49	<i>Maytenus guianensis</i>	39,7±0,67	-0,16±0,38	15,9±0,38	10,7±3,23	41,6±10,87	-1,3±6,10
50	Muirapuama	>100	1,15±0,74	5,3±0,1	49,1±5,0	20,0±4,74	7,2±1,40
51	<i>Arrabidea chica</i>	>100	0,65±0,14	3,8±0,3	34,3±28,0	-8,2±5,84	1,8±0,84
52	<i>Vismia guianensis</i>	31,4±0,51	11,5±0,24	17,1±0,9	51,6±2,12	48,2±20,03	1,7±2,02
53	<i>Passiflora</i>	47,3±0,99	4,14±0,11	12,1±0,67	50,3±2,1	64,1±5,34	6,0±3,10

	<i>nitida</i>						
54	<i>Smilax</i>	44,7±0,50	0,25±0,15	15,5±0,55	32,8±3,95	24,5±2,53	5,3±0,29
	<i>brasiliensis</i>						
55	<i>Derris</i>	>100	5,47±0,17	3,5±0,37	50,6±4,55	10,7±2,52	2,3±0,08
	<i>floribuda</i>						
56	<i>Derris</i>	>100	0,27±0,09	6,6±0,27	-44,6±12,39	5,6±3,12	0,4±1,99
	<i>floribuda</i>						
57	<i>Derris</i>	>100	0,39±0,02	2,6±0,24	31,4±16,49	-2,3±9,7	2,6±1,93
	<i>floribuda</i>						
58	<i>Justicia</i>	49,7±3,07	-0,07±0,01	20,2±1,02	28,2±5,43	84,4±1,28	5,7±0,99
	<i>acuminatissima</i>						
59	<i>Eugenia</i>	>100	-0,15±0,02	0,1±0,03			4,5±5,04
	<i>punicifolia</i>						
60	<i>Cyssus</i>	>100	1,46±0,2	0,8±0,23			
	<i>Sicioides</i>						
61	249-g	58,9±1,27	-0,06±0,01	12,5±0,27	57,65±5,26	64,8±0,80	1,9±0,66
62	249-f	>100	-0,03±0,01	1,85±0,57	45,6±7,27	-15,3±4,16	-2,9±3,86
63	249-g	>100	0,87±0,06	2,6±0,04	-43,1±17,38	5,4±4,26	-0,06±2,21
64	249-f	>100	-0,61±0,007	2,5±0,26	-25,0±26,08	17,9±6,43	-4,9±2,21
65	249-f	>100	-0,001±0,011	2,8±0,11	49,2±4,44	7,9±13,99	0,04±5,27

Tabela 2 - Perfil químico e de inibição enzimática dos extratos de plantas da Amazônia.

A técnica do potencial antioxidante DPPH foi a primeira etapa da pesquisa a ser realizada, submetendo todos os extratos em estudo. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CI50) e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al, 2007). Dentre as amostras que apresentaram maior grau de atividade antioxidante, comparado com o padrão quercetina, estão os extratos 234-cc, 102-f, 24-g, 162-f (metanólico), 157-f, PBP-002 e *Libidibia ferrea* casca, como podem ser vistas na figura 1. A IC 50 da quercetina foi de 4,11µg/mL, enquanto a IC 50 dos extratos foi de 28,4µg/mL, 28,1µg/mL, 28,5µg/mL, 28,7µg/mL, 28,6µg/mL, 28,5µg/mL e 27,3µg/mL, respectivamente.

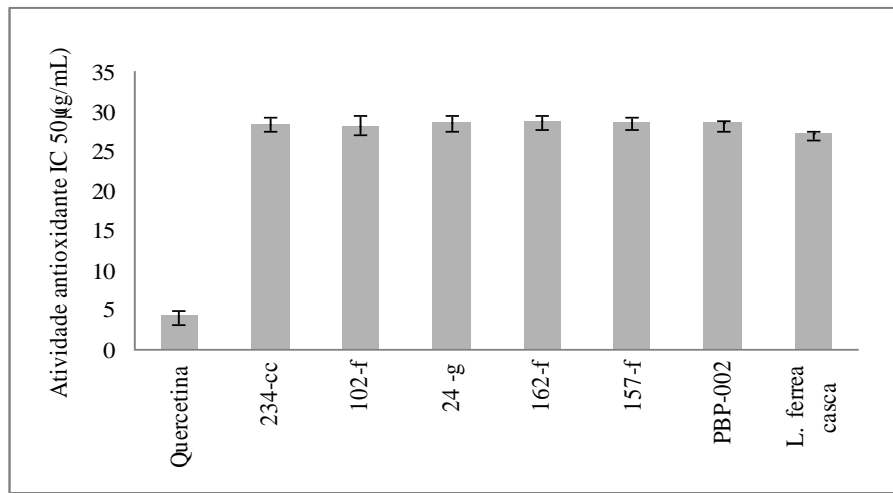


Figura 1 – Atividade antioxidante expressa como concentração inibitória 50 (IC 50) em extratos de plantas da Amazônia contra o radical DPPH.

A segunda técnica realizada foi a de flavonóides totais, onde foi possível mensurar a porcentagem destes fenóis no extrato e, assim, relacionar com a atividade inibitória das enzimas. De acordo com a figura 2, as amostras que apresentaram maior concentração de flavonóides foram os extratos 162-f (diclorometânico), 230-FPX, 152-f, 234-f, 162-f (metanólico), 157-f, 146-f, PBP-007, *Libidibia ferrea* casca, *Arrabidea chica* (hidroetanólico), *Vismia guianensis*, *Passiflora nítida* e *Derris floribuda* (metanólico) com 3,8%, 4,09%, 4,02%, 4,91%, 5,71%, 7,78%, 3,13%, 3,48%, 3,91%, 5,07%, 11,5%, 4,14% e 5,47%, respectivamente.

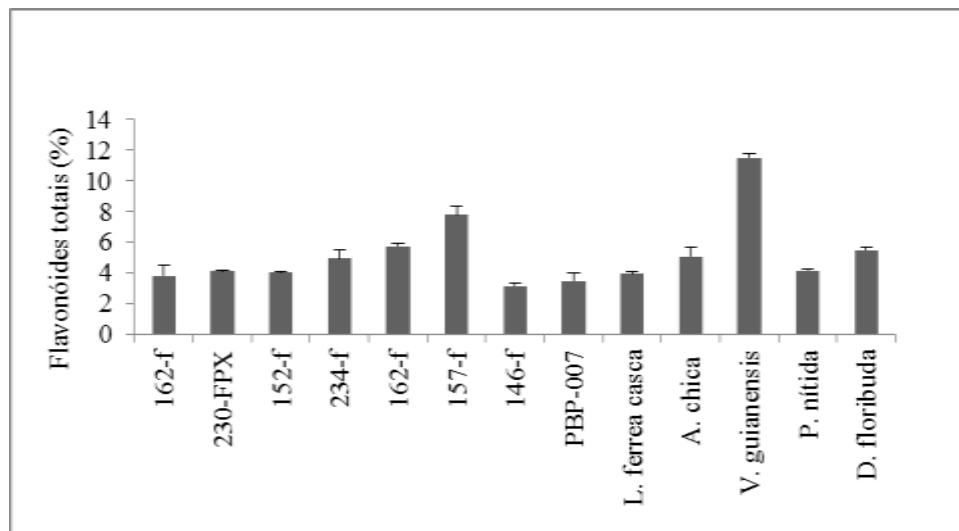


Figura 2 – Concentração de flavonóides totais (%) em extratos de plantas da Amazônia.

Outro teste realizado na pesquisa foi a determinação de fenóis totais nos extratos. Assim como na determinação de flavonóides, quanto maior a porcentagem de fenóis totais no extrato, melhor pode ser a atividade inibitória das enzimas. Dessa forma, as amostras que apresentaram maior concentração de fenóis totais foram os extratos 091-f, 230-g, 230-cc, 234-cc, 152-f, 145-g, 102-f, 73-cc, 24-g, 162-f (metanólico), 146-f, PBP-002, *Justicia acuminatissima* (aquoso), *Justicia acuminatissima* (hidroetanólico), *Libidibia ferrea* vagem e *Libidibia ferrea* casca, como pode ser melhor visualizado na figura 3, com 22,7%, 19,7%, 21,2%, 40,9%, 19,7%, 26,1%, 30,3%, 23,2%, 35,2%, 25,7%, 19,9%, 21,9%, 29,9%, 35,7%, 34,4% e 41,2%, respectivamente.

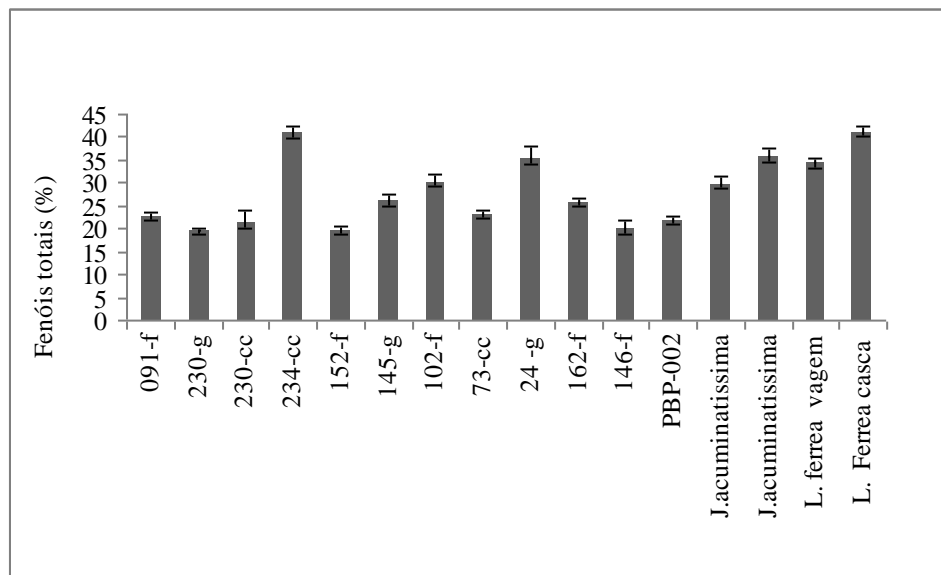


Figura 3 – Concentração de fenóis totais (%) em extratos de plantas da Amazônia.

Dentre as enzimas, a primeira a ser testada foi a hialuronidase. O resultado foi apresentado em porcentagem de inibição com extratos na concentração de 100µg/mL. As amostras que apresentaram melhor porcentagem de inibição em relação à enzima foram os extratos 031 MAGM, 145-f, 091-f, 162-c, 157-r, 146-g, 234-cc, 152-f (aquoso), 152-f (metanólico), 102-f, 73-cc, 157-f, PBP-001, *Calycophyllum spruceanum* (hidroetanólico), *Libidibia ferrea* vagem e *Libidibia ferrea* casca, como mostra a figura 4. A porcentagem de inibição foi de 90,7% para o padrão rutina na concentração de 50µg/mL e, respectivamente, de 73,7%, 67%, 68,1%, 66,9%, 75,8%, 72,9%, 64,3%, 67,3%, 85,1%, 73,7%, 83,1%, 76,3%, 70,2%, 70,6%, 77,6% e 78,1% para os demais extratos.

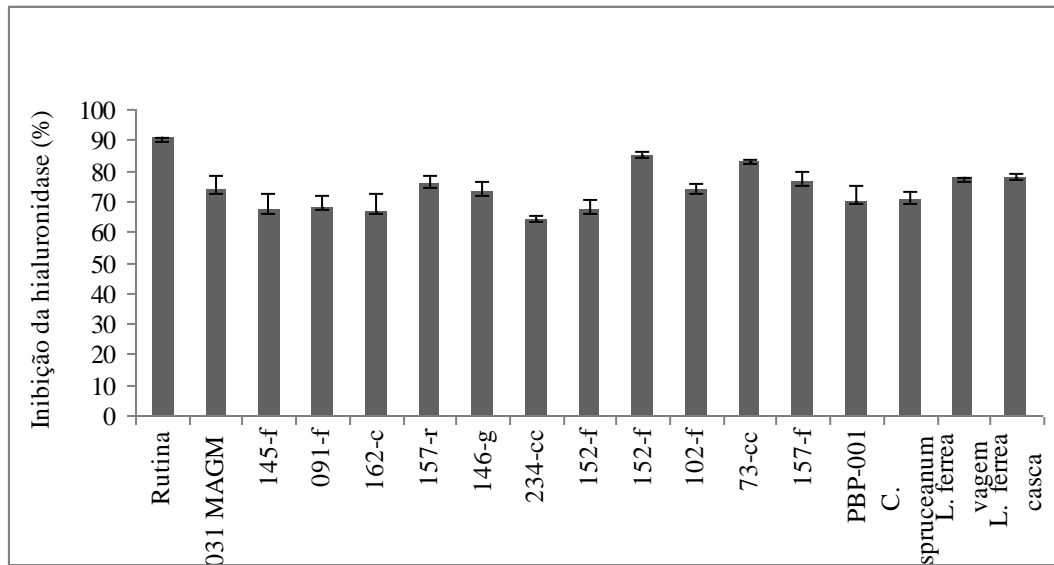


Figura 4 –Inibição da hialuronidase (%) do padrão rutina e de extratos de plantas da Amazônia.

fenóis totais e a inibição da hialuronidase (JACKSON et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; SUMANTRAN et al., 2007; THRING et al., 2009). Dessa forma, a inibição da hialuronidase por extratos ricos em flavonóides podem ser observadas neste estudo, principalmente, através das amostras 152-f, 162-f e *Libidibia ferrea* casca, assim como, a inibição desta por extratos com altas concentrações de fenóis totais podem ser demonstradas através de 091-f, 234-cc, 152-f, 102-f, 73-cc, *Libidibia ferrea* vagem e *Libidibia ferrea* casca.

Avaliando a ação dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae) sobre a atividade da hialuronidase, Marchesan et al (2006), mostraram que o óleo produzido por *B. dracunculifolia* inibiu a atividade enzimática em 77,86% com 50 μ L e o óleo produzido por *B. uncinella* teve a inibição enzimática menor, pois a atividade enzimática foi inibida em 74,40%.

A segunda enzima testada foi a elastase e o seu resultado também foi apresentado em percentagem de inibição com extratos na concentração de 50 μ g/mL. De acordo com a figura 5, dentre as amostras que apresentaram melhor percentagem de inibição estão os extratos 157-r com 82,7%, 234-cc com 69,4%, 0,91-cc com 58%, 234-g com 64,4%, 73-cc com 71,2%, 162-f (metanólico) com 65,6%, 157-f com 80%, PBP-006 com 66,4%, PBP-008 com 56,2%, *Calycophyllum spruceanum* (hidroetanólico) com 67%, *Justicia acuminatissima* (aquoso) com 71,3%, *Justicia acuminatissima* (hidroetanólico) com 80,2%, *Passiflora nítida* com 64,1% e *Justicia acuminatissima* (etanólico) com 84,4%.

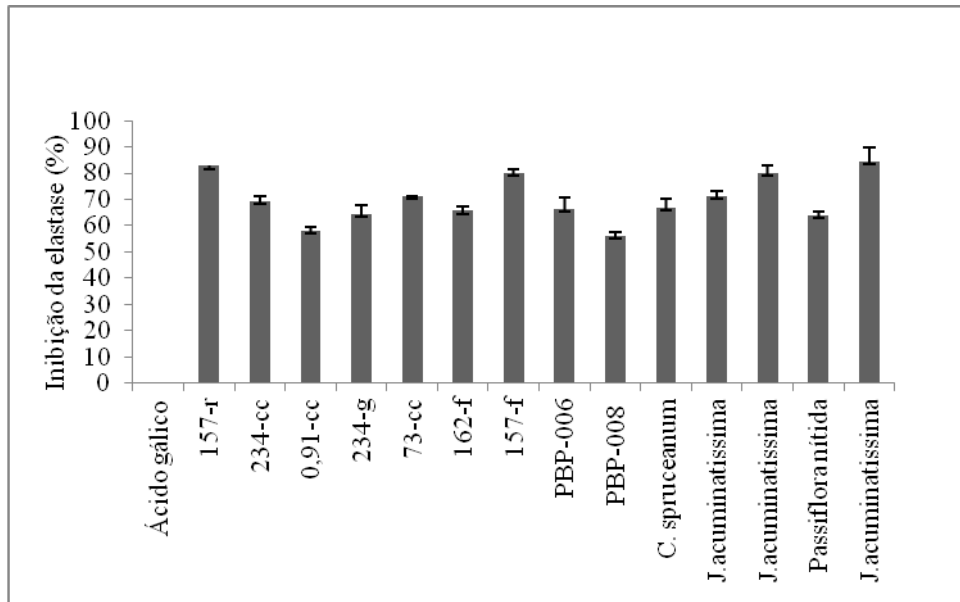


Figura 5 –Inibição da elastase (%) do padrão ácido gálico e de extratos de plantas da Amazônia.

Assim como a hialuronidase, vários estudos têm demonstrado a relação entre a concentração de flavonóides e fenóis totais e a inibição da elastase (JACKSON et al., 2010; OLIVEIRA, 2010; SUMANTRAN et al., 2007; THRING et al., 2009). Dessa forma, a inibição da elastase por extratos com flavonóides podem ser observadas neste estudo, principalmente, através das amostras 162-f (metanólico) e 157-f, assim como, a inibição desta por extratos com altas concentrações de fenóis totais podem ser demonstradas através de 234-cc, 73-cc, 162-f (metanólico), *Justicia acuminatissima* (aquoso) e *Justicia acuminatissima* (hidroetanólico). Em um estudo anterior, 21 extratos foram testados contra elastase, mas apenas quatro apresentaram inibição acima de 50%: *Camellia sinensis* Kuntze (89%), *Galium aparine* L. (57,9%), *Arctium lappa* L. (50,9%) e *Fucus vesiculosus* L. (50,2%) (THRING et al., 2009).

É notável que cinco extratos exibiram atividades inibitórias satisfatórias tanto no ensaio de hialuronidase com no de elastase. Expresso como porcentagem de inibição de ambas as enzimas tem-se os extratos 157-r (H: 75,8%, E: 82,7%), 234-cc (H: 64,3%, E: 69,4%), 73-cc (H: 83,1%, E: 71,2%), 157-f (H: 76,3%, E: 80%) e *Calycophyllum spruceanum* (hidroetanólico) (H: 70,6 %, E: 67%).

O teste de inibição enzimática da tirosinase pelos extratos foi o terceiro realizado e o resultado foi apresentado em porcentagem de inibição com extratos na concentração de 100µg/mL. As amostras, na concentração utilizada, não demonstraram uma atividade inibitória significativa da enzima em estudo, pois apresentaram resultados com valores abaixo de 20% de inibição.

5. CONCLUSÃO

Este estudo revela que a partir de um painel de 65 extratos de plantas, dezesseis apresentam atividade anti-hialuronidase, com níveis de inibição satisfatórios de até 85,1%. Quatorze extratos apresentaram atividade anti-elastase satisfatória que vão até 84,4% de inibição na concentração de 100 µg/mL. Cinco extratos tiveram atividade inibitória contra ambas as enzimas. Dentre eles, verificou-se que o 234-cc e 73-cc tem elevado teor de compostos fenólicos. Além disso, observou-se através dos resultados obtidos nas condições deste estudo que nenhum dos extratos possuem a capacidade de inibir a atividade enzimática da tirosinase de forma satisfatória. 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F.; *J. Agric. Food Chem.* 52, 5195, 2004.

BOROJEVIC, R.; SERRICELLA, P. Próteses vivas de pele humana. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, n. 7, p. 16-18, 1999.

CARVALHO, Elisabete B. de. Estudos da interação entre proteínas e taninos: influência da presença de polissacarídeos. Tese (Doutorado em Química). Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, Porto, 2007.

CHANG, CHIA-CHI; YANG, MING-HUA; WEN, HWEI-MEI; CHERN, JIING-CHUAN. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, Vol. 10, No. 3, 2002, Pages 178-182.

GIARDINA, S; MICHELOTTI, A; ZAVATTINI, G; FINZI, S; GHISALBERTI, C; MARZATICO, F. Studio d'efficacia *in vitro*: valutazione dell'influenza di resveratrolo e resveratrolo + N-acetil-cisteina sulla proliferazione cellulare e sull'inibizione della collagenasi. *Minerva ginecológica*, vol . 62 . n. 3 . pag. 195 - 201, 2010.

GONÇALVES, S. B. Extração, purificação e estudos sobre a formação de filmes monomoleculares da hialuronidase bovina. 2007. 166 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Programa de Pós-Graduação em Engenharia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

HERING, V. J. J. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification, properties, and reactions catalyzed. *Methods Enzymol.* 142:154-65, 1987.

HIRATA, Lilian Lúcio; SATO, Mayumi Eliza Otsuka; SANTOS, Cid Aimbiré de Moraes. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo *Acta Farm. Bonaerense*, vol. 23, n. 3, 2004.

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.

LEITE, Sergio Roberto de Andrade. Inhibitors of human collagenase, MMP1. *Eclética Química*, São Paulo, 34(4): 87-102, 2009.

MACRINI, Daclé Juliani. Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase. 2004. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

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, mai./ago. 2006.

NICOLETTI, Maria A.; ORSINE, Eliane M. de A.; DUARTE, Ana C. N.; BUONO, Gabriela A. Hiper Cromias: Aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. *Cosmetics & Toiletries*, São Paulo, vol. 14, p. 46-51, mai/jun. 2002.

OLIVEIRA, Karina Bora de. Determinação do ácido rosmarínico em *Salvia officinalis* L., Lamiaceae, e avaliação de sua toxicidade e influência na melanogênese. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

PANSERA M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.13, n.1, p.17-22, 2003.

RODRIGUES, V. Análise dos efeitos do colágeno bovino e derivados na proliferação celular e biossíntese de colágeno em fibroblastos humanos. 2009. 74 f. Dissertação (Mestrado em

Biotecnologia). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

SIMÕES, Ana Paula Rodrigues; GUERREIRO, Bruna Martins; SORIANI, Marcela; CIPRO, Mariana Zecchin. Tanino. Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Jaboticabal, 2009.

SEIGLER, D.S.; SEILEIMER, S.; KEESY, J.; HUANG, H.F. Tannins from four common Acacia species of Texas and Northeastern Mexico. *Economic Botany*, v.40, p.220-232, 1986.

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.

SUMANTRAN, V. N.; KULKARNI, A. A.; HARSULKAR, A.; WELE, A.; KOPPIKAR, S. J.; CHANDWASKAR, R.; GAIRE, V.; DALVI, M.; WAGH, U. V. Hyaluronidase and collagenase inhibitory activities of the herbal formulation *Triphala guggulu*; *J. Biosci.* 32 755–761, 2007.

TAKAHASHI, Tomoko; KAWAI, Mayumi Ikegami; OKUDA, Ryozou; SUZUKI, Kaori. A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry* 322 (2003) 257–263, 2003.

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*, 2009, 9:27 doi:10.1186/1472-6882-9-27.

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.