



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *Calycophyllum
spruceanum* (Benth) Hook. F. ex. Schum SOBRE ENZIMAS DE
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

DANIELLE BARAÚNA SILVA

**MANAUS
2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

DANIELLE BARAÚNA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *Calycophyllum
spruceanum* (Benth) Hook. F. ex. Schum SOBRE ENZIMAS DE
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Orientadora: Prof^ª Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

**MANAUS
2012**

Ficha Catalográfica
Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Silva, Danielle Baraúna

S586a Avaliação da atividade do extrato hidroetanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* (Benth) Hook. F. ex. Schum sobre enzimas de aplicação cosmética / Danielle Baraúna Silva. - Manaus: UFAM, 2012.

113 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas, 2012.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

1. Plantas medicinais 2. *Calycophyllum spruceanum* – Extrato seco 3. Envelhecimento cutâneo I. Vasconcellos, Marne Carvalho de (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU 633.88(043.3)

DANIELLE BARAÚNA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DAS CASCAS DE *Calycophyllum
spruceanum* (Benth) Hook. F. ex. Schum SOBRE ENZIMAS DE
APLICAÇÃO COSMÉTICA**

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Aprovado em 31 de agosto de 2012.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a. Marne Carbalho de Vasconcellos, Orientadora
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Ádley Antonini Neves de Lima, Membro
Universidade Federal do Amazonas

Prof^a Dr^a. Cecília Verônica Nunez, Membro
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

RESUMO

A exposição à radiação UV é um dos principais fatores externos responsáveis pela hiperpigmentação e envelhecimento cutâneo, alterações que afetam social e psicologicamente a pessoa acometida. Tal fato tem estimulado a pesquisa por novos agentes, principalmente baseados em produtos naturais. Nesse sentido, a espécie *Calycophyllum spruceanum*, utilizada popularmente na forma de cataplasma como antiinflamatório, agente de rejuvenescimento e como tratamento em infecções da pele causadas por fungos, apresenta-se como interessante objeto de estudo para esse fim. Assim, este trabalho objetivou avaliar o efeito de extratos hidroetanólicos das cascas de *C. spruceanum* sobre enzimas de aplicação cosmética (tirosinase, elastase, collagenase e hialuronidase). Inicialmente, foram obtidos três extratos hidroetanólicos, extrato fluido (EHF), extrato seco em liofilizador (EHL) e extrato seco por aspersão (EHSA), a partir dos quais foram realizados ensaios de atividade antioxidante, inibição enzimática *in vitro* e citotoxicidade. Posteriormente, uma formulação semi-sólida (creme) foi manipulada para incorporação dos extratos para averiguar se as atividades de sequestro de radicais DPPH, inibição de tirosinase, quelante de ferro, hemólise e pH permaneciam estáveis ou se a incorporação dos ativos a formulação poderia modificar as atividades encontradas nos extratos testados isoladamente. As formulações foram testadas em comparação com produto comercialmente utilizado. O EHF foi caracterizado obtendo-se pH: 5,5; densidade: 0,9575 g/cm³ e 2,5 ± 0,03% de resíduo seco. Os extratos secos apresentaram teores de fenóis totais superiores aos do EHF e estatisticamente iguais. Os extratos apresentaram boa atividade antioxidante sobre o radical DPPH, porém inferiores a do padrão Trolox®. Apenas o EHF apresentou atividade quelante de ferro. A atividade antioxidante celular foi realizada com os extratos secos, EHL e EHSA, não demonstrando grande diferença entre o efeito observado *in vitro* e o observado *in situ*, estas atividades, no entanto, corresponderam a metade do potencial do padrão Quercetina. Apenas os extratos secos apresentaram inibição da tirosinase, sendo a atividade do EHL muito superior a do EHSA. A inibição da collagenase pelos extratos secos foram baixas e estatisticamente iguais. Para as enzimas elastase e hialuronidase o EHSA apresentou atividade superior ao EHL sendo ambas de grande interesse para uso como potencial rejuvenescedor. A ação de EHSA na enzima hialuronidase foi superior a do padrão Rutina. Os extratos apresentaram-se seguros para uso. As formulações com extratos secos apresentaram atividades bastante superiores as do fluido e as do produto comercial (PC) no ensaio do DPPH. A atividade quelante de ferro foi observada apenas na formulação base e a inibição enzimática da tirosinase foi maior na formulação contendo extrato liofilizado (FBEL) do que na formulação contendo extrato seco por aspersão (FBESA) e não foi observada nas demais formulações. A FB apresentou potencial hemolítico, no entanto observou-se que a presença de compostos no extrato fluido (FBEF) diminuíram essa citotoxicidade e na FBEL a mesma não foi observada. A FBESA apresentou hemólise levemente superior a apresentada pela FB. O pH das formulações também foi avaliado (FB: 7,45; PC: 7,31; FBEF: 7,17; FBEL: 5,06; FBESA: 5,29). Nota-se, portanto, o grande potencial para uso cosmético da espécie, no entanto, estudos para adequação de método de secagem e formulação são necessários.

Palavras-chave: extrato seco, hiperpigmentação, envelhecimento cutâneo.

ABSTRACT

Exposure to UV radiation is one of the main external factors responsible for hyperpigmentation and skin aging, and social changes that affect a person psychologically affected. This fact has stimulated the search for new agents, mainly based on natural products. Accordingly, the species *Calycophyllum spruceanum*, popularly used in the form of cataplasm as anti-inflammatory, rejuvenating agent and as a treatment for the infections caused by fungi, presented as interesting object of study for this purpose. This study aimed to evaluate the effect of hydroethanolic extracts from the bark of *C. spruceanum* cosmetic application of enzymes (tyrosinase, elastase, collagenase and hyaluronidase). Initially, we obtained three hydroethanolic extracts, fluid extract (EHF), freeze-dried extract (EHL) and spray dried extract (EHSA), from which assays were performed antioxidant activity, in vitro enzyme inhibition and cytotoxicity. Subsequently, a semi-solid formulation (cream) was manipulated to incorporate the extracts to determine whether the activities of DPPH radicals hijacking, tyrosinase inhibition, iron chelation, hemolysis and pH remained stable or whether the incorporation of assets could change the formulation activities found in extracts tested alone. Testasdas formulations were compared with commercially used product. The EHF was characterized yielding pH: 5.5, density: 0.9575 g/cm³ and 2.5 ± 0.03% of dry matter. The dry extratros showed higher total phenolic content of the EHF and statistically equal. The extracts showed good antioxidant activity on DPPH radical, but lower than that of standard Trolox ®. Only the EHF was active iron chelator. The cellular antioxidant activity was performed with the dried extracts, and EHL EHSA, showing no major difference between the observed effect observed in vitro and in situ, these activities, however, accounted for half of the standard potential of Quercetin. Only the dried extracts showed inhibition of tyrosinase activity being much higher than the EHL EHSA. Inhibition of collagenase by the dry extracts were low and statistically similar. For enzymes elastase and hyaluronidase EHSA the EHL showed activity superior to both being of great interest for potential use as a rejuvenator. The action of the enzyme hyaluronidase EHSA was above the standard Rutin. The extracts showed to be safe for use. The formulations with dry extracts showed activity well above the fluid and the commercial product (PC) in the DPPH assay. The iron chelator activity was observed only in the base formulation and the enzymatic inhibition of tyrosinase was higher in lyophilized formulation containing extract (FBEL) than the formulation containing spray dried extract (FBESA) and was not observed in the other formulations. The FB showed hemolytic potential, however it was observed that the presence of the compounds fluid extract (FBEF) and decreased cytotoxicity in this FBEL the same was not observed. The FBESA showed slightly higher hemolysis presented by the FB. The pH of fomulações was also evaluated (FB: 7.45; PC: 7.31; FBEF: 7.17; FBEL: 5.06; FBESA: 5.29). Note, therefore, the potential for cosmetic use of the species, however, studies for adequate drying method and formulation are required.

Keywords: dried extracts, hyperpigmentation, skin aging.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Camadas da Pele.	15
Figura 2 – Estrutura da eumelanina e feomelanina.	17
Figura 3 – Biossíntese de Melanina. TYR – Tirosinase; TRP-1 – Proteína 1 relacionada com a tirosinase; TRP-2 – Proteína 2 relacionada com a tirosinase; GSH – Glutathiona; DHI – 5,6-Diidroxiindol; IQ – Indol-5,6-quinona; DHICA – 5,6- Dihidroxiindol-2-ácido carboxílico; ICAQ – Indol-5,6- quinona ácido carboxílico; HBTA: 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina.....	21
Figura 4 – Paciente com melasma.	23
Figura 5 – Lentigo solar.	24
Figura 6 – Árvore de <i>Calycophyllum spruceanum</i>	36
Figura 7 – Delineamento experimental.	40
Figura 8 – Gráfico de representação da determinação do pH da formulação-base e formulações contendo extratos de <i>C. spruceanum</i>	55
Figura 9 – Gráfico da atividade antioxidante expresso a partir das porcentagens de sequestro dos radicais livres em DPPH. A) <i>C. spruceanum</i> (extrato liofilizado); B) <i>C. spruceanum</i> (extrato seco por aspersão); e C) <i>C. spruceanum</i> (extrato fluido); e D) Padrão de atividade antioxidante Trolox.	56
Figura 10 – Atividade inibitória da tirosinase <i>in vitro</i> . Resultados expressos em média \pm desvio padrão. A) <i>C. spruceanum</i> (extrato liofilizado); B) <i>C. spruceanum</i> (extrato seco por aspersão); e C) Padrão de inibição Ácido Kójico. Para todos as amostras $p < 0,05$. .	58
Figura 11 – Gel mostrando a inibição da atividade da collagenase por zimografia <i>in vitro</i> dos extratos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado e <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão.	60
Figura 12 – Gráfico área <i>versus</i> concentração obtido a partir das áreas das bandas do gel de zimografia. O gráfico apresenta a inibição da atividade da collagenase a partir de extrato de <i>C. spruceanum</i> liofilizado (Cs.L.) e <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão (Cs.S.A.).....	60
Figura 13 – Atividade Antioxidante celular em linhagem de fibroblastos murino NIH 3T3 dos extratos e padrão Quercetina. Os extratos de <i>C. spruceanum</i> encontravam-se na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e o padrão (Quercetina) a 5 $\mu\text{g/mL}$	63
Figura 14 – Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoresceína no fibroblasto murino NIH 3T3. As fluorescências representam média \pm dp (n=3).Os extratos estavam na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e o padrão (Quercetina) a 5 $\mu\text{g/mL}$	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação taxonômica <i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth (Cronquist, 1981)..	37
Tabela 2 – Formulação-base para os cremes de <i>C. spruceanum</i> .	43
Tabela 3 – Teor de resíduo seco, densidade e pH da solução extrativa obtida a partir das cascas de <i>C. spruceanum</i> .	54
Tabela 4 – Teores de fenóis totais dos extratos hidroetanólicos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado, <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão e <i>C. spruceanum</i> extrato fluido.	54
Tabela 5 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH de cremes a 10%, preparados a partir de extratos das cascas de <i>C. spruceanum</i> .	57
Tabela 6 – Atividade Quelante de Ferro de extratos de <i>C. spruceanum</i> (fluido, seco por aspersão e seco por liofilização) e cremes a 10% preparados a partir de extratos das cascas de <i>C. spruceanum</i> .	57
Tabela 7 – Atividade anti-tirosinase de cremes a 10%, preparados a partir de extratos das cascas de <i>C. spruceanum</i> .	59
Tabela 8 – Inibição da atividade da colagenase <i>in vitro</i> por extratos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado e <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão.	61
Tabela 9 – Atividade inibitória da elastase <i>in vitro</i> . Resultados expressam a CI ₅₀ em média ± desvio padrão dos extratos.	61
Tabela 10 – Inibição da atividade da hialuronidase <i>in vitro</i> por extratos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado, <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão e Padrão.	62
Tabela 11 – CI ₅₀ (µg/mL) da viabilidade celular em Melan-A após exposição de 24, 48 e 72 h aos extratos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado e <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão e padrão de morte celular, Doxorubicina.	62
Tabela 12 – CI ₅₀ (µg/mL) da Viabilidade celular em NIH 3T3 após exposição de 24 h aos extratos de <i>C. spruceanum</i> liofilizado e <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão.	63
Tabela 13 – Potencial hemolítico de extratos de <i>C. spruceanum</i> (seco por aspersão e seco por liofilização) a 2 mg/mL e cremes a 10% preparados a partir de extratos das cascas de <i>C. spruceanum</i> .	65

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Pele	14
2.1.1 Melanina	16
2.2 Melanogênese	18
2.3 Hiperpigmentação.....	22
2.3.1 Inibição da Tirosinase.....	25
2.3.2 Antioxidantes com ação clareadora de pele	25
2.4 Envelhecimento cutâneo.....	26
2.4.1 Componentes da matriz extracelular e envelhecimento	27
2.4.2 Estresse oxidativo e envelhecimento cutâneo	31
2.5 Produtos Vegetais	32
2.5.1 Compostos fenólicos	33
2.5.2 Extratos secos vegetais	34
2.5.3 Calycophyllum spruceanum	36
3 OBJETIVOS.....	39
3.1 Geral	39
3.2 Específicos.....	39
4 METODOLOGIA.....	40
4.1 Estratégia Experimental.....	40
4.2 Obtenção dos extratos.....	40
4.3 Caracterização da solução extrativa	41
4.3.1 Densidade relativa	41
4.3.2 pH	42
4.3.3 Determinação de resíduo seco	42
4.3.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	42
4.4 Formulação de cremes a partir dos extratos secos e extrato fluido	43
4.4.1 pH	44
4.5 Atividade Antioxidante.....	44
4.5.1 Teste do 2,2-difenil-1- picrilhidrazila (DPPH).....	44
4.5.2 Avaliação da atividade quelante de ferro	45
4.6 Teste de Inibição da Tirosinase <i>in vitro</i>	45
4.7 Zimografia <i>in vitro</i> – Inibição da colagenase	46
4.8 Teste de inibição da colagenase <i>in vitro</i>	47
4.9 Ensaio da inibição da elastase <i>in vitro</i>	48
4.10 Ensaio de inibição da hialuronidase <i>in vitro</i>	48

4.11 Ensaaios em Células.....	49
4.11.1 Linhagens celulares	49
4.11.2 Manutenção das células	49
4.11.3 Citotoxicidade pela técnica de Alamar blue	50
4.11.4 Atividade Antioxidante Celular.....	51
4.11.5 Atividade hemolítica em sangue de camundongo	52
4.12 Análise Estatística	53
5 RESULTADOS	54
5.1 Caracterização da solução extrativa	54
5.1.1 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	54
5.2 Formulações	55
5.2.1 Determinação do pH.....	55
5.3 Testes de avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	55
5.3.1 Teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	55
5.3.2 Avaliação da capacidade quelante de ferro	57
5.4 Teste de inibição da tirosinase <i>in vitro</i>	58
5.5 Teste de inibição da colagenase <i>in vitro</i> – Teste em microplaca e Zimografia <i>in vitro</i>	59
5.6 Ensaio da inibição da elastase <i>in vitro</i>	61
5.7 Ensaio de inibição da hialuronidase <i>in vitro</i>	61
5.8 Citotoxicidade pela técnica de Alamar blue	62
5.9 Atividade Antioxidante Celular.....	63
5.10 Atividade hemolítica em sangue de camundongo	64
6 DISCUSSÃO.....	66
7 CONCLUSÕES.....	93
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
ANEXOS.....	113
ORÇAMENTO.....	113
CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	114

1 INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo que reveste toda a superfície corporal, compondo 16% do peso total do corpo. Fornece proteção, sendo considerada barreira física entre o corpo e o meio ambiente, evitando perdas de água e eletrólitos, reduzindo a penetração dos produtos tóxicos e protegendo contra microorganismos patogênicos. Assim, está diretamente exposta a efeitos térmicos, mecânicos e químicos, que potencialmente prejudicam sua estrutura (GROEBER *et al*, 2011; KHAVKIN e ELLIS, 2011; VENUS *et al*, 2011).

As patologias relacionadas à pele influenciam social e psicologicamente às pessoas acometidas, intensificando a busca de aceitação pela sociedade, que impõe critérios ideais de beleza e aparência física a serem seguidos. As alterações cutâneas, principalmente os distúrbios de pigmentação são freqüentemente encontrados em adultos e são queixas comuns dos pacientes em consultórios dermatológicos. A preocupação surge pela percepção, por parte do paciente, das áreas ou lesões que ocorrem mudança na tonalidade da cor ou pelo próprio médico, que observa área com pigmentação alterada (BAUMANN, 2004; PANDYA e GUEVARA, 2000; RAWLINGS *et al*, 2008; ROSE, 2009).

A radiação UV pode levar a pigmentação da pele e ao envelhecimento precoce, cujos tratamentos requerem o uso de fotoprotetores, despigmentantes e rejuvenescedores. Nesse sentido, várias substâncias vem sendo utilizadas para prevenir e/ou tratar o envelhecimento cutâneo, bem como para diminuir a pigmentação da pele (RANGEL e KEDOR-HACKMANN, 2000).

No que diz respeito as desordens pigmentares, novos tratamentos têm sido desenvolvidos e executados em clínicas dermatológicas como o uso de agentes despigmentantes, *peelings* químicos, dermoabrasão, *laser* entre outros. No entanto, esses tratamentos podem não obter resultados satisfatórios como também desencadear reações

secundárias, como irritação cutânea e desenvolvimento de hiperpigmentações pós-inflamatórias (BAUMANN, 2004; GAUTHIER, 2004; LOBÃO, 2004; PANDYA e GUEVARA, 2000).

Os atuais métodos para tratamento do envelhecimento encontram-se cada dia mais tecnológicos e invasivos, porém, os produtos naturais incluindo as plantas, são relevantes e podem ser altamente eficazes. A investigação científica também corrobora com o uso tradicional de muitas plantas para obtenção de benefícios para a pele e, para elucidar os mecanismos bioquímicos de ação para um número crescente de compostos fitoquímicos (ANGERHOFER *et al*, 2009).

Nos últimos anos, as alterações cutâneas associadas aos distúrbios pigmentares, envelhecimento e fotoenvelhecimento tem defrontado os dermatologistas no tratamento da pele com procedimentos cirúrgicos e não cirúrgicos. Este último tem estimulado diversos pesquisadores para realização de estudos envolvendo a descoberta de novos ativos que atendam a este nicho de mercado (KHAVKIN e ELLIS, 2011; POWELL, 2006; ROULIN e DUCREST, 2011).

Paralelo a isso, a demanda por produtos de beleza e o aquecimento do mercado de cosméticos propicia também inúmeras oportunidades de pesquisa de novos ativos. Grandes empresas tem investido nos produtos naturais para uso preventivo ou terapêutico nos cuidados da pele. As plantas são fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para síntese de grande número de substâncias com propriedade terapêutica conhecida pela população e, algumas comprovadas por estudos (BARA *et al*, 2006; COSTA *et al*, 2010; GUERRA e NODARI, 1999; KIM e UYAMA, 2005).

Formulações cosméticas produzidas a partir de ativos botânicos são utilizadas desde a antiguidade e extratos vegetais continuam desempenhando importante papel nos cosméticos

contemporâneos (ANGERHOFER *et al*, 2009). Nesse contexto, a biodiversidade da Amazônia e a extensa predominância de espécies vegetais ainda pouco estudadas, com diferentes constituintes químicos, abundantes em flavonóides, cumarinas, taninos e outros compostos, torna-se cada vez mais importante para o desenvolvimento de produtos medicinais e cosméticos potencialmente ativos (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005; SOUZA *et al*, 2008).

Estudos clínicos adicionais são necessários para otimizar a aplicação de produtos naturais em formulações cosméticas, mas a fundamentação científica para a segurança e eficácia de uma série de extratos e compostos botânicos para a prevenção e o tratamento do envelhecimento da pele (ANGERHOFER *et al*, 2009) e dos distúrbios pigmentares (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005; SOUZA *et al*, 2008) são evidentes.

Dessa forma, baseando-se em resultados obtidos de trabalhos anteriores, desenvolvidos pelo grupo de pesquisa em produtos naturais e análises clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com a espécie vegetal *Calycophyllum spruceanum* e da comprovação de sua atividade antioxidante conforme Lino *et al* (2009), este trabalho visa avaliar a atividade de extratos das cascas de *C. spruceanum* sobre enzimas de interesse cosmético (tirosinase, colagenase, elastase e hialuronidase) assim como sua atividade antioxidante e o efeito desses extratos sobre algumas dessas atividades após a incorporação em emulsões, comparando-as com o produto disponível no mercado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Pele

A pele desempenha um papel extremamente importante, fornecendo uma barreira física eficiente contra agressões exógenas, de natureza química ou biológica que podem afetar o estado fisiológico do corpo. Além dessa função, a pele age como órgão sensorial, participa do sistema imunológico, regula a temperatura corpórea e oferece um sistema de defesa contra a Radiação Ultravioleta (UV). A pele que representa cerca de 16% do peso corporal, é considerada o maior órgão do corpo humano, sendo formada por tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica distribuídos em três camadas distintas: a epiderme, a derme e a hipoderme (Figura 1) (COSTIN e HEARING, 2007; SOUZA e VARGAS, 2004).

A epiderme é a camada mais superficial da pele, é um epitélio de revestimento estratificado e pavimentoso que possui várias camadas de células que se achatam à medida que se tornam mais superficiais. Essas células são diferenciadas em queratinocíticas, composta de queratinócitos e não queratinocíticas formada por melanócitos, células de Langerhans e células de Merkel (BAUMANN, 2004; SOUZA e VARGAS, 2004).

As camadas da epiderme estão dispostas conforme a maturidade da população queratinocítica. Na camada basal as células basais são responsáveis pela manutenção da epiderme, por meio da renovação contínua da população celular. A camada espinhosa é composta de cinco a dez camadas de células maiores que as células basais devido ao citoplasma amplo e eosinofílico, identificadas como desmossomos, responsáveis pela grande coesão celular dos epitélios, resistentes a fortes trações e pressões. A camada granulosa tem de uma a três fileiras de células grandes, losangulares repletas de grânulos querato-hialinas. Por fim na camada mais superficial da epiderme, a córnea, residem os queratinócitos mais

maduros e que completam o processo de queratinização (BAUMANN, 2004; SOUZA e VARGAS, 2004).

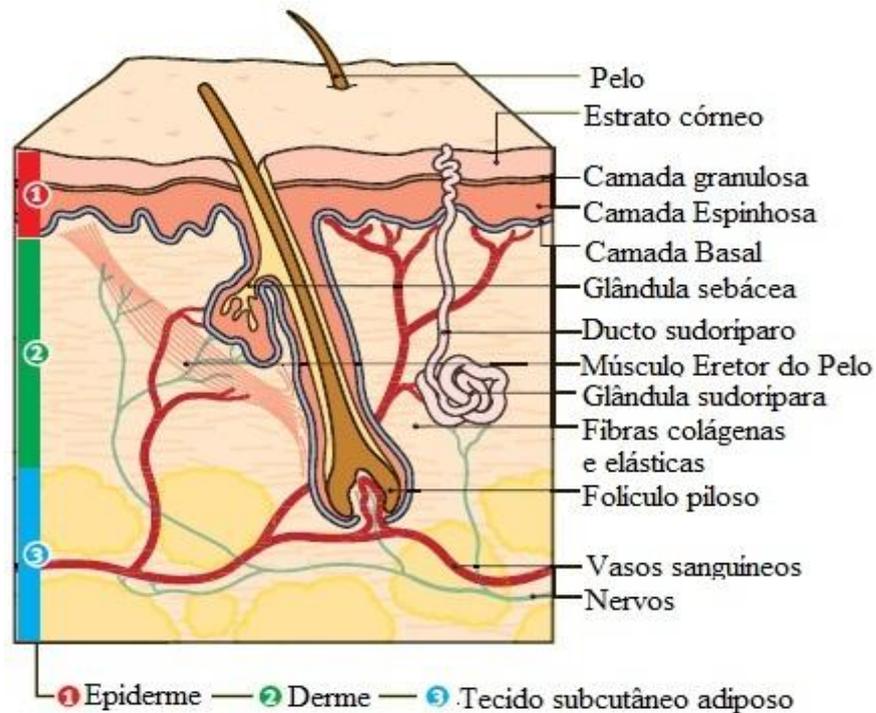


Figura 1 – Camadas da Pele.
 FONTE: Adaptado de QUINN, 2004.

A derme é de origem mesodérmica, localiza-se abaixo da epiderme e é responsável por boa parte da força mecânica e das sensações da pele. É formada por fibras colágenas, fibras elásticas e substância amorfa, todas produzidas pelos fibroblastos. Na derme encontram-se vasos, nervos e músculos eretores do pêlo, além dos anexos cutâneos (QUINN, 2004; SOUZA e VARGAS, 2004). As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Sob a pele, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como isolante térmico, reserva energética e na proteção contra choques mecânicos (SOUZA e VARGAS, 2004).

Será abordado neste trabalho, a célula não queratinocítica mais importante, os melanócitos, que são células dendríticas, desprovidas de desmossomas, derivadas da crista neural. Estão localizados abaixo da camada basal, na proporção de um melanócito para dez queratinócitos basais. São responsáveis pela produção de melanina, que é transferida para os queratinócitos através dos processos dendríticos. Cada melanócito transfere melanina para 36 queratinócitos vizinhos (ITO e WAKAMATSU, 2008; QUINN, 2004; SOUZA e VARGAS, 2004; YAMAGUCHI *et al*, 2007).

2.1.1 Melanina

A variação da cor da pele é uma das características mais perceptíveis nos seres humanos. Essa variação da pigmentação da pele é determinada maior parte pela melanina e principalmente pela sua qualidade, quantidade e distribuição na pele. As melaninas são biopolímeros, cuja estrutura química não foi satisfatoriamente determinada e cuja papéis fisiológicos não são compreendidos inteiramente. São classificadas em dois tipos principais: eumelanina e feomelanina, e estão representadas estruturalmente na Figura 2 (AGAR e YOUNG, 2005; ITO e WAKAMATSU, 2008; RÓZANOWSKA *et al*, 1999).

A eumelanina é um biopolímero heterogêneo composto por diferentes estados oxidativos das unidades 5,6-di-hidroxi-indol (DHI) e 5,6-di-hidroxi-indol-2-ácido carboxílico (DHICA), e também de unidades pirrólicas derivadas da dissociação peroxidativa dos mesmos, representada pela coloração variável de marrom a preto. A feomelanina é representada estruturalmente pelo agrupamento de benzotiazinas, benzotiazóis e isoquinolinas. A proporção dos dois tipos de melanina estabelece as várias tonalidades de pele dos diferentes grupos sociais (MACRINI *et al*, 2009; SIMON *et al*, 2009).

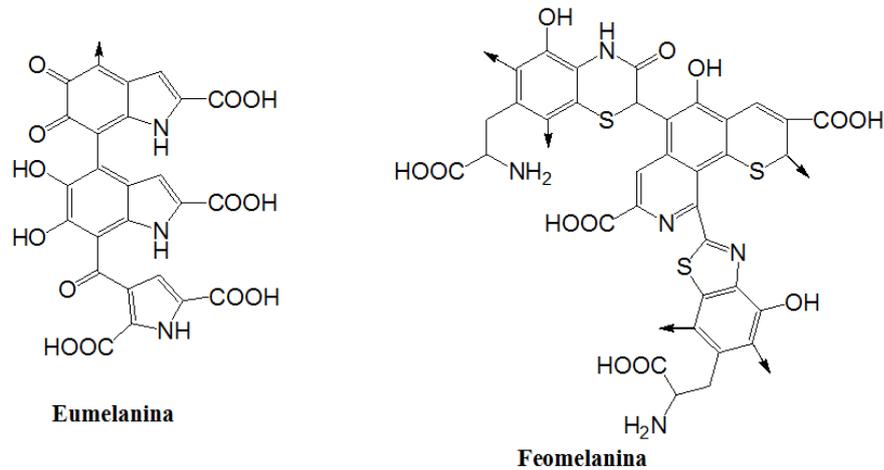


Figura 2 – Estrutura da eumelanina e feomelanina.
 FONTE: ITO e WAKAMATSU, 2008.

A propriedade biológica mais conhecida da melanina é a proteção ao DNA contra a absorção de raios UV, proporcionando uma barreira natural acima do núcleo das células da camada basal. A radiação UV é um dos fatores externos que direta ou indiretamente afetam a pigmentação da pele resultando em alteração estrutural e funcional nas células. O sol é a maior fonte de radiação UV que interage com o ser humano (AGAR e YOUNG, 2005; COSTIN e HEARING, 2007; PARK *et al*, 2009; YAMAGUCHI e HEARING, 2009).

A radiação UV faz parte do chamado espectro eletromagnético e compreende a faixa de comprimento de onda entre 100 e 400 nm. É dividida em UVA (320 a 400 nm), UVB (280 a 320 nm) e UVC (100 a 280 nm). Esta última normalmente é absorvida pela camada de ozônio não atingindo a superfície terrestre. A radiação solar UV que atinge a terra bem como a pele, é composta de 5-10 % de radiação altamente energética UVB e 90-95 % de radiação menos energética UVA. No entanto, a radiação UVA, devido ao seu comprimento de onda penetra mais profundamente a pele (HERRLING *et al*, 2008; PARK *et al*, 2009).

As radiações UVA e UVB penetram a pele e desencadeiam patologias como erupções cutâneas, queimaduras, imunossupressão, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. A radiação UVA ao penetrar nas células é absorvida pelo oxigênio molecular e por substâncias cromóforas fotossensíveis que produzem radicais livres oxidativos sendo responsáveis pelo

envelhecimento cutâneo precoce (fotoenvelhecimento ou envelhecimento actínico), por doenças de fotossensibilidade e também contribuem para o desenvolvimento do câncer. A radiação UVB causa dano direto ao DNA, ou seja, ao ser absorvida causa ruptura do DNA em dímeros de ciclobutano-pirimidina e fotoprodutos de pirimidina pirimidona (HERRLING *et al*, 2008; ARAÚJO e SOUZA, 2008).

A melanina pode tanto proteger a célula da produção de espécies reativas de oxigênio quanto ser um elemento pró-oxidante. Com base em estudos, os dois tipos de melanina desempenham propriedade antioxidante protegendo o DNA contra danos induzidos pela radiação UV. Porém, tanto a melanina quanto seus intermediários, principalmente a feomelanina dependendo do seu peso molecular e estado de polimerização pode aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio induzida pela radiação UV e, conseqüentemente o dano ao DNA (COSTING e HEARING, 2007; ITO e WAKAMATSU, 2008).

A propriedade antioxidante da melanina relaciona-se com tipo e proporção entre eumelanina e feomelanina, condicionando ao pigmento mais escuro a maior capacidade antioxidante. Sendo assim, a pele negra demonstra maior nível de proteção contra a radiação UV que a pele clara. Os estudos sugerem que o aumento dos casos de melanoma em peles claras não se deve apenas a proteção da pele pela feomelanina, mas sim às propriedades mutagênicas dela e seus intermediários como resultado da capacidade pró-antioxidante (AGAR e YOUNG, 2005; HERRLING *et al*, 2008; RÓZANOWSKA *et al*, 1999).

2.2 Melanogênese

A melanogênese é a biossíntese da melanina e ocorre em organelas chamadas melanossomos contidas em células especializadas, os melanócitos. Os melanossomos são geralmente divididos em quatro estágios de maturação (I-IV) determinados pela estrutura e

quantidade, qualidade e organização da melanina produzida. Originam-se da região perinuclear do complexo de Golgi, onde recebem todas as proteínas enzimáticas e estruturais fundamentais para a melanogênese. Os melanossomos podem ser de dois tipos: eumelanossomos e feomelanossomos (MIOT *et al*, 2009; PASSERON *et al*, 2005; SIMON *et al*, 2009).

O estágio I é comum em eu- e feomelanogênese, onde os melanossomos são vacúolos esféricos com presença de grande quantidade de tirosinase (principal enzima envolvida na melanogênese) e proteína melanossomal (Pmel 17). Esta proteína confere maturação ao melanossomo para o estágio II, onde o melanossomo torna-se mais alongado, fibroso e com pouca quantidade de melanina. No estágio III, a síntese de melanina começa e o pigmento é uniformemente depositado sobre as fibrilas internas. Na última fase de desenvolvimento (IV) são detectadas regiões altamente pigmentadas nos melanócitos, onde estes melanossomos apresentam-se elípticas ou elipsóides, opacas e eletrodensas devido à completa deposição de melanina e tirosinase pouco ativa, estando totalmente maduros. Os feomelanossomos são sempre esféricos e granulares nos quatro estágios de maturação. Ainda no quarto estágio, os melanossomos são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos (COSTIN e HEARING, 2007; YAMAGUCHI e HEARING, 2009).

Dentro dos melanossomos, três enzimas são absolutamente necessárias para sintetizar os diferentes tipos de melanina: a tirosinase, as proteínas relacionadas a tirosinase denominadas TRPs e DOPAcroma tautomerase. A TRP 1, uma das proteínas relacionadas a tirosinase é a glicoproteína mais presente no melanócito, ocorre somente nos eumelanossomos e é responsável pelo controle da síntese de melanina. A DOPAcroma tautomerase age em etapas subsequentes às etapas de ação da tirosinase e é responsável pela diferenciação da melanina. Porém, a mais importante é a tirosinase, que está envolvida nas reações de catalisação da síntese de melanina (COSTIN e HEARING, 2007; PASSERON *et al*, 2005).

A tirosinase é uma enzima limitante para a melanogênese, o aumento ou diminuição de sua expressão como de sua atividade podem levar a alteração da síntese de melanina. Contém no seu sítio ativo dois átomos de cobre ligados a resíduos de histadina. A tirosinase catalisa a oxidação de monofenóis e *o*-difenois (atividade difenolase) aos seus respectivos derivados *o*-quinonas. Na melanogênese, a tirosinase inicia a cascata de reações que converte tirosina ao biopolímero melanina (CHANG, 2009; SCHALLREUTER *et al*, 2007).

Na monofenolase, a tirosina catalisa a *o*-hidroxilação da tirosina, um monofenol, a β -3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e a oxidação da DOPA, um *o*-difenol, a DOPAquinona, uma *o*-quinona. A partir da DOPAquinona, reações enzimáticas e não-enzimáticas ocorrem para produzir compostos dihidroxiindólicos (DHI) para formação da eumelanina e na presença de compostos sulfídricos há formação de feomelanina (CHANG, 2009; SILVEIRA, 2007).

Na figura 3, a DOPAquinona na ausência de sulfidrilas, têm incorporada um grupamento amino produzindo a ciclodopa ou leucodopacroma. Por uma reação de oxidação e redução entre a DOPAquinona e a ciclodopa é formada DOPA novamente. A leucodopacroma sofre também uma oxidação formando a dopacroma, que pela ocorrência de descarboxilação gera o di-hidroxi-indol (DHI) e em menor proporção gera ácido carboxílico di-hidroxi-indólico (DHICA). Esses dois compostos indólicos são oxidados formando a eumelanina. Por outro lado, a DOPAquinona na presença do grupo sulfurado cisteína forma um intermediário feomelanina, as cisteinildopas, que após reação de oxidação formam benzotiazinas, outro intermediário da feomelanina. As misturas desses intermediários originam as feomelaninas (CHANG, 2009; PARK *et al*, 2009; SARANGARAJAN e APTE, 2006; SCHAULLREUTER *et al*, 2007).

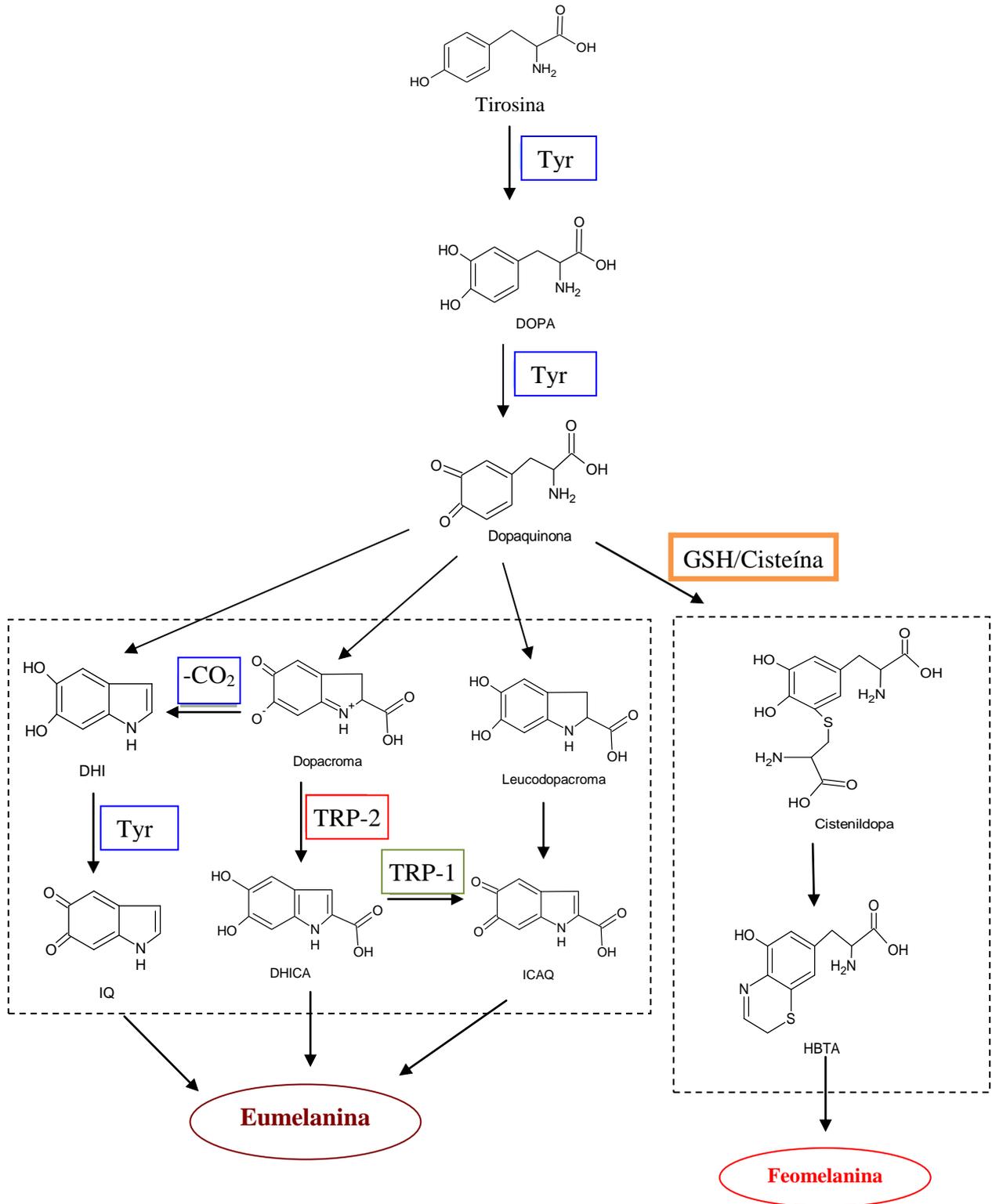


Figura 3 – Biossíntese de Melanina. TYR – Tirosinase; TRP-1 – Proteína 1 relacionada com a tirosinase; TRP-2 – Proteína 2 relacionada com a tirosinase; GSH – Glutationa; DHI – 5,6-Diidroxiindol; IQ – Indol-5,6-quinona; DHICA – 5,6- Dihidroxiindol-2-ácido carboxílico; ICAQ – Indol-5,6- quinona ácido carboxílico; HBTA: 5-hidroxi-1,4- benzotiazinilalanina.

FONTE: Adaptado de PANICH, 2011.

2.3 Hiperpigmentação

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. Estudos foram conduzidos sobre diversas manifestações crônicas que afetam o aspecto pessoal e a satisfação estética. Muitos deles provam que as radiações de luz solar são as principais responsáveis pela maioria destas anomalias, seguidas pelos hormônios e/ou fatores externos (NICOLETTI *et al*, 2002).

O melasma é a hiperpigmentação adquirida mais comum caracterizada por manchas irregulares marrom-claro ao cinza geralmente na face, nos lábios superiores, testa e bochechas em tonalidades variadas. A radiação UV é um importante fator para desencadear ou agravar o desenvolvimento do melasma. São mais freqüentes em mulheres, e normalmente aparecem durante a gravidez caracterizando o melasma gravídico. Essas manchas são consideradas benignas, porém são esteticamente desagradáveis e difíceis de tratar (GAUTHIER, 2004; KANG e ORTONNI, 2009).

O tratamento clínico para o melasma visa retardar a proliferação de melanócitos, inibição da formação de melanosomos e promoção da degradação destes. Os dermatologistas prescrevem o uso de agentes despigmentantes como hidroquinona, ácido kójico e também agentes queratinolíticos como a tretinoína, ácido glicólico. No entanto, é necessário e imprescindível o uso de protetor solar para proteção a radiação UV (GARCÍA; 2010).



Figura 4 – Paciente com melasma.
FONTE: GRIMES, 2009.

Ainda há outras manchas solares que podem aparecer em qualquer tipo de pele chamada de lentigos solares, predominam em partes do corpo expostas a radiação UV como face, colo e braços. Normalmente, aparecem em pessoas com idade acima de 50 anos sendo denominada também como manchas senis. As lesões podem ser grandes e apresentar variações na coloração, além disso, podem representar lesões malignas como melanoma. Há também os lentigos simples que são máculas escuras que surgem na infância e não estão relacionadas à exposição solar e também não tem caráter maligno (NICOLETTI *et al*, 2002; ORTONNE e PASSERON, 2005; SCHMIDT, 2008).



Figura 5 – Lentigo solar.
FONTE: SPENCERI, 2003.

Em peles expostas ao sol pode haver desenvolvimento de sardas ou efélides. São lesões que escurecem quando expostas ao sol e que clareiam quando não expostas. Os efélides surgem durante a infância ou adolescência sendo mais comum em pessoas de pele clara. Apresentam aumento da produção de melanina sem alteração no número de melanócitos. Tanto para lentigos como efélides o tratamento consiste em proteção solar como prevenção na formação de manchas e para lesões existentes é realizado o uso de agentes despigmentantes e protetor solar, podem ser tratadas também através de *laser* (BEYLOT, 2009; SCHMIDT, 2008; SPENCERI, 2003).

A hiperpigmentação pós-inflamatória ocorre pela produção aumentada de melanina devido a uma agressão a pele. As manchas tendem a desaparecer naturalmente desde que o processo inflamatório inicial seja tratado. O uso de agentes químicos não é recomendado devido a possibilidade de causar irritação, sendo indicado uso de corticóides e antiinflamatórios (GRIMES, 2009; PANDYA e GUEVARA, 2000).

2.3.1 Inibição da Tirosinase

O fundamento principal de terapias para prevenção e tratamento de hiperpigmentações é a inibição da enzima tirosinase. Agentes despigmentantes que agem desta forma como o ácido kójico, são utilizados em clínicas dermatológicas e de estética. Recentemente, as pesquisas buscam clareadores com esta atividade. O inibidor da tirosinase mais estudado é o ácido kójico que atua como inibidor competitivo nas atividades monofenolase e difenolase da tirosinase e age inibindo a enzima pela quelação do cobre do sítio ativo da mesma (CHANG, 2009; SILVEIRA, 2007).

2.3.2 Antioxidantes com ação clareadora de pele

Antioxidantes são substâncias que eliminam os radicais livres e previnem a pele quanto aos seus danos. Visto que, os radicais livres e espécies reativas de oxigênio como óxido nítrico, peróxido e superóxido, estimulam a síntese de melanina por várias reações, as substâncias antioxidantes podem inibir esse processo (CHANG, 2009; SCHALLREUTER *et al*, 2007).

Os antioxidantes também podem ter ação limitante da melanogênese. Trabalhos sobre inibição da tirosinase relacionam essa ação a uma atividade antioxidante. Porém, pode não ser por inibição da enzima tirosinase e sim pela redução do produto da reação catalisada pela enzima ao seu precursor, dificultando a formação da melanina. Demonstrando assim, a importância dessas substâncias na prevenção da formação de melanina, ou seja, no uso da terapia antimelanogênica (CHANG, 2009).

2.4 Envelhecimento cutâneo

O envelhecimento é um fenômeno natural e inevitável que pode ser estudado *in vivo* e *in vitro* (CHONDROGIANNIA *et al*, 2010). O envelhecimento da pele resulta de envelhecimento biológico intrínseco, juntamente com exposições extrínsecas, tais como luz ultravioleta e tabagismo (ALLERHAND *et al*, 2011).

O envelhecimento intrínseco (EI) é causado pela passagem do tempo e determinado por vários fatores incluindo o fundo genético e a diminuição progressiva do telômero. O envelhecimento extrínseco (EE) é um processo semelhante, que se sobrepõe sobre o envelhecimento intrínseco, causado principalmente pela radiação ultravioleta. Os sinais clínicos de envelhecimento da pele são a diminuição de tecido com linhas de expressão exageradas, rugas, manchas senis, queratoses actínicas e muitos outros (LONGO *et al*, 2011; KHAVKIN e ELLIS, 2011).

O envelhecimento cutâneo (EC) é definido como o acúmulo de danos à pele ao longo do tempo. A pele é o órgão externo onde os sinais e sintomas de envelhecimento são prontamente evidentes (RAUT *et al*, 2012) representando um órgão ideal para estudar o processo de envelhecimento. Embora os mecanismos subjacentes de EC e das doenças sejam complexos, a pele permite uma visão sobre a biologia do envelhecimento em outros tecidos menos acessíveis. Além disso, o enfraquecimento e a fragilidade da pele são um grande problema para os idosos, predispondo-os a condições, como descamação da pele e úlceras cutâneas que são um fardo enorme em centros de acolhimento e hospitais (HIEBERT *et al*, 2011).

Em relação à patogênese da pele envelhecida, várias teorias têm sido propostas, incluindo a teoria da senescência celular, diminuição da capacidade celular de reparo do DNA e perda de telômeros, mutações pontuais de mtDNA extranuclear, estresse oxidativo, aumento

da frequência de anomalias cromossômicas, mutações de um único gene e hormônios (MAKRANTONAKI *et al*, 2010).

A radiação UV é a contribuição ambiental mais significativa para o EC e, apesar de avanços obtidos na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos, muitos aspectos desse processo ainda precisam ser descobertos (HIEBERT *et al*, 2011). No entanto, o EC pode ser retardado por cosméticos, bem como por abordagens farmacêuticas (RAUT *et al*, 2012).

2.4.1 Componentes da matriz extracelular e envelhecimento

Embora os processos de envelhecimento, intrínsecos e extrínsecos, estejam associados com alterações fenotípicas em células cutâneas, importantes mudanças estruturais e funcionais ocorrem na matriz extracelular (MEC), onde colágenos fibrilares, fibras elásticas e proteoglicanos são necessários para conferir a resistência, a resiliência (recuo) e a hidratação, respectivamente (NAYLOR *et al*, 2011).

A perda de tecido cutâneo é certamente o processo mais visível no envelhecimento. Essa perda de tecido, que é facilmente notada na pele, pode ser atribuída a vários fatores tais como a perda de células e perda de matriz extracelular (MEC). A perda de células refere-se a ambas as camadas da epiderme e da derme. A perda de MEC é evidente quando secções histológicas da pele de indivíduos jovens e idosos são comparadas, e resulta da perda celular, da redução da capacidade biossintética das células restantes e de um aumento progressivo de enzimas degradantes da matriz (ROBERT *et al*, 2012).

As rugas finas e a elasticidade reduzida (tanto o comprimento quanto a capacidade de recuo) que caracterizam a pele intrinsecamente envelhecida são exageradas na pele

fotoenvelhecida, onde a exposição à radiação UV está associada com o desenvolvimento de rugas profundas e acentuada perda de elasticidade (NAYLOR *et al*, 2011).

Fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos são os principais componentes afetados na pele fotoenvelhecida. O colágeno é o componente extracelular mais abundante e fornece as propriedades de suporte a tensão para a derme, compreendendo 80% do peso seco da pele. A rede de fibras elásticas responsáveis por 2-4% da matriz extracelular proporciona elasticidade à pele, enquanto que as macromoléculas glicosaminoglicanos/proteoglicanos desempenham um papel na hidratação da pele e na sinalização biológica, compreendendo apenas 0,1-0,3% do peso seco da pele (JENKINS, 2002).

Alterações no colágeno são consideradas uma das causas de formação de rugas na pele e têm sido observadas na pele envelhecida intrinsecamente e na fotoenvelhecida (LEE *et al*, 2012). O colágeno é o principal constituinte da derme e é formado de fibras de colágeno sintetizadas por fibroblastos. Mais de 90% das fibras dérmicas são formadas por colágeno intersticial, principalmente os tipos I e III, proporcionando resistência à tensão e resistência mecânica para a pele. Com o envelhecimento, o número e o diâmetro dos feixes de fibra de colágeno e a taxa de colágeno do tipo I e do tipo III diminuem (KHAVKIN e ELLIS, 2011). Além disso, o colágeno é crucial durante a remodelação do tecido conjuntivo, por exemplo, na cicatrização de feridas e fibrose (KIM *et al*, 2006).

A radiação UVB é conhecida por induzir a expressão de metaloproteinases de matriz-1, -3 e -9 (MMP-1, -3 e -9) na epiderme humana normal *in vivo* (CHEN *et al*, 2011). As metaloproteinases de matriz (MMPs) são uma grande família de endoproteases zinco-dependentes com uma ampla gama de especificidades de substrato, e são capazes de degradar todas as proteínas da matriz extracelular (MEC). A exposição única ou repetida à radiação UV reduz os níveis de pró-colágeno tipo I e aumenta os níveis de MMP-1, colagenase intersticial,

que inicia a degradação dos colágenos tipo I e III (KIM *et al*, 2006). Acredita-se que é a MMP-1 é a principal contribuinte para o fotoenvelhecimento (CHEN *et al*, 2011).

Embora o mecanismo de sinalização permaneça pouco claro, a radiação UV de alguma forma desencadeia a ligação ao DNA de ativador de proteína-1 (AP-1), que induz as MMPs, tais como a colagenase (MMP-1), estromelisina (MMP-3), gelatinase (MMP-9), e metaloelastase (MMP-12) (LEE *et al*, 2012).

As fibras elásticas são responsáveis pelo regresso da pele para a sua configuração normal após deformação e estendem-se desde a lâmina densa da junção dermo-epidérmica na derme reticular. As fibras elásticas são finas na derme papilar, mas tornam-se mais espessa e mais orientadas horizontalmente na derme reticular (KHAVKIN e ELLIS, 2011). A elastina é a proteína elástica mais importante da MEC de vertebrados, devido às suas propriedades físicas únicas e durabilidade extrema (HEINZ *et al*, 2012). A elastina é a proteína da matriz extracelular responsável pela elasticidade dos tecidos. Ela é abundante em tecidos tais como pele, pulmão ou grandes artérias (CANTARELLI *et al*, 2009; HEINZ *et al*, 2012). Seja devido ao desgaste ou à ação de elastases, a fragmentação de elastina é uma característica do envelhecimento e do aumento da concentração sanguínea de peptídeos elastina (PE) com a idade (CANTARELLI *et al*, 2009).

A elastase tem uma grande especificidade para a quebra de proteínas do tecido conjuntivo, principalmente elastina, utilizando-as como substratos tais como, fibronectina, colágeno, e os tecidos de cartilagem. Biologicamente, o aumento da atividade da elastase com a idade, com a fragmentação do colágeno e elastina, conduzem a uma redução na elasticidade da pele e o aparecimento de rugas (XU, G-H *et al*, 2010).

Oh *et al* (2011) relata que as alterações intrínsecas ao envelhecimento e fotoenvelhecimento são dependentes de mudanças de conteúdo de glicosaminoglicanos (GAGs) na derme e epiderme. Glicosaminoglicanos (GAGs) são longas cadeias de

polissacarídeos lineares consistindo de 10 a vários milhares de repetições de unidades de dissacarídeos específicas. Seis tipos de GAG, incluindo sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatano (DS), sulfato de queratano (KS), sulfato de heparano (HS), heparina (HP), e ácido hialurônico (HA), estão envolvidos em várias funções estruturais e de preenchimento de espaços vazios na pele além da regulação de muitos processos fisiológicos. Devido à sua propriedade comum da alta carga negativa, resultante da presença de grupos carboxílicos e sulfato, GAGs podem ter capacidades de retenção de água significativas e contribuem para a manutenção da hidratação da pele (OH *et al*, 2011).

O ácido hialurônico (AH) é o polissacarídeo mais ubíquo (glicosaminoglicanas) em tecidos conjuntivos de vertebrados. Sua produção local por células diferenciadas mesenquimais foi demonstrada por vários autores desde a primeira descrição de sua estrutura química por Karl Meyer. Várias das suas propriedades principais estão relacionadas com o seu peso molecular elevado e à sua capacidade para reter uma quantidade elevada de água nos seus interstícios (ROBERT; ROBERT; RENARD, 2010).

A diminuição de AH com o envelhecimento tem sido identificada como um dos principais fatores responsáveis pela aparência física da pele envelhecida, incluindo a formação de rugas e da perda da elasticidade da pele (HSU e CHIANG, 2009; ANILKUMAR *et al*, 2011). A radiação UV diminui a quantidade de AH na derme humana devido a indução de expressão dérmica de hialuronidase (Hyal) (OH *et al*, 2011).

A enzima hialuronidase degrada AH, e considera-se que a atividade elevada de hialuronidase nos tecidos está implicada em processos de regeneração e de restauração em tecidos, no aumento da vascularização e na taxa de crescimento celular descontrolado de tumores (CHAJARA *et al*, 1998).

2.4.2 Estresse oxidativo e envelhecimento cutâneo

É cada vez mais evidente que o envelhecimento biológico e o fotoenvelhecimento da pele compartilham mecanismos etiológicos fundamentais. O estresse oxidativo se apresenta como um dos prováveis mecanismos responsáveis pelo envelhecimento cutâneo (EC). Em estudos *in vitro* foi demonstrado que o estresse oxidativo é a maior causa de fragmentação do colágeno por indução de metaloproteinase-1 (ALLERHAND *et al*, 2011).

A capacidade antioxidante dos tecidos diminui durante o envelhecimento. Vale ressaltar que a pele é um órgão diretamente exposto à espécies reativas de oxigênio (ROS) a partir do ambiente, bem como de fontes endógenas, e, portanto, é um candidato principal e destino para tensões oxidativas. A pele é cronicamente exposta a ROS, e sabe-se que a produção de ROS pode provocar distúrbios graves na pele. ROS, tais como os radicais ânions superóxido formados durante a respiração mitocondrial e fagocitose, têm demonstrado causar danos oxidativos a moléculas biológicas, tais como lípidos, proteínas e DNA (XU, H. *et al*, 2010).

A radiação UV tem efeitos deletérios sobre a pele humana, incluindo queimaduras solares, supressão imunológica, câncer e fotoenvelhecimento. A radiação UVB, em particular, é o agente cancerígeno ambiental conhecido mais perigoso em relação à saúde humana através da geração de ROS. As ROS geradas resultam na subsequente ativação de complexas vias de sinalização, seguidas por indução de metaloproteinases de matriz (MMPs) em células da pele e de inibição da degradação ou síntese de matriz extracelular colagenosa nos tecidos conjuntivos (ADILA *et al*, 2010).

Peres e colaboradores (2011) relatam que o dano oxidativo tem sido proposto como uma ligação comum entre todas as teorias do envelhecimento. O fenômeno oxidativo relacionado com a idade continua a fornecer evidências de que há um declínio na atividade

das enzimas antioxidantes e das defesas antioxidantes, levando a um acúmulo de produtos finais que geram dano oxidativo. Estes produtos são todos marcadores de estresse oxidativo, e a influência do ambiente, radiação UV mais notadamente solar, é de considerável importância para o envelhecimento da pele.

O processo biológico de envelhecimento pode ser influenciado positivamente por alguns fatores ambientais, tais como antioxidantes naturais. A vitamina E, cinetina, carnosina e o alho são alguns exemplos de compostos naturais que têm demonstrado exercer um efeito pró-longevidade em culturas primárias humanas (CHONDROGIANNIA *et al*, 2010).

A radiação UV tem um forte componente oxidativo e o estresse foto-oxidativo tem sido intensamente relacionado a uma pele fotodanificada. Nesse sentido, a ingestão regular ou tratamentos de pele com produtos contendo agentes antioxidantes podem ser estratégias úteis para a prevenção de danos induzidos por UV (HEO *et al*, 2009).

2.5 Produtos Vegetais

O uso de compostos sintéticos normalmente causa irritação na pele. Pesquisadores têm buscado uso de compostos naturais no desenvolvimento de novos produtos, e várias substâncias já foram identificadas como potentes inibidores da tirosinase e da melanogênese. Além disso, estudos comprovam atividade antioxidante desses produtos naturais (MOMTAZ *et al*, 2008).

Embora o envelhecimento seja um desgaste natural, ele pode, pelo menos, ser adiado ou evitado por certas abordagens. Apesar de o tratamento somático do envelhecimento seja ainda um objetivo muito rebuscado, as investigações recentes têm demonstrado que há um número de produtos químicos derivados da natureza, para além de um número de fármacos

sintéticos, com variados efeitos terapêuticos que podem ser úteis no controle desse processo (KAPOOR *et al*, 2009).

2.5.1 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos consistem em uma variedade de metabólitos secundários, tais como fenóis simples, ácidos fenólicos, flavonóides, taninos etc. Para vários desses compostos é relatada a função de proteção conferindo às plantas ação contra a radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros. Além disso, esses compostos possuem várias atividades biológicas como antioxidantes, antimutagênicos, antibacterianos, anticâncer, etc (CHUNG *et al*, 2011).

Os compostos fenólicos são uma classe metabólitos secundários de plantas de baixo peso molecular. A maioria destes compostos são capazes de sequestrar radicais livres tais como os produzidos durante o metabolismo celular (espécies reativas de oxigênio (ROS) ou radicais livres, como peróxido de hidrogênio, oxigênio singleto e radical hidroxila) que podem levar ao estresse oxidativo. O estresse oxidativo está associado com graves problemas de saúde crônicos, como câncer, inflamação, doenças neurodegenerativas, doenças cardíacas, envelhecimento e também a deterioração de alimentos (GOUVEIA *et al*, 2013).

Os polifenóis são a maior classe de substâncias inibidoras da tirosinase. Dentre eles, os flavonóides são os derivados fenólicos mais estudados e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas. Os flavonóides são divididos em flavonas, flavonóis, flavanonas, flavononóis, isoflavonóides, chalconas e catequinas, os quais se distinguem pela adição de anéis oxigenados heterocíclicos, pelas diferentes posições do anel adicional, e por adição de grupos hidroxila, metila, isoprenóide e metoxila a molécula. Essas diferenças determinam o potencial de inibição da tirosinase (CHAN *et al*, 2008).

Os flavonóis, bem representados pela quercetina, geralmente causam inibição competitiva da enzima e também atuam quelando o íon cobre, co-fator enzimático. Os derivados de benzaldeídos e de benzoatos, como o ácido benzóico, o ácido cinâmico, o ácido gálico e o ácido *p*-coumárico, caracterizam outra classe de inibidores da tirosinase, os quais atuam ligando-se diretamente ao sítio ativo enzimático. Esteróides e lipídeos de cadeia longa, como a trilinoleína, causam inibição da enzima por se ligarem a sítios da tirosinase diferentes do ativo, sendo caracterizados como inibidores não-competitivos (CHANG, 2009).

Os flavonóides possuem estrutura bastante semelhante à de substratos da tirosinase e de fato, a atividade anti-tirosinase dos flavonóis se deve à 3-hidroxi-4-ceto, pois essa estrutura é capaz de se ligar ao sítio ativo da enzima e quelar o cobre. As hidroxilas do anel A: (C6, C7 e C8) e do anel B (C2, C3 e C4) dos flavonóides são responsáveis por essa interação com o cobre (KIM *et al*, 2002).

Compostos fenólicos tais como flavonóides e taninos também possuem ação anti-envelhecimento, como é o caso da quercetina, um conhecido flavonóide (CHONDROGIANNI *et al*, 2010; SCHWAGER *et al*, 2008; ROESLER *et al*, 2007; WACH *et al*, 2007). Compostos fenólicos possuem grande potencial despigmentante e rejuvenecedor também devido aos seus feitos antioxidantes (CHAN *et al*, 2008; ANGERHOFER *et al*, 2009).

2.5.2 Extratos secos vegetais

Extratos secos vegetais por apresentarem facilidade de padronização e manuseio, o que contribui para a garantia da homogeneidade de preparações farmacêuticas, são muito mais adaptados às necessidades da terapêutica moderna. Estes podem ser preparados a partir de

solução extrativa vegetal, submetida a técnicas de secagem como liofilização, secagem por nebulização (secagem por *spray dryer*) e a secagem em leito de jorro (SOUZA, 2003).

O processo de secagem por aspersão é um método extensivamente utilizado (PÉREZ-SERRADILLA e LUQUE DE CASTRO, 2011; FANG e BHANDARI, 2011) em virtude de ser um processo contínuo e de baixo custo que produz partículas secas de boa qualidade, e para o qual a maquinaria necessária está prontamente disponível (FANG e BHANDARI, 2011). Os pós obtidos por secagem por aspersão tem boas características de reconstituição, baixa atividade de água e são adequados para o transporte e armazenamento (KHA *et al*, 2010). Além disso, esse é um processo altamente adequado para componentes sensíveis ao calor, tais como carotenoides (KHA *et al*, 2010; FANG e BHANDARI, 2011) pois a secagem é muito rápida e o núcleo é aquecido a temperaturas geralmente muito menores que 100 °C (FANG; BHANDARI, 2011).

A liofilização fornece produtos de excelente qualidade, tanto produtos alimentares quanto produtos farmacêuticos, devido às temperaturas moderadas em que o processo é realizado, contribuindo para a formação de sólidos altamente porosos que retêm aroma, cor e sabor. No entanto, a liofilização necessita de grande investimento e custos de operação (BUBNOVICH *et al*, 2012).

A liofilização é um processo importante e bem estabelecido para melhorar a estabilidade a longo prazo de drogas lábeis, especialmente proteínas terapêuticas. Cerca de 50% dos produtos biofarmacêuticos atualmente comercializados são liofilizados, representando a estratégia de formulação mais comum. Na liofilização as reações de degradação no estado sólido, químicas ou físicas, são inibidas ou suficientemente desaceleradas, resultando em um estabilidade melhorada a longo prazo. Além da vantagem de uma melhor estabilidade, formulações liofilizadas também proporcionam facilidade de manuseio durante o transporte e armazenamento (KASPER e FRIESS, 2011).

2.5.3 *Calycophyllum spruceanum*

Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. F. ex Schum, Rubiaceae, conhecida como mulateiro, pau-mulato (português), palo-mulato, capirona (espanhol) ou ainda pau-marfim. É uma espécie vegetal nativa da região amazônica (Brasil), encontrada também na Colômbia, Bolívia e Peru. Na Amazônia, a casca do mulateiro é utilizada na forma de cataplasma, para o tratamento de cortes, feridas e queimaduras e acredita-se que tenha efeitos em cosméticos para celulite, manchas de pele e rugas bem como em infecções da pele causadas por fungos. Além desses usos, os nativos utilizam o chá da casca em banhos de rejuvenescimento (REVILA, 2000; COSTA *et al*, 2011).

A árvore atinge de 20-35 m de altura por 0,7-1,8 m diâmetro caulinar. Possui tronco retilíneo, ramificado somente no ápice. A casca é fina, apresenta coloração esverdeada e quando envelhecida a coloração da casca varia de pardacenta até castanho-escura. As folhas são simples, opostas, oblongas ou ovado-oblongas, o ápice é agudo ou obtuso e a base é pouco atenuada (COSTA *et al*, 2007).



Figura 6 – Árvore de *Calycophyllum spruceanum*

FONTE: Retirado de <http://br.olhares.com/pau_mulato_foto788720.html> Acesso em: 18 maio 2011.

Encontra-se em zonas de capoeiras fechadas velhas e/ou novas, altas e inundáveis, perto e longe de corpos de água, em chácaras, campos de pastagens, áreas degradadas, com alta intensidade de luz e sombra baixa. É resistente a inundações, ocorre de preferência em áreas de várzea alagadas por água barrenta. Comum em clima tropical úmido, com temperatura média anual de 22 °C a 30 °C e precipitação fluvial entre 1.100 a 3.400 mm anuais. Desenvolve-se em solos argilosos e arenosos que apresentam um conteúdo médio ou alto de matéria orgânica. Prefere solos com pH 7 e saturação de alumínio menor de 30%. Não se desenvolve em solos extremamente ácidos, com pH de 4 a 4,5 (REVILA, 2000).

Esta espécie corresponde à seguinte classificação taxonômica:

Tabela 1 – Classificação taxonômica *Calycophyllum spruceanum* Benth (Cronquist, 1981)

Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Mognoliopsida
Subclasse:	Asteridae
Ordem:	Rubiales
Família:	Rubiaceae
Gênero:	<i>Calycophyllum</i>
Espécie:	<i>Calycophyllum spruceanum</i> Benth

Segundo Zuleta (1997), o estudo químico do extrato etanólico das cascas de *C. spruceanum* indicou a presença de auronas, chalconas, flavonóides, antraquinonas, compostos fenólicos, taninos, benzopironas, alcalóides e saponinas, demonstrando a riqueza química da espécie. Em relação a atividade biológica, Zuleta (1997) realizou ensaio da DOPA-reação, obtendo resultados positivos, confirmando a presença de substâncias redutoras de metais. Porém o estudo não foi conclusivo se houve produção de melanina pelos melanócitos

estimulada por algum dos componentes do extrato e também não apresentou atividade antimicrobiológica, refutando o uso popular para cura infecções fúngicas da pele.

No entanto, estudos mais recentes desenvolvidos pelo grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas com o extrato obtido das cascas de *C. spruceanum* demonstraram presença de taninos, causando efeito adstringente. Além disso, demonstraram possuir alto teor de fenóis e ácidos orgânicos na planta conferindo atividade antibacteriana, antifúngica e inseticida e os fenóis isolados apresentaram atividade antioxidante (LINO *et al*, 2009; VARGAS *et al*, 2007).

Costa e colaboradores (2011) realizaram estudo desenvolvendo extrato aquoso de *Calycophyllum spruceanum* usando planejamento fatorial para avaliação dos seguintes parâmetros extrativos: método de extração, relação droga solvente, tempo de extração. E devido à não elucidação dos compostos responsáveis pela atividade terapêutica desta espécie, os taninos foram utilizados como marcadores químicos para o controle de qualidade. Nesse estudo, foi possível determinar qual solução extrativa possui maior índice de tanino total e resíduo seco mais elevado. Além disso, os resultados obtidos da caracterização físico-química sugeriram que condições ambientais modificam as propriedades e influenciam na qualidade e segurança de um produto derivado desta espécie.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante e o efeito dos extratos das cascas de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. F. ex Schum sobre enzimas de interesse cosmético.

3.2 Específicos

- Caracterizar o extrato hidroetanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum*;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos, produto comercial e formulações obtidas de extratos das cascas de *Calycophyllum spruceanum*;
- Avaliar o efeito inibitório dos extratos das cascas de *C. spruceanum* sobre as enzimas tirosinase, colagenase, hialuronidase e elastase;
- Avaliar o efeito inibitório das formulações dos extratos das cascas de *C. spruceanum* sobre a enzima tirosinase;
- Avaliar a citotoxicidade dos extratos das cascas de *C. spruceanum* em melanócitos Melan-A e em fibroblastos NIH 3T3;
- Avaliar o potencial hemolítico dos extratos e formulações do extrato hidroetanólico das cascas de *C. spruceanum*.

4 METODOLOGIA

4.1 Estratégia Experimental

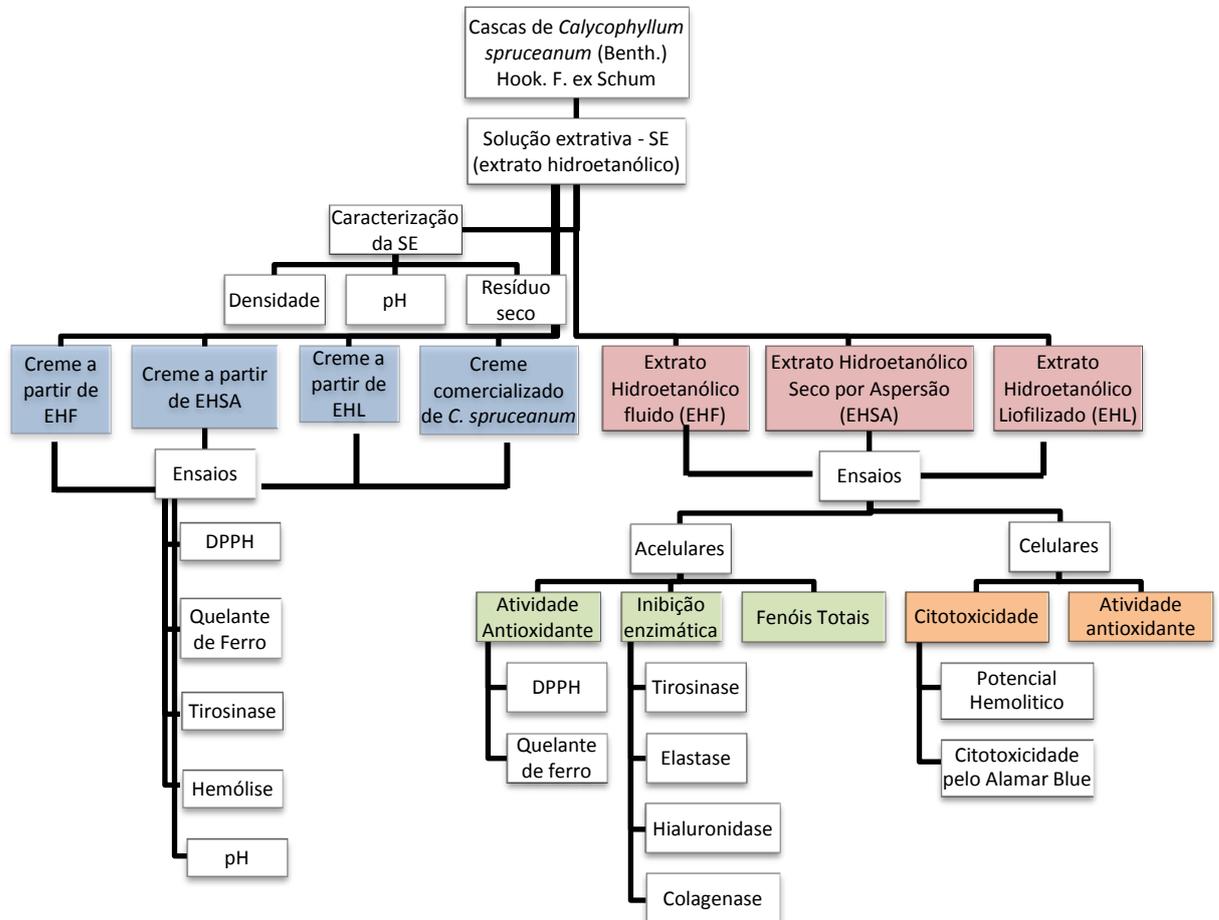


Figura 7 – Delineamento experimental.

4.2 Obtenção dos extratos

As cascas de *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. F. ex Schum foram coletadas por mateiros sob orientação do botânico Juan Revilla do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia) no município de Manicoré no Amazonas.

Para a preparação do extrato, as cascas foram secas em estufa e, após a secagem, trituradas em moinho de facas. O extrato hidroetanólico foi obtido pelo método de maceração

por 30 minutos à temperatura ambiente. Pesaram-se 500 gramas da matéria-prima vegetal para 750 mililitros de etanol 96 °GL e 1250 mililitros de água. O extrato foi filtrado e em seguida separado em extrato fluido (EHF), extrato seco em liofilizador (EHL) e extrato seco por aspersão (EHSA).

4.3 Caracterização da solução extrativa

4.3.1 Densidade relativa

Conforme preconizado na Farmacopéia Brasileira (2010) foi empregado o uso do picnômetro de 25 mL previamente calibrado, limpo e seco. O procedimento foi realizado com a transferência do extrato hidroetanólico das cascas de *Calycophyllum spruceanum* para o picnômetro, ajustado a temperatura de 20 °C, o excesso da amostra foi removido e realizou-se a pesagem. O teste foi realizado em triplicata obtendo-se média e desvio padrão. A massa do picnômetro cheio e vazio foi usada para determinar a densidade da amostra conforme a seguinte fórmula:

$$\text{Densidade (g/mL)} = \frac{M1 - M}{25 \text{ mL}}$$

Onde, M 1 – massa do balão contendo o extrato de *C. spruceanum* e M – massa do balão vazio.

4.3.2 pH

O pH foi determinado através da utilização de potenciômetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e Ph 7,0 com eletrodo de plástico, em triplicata de experimento, em conformidade com a Farmacopéia Brasileira (2010).

4.3.3 Determinação de resíduo seco

A determinação do teor de resíduo seco do extrato fluido foi realizada conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (2010). Transferiu-se, com uma pipeta graduada, 2 mL do extrato para um pesa-filtro, medindo aproximadamente 50 mm de diâmetro e 30 mm de altura. Evaporou-se até a secura em banho-maria e deixou-se dessecar em estufa a 100 – 105 °C por 3 horas. Após, deixou-se esfriar em dessecador, sobre pentóxido de fósforo e pesou-se. Calculou-se a porcentagem sobre a massa de extrato utilizado. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

4.3.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais

A determinação de fenóis totais presentes nas amostras de extrato das cascas de *C. spruceanum* foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo Singleton e Rossi (1965) com modificações. Em placas de 96 poços foram adicionados 50 µL de Folin-Ciocalteu (Sigma) a 10 µL de extrato/ácido gálico/água. Para eliminar a leitura referente à cor dos extratos e do ácido gálico foram adicionados 10 µL do extrato ou do ácido gálico a 50 µL de água. A placa foi incubada a 37 °C por 8 minutos e realizada a primeira leitura no leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) a 715 nm. Após

essa leitura, foram adicionados 240 µL de carbonato de sódio a 0,4%. A placa foi incubada por três minutos e realizou-se a segunda leitura. O teor de fenóis em mgEAG/mg do extrato foi calculado a partir da fórmula gerada pela curva de ácido gálico e convertida para ser expressa em termos de porcentagem por meio da fórmula abaixo:

$$Fenóis\ Totais\ (\%) = \frac{(Abs_{extrato} \times 100)}{Abs_{acidogálico}}$$

4.4 Formulação de cremes a partir dos extratos secos e extrato fluido

Na formulação dos cremes, manipulou-se os componentes descritos na Tabela 2, para a obtenção de uma formulação-base na qual os extratos a 10 % foram incorporados. Para a preparação dessa formulação-base foram aquecidos separadamente os componentes da fase aquosa a 75 – 80 °C. Adicionando-se os outros componentes lentamente com agitação vigorosa e constante. Após a solubilização de todos os componentes, diminuiu-se a velocidade de agitação até a mistura alcançar a temperatura ambiente (BATISTUZZO *et al*, 2011). Após a preparação da formulação-base procedeu-se a incorporação dos extratos (EHF, EHL e EHSA) na concentração de 10%, conforme o produto comercializado.

Tabela 2 – Formulação-base para os cremes de *C. spruceanum*.

Componentes	Concentração na formulação (%)
Monoestearato de Glicerila	5,28%
Miristato de Isopropila	7,72%
Água	q. s. p. 100g
Metilparabeno	0,11%
Propilparabeno	0,12%
Propilenoglicol	4,41%
Ácido Esteárico	8,83%
Trietanolamina	0,88%

4.4.1 pH

Para determinação do pH das formulações transferiu-se uma alíquota de aproximadamente 4 g da amostra em 20 mL de água para um béquer e imergiu-se o eletrodo do pHmetro. Repetiu-se a operação na mesma amostra a fim de se obter duas medidas de pH (BRASIL, 2004). Aferiu-se o pH em pHmetro devidamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e Ph 7,0 com eletrodo de plástico.

4.5 Atividade Antioxidante

4.5.1 Teste do 2,2-difenil-1- picrilhidrazila (DPPH)

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos de *C. spruceanum*, avaliou-se a reação entre diferentes concentrações dos extratos e a solução alcoólica de DPPH (MOLYNEUX, 2004). Pesaram-se 2 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e dissolveu-se em 12 mL de etanol absoluto. Foram preparadas também soluções teste dos extratos em diferentes concentrações até 25 µg/mL. Foi realizada a leitura em leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) para conhecer a absorvância dos brancos específicos (A1), em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL das diluições dos extratos e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30 µL das diluições dos extratos e 270 µL da solução de DPPH, incubando-se a placa em seguida, ao abrigo da luz por 30 minutos, decorridos os quais, realizou-se a segunda leitura (A2) e mensurou-se a redução do radical livre DPPH a 517 nm. Como controle negativo foram utilizados 30 µL de etanol e 270 µL de solução de DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH, calculado segundo a equação abaixo (onde A1= absorvância 1 e A2 = absorvância 2).

$$Atividade (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1 amostra)}{(A_2 - A_1 controle)} \times 100$$

A determinação da concentração de eficiência mediana do DPPH (CE₅₀), ou seja, a concentração do extrato que causa 50% da cor do DPPH, foi obtida por regressão linear simples dos pontos plotados graficamente no programa Origin 6.0. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas em triplicatas realizadas para cada uma das concentrações dos extratos. Os resultados obtidos dos extratos foram comparados com uma curva de atividade de diferentes concentrações de Trolox, utilizado como controle positivo de atividade antioxidante.

4.5.2 Avaliação da atividade quelante de ferro

A atividade quelante de ferro pelos extratos e formulações foi avaliada de acordo com metodologia proposta por Ebrahimzadeh *et al* (2008). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 µL do padrão (EDTA)/extrato/controle negativo (diluyente) juntamente com 10 µL de solução de Cloreto Férrico (FeCl₂) a 2 mM, incubando-se por 5 minutos à temperatura de 37 °C e em seguida realizou-se a primeira leitura (A1) em leitor de Elisa (DTX 800 - Beckmar Coulter). Após a leitura A1, foram adicionados 10 µL de Hidroxilamina hidrociorada 300 mM e 30 µL de Ferrozine 5 mM, incubando-se por 15 minutos a temperatura de 37 °C, sendo realizada em seguida a segunda leitura (A2). O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a equação:

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1_{amostra})}{(A_2 - A_1_{controle})} \times 100$$

4.6 Teste de Inibição da Tirosinase *in vitro*

A inibição da tirosinase pelos extratos foi avaliada segundo método descrito por Chan *et al* (2008). Foram preparadas diferentes soluções testes dos extratos das cascas de

Calycophyllum spruceanum em DMSO. Para retirar as absorvâncias dos extratos, 20 µL de cada solução teste dos extratos foram pipetados em triplicata a uma placa de 96 poços de fundo redondo aos quais foram previamente adicionados 80 µL de solução de tirosinase. As absorvâncias 1 (A1) foram determinadas leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) a 475 nm. A placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C e em seguida adicionou-se 100 µL do reagente de cor DOPA (diidroxifenilalanina). Em seguida, incubou-se a placa por 15 minutos a 37 °C e determinou-se às absorvâncias finais (A2) no mesmo comprimento de onda. Foram determinadas as concentrações finais dos extratos considerando o fator de diluição com a enzima. Como controle positivo foi utilizado o ácido kójico preparado da mesma forma que as amostras teste. A CI₅₀ foi obtida por regressão linear simples a partir de gráficos plotados utilizando o programa Origin 6.0. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado a seguir, onde A2= absorvância 2 e A1= absorvância 1 (HEARING, 1987):

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{(A_2 - A_1 \text{ amostra})}{(A_2 - A_1 \text{ controle})} \times 100$$

4.7 Zimografia *in vitro* – Inibição da collagenase

Essa metodologia foi realizada segundo metodologia de Snoek-Van Beurden e Von Den Hoff (2005). As amostras em diferentes concentrações foram incubadas por 15 minutos com 10 µL da enzima Collagenase tipo I (50 µg/mL) obtida de *Clostridium histolyticum* (ChC – EC.3.4.23.3). Posteriormente foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 0,75 mm - (100 V, 2 h, sistema Mini-Protean III BioRad®), poliacrilamida (PAGE) 30% contendo 10% de dodecil sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 1,0% de gelatina. Ao final da corrida o gel foi lavado com Triton 2,5% para remoção do SDS. Em seguida, incubou-se o gel a 37 °C por 18 horas em um tampão de incubação Tris-HCl 0,05 M, CaCl₂ 5 mM, ZnCl₂ 5

μM , pH 8,0. Após o período de incubação, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*® por 30 minutos à temperatura ambiente e descorados com uma solução contendo 10% de metanol e 10% de ácido acético em água. O gel foi digitalizado (450 d.p.i.) e as intensidades das bandas e massas moleculares calculadas utilizando o programa ImageJ.

4.8 Teste de inibição da colagenase *in vitro*

O efeito dos extratos sobre a colagenase foi avaliado por metodologia espectrofotométrica descrita por Van Mart e Steinbrink (1981) *apud* Thring *et al* (2009). O substrato sintético, *N*-[3-(2-furil)acrilóila]-Leu-Gly-Pro-Ala (FALGPA), e a enzima, Colagenase tipo I (ChC – EC.3.4.23.3), foram dissolvidos em Tampão Tricina (50 mM de Tricina, 400mM de NaCl, 10 mM de CaCl_2 , pH 7,5). Foram realizadas diluições sucessivas do extrato de *C. spruceanum* das quais, 10 μL foram adicionadas a uma placa de 96 poços a 10 μL da enzima e 90 μL de tampão. Em seguida, as absorvâncias foram lidas a 335 nm leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) obtendo-se a leitura A1. Incubou-se a placa por 5 minutos a 37 °C e, em seguida, foram adicionados 100 μL do substrato para o início da reação. A placa possuía poços com volume final de 200 μL contendo o tampão de Tricina, 1 mM FALGPA, 1 unidade de ChC e o extrato teste. Controles negativos foram realizados com tampão. A absorvância de 335 nm foi mensurada imediatamente depois de adicionado o substrato e em tempos contínuos. A porcentagem de inibição da colagenase pelo extrato foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Inibição (\%)} = 100 - \frac{(A_2 - A_1 \text{ amostra})}{(A_2 - A_1 \text{ controle})} \times 100$$

4.9 Ensaio da inibição da elastase *in vitro*

O efeito dos extratos sobre a elastase foi avaliado por metodologia espectrofotométrica descrita por KIM *et al* (2004) e modificada por Thring *et al* (2009). Esse ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 60 mM (pH 7,5). A elastase pancreática suína (PE – E.C.3.4.21.36) foi dissolvida para obter 3,33 mg/mL de solução estoque em água estéril. O substrato AAAPVN (*N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilido) foi dissolvido no tampão para 1,6 mM. Foram adicionados 10 µL das amostras, a 90 µL da enzima, e incubados por 15 minutos. Após esse período, realizou-se uma leitura para eliminar a interferência da coloração das amostras (Branco) e em seguida adicionou-se 100 µL do substrato para o início da reação, realizando-se a primeira leitura imediatamente em leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter). A reação teve o volume final de 200 µL, contendo tampão, 0,8 mM AAAPVN, 1 µg/mL PE e extrato teste. Controles negativos foram realizados usando o diluente. Valores de absorbância entre 381 e 402 nm foram mensurados imediatamente seguindo a adição do substrato e então continuamente por 50 minutos usando um leitor de microplacas. A porcentagem de inibição da elastase pelo extrato foi calculada conforme a fórmula abaixo (THRING *et al*, 2009):

$$Inibição (\%) = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{(A_{controle})} \times 100$$

4.10 Ensaio de inibição da hialuronidase *in vitro*

A inibição da atividade de hialuronidase foi determinada conforme metodologia descrita por Reissig *et al* (1955) e modificada por Marchesan *et al* (2006). A mistura da reação consistiu de 30 µL das soluções testes, 125 µL do sal de potássio do ácido hialurônico em tampão acetato 0,1 M (pH 3,6) contendo 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl) e 15 µL da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, Sigma Co), dissolvida no

mesmo tampão; esta mistura da reação foi incubada a 37 °C por 40 minutos. Após a incubação, 40 µL de tetraborato de potássio 0,8 M foram adicionados a mistura de reação, levando-se ao banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 90 µL de *r*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e a mistura foi incubada novamente a 37 °C por 20 minutos. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) a 620 nm usando água como controle. Como controle positivo, utilizou-se a Rutina. O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a equação:

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1 amostra)}{(A_2 - A_1 controle)} \times 100$$

4.11 Ensaios em Células

4.11.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas células Melan-A (melanócitos) gentilmente doadas pela Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis da Universidade Federal de São Paulo, e NIH 3T3 doadas pela Profa. Dra. Silvya Stuchi Maria-Engler da Universidade de São Paulo. As células NIH 3T3 são uma linhagem contínua de células estabelecidas a partir da cultura de embrião de rato Swiss sendo extensivamente utilizadas em estudos fármaco-toxicológicos (TODARO e GREEN, 1963; TODARO *et al*, 1965).

4.11.2 Manutenção das células

As células Melan-A e NIH 3T3 foram cultivadas em DMEM acrescido de 10% de SFB, 1% de penicilina e 1% de estreptomicina. Todas as células foram incubadas a 37 °C e atmosfera úmida com 5% CO₂.

4.11.3 Citotoxicidade pela técnica de Alamar blue

A citotoxicidade dos extratos das cascas *Calycophyllum spruceanum* nas células foi avaliada para determinação das concentrações não tóxicas dos extratos a serem testadas nos ensaios subsequentes.

Para a realização do teste, foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de $0,5 \times 10^4$ células/mL. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações dos extratos das cascas de *C. spruceanum*, realizando-se o tratamento em triplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72h). A CI_{50} foi determinada a partir de uma curva de concentração (400 – 6,25 $\mu\text{g/mL}$). Como controle positivo de citotoxicidade foi utilizada a Doxorrubicina (0 – 25 $\mu\text{g/mL}$).

Passado o tempo de tratamento (24, 48 e 72 horas) foram adicionados 10 μL de resazurina (0,2%) na respectiva triplicata de tratamento. Como branco da reação foram lidos os poços com células e extratos sem resazurina. Após 2 horas, tempo de metabolização da resazurina padronizado para as linhagens estudadas, realizou-se a leitura da fluorescência. A viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\Delta F_t}{\Delta F_c} \times 100$$

Onde: ΔF_t = (fluorescência da célula + meio + amostra + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + extrato)

ΔF_c = (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO)

4.11.4 Atividade Antioxidante Celular

Este teste foi realizado conforme metodologia descrita por Wolfe e Liu (2007). Em placa de 96 poços foram cultivadas 6×10^4 células em 100 μL de meio de cultura DMEM completo por poço. Os poços externos não foram utilizados em virtude de sofrerem uma maior variação durante a leitura do que os poços mais internos. Após 24 horas de incubação em estufa de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$, o meio foi removido e os poços lavados com PBS. Em seguida, as células foram tratadas em triplicata com 100 μL de uma solução de meio contendo 10% de SFB, 25 μM de diclorofluoresceína e 100 μL do extrato a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e nos poços reservados ao padrão, quercetina na concentração de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Como controle negativo utilizou-se solução salina PBS. Após o tempo de tratamento, 1 hora, as células foram lavadas mais uma vez com 100 μL de PBS e foram adicionados 100 μL de ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropano) a 600 μM (diluído em solução salina balanceada de Hank's). Em seguida, a placa foi lida leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) com filtro de emissão a 538 nm e com excitação a 485 nm a cada 10 min por 1h.

A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada para o tempo de 60 minutos conforme a fórmula abaixo:

$$AAC (\%) = 100 - \frac{\Delta Fa}{\Delta Fb} \times 100$$

Onde: ΔFa = fluorescência da amostra aos 60 minutos - fluorescência da amostra no tempo 0

ΔFb = fluorescência do controle aos 60 minutos - fluorescência do controle no tempo 0

4.11.5 Atividade hemolítica em sangue de camundongo

A avaliação do potencial hemolítico dos extratos de *C. spruceanum* foi realizada segundo metodologia proposta por Malpezzi (1993). Foram utilizadas solução salina (NaCl 0,85% + CaCl 10 mM) e solução de hemácias 2% (obtidas a partir de sangue de camundongo *Mus musculus Swiss* coletado por via intracardíaca em tubo de heparina). Para o preparo da solução de hemácias foram adicionados 2 mL de solução salina a 200 µL de sangue em tubo falcon de 15 mL que em seguida, foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. Ao término da última centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de solução salina. Para o ensaio, 10 µL de diferentes concentrações das soluções teste (maior concentração testada: 2 mg/mL) e 90 µL de solução salina foram plaqueados em placas de 96 poços. DMSO foi utilizado como controle negativo e TritonX-100 como controle positivo (40 µL em 60 µL de solução salina). Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de hemáceas a 2% em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Para exclusão da interferência da coloração das soluções, estas foram plaqueadas juntamente com 100 µL de solução salina e sem solução de hemácias (Absorbância A1). Após o período de incubação a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 minutos e após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outra placa, a qual foi lida em leitor de Elisa (DTX 800 - Beckman Coulter) a 450 nm (Absorbância A2).

4.12 Análise Estatística

Os valores foram expressos utilizando-se média e desvio-padrão. A determinação da CI_{50} dos testes antioxidantes do extrato pelo método do DPPH foi realizada pelo método de regressão linear simples, usando o programa Origin® (versão 8.0; micronal software, northampton, Massachussetts, EUA). A determinação da CI_{50} do efeito do extrato sobre a atividade das enzimas tirosinase, elastase, colagenase e hialuronidase foi realizada pelo método de regressão sigmoidal, usando o programa Origin® (versão 8.0; micronal software, northampton, Massachussetts, EUA). A determinação da CI_{50} da toxicidade celular foi realizada usando o programa GraphPad prism 5®. A diferença significativa foi calculada pelo teste t-Student, e valores p menores que 0,05 foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da solução extrativa

A solução extrativa foi caracterizada seguindo métodos preconizados na Farmacopéia Brasileira obtendo-se os resultados descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Teor de resíduo seco, densidade e pH da solução extrativa obtida a partir das cascas de *C. spruceanum*.

Ensaio	Valores
<i>Resíduo seco</i>	2,5 ± 0,03
<i>Densidade relativa</i>	0,9575 ± 0,15 g/cm ³
<i>pH</i>	5,5

5.1.1 Determinação do Teor de Fenóis Totais

O teor de fenóis totais dos extratos foi calculado utilizando-se como equivalente o ácido gálico. A diferença nos resultados obtidos, observada nos dados apresentados na tabela 4, não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). Portanto, o processo de secagem não influenciou no teor de compostos fenólicos nos extratos hidroetanólicos de *C. spruceanum*.

Tabela 4 – Teores de fenóis totais dos extratos hidroetanólicos de *C. spruceanum* liofilizado, *C. spruceanum* seco por aspersão e *C. spruceanum* extrato fluido.

	Fenóis Totais (%)
<i>C. spruceanum</i> Liofilizado	20,63 ± 1,58
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	17,5 ± 0,69
<i>C. spruceanum</i> extrato fluido	6,8 ± 0,55

5.2 Formulações

5.2.1 Determinação do pH

A determinação do pH das formulações de *C. spruceanum* e da formulação base foi realizada e encontram-se descritas na figura a seguir.

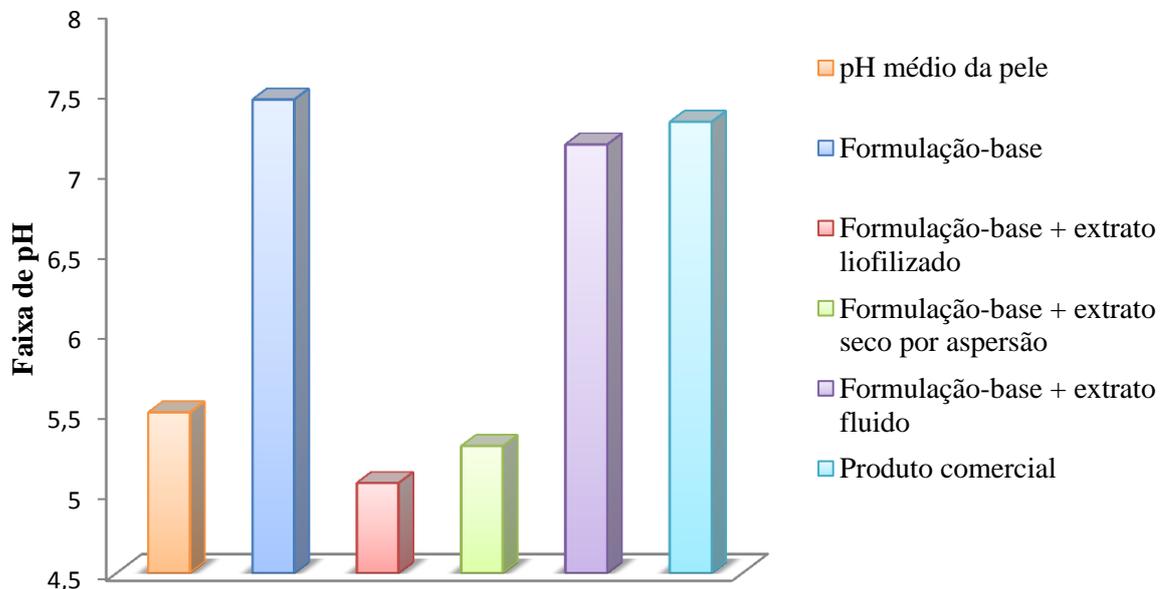


Figura 8 – Gráfico de representação da determinação do pH da formulação-base e formulações contendo extratos de *C. spruceanum*.

5.3 Testes de avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

5.3.1 Teste do 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

A capacidade antioxidante dos extratos de *C. spruceanum* foi avaliada através de três métodos diferentes: sequestro de radicais livres do DPPH, avaliação da capacidade quelante de metais e avaliação da atividade antioxidante celular.

A atividade antioxidante dos extratos foi confirmada através da técnica de mensuração da taxa de seqüestro do radical livre DPPH. Os resultados obtidos no ensaio estão apresentados na figura 9. De modo geral, observa-se que neste ensaio apesar de próximas, as CE_{50} apresentadas são estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). Além disso, pode-se afirmar que todos os extratos apresentaram alta capacidade de seqüestro destes radicais.

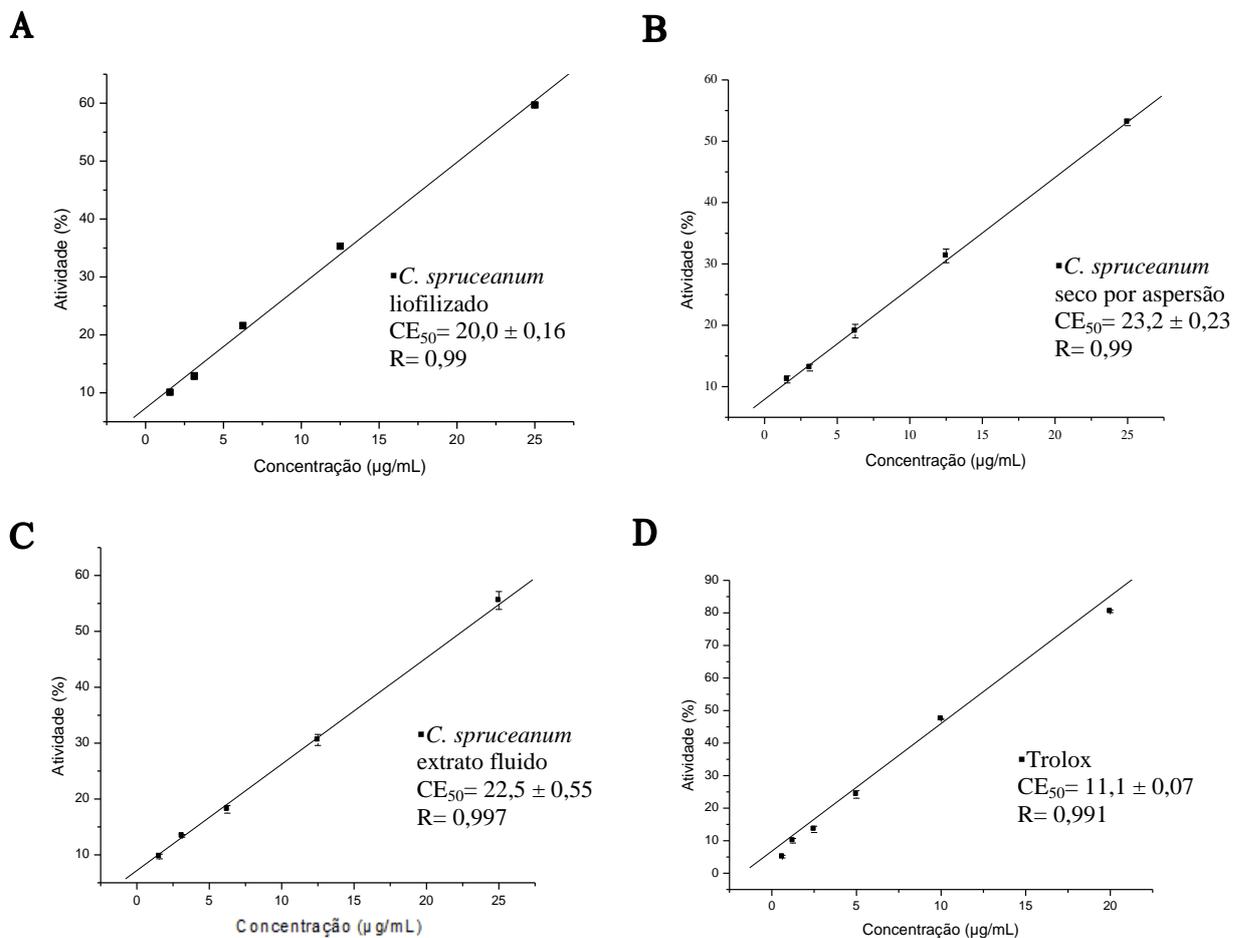


Figura 9 – Gráfico da atividade antioxidante expresso a partir das porcentagens de seqüestro dos radicais livres em DPPH. A) *C. spruceanum* (extrato liofilizado); B) *C. spruceanum* (extrato seco por aspersão); e C) *C. spruceanum* (extrato fluido); e D) Padrão de atividade antioxidante Trolox.

Os valores de CE_{50} foram calculados por regressão linear dos gráficos em que o eixo das abscissas representou a concentração dos extratos e o eixo das ordenadas a atividade antioxidante (%).

Após a avaliação da atividade dos extratos, os cremes obtidos a partir do extrato fluido e extratos secos por aspersão e por liofilização foram testados quanto a atividade sequestradora de radicais DPPH (Tabela 5).

Tabela 5 – Atividade antioxidante pelo método do DPPH de cremes a 10%, preparados a partir de extratos das cascas de *C. spruceanum*.

	Atividade (%)
Formulação-base	SA
Produto (creme de <i>C. spruceanum</i> disponível no mercado)	26,9 ± 1,03
Creme com extrato fluido de <i>C. spruceanum</i>	48,2 ± 1,16
Creme com extrato seco de <i>C. spruceanum</i> liofilizado	83,7 ± 2,21
Creme com extrato seco <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	85,6 ± 0,32

SA – Sem Atividade.

5.3.2 Avaliação da capacidade quelante de ferro

A capacidade quelante de ferro dos extratos de *C. spruceanum* foi avaliada e os resultados encontram-se na tabela 6.

Tabela 6 – Atividade Quelante de Ferro de extratos de *C. spruceanum* (fluido, seco por aspersão e seco por liofilização) e cremes a 10% preparados a partir de extratos das cascas de *C. spruceanum*.

	Atividade (%)
<i>C. spruceanum</i> extrato fluido	57,1 ± 5,13
<i>C. spruceanum</i> liofilizado	SA
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	SA
Formulação-base	43,1 ± 1,1
Produto (creme de <i>C. spruceanum</i> disponível no mercado)	SA
Creme com extrato fluido de <i>C. spruceanum</i>	SA
Creme com extrato seco de <i>C. spruceanum</i> liofilizado	SA
Creme com extrato seco <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	SA

SA – Sem Atividade.

5.4 Teste de inibição da tirosinase *in vitro*

Os efeitos anti-tirosinase dos extratos de *C. spruceanum* foram determinados através do cálculo da oxidação da L-DOPA a Dopaquinona conforme ensaio *in vitro* com tirosinase obtida de cogumelo. Os extratos secos por aspersão e liofilizado apresentaram boa atividade inibitória *in vitro*, no entanto, estas foram inferiores a do ácido kójico (Figura 10).

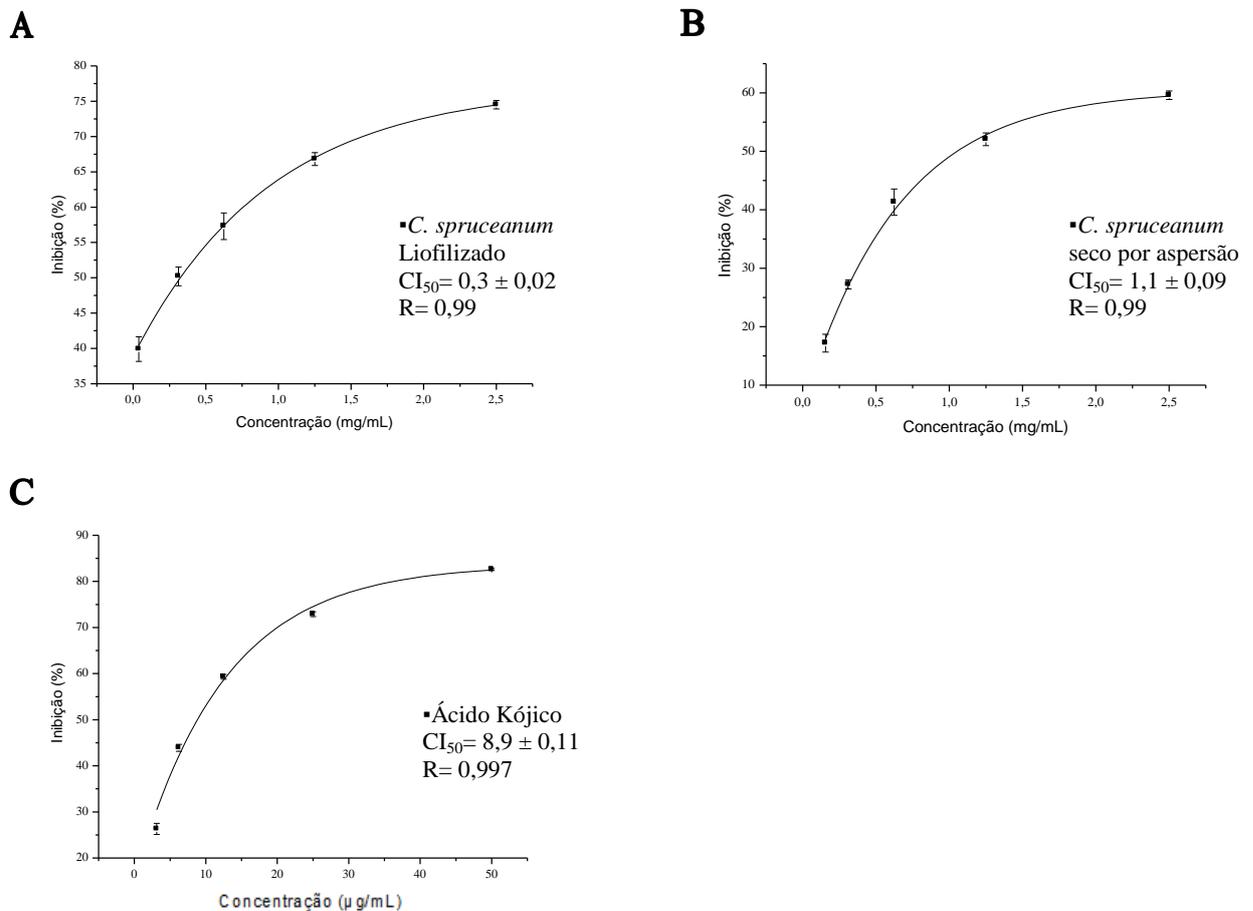


Figura 10 – Atividade inibitória da tirosinase *in vitro*. Resultados expressos em média \pm desvio padrão. A) *C. spruceanum* (extrato liofilizado); B) *C. spruceanum* (extrato seco por aspersão); e C) Padrão de inibição Ácido Kójico. Para todos as amostras $p < 0,05$.

A inibição apresentada pelo extrato fluido foi de apenas $15,3 \pm 0,54\%$ na concentração de 2 mg/mL. Após a avaliação dos extratos secos e fluido, os cremes obtidos a partir desses extratos foram testados quanto a atividade inibitória da tirosinase (Tabela 7).

Tabela 7 – Atividade anti-tirosinase de cremes a 10%, preparados a partir de extratos das cascas de *C. spruceanum*.

	Atividade (%)
Formulação-base	SA
Produto (creme de <i>C. spruceanum</i> disponível no mercado)	SA
Creme com extrato fluido de <i>C. spruceanum</i>	SA
Creme com extrato seco de <i>C. spruceanum</i> liofilizado	41,0 ± 0,36
Creme com extrato seco <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	25,6 ± 1,35

SA – Sem Atividade.

5.5 Teste de inibição da collagenase *in vitro* – Teste em microplaca e Zimografia *in vitro*

A atividade inibitória da collagenase (MMP-1) dos extratos secos por aspersão e liofilizado foi testada por dois métodos diferentes, o primeiro, o método da zimografia reversa e, o segundo, um teste de inibição enzimática *in vitro* utilizando microplacas.

O método da zimografia reversa *in vitro* foi realizado como forma de triagem para verificar o potencial inibitório dos extratos. Através das áreas das bandas de degradação de colágeno, é possível calcular a porcentagem de inibição dos extratos analisados. Assim, após análise das áreas obtidas no gel (Figura 11), que claramente demonstraram que houve uma inibição da collagenase, e a partir dos gráficos plotados (Figura 12), as porcentagens de inibição da collagenase pelos extratos foram calculadas.

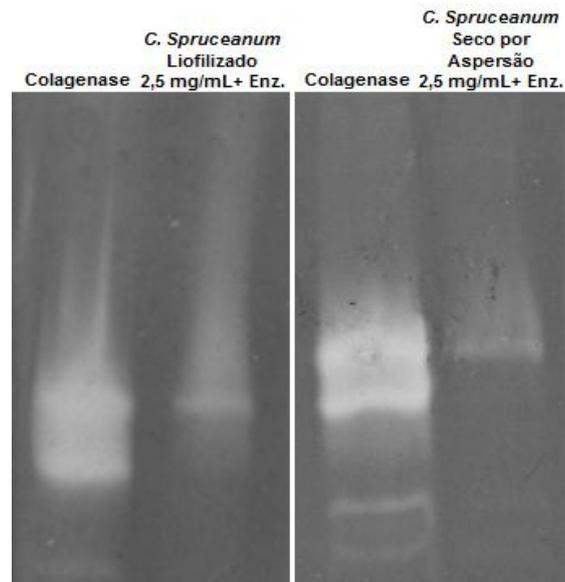


Figura 11 – Gel mostrando a inibição da atividade da colagenase por zimografia in vitro dos extratos de *C. spruceanum* liofilizado e *C. spruceanum* seco por aspersão.

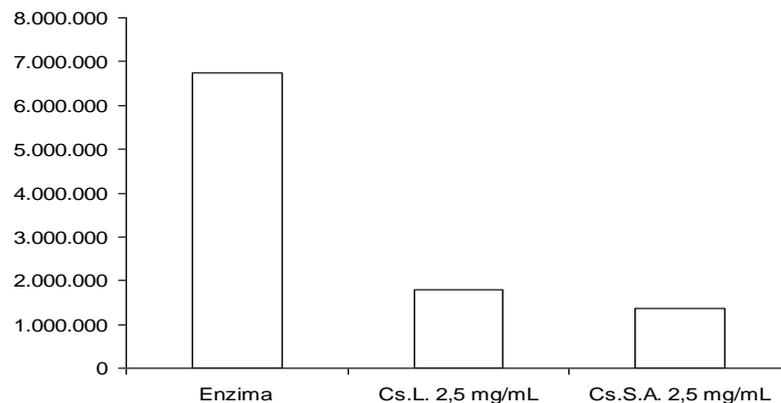


Figura 12 – Gráfico área versus concentração obtido a partir das áreas das bandas do gel de zimografia. O gráfico apresenta a inibição da atividade da colagenase a partir de extrato de *C. spruceanum* liofilizado (Cs.L.) e *C. spruceanum* seco por aspersão (Cs.S.A.).

As inibições apresentadas no gráfico da figura 12 – foram de 73,6% para o extrato liofilizado e 79,7% para o extrato seco por aspersão, ambos foram testados na concentração de 2,5 mg/mL. A partir destes resultados, pode-se realizar o teste em microplacas para obtenção da CI_{50} .

Os resultados obtidos no teste em microplacas encontram-se na tabela 8 onde pode-se observar que estes não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em seus valores de CI_{50} .

Tabela 8 – Inibição da atividade da collagenase *in vitro* por extratos de *C. spruceanum* liofilizado e *C. spruceanum* seco por aspersão.

Amostra	CI₅₀ (µg/mL)
<i>C. spruceanum</i> liofilizado	812 ± 160,0
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	798 ± 60,0

5.6 Ensaio da inibição da elastase *in vitro*

Os extratos *C. spruceanum* foram avaliados quanto ao efeito de inibição sobre a enzima elastase, a partir de ensaio enzimático *in vitro*. Os extratos secos por aspersão e liofilizado apresentaram boa atividade inibitória *in vitro*, estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$). O extrato seco por aspersão apresentou atividade um pouco mais elevada que a do extrato liofilizado (Tabela 9).

Tabela 9 – Atividade inibitória da elastase *in vitro*. Resultados expressam a CI₅₀ em média ± desvio padrão dos extratos.

Amostra	CI₅₀ (µg/mL)
<i>C. spruceanum</i> liofilizado	55,6 ± 0,93
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	49,1 ± 4,38
<i>C. spruceanum</i> extrato fluido	36,9 ± 0,25

5.7 Ensaio de inibição da hialuronidase *in vitro*

Os extratos *C. spruceanum* foram avaliados quanto ao efeito de inibição sobre a enzima hialuronidase, a partir de ensaio enzimático *in vitro*. Os extratos secos por aspersão e liofilizado apresentaram interessante atividade inibitória *in vitro*, estatisticamente diferentes entre si ($p < 0,05$), apresentando o extrato seco por aspersão atividade superior a do extrato liofilizado e a do padrão (Tabela 10).

Tabela 10 – Inibição da atividade da hialuronidase *in vitro* por extratos de *C. spruceanum* liofilizado, *C. spruceanum* seco por aspersão e Padrão.

Amostra	CI ₅₀ (µg/mL)
<i>C. spruceanum</i> liofilizado	29,7 ± 1,30
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	17,4 ± 1,68
Rutina	27,6 ± 0,06

5.8 Citotoxicidade pela técnica de Alamar blue

Nas tabelas 11 e 12 estão representadas as viabilidades de melanócitos (Melan-A) e de fibroblastos (NIH 3T3) em diferentes períodos de tratamento. As CI₅₀ dos extratos e da doxorrubicina, controle positivo de morte, estão apresentadas nessas tabelas para os períodos estudados. Não houve diferença estatisticamente significativa na citotoxicidade dos extratos em Melan-A no período de 48 h ($p > 0,05$), no período de 72 h pode-se observar que o extrato seco por aspersão apresenta-se levemente mais citotóxico ($p < 0,05$).

Tabela 11 – CI₅₀ (µg/mL) da viabilidade celular em Melan-A após exposição de 24, 48 e 72 h aos extratos de *C. spruceanum* liofilizado e *C. spruceanum* seco por aspersão e padrão de morte celular, Doxorrubicina.

Tempo (h)	<i>C. spruceanum</i> liofilizado CI ₅₀ (µg/mL)	<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão CI ₅₀ (µg/mL)	Doxorrubicina CI ₅₀ (µg/mL)
24	> 215,0	> 215,0	4,17 (3,57 – 4,88)
48	151,9 (128,3 – 179,8)	147,0 (131,4 – 164,5)	0,92 (0,73 – 1,15)
72	116,3 (103,1 – 131,2)	88,71 (64,30 – 122,4)	> 25

A tabela 12 traz os resultados da citotoxicidade em NIH 3T3 no período de 24 h onde podemos observar maior citotoxicidade dos extratos nessa linhagem em comparação com Melan-A e maior citotoxicidade do extrato liofilizado em comparação com o extrato seco por aspersão.

Tabela 12 – CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da Viabilidade celular em NIH 3T3 após exposição de 24 h aos extratos de *C. spruceanum* liofilizado e *C. spruceanum* seco por aspersão.

<i>C. spruceanum</i> liofilizado CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	<i>Doxorrubicina</i> CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
78,99 (63,76 – 97,86)	122,5 (104,9 – 143,0)	0,90 (0,54 – 1,48)

Todos os resultados estão representados como média \pm desvio padrão do ensaio realizado em triplicata.

5.9 Atividade Antioxidante Celular

A atividade antioxidante celular (AAC) dos extratos de *C. spruceanum* foi avaliada sobre células da linhagem NIH 3T3 (fibroblastos murinos) após confirmação de atividade *in vitro* pelo método do DPPH. As figuras 13 e 14 apresentam os resultados obtidos no ensaio de AAC em células. Neles, podemos observar que a atividade antioxidante em células foi próxima a observada no ensaio do DPPH, diminuindo de forma inexpressiva.

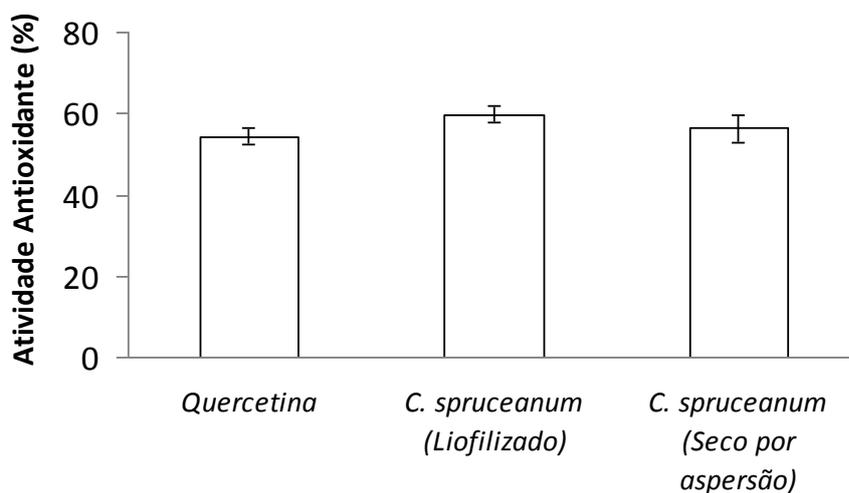


Figura 13 – Atividade Antioxidante celular em linhagem de fibroblastos murino NIH 3T3 dos extratos e padrão Quercetina. Os extratos de *C. spruceanum* encontravam-se na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e o padrão (Quercetina) a 5 $\mu\text{g/mL}$.

A figura 14 apresenta o crescimento da fluorescência que indica a oxidação das células NIH 3T3 tratadas com diclorofluoresceína na presença de quercetina e na presença dos

extratos no ensaio de atividade antioxidante celular. Nesta figura estão representadas as curvas dose-resposta do teste de atividade antioxidante da quercetina e dos extratos em fibroblastos murino NIH 3T3 em período de 1 hora de tratamento.

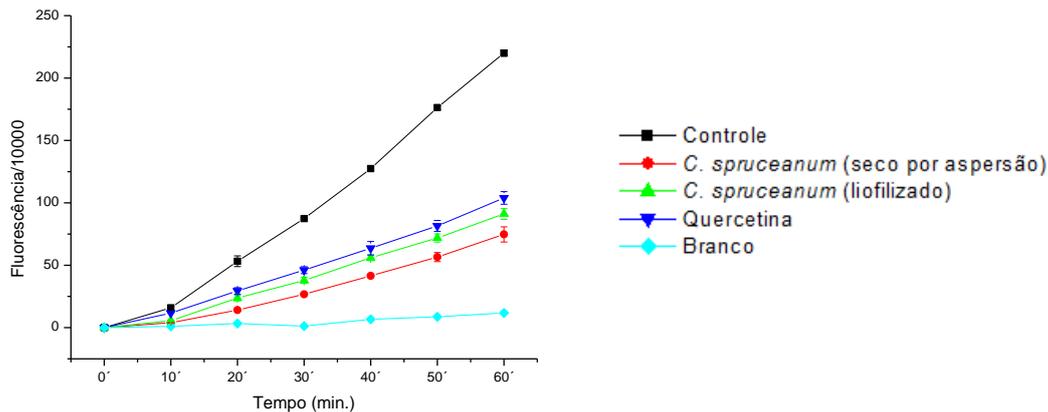


Figura 14 – Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoresceína no fibroblasto murino NIH 3T3. As fluorescências representam média \pm dp (n=3). Os extratos estavam na concentração de 25 μ g/mL e o padrão (Quercetina) a 5 μ g/mL.

Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a atividade do extrato seco por aspersão (inibição = $56,3 \pm 3,53\%$) e a quercetina (inibição = $54,5 \pm 2,15\%$), no entanto, vale ressaltar que a concentração de quercetina utilizada foi cinco vezes menor do que a dos extratos estudados. O extrato seco por aspersão e o extrato liofilizado (inibição = $59,9 \pm 2,17\%$) apresentam diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), sendo, portanto, a atividade do segundo ligeiramente superior a do primeiro.

5.10 Atividade hemolítica em sangue de camundongo

O efeito hemolítico dos extratos secos de *C. spruceanum* foi avaliado em eritrócitos de camundongos *Mus musculus* Swiss. Neste ensaio, observou-se ausência de atividade hemolítica nas concentrações testadas até 1 mg/ml. Para este ensaio, foram consideradas

ativas aquelas substâncias que apresentaram $CE_{50} < 250 \mu\text{g/mL}$. A tabela 13, traz o percentual de hemólise das amostras testadas.

Tabela 13 – Potencial hemolítico de extratos de *C. spruceanum* (seco por aspersão e seco por liofilização) a 2 mg/mL e cremes a 10% preparados a partir de extratos das cascas de *C. spruceanum*.

	Hemólise (%)
<i>C. spruceanum</i> liofilizado	15,6 ± 1,06
<i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	11,2 ± 1,69
Formulação-base	74,6 ± 2,40
Produto (creme de <i>C. spruceanum</i> disponível no mercado)	14,3 ± 2,75
Creme com extrato fluido de <i>C. spruceanum</i>	66,7 ± 3,33
Creme com extrato seco de <i>C. spruceanum</i> Liofilizado	SA
Creme com extrato seco <i>C. spruceanum</i> seco por aspersão	86,6 ± 1,82

SA – Sem Atividade.

As hemólises apresentadas pelos extratos secos, liofilizado e seco por aspersão, e pelo produto, quando comparadas, não possuem diferença estaticamente significativa ($p > 0,05$). A hemólise apresentada pela formulação-base é estatisticamente igual ($p > 0,05$) a hemólise apresentada pelo creme com extrato liofilizado de *C. spruceanum*.

6 DISCUSSÃO

Este trabalho realizou estudo da atividade antioxidante e do efeito sobre enzimas de interesse cosmético (tirosinase, colagenase, elastase e hialuronidase), de extratos secos, extrato fluido e formulações das cascas de *Calycophyllum spruceanum*. Dentre os resultados encontrados, destacam-se a inibição das enzimas hialuronidase e elastase *in vitro* e o efeito antioxidante dos extratos em linhagens celulares de fibroblastos murinos (NIH 3T3).

Há um grande interesse da indústria em produtos cosméticos a partir de produtos de origem natural, no entanto, não há trabalhos desse tipo para a espécie *Calycophyllum spruceanum*. Sendo assim, esse é um estudo inédito para esta espécie. Trabalhos semelhantes não são encontrados em espécies do gênero *Calycophyllum* mas, trabalhos envolvendo estas atividades podem ser encontrados com espécies de outros gêneros pertencentes a família Rubiaceae (BAURIN *et al*, 2002; CHIANG *et al*, 2011; WEST *et al*, 2009).

As indústrias farmacêuticas têm um especial interesse pelos extratos secos, pois as formas farmacêuticas sólidas apresentam precisão de dosagem do material seco e facilidade de manuseio, transporte e armazenagem, além das formas farmacêuticas secas apresentarem maior estabilidade química, física e microbiológica (OLIVEIRA e PETROVICK, 2010; ROCHA *et al*, 2010; PÉREZ-SERRADILLA e LUQUE DE CASTRO, 2011; COUTO *et al*, 2012). Além disso, extratos secos permitem a fabricação de formulações farmacêuticas sólidas, como comprimidos e cápsulas, que representam a maior parte dos medicamentos utilizados em todo o mundo (COUTO *et al*, 2012). Nesse sentido, este trabalho utilizou os processos de secagem disponíveis na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, liofilização e secagem por aspersão, com o intuito de compará-las quanto a influência que o processo de secagem escolhido tem nas atividades biológicas

estudadas. Assim, foram obtidos o extrato seco por aspersão e o extrato liofilizado a partir de extrato hidroetanólico das cascas de *C. spruceanum*.

Até o momento, diferentes métodos de secagem têm sido aplicados a diferentes matérias-primas e cada método possui as suas próprias características. No entanto, o efeito de um método específico de secagem sobre a retenção de qualidade não é previsível e depende dos compostos envolvidos e especificamente da planta em estudo. Portanto, a informação significativa para melhorar as qualidades dos produtos obtidos pode ser revelada por uma avaliação comparativa das diversas tecnologias de secagem (LIN, L. *et al*, 2012). Além disso, a informação sobre as alterações no perfil fenólico, a capacidade antioxidante e atividades inibitórias sobre tirosinase, colagenase, elastase e hialuronidase de *C. spruceanum* é inexistente.

Nesse sentido, é interessante verificar quais dos dois processos poderá gerar um extrato que conserve as atividades biológicas pesquisadas e que apresente a melhor relação custo/benefício visando a produção de um produto cosmético. A primeira etapa do trabalho, foi a caracterização da solução extrativa através da avaliação do resíduo seco, densidade e pH da solução. Avaliações estas que já foram realizadas em extratos aquosos da espécie obtidos em diferentes processos de extração por Costa *et al* (2011), em um estudo no qual os pesquisadores buscaram o desenvolvimento tecnológico através de desenho fatorial.

O teor de resíduo seco para o extrato hidroetanólico das cascas de *C. spruceanum* obtido neste trabalho foi de $2,5 \pm 0,03\%$, superior ao obtido por Costa *et al* (2011) através da preparação de extrato aquoso por decocção por 15 minutos $7,5\%$ que foi de $2,27 \pm 0,00\%$, esse extrato foi o que rendeu o maior teor de resíduo seco no estudo em questão, o extrato com menor teor de resíduo seco obtido por Costa e colaboradores (2011) foi o do extrato aquoso por decocção por 15 minutos $2,5\%$ ($0,67 \pm 0,01\%$). Esse resultado sugere que o

método, solvente e tempo de extração escolhidos para o nosso estudo são capazes de extrair uma maior quantidade de substâncias da planta.

A densidade relativa da solução extrativa hidroetanólica em estudo foi de $0,9575 \pm 0,15 \text{ g/cm}^3$, inferior ao encontrado por Costa e colaboradores (2011) na solução extrativa aquosa de *C. spruceanum* ($0,998 \pm 0,17 \text{ g/cm}^3$). Analisando-se a densidade encontrada para outros extratos na literatura, as quais variam entre 0,8-0,99 (FONSECA e LIBRANDI, 2008; ALVARENGA *et al*, 2009), observa-se que o extrato encontra-se dentro de uma faixa comum a maioria deles.

Na caracterização dos extratos foi avaliado, entre outros parâmetros, o pH. Segundo Longhini *et al* (2007) este dado é fundamental no processo de extração, pois é responsável por selecionar e determinar as substâncias a serem extraídas, de acordo com suas características químicas e de polaridade. Atua, ainda, como sensor da estabilidade do produto, pois o pH é sinalizador de prováveis alterações químicas que possam estar ocorrendo no meio extrativo. Além disso, o pH ácido evita o ataque de alguns microrganismos contaminantes de produtos líquidos.

O pH da solução extrativa analisado foi de 5,5, superior ao encontrado por Costa e colaboradores (2011) na solução extrativa aquosa de *C. spruceanum* (pH 3,8), demonstrando que o extrato aquoso estudado por estes pesquisadores teve maior capacidade de extração de substâncias ácidas do que o extrato hidroetanólico produzido em nosso estudo. Esta diminuição do pH observada nos extratos com relação ao líquido extrator mostra o caráter ácido das substâncias extraídas. Extratos ricos em polifenóis e taninos possuem características ácidas.

Segundo Vasconcelos *et al* (2005) a otimização dos parâmetros de secagem como temperaturas de entrada e de saída e velocidade de fluxo de alimentação, concentração e tipo de adjuvante tecnológico, assim como os teores de resíduo seco do extrato fluido a nebulizar

são fatores indispensáveis para obtenção de extratos secos com melhores características físico-químicas e aumento do rendimento da operação.

Neste trabalho também foram elaborados cremes aos quais foram incorporados os extratos secos e extrato fluido. Para tanto, as formulações foram testadas e o pH de cada uma delas determinado para conhecimento da viabilidade da utilização tópica das mesmas.

A determinação do pH é um parâmetro importante nas formulações que visam aplicação cutânea, pois cada produto deve apresentar pH compatível com a região do corpo onde se aplica. A pele tem normalmente um pH médio de 5,5, embora este valor possa variar ligeiramente consoante as diferentes zonas do corpo. O pH natural da pele provém das secreções das glândulas apócrinas e endócrinas que conduzem à formação de uma película de proteção sobre toda a superfície cutânea, designada de filme hidrolipídico (OLIVEIRA, 2009).

Observando-se a figura 8, verifica-se que apenas as formulações contendo extratos secos encontram-se próximas a um pH ideal para formulações cosméticas tópicas (pH da formulação contendo extrato seco liofizado = 5,06 e pH da formulação contendo extrato seco por aspersão = 5,29). Essas formulações apresentam valores mais próximos do pH médio da pele (pH 5,5). As formulações contendo extrato fluido não sofrem grandes alterações de pH (pH da formulação contendo extrato fluido = 7,17 e pH da formulação do produto comercial = 7,31) quando comparadas a formulação-base (pH = 7,45) mantendo o pH, no entanto, acima do pH ideal para esse tipo de formulação. Do ponto de vista tecnológico, torna-se útil a inclusão de ácidos fracos tamponados para ajuste de pH a valores menos sujeitos a variações acidentais nessas formulações. Segundo Oliveira (2009) essa prática é desejável especialmente em cremes O/A, cujo aumento de acidez (por hidrólise enzimática, por exemplo), pode levar à ruptura da emulsão.

Após a caracterização da solução extrativa os extratos passaram pelos processos de secagem. Após obtenção dos extratos secos avaliou-se a influência dos mesmos no teor de fenóis totais, constituintes conhecidos por serem responsáveis por boa parte das atividades biológicas de extratos vegetais.

Para conhecer o teor de fenóis totais dos extratos foi realizado o método de Folin Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965) com leves modificações. Conforme a tabela 4, os extratos secos não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) demonstrando que o processo de secagem não teve influência no teor final de fenóis totais dos extratos. O extrato fluido apresentou menor teor de fenóis totais ($6,8 \pm 0,55\%$) em relação ao extrato liofilizado ($20,63 \pm 1,58\%$) e extrato seco por aspersão ($17,5 \pm 0,69\%$), o que era esperado haja visto que as substâncias são concentradas na amostra com o processo de secagem.

O reativo de Folin-Ciocalteu é um dos métodos mais utilizados na pesquisa de compostos fenólicos, sofrendo mudança de coloração do amarelo para azul. Quanto maior a intensidade da coloração azul, maior a quantidade de compostos fenólicos na solução (Bora *et al*, 2005).

São escassos os trabalhos que tenham avaliado a influência do tipo de secagem sobre a perda de compostos fenólicos. Estudo de Fang e Bhandari (2011) avaliou a influência do processo de secagem por aspersão sobre o teor de compostos fenólicos de *Myrica rubra* Sieb. et Zucc e verificou que quase não houve perdas registradas durante o processo (~ 93-97% foram retidos), no entanto, houve perdas após determinado período de estocagem dos pós. Harbourne e colaboradores (2009) em estudo sobre o efeito do método de secagem sobre os constituintes fenólicos de *Filipendula ulmaria* e *Salix alba*, assim como neste trabalho, não verificaram efeitos significativos sobre o teor total de fenóis. Rojas (2011) através de análises cromatográficas concluiu que o processo de secagem por aspersão não causava mudanças

significativas nos perfis dos extratos quando comparados ao extrato liofilizado mas que o processo de secagem em leito de jorro causava maior degradação dos marcadores químicos frente aos processo de *spray dryer* e liofilização.

Kyi e colaboradores (2005) determinaram a cinética da reação de oxidação de polifenóis em amêndoas de cacau durante a secagem em temperaturas variando entre 40 e 60 °C e em umidades entre 50 e 80% e verificaram que, quanto maior a temperatura e a umidade, maior a oxidação dos polifenóis presentes no cacau. A degradação das substâncias fenólicas, pode ser associada com a ocorrência de reações oxidativas ou decomposição de compostos termolábeis induzidas pelo calor e também com a possibilidade de perdas de substâncias voláteis durante a secagem por aspersão (GEORGETTI *et al*, 2008). Polifenóis são compostos sensíveis ao tratamento pelo calor, e a secagem por aspersão tem apresentado potencial para seu encapsulamento, sendo utilizada com sucesso para o encapsulamento de uma série de materiais ricos em polifenóis (FANG e BHANDARI, 2011).

Compostos fenólicos são utilizados como antioxidantes naturais, e vem ganhando importância devido aos seus benefícios para a saúde humana, diminuindo o risco de doenças degenerativas mediante a redução do estresse oxidativo e inibição da oxidação de macromoléculas. Além da atividade antioxidante, fenóis e/ou extratos fenólicos demonstram certa atividade antimicrobiana, tornando-se uma boa alternativa aos antibióticos e conservantes químicos. Há um interesse alargado em usar compostos naturais antimicrobianos, devido ao aumento da pressão do consumidor sobre a indústria de alimentos, para evitar conservantes químicos e devido à crescente resistência aos antibióticos (OLIVEIRA *et al*, 2008).

Avaliações das propriedades antioxidantes dos compostos naturais são muito importantes por causa de seus usos em alimentos, medicamentos e cosméticos (MISHRA *et al*, 2012). Agentes antioxidantes desempenham um papel muito importante no sistema de

defesa do corpo contra as espécies reativas de oxigênio (ROS), subprodutos nocivos gerados durante a respiração celular aeróbica normal. Além disso, diferentes fatores de estresse ambientais como a poluição, temperatura, excesso de intensidade de luz e limitação nutricional são capazes de aumentar a produção de ROS (NOIPA *et al*, 2011).

Este trabalho realizou avaliação da atividade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH onde pôde-se observar uma ótima atividade antioxidante em ambos extratos com atividade levemente superior atribuída ao extrato liofilizado (figura 9). A capacidade antioxidante dos extratos foi avaliada em concentrações até 25 µg/mL, definindo-se como tempo de reação 30 minutos, corroborando com grande parte da literatura (LU e FOOD, 2001; BRACA *et al*, 2002; KIM *et al*, 2002), onde esse ensaio é empregado. Concomitantemente à avaliação da capacidade antioxidante dos extratos vegetais, realizou-se o ensaio de redução do DPPH com o Trolox® (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), uma substância de comprovada ação antioxidante, empregada neste trabalho como controle positivo do ensaio.

Espécies reativas de oxigênio em particular (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), estão envolvidos na patogênese de várias doenças crônico-degenerativas, tais como inflamação, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer e transtornos relacionados ao envelhecimento. Embora ROS e RNS sejam mensageiros secundários em funções fisiológicas normais do organismo e participem em vários mecanismos de regulação redox, uma superprodução dessas espécies podem oprimir enzimas protetoras e causar destrutivos e letais efeitos celulares (LOCATELLI *et al*, 2009). Nesse sentido, uma grande variedade de métodos têm sido desenvolvidos para a investigação de capacidade antioxidante, como o ensaio de estimativa do total da capacidade de redução eletroquímica do 2,2-difenil-1-picrilhidrazil radical (DPPH). O método do DPPH é amplamente utilizado devido à sua

estabilidade, simplicidade e seu sistema de reação simples que envolve apenas a reação direta entre o radical e um antioxidante (NOIPA *et al*, 2011).

O sequestro de radicais livres é um dos mecanismos reconhecidos pelo qual ocorre a ação dos antioxidantes. O método de sequestro do radical DPPH pode ser utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos específicos ou de um extrato em curto período de tempo (PRADO, 2009).

Em comparação com a atividade antioxidante exercida pelo padrão Trolox® (CI₅₀ de 11,1 ± 0,07 µg/ml), todos os extratos analisados apresentaram menor ação (EHL – CI₅₀= 20,0 ± 0,16; EHSA – CI₅₀= 23,2 ± 0,23; EHF – CI₅₀= 22,5 ± 0,55 µg/mL). Tal fato era previsível, uma vez que o Trolox® empregado é um padrão purificado e que os extratos de *C. spruceanum* apresentam inúmeras substâncias que exercem esse efeito antioxidante, tais como compostos fenólicos, taninos e carotenóides. Associado a isso, destaca-se que extratos vegetais por possuírem essa infinidade de ativos biológicos podem ser utilizados para a obtenção de mais benefícios além do efeito antioxidante esperado. Por mais que a ação antioxidante dos extratos tenham sido inferiores ao padrão Trolox®, ainda assim, podem ser consideradas relevantes, uma vez que podem ser fonte de substâncias preventivas ao estresse oxidativo imposto diariamente ao organismo.

As formulações preparadas a partir dos extratos secos (liofilizado e seco por aspersão) apresentaram excelente atividade antioxidante pelo sequestro de radicais DPPH (83,7 ± 2,21 e 85,6 ± 0,32%, respectivamente), não apresentando atividade significativamente diferente ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem que a formulação não provoca alterações na atividade antioxidante desses extratos. No entanto, ao avaliarmos o produto comercial e a formulação creme preparada a partir de extrato fluido (26,9 ± 1,03 e 48,2 ± 1,16%, respectivamente) observamos que os extratos secos são superiores quanto a atividade antioxidante e que a

incorporação do extrato fluido na formulação diminuiu significativamente sua atividade antioxidante, o que pode ser explicado pela evaporação e/ou degradação de compostos.

O ensaio do DPPH é uma metodologia muito utilizada devido ser rápida, fácil e não muito cara, o que resulta numa diversidade de protocolos seguidos e divergências de resultados interlaboratoriais (SHARMA e BHAT, 2009). Assim, os resultados dos testes com o radical DPPH são apresentados de diversas maneiras dentre as quais, temos a CE_{50} , uma das mais utilizadas e a escolhida para a representação dos dados obtidos neste trabalho, cujo valor representa a quantidade de um antioxidante necessária para reduzir a 50% a concentração do DPPH inicial (LIU *et al*, 2008; RUMBAOA *et al*, 2009; ATMANI *et al*, 2009).

As metodologias para a determinação da capacidade antioxidante são numerosas e podem estar sujeitas a interferências, além de se basearem em fundamentos diversos (GONÇALVES, 2008). No que diz respeito a métodos *in vitro* para avaliar a atividade de sequestro de radicais, diferentes espécies de radicais são normalmente utilizados, tais como ABTS+, DMPD+ e DPPH. Eles são radicais artificiais e não reproduzem a situação *in vivo*, no entanto, eles são úteis para avaliar a atividade antioxidante de uma maneira rápida, fácil e não muito cara (LOCATELLI *et al*, 2009). Dessa forma, atualmente preconiza-se a utilização de duas ou mais técnicas, já que nenhum ensaio usado isoladamente para determinar a capacidade antioxidante irá refletir exatamente a “capacidade antioxidante total” de uma amostra (GONÇALVES, 2008).

Um outro teste de atividade antioxidante foi realizado neste trabalho, a avaliação da atividade quelante de ferro. Ao observarmos os resultados obtidos notamos que apenas o extrato fluido de *C. spruceanum* apresentou atividade quelante ($57,1 \pm 5,13\%$ na concentração de 1,25 mg/mL). Esse resultado sugere que os métodos de secagem degradam as substâncias com atividade quelante e que a incorporação do extrato fluido na formulação-base diminuiu drasticamente esse potencial do extrato. A formulação-base apresentou atividade quelante

(43,1 ± 1,1%) e foi utilizada como branco para o cálculo da atividade das formulações, as quais não apresentaram potencial quelante, o que sugere que os componentes da formulação inativam as substâncias com esse potencial no extrato fluido e que os compostos com atividade quelante são provavelmente degradados durante o processo de secagem.

Considerando que a atividade antioxidante da maioria dos agentes se dá pela inativação de ROS apenas após estes terem sido formados, agentes quelantes de ferro são capazes de impedir a sua formação. O ferro pode ter um ciclo redox entre seus dois estados de oxidação – Fe^{2+} e Fe^{3+} – e atuar como um catalisador formando radicais hidroxila (reações de Fenton e de Haber-Weiss). Em flavonóides, as propriedades antioxidantes e quelantes de ferro estão intimamente relacionados a sua atividade, podendo incluir dois passos – primeiro o ferro é quelado pelos flavonóide e os ROS que são formados na sua vizinhança são subsequentemente eliminados pelos flavonóides. Deste modo, os radicais são destruídos no mesmo local onde eles são formados (KAISEROVÁ *et al*, 2007)

Blasa e colaboradores (2011) ressaltam que há a necessidade de executar ensaios *in vitro* semelhantes ao método do DPPH, como o ensaio ORAC (Teste de avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio), e o ensaio de avaliação de atividade antioxidante celular (AAC) para melhor comparar a atividade de diferentes extratos vegetais e para ter resultados mais relevantes para confirmação da biodisponibilidade dos mesmos. O ensaio de AAC pode ser mais preditivo do que o teste do DPPH para avaliação da atividade sequestrante de radicais de extratos e compostos fitoquímicos puros em sistemas biológicos.

O primeiro ensaio de determinação de atividade antioxidante celular (AAC) foi desenvolvido por Wolfe e Liu (2007). O ensaio mediu em células HepG2 tumorais, a inibição exercida por agentes antioxidantes sobre a oxidação de uma sonda intracelular, gerada por um precursor, o '2,7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH-DA), o qual se difunde para dentro da célula, onde é hidrolisado para DCFH por esterases intracelulares. Os radicais peroxila,

gerados a partir do AAPH (2'-2'-azobis 2-amidino propano hidrocloreto), oxidam o DCFH à um derivado DCF fluorescente. Os antioxidantes, adicionados ao sistema, eliminam os radicais peroxila e inibem a produção de DCF. A taxa de aumento na fluorescência celular, em comparação com as células do controle, indica a AAC do composto (WOLFE e LIU, 2007). Vale ressaltar ainda, que o ensaio baseado em AAC pode ser considerado como um método biologicamente mais relevante do que os métodos químicos antioxidantes conhecidos, por contar com aspectos da absorção, metabolismo e localização de compostos antioxidantes no interior das células (XU e CHANG, 2012). O ensaio de AAC realizado neste trabalho consistiu de uma adaptação do ensaio de Wolfe e Liu (2007) para linhagens celulares de fibroblastos murinos (NIH 3T3).

De acordo com a figura 9 e os resultados obtidos na AAC (figuras 13 e 14), podemos observar que os extratos possuem uma atividade antioxidante em células na concentração de 25 µg/mL muito próxima das CE₅₀ obtidas para o DPPH, demonstrando que os extratos têm grande possibilidade de reproduzir esse efeito antioxidante *in vivo* e, principalmente, pouco da atividade antioxidante observada no teste do DPPH é perdida quando avaliada em modelos celulares.

Em comparação com a atividade antioxidante exercida pelo padrão quercetina a 5 µg/mL, todos os extratos analisados apresentaram menor ação. Esse fato, assim como observado no ensaio de DPPH era previsível, uma vez que a quercetina é um flavonóide purificado com excelente atividade antioxidante e que os extratos de *C. spruceanum* apresentam inúmeras substâncias que podem atuar em sinergia e melhorar ou reduzir a atividade de compostos isolados.

A avaliação da atividade antioxidante em células fornece um parâmetro de como esse composto poderá se comportar *in vivo*, já que a eficácia na acessibilidade à parte interna da célula é de extrema importância para que possa ser observada uma atividade antioxidante

celular e, depende de muitos fatores tais como: lipofilicidade dos compostos, solubilidade no meio de incubação, o número de ligações duplas e o número e posição dos grupos hidroxila (BLASA *et al*, 2011).

Alguns trabalhos que comparam atividades antioxidantes por métodos químicos e celulares são encontrados para alimentos (TAN *et al*, 2011; ROY *et al*, 2009; CHU *et al*, 2012) e extratos (TABART *et al*, 2012; CHU *et al*, 2011) principalmente. Quando comparadas as atividades apresentadas pelos extratos de *C. sprucenaum* com outros extratos estudados observamos que estes apresentam excelente atividade antioxidante celular. Trabalho de Tabart e colaboradores (2012) encontraram uma CE_{50} de $113,0 \pm 7,00 \mu\text{g/mL}$ para extratos de folhas de *Ribes nigrum*, bastante superior a esperada para os nossos extratos.

Outro fator que gera interesse na utilização de antioxidantes refere-se aos efeitos da radiação UV na pele. Está bem estabelecido que a resposta inflamatória aguda após a irradiação de luz UV na pele e os processos degenerativos relacionados com a exposição crônica da pele a irradiação UV são em grande parte mediados pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela insuficiência de sistemas antioxidantes. Por isso, devido aos efeitos deletérios de ROS na pele, muitos estudos têm-se centrado no estabelecimento e avaliação de antioxidantes para enriquecer o sistema de proteção endógena cutânea, e, assim, prevenir e/ou tratar danos na pele induzidos pela irradiação UV. Neste contexto, muita atenção tem sido dada aos antioxidantes de fontes naturais, em especial flavonóides e outros compostos fenólicos (FONSECA *et al*, 2010).

O estudo da atividade antioxidante também é um parâmetro importante quando são visados efeitos despigmentantes, já que o teste de inibição da tirosinase também aborda um efeito antioxidante. A tirosinase é uma enzima chave na síntese de melanina e seus inibidores podem ser utilizados para tratar eficientemente a hiperpigmentação e são amplamente aplicados em produtos cosméticos e suplementos alimentares (YANG *et al*, 2012). Vários

compostos ativos possuem tanto atividades anti-tirosinase quanto atividades antioxidantes, como o ácido kójico, hidroquinona, arbutina, ácido cítrico, sulfitos e 4-hexilresorcinol (LIN, Y-S *et al*, 2012).

A atividade antioxidante é importante em inibidores de melanogênese, pois impede a oxidação de substâncias imprescindíveis para a formação de melanina. Nessa via sintética, a dihidroxifenilalanina (DOPA) é convertida a dopacroma pela ação da enzima tirosinase ou por auto-oxidação e reações subsequentes de oxidação do di-idroxi-indol e do ácido carboxílico dihidroxiindólico que terão como produto final o polímero melanina. Assim, a inibição da melanogênese pode ser alcançada por substâncias antioxidantes ou por inibidores da tirosinase (HEO *et al*, 2010).

A utilização de inibidores da tirosinase como o ácido kójico e hidroquinona tem enorme importância na indústria cosmética devido aos seus efeitos despigmentantes. Tais agentes sintéticos muitas vezes resultam em inflamação da pele de modo que alternativas a estes agentes estão sendo procuradas entre produtos naturais. O uso tradicional das plantas contra doenças de pele, especialmente para fins cosméticos, é uma prática comum na medicina popular de muitas culturas, e podem fornecer pistas para a descoberta de melhores agentes despigmentantes (MOMTAZ *et al*, 2008). Alguns potentes inibidores da tirosinase como cuminaldeído, oxiresveratrol, campferol, quercetina e derivados do ácido gálico, têm sido isolados a partir de várias plantas (HSU *et al*, 2007).

Nenhum dos extratos secos estudados apresentou inibição enzimática superior a do ácido kójico ($CI_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$). A atividade apresentada pelo extrato fluido foi extremamente baixa, apresentando uma inibição de apenas $15,3 \pm 0,54 \%$ na concentração de 2 mg/mL , indicando assim, que a etapa de secagem do extrato é necessária quando esta atividade é visada. O extrato seco por liofilização mostrou efeito inibitório sobre a tirosinase ($CI_{50} = 0,3 \pm 0,02 \text{ mg/mL}$) notavelmente superior ao extrato seco por aspensão ($CI_{50} = 1,1 \pm 0,09 \text{ mg/mL}$).

As formulações preparadas a partir dos extratos secos, liofilizado e seco por aspersão, apresentaram boa atividade anti-tirosinase ($41,0 \pm 0,36$ e $25,6 \pm 1,35$ %, respectivamente), já o produto e a formulação a partir do extrato fluido não apresentaram inibição da tirosinase. Os extratos secos, portanto, apresentam maior potencial para utilização com agentes anti-tirosinase, e novamente, o extrato liofilizado apresenta atividade superior a atividade apresentada pelo extrato seco por aspersão.

A diferença nas atividades dos extratos secos sugerem que outros compostos ativos podem ser os responsáveis pela atividade anti-tirosinase do extrato e que estes podem ter sido degradados durante o processo de secagem no *spray dryer*. Outra hipótese para a diferença na atividade dos extratos pode ser que apesar de os valores de fenóis totais não apresentarem diferença estatisticamente significativa, deve-se lembrar que fenóis compreendem taninos, flavonóides e polifenóis, os quais podem estar em diferentes concentrações nos dois extratos justificando assim essa diferença tão grande na atividade biológica dos produtos. Lin, L. *et al* (2012) comparou diferentes métodos de extração e secagem para *Rabdosia serra* (Maxim.) e também observou melhores atividades inibitórias da tirosinase nos extratos liofilizados.

O processo de secagem pode influenciar na atividade biológica, segundo Oliveira e Petrovick (2010) deve-se levar em consideração que o processo de *spray dryer* exerce influência não somente sobre as características tecnológicas, físicas e químicas dos produtos obtidos, podendo também interferir na sua atividade biológica. O processo de liofilização também pode influenciar na atividade biológica de extratos. Estudo de Hsu e colaboradores (2007) observou que o processo de liofilização causava a diminuição da atividade anti-tirosinase de extrato aquoso de algumas espécies de *Lavendula sp.* optando assim, pela utilização de extratos brutos para o estudo. Essa instabilidade dos compostos frente a liofilização levou os pesquisadores a acreditar que os compostos ativos poderiam ser proteínas.

Na literatura, polifenóis e flavonóides, são relatados como compostos que apresentam alta inibição da tirosinase e oxidação (CHEN *et al*, 2010). Alam *et al* (2012) sugerem que a atividade antioxidante pode ser também um dos mecanismos importantes para a atividade inibitória da tirosinase. No entanto, mesmo com a significativa atividade antioxidante que estes extratos apresentaram, isso não foi suficiente para que exibissem atividade inibitória satisfatória e parece não ter influenciado nessa atividade.

Muitos inibidores desta enzima possuem estrutura fenólica tal como o ácido kójico e a arbutina (SÜNTAR *et al*, 2011). No entanto, o fato de os extratos testados não terem apresentado atividade notável nas concentrações testadas, pode estar relacionado a estrutura de seus compostos fitoquímicos. Süntar *et al* (2011) discutem em seu trabalho que o fator mais importante na eficácia das chalconas contra a tirosinase é a localização dos grupos hidroxila em anéis aromáticos, e que a prenilação com o grupo de isoprenila ou a vinilação a moléculas de flavonóides não aumentam a atividade inibitória da tirosinase.

Atividades anti-tirosinase são atribuídas também a alcalóides, compostos ativos presentes na espécie *C. spruceanum*, e que podem ter sofrido degradação durante os processos de secagem. Shaheen e colaboradores (2005) isolaram alcalóides de *Aconitum laeve*, dentre os quais dois, lappaconitina e puberanina, apresentaram inibição da tirosinase com CI_{50} de 93,33 e 205,21 μ M, respectivamente. Os alcalóides alpneumina G, vincamina, e apovincamina isolados e testados quanto a atividade anti-tirosinase demonstraram ser capazes de diminuir a síntese de melanina em linhagens celulares B16F10 (KOYAMA *et al*, 2010).

Ao compararmos a inibição da tirosinase causada pelos extratos das cascas de *C. spruceanum* com os efeitos inibitórios de outras plantas reportadas na literatura, pode-se perceber um grande potencial do extrato liofilizado para esta atividade. Diferentes extratos de sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench ou *Sorghum vulgare* Pers.), aquoso, 70% água:acetona e metanólico, foram liofilizados e estudados por Wang *et al* (2011) apresentando $CI_{50} = 0,91 \pm$

0,16; $1,60 \pm 0,11$; $0,58 \pm 0,09$ mg/mL, respectivamente. Chiari *et al* (2010) estudaram extratos secos por aspersão de 91 espécies nativas da região central da Argentina quanto a atividade anti-tirosinase encontrando nas espécies *Dalea elegans*, *Lithrea molleoides* e *Thalictrum decipiens* Bolvin uma inibição superior a 90% da atividade difenolase a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo a primeira a mais eficaz ($\text{CI}_{50} = 49,27 \mu\text{g/mL}$) seguido por *L. molleoides* ($\text{CI}_{50} = 79,44 \mu\text{g/mL}$) e, finalmente, *T. decipiens* ($\text{CI}_{50} = 158,03 \mu\text{g/mL}$). Com base nesses resultados e, devido à alta disponibilidade e acessibilidade a espécie *L. molleoides* na área montanhosa de Córdoba, esta espécie foi selecionada pelos autores como fonte potencial de novos compostos anti-tirosinase. Oliveira (2011) estudou diferentes extratos de *Passiflora nitida* obtidos por diferentes processos de extração, todos os extratos passaram pelo processo de secagem por aspersão para então serem avaliados quanto a inibição da tirosinase, os extratos secos, aquoso por maceração (EAM) e aquoso por infusão (EAI) foram os que apresentaram melhor atividade inibitória da tirosinase, $\text{CI}_{50} = 439 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ para o EAM e $475 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ para o EAI.

Apesar do potencial sobre a tirosinase apresentado *in vitro*, faz-se necessário a avaliação do comportamento desses extratos em modelos celulares e/ou modelos *in vivo*, pois apesar da simplicidade do teste de inibição da tirosinase *in vitro*, neste ensaio a enzima obtida é proveniente de um cogumelo e fornece apenas uma idéia do potencial do extrato estudado. Chan *et al* (2011) ressaltam que deve-se lembrar que a tirosinase de cogumelo é encontrada no citosol, enquanto a tirosinase em melanócitos é ligada à membrana, podendo portanto, ser esperado um efeito antimelanogênese diferente sobre essas tirosinases. Uma vez que as células alvo dos agentes a serem rastreados são melanócitos, seria mais viável usar tirosinase derivada das células produtoras de melanina em vez de cogumelos. Portanto, mais estudos para melhor avaliação dessa atividade devem ser realizados.

Este trabalho também avaliou a ação dos extratos de *C. spruceanum* sobre as enzimas colagenase, elastase e hialuronidase, enzimas presentes na matriz extracelular que estão envolvidas em processos cicatriciais e no envelhecimento cutâneo.

A diminuição da matriz extracelular (MEC) é um evento comum durante o envelhecimento dos tecidos conjuntivos. Fibroblastos obtidos da pele humana de doadores mais velhos têm níveis aumentados de mRNA colagenase e de proteínas, em relação aos doadores mais jovens, enquanto a expressão de genes do colágeno tipo I e III diminuem de forma dependente da idade. O envelhecimento está associado com uma expressão aumentada da colagenase, no entanto, os mecanismos reguladores envolvidos na superexpressão da colagenase dependentes da idade ainda não foram elucidados (RICCIARELLI *et al*, 1999).

O estresse oxidativo também é atribuído como causa do envelhecimento cutâneo. Há uma teoria do envelhecimento cutâneo pela ação dos radicais livres que se baseia na falha do mecanismo antioxidante natural. Estudos realizados *in vivo* e *in vitro* sugerem uma correlação entre o processo de envelhecimento e a redução de agentes enzimáticos e não-enzimáticos, com consequente aumento na formação de espécies reativas de oxigênio (KEDE e SABATOVICH, 2004). Assim, a junção de atividades antioxidantes e inibitória sobre as enzimas que atuam degradando a MEC fornecerão agentes com grande potencial para o tratamento ou prevenção de processos cicatriciais e envelhecimento cutâneo.

As enzimas proteolíticas elastase, hialuronidase e colagenase (MMP-1) estão presentes na derme, e são responsáveis pela degradação da elastina, ácido hialurônico e fibras colágenas da MEC. A repetitiva exposição à radiação UV acelera a síntese destas enzimas conduzindo à perda de elasticidade da pele e diminuindo a capacidade dela para reter a água, o que implica na formação de sinais mais evidentes de envelhecimento cutâneo. Os tratamentos mais promissores do envelhecimento da pele incluem extratos de ervas, vitaminas e suplementos alimentares antioxidantes, que têm sido amplamente aceitos como sequestradores de radicais

livres a partir de células da pele e redutores dos níveis de enzimas dérmicas para restauração da elasticidade da pele, reduzindo assim, o processo de formação de rugas, por exemplo (MAITY *et al*, 2011).

Quanto ao papel da collagenase tipo I (MMP-1), um fato interessante e que deve ser observado, é que fibroblastos obtidos de pacientes que sofrem prematuramente de várias síndromes do envelhecimento secretam níveis elevados de MMP-1, o que indica que há uma forte associação entre a idade e a expressão anormal dessa enzima (DASGUPTA *et al*, 2009). A metaloproteíase-1 (MMP-1) degrada, especificamente, os colágenos tipo I, II e III (SUNAMI *et al*, 2000; SARDINHA *et al*, 2000).

O colágeno tipo I é a proteína mais abundante encontrada em tecidos de mamíferos, sendo a principal proteína estrutural do osso, pele e tendão, fornecendo integridade estrutural atuando como uma matriz, na qual as outras células podem proliferar. O colágeno também é conhecido por ter um papel no controle do formato, diferenciação e migração celular e, na síntese de um grande número de proteínas. Além disso, é também um biomaterial importante encontrado em aplicações difundidas em áreas como suturas cirúrgicas, cosméticos e cicatrização de feridas (MADHAN *et al*, 2007).

O método escolhido para conhecimento inicial da atividade dos extratos sobre a collagenase foi a Zimografia. Esse é um método simples quantitativo, que pode ser utilizado para a determinação direta e estudo da distribuição espacial das MMPs e seus inibidores. A zimografia envolve a separação eletroforética de proteínas sob condições não redutoras através de um gel desnaturante de SDS-PAGE (dodecilsulfato de sódio-poliacrilamida), contendo substratos (por exemplo, gelatina, caseína ou colágeno). A clivagem do substrato ocorre após renaturação das proteínas pela troca do SDS por um detergente não iônico (por exemplo, Triton X-100). Atividades proteolíticas de MMPs são então detectadas como bandas claras após coloração com *Coomassie Blue*. A ausência de um padrão universal contribui para

a falta de reprodutibilidade inter-laboratorial e transferibilidade dos resultados. Apesar dos problemas com a normalização, este método é largamente utilizado (KRIZKOVA *et al*, 2011).

Após o resultado positivo no método da zimografia, os extratos foram avaliados em metodologia espectrofotométrica na qual verificou-se que o processo de secagem não exerceu influência na ação inibitória sobre a colagenase (Tabela 9), não havendo diferença estatisticamente significativa na ação desses extratos ($p > 0,05$). A atividade inibitória da colagenase em extratos vegetais é atribuída principalmente a polifenóis, os quais estão presentes em nossos extratos, no entanto, parecem não ser os que possuem maior afinidade para inibição dessa enzima. A utilização de polifenóis sob a forma de curtimenta vegetal para a estabilização de colágeno da matriz extracelular remonta a história da humanidade (MADHAN *et al*, 2007).

Poucos trabalhos são encontrados com estudos de inibição da MMP-1. Losso e colaboradores (2004) estudaram o efeito de uma proteína obtida a partir da soja e verificaram inibições dessa enzima em concentrações abaixo de 115 nM. Maity *et al* (2011) encontraram ação similar a do ácido oleanóico no extrato metanólico das flores *Tagetes erecta* Linn. Leite (2009) estudou a ação das drogas meloxicam, tenoxicam, piroxicam e alendronato de sódio sobre a MMP-1 encontrando as seguintes CI_{50} , 66, 91 e 63 μ M, respectivamente. O alendronato de sódio estimulou a atividade da MMP-1 mas inibiu a atividade das MMP 3, 8, 9, 12 e 13. Rennert e Melzing (2002) estudaram a ação do extrato aquoso e diclorometano de quinze basidiomicetos sobre a colagenase tipo 1, os extratos aquosos não apresentaram inibição e os com diclorometano apresentaram inibição na concentração de 200 μ g/mL, dos quais sete apresentaram CI_{50} inferior a 200 μ g/mL. Thring *et al* (2009) estudaram 21 extratos vegetais quanto a atividade inibitória sobre a colagenase e a elastase, desses dezesseis extratos apresentaram atividade anti-colagenase, entre eles, o chá branco, chá verde, tintura de *Rosa*

centifolia L. e *Lavandula angustifolia* L. com 87, 47, 41 e 37% de inibição, respectivamente na concentração de 25 µg/mL.

Assim, observando-se os resultados relatados na literatura e comparando-os com os obtidos neste trabalho, nota-se que os extratos das cascas de *C. spruceanum* apresentam uma fraca atividade anti-colagenase, o que pode, se visto de modo isolado, classificá-los como agentes não tão interessantes na prevenção e tratamento dos sinais do envelhecimento cutâneo. No entanto, quando aliadas as atividade antioxidantes, com as atividades anti-elastase e anti-hialuronidase que serão discutidas a seguir, percebemos que estes possuem grande potencial como agentes anti-envelhecimento.

As metaloproteinases desempenham papéis importantes numa variedade de processos biológicos e o desequilíbrio da sua atividade e expressão, muitas vezes são a base de diversas doenças. Por esta razão, eles tem sido historicamente representadas como intrigantes alvos de drogas, apesar de que sua inibição terapêutica têm levantado muitas questões, uma vez que (1) a atividade dessas enzimas é pleiotrópica de modo que sua inibição poderia modular negativamente a algumas funções celulares; e (2) um grande número de inibidores não são seletivos para uma única enzima (SBARDELA *et al*, 2012).

Este trabalho também avaliou a ação inibitória dos extratos de *C. spruceanum* sobre a elastase onde nota-se que o extrato seco por aspensão apresentou atividade levemente superior a do extrato liofilizado (Tabela 9) e estatisticamente significativa ($p < 0,05$). Alterações teciduais idade-dependentes frequentemente envolvem o aumento da atividade proteolítica e, especialmente, da atividade de elastase tipo endopeptidase. Estas enzimas são, pelo menos parcialmente responsáveis pela fragmentação idade-dependente das fibras elásticas, tanto nos grandes vasos quanto na pele (ROBERT *et al*, 2010). O inibidor alfa-1-proteinase ($\alpha 1$ PI), é um inibidor de protease que é inativado por oxidantes, e é o principal inibidor endógeno da elastase ajudando a limitar a atividade da elastase excessiva (DAELS-RAKOTOARISON *et*

al, 2003) assim, a atividade antioxidante apresentada pelos extratos seria de grande vantagem também como um agente para auxiliar na atuação desse inibidor natural de elastase impedindo sua inativação.

Os resultados encontrados mostram o potencial das cascas de *C. spruceanum* como agente anti-elastase ($CI_{50} - EHL = 55,6 \pm 0,93$; $CI_{50} - EHSa = 49,1 \pm 4,38$; e $CI_{50} - EHF = 36,9 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$) mesmo quando comparado a extratos que apresentaram atividades superiores. O extrato fluido apresentou atividade superior a dos extratos secos, sendo a do extrato seco por aspersão superior a do extrato liofilizado, mostrando que o processo de secagem interfere nessa atividade, possivelmente pela degradação dos compostos com potencial inibidor da elastase, verificando-se também maior degradação desses compostos pelo processo de liofilização.

Maity e colaboradores (2011) encontraram uma excelente atividade inibitória sobre a elastase no extrato metanólico das flores de *Tagetes erecta* Linn ($CI_{50} = 4,13 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$) superior ao padrão, ácido oleanólico, concluindo que os compostos presentes no extrato atuam em sinergia potencializando esta ação. Os compostos isolados a partir do extrato desta flor, ácido síringico e β -amirina, apresentaram baixa atividade inibitória segundo os pesquisadores ($CI_{50} = 34,29 \pm 1,71$ e $33,98 \pm 1,82 \mu\text{g/mL}$), mostrando que estes atuam em sinergia. Nema e colaboradores (2011) estudaram o potencial do suco liofilizado de *Cucumis sativus* sobre a elastase e encontraram uma excelente atividade, com CI_{50} de $6,14 \pm 1,74 \mu\text{g/mL}$, superior a do ácido oleanólico ($CI_{50} = 18,47 \pm 1,4 \mu\text{g/mL}$). Um estudo com extratos de quinze basidiomicetos realizado por Rennert e Melzing (2002), onde todos os extratos com diclorometano apresentaram inibição na concentração de $2 \mu\text{g/mL}$, nove desses extratos apresentando inibição de cerca de 90% nessa concentração. Os extratos aquosos dos basidiomicetos também apresentaram inibição da elastase. Thring *et al* (2009) estudaram a ação de vinte e um extratos sobre a elastase e encontrou no chá branco um potencial superior

ao encontrado nas cascas de *C. spruceanum*, o qual apresentou 89% de inibição da enzima na concentração de 25 µg/mL.

O ácido hialurônico e elastina são responsáveis pela organização, elasticidade e estrutura da matriz extracelular do tecido conjuntivo, a qual diminui acentuadamente durante a maturação, bem como no envelhecimento prematuro. A polimerização das fibras do tecido conjuntivo levam à perda de elasticidade da pele e a diminuição da sua capacidade de retenção da água. Nesse sentido, a busca de novos ativos cosméticos a partir de recursos naturais tem tido um grande interesse e também podem ser utilizados como ativos cosméticos para diminuição dos efeitos do envelhecimento na pele (NEMA *et al*, 2011)

Na avaliação da atividade inibitória sobre a hialuronidase nota-se que o extrato seco por aspersão assim como na atividade anti-elastase também apresentou atividade levemente superior ($CI_{50} = 17,4 \pm 1,68$ µg/mL) a do extrato liofilizado ($CI_{50} = 29,7 \pm 1,30$ µg/mL) e estatisticamente significativa ($p < 0,05$). A Atividade do extrato seco por aspersão foi superior a do padrão rutina ($CI_{50} = 27,6 \pm 0,06$ µg/mL) e a atividade do extrato liofilizado foi muito próxima a exibida pelo padrão ($p < 0,05$).

Ao compararmos a atividade dos extratos com o padrão observamos que eles possuem grande potencial para utilização como agentes anti-envelhecimento pois apresentam grande atividade inibitória sobre a elastase e a hialuronidase. Ao pesquisarmos na literatura, verificamos que outros extratos também apresentaram atividades muito boas, as vezes superiores, mas que não descartam a utilização dos extratos de *C. spruceanum* como agentes anti-hialuronidase. Um exemplo é o trabalho de Piwowarski *et al* (2011), os pesquisadores estudaram o extrato das partes aéreas de *Lythrum salicaria* L., o qual apresentou uma excelente inibição da atividade da hialuronidase com $CI_{50} = 8,1 \pm 0,8$ µg/mL em contraste com o padrão utilizado pelos autores, a heparina ($CI_{50} = 62,1 \pm 7,5$ µg/mL), um inibidor não-competitivo da enzima bem conhecido. O extrato metanólico das flores de *Tagetes erecta*

Linn apresentou excelente atividade inibitória sobre as enzimas elastase ($CI_{50} = 4,13 \pm 0,93 \mu\text{g/mL}$) e hialuronidase ($CI_{50} = 11,70 \pm 1,79 \mu\text{g/mL}$), superiores a ação do ácido oleanólico ($CI_{50} = 43,38 \pm 0,37 \mu\text{g/mL}$) e superiores a dos compostos isolados no extrato, ácido siríngico e β -amirina ($CI_{50} = 22,24 \pm 2,27$ e $29,41 \pm 2,14 \mu\text{g/mL}$), confirmando a idéia de que os compostos nos extratos atuam em sinergia aumentando a atividade sobre a enzima (MAITY *et al*, 2011). Barros (2012) estudou os extratos secos por aspersão da casca e da vagem de *Libidibia ferrea* obtendo $CI_{50} = 8,5 \pm 1,08$ e $16,0 \pm 0,5 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. O suco liofilizado de *Cucumis sativus* apresentou $CI_{50} = 20,98 \pm 1,78 \mu\text{g/mL}$ na hialuronidase enquanto que o padrão, ácido oleanólico, apresentou $CI_{50} = 41,54 \pm 1,57 \mu\text{g/mL}$ (NEMA *et al*, 2011), os resultados obtidos para o fruto *C. sativus* estão muito próximos aos obtidos em nosso trabalho.

Para conhecimento da segurança dos extratos e para possibilitar a realização do teste de atividade antioxidante celular, fez-se necessário conhecer a viabilidade dos extratos em linhagens celulares de fibroblastos murinos (NIH 3T3). Para tanto, a avaliação ocorreu apenas no período de 24 h. A avaliação da viabilidade celular em melanócitos murinos (Melan-A) foi realizada em diferentes períodos de tratamento (24, 48, 72 h) visando conhecer se os extratos apresentam algum efeito citotóxico importante nestas linhagens. Assim, pode-se obter um parâmetro de segurança de utilização desses extratos.

Para avaliação da viabilidade celular nas linhagens NIH 3T3 e Melan-A utilizou-se o método de Alamar Blue. Tal método trata-se de um ensaio prático de estudo de citotoxicidade pelo qual é possível mensurar a viabilidade celular através da redução da resazurina inicialmente azul pelas células viáveis, tornando-a rosa e mais fluorescente (NAKAYAMA *et al*, 1997).

Quanto a citotoxicidade, pode-se afirmar que em linhagens Melan-A os extratos tiveram comportamento tempo-dependente e no período máximo de exposição (72 h) também

apresentaram comportamento concentração-dependente. O extrato seco por aspersão foi levemente mais citotóxico para Melan-A do que o extrato liofilizado (Tabela 11).

Observando-se a CI_{50} dos extratos em NIH 3T3 (Tabela 12) observa-se que a concentração necessária para uma ótima atividade antioxidante celular é bastante inferior a concentração tóxica para 50% da população celular estudada. No entanto, observa-se que o extrato liofilizado é mais citotóxico para esta linhagem e que os extratos apresentam-se mais citotóxicos em NIH 3T3 do que em melanócitos.

Os extratos de *Lithospermum erythrorhizon*, *Pharbitis nulo*, *Gentiana macrophylla*, *Glycyrrhiza uralensis*, *Sophora japonica*, *Spatholobus suberectus*, *Polygonatum odoratum*, *Cannabis sativa*, *Morus alba*, *Phytolaacca acinosa*, *Citrus reticulata* e *Amornurn villosurn* foram testados por Wang e colaboradores (2006) em linhagens de melanócitos humanos e apresentaram segundo os autores, baixa citotoxicidade, apresentando uma viabilidade celular de 80% na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ em melanócitos humanos. Diante do exposto, podemos enfatizar que os extratos de *C. spruceanum* também possuem baixa citotoxicidade.

Assim como a avaliação da citotoxicidade celular pelo método do Alamar Blue, o potencial hemolítico é um outro método que pode ser utilizado para se conhecer a segurança dos extratos estudados. A avaliação do potencial hemolítico de produtos cosméticos é exigida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e encontra-se referida no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2004).

A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade (SHARMA e SHARMA, 2001). A membrana dos eritrócitos é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada através de interações com drogas (AKI e YAMAMOTO, 1991). O eritrócito humano, que é destituído de núcleo e outras organelas, não é uma célula típica. No entanto, a sua simplicidade estrutural e funcional faz com que seja um modelo conveniente

celular que é particularmente útil para estudos de toxicidade de xenobióticos (BORS *et al*, 2011)

Apesar de serem relatadas a presença de saponinas e alcalóides na espécie *C. spruceanum* (ZULETA, 1997; ZULETA *et al*, 2003) e a literatura indicar que algumas substâncias isoladas de plantas como polifenóis, epicatequinas, glicosídeos estéril, saponinas triterpenenóides e outros podem causar alterações na membrana de células vermelhas e produzir hemólise (BADER *et al*, 1996; GRINBERG *et al*, 1997; ZHANG *et al*, 1997), não foi observado efeito hemolítico dos extratos até na concentração de 1 mg/mL, os quais apresentaram hemólise apenas na maior concentração testada (2 mg/mL).

As hemólises apresentadas pelos extratos secos, liofilizado e seco por aspersão, e pelo produto comercializado foram muito baixas na concentração de 2 mg/mL ($15,6 \pm 1,06$; $11,2 \pm 1,69$ e $14,3 \pm 2,75\%$, respectivamente) e são estatisticamente semelhantes, indicando que são seguros para a utilização nessas concentrações, sugerindo que os compostos com poder hemolítico que estão presentes nestes extratos não foram capazes de causar danos às membranas celulares.

A hemólise apresentada pela formulação-base ($74,6 \pm 2,40\%$) é estatisticamente semelhante ($p > 0,05$) a hemólise apresentada pelo creme com extrato seco por aspersão de *C. spruceanum* ($86,6 \pm 1,82\%$), o que nos leva a crer que a hemólise detectada refere-se a formulação-base e não ao extrato seco por aspersão, sugerindo que este não apresentou compostos hemolíticos ativos mas também não estava dotado de substâncias anti-hemolíticas para reversão do efeito apresentado pela formulação-base.

A formulação creme com extrato fluido apresentou menor potencial hemolítico ($66,7 \pm 3,33\%$) que a formulação-base e, a formulação com extrato liofilizado não apresentou atividade hemolítica. A hemólise apresentada pela formulação-base pode ter sido devido a compostos com potencial hemolítico, no entanto, não foram encontrados relatos desse

potencial para os seus componentes. A atividade apresentada pelo extrato liofilizado e a diminuição da hemólise apresentada no creme com extrato fluido podem ter sido alcançadas devido a presença de flavonóides no extrato. Os extratos de *C. spruceanum* apresentaram uma boa porcentagem de fenóis totais dentre os quais encontram-se os flavonóides. A atividade encontrada no teste anti-tirosinase quando comparada com a obtida nesse ensaio nos leva a crer que a porcentagem de fenóis do extrato liofilizado concentra em sua maioria flavonóides, afinal, tais substâncias são relatadas como inibidoras da tirosinase e antioxidantes e esse extrato apresentou atividade superior ao extrato seco por aspersão na inibição da tirosinase. O efeito anti-hemolítico de flavonóides já foi demonstrado *in vitro*, e o papel de proteção desempenhado por esses compostos contra a hemólise oxidativa hipotônica parece depender da sua incorporação nas membranas dos glóbulos vermelhos por ligações seletivas com lipídios e proteínas de membrana (TULIPANI *et al*, 2011).

O produto comercial também não apresentou atividade hemolítica e isso pode ter ocorrido a diversos fatores, entre eles, adjuvantes farmacêuticos que não apresentam potencial hemolítico e maior teor de flavonóides nessa formulação conferido proteção contra a hemólise, isso porque tal formulação não é composta apenas por extrato de *C. spruceanum*, apresentando por exemplo extratos de algas marinhas e de óleo de germe de trigo.

Os eritrócitos são considerados como alvos principais para ataque de radicais livres, devido à presença na membrana de concentrações elevadas de ácidos graxos polinsaturados e ao seu papel específico como transportadores de oxigênio (SANTOS *et al*, 2011). Nesse sentido, alguns estudos buscam avaliar a inibição da hemólise oxidativa *in vitro*. Assim, os polifenóis, que estão presentes nestes extratos, segundo Santos e colaboradores (2011) são compostos antioxidantes que podem contribuir para sua atividade anti-hemolítica.

Aki e Yamamoto (1991) observaram que drogas hidrossolúveis podem causar hemólise através da ligação da droga à membrana das hemácias, as quais, após terem seus

sítios de ligação saturados, se rompem. Já fármacos com baixa solubilidade em água podem causar a hemólise por intercalação aos fosfolípídeos de membrana. Esta intercalação induz mudanças de permeabilidade ou até mesmo fragmentação da membrana eritrocitária, ocasionando lise osmótica (PRETÉ *et al*, 2011; APARÍCIO *et al*, 2005).

7 CONCLUSÕES

- O processo de secagem, seja liofilização ou *spray dryer*, não influenciou o teor de fenóis totais e a atividade anti-colagenase do extrato hidroetanólico das cascas de *C. spruceanum*;
- A atividade antioxidante do extrato seco por liofilização foi ligeiramente superior a do extrato seco por aspersão tanto pelo método do DPPH quanto pelo ensaio de atividade antioxidante celular;
- A atividade antioxidante das formulações contendo extratos secos foram equivalentes e superiores as atividades das formulações contendo extrato fluido. A formulação contendo extrato fluido preparada neste estudo teve atividade antioxidante superior ao produto comercial;
- A capacidade quelante de ferro apenas pode ser observada no extrato fluido da casca de *C. spruceanum*, observando-se também que ao incorporar os extratos na formulação-base essa atividade é perdida;
- O extrato seco por liofilização apresentou melhor inibição da tirosinase que o extrato seco por aspersão;
- A formulação contendo extrato seco por liofilização apresentou melhor inibição da tirosinase que o extrato seco por aspersão. As formulações contendo extratos fluidos não apresentaram atividade satisfatória sobre essa enzima;
- O extrato seco por aspersão apresentou atividades de inibição das enzimas elatase e hialuronidase ligeiramente superiores às apresentadas pelo extrato seco por liofilização;
- O extrato seco liofilizado foi ligeiramente mais citotóxico em células NIH 3T3, enquanto o extrato seco por aspersão foi ligeiramente mais citotóxico em células Melan-A. Ambos os extratos apresentaram-se mais citotóxicos em NIH 3T3;

- Os extratos não foram capazes de causar hemólise importante na maior concentração estudada, sendo seguros para uso. No entanto, a formulação-base possui componentes com potencial hemolítico e precisa ser revista;
- A formulação contendo extrato liofilizado e o produto comercial não apresentaram atividade hemolítica e a formulação contendo extrato fluido apresentou diminuição da atividade hemolítica quando comparada a apresentada pela formulação-base o que pode ser atribuído a um efeito protetor exercido por flavonóides que provavelmente encontram-se em concentração satisfatória neste extrato.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADILA, M. D.; KAISER, P.; SATTI, N. K.; ZARGAR, A. M.; VISHWAKARMA, R. A.; TASDUQ, S. A. Effect of *Embllica officinalis* (fruit) against UVB-induced photo-aging in human skin fibroblasts. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, p. 109–114, 2010.

AGAR, N.; YOUNG, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research*, v. 571, p. 121–132, 2005.

AKI, H.; YAMAMOTO, M. Drug binding to human erythrocytes in the process of ionic drug-induced hemolysis. Flow microcalorimetric approaches. *Biochemical Pharmacology*, v. 41, 1991.

ALAM, N.; YOON, K. N.; LEE, J. S.; CHO, H. J.; LEE, T. S. Consequence of the antioxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of various extracts from the fruiting bodies of *Pleurotus ferulae*. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 19, p. 111–118, 2012.

ALLERHAND, M.; OOI, E. T.; STARR, R. J.; ALCORN, M.; PENKE, L.; DROST, E.; MACNEE, W.; DEARY, I. J.; STARR, J. M. Skin ageing and oxidative stress in a narrow-age cohort of older adults. *European Geriatric Medicine*, v. 2, p. 140–144, 2011.

ALVARENGA, F. C. R.; GARCIA, E. F.; BASTOS, E. M. A. F.; GRANDI, T. S. M.; DUARTE, M. G. R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, p. 442-448, 2009.

ANGERHOFER, C. K.; MAES, D.; GIACOMONI, P. U. Chapter 10 – The Use of Natural Compounds and Botanicals in the Development of Anti-Aging Skin Care Products. *Skin Aging Handbook — An Integrated Approach to Biochemistry and Product Development*, p. 205–263, 2009.

ANILKUMAR, T.V.; MUHAMED, J.; JOSE, A.; JYOTHI, A.; MOHANAN, P.V.; KRISHNAN, L. K. Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of acute wound. *Biologicals*, v. 39, p. 81-88, 2011.

APARÍCIO, R. M., GARCÍA-CELMA, M. J.; VINARDELL, M. P.; MITJANS, M. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 39, n. 5, p. 1063-1067, 2005.

ARAÚJO, T. S; SOUZA, S. O. Protetores solares e os efeitos da radiação ultravioleta. *Scientia Plena 4*. v. 4, n. 11, 2008.

ATMANI, D.; CHAHER, N.; BERBOUCHA, M.; AYOUNI, K.; LOUNIS, H.; BOUDAUD, H.; DEBBACHE, N.; ATMANI, D. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. *Food Chemistry*, Barking, v. 112, p. 303-309, 2009.

BADER, G., PLOHMANN, B., HILLER, K. & FRANZ, G. Cytotoxicity of triterpenoid saponins. Part 1: Activities against tumor cells in vitro and hemolytical index. *Pharmazie*, v. 51, p. 414-417, 1996.

BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C. B.; AMORIM, L. L. S. S.; DE PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 2, p. 211–215, 2006.

BARROS, A. O. **Avaliação das atividades antioxidante e inibitória sobre as enzimas elastase, colagenase e hialuronidase da *Libidibia ferrea* MART.** 2012. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Am.

BATISTUZZO, J.A.O; ETO, Y.; ITAYA, M. *Formulário Médico Farmacêutico*. 4ª Ed. Editora Pharmabooks. São Paulo-SP, 2011.

BAUMANN, L. Ciência Básica da Epiderme. In: _____. *Dermatologia cosmética - Princípios e prática*. 1. ed. TIJUCA: Ed Livraria e Ed Revinter Ltda, 2004.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, Q.T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 82, p. 155–158, 2002.

BEYLOT, C. What's new in aesthetic dermatology: leers and lasers treatments Quoi de neuf en dermatologie esthétique: comblement et lasers. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 136, p. 152-159, 2009.

BLASA, M.; ANGELINO, D.; GENNARI, L.; NINFALI, P. The cellular antioxidant activity in red blood cells (CAA-RBC): A new approach to bioavailability and synergy of phytochemicals and botanical extracts. *Food Chemistry*, v. 125, p. 685–691, 2011.

BORA, K.; MIGUEL, O. G.; ANDRADE, C. A.; OLIVEIRA, A. O. T. Determinação da concentração de polifenóis e do potencial antioxidante das diferentes frações do extrato de folhas de *Dicksonia sellowiana*, (Presl.) Hook, Dickson Iaceae. *Visão Acadêmica*, v. 6, n. 2, p. 6-15, 2005.

BORS, M.; BUKOWSKA, B.; PILARSKI, R.; GULEWICZ, K.; OSZMIAŃSKI, J.; MICHAŁOWICZ, J.; KOTER-MICHALAK, M.; Protective activity of the *Uncaria tomentosa* extracts on human erythrocytes in oxidative stress induced by 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) and catechol. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 2202–2211, 2011.

BRACA, A.; SORTINO, C.; POLITI, M.; MORELLI, I.; MENDEZ, J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *J Ethnopharmacol*, v. 79, n.3, p.379-81, 2002.

BRASIL. *Farmacopéia Brasileira*. 5ª Ed. v. 1, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

BRASIL. *Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos*. v. 1. Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2004.

BUBNOVICH, V.; REYES, A.; QUIJADA, E.; MAHN, A. Numerical simulation of lyophilization of carrot slices at atmospheric pressure in a fluidized bed. *Journal of Food Engineering*, v. 109, p. 659–667, 2012.

CANTARELLI, B.; DUCA, L.; BLANCHEVOYE, C.; POITEVIN, S.; MARTINY, L.; DEBELLE, L. Elastin peptides antagonize ceramide-induced apoptosis. *FEBS Letters*, v. 583, p. 2385-2391, 2009.

CHAJARA, A.; DELPECH, B.; COUREL, M-N.; LEROY, M.; BASUYAU, J-P.; LÈVESQUE, H. Effect of aging on neointima formation and hyaluronan, hyaluronidase and hyaluronectin production in injured rot aorta. *Atherosclerosis*. v. 138, p. 53-64, 1998.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, L.F.; LIANTO, F.S.; WONG, S.K.; LIM, K.K.; JOE, C.E.; LIM, T.Y. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, v.109, p. 477–483, 2008.

CHAN, Y.Y.; KIM, K.H.; CHEAH, S.H. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1183–1188, 2011.

CHANG, T. S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CHEN, C-L.; LIOU, S-F.; CHEN, S-J.; SHIH, M-F. Protective effects of *Chlorella*-derived peptide on UVB-induced production of MMP-1 and degradation of procollagen genes in human skin fibroblasts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 60, p. 112-119, 2011.

- CHEN, C-Y.; KUO, P-L.; CHEN, Y-H.; HUANG, J-C.; HOF, M-L.; LIN, R-J.; CHANG, J-S.; WANG, H-M. Tyrosinase inhibition, free radical scavenging, antimicroorganism and anticancer proliferation activities of *Sapindus mukorossi* extracts. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, v. 41, p. 129–135, 2010.
- CHIANG, H-M.; LIN, T-J.; CHIU, C-Y.; CHANG, C-W.; HSU, K-C.; FAN, P-C.; WEN, K-C. *Coffea arabica* extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 309-318, 2011.
- CHIARI, M.E.; JORAY, M.B.; RUIZ, G.; PALACIOS, S.M.; CARPINEILA, M.C.; Tyrosinase inhibitors from native and naturalized plants from central Argentina Isolation of active principle from *Lithraea molleoides*. *Food Chem.* v. 120, p. 10-14, 2010.
- CHONDROGIANNI, N.; KAPETA, S.; CHINOI, I.; VASSILATOU, K.; PAPASSIDERI, I.; GONOS, E. S. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. *Experimental Gerontology*, v. 45, p. 763–771, 2010.
- CHU, Y-F.; CHEN, Y.; BLACK, R. M.; BROWN, P. H.; LYLE, B. J.; LIU, R. H.; OU, B. Type 2 diabetes-related bioactivities of coffee: Assessment of antioxidant activity, NF- κ B inhibition, and stimulation of glucose uptake. *Food Chemistry*, v. 124, p. 914–920, 2011.
- CHUNG, I-M.; SEO, S-H.; AHN, J-K.; KIM, S-H. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. *Food Chemistry*, v. 127, p. 960–967, 2011.
- COSTA, A.; MOISÉS, T. B.; CORDERO, T.; ALVES, C. R. T.; MARMIRORI, J. Associação de emblica, licorice e belides como alternativa à hidroquinona no tratamento clínico do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 85, n. 5, p. 613-620, 2010.
- COSTA, L. M.; SANTOS, V. A.; OHANA, D. T.; LIMA, E. S.; PEREIRA, M. M., SOUZA, T. P. Technological development of aqueous extracts from *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) using factorial design. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v. 21, n. 1, p. 181-186, 2011.
- COSTA, L.M.; PEREIRA, M.M.; SANTOS, V.A.; OHANA, D.; LIMA, E. S. Estudo Farmacognóstico e de Atividade biológica da espécie vegetal *Calycophyllum spruceanum* Benth. In: VI Simpósio de Farmacognosia, 2007, Belém. *Jornal Brasileiro de Fitomedicina*, v. 5. p. 70-70, 2007.
- COSTIN, G-E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. v. 21, p. 976-994, 2007.

COUTO, R. O.; CONCEIÇÃO, E. C.; CHAUL, L. T.; OLIVEIRA, E. M. S.; MARTINS, F. S.; BARA, M. T. F.; REZENDE, K. R.; ALVES, S. F.; PAULA, J. R. Spray-dried rosemary extracts: Physicochemical and antioxidant properties. *Food Chemistry*, v. 131, p. 99–105, 2012.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. *Columbia University Press*. New York, 1981.

DAELS-RAKOTOARISON, D. A.; KOUAKOU, G.; GRESSIER, B.; DINE, T.; BRUNET, C.; LUYCKX, M.; BAILLEUL, F.; TROTIN F. Effects of a caffeine-free *Cola nitida* nuts extract on elastase/alpha-1-proteinase inhibitor balance Original Research Article. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 143-150, 2003.

DASGUPTA, J.; KARA, S.; REMMEN, H. V.; J. MELENDEZ, A. Age-dependent increases in interstitial collagenase and MAP Kinase levels are exacerbated by superoxide dismutase deficiencies. *Experimental Gerontology*, v. 44, p. 503–510, 2009.

EBRAHIMZADEH, M. A.; POUMORAD, F.; BEKHRADNIA, A. R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 3188-3192, 2008.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1139–1147, 2011.

FONSECA, P.; LIBRANDI, A. P. L. Avaliação das características físico-químicas e fitoquímicas de diferentes tinturas de barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 44, n. 2, 2008.

FONSECA, Y. M.; CATINIA, C. D.; VICENTINI, F. T. M. C.; NOMIZO, A.; GERLACH, R. F.; FONSECA, M. J. V. Protective effect of *Calendula officinalis* extract against UVB-induced oxidative stress in skin: Evaluation of reduced glutathione levels and matrix metalloproteinase secretion. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 127, p. 596–601, 2010.

GARCÍA, C.GARCÍA. Lesiones de La pigmentación cutánea. *Medicine*, v. 48; p. 3195-3203, 2010.

GAUTHIER, Y. Mélasma: prise en charge globale, Melasma: clinical and therapeutic management. *Dermatologie Cosmétique*. v.1, p. 113–122, 2004.

GEORGETTI, S.R.; CASAGRANDE, R., DE SOUZA, C.R.F.; DE OLIVEIRA, W.P.; FONSECA, M.J.V. Spray drying of the soybean extract: effects on chemical properties and antioxidant activity. *Food Sci Technol*. v. 41, p. 1521-1527, 2008.

GONÇALVES, A. E. S. S. **Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C.** 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos). Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. *varia* (Lowe ex DC.) R.Fern., an endemic species of Macaronesia region. *Industrial Crops and Products*, v. 42, p. 573–582, 2013.

GRIMES, P. E. Management of hiperpigmentation in darker racial groups. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, v. 28, p. 77-85, 2009.

GRINBERG, L.N., NEWMARK, H., KITROSSKY, N., RAHAMIM, E., CHEVION, M. & RACHMILEWITZ, E.A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 54, p. 973 - 978, 1997.

GROEBER, F.; HOLEITER, M.; HAMPEL, M.; HINDERER, S.; SCHENKE-LAYLAND, K. Skin tissue engineering—In vivo and in vitro applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*. v. 63(4), p. 352–366, 2011.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora UFRGS. 1999.

HARBOURNE, N.; MARETE, E.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, D. Effect of drying methods on the phenolic constituents of meadowsweet (*Filipendula ulmaria*) and willow (*Salix alba*). *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1468–1473, 2009.

HEARING, V. J. Jr. Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): Purification, properties, and reactions catalyzed. In S. Kaufman (Ed.). *Methods in enzymology*. v. 142, p. 154–165, 1987.

HEINZ, A.; JUNG, M. C.; JAHREIS, G.; RUSCIANI, A.; DUCA, L.; DEBELLE, L.; WEISS, A. S.; NEUBERT, R. H. H.; SCHMELZE, C. E. H. The action of neutrophil serine proteases on elastin and its precursor. *Biochimie*, v. 94, p. 192-202, 2012.

HEO, S-J.; KO, S-C.; KANG, S-M.; CHA, S-H.; LEE, S-H.; KANG, D-H. K.; JUNG, W-K.; AFFAN, A.; OHA, C.; JEON, Y-J. Inhibitory effect of diphlorethohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food and Chemical Toxicology*, 2010.

HEO, S-J.; KO, S-C; CHA, S-H.; KANG, D-H.; PARK, H-S.; CHOI, Y-U.; KIM, D.; JUNG, W-K.; JEON, Y-J. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 1123–1130, 2009.

HERRLING, T.; JUNG, K. J.; FUCHS, J. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair Spectrochimica. *Acta Part*, v. 69, p. 1429–1435, 2008.

HIEBERT, P. R.; BOIVIN, W. A.; ABRAHAM, T.; PAZOOKI, S.; ZHAO, H; GRANVILLE, D. J. Granzyme B contributes to extracellular matrix remodeling and skin aging in apolipoprotein E knockout mice. *Experimental Gerontology*, v, 46, p. 489-499, 2011.

HSU, C-K.; CHANG, C-T.; LUB, H-Y.; CHUNG, Y-C. Inhibitory effects of the water extracts of *Lavendula* sp. on mushroom tyrosinase activity. *Food Chemistry*, v. 105, p. 1099–1105, 2007.

HSU, M-F.; CHIANG, B-H. Stimulating effects of *Bacillus subtilis* natto-fermented *Radix astragali* on hyaluronic acid production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 474-481, 2009.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemistry of Mixed Melanogenesis — Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, v.84, p. 582–592, 2008.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 123, p. 801–810, 2002.

KAISEROVÁ, H.; ŠIMŮNEK, T.; VAN DER VIJGH, W. J. F.; BAST, A.; KVASNIČKOVÁ, E. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1772, p. 1065-1074, 2007.

KANG, H. Y.; ORTONNI, J.P. Melasma Update. *Actas Dermosifiliography*, v.100:Supl. 2, p. 10100-03, 2009.

KAPOOR, V. K.; DUREJA, J.; CHADHA R. Synthetic drugs with anti-ageing effects. *Drug Discovery Today*, v. 14, p. 899-904, 2009.

KASPER, J. C.; FRIESS, W. The freezing step in lyophilization: Physico-chemical fundamentals, freezing methods and consequences on process performance and quality attributes of biopharmaceuticals. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 78, p. 248–263, 2011.

KEDE, M. P. V.; SABATOVICH, O. **Dermatologia estética**. São Paulo: Atheneu; 2004. 771p.

KHA, T. C.; NGUYEN, M. H.; ROACH, P. D. Effects of spray drying conditions on the physicochemical and antioxidant properties of the Gac (*Momordica cochinchinensis*) fruit aril powder. *Journal of Food Engineering*, v. 98, p. 385–392, 2010.

KHAVKIN, J.; ELLIS, D. A. F. Aging Skin: Histology, Physiology, and Pathology Review Article. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 19, p. 229-234, 2011.

KIM, J.-K.; NOH, J.H.; LEE, S.; CHOI, J.S.; SUH, H.; CHUNG, H.Y., SONG, Y.-O. and CHOI, W.C. The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5- ihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, Bull. *Korean Chemical Society*, v. 23, n.5, 661-662, 2002.

KIM, M-S.; KIM, Y. K.; CHO, K. H.; CHUNG, J. H. Regulation of type I procollagen and MMP-1 expression after single or repeated exposure to infrared radiation in human skin. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 127, p. 875-882, 2006.

KIM, Y.J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 1707–1723, 2005.

KOYAMA, K. K.; HIRASAWA, Y.; HOSOYA, T.; HOE, T. C.; CHAN, K-L.; MORITA, H. Alpnemines A–H, new anti-melanogenic indole alkaloids from *Alstonia pneumatophora*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 18, p. 4415–4421, 2010.

KRIZKOVA, S.; ZITKA, O.; ADAM, V.; KIZEK, R.; MASARIK, M.; STIBOROVA, M.; ECKSCHLAGER, T.; CHAVIS, G. J. Assays for determination of matrix metalloproteinases and their activity. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, p. 1819–1832, 2011.

KYI, T. M.; DAUD, W. R. W.; MOHAMMAD, A. B.; SAMSUDIN, M. W.; KADHUM, A. A. H.; TALIB, M. Z. M. The kinetics of polyphenol degradation during the drying of Malaysian cocoa beans. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 40, n. 3, p. 323-331, 2005.

LEE, Y. M.; KANG, S. M.; CHUNG, J. H. The role of TRPV1 channel in aged human skin. *Journal of Dermatological Science*, v. 65, p. 81-85, 2012.

LEITE, S. R. A. Inhibitors of human collagenase, MMP1. *Eclética química*, v. 34, 2009.

LIN, L.; LEI, F.; SUN, D-W.; DONG, Y.; YANG, B.; ZHAO, M. Thermal inactivation kinetics of *Rabdosia serra* (Maxim.) Hara leaf peroxidase and polyphenol oxidase and comparative evaluation of drying methods on leaf phenolic profile and bioactivities. *Food Chemistry*, v. 134, p. 2021–2029, 2012.

LIN, Y-S.; CHEN, S-H.; HUANG, W-J.; CHENE, C-H.; CHIENE, M-Y.; LIN, S-Y.; HOU, W-C. Effects of nicotinic acid derivatives on tyrosinase inhibitory and antioxidant activities. *Food Chemistry*, v. 132, p. 2074–2080, 2012.

LINO, T. S. S; LIMA, E. S.; PEREIRA, M. M.; VASCONCELLOS, M. C. Efeito antioxidante e fotoprotetor de extratos aquosos e etanólicos da casca do *Calycophyllum spruceanum*. In: 61a Reuniao Anual da SPBC, 2009, Manaus. *Anais da 61a Reuniao Anual da SPBC*, 2009. v. 1. p. 40-40.

LIU, X.; CUI, C.; ZHAO, M.; WANG, J.; LUO, W.; YANG, B.; JIANG, Y. Identification of phenolics in the fruit of emblica (*Phyllanthus emblica* L.) and their antioxidant activities. *Food Chemistry*, Barking, v. 109, p. 909-915, 2008.

LOBÃO, A. Hiper e Hipopigmentação Pós-inflamatória. In: KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVICH, Oleg. *Dermatologia Estética*. 1. ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2004.

LOCATELLI, M.; GINDRO, R.; TRAVAGLIA, F.; COÏSSON, J-D.; RINALDI, M.; ARLORIO, M. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, v. 114, p. 889–897, 2009.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Revista brasileira de farmacognosia*, v.17, 2007.

LONGO, C.; CASARI, A.; BERETTI, F.; CESINARO, A. M.; PELLACANI, G. Skin aging: in vivo microscopic assessment of epidermal and dermal changes by means of confocal microscopy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, In Press, 2011.

LOSSO, J. N.; MUNENE, C. N.; BANSODE, R. R.; BAWADI, H. A. Inhibition of matrix metalloproteinase-1 activity by the soybean Bowman–Birk inhibitor. *Biotechnology Letters*, v. 26, p. 901–905, 2004.

LU, Y.; FOOD, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chemistry*, v.75, p.197-202, 2001.

MACRINI, D. J.; SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N.; OHARA, M. T.; Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an *in vitro* evaluation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 45, n. 2, p. 715-721, 2009.

MADHAN, B.; KRISHNAMOORTHY, G.; RAGHAVA RAO, J.; NAIR, B. U. Role of green tea polyphenols in the inhibition of collagenolytic activity by collagenase. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 41, p. 16–22, 2007.

MAITY, N.; NEMA, N. K.; ABEDY, K.; SARKAR, B. K.; MUKHERJEE, P. K. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1300–1305, 2011.

MAKRANTONAKI, E.; SCHÖNKNECHT, P.; HOSSINI, A. M.; KAISER, E.; KATSOULI, M.-M.; ADJAYE, J.; SCHRÖDER, J.; ZOUBOULIS, C. C. Skin and brain age together: The role of hormones in the ageing process. *Experimental Gerontology*, v. 45, p. 801-813, 2010.

MALPEZZI, E. L. L.A.; FREITAS, J. C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA H.. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*, v. 31 n.7 p. 853-864, 1993.

MALPEZZI, E.L.; DE FREITAS, J.C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA, H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*. v. 31(7), p. 853-64, 1993.

MANDELBAUM, S.H.; DI SANTIS, E.P.; MANDELBAUM, M.H.S. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares - Parte I. *An bras Dermatol*, v. 78, n. 4, p. 393-410, 2003.

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.

MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora UFRGS. 1999.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; DA SILVA, M. G.; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 6, p. 623-635, 2009.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, v. 130, p. 1036–1043, 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín J. Sci. Technol.* v. 26, p. 211–219, 2004.

MOMTAZ, S.; MAPUNYA, B. M.; HOUGHTON, P.J.; EDGERLY, C.; HUSSEIN A.; NAIDOO, S.; LALL, N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, 2008.

NAKAYAMA, K.; NOMOTO, A.M.; NISHIJIMA, M.; MARUYAMA, T. Morphological and functional characterization of hemocytes in the giant clam *Tridacna crocea*. *J. Invertebr. Pathol.*, v. 69, p. 105-111, 1997.

NAYLOR, E. C.; WATSON, R. E. B.; SHERRATT, M. J. Molecular aspects of skin ageing. *Maturitas*, v. 69, p. 249–256, 2011.

NEMA, N. K.; MAITY, N.; SARKAR, B.; MUKHERJEE, P. K. *Cucumis sativus* fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. *Archives of Dermatological Research*, v. 303, p. 247–252, 2011.

NICOLETTI, M. A.; ORSINE, E. M. A.; DUARTE, A. C. N.; BUONO, G. A. Hiper Cromias: Aspectos Gerais e Uso de Despigmmentantes Cutâneos. *Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)*. v.4, p. 46-51, 2002.

NOIPA, T.; SRIJARANAI, S.; TUNTULANI, T.; NGEONTAE, W. New approach for evaluation of the antioxidant capacity based on scavenging DPPH free radical in micelle systems. *Food Research International*, v. 44, p. 798–806, 2011.

OH, J-H.; KIM, Y. K.; JUNG, J-Y.; SHIN, J-E.; KIM, K. H.; CHO, K. H.; EUN, H. C.; CHUNG, J. H. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *Journal of Dermatological Science*, v. 62, p.192-201, 2011.

OLIVEIRA, A. Z. M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com ácido hialurônico**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Farmacêutica), Programa de Pós-graduação em Tecnologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto.

OLIVEIRA, I.; SOUSA, A.; FERREIRA, I. C. F. R.; BENTO, A.; ESTEVINHO, L.; PEREIRA, J. A. Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 2326–2331, 2008.

OLIVEIRA, N. S. M. **Avaliação da atividade antioxidante e efeito sobre a melanogênese de extratos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus – Am.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia / Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.

ORTONNE, JP.; PASSERON, T. Melanin Pigmentary Disorders: Treatment Update. *Dermatologic Clinics*, v. 23, p. 209 – 226, 2005.

PANDYA, A. G.; GUEVARA, I. L. Disorders of hyperpigmentation. *Dermatologic Clinics*, v. 18, p. 91-98, 2000.

PANICH, U. Antioxidant Defense and UV-Induced Melanogenesis: Implications for Melanoma Prevention. In: CAO, M. Y. (Ed.). *Current Management of Malignant Melanoma*, InTech, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-management-of-malignant-melanoma/antioxidant-defense-and-uv-induced-melanogenesis-implications-for-melanoma-prevention>>. Acesso em: 25 mar 12

PARK, H.Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 1493 – 1506, 2009.

PASSERON, T.; BALLOTI, R.; ORTONNI, J-P. Mélanogènese Melanogenesis. *EMC-Dermatologie Cosmétologie*. v. 2, p. 204–216, 2005.

PERES, P.S.; TERRA, V.A.; GUARNIER, F.A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 103, p. 93-97, 2011.

PÉREZ-SERRADILLA, J. A.; LUQUE DE CASTRO, M.D. Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from wine lees and spray-drying of the extract. *Food Chemistry*, v. 124, p. 1652–1659, 2011.

PIWOWARSKI, J. P.; KISS, A. K.; KOZŁOWSKA-WOJCIECHOWSK, M. Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 937–941, 2011

POWELL, J. Skin Physiology. *Whomen's Health Medicine*. v. 3, p. 130-133, 2006.

PRADO, A. **Composição fenólica e atividade antioxidante de frutas tropicais**. 2009. 106 p. II. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, Piracicaba – SP.

PRETÉ, P. S. C., DOMINGUES, C. C.; MEIRELLES, N. C. ; MALHEIROS, S. V. P. ; GOÑI, F. M.; PAULA, E.; SCHREIER, S. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction – A spin label study. *Biochemica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1808, n. 1, p. 164-170, 2011.

QUINN, A. Biology of the skin and dermatological disease. *Medicine Basic Science*, v. 32, n. 12, p. 1-3, 2004.

RANGEL, V. L. B. I.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Acido glicólico: agente despigmentante e rejuvenescedor. *Revista de Ciências Farmacêuticas*, v. 21, p. 11-22, 2000.

RAUT, S.; BHADORIYA, S. S.; UPLANCHIWAR, V.; MISHRA, V.; GAHANE, A.; JAIN, S. K. Lecithin organogel: A unique micellar system for the delivery of bioactive agents in the treatment of skin aging. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 2, p. 8–15, 2012.

RAWLINGS, A.V.; MATTS, P.J.; ANDERSON, C.D; ROBERTS. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. v. 5, n. 2, p. 127-136, 2008.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J.L.; LELOIR, L.F. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. *J. Biol. Chem.* v. 217, p. 959-966, 1955.

RENNERT, B.; MELZIG, M. F. Screening of Selected Basidiomycetes for Inhibitory Activity on *Clostridium histolyticum* Collagenase and Human Leukocyte Elastase. *Phytotherapy Research*, v. 16, p. 81–83, 2002.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** SEBRAE/AM. 1. ed. Programa de Desenvolvimento Empresarial e Tecnológico, Manaus. 405p. 2000.

RICCIARELLI, R.; MARONI, P.; ÖZER, N.; ZINGG, J-M.; AZZI, J-M. Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by α -tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 27, p. 729–737, 1999.

ROBERT, L.; LABAT-ROBERT, J.; ROBERT, A.-M. Physiology of Skin Aging. *Clinics in Plastic Surgery*, v. 39, p. 1–8, 2012.

ROBERT, L.; MOLINARI, J.; RAVELOJAONA, V.; ANDRÈS, E.; ROBERTA, A. M. Age- and passage-dependent upregulation of fibroblast elastase-type endopeptidase activity. Role of advanced glycation endproducts, inhibition by fucose- and rhamnase-rich oligosaccharides. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 50, p. 327–331, 2010.

ROBERT, L.; ROBERT, A.-M.; RENARD, G. Biological effects of hyaluronan in connective tissues, eye, skin, venous wall. Role in aging. *Pathologie Biologie*, Volume 58, Issue 3, June 2010, Pages 187-198

ROCHA, A. P. T.; CABRAL, S. B.; SILVA, O. S.; ALSINA, O. L. S. Estudo da friabilidade de grânulos de quebra-pedra recobertos em leito de jorro. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 5, p.88-95, 2010.

ROESLER, R. *et al.* Atividade Antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 27, p. 53-60, 2007.

ROJAS, D. F. C. **Extratos secos padronizados de *Bidens pilosa* L.: Desenvolvimento tecnológico e avaliação da atividade biológica.** 2011. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

ROSE, Paul T. Pigmentary disorders. *Medical Clinics of North America*. v. 93, p. 1225-1239, 2009.

ROULIN, A.; DUCREST, A-L. Association between melanism, physiology and behaviour: A role for the melanocortin system. *European Journal of Pharmacology*, v. 660, no.1, p.226(8), 2011.

ROY, M. K.; JUNEJA, L. R.; ISOBE, S.; TSUSHIDA, T. Steam processed broccoli (*Brassica oleracea*) has higher antioxidant activity in chemical and cellular assay systems. *Food Chemistry*, v. 114, p. 263–269, 2009.

RÓZANOWSKA, M. R.; SARNA, T.; LAND, E. J. ; TRUSCOTT, T. G. Free Radical Scavenging Properties of melnin interaction of Eu-melanin and pheo-melanin models with reducing and oxidizing radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 5/6, p. 518–525, 1999.

RUMBAOA, R. G. O.; CORNAGO, D. F.; GERONIMO, I. M. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry*, Barking, v. 113, p. 1133-1138, 2009.

SABATOVICH, O. *Dermatologia Estética*. 1. ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2004.

SANTOS, R. P.; MENDES, L. S.; SILVA, B. M.; PINHO, P. G.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; PEREIRA, J. A.; CARVALHO, M. Phytochemical profiles and inhibitory effect on free radical-induced human erythrocyte damage of *Dracaena draco* leaf: A potential novel antioxidant agent. *Food Chemistry*, v. 124, p. 927–934, 2011.

SARANGARAJAN, R.; APTE, S. P. The polymerization of melanin: a poorly understood phenomenon with egregious biological implications. *Melanoma Research*, v. 16, n. 1, p. 3-10, 2006.

SARDINHA, T. C.; NOGUERAS, J. J.; XIONG, H.; WEISS, E. G.; WEXNER, S. D.; ABRAMSON, S. Membrane-Type 1 matrix metalloproteinase mRNA expression in colorectal cancer. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 43, p. 389-395, 2000.

SBARDELLA, D.; FASCIGLIONE, G. F.; GIOIA, M.; CIACCIO, C.; TUNDO, G. R.; MARINI, S.; COLETTA, M. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, p. 119–208, 2012.

SCHALLREUTER, K. U.; KOTHARI, S.; CHAVAN, B.; SPENCER, J. D. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 395-404, 2007.

SCHMIDT, J. M. S. Lentiginosis mucocutáneas. *La Piel en el Contexto de la Medicina y sus Especialidades*. v. 23, n. 7, p. 356-366, 2008.

SCHWAGER, J. *et al.* Challenges in discovering bioactives for the food industry. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 19, p. 66-72, 2008.

SHAHEEN, F.; AHMAD, M.; KHAN, M. T.H.; JALIL, S.; EJAZ, A.; SULTANKHODJAEV, M. N.; ARFAN, M.; CHOUDHARY, M. I.; ATTA-UR-RAHMAN. Alkaloids of *Aconitum laeve* and their anti-inflammatory, antioxidant and tyrosinase inhibition activities. *Phytochemistry*, v. 66, p. 935–940, 2005.

SHARMA, O. P.; BHAT, T. K. DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, Barking, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SHARMA, P.; SHARMA, J. D. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SILVEIRA, J.E.P.S. *Avaliação dos defeitos in vitro de espécies vegetais como potenciais ativos despigmentantes*. São Paulo: UNESP, 2007. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências 2007.

SIMON, J. D.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Research*, v. 22, p. 563–579, 2009.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J.A.Jr. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Amer. J. Enol. Viticult.* v. 16, p. 144-158, 1965.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Bio Techniques*, v 38, p 73-83, 2005.

SOUSA, F. C. F; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; CAVALCANTE, F. H. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy.* v. 18, n. 4. p. 642-654, 2008.

SOUZA, C. R. F. **Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos spray-dryer e leito de jorro.** 2003. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação Ciências, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

SOUZA, M. A. J.; VARGAS, T. J. S. Anatomia, fisiologia e histologia da pele. In: KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVICH, Oleg. *Dermatologia Estética*. 1. ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2004.

SPENCERI, E. A.. Disorders of pigmentation. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 11, p. 209– 217, 2003.

SUNAMI, E.; TSUNO, N.; OSADA, T.; SAITO, S.; KITAYAMA, J.; TOMOZAWA, S.; TSURUO, T.; SHIBATA, Y.; MUTO, T.; NAGAWA, H. MMP-1 is a prognostic marker for hematogenous metastasis of colorectal cancer. *Oncologist*, v. 5, p. 108-114, 2000.

SÜNTAR, I.; AKKOL, E. K.; ŞENOL, F. S.; KELES, H.; ORHAN, I. E. Investigating wound healing, tyrosinase inhibitory and antioxidant activities of the ethanol extracts of *Salvia cryptantha* and *Salvia cyanescens* using *in vivo* and *in vitro* experimental models. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 135, p. 71–77, 2011.

TABART, J.; FRANCK, T.; KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; SERTEYN, D.; DEFRAIGNE, J-O.; DOMMES, J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ribes nigrum* extracts. *Food Chemistry*, v. 131, p. 1116–1122, 2012.

TAN, A. C.; KONCZAK, I.; RAMZAN, I.; SZEB, D. M.-Y. Antioxidant and cytoprotective activities of native Australian fruit polyphenols. *Food Research International*, v. 44, p. 2034–2040, 2011.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine* v. 9, 2009.

TODARO, G.J., GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol.* v. 17, p. 299-313, 1963.

TODARO, G.J.; LAZAR, G.K.; GREEN, H. The initiation of cell division in a contact inhibited mammalian cell line. *J. Cell. Physiol.* v. 66, p. 325-333, 1965.

TULIPANI, S.; ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; BUSCO, F.; BOMPADRE, S.; QUILES, J. L.; MEZZETTIE, B.; BATTINO, M. Strawberry consumption improves plasma antioxidant status and erythrocyte resistance to oxidative haemolysis in humans. *Food Chemistry*, v. 128, p. 180–186, 2011.

VARGAS, F.S.; PEREIRA, M.M.; LIMA, E.S. Free radical scavenger and antioxidant activity of *Calycophyllum spruceanum* (Benth) in Carbon Tetrachloride-treated rats. In: V meeting of SFRBM – South American Group, Montevideo. Book of Abstracts, v. 1, p. 123-123, 2007.

VASCONCELOS, E. A. F.; MEDEIROS, F. N.; RAFFIN, F. N.; MOURA, T. F. A. L. Influência da temperatura de secagem e da concentração de Aerosil®200 nas características dos extratos secos por aspersão da *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 3, p. 243-249, 2005.

VENUS, M.; WATERMAN, J.; McNAB, I. Basic physiology of the skin. *Surgery (Medicine Publishing)*. v. 29 (10), p. 471-74, 2011.

WACH, A. *et al.* Quercetin content in some food and herbal samples. *Food Chemistry*, v. 100, p. 699-704, 2007.

WANG, C-Y.; NG, C-C.; LIN, H-T.; SHYU, Y-T. Free radical-scavenging and tyrosinase-inhibiting activities of extracts from sorghum distillery residue. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 111, p. 554–556, 2011.

WANG, K-H.; Lin, R-D.; HSU, F-L.; HUANG, Y-H.; CHANG, H-C.; HUANG, C-Y.; LEE, M-H. Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, p. 353–359, 2006.

WEST, B. J.; DENG, S.; PALU, A. K.; JENSEN, C. J. *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae) leaf extracts mitigate UVB-induced erythema. *Journal of Natural Medicines*, v. 63, n. 3, p. 351-4, 2009.

WOLFE, K.L.; LIU, R.H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods and dietary supplements. *J. Agric. Food Chem.*, v. 55, p. 8896-8907.

XU, B.; CHANG, S. K.C. Comparative study on antiproliferation properties and cellular antioxidant activities of commonly consumed food legumes against nine human cancer cell lines. *Food Chemistry*, v. 134, p. 1287–1296, 2012.

XU, G-H.; KIM, Y-H.; CHI, S-W.; CHOO, S-J.; RYOO, I-J.; AHN, J-S.; YOO, I-D. Evaluation of human neutrophil elastase inhibitory effect of iridoid glycosides from *Hedyotis diffusa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 513-515, 2010.

XU, H.; WU, P-R.; SHEN, Z-Y.; CHEN, X-D. Chemical analysis of *Hericium erinaceum* polysaccharides and effect of the polysaccharides on derma antioxidant enzymes, MMP-1 and TIMP-1 activities. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 47, p. 33-36, 2010.

YAMAGUCHI Y, HEARING VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 2, p. 193-199, 2009.

YAMAGUCHI, Y; BRENNER, M; HEARING, V. J. The Regulation of Skin Pigmentation. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 282, n. 38, p. 27557–27561, 2007.

YANG, Z.; ZHANG, Y.; SUN, L.; WANG, Y.; GAO, X.; CHENG, Y. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Analytica Chimica Acta*, v. 719, p. 87–95, 2012.

ZHANG, A., ZHU, Q.Y., LUK, Y.S., HO, K.Y., FUNG, K.P. & CHEN, Z.Y. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Science*, v. 61, 1997.

ZULETA, L. M. C. *Estudos químico e biológico das cascas de Calycophyllum spruceanum Benth.* 1997. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas, Manaus-Am.

ZULETA, L. M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C. M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, v. 64, p. 549–553, 2003.

ANEXOS

ORÇAMENTO

ITEM	USO NO PROJETO	VALOR (R\$)
Coleta do material vegetal	<i>Uso nos testes de avaliação</i>	500,00
Inspeção visual, lavagem, secagem, estabilização e moagem do material vegetal	<i>Uso nos testes de avaliação</i>	250,00
Preparação do extrato amostra para fins de ensaio preliminares	<i>Uso nos testes de avaliação</i>	500,00
Reagentes (meio de cultura, soro, alamar blue, etc.)	<i>Preparo de soluções, preparo dos testes</i>	5.000,00
Material de laboratório (luvas, pipetas, ponteiros, máscaras, placas, tubos, gaze, algodão, etc)	<i>Uso na coleta de sangue dos voluntários</i>	2.000,00
Vidrarias	<i>Preparo de soluções e auxílio na realização dos testes</i>	500,00
Total		8.750,00

INFRA- ESTRUTURA DISPONÍVEL:

Equipamentos	Uso no Projeto
Banho de Ultrassom	<i>Dissolução de amostras</i>
Banho-Maria	<i>Utilizado para manter as amostras na temperatura adequada quando estão sendo processadas</i>
Botijão de Nitrogênio	<i>Utilizado para manter os tubos criostáticos para a preservação das células.</i>
Capela de Exaustão	<i>Para manipulação de reagentes e contaminantes.</i>
Capela de Exaustão de Vapores	<i>Secagem das placas cromatográficas</i>
Capela de fluxo laminar vertical	<i>Utilizada para o manuseio estéril das culturas de células</i>
Centrífuga refrigerada	<i>Utilizada para o processamento das amostras em baixas temperaturas</i>
Computador	<i>Acoplado aos microscópios para obtenção de imagens</i>
Contador de células manual	<i>Utilizado para contagem de células</i>
Estufa	<i>Secagem de material</i>
Incubadora de CO ₂	<i>Utilizada para manter as células em cultura em atmosfera de 95% de O₂ e 5% de CO₂ e com temperatura controlada.</i>
Leitora Elisa	<i>Utilizada para fazer leitura de microplacas</i>
Micropipetas Automáticas	<i>Utilizadas para a realização dos testes</i>
Moinho de faca tipo Willey	<i>Utilizado para triturar o extrato</i>
Rotaevaporador	<i>Utilizado para retirar solvente da amostra</i>

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

ATIVIDADES	2010										2011										2012									
	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A
Obtenção de créditos	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R																		
Revisão bibliográfica	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coleta da planta															R															
Preparação dos extratos																	R						R	R						
Caracterização do extrato																	R					R	R							
Exame de qualificação															R															
Preparação das formulações																	R												R	
Ensaio do DPPH																	R	R											R	
Inibição da Tirosinase																			R	R									R	
Inibição da Colagenase																			R	R										
Inibição da Elastase																			R	R									R	
Inibição da Hialuronidase																			R	R										
Zimografia reversa																				R	R								R	R
Alamar blue																				R	R									
Antioxidação celular																				R	R									
Potencial Hemolítico																				R	R								R	
Redação da dissertação																											R	R	R	R
Defesa da dissertação																														R

R – Realizado