

**Plantas do cerrado:  
obtenção e caracterização  
espectroscópica de extratos e  
avaliação do potencial de  
inibição da tirosinase**

**Isaac de Freitas Corradi**

ISAAC DE FREITAS CORRADI

**PLANTAS DO CERRADO:  
OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO  
ESPECTROSCÓPICA DE EXTRATOS E AVALIAÇÃO  
DO POTENCIAL DE INIBIÇÃO DA TIROSINASE**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

**Belo Horizonte**

**2012**

C823p  
2012  
D

Corradi, Isaac de Freitas  
Plantas do cerrado: obtenção e caracterização  
espectroscópica de extratos e avaliação do potencial  
de inibição da tirosinase / Isaac de Freitas Corradi.  
2012.  
ix, 138 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.

Bibliografia: f. 79-89.

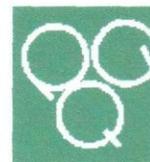
Anexos: f. 90-138.

1. Química Orgânica - Teses 2. Melanina - Teses 3.  
Cor da pele - Teses 4. Distúrbios de pigmentação da  
pele - Teses 5. Inibidores enzimáticos - Teses 6.  
Plantas medicinais - Teses I. Takahashi, Jacqueline  
Aparecida, Orientadora II. Título.

CDU 043



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx  
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG  
TEL.: 031 - 3499-5732  
FAX: 031 - 3499-5700  
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Plantas do Cerrado: Obtenção e Caracterização Espectroscópica de Extratos e  
Avaliação do Potencial de Inibição da Tirosinase"**

**Isaac de Freitas Corradi**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Profª. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora  
UFMG

Prof. Sidney Augusto Vieira Filho  
UFOP

Profª. Lucienir Pains Duarte  
UFMG

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2012.

**Este trabalho foi desenvolvido sob orientação da Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi.**

**Este trabalho foi desenvolvido com a  
colaboração do Prof. Dr. Edward de  
Souza.**

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico este trabalho  
A Deus, por permiti-lo;  
A minha amada esposa, Deise,  
pelo amor, apoio e paciência;  
A meus pais, Carlos e Vilma  
pelo amor e educação desde o berço;  
Ao Melqui,  
meu querido irmão e amigo fiel; e  
A minha amada filhinha Stella,  
projeto de amor executado  
em meio a este projeto.**

**“If you peel away the armor is something underneath  
If you look below for hidden treasure underneath another layer  
Are you hiding underneath the skin.”**

**Danny Elfman.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar sempre e por iluminar meus caminhos, muitas vezes obscuros, na busca incessante pelo conhecimento.

À minha família, meu porto seguro, por me apoiar e ficar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

À minha amada esposa Deise, pelo amor a mim dedicado e muitas vezes manifestado sob a forma de paciência e ombro amigo em todos os momentos.

Aos os amigos e colegas de trabalho dos Florais de Minas, em especial ao Breno e à Ednamara, pela confiança e por me darem a oportunidade de evoluir acadêmica e profissionalmente.

Aos amigos e colegas de trabalho da Faculdade de Farmácia da Universidade de Itaúna, em especial aos professores Gilmar e Haendel, pelo incentivo e apoio prestados.

À FAPEMIG, pelo apoio financeiro ao projeto.

Às secretárias do curso de Pós-graduação em Química, Paulette, Kátia e Lilian, pela boa vontade, atenção e bom atendimento prestados.

À amiga Jociani Ascari e às professoras Dra. Lucienir P. Duarte e Dra. Maria Amélia D. Boaventura, por cederem gentilmente alguns padrões analisados neste trabalho.

À Dra. Ivana Silva Lula e ao analista Ricardo Assis Machado, ambos do LAREMAR, pelo auxílio na obtenção de espectros de RMN

À analista Ana Cristina Morgado, pelo auxílio na obtenção de espectros de infravermelho.

Aos integrantes do LaBB, leais companheiros, que me ajudaram de diversas formas, em especial aos amigos Ana Sarah, Adriana, Karine e Giovanni.

Ao amigo Fernando César, pelos muitos favores prestados nas horas de dificuldade.

À Dra. Vany Ferraz, do laboratório de Cromatografia do DQ-UFMG, pela colaboração e amizade.

Ao Prof. Dr. Alexandre Salino e aos pesquisadores do Herbário BHCB, pela preciosa ajuda na classificação botânica das plantas abordadas neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Liu Wen Yu, pelas preciosas ajudas na reserva, calibração e manutenção dos espectrofotômetros UV-Vis.

À Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelas valiosas discussões sobre formulações cosméticas.

Ao Prof. Dr. Edward de Souza, meu “pai acadêmico”, por minha iniciação científica (literalmente), pela intensa colaboração e sugestões sempre pertinentes.

E, por último e em especial, à Profa. Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, pela orientação e exemplo de dedicação, profissionalismo e amor à ciência e, acima de tudo, por ser uma pessoa iluminada. Se tive sorte em ter um “pai acadêmico”, mais sorte ainda foi ter uma “mãe acadêmica”.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ÍNDICE DE TABELAS.....	vi
ÍNDICE DE EQUAÇÕES.....	vii
RESUMO.....	viii
ABSTRACT.....	ix

### CAPÍTULO 1

1. Introdução.....	1
1.1. Melanina e suas funções fisiológicas.....	2
1.2. Tirosinase e seu papel na melanogênese.....	4
1.3. Inibidores naturais da tirosinase.....	6
1.4. O ácido kójico como inibidor padrão da tirosinase.....	11
1.5. Objetivos.....	12
1.5.1. Objetivos gerais.....	12
1.5.2. Objetivos específicos.....	12

### CAPÍTULO 2

2. Metodologia.....	13
2.1. Equipamentos, reagentes e materiais.....	15
2.1.1. Equipamentos.....	15
2.1.2. Reagentes e materiais.....	16
2.1.3. Preparo de reagentes.....	17
2.2. Seleção, coleta e classificação botânica das plantas.....	19
2.3. Preparo dos extratos vegetais.....	21
2.4. Seleção de substâncias a serem utilizadas como padrões de referência.....	21
2.5. Caracterização dos extratos por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	22
2.6. Testes de inibição enzimática da tirosinase via espectroscopia no UV-Vis.....	23
2.7. Teste de inibição da tirosinase por bioensaios com discos de batata.....	24
2.8. Padronização e estudo comparativo dos extratos por CLAE-UV.....	25
2.9. Caracterização dos extratos e dos padrões por espectroscopia na região do infravermelho (IV).....	26
2.10. Caracterização e padronização dos extratos mais ativos e dos padrões por ressonância magnética nuclear (RMN).....	26
2.11. Teste de incorporação dos extratos mais ativos em uma formulação-base.....	26

### CAPÍTULO 3

3. Resultados e discussão.....	28
3.1. Seleção das plantas e preparo dos extratos.....	30

3.2. Testes preliminares.....	31
3.3. Caracterização dos extratos e padrões por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis).....	32
3.4. Teste de inibição da tirosinase via espectroscopia no UV-Vis.....	33
3.5. Teste de inibição da tirosinase usando discos de batata.....	39
3.6. Padronização e caracterização dos extratos e dos padrões por CLAE.....	41
3.7. Caracterização dos extratos e dos padrões por espectroscopia no IV.....	45
3.8. Análise e caracterização dos padrões e dos extratos mais ativos por ressonância magnética nuclear (RMN).....	47
3.9. Estudo dos extratos mais ativos via CLAE-DAD e CLAE- EM.....	67
3.10. Incorporação dos extratos mais ativos em uma formulação-base farmacêutica.....	71
3.11. Testes de inibição da tirosinase com as formulações contendo os extratos mais ativos.....	71

## ***CAPÍTULO 4***

4. Conclusões.....	76
Referências.....	79
Anexos.....	90

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	absorvância
aq.	aquoso
Arg	arginina
Asp	asparagina
CIE	<i>Commision Internationale L'Eclairage</i> (Comissão Internacional de Iluminação)
CIE-L*a*b*	sistema subtrativo de cores proposto pela <i>Commision Internationale L'Eclairage</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detecção por arranjo de diodos
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CLAE-UV	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia no ultravioleta
$\delta$	deslocamento químico
DAD	detector de arranjo de diodos
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DR	reflexão difusa
E	absortividade
EM	espectrometria de massas
EQ.	equação
ESI	<i>electrospray ionization</i> (ionização por eletrospray)
<i>et al.</i>	e outros
FIG.	Figura
GPS	<i>global positioning system</i> (sistema de posicionamento global)
GRAF.	gráfico
His	histidina
IV	infravermelho
k	gradiente linear ou coeficiente de inclinação
$K_M$	constante de Michaelis-Menten
$K_i$	constante de inibição
l	largura ou comprimento do caminho ótico
LaBB	laboratório de biotecnologia e bioensaios
L-Dopa	3,4-di-hidroxi-fenilalanina
max	máximo
m/m	relação entre massas

$m/z$	relação massa/carga
$\bar{\nu}$	número de onda
p.	página
pp.	páginas
PBS	solução tampão fosfato de sódio pH 7
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.	quantidade suficiente
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de $^{13}\text{C}$	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de $^1\text{H}$	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
TAB.	tabela
TR	tempo de retenção
Trp	triptofano
Tyr	tirosina
U	unidade de atividade
uA	unidade de absorvância
UV	ultravioleta
UV-Vis	ultravioleta-visível
V	volume
v.	versão
$v_0$	velocidade inicial
$v_{\text{max}}$	velocidade máxima
$\lambda$	comprimento de onda

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Rota biossintética da melanina com as reações enzimáticas envolvendo as atividades de fenoxidase da tirosinase.....	4
<b>Figura 2:</b> Proposta de modelo biomimético para o sítio ativo da tirosinase.....	5
<b>Figura 3:</b> Visão geral da estrutura dimérica de uma tirosinase de origem bacteriana.....	5
<b>Figura 4:</b> Fluxograma de delineamento das etapas deste trabalho.....	14
<b>Figura 5:</b> Fotos das plantas selecionadas para o estudo.....	19
<b>Figura 6:</b> Mapa do Brasil destacando a região de cerrado e a localização dos pontos de coleta em Itaúna, Minas Gerais.....	20
<b>Figura 7:</b> Curvas de formação do dopacromo em quatro situações diferentes.....	33
<b>Figura 8:</b> Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase dos extratos testados.....	36
<b>Figura 9:</b> Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase para os padrões testados.....	37
<b>Figura 10:</b> Fotos dos discos de batata no início (A, t = 0 min) e no fim (B, t = 30 min) do bioensaio para avaliação da atividade anti-tirosinásica dos xtratos.....	39
<b>Figura 11:</b> Diagrama comparativo dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos para os extratos vegetais analisados pelo teste com discos de batata e pelo teste via espectroscopia no UV-Vis.....	40
<b>Figura 12:</b> Diagramas comparativos mostrando os cromogramas (CLAE) dos extratos.....	43
<b>Figura 13:</b> Diagrama comparativo dos cromogramas obtidos por CLAE, sozinhos ou em sobreposição, dos padrões testados.....	44
<b>Figura 14:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do ácido gálico (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	48
<b>Figura 15:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do ácido gálico (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	48
<b>Figura 16:</b> Subespectro DEPT do ácido gálico (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	49

<b>Figura 17:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do ácido kójico (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>50</b>
<b>Figura 18:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do ácido kójico (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>50</b>
<b>Figura 19:</b> Subespectro DEPT do ácido kójico (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>51</b>
<b>Figura 20:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da hidroquinona (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>52</b>
<b>Figura 21:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da hidroquinona (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>52</b>
<b>Figura 22:</b> Subespectro DEPT da hidroquinona (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>53</b>
<b>Figura 23:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do kaempferol (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>54</b>
<b>Figura 24:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do kaempferol (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>54</b>
<b>Figura 25:</b> Subespectro DEPT do kaempferol (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>55</b>
<b>Figura 26:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da quercetina (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>56</b>
<b>Figura 27:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da quercetina (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>56</b>
<b>Figura 28:</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da quercetina (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>57</b>
<b>Figura 29:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da rutina (200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>58</b>
<b>Figura 30:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da rutina (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>58</b>
<b>Figura 31:</b> Expansão do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da rutina (50 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ).....	<b>59</b>
<b>Figura 32:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da $\beta$ -amirina (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	<b>60</b>
<b>Figura 33:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da $\beta$ -amirina (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	<b>60</b>
<b>Figura 34:</b> Subespectro DEPT da $\beta$ -amirina (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	<b>61</b>
<b>Figura 35:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do estigmasterol (200 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	<b>62</b>
<b>Figura 36:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ do estigmasterol (50 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	<b>62</b>

<b>Figura 37:</b> Subespectro DEPT do estigmasterol (50 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	<b>63</b>
<b>Figura 38:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato IC-08 (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	<b>64</b>
<b>Figura 39:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do extrato IC-08 (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	<b>64</b>
<b>Figura 40:</b> Subespectro DEPT do extrato IC-08 (50 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	<b>65</b>
<b>Figura 41:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato IC-17 (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	<b>66</b>
<b>Figura 42:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do extrato IC-03 (200 MHz, CD <sub>3</sub> OD).....	<b>66</b>
<b>Figura 43:</b> Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos no testes via UV-Vis convencional para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.....	<b>73</b>
<b>Figura 44:</b> Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos no teste via UV-Vis com leitura por reflectância difusa (DR), para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.....	<b>74</b>
<b>Figura 45:</b> Fotos dos discos de batata no início (A, t = 0 min) e no fim (B, t = 30 min) do bioensaio para avaliação da atividade anti-tirosinásica das formulações contendo ácido kójico e os extratos mais ativos.....	<b>74</b>
<b>Figura 46:</b> Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos no bioensaio com discos de batata para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.....	<b>75</b>

## ÍNDICE DE TABELAS E QUADROS

<b>Tabela 1:</b> Classificação botânica, dados de localização dos pontos de coleta e números de depósito no herbário BHCB das plantas estudadas.....	20
<b>Tabela 2:</b> Codificação dos extratos vegetais.....	21
<b>Tabela 3:</b> Lista de reagentes, quantidades e sequência de etapas usadas no teste de inibição enzimática.....	24
<b>Tabela 4:</b> Classes de substâncias com atividade anti-tirosinásica presentes nas plantas estudadas.....	30
<b>Tabela 5:</b> Coeficientes de inclinação (k) das partes ascendentes das curvas de formação de dopacromo obtidas na ausência e na presença dos padrões e extratos testados.....	34
<b>Tabela 6:</b> Principais bandas de absorção observadas nos espectros no IV para os padrões analisados.....	45
<b>Tabela 7:</b> Principais bandas de absorção observadas nos espectros no IV dos extratos.....	46
<b>Tabela 8:</b> Resultados obtidos a partir da análise dos espectros de massas de IC-03.....	69
<b>Tabela 9:</b> Resultados obtidos a partir da análise dos espectros de massas de IC-08.....	70
<b>Tabela 10:</b> Resultados obtidos a partir da análise dos espectros de massas de IC-17.....	70
<b>Tabela 11:</b> Coeficientes de inclinação (k) das partes ascendentes das curvas de formação de dopacromo obtidas na ausência e presença dos cremes contendo ácido kójico e os três extratos vegetais mais ativos.....	72
<b>Quadro 1:</b> Condições cromatográficas utilizadas na caracterização e padronização dos extratos e padrões por CLAE-UV.....	25
<b>Quadro 2:</b> Composição do creme usado como veículo-base para incorporação dos extratos mais ativos.....	26

## ÍNDICE DE EQUAÇÕES

<b>Equação 1:</b> Equação para o cálculo da atividade anti-tirosinásica.....	<b>23</b>
<b>Equação 2:</b> Equação para cálculo do grau de inclinação na parte ascendente das curvas de formação de dopacromo em função do tempo.....	<b>33</b>
<b>Equação 3:</b> Equação para cálculo da variação total de cor a partir de coordenadas numéricas do sistema espacial de cores L*a*b*.....	<b>40</b>
<b>Equação 4:</b> Equação utilizada no cálculo do percentual de inibição da tirosinase a partir dos valores de variação total de cor ( $\Delta E^*$ ).....	<b>40</b>

## RESUMO

A tirosinase desempenha um papel fundamental na biossíntese de melanina e, portanto, a sua inibição paralisa o processo como um todo ou pode, até mesmo, minimizar algumas de suas consequências. Assim, manchas de pele e hiper-pigmentação cutânea causadas pela formação excessiva ou acúmulo de melanina podem ser tratadas com formulações contendo substâncias e ou extratos com ação anti-tirosinásica. No presente trabalho, foram coletadas espécies de treze plantas nativas ou exóticas do cerrado brasileiro e, em seguida, obtidos dezoito extratos etanólicos secos. Esses extratos foram caracterizados e estudados via espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  e espectrometria de massas, empregando-se, quando possível, padrões comerciais ou anteriormente isolados. A atividade anti-tirosinásica das amostras foi avaliada através de bioensaios *in vitro*, monitorando-se, via espectroscopia no UV-Vis, a formação do dopacromo, um dos intermediários do processo de síntese, e em testes com discos de batata, uma das fontes naturais de tirosinase. Ao final, esses resultados foram comparados com aqueles advindos do emprego do ácido kójico, um agente anti-tirosinásico amplamente estudado e empregado. Os resultados dos dois tipos de ensaio foram, em geral, coincidentes e indicaram que os inibidores de tirosinase mais ativos seriam, em ordem decrescente, os extratos obtidos a partir de *Brosimum gaudichaudii*, *Schinus terebinthifolius*, *Stryphnodendron adstringens*, *Kalanchoe pinnata* e *Rosa alba*. Por último, formulações cosméticas foram preparadas a partir dos três extratos mais ativos e, então, avaliadas quanto à atividade anti-tirosinásica através dos métodos mencionados acima. Os resultados demonstraram que as formulações apresentaram atividades inibitórias similares às determinadas para os extratos concentrados e, dessa maneira, o que consistiu uma indicação de que esses extratos e respectivas formulações têm propriedades para serem utilizadas no tratamento de manchas de pele.

Palavras-chave: melanina, tirosinase, ácido kójico, atividade anti-tirosinásica.

## ABSTRACT

The enzyme tyrosinase is crucial on the biosynthesis of the melanin. Consequently, its inhibition stops the synthesis and even can minimize some of its consequences. For instance, it is well known that lotions and creams containing those inhibitors are employed to reduce or eliminated some skins blemishes, originated by the excessive formation or accumulation of the melanin. The first step of the present work was the collection of 13 different species, native or not, of the Cerrado (brazilian savannah). It was followed by obtention and characterization of 18 extracts. That characterization was achieved employing various chromatographic and spectrometric methods and, when possible, by comparison with commercial or isolated standards. The inhibition proprieties themselves were evaluated *in vitro* (through the effect of the extracts on the formation of the dopachrome, an intermediary of the melanina's biosynthesis process, via UV-Vis spectroscopy) or their ability to curb or stop the spontaneous darkening in discs of potato, a natural and rich source of tyrosinase. Those results were compared with those achieved by the use of the kojic acid, a widely studied and known inhibitor of the melanin's formation. In general, both methods indicated that the most actives extracts were, in decrescent order, those obtained from *Brosimum gaudichaudii*, *Schinus terebinthifolius*, *Stryphnodendron adstringens*, *Kalanchoe pinnata* and *Rosa alba*. Finally, it was evaluated the inhibition activity of some lotions, made from those three most active extracts, and the results were remarkable coincident with those recorded for the crude extracts, which indicated their anti-tyrosinase power and their potential use on products utilized on the healing of some skins blemishes.

Keywords: melanin, tyrosinase, kojic acid, anti-tyrosinase activity.

# *Capítulo 1*

## **INTRODUÇÃO**

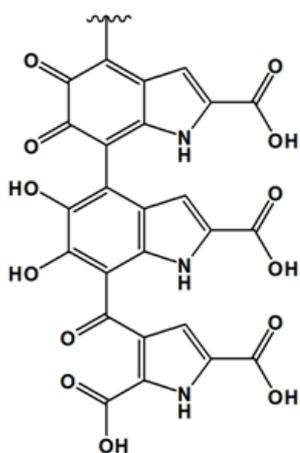
## 1. Introdução

### 1.1. Melanina e suas funções fisiológicas

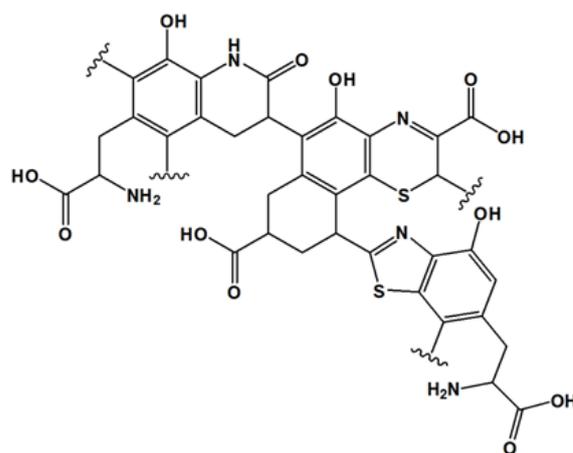
Melanina (do Grego *melanos*, "escuro") é o nome dado a um grupo de polímeros que ocorrem na pele, cabelo, pelos e penas de vertebrados, bem como na parte posterior do globo ocular, na íris, em certas regiões do cérebro e em algumas glândulas. Alguns tipos de melanina ocorrem no exoesqueleto de cutícula ou quitina dos insetos e nos olhos e ocelos da maioria dos animais. As melaninas também são responsáveis pela coloração preta da tinta de camuflagem e fuga secretada por lulas e outros cefalópodes, atuando, também, como agentes protetores em certos organismos microscópicos. Em humanos, a melanina é o pigmento que torna a pele preta, marrom, ou ocasiona tonalidades vermelha e amarela (Riley, 1997).

Sua capacidade de absorver a luz está associada, conseqüentemente, à fotoproteção e termorregulação dos corpos como um todo e da pele e olhos em particular (Kim & Uyama, 2005). O papel fisiológico da melanina é, também, acentuado pela sua capacidade em diminuir a formação, reagir com ou neutralizar a ação de radicais livres (Riley, 1997).

Dentre as várias formas de melanina existentes, duas se destacam devido à sua ocorrência natural em mamíferos: a eumelanina (1) e a feomelanina (2) (Plonka & Grabacka, 2006).



1



2

A eumelanina apresenta coloração escura (preta ou marrom) e é a responsável pelas cores e tonalidades da pele, do cabelo e dos pelos. Em termos humanos, a eumelanina negra (mais comum em não-caucasianos) ocasiona peles de cores escuras quando presente em grandes quantidades, e acinzentadas, quando em concentrações menores. A eumelanina marrom, mais comum em povos de

origem caucasiana, pode conferir tons acastanhados ao cabelo quando presente em abundância, mas, em quantidades menores, produz tons marrons mais suaves ou até mesmo loiros. Por sua vez, a feomelanina (responsável pela cor vermelha) é, em geral, mais abundante na pele de mulheres do que na dos homens e, por isso, a pele feminina costuma ser naturalmente um pouco mais vermelha. A feomelanina é, obviamente, o pigmento mais abundante nos cabelos ruivos. A ausência de melanina na pele, cabelo e olhos resulta no albinismo em humanos e animais, o qual está intimamente associado a fatores de origem genética de modo geral.

Do ponto de vista químico, a eumelanina é composta por pigmentos nitrogenados insolúveis em água, produzidos pela polimerização oxidativa enzimática de derivados 5,6-di-hidroxi-indólicos a partir de tirosina via L-Dopa. Já a feomelanina é constituída de pigmentos básico-solúveis contendo enxofre, os quais são produzidos através da polimerização oxidativa de unidades cisteinildopa via intermediários 1,4-benzotiazínicos (**FIG. 1, p. 4**).

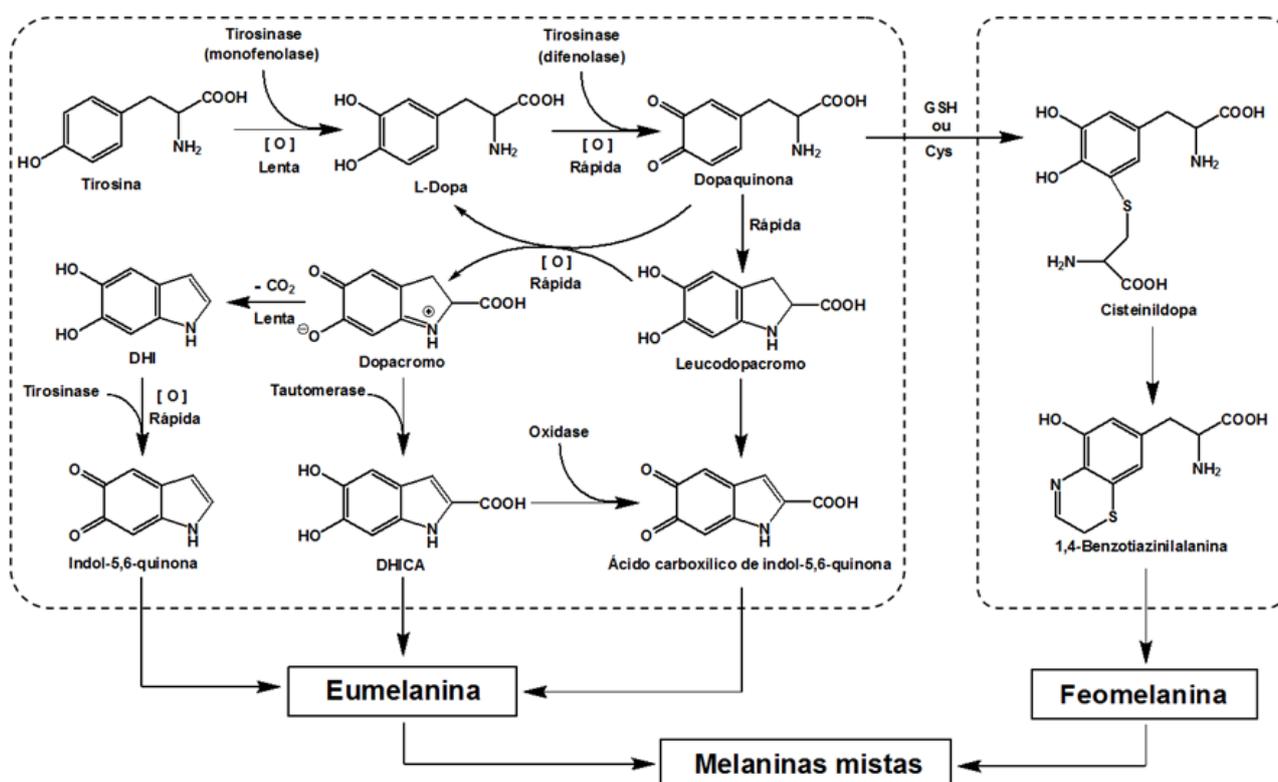
Como dito, a melanina tem propriedades fotoquímicas que a tornam um importante agente protetor de tecidos e órgãos contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (UV) e dos íons por ela produzidos (Raposo & Marks, 2007). Praticamente toda radiação UV por ela absorvida é convertida e dispersa na forma de calor em quantidades inofensivas. Nesse processo, a melanina reduz a geração de radicais livres a um mínimo e, assim, evita danos indiretos ao DNA que poderiam causar melanomas (tumores malignos de pele).

Quando pessoas de pele clara, não albinas, expõem-se ao sol, sua pele primeiramente fica avermelhada e, em seguida, marrom, à medida em que melanina extra é produzida e acumulada na pele. A cor marrom é uma resposta natural à luz solar excessiva, agindo na proteção cutânea. Todavia, determinadas radiações presentes nos raios solares também causam mutações genéticas nas células epidérmicas, levando à produção excessiva de melanina e à formação de melanomas, que são tumores escuros (pretos ou marrons) de pele. Estes também surgem devido a outras causas e são especialmente prevalentes em pessoas de pele e cabelos claros, mas, nem por isso, estão sempre e intrinsecamente associados a fatores hereditários (PBRG, 2011).

Casos de hiper-pigmentação local devida à formação excessiva ou acúmulo concentrado de melanina são problemas que ocorrem em outras doenças de pele tais como lentigo (manchas castanhas planas), nevus (lesão nodular, geralmente congênita) e que, também, levam à formação de sardas, manchas e marcas de nascença. Outras causas de hiper-pigmentação são acnes, eczemas e melasma, este último um distúrbio associado à gravidez ou tratamentos hormonais (Robb, 1984).

## 1.2. Tirosinase e seu papel na melanogênese

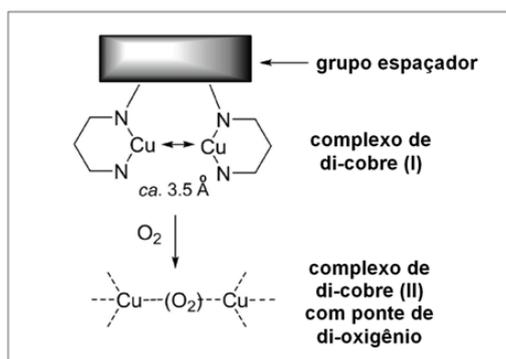
A tirosinase é uma metaloenzima do grupo das polifenol oxidases que ocorre em vários organismos (Sendovski *et al.*, 2011; Kaye, 2011) e desempenha algumas funções específicas na melanogênese (FIG. 1). Nesse processo biossintético, ela age na transformação de L-tirosina em L-Dopa através de hidroxilação e, depois, na conversão de L-Dopa em *o*-dopaquinona por oxidação (Kamkaen *et al.*, 2007). Além disso, catalisa a oxidação de 5,6-di-hidroxi-indol (DHI) para formar indol-5,6-quinona, um dos precursores de melanina. A multiplicidade de funções dessa enzima pode ser explicada, ao menos em parte, por suas características estruturais e por algumas propriedades peculiares, tal como a plasticidade apresentada por átomos específicos de seu sítio ativo, conforme será explicado adiante.



Cys = cisteína, DHI = 5,6-di-hidroxi-indol; DHICA = ácido 5,6-di-hidroxi-indólico; GSH = glutatona; [O] = oxidação.

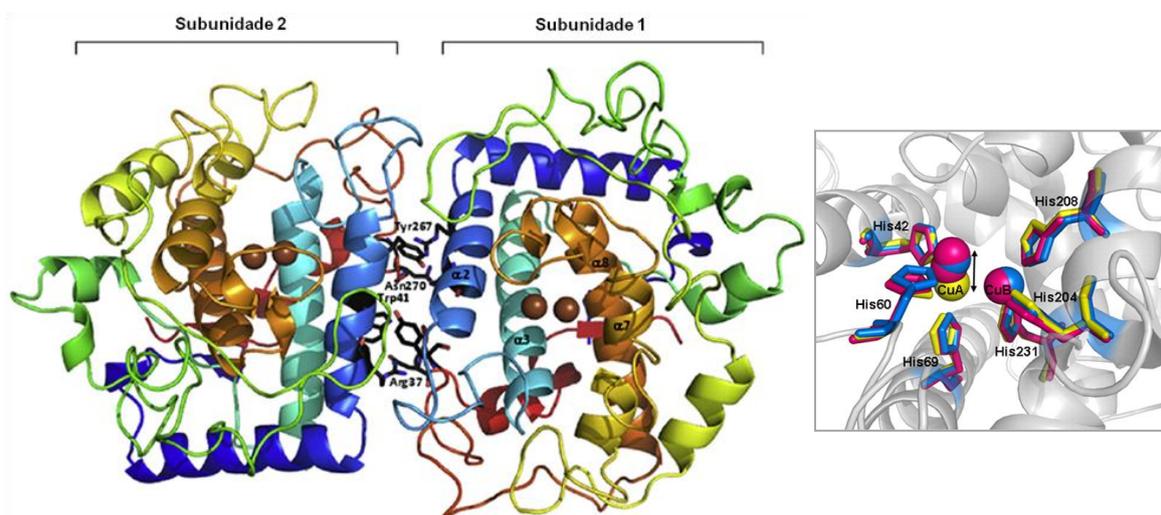
**FIGURA 1** – Rota biossintética da melanina com as reações enzimáticas envolvendo as atividades de fenoloxidase da tirosinase. Adaptado de Kamkaen *et al.* (2007), Kim & Uyama (2005), Kobayashi *et al.* (1995) e Prota (1988).

A tirosinase contém pelo menos um sítio ativo binuclear formado por dois átomos de cobre (Kim & Uyama, 2005). De acordo com Kaye (2011), o sítio ativo desta enzima contém dois átomos de cobre (I) devidamente coordenados e distanciados entre si por aproximadamente 3,55 Å. Com base em estudos biomiméticos, este sítio é ativado após a ligação com o oxigênio molecular, formando compostos de coordenação de di-cobre (II) interligados por uma ponte di-oxigenada (FIG. 2, p. 5).



**FIGURA 2** – Proposta de modelo biomimético para o sítio ativo da tirosinase. Fonte: Kaye (2011).

Recentemente, a estrutura de uma tirosinase de origem bacteriana (**FIG. 3**) foi caracterizada por Sendovski *et al.* (2011), evidenciando que a mesma é um dímero que possui não apenas um, mas, sim, dois sítios ativos ou afins e que os dois átomos de cobre presentes (CuA e CuB), também apresentam plasticidade, *i.e.*, a possibilidade de migração e conseqüente mudança de posição na enzima. Com isso, a tirosinase é capaz de catalisar tanto a *o*-hidroxilação de monofenóis quanto a oxidação de dois elétrons de *o*-difenois para *o*-quinonas, sendo que esta última reação é muito mais rápida do que a anterior. Assim sendo, a hidroxilação de tirosina e sua conversão a L-Dopa é considerada a etapa determinante ou limitante do processo.



**FIGURA 3** – Visão geral da estrutura dimérica de uma tirosinase de origem bacteriana. Adaptado de Sendovski *et al.* (2011).

Na **FIG. 3**, na imagem maior à esquerda, ambas as subunidades 1 e 2 são apresentadas no sentido N-terminal para C-terminal. Os íons de cobre nos sítios ativos são representados em marrom. Os pontos de contato em cada subunidade para formação do dímero, Trp41-Tyr267 e Arg37-Asn270, onde Trp, Tyr, Arg e Asn significam respectivamente triptofano, tirosina, arginina e asparagina, sendo mostrados

em preto. As quatro hélices principais, a partir das quais os resíduos de His (histidina) coordenam-se com os íons de cobre, são apresentadas na subunidade 1:  $\alpha 2$  em azul claro,  $\alpha 3$  em ciano,  $\alpha 7$  em amarelo escuro e  $\alpha 8$  em laranja. À direita, em detalhe, é possível visualizar a posição dos sítios ativos CuA e CuB com seus respectivos resíduos de histidina.

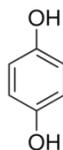
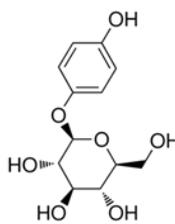
Ainda segundo Sendovski *et al.* (2011), embora a tirosinase e as proteínas a ela relacionadas já tenham sido estudadas intensivamente, seu mecanismo catalítico ainda é assunto de debate devido à sua complexidade, à existência de duas atividades catalíticas no mesmo sítio ativo, e a um aparente tempo de espera antes do início da atuação da enzima propriamente dita. Esse tempo de espera estaria associado à atividade monofenolásica da tirosinase. Comparativamente, com base na falta de atividade monofenolásica na catecol oxidase, enzima do mesmo grupo da tirosinase e que possui um grande resíduo aromático que bloqueia o CuA, foi sugerido que, nas tirosinases, as quais não possuem este resíduo de bloqueio, monofenóis ligariam-se ao CuA e *o*-difenois ligariam-se ao CuB.

Decker *et al.* (2006) propuseram um mecanismo no qual o substrato monofenólico é orientado pelo CuA por interações hidrofóbicas com um resíduo de aminoácido histidina (His194 ou His208, dependendo da origem da tirosinase) presente na enzima. A hidroxilação ocorreria por um mecanismo de substituição eletrofílica enquanto o substrato é posicionado *trans* em relação ao outro resíduo de histidina. Olivares *et al.* (2002) e Olivares & Solano (2009) também propuseram, com base em mutações de sítio observadas em tirosinase de ratos, que monofenóis se ligariam ao CuA e que *o*-difenois se ligariam ao CuB. Essa proposta foi reforçada pelas elucidações estruturais providas por Sendovski *et al.* (2011), que, também, forneceram dados que evidenciam a possibilidade da tirosina e o L-Dopa se ligarem de forma diferente ao mesmo sítio ativo da enzima.

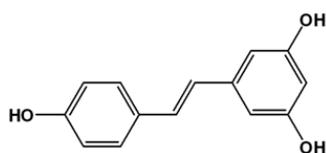
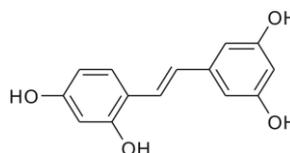
### 1.3. Inibidores naturais da tirosinase

Como a tirosinase participa de, pelo menos, três etapas da melanogênese, sua inibição implica, fundamentalmente, na inibição em si da biossíntese de melanina e esta inibição constitui a base de muitas das formulações empregadas no tratamento de manchas de pele.

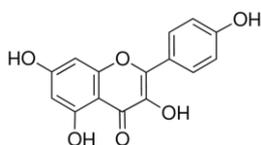
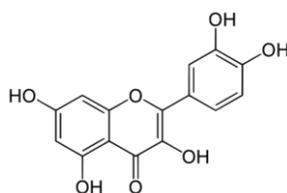
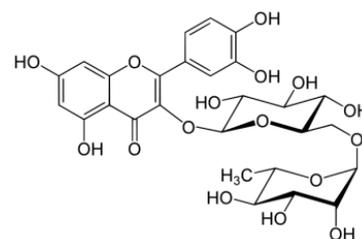
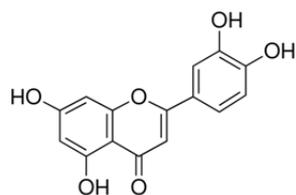
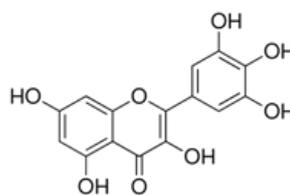
Várias substâncias de origem natural já foram descritas como inibidoras da tirosinase, muitas das quais são compostos fenólicos como, por exemplo, a hidroquinona (**3**) e a arbutina (**4**) (glicosídeo da hidroquinona), presentes em diversas formulações para clareamento de pele (Muñoz *et al.*, 2006).

**3****4**

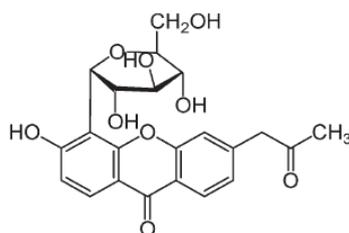
Outros reconhecidos e potentes inibidores são os estilbenos, derivados do resorcinol com diferentes substituintes na posição 4, como o resveratrol (**5**) e oxi-resveratrol (**6**) (Shimizu *et al.*, 2000; Chang, 2009).

**5****6**

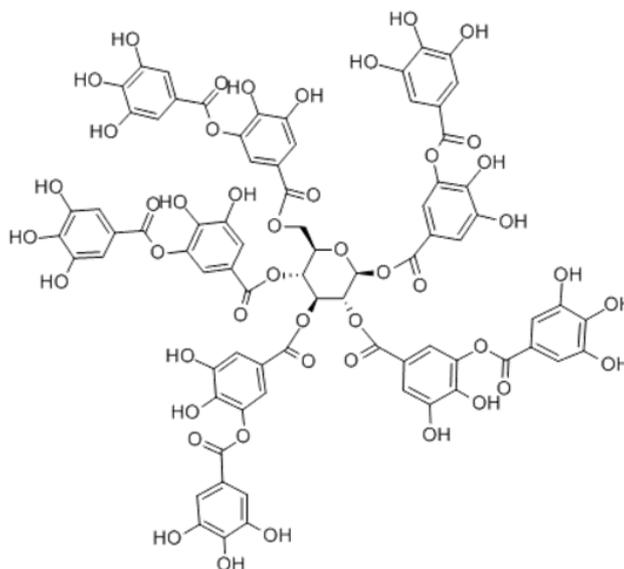
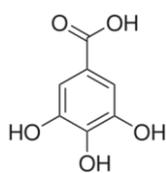
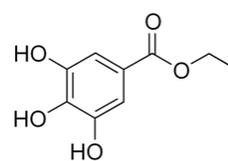
Na mesma linha, flavonoides e biflavonoides (contendo um grupo  $\alpha$ -ceto, tais como flavonas e flavanonas) apresentaram potente atividade anti-tirosinásica (Badria & El Gayyar, 2001; Masuda *et al.*, 2005); flavonóis possuindo uma porção 3-hidroxi-4-ceto, tais como kaempferol (**7**) e quercetina (**8**), quelam, por inibição competitiva, o cobre no sítio ativo da enzima, levando à inativação irreversível da tirosinase (Kubo & Kinst-Hori, 1999a; Kubo *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 1999; Kubo *et al.*, 2007); a rutina (**9**), que é um glicosídeo da quercetina, também inibe a tirosinase, porém é bem menos ativa do que sua porção aglicona (Chang, 2009). Além disso, atividade anti-tirosinásica também foi descrita para a flavona luteolina (**10**) (Kim & Uyama, 2005), o flavonol miricetina (**11**), isoflav-3-enos, isoflavanas e isoflavonas (Chang, 2009).

**7****8****9****10****11**

Algumas chalconas preniladas naturais já demonstraram potente ação anti-tirosinásica (Nerya *et al.*, 2004), bem como a cumarina aloesina (**12**), isolada de *Aloe vera* (Jin *et al.*, 1999; Masamoto *et al.*, 2003; Kim & Uyama, 2005; Chang, 2009).

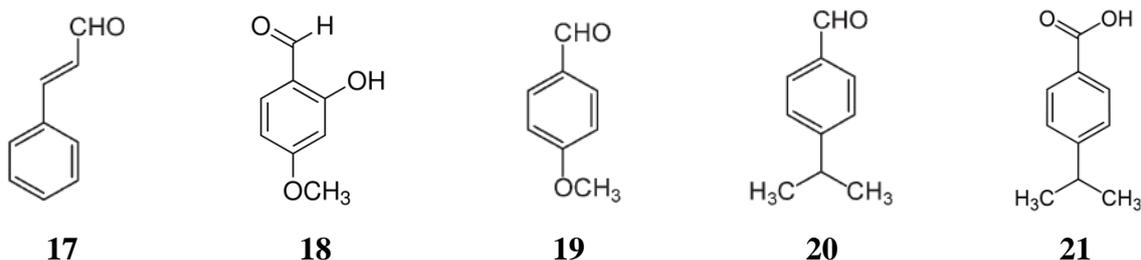
**12**

Taninos também apresentam atividade anti-tirosinásica, como é o caso do galotanino (**13**). São igualmente ativos inibidores da tirosinase, o ácido gálico (**14**) e os seus alquil ésteres (**15**) e (**16**) (respectivamente, galatos de metila e etila), o primeiro fruto da hidrólise alcalina, ou ácida, de taninos, os últimos obtidos, obviamente, por esterificação deste ácido (Kubo, 1999; Kubo, Chen & Nihei, 2003).

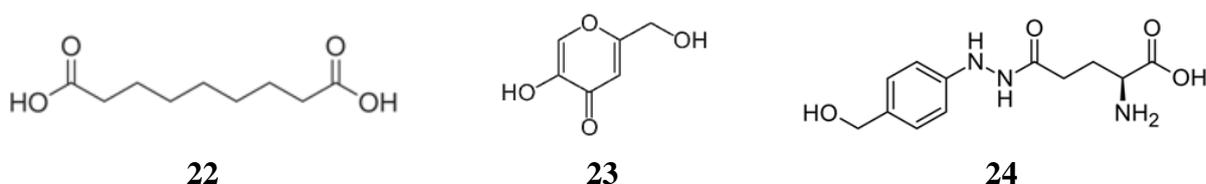
**13****14**
**15****16**

Evidências corroboram a hipótese de uma inibição competitiva do processo quando se emprega o ácido gálico ou seus derivados. Ou seja, o ácido compete com o L-Dopa pelo sítio ativo onde ocorre a oxidação (Shahidi & Naczki, 1995), sendo que as *o*-quinonas assim produzidas podem condensar entre si através de uma adição de Michael, produzindo um intermediário quinol-quinona relativamente estável (Sayre & Nadkarni, 1994).

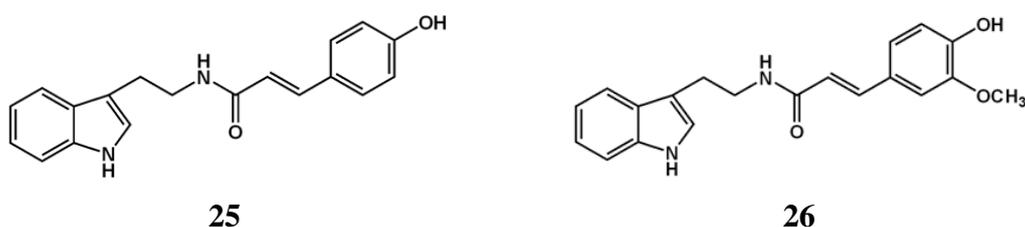
Processos inibitórios da tirosinase claramente não competitivos são gerados por aldeídos alifáticos  $\alpha,\beta$ -insaturados, em especial os (2E)-alquenais alifáticos, que formam uma base de Schiff com um grupo amino primário na enzima tirosinase ao invés de se ligarem ao centro ativo binuclear de cobre (Kubo & Kinst-Hori, 1998a e 1999b). O grupo aldeído é conhecido por reagir com grupos nucleofílicos biologicamente importantes tais como grupos sulfidríla, amino e hidroxila. Além disso, aldeídos aromáticos ou derivados do benzaldeído, tais como cinamaldeído (**17**), 2-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (**18**), anisaldeído (**19**), cuminaldeído (**20**) e ácido cúmico (**21**) são inibidores da tirosinase (Kubo & Kinst-Hori, 1998b; Kubo & Kinst-Hori, 1999c; Lee *et al.*, 2000; Ha *et al.*, 2005).

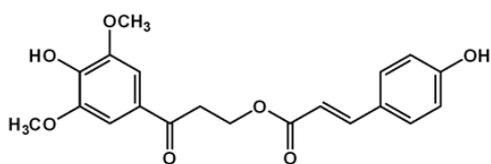


Também são exemplos de inibidores da tirosinase os metabólitos de origem fúngica ácido azeláico (**22**), isolado de *Pityrosporum ovale* (Schallreuter & Wood, 1990; Kim & Uyama, 2005), ácido kójico (**23**), isolado de várias espécies de *Aspergillus*, *Penicilium* e de algumas bactérias (Parrish *et al.*, 1966; Wiley *et al.*, 1942; Niwa & Akamatsu, 1991; Bentley, 2006) e agaritina (**24**), isolada de espécies de *Agaricus* (Madhosingh & Sundberg, 1974; Espín *et al.*, 1998; Kim & Uyama, 2005).

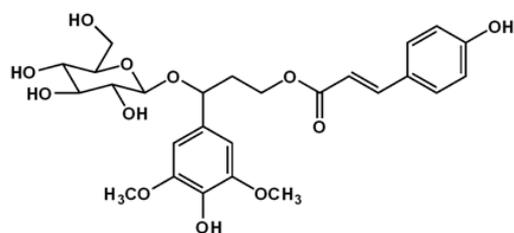


Já foram descritos como fortes inibidores da tirosinase dois alcaloides derivados da serotonina, N-*p*-cumaroilserotonina (**25**) e N-feruloilserotonina (**26**), e dois fenilpropanoides derivados do ácido *p*-cumárico, 3-*O-p*-cumaroil-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxi-fenil)-1-propanona (**27**) e 3-*O-p*-cumaroil-1-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-1-*O*- $\beta$ -D-gulcopiranosilpropanol (**28**) (Sultana & Lee, 2009).



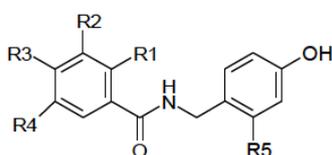


27



28

Na mesma categoria, encontram-se N-benzilbenzamidás (**29a** a **29d**), cujo esqueleto estrutural é análogo ao das chalconas, mas com uma porção amida (e não a ligação dupla) conectando os dois anéis aromáticos (Chang, 2009).

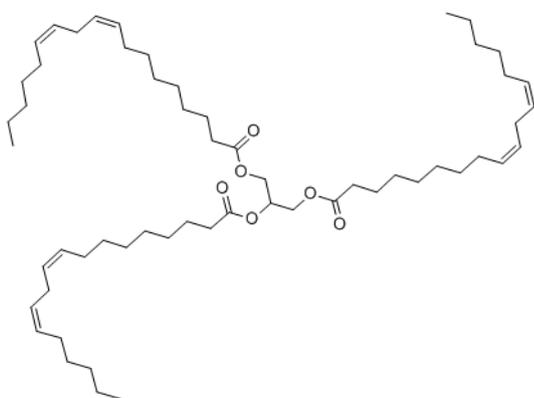


29

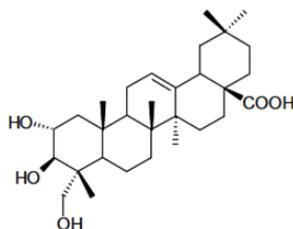
(**29a** = 3,5,2',4'-tetra-hidroxi: R1=R3=H, R2=R4=R5=OH; **29b** = 2,4,2',4'-tetra-hidroxi:

R1=R3=R5=OH, R2=R4=H; **29c** = 3,5,4'-tri-hidroxi: R1=R3=R5=H, R2=R4=OH; **29d** = 2,4,4'-tri-hidroxi: R1=R3=OH, R2=R4=R5=H)

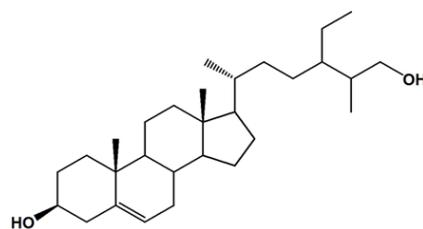
Finalmente, a trilinoleína (**30**), um triacilglicerol, demonstrou ser um inibidor não competitivo da tirosinase tão potente quanto o ácido kójico (Jeon *et al.*, 2006) e, também, existem alguns esteroides caracterizados como inibidores da tirosinase, como é o caso do ácido arjunólico (**31**) e do estigmast-5-en-3 $\beta$ ,26-diol (**32**) (Sabudak *et al.*, 2006; Ullah *et al.*, 2007).



30



31

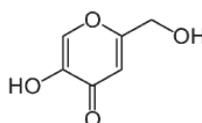


32

No desenvolvimento de uma formulação, deve-se levar em conta não só a capacidade inibidora da substância, mas também sua permeabilidade celular, de forma que inibidores das classes dos lipídios de cadeia longa e esteroides com capacidade inibidora moderada possuem, por outro lado, maior permeabilidade na pele humana e, logo, podem gerar formulações bem sucedidas (Chang, 2009).

#### 1.4. O ácido kójico como inibidor padrão da tirosinase

O ácido kójico (5-hidroxi-2-(hidroximetil)- $\gamma$ -pirona) (**23**) é um inibidor padrão comumente usado em estudos de inibição da tirosinase. Ele é um bom quelador de íons de metais de transição, sendo também um bom sequestrador de radicais livres (Kim & Uyama, 2005).



**23**

O ácido kójico inibe tirosinases de várias bactérias, cogumelos, plantas e artrópodes, sendo usado atualmente como um agente branqueador da pele e como aditivo em alimentos para prevenir o escurecimento enzimático (Chang, 2009). Esta inibição é competitiva em se tratando da atividade monofenolásica e mista para a atividade difenolásica da tirosinase de cogumelos (Chang, 2009). Segundo Sendovski *et al.* (2011), o mecanismo sugerido para explicar esta inibição baseia-se na quelação do cobre no sítio ativo da enzima. Além disso, o ácido kójico reduz a *o*-quinona a *o*-difenoil, prevenindo, assim, a formação da melanina. Todavia, observou-se recentemente que o ácido kójico também é capaz de se complexar com um sítio diferente do ativo, indicando a possibilidade de um mecanismo de inibição não competitiva, contraposta à própria possibilidade de migração (plasticidade) do cobre (Sendovski *et al.*, 2011).

Portanto, apesar de os mecanismos de inibição da tirosinase pelo ácido kójico ainda constituírem objetos de investigação, ele é um dos inibidores mais empregados devido à sua eficácia, relativa estabilidade, facilidade de manuseio e disponibilidade no mercado, sendo usado, também, como padrão de comparação em estudos de inibição da tirosinase.

## 1.5. Objetivos

### 1.5.1. Objetivos gerais

- Avaliar o potencial de inibição da tirosinase de extratos de plantas nativas e exóticas presentes no cerrado brasileiro;
- Estudar a inibição da tirosinase, pelos extratos testados, centrando-se na etapa de conversão de L-DOPA em dopacromo;
- Selecionar e utilizar os extratos mais promissores como agentes inibidores da tirosinase na preparação de formulações cosméticas.

### 1.5.2. Objetivos específicos

- Selecionar plantas nativas e exóticas do cerrado, classificá-las botanicamente e preparar extratos etanólicos secos de uma ou mais partes vegetais das espécies escolhidas;
- Selecionar substâncias para serem utilizadas como padrões de referência e caracterizá-las por métodos cromatográficos (CLAE-UV) e espectrométricos (UV-Vis, IV e RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ ) a fim de adquirir conhecimentos e domínio sobre estas técnicas analíticas e de obter informações que possam ser úteis na análise comparativa dos extratos testados;
- Caracterizar e padronizar os extratos vegetais por métodos cromatográficos e espectroscópicos, comparando os resultados entre si e com os padrões selecionados;
- Realizar testes de inibição da tirosinase com os extratos e os padrões utilizando métodos espectroscópicos (UV-Vis) e um método alternativo com discos de batata.
- Selecionar os extratos mais ativos contra a tirosinase e submetê-los a análises complementares por métodos cromatográficos e espectrométricos (CLAE-DAD, CLAE-EM e RMN) a fim de tentar obter informações adicionais que permitam diferenciar estes extratos dos demais.
- Obter formulações cosméticas de uso tópico contendo os extratos mais ativos e submetê-las a um estudo de estabilidade primária.
- Avaliar a atividade anti-tirosinásica das formulações contendo os extratos mais ativos, comparando seus resultados entre si e com aqueles obtidos para os extratos.

## *Capítulo 2*

### **METODOLOGIA**

## 2. Metodologia

Na FIG. 4, há um fluxograma com a sequência de etapas seguidas para a realização deste trabalho.

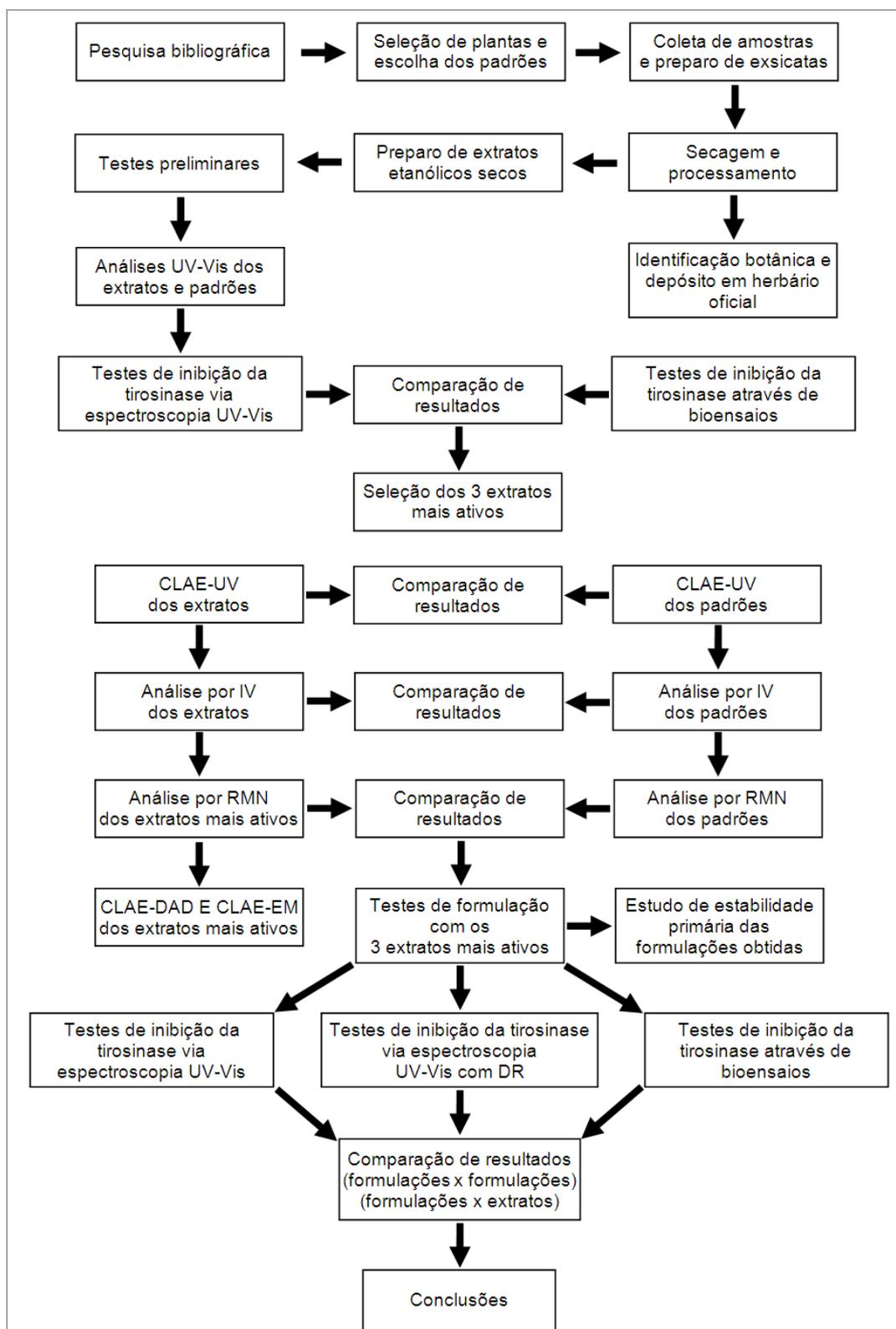


FIGURA 4 – Fluxograma de delineamento das etapas deste trabalho.

## 2.1. Equipamentos, reagentes e materiais

### 2.1.1. Equipamentos

- Moinho de laboratório John Willey & Sons – foi utilizado na moagem das plantas para o preparo dos extratos.
- Espectrofotômetro UV-Vis Hitachi modelo U-2010 Spectrophotometer, série 9713-002, versão room 2550 01 – foi utilizado para registrar espectros no UV-Vis de extratos e padrões e para gerar curvas de formação de dopacromo nos testes de inibição enzimática em tempo real.
- Espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo UVPC série 1601 (pertencente à indústria Florais de Minas, Itaúna-MG) – foi utilizado na geração dos espectros no UV-Vis dos extratos estudados.
- Espectrofotômetro UV-Vis Varian modelo Cary 100 Bio Spectrophotometer UV1006m029 equipado com suporte para leitura em refletância difusa – foi utilizado para registrar curvas de formação de dopacromo nos testes de inibição enzimática em tempo real envolvendo as formulações obtidas com os extratos mais ativos.
- Sistema de CLAE Shimadzu composto por duas bombas de CLAE Shimadzu modelo LC-AT, detector UV-Vis Shimadzu modelo Prominence SPD-20A com dois canais de leitura, válvula de injeção manual de amostras com *loop* de 20  $\mu\text{L}$ , seringa de injeção de amostras SGE de 250  $\mu\text{L}$  com agulha sem bisel, coluna cromatográfica Agilent modelo Zorbax ODS (octadecilsilano) / C18 (250 mm de comprimento x 4.6 mm de diâmetro interno x 0.5  $\mu\text{m}$  de diâmetro médio das partículas da fase estacionária) utilizando o programa LC Solution – foi utilizado para gerar os cromatogramas das soluções contendo os extratos vegetais testados.
- Sistema de CLAE Shimadzu equipado com DAD (detector de arranjo de diodo) composto por duas bombas de CLAE Shimadzu modelo LC-10AD, um módulo com barramento de comunicação Shimadzu modelo CBM-10A, um detector DAD (detector de arranjo de diodo) Shimadzu modelo SPD-M10A *VP* e sistema de injeção automática de amostras Shimadzu modelo SIL-10AF contendo o programa Class LC10 – foi utilizado para gerar os cromatogramas e espectros no UV-Vis.
- Espectrômetro infravermelho Varian modelo FTIR Spectrometer 660 – foi utilizado na geração dos espectros no IV.
- Espectrômetros de RMN Bruker *Avance* DRX 400 e DPX 200 – foram utilizados para gerar os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135.

- Sistema de cromatografia líquida acoplado a um analisador de massas tipo *ion trap* LC-MS/MS(n) Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus (Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo – CA-IQ-USP) – foi utilizado na análise dos extratos mais ativos.
- Câmera fotográfica Kodak EasyShare C360 5.0 mega pixels – foi utilizada para fotografar amostras de plantas e extratos e também na geração das imagens usadas nos testes de inibição enzimática da tirosinase através de um bioensaio com discos de batata.
- Programas computacionais Microsoft Excel v. 7.0, Microcal Origin Pro v. 8.0 e Adobe Photoshop v. 7.0.1.
- Balança analítica Quimis, modelo Q-ILA2104, 210 g/ 0,1 mg.
- Balança eletrônica Digimed KN1000C, classe de exatidão II, série 04G6.
- Banho de ultrassom UltraCleaner 800A com aquecimento.
- Evaporador rotativo Büchi Waterbath, modelo B-480 e Fisaton modelo 802, série 531782.
- Banho Buchi Waterbath B-480.
- Deionizador de água Millipore modelo Milli-Q.
- Banho de ultra-som Branson modelo 1510.
- Micro-aspirador / bomba de vácuo Nevoni modelo 5005.

### 2.1.2. Reagentes e materiais

- Enzima tirosinase (Sigma – Aldrich, CAS 9002-10-2, lote EC 232-653-4).
- L-Dopa - 3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina (Aldrich, CAS 59-92-7, lote EC 200-445-2).
- Ácido acético glacial P.A. (Merck).
- Ácidos cafeico e gálico (gentilmente cedidos pela Profa. Lucienir P. Duarte, DQ /UFMG).
- Ácido kójico (Acros Organics, lote A0217045001).
- Álcool cetílico (Oxiten, lote 110505C01027).
- Álcool cetosteárfico etoxilado (Volp, lote 2/2175831 F03).
- Álcool etílico (etanol) com grau de pureza comercial (Minálcool).
- $\beta$ -amirina (produto natural disponível no laboratório).
- Brometo de cetiltrimetilamônio (Vetec, lote 043371).
- Estigmasterol (Sigma, lote 56H5001).
- Galato de metila (produto natural isolado por Jociani Ascari e cedido gentilmente pela Profa. Maria Amélia D. Boaventura, DQ / UFMG).
- Glicerina (Oxiten, lote 110214C00928 F02).
- Hidroquinona (Nuclear, lote 01060969).

- Imidazolinidil uréia (Induchem, lote 313905).
- Luteolina (Sigma, lote 116K4078).
- Metanol grau HPLC (Tedia, lote 1002065R).
- Monoestearato de glicerila (Nacional, lote 2011092819).
- Nipagin (metilparabeno) (Thor, lote BZ1274411308 F01).
- Nipazol (propilparabeno) (Thor, lote PP330909 F04).
- Óleo mineral (Plury Química, lote 2102680).
- Palmitato de isopropila (Polytechno, lote PA80321).
- Quercetina di-hidratada (Sigma, lote 110K1836).
- Rutina hidratada (Sigma, lote 085K0196).
- Solução tampão fosfato de sódio 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,0 (Nalgon, lote 2143, e Synth, lote 109085).
- Cubetas de quartzo com capacidade volumétrica de 4,5 mL, 190 a 2500 nm, marca Micronal modelo 100-QS K 283.
- Cubetas descartáveis para espectrofotômetro de polimetilmetacrilato com capacidade volumétrica de 4,5 mL, faixa de leitura de 280 a 800 nm, caminho ótico de 10 mm, marca Kartell S.P.A. lote 2823/08.
- Filtros descartáveis para seringa Millipore modelo Millex 0,45 µm.
- Fatiador de batatas marca Tramontina.
- Micropipeta automática Finnpipette Colour 4027, Lab systems de 200 – 1000 µL, série E19971.
- Micropipeta automática Kacil de 100 µL, série 0037201.
- Termômetro Incoterm, série 313675.
- Seringas descartáveis BD de 5 mL.

### 2.1.3. Preparo de reagentes

- Soluções-amostra de extratos vegetais (Bracarense, 2008)

Alíquotas de 10 ou 30 mg de cada extrato vegetal a ser testado foram dispersadas e ou dissolvidas em 10 mL de tampão fosfato pH 7. As soluções contendo 1 e 3 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, foram armazenadas sob refrigeração (5 ± 3 °C).

- Soluções de ácido kójico (Bracarense, 2008)

Adicionaram-se, em um balão volumétrico, 10 ou 30 mg de ácido kójico previamente dissolvido em q.s. de solução tampão fosfato pH 7 e completou-se o volume para 10 mL com solução tampão

fosfato pH 7. Estas soluções contendo 1 e 3 mg mL<sup>-1</sup>, respectivamente, foram mantidas em banho de gelo (1 ± 1 °C) ou armazenadas sob congelamento (-18 °C).

- Solução de L-Dopa (4 mg mL<sup>-1</sup>) (Bracarense, 2008)

Uma alíquota de 100 mg de L-Dopa foi transferida para um balão volumétrico e dissolvida em 25 mL de solução tampão fosfato pH 7; esta solução foi previamente desaerada em banho de ultrassom por 15 min sempre que usada. Esta solução foi mantida ao abrigo da luz em banho de gelo a 1 ± 1 °C.

- Solução de tirosinase (13 U mL<sup>-1</sup>) (Bracarense, 2008)

Uma alíquota de 4,7 mg de tirosinase (5370 U mg<sup>-1</sup>) foi transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL. Em seguida, completou-se o volume com solução tampão fosfato pH 7, obtendo-se uma concentração de 504,78 U mL<sup>-1</sup>. Foram transferidos 0,65 mL (650 µL) desta solução para um balão volumétrico de 25 mL, completando-se o volume com tampão fosfato pH 7. Esta solução (13 U mL<sup>-1</sup>) foi mantida ao abrigo da luz em banho de gelo a 1 ± 1 °C.

- Soluções utilizadas nas análises cromatográficas (adaptado de Prediger *et al.*, 2008)

Alíquotas de 10 mg de cada extrato vegetal ou padrão (ácido cafeico, ácido gálico, ácido kójico, β-amirina, galato de metila, hidroquinona, luteolina, quercetina e rutina) foram diluídas, separadamente, em 1 mL de metanol, homogeneizadas, filtradas usando filtros Millipore Millex 0,45 µm e transferidas para *vials* de cor âmbar.

- Fase móvel A

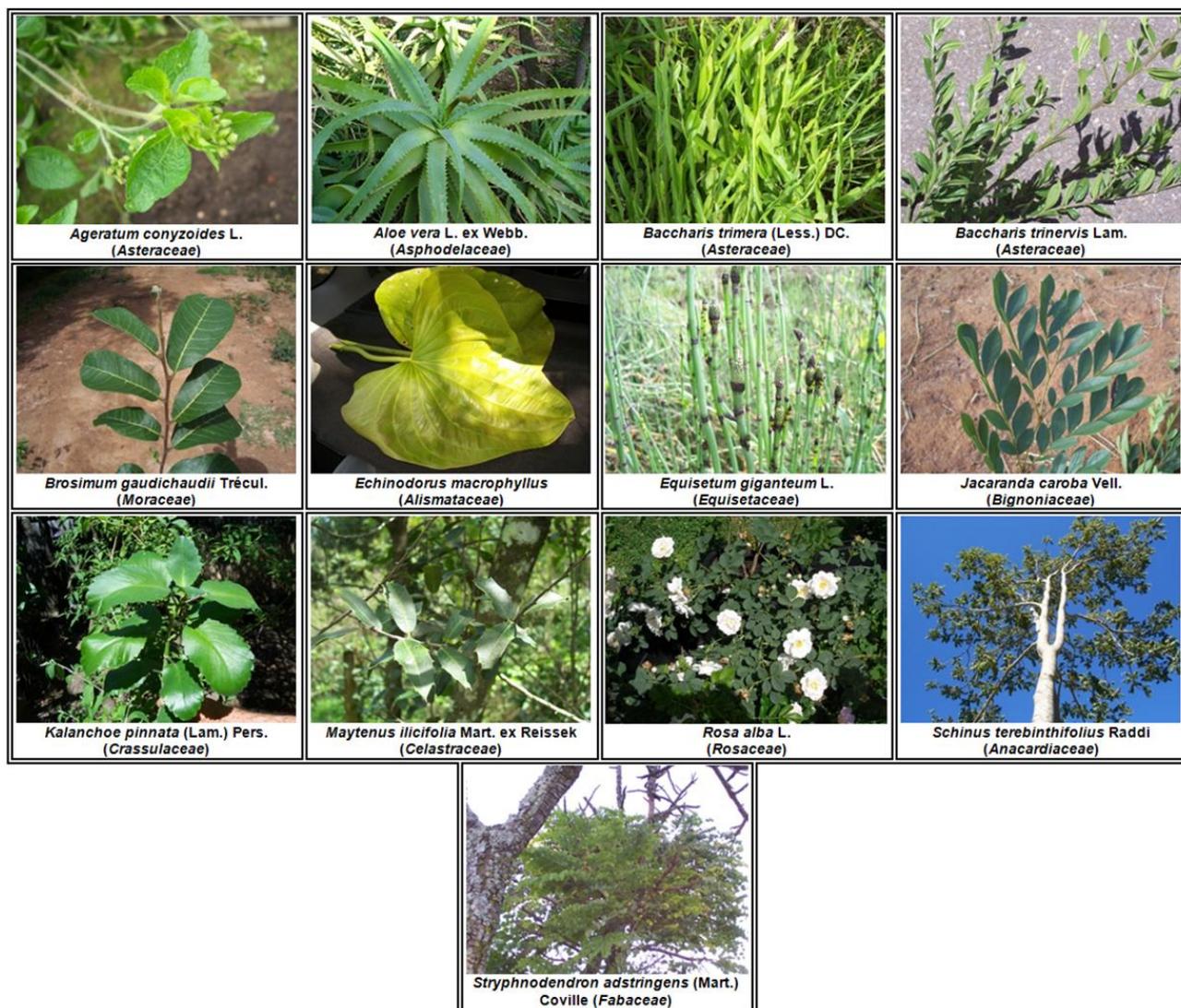
Um mistura de metanol e ácido acético, ambos grau HPLC, na proporção de 99,7 : 0,3, pH 5,5, foi usada como fase móvel A.

- Fase móvel B

Água purificada (recém deionizada), metanol grau HPLC e ácido acético grau HPLC foram misturados na proporção de 79,7:20:0,3. Uma pequena quantidade de brometo de cetiltrimetilamônio (tensoativo) foi adicionada ao meio com o intuito de reduzir a tensão superficial da fase móvel B, tornando seu fluxo no sistema de CLAE mais constante e uniforme e contribuindo para gerar uma linha de base mais estável, com uma resposta do sistema mais segura e confiável. O pH do solvente B foi 4,0.

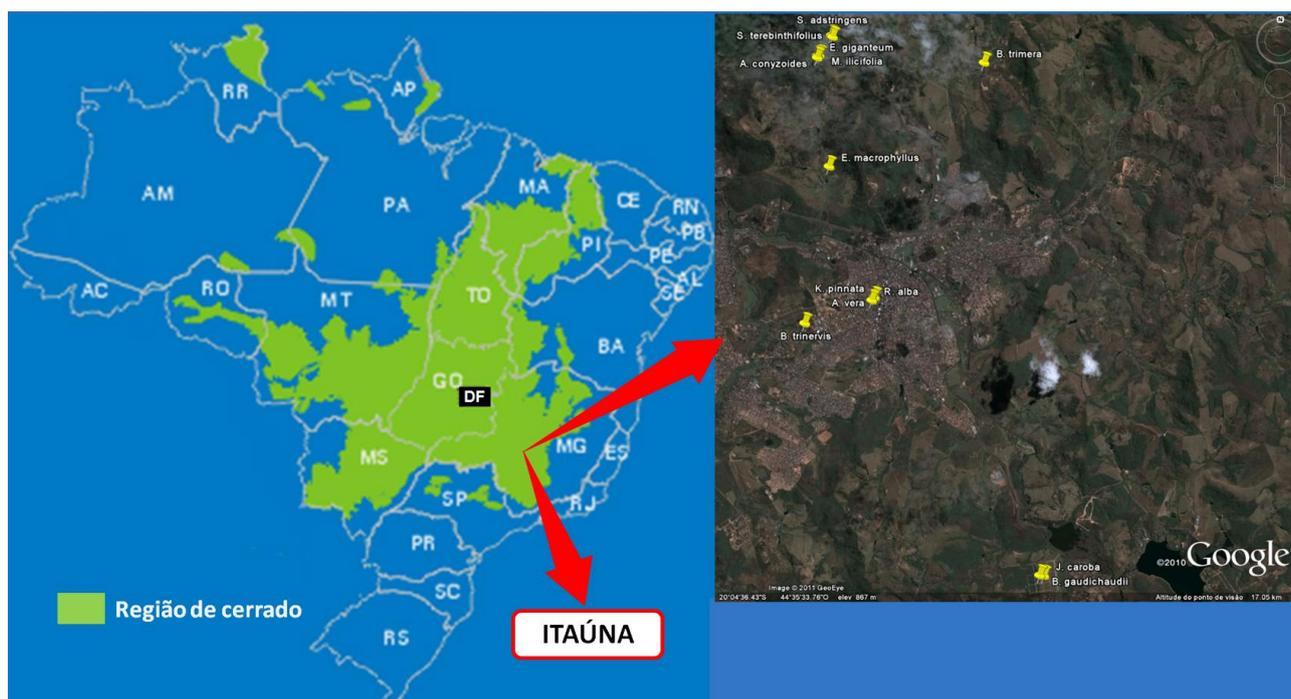
## 2.2. Seleção, coleta e classificação botânica das plantas

Treze plantas nativas ou exóticas de interesse presentes na região do cerrado foram coletadas (**FIG. 5**).



**FIGURA 5** – Fotos das plantas selecionadas para o estudo. Autor: Isaac F. Corradi.

A coleta foi realizada na cidade de Itaúna (MG, Brasil) e vizinhanças, seguindo as técnicas usuais para plantas vasculares (Stace, 1989). Os pontos de coleta foram devidamente localizados por GPS (sistema de posicionamento global), conforme mostrado na **FIG. 6, p. 20**, e na **TAB. 1, p. 20**. Exsicatas das espécies amostradas foram depositadas no herbário da Universidade Federal de Minas Gerais (Herbário BHCB) e sua identificação foi feita pelo Prof. Alexandre Salino (ICB / UFMG) usando a literatura taxonômica e por comparação com outros espécimes já classificados. As espécies foram organizadas e classificadas de acordo com o sistema de classificação botânica do APG II (APG II, 2003). Os números de depósito no BHCB, os códigos de identificação, as partes usadas de cada planta são mostrados na **TAB. 1, p. 20**.



**FIGURA 6** – Mapa do Brasil destacando a região de cerrado e a localização dos pontos de coleta em Itaúna, Minas Gerais. Adaptado de: Embrapa, 2011. In: <http://www.cpac.embrapa.br/cerrado.htm/>; Google Earth, 2010. Acesso em 23/05/2011.

**Tabela 1:** Classificação botânica, dados de localização dos pontos de coleta e números de depósito no herbário BHCb das plantas estudadas

Família	Nome científico	Coordenadas de localização*	Nº BHCb
Alismataceae	<i>Echinodorus macrophyllus</i> (Kunth) Micheli	20°03'15,56" S, 44°35'24,72" W	140210
Anacardiaceae	<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	20°01'56,55" S, 44°35'27,11" W	140206
Asphodelaceae	<i>Aloe vera</i> L.	20°04'34,26 S, 44°34'51,66" W	148429
Asteraceae	<i>Ageratum conyzoides</i> L.	20°02'08,81" S, 44°35'35,50" W	140211
	<i>Baccharis trimera</i> (Less.) DC.	20°02'07,83" S, 44°33'47,57" W	148427
	<i>Baccharis trinervis</i> Lam.	20°04'52,02" S, 44°35'35,86" W	140203
Bignoniaceae	<i>Jacaranda caroba</i> Vell.	20°07'19,31" S, 44°32'54,56" W	140208
Celastraceae	<i>Maytenus ilicifolia</i> Mart. ex Reissek	20°27,34" S, 44°35'34,27" W	140204
Crassulaceae	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers.	20°04'34,22" S, 44°34'51,69" W	148430
Equisetaceae	<i>Equisetum giganteum</i> L.	20°02'07,92" S, 44°35'35,57" W	140212
Fabaceae	<i>Stryphnodendron adstringens</i> (Mart.) Coville	20°01'55,10" S, 44°35'27,06" W	140207
Moraceae	<i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul.	20°07'19,11" S, 44°32'57,95" W	140205
Rosaceae	<i>Rosa alba</i> L.	20°4'36,10" S, 44°34'53,26" W	140209

\* Coordenadas de localização dos sítios de coleta das plantas obtidos por GPS.

### 2.3. Preparo dos extratos vegetais

As plantas foram secadas ao abrigo da luz, moídas em moinho de facas e submetidas ao preparo dos extratos, exceto *A. vera* e *K. pinnata*, cujas folhas são carnosas, com alto teor de água. Nestes dois casos, os extratos foram preparados a partir dos materiais frescos.

No preparo dos demais extratos, as plantas secas e pulverizadas foram maceradas à temperatura ambiente em etanol comercial por 48 h. Os extratos etanólicos foram filtrados em gaze, o solvente foi removido em evaporador rotatório e os extratos secos foram acondicionados em frascos vedados e armazenados a  $5 \pm 3$  °C. A codificação usada para a identificação dos extratos está na **TAB. 2**.

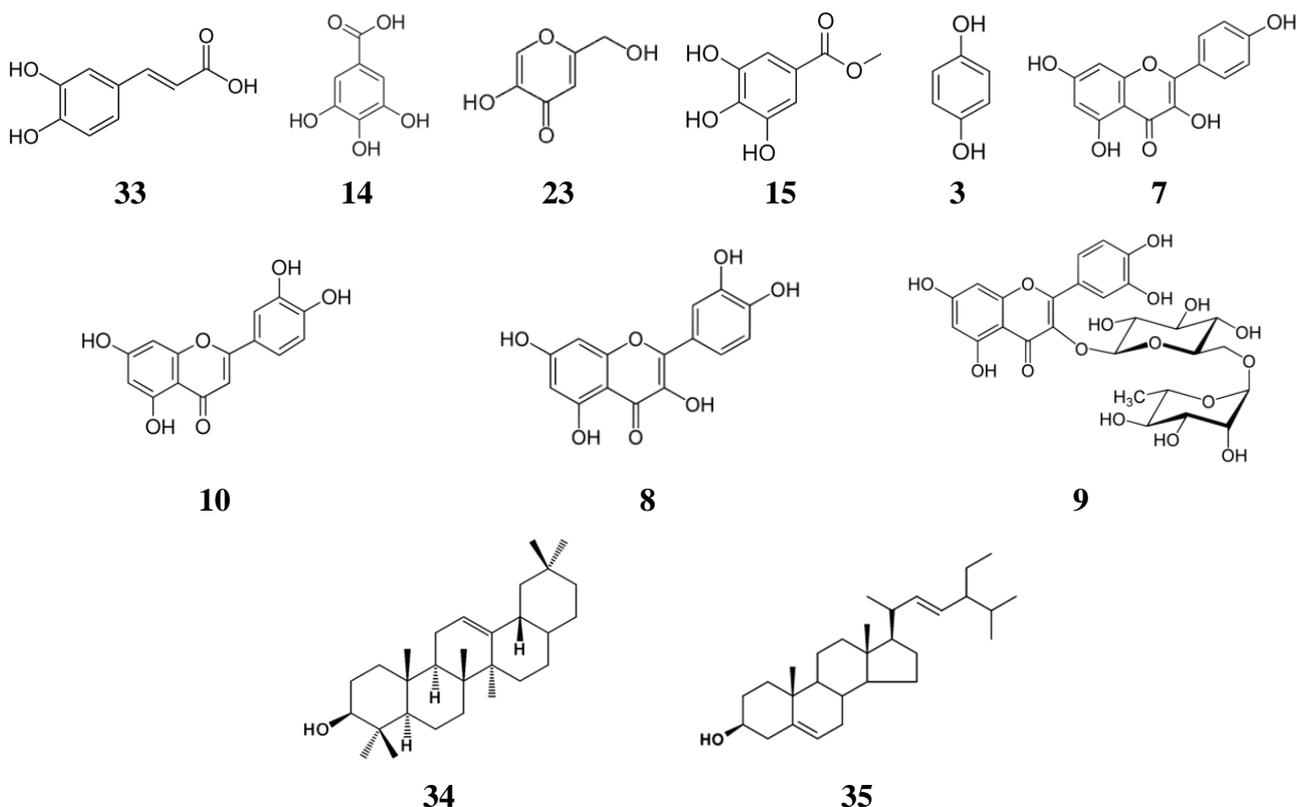
**Tabela 2:** Codificação dos extratos vegetais

Código	Espécie	Nome popular	Partes usadas
IC-01	<i>J. caroba</i>	caroba	folhas
IC-02	<i>B. trimera</i>	carqueja	folhas
IC-03	<i>B. gaudichaudii</i>	mamacadela	folhas
IC-04	<i>K. pinnata</i>	saião, folha-santa ou folha-da-fortuna	folhas
IC-05	<i>J. caroba</i>	caroba	caules
IC-06	<i>B. gaudichaudii</i>	mamacadela	caules
IC-07	<i>K. pinnata</i>	saião, folha-santa ou folha-da-fortuna	caules
IC-08	<i>S. terebinthifolius</i>	aroeira	folhas
IC-09	<i>A. vera</i>	babosa	folhas
IC-10	<i>S. adstringens</i>	barbatimão	folhas
IC-11	<i>B. trinervis</i>	santaninha	partes aéreas
IC-12	<i>M. ilicifolia</i>	espinheira-santa	folhas
IC-13	<i>E. macrophyllus</i>	chapéu-de-couro	folhas
IC-14	<i>R. alba</i>	rosa branca	partes aéreas
IC-15	<i>E. giganteum</i>	cavalinha	caules
IC-16	<i>A. conyzoides</i>	mentrasto	partes aéreas
IC-17	<i>S. terebinthifolius</i>	aroeira	cascas do tronco
IC-18	<i>S. adstringens</i>	barbatimão	cascas do tronco

### 2.4. Seleção de substâncias a serem utilizadas como padrões de referência

Algumas substâncias conhecidas foram selecionadas para análise e comparação com os extratos. Na escolha desses padrões, considerou-se a possibilidade de sua ocorrência nas amostras estudadas, ou o fato de alguns deles serem conhecidos inibidores da tirosinase. Os padrões selecionados foram os ácidos

cafeico (**33**), gálico (**14**) e kójico (**23**), galato de metila (**15**), hidroquinona (**3**), kaempferol (**7**), luteolina (**10**), quercetina (**8**), rutina (**9**),  $\beta$ -amirina (**34**), estigmasterol (**35**).



Os padrões acima foram caracterizados por cromatografia (CLAE) e por técnicas espectroscópicas (UV-Vis, IV, RMN) e tiveram sua atividade anti-tirosinásica determinada pelo mesmo método espectroscópico utilizado para avaliar os extratos vegetais.

## 2.5. Caracterização dos extratos e padrões por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)

Para a caracterização dos extratos vegetais por espectroscopia UV-Vis, alíquotas de 30,0 mg de cada extrato foram solubilizadas em quantidade suficiente de metanol PA, completando-se o volume (3,0 mL) com tampão fosfato pH 7; as amostras foram analisadas em cubetas descartáveis de 1,0 cm de caminho ótico em espectrômetro UV-Vis na faixa de 700 a 200 nm. Esta análise foi realizada para e durante os testes de inibição enzimática da tirosinase a fim de avaliar o perfil espectrométrico das amostras no mesmo solvente usado nos experimentos.

Alíquotas de 30,0 mg de cada extrato também foram solubilizadas em 3,0 mL metanol PA e em 3,0 mL de duas misturas de metanol PA e tampão fosfato pH 3 nas proporções de 1:1 e 1:3 e analisadas

em cubetas de quartzo de 1,0 cm de caminho ótico em espectrômetro UV-Vis na faixa de 900 a 220 nm. Esta análise foi realizada antes da padronização dos extratos por CLAE-UV para avaliar espectrometricamente os efeitos da variação de pH no meio e da diluição das amostras, verificando a ocorrência de deslocamento bato ou hipsocrômico e ou efeito hipo ou hiperocrômico nos espectros no UV-Vis.

## 2.6. Testes de inibição enzimática da tirosinase via espectroscopia no UV-Vis

A atividade anti-tirosinásica foi analisada *in vitro* de acordo com o método descrito por Tomita *et al.* (1990), Kamkaen *et al.* (2007) e Ye *et al.* (2010) através da inibição enzimática da conversão de L-Dopa em dopacromo catalisada pela tirosinase e monitorada em tempo real via espectroscopia no UV-Vis. A potência ou concentração ótima da solução de tirosinase, preparada em tampão fosfato pH 7, foi de 13 U mL<sup>-1</sup>, valor estabelecido previamente por Bracarense (2008). Uma unidade (U) da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de aumentar a absorção em 0,001 uA a 475 nm nas condições experimentais seguidas no teste (Kubo *et al.*, 2003). A formação do dopacromo foi monitorada por 900 s em 475 nm ( $\epsilon_{475} = 3600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ). A atividade anti-tirosinásica foi calculada usando a seguinte equação (Kamkaen *et al.*, 2007)

$$\% \text{ inibição de tirosinase} = \frac{(A - B) - (C - D) \times 100}{(A - B)}$$

**EQUAÇÃO 1** – Equação para o cálculo da atividade anti-tirosinásica.

Sendo que A é a absorvância máxima da solução de referência (somente enzima e substrato), B é a absorvância inicial da solução “branco” (tempo = 0), C é a absorvância máxima da solução amostra (amostra + enzima + substrato) e D é a absorvância inicial da solução amostra.

Como controle, foram usados L-Dopa (IC-C) na geração da curva padrão de formação do dopacromo, e L-Dopa acrescido de ácido kójico (IC-AK) na geração da curva padrão de inibição enzimática (TAB. 3, p. 24).

**Tabela 3:** Lista de reagentes, quantidades e sequência de etapas usadas no teste de inibição enzimática

Códigos das Amostras	Sequência de etapas					
	(1) PBS* (mL)	(2) Solução amostra (mL)	(3) Solução enzimática (mL)	(4) Pré- incubação	(5) L-Dopa (mL)	(6) Análises
IC-C	1,9	–	0,1	Pré-incubação da enzima com cada substrato por 300 s	1,0	Obtenção dos espectros ou curvas de formação de dopacromo em 475 nm por 900 s
IC-AK**, IC-01 a IC-18 e padrões de referência	0,9	1,0	0,1		1,0	

\*PBS = solução tampão fosfato de sódio pH 7.

\*\* Ácido kójico (IC-AK) foi adicionado na mesma quantidade de cada extrato, ou seja, 1,0 mL. A concentração final de ácido kójico e dos extratos em cada cubeta foi 1 mg mL<sup>-1</sup>.

Posteriormente, o teste descrito acima foi realizado com alíquotas das formulações, concentradas ou diluídas, contendo os extratos mais ativos contra a tirosinase. Ainda com estas formulações, foi realizado um teste de inibição enzimática utilizando espectroscopia no UV-Vis nas mesmas condições, porém com leitura por reflexão difusa (DR) a fim de avaliar o efeito do espalhamento do feixe de radiação UV-Vis provocada pela turvação do meio devida à dispersão das formulações emulsionadas no meio diluente do experimento.

## 2.7. Teste de inibição da tirosinase por bioensaios com discos de batata

Um teste alternativo à análise espectroscópica de inibição da tirosinase foi descrito por Girelli *et al.* (2004), sendo realizado com vegetais contendo esta enzima alvo em abundância, no caso da tirosinase, maçãs e batatas, nas quais a inibição enzimática é estudada “*in situ*”. O método descrito por Girelli *et al.* (2004) foi devidamente adaptado, descartando-se o emprego de fatias de maçã, dado o rápido escurecimento observado, e de fatias inteiras de batatas, para se evitar problemas de contaminação cruzada.

Neste trabalho, optou-se pelo emprego de discos simétricos (10 mm de diâmetro por 3,0 mm de espessura) de batata inglesa branca (*Solanum tuberosum*, cultivar de casca e polpa claras). Nos discos, foram adicionados, de forma sequencial ou alternativa, alíquotas tamponadas (pH 7) de 100 µL de L-Dopa (4 mg mL<sup>-1</sup>), do inibidor padrão ácido kójico (3 mg mL<sup>-1</sup>), de padrões de referência (10 mg mL<sup>-1</sup>), de extratos problemas (10 mg mL<sup>-1</sup>) e de formulações contendo os extratos mais ativos na forma concentrada e diluída (10 mg mL<sup>-1</sup>).

As coordenadas cromáticas iniciais foram registradas fotograficamente logo após o fatiamento dos discos de batata e a adição de soluções tamponadas (pH 7) de ácido kójico ou de extratos sobre os mesmos, sendo tais medidas tomadas como a cor original e inicial dos discos de batata. Em seguida, L-Dopa em solução tamponada (pH 7) foi adicionada sobre cada disco. As imagens e coordenadas finais do experimento foram obtidas 30 min após a adição do L-Dopa. Como controle, foram utilizados, em duplicata, discos de batata sobre os quais foram adicionadas as mesmas soluções-amostras, exceto L-Dopa, e um disco acrescido apenas de L-Dopa.

A conversão das variações de coloração em dados numéricos foi realizada empregando-se o sistema de leitura de coordenadas cromáticas “CIE-L\*a\*b\*” (Conci, 2010), um aplicativo integrante do programa Adobe Photoshop® v. 7.0, e procedeu-se ao tratamento matemático e estatístico dos mesmos.

## 2.8. Padronização e estudo comparativo dos extratos e padrões por CLAE-UV

Um estudo comparativo dos perfis cromatográficos dos extratos e padrões foi realizado a partir da adaptação do método descrito por Prediger *et al.* (2008). No **Quadro 1** estão resumidas as condições cromatográficas utilizadas. As eluições cromatográficas foram realizadas em duplicata ou triplicata.

**Quadro 1:** Condições cromatográficas utilizadas na caracterização e padronização dos extratos e padrões por CLAE-UV

<b>Coluna:</b> Agilent Zorbax ODS, 250mm x 4,6mm i.d. x 0,5µm.			
<b>Fluxo:</b> 0,9 mL/min.			
<b>Detector:</b> UV.			
<b>Canais de leitura:</b> 280 nm e 350 nm.			
<b>Fase móvel:</b> solvente A = metanol / ácido acético (99,7/0,3); solvente B= água / metanol / ácido acético (79,7/20/0,3); tensoativo (brometo de cetiltrimetilamônio).			
<b>Volume de injeção de amostra:</b> 20 µL.			
<b>Sistema de eluição:</b>			
Tempo / min	Solvente A (%)	Solvente B (%)	Eluição
00	0	100	equilíbrio
00 a 10	0 – 25	100 – 75	gradiente linear
10 a 25	50	50	isocrática
25 a 40	80	20	isocrática
40 a 50	0	100	reequilíbrio

Os extratos que demonstraram maior ação anti-tirosinásica, assim como o extrato que apresentou a melhor resolução de picos na primeira bateria de análises cromatográficas, tiveram seu perfil

determinado utilizando-se um sistema de CLAE equipado com DAD (detector de arranjo de diodo). Os espectros no UV-Vis das substâncias referentes aos principais picos observados foram obtidos.

### 2.9. Caracterização dos extratos e dos padrões por espectroscopia na região do infravermelho (IV)

Amostras de 5,0 mg de cada extrato vegetal e dos padrões analisados foram preparadas e incorporadas em pastilhas de brometo de potássio (KBr) para a obtenção dos espectros no IV.

### 2.10. Caracterização e padronização dos extratos mais ativos e dos padrões por ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , de  $^{13}\text{C}$  e DEPT-135 dos extratos mais ativos contra a tirosinase e dos padrões foram obtidos em espectrômetro Bruker *Avance* DPX-200 do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) no DQ da UFMG, operando à temperatura de 300 K. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm usando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna e as constantes de acoplamento ( $J$ ) são fornecidas em Hz.

### 2.11. Teste de incorporação dos extratos mais ativos em uma formulação-base

Os três extratos com maior ação anti-tirosinásica foram incorporados em uma formulação cosmética de uso tópico constituída por um creme preparado com os reagentes do **Quadro 2**.

**Quadro 2:** Composição do creme usado como veículo-base para incorporação dos extratos mais ativos.

Fases e reagentes	Quantidade (% m/m)
Fase A (oleosa):	
Álcool cetílico	3,0
Álcool cetosteárilico etoxilado	5,0
Palmitato de isopropila	1,5
Óleo mineral	2,0
Monoestearato de glicerila	3,0
Nipazol (propilparabeno)	0,05
Fase B (aquosa):	
Água	80,85
Glicerina	3,0
Nipagin (metilparabeno)	0,1
Fase C:	
Imidazolinidil uréia	1,0

No preparo do veículo-base, a fase A foi inicialmente aquecida, após a pesagem e mistura dos reagentes, até cerca de 70 °C. Em seguida, a fase B foi aquecida a aproximadamente 75 °C, até a completa dissolução do nipagin. As fases A e B foram, então, misturadas e mantidas sob agitação mecânica a 300 rpm. Após a completa homogeneização das duas fases iniciais e redução da

---

temperatura abaixo de 40 °C, a fase C foi adicionada, sendo a mistura ainda mantida por agitação a 300 rpm até a incorporação desta última fase (conservante) à mistura das fases A e B.

Alíquotas de 25,0 mg de ácido kójico e dos extratos IC-03, IC-08 e IC-17 foram incorporados em 1,0 g de veículo (creme-base). Para facilitar a incorporação, o ácido kójico e os extratos foram previamente solubilizados em 500 µL de etanol comercial 96 °GL, filtrados em filtro-seringa descartável de 0,45 µm (Millex<sup>®</sup>) para a remoção de eventuais materiais suspensos. Em seguida, as soluções filtradas foram adicionadas aos poucos sobre o creme-base sob agitação constante seguida de sonicação em banho de ultrassom por 30 a 60 s até completa solubilização. Também foram preparadas, nas mesmas condições, algumas formulações nas quais os extratos solubilizados foram incorporados sem filtração. As formulações obtidas, contendo 2,5% m/m de ácido kójico ou de extratos, foram acondicionadas em frascos de vidro com tampa de borracha, envoltos em papel alumínio e armazenados a  $5 \pm 3$  °C.

## *Capítulo 3*

# **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 3. Resultados e discussão

O mercado mundial de fitoterápicos cresce gradativamente em todo mundo, sendo que, desde o ano 2000, já movimentou cifras superiores a vinte e dois bilhões de dólares anuais. O crescimento deste mercado é fruto, ao menos em parte, de uma retomada de valores ecológicos e do resgate da demanda por produtos de origem natural ocorridos desde meados da década de 90. Este movimento curiosamente iniciou-se em países desenvolvidos, onde o uso de medicamentos de origem sintética é bem estabelecido, e ganhou força devido ao aprimoramento de tecnologias farmacêuticas e químicas, o que permitiu um melhor controle de qualidade de fármacos e tornou possível a fabricação de fitoterápicos e fitofármacos seguros, eficazes e com ações reprodutíveis (Yunes *et al.*, 2001).

Recentemente, os governos do Brasil e de outros países em desenvolvimento passaram a dar atenção especial ao uso racional de medicamentos e terapias naturais, como forma de aumentar e melhorar o acesso da população à saúde com custos mais baixos. Exemplo disso é a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), instituída pelo governo federal brasileiro em 2006, com o intuito de promover a melhoria da atenção à saúde, o uso sustentável da biodiversidade brasileira, o desenvolvimento industrial e tecnológico associado à perspectiva de inclusão social e regional, dentre outros fatores (Brasil, 2006).

Segundo Yunes *et al.* (2001), quatro vantagens do uso de fitoterápicos e extratos vegetais brutos são destacadas para justificar seu uso atualmente. A primeira delas é a sinergia de efeitos, pois, de um modo geral, as plantas apresentam vários compostos com efeitos similares. A segunda vantagem é a associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes. A terceira vantagem é o menor risco de efeitos colaterais, considerando que os compostos ativos se apresentam em concentrações reduzidas nas plantas, o que faz com que os riscos de efeitos secundários não desejáveis sejam bem menores. Por último, estão os menores custos de pesquisa, já que, enquanto a descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco envolvem investimentos muito elevados, com custo variando entre trezentos a quinhentos milhões de dólares (Binder, 1994), o desenvolvimento de um novo fitoterápico é alcançado a custos bem menores.

Assim, este trabalho visa a contribuir com a geração de informações que certamente serão úteis para o uso das plantas estudadas como fitoterápicos, em confluência com as tendências acima descritas.

### 3.1. Seleção das plantas e preparo dos extratos

A partir do conhecimento das reações envolvidas na biossíntese de melanina, do importante papel da tirosinase em pelo menos três etapas de sua rota biossintética, foi realizado um levantamento bibliográfico de plantas nativas e exóticas do cerrado com potencial atividade inibidora da tirosinase. Neste levantamento, foram obtidos dados das composições químicas das plantas selecionadas, cruzando-se essas informações com dados da literatura de produtos naturais inibidores da tirosinase.

Assim, foram estudadas treze espécies vegetais, das quais foram obtidos dezoito extratos em função de se trabalhar com partes distintas de algumas delas, como foi o caso, por exemplo, de *Schinus terebinthifolius* e *Stryphnodendron adstringens*, das quais foram preparados extratos das folhas e das cascas do tronco. As espécies selecionadas e seus constituintes associados à inibição da tirosinase estão na **TAB. 4**.

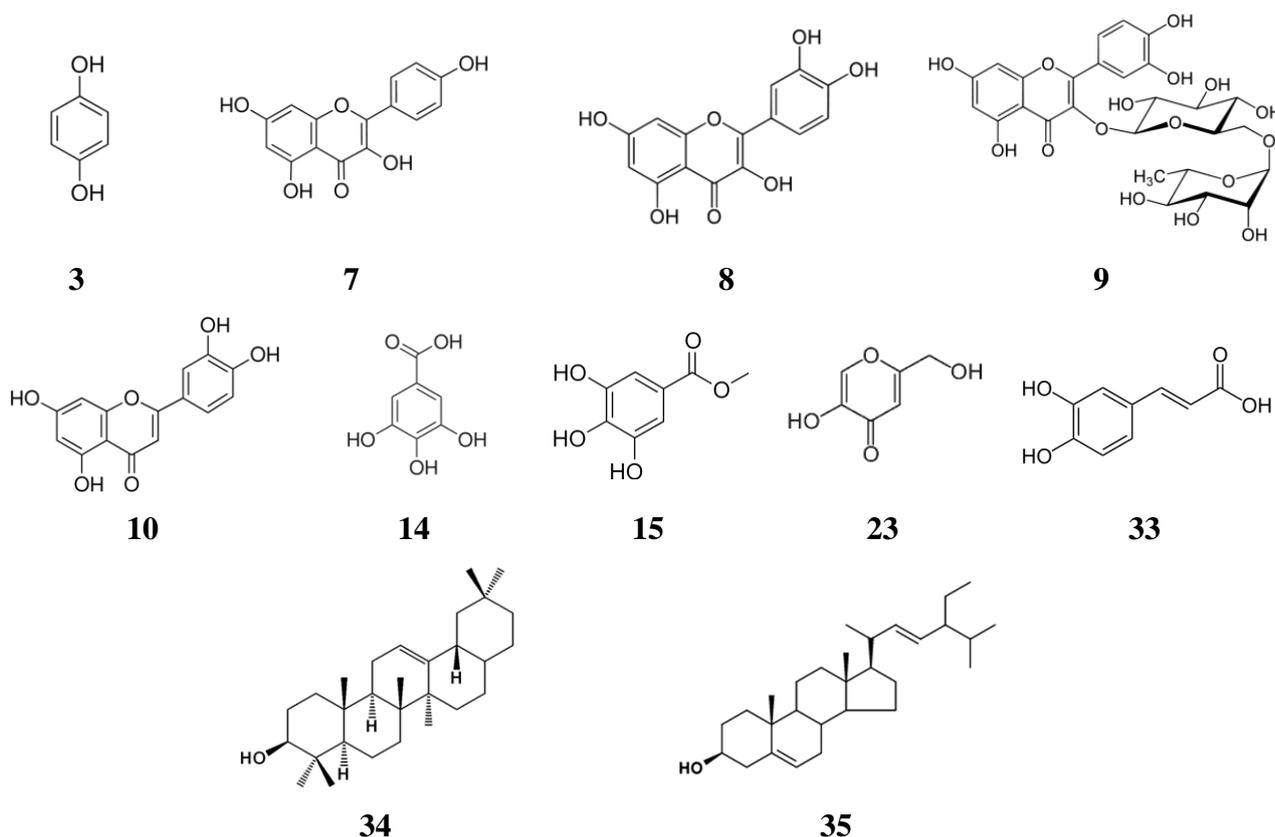
**Tabela 4:** Classes de substâncias com atividade anti-tirosinásica presentes nas plantas estudadas

Nome científico	Constituintes associados à inibição da tirosinase
<i>A. conyzoides</i>	Cumarinas, flavonoides, esteroides, taninos (Kamboj & Saluja, 2011; Castro <i>et al.</i> , 2004).
<i>A. vera</i>	Antraquinonas, cumarinas (aloesina) (Abu-Gabal & Al Saigh, 2008; Chang, 2009; Rajput <i>et al.</i> , 2009; Choi <i>et al.</i> , 1996).
<i>B. gaudichaudii</i>	Compostos fenólicos, cumarinas preniladas, chalconas (Monteiro <i>et al.</i> , 2002; Jacomassi <i>et al.</i> , 2007).
<i>B. trimera</i>	Flavonoides (Gosmann <i>et al.</i> , 2010; Rendon & Vila, 1995).
<i>B. trinervis</i>	Flavonoides (flavonas 6-oxigenadas) (Sharp <i>et al.</i> , 2001; Rojas <i>et al.</i> 2008).
<i>E. giganteum</i>	Ácido gálico, flavonóides, taninos (Lorenzi & Matos, 2008).
<i>E. macrophyllum</i>	Flavonoides, taninos (Tanus-Rangel <i>et al.</i> , 2010).
<i>J. caroba</i>	Taninos, quinonas (hidroquinona) (Gachet & Schühly, 2009; Valadares, 2009).
<i>K. pinnata</i>	Flavonoides, fenóis, taninos (Okwu & Josiah, 2006).
<i>M. ilicifolia</i>	Flavonoides, taninos (BHP, 1996 ; Desmarchelier & Schaus, 2000; Mors <i>et al.</i> , 2000; F. Bras. V, 2010; Queiroga <i>et al.</i> , 2000).
<i>S. adstringens</i>	Flavonoides, taninos (F. Bras. V, 2010).
<i>S. terebinthifolius</i>	Flavonoides, taninos, esteróides e outros compostos fenólicos (El-Massry <i>et al.</i> , 2009; Moustafa <i>et al.</i> , 2007).

As plantas estudadas foram coletadas em pontos mapeados por GPS. Todas as coletas foram realizadas com a anuência dos proprietários dos sítios de amostragem e as quantidades coletadas foram pequenas para que o impacto ambiental fosse insignificante, sem nenhum tipo de agressão ou desequilíbrio ao ecossistema, como reza a atual legislação ambiental brasileira. Feita a coleta, foram preparadas exsicatas que foram depositadas em um herbário credenciado pelo IBAMA, o Herbário do

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (BHCB) para que as espécies botânicas fossem devidamente classificadas, identificadas e rastreadas. Em seguida, as amostras vegetais coletadas foram processadas para a obtenção dos extratos etanólicos secos conforme descrito na Metodologia.

A caracterização e a padronização dos extratos fornecem, obviamente, informações úteis sobre sua composição quali e quantitativa, e são essenciais para assegurar a qualidade, segurança e, assim, possibilitar o uso sistemático e racional dos mesmos em etapas posteriores de formulação de produtos naturais cosméticos e ou farmacêuticos. Além disso, elas também são úteis para avaliar possíveis variações de composição das amostras em função de sua origem ou sazonalidade. Algumas substâncias conhecidas foram utilizadas como padrões, devido à sua ocorrência nas amostras estudadas, e/ou por serem conhecidos inibidores da tirosinase. Os padrões selecionados foram os ácidos gálico (**14**), kójico (**23**) e cafeico (**33**), hidroquinona (**3**), kaempferol (**7**), quercetina (**8**), rutina (**9**), luteolina (**10**), galato de metila (**15**),  $\beta$ -amirina (**34**) e estigmasterol (**35**).



### 3.2. Testes preliminares

Como os testes de inibição enzimática requerem o uso de tampão fosfato pH 7 como solvente para simular o pH fisiológico da pele, foi necessária a adição de um co-solvente para solubilizar os extratos vegetais antes de incorporá-los ao tampão, já que não foi possível realizar a solubilização direta dos extratos neste tampão.

O uso de acetona como co-solvente mostrou-se inadequado, pois a maioria dos extratos apresentou forte turvação neste solvente. Por outro lado, em metanol, ocorreu a solubilização adequada dos extratos. A fim de evitar a presença de eventuais partículas no meio, as soluções metanólicas dos extratos foram filtradas. Além disso, o espectro no UV-Vis do metanol mostrou que o mesmo não interferiria nas leituras espectrométricas a serem realizadas. Portanto, os extratos foram inicialmente dissolvidos em 1 mL de metanol PA, completando-se o volume com tampão fosfato pH 7.

A maioria dos padrões foi solúvel em metanol, exceto o estigmasterol. A  $\beta$ -amirina foi solúvel em metanol após sonicação.

### **3.3. Caracterização dos extratos e padrões por espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis)**

Os extratos e os padrões foram caracterizados inicialmente por espectroscopia no UV-Vis. Os espectros no UV-Vis das amostras testadas encontram-se nos **ANEXOS 1 a 3, p. 91-99**. De um modo geral, as bandas de absorção observadas nos espectros no UV-Vis dos extratos e dos padrões em metanol ficaram entre 380 a 260 nm. A maioria dos extratos também apresentou uma banda de absorção de baixa intensidade ( $< 0,2$  uA), acima de 660 nm.

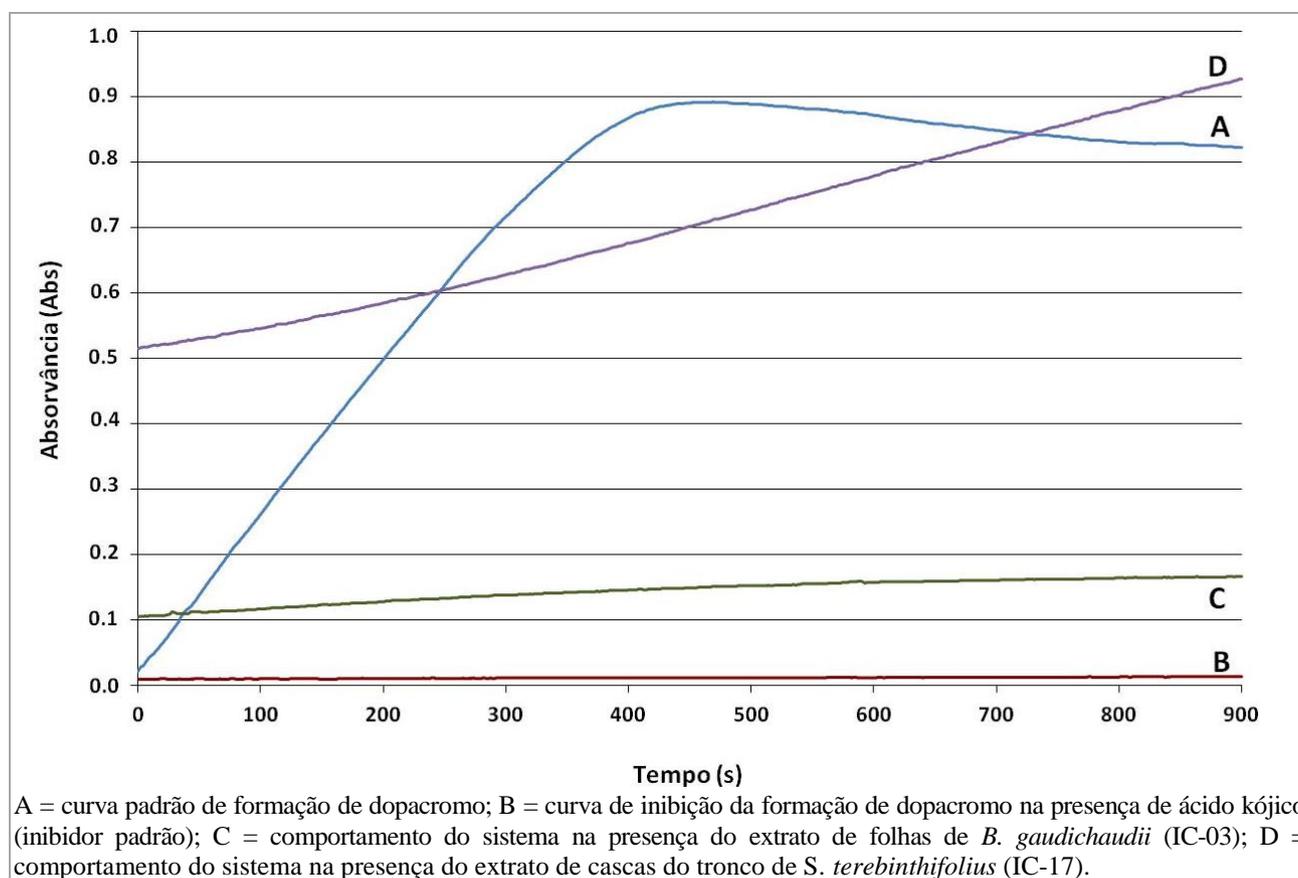
Nos espectros das amostras em tampão fosfato pH 7, observou-se, em geral, um deslocamento batocrômico em relação aos espectros obtidos com metanol, com bandas de absorção máxima em torno de 350 nm, sendo esta uma banda típica de compostos polifenólicos. Em meio tamponado ácido (pH 3), os extratos apresentaram bandas de absorção máxima na região entre 350 e 340 nm, tal como as observadas com a quercetina e luteolina, e bandas intensas em torno de 280 nm, sendo estas últimas bandas típicas de sistemas conjugados, como é o caso dos ácidos kójico e gálico e da hidroquinona, por exemplo. Devido à pequena quantidade disponível, os padrões não foram analisados, via UV-Vis, em tampão ácido.

Os resultados observados para os extratos e os padrões nesta etapa do trabalho foram usados na avaliação de possíveis interferências nos testes espectroscópicos de inibição da tirosinase e na escolha dos comprimentos de onda adotados durante a etapa de padronização dos extratos por CLAE-UV.

### 3.4. Teste de inibição da tirosinase via espectroscopia no UV-Vis

A análise da atividade anti-tirosinásica dos extratos e padrões foi realizada à temperatura ambiente a partir da comparação entre as curvas-padrão de formação de dopacromo obtidas na ausência e na presença dos extratos e dos padrões de referência (ANEXO 4, p. 100-105).

O gráfico da FIG. 7 ilustra a análise efetuada, ao se comparar as curvas dos controles negativo (ausência de inibição) e positivo (presença de inibição provocada pelo ácido kójico) com aquelas dos extratos IC-03 e IC-17. Quanto menos inclinada é a curva, maior é o poder de inibição da tirosinase apresentado pela amostra. Por exemplo, o extrato IC-03 é um inibidor melhor do que o extrato IC-17.



**FIGURA 7** – Curvas de formação do dopacromo em quatro situações diferentes.

O gradiente (grau de inclinação) das curvas foi calculado pela seguinte equação:

$$k = \frac{A_f - A_0}{t_f - t_0}$$

**EQUAÇÃO 2** – Equação para cálculo do grau de inclinação na parte ascendente das curvas de formação de dopacromo em função do tempo.

Na **EQ. 2** acima,  $k$  é o gradiente, o “coeficiente de inclinação da reta”, que corresponde, dessa maneira, ao aumento da concentração de dopacromo em função do tempo;  $A_f$  é a absorvância no tempo final;  $A_0$  é a absorvância no tempo inicial;  $t_f$  é o tempo final e  $t_0$ , o tempo inicial.

O valor  $k$  é equivalente à velocidade inicial da formação de dopacromo; conseqüentemente, quanto menor o valor de  $k$ , mais efetiva é a inibição. Os valores de  $k$  calculados para diferentes intervalos de tempo (segundos) são apresentados na **TAB. 5**.

**Tabela 5:** Coeficientes de inclinação ( $k$ ) das partes ascendentes das curvas de formação de dopacromo obtidas na ausência e na presença dos padrões e extratos testados

Amostra	0-100 s	100 – 200 s	200 – 300 s
	$k_1 / s^{-1}$	$k'_1 / s^{-1}$	$k''_1 / s^{-1}$
<b>Controle (IC-C)</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>	<b>0,002</b>
<b>Ácido kójico (IC-AK)</b>	<b>n.d.*</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
Ácido cafeico (IC-AC)	0,002	0,002	0,002
Ácido gálico (IC-AG)	0,001	0,001	0,001
Galato de metila (IC-GM)	0,001	0,001	0,001
Hidroquinona (IC-HQ)	0,001	0,002	0,002
Luteolina (IC-LT)	0,001	0,002	0,002
Quercetina (IC-QC)	0,001	0,002	0,002
Rutina (IC-RT)	0,002	0,003	0,002
b-Amirina (IC-BA)	0,001	0,002	0,001
Estigmasterol (IC-ST)	0,002	0,002	0,002
<i>J. caroba</i> folhas (IC-01)	0,002	0,002	0,002
<i>B. trimera</i> folhas (IC-02)	0,002	0,002	0,002
<b><i>B. gaudichaudii</i> folhas (IC-03)</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
<b><i>K. pinnata</i> folhas (IC-04)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>J. caroba</i> caules (IC-05)	0,002	0,002	0,002
<i>B. gaudichaudii</i> caules (IC-06)	0,002	0,002	0,002
<i>K. pinnata</i> caules (IC-07)	0,002	0,002	0,002
<b><i>S. terebinthifolius</i> folhas (IC-08)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>A. vera</i> folhas (IC-09)	0,002	0,002	0,002
<b><i>S. adstringens</i> folhas (IC-10)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>B. trinervis</i> partes aéreas (IC-11)	0,002	0,002	0,002
<i>M. ilicifolia</i> folhas (IC-12)	0,002	0,002	0,002
<i>E. macrophyllus</i> folhas (IC-13)	0,002	0,002	0,002
<b><i>R. alba</i> partes aéreas (IC-14)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>
<i>E. giganteum</i> caules (IC-15)	0,001	0,002	0,002
<i>A. conyzoides</i> partes aéreas (IC-16)	0,001	0,002	0,002
<b><i>S. terebinthifolius</i> cascas do tronco (IC-17)</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>
<b><i>S. adstringens</i> cascas do tronco (IC-18)</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>	<b>0,001</b>

\* n.d.: não detectado.

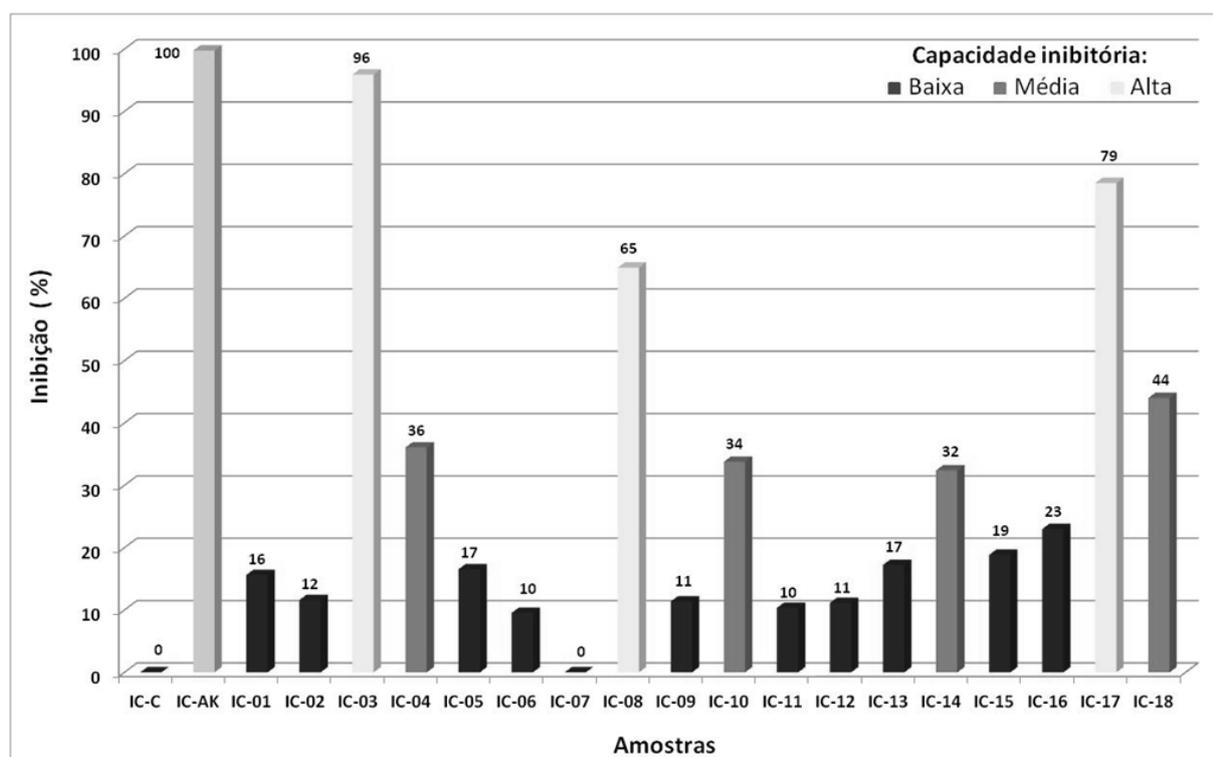
Os parâmetros de controle (IC-C e IC-AK) e os extratos com maior ação anti-tirosinásica foram destacados em negrito.

Em geral,  $k$  independe do intervalo de tempo e pequenas flutuações são atribuídas à perda da transparência do meio devido ao avanço da reação. A modificação drástica na linearidade observada na curva A, após aproximadamente 400 s, (**FIG. 7, p. 33**), foi aqui atribuída ao completo consumo do L-Dopa e, assim, a concentração de dopacromo diminuiu pela sua transformação em DHI (5,6-di-hidroxi-indol), o qual origina, por sua vez, outros produtos que são encontrados na rota biossintética da melanina (**FIG. 1, p. 4**).

Pela análise preliminar das curvas de formação de dopacromo (**FIG. 7, p. 33** e **TAB. 5, p. 34**), observou-se que os extratos mais ativos (com maior atividade inibitória, ou seja, aqueles que apresentam menores coeficientes de inclinação) foram, na ordem, os obtidos das folhas de *B. gaudichaudii* (IC-03), da casca do tronco (IC-17) e das folhas (IC-08) de *S. terebinthifolius* e da casca do tronco de *S. adstringens* (IC-18).

Nos diagramas das **FIGs. 8 e 9, p. 36 e 37**, está representada a ação inibitória dos extratos e dos padrões em comparação com a efetividade do inibidor padrão, o ácido kójico. Os valores de inibição foram calculados a partir da **EQ. 1, p. 23**. O ponto máximo de formação do dopacromo ocorreu em torno de 400 a 450 s após a adição de L-Dopa ao sistema, de acordo com observações da curva de formação de dopacromo a partir de L-Dopa catalisada pela tirosinase na ausência de inibidores (vide **FIG. 7, p. 33**, curva A). Os valores dos parâmetros B e D da **EQ. 1, p. 23**, foram determinados no início de cada corrida ( $t = 0$  s), a fim de corrigir as interferências causadas pela transparência parcial da mistura naquele comprimento de onda.

Em termos de atividade, os extratos foram divididos em três categorias principais A, B e C. O grupo A reuniu extratos com atividade anti-tirosinásica acima de 60% (colunas em cinza claro na **FIG. 8, p. 36**), contendo os três extratos mais ativos (IC-03, IC-17 e IC-08, respectivamente). No grupo B, ficaram os extratos com ação anti-tirosinásica intermediária, em torno de 30 a 45% (colunas em cinza escuro na **FIG. 8, p. 35**), dentre os quais estão os extratos de cascas do tronco de *S. adstringens* (IC-18 = 44%), de folhas de *K. pinnata* (IC-04 = 36%), de folhas de *S. adstringens* (IC-10 = 34%) e de partes aéreas de *R. alba* (IC-14 = 32%). Por último, os extratos com atividade anti-tirosinásica pequena ou pouco expressiva (abaixo de 23%) (colunas pretas na **FIG. 8, p. 36**) foram reunidos no grupo C.



IC-C = controle; IC-AK = ácido kójico; IC-01 a IC-18 = extratos testados; colunas cinza claro = extratos do grupo A (elevada atividade anti-tirosinásica); colunas cinza escuro = extratos do grupo B (atividade anti-tirosinásica intermediária); colunas pretas = extratos do grupo C (baixa atividade anti-tirosinásica).

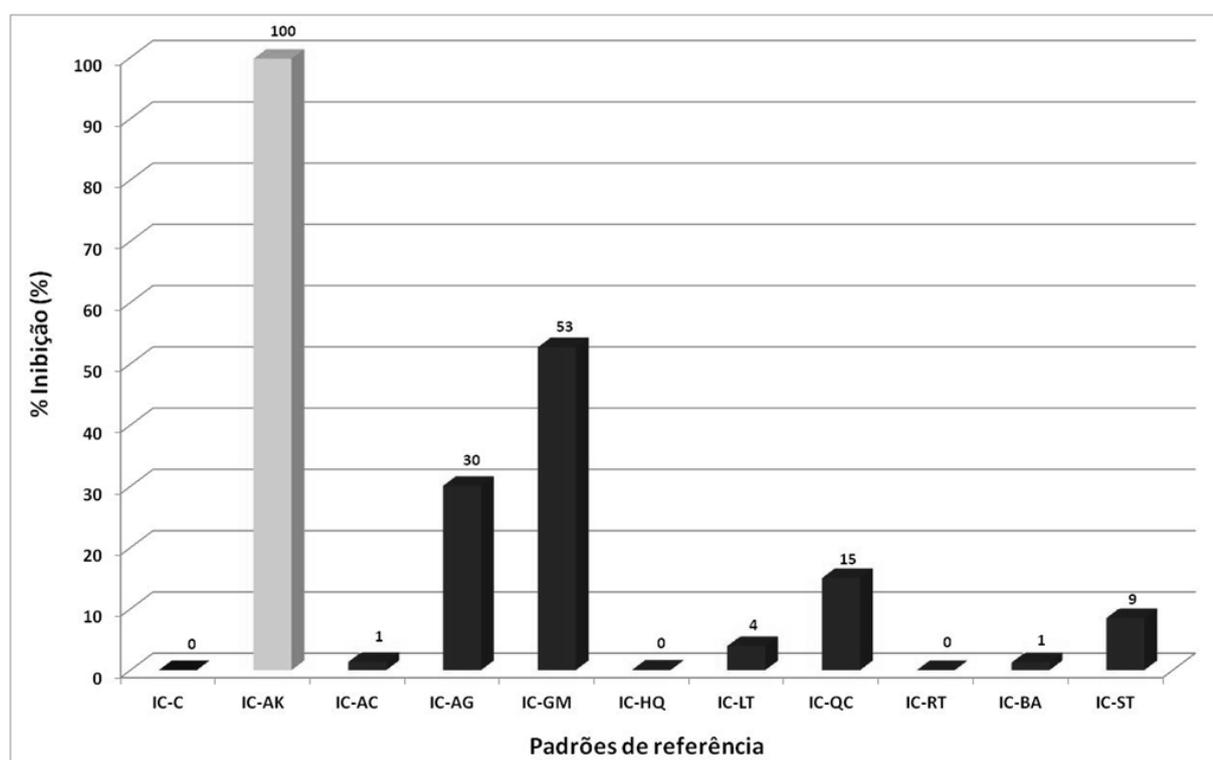
**FIGURA 8** – Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase dos extratos testados.

Em relação às famílias botânicas, o maior número de espécies avaliadas neste estudo pertence à família Asteraceae (dois gêneros e três espécies), das quais os extratos de *B. trimera* (IC-02) e *B. trinervis* (IC-11) apresentaram valores próximos de inibição da tirosinase (12% e 10%, respectivamente), indicando possivelmente que a composição e ou o teor de substâncias inibidoras poderiam ser similares em ambos os casos. O extrato IC-16, preparado a partir da outra espécie desta família, *A. conyzoides*, demonstrou ser quase duas vezes mais ativo (23%) do que os extratos das plantas do gênero *Baccharis*.

A ação anti-tirosinásica em diferentes partes de uma mesma espécie também foi avaliada em alguns casos. O extrato de folhas de *K. pinnata* (IC-04) apresentou ação anti-tirosinásica intermediária (36%), enquanto que o respectivo extrato de caules (IC-07) não apresentou atividade, indicando que, nesta espécie, a(s) substância(s) inibidora(s) está(ão) concentrada(s) nas folhas e não nos caules. O mesmo ocorreu com *B. gaudichaudii*, cujo extrato de folhas (IC-03) apresentou elevada ação anti-tirosinásica (96%), enquanto que o extrato de caules (IC-11) demonstrou pequena inibição (10%). Em *S. terebinthifolius*, ambos os extratos de cascas do tronco (IC-17) e de folhas (IC-08) apresentaram atividade anti-tirosinásica elevada (79% e 65%, respectivamente). Resultado similar foi observado para *S. adstringens*, cujo extrato de cascas do tronco (IC-18) apresentou maior ação anti-tirosinásica

(44%) do que o respectivo extrato de folhas (IC-10, 34%). Para *J. caroba*, os valores de inibição foram muito próximos para ambas as partes vegetais testadas, folhas (IC-01, 16%) e caules (IC-05, 17%). O extrato das partes aéreas de *R. alba* (IC-14), incluído aleatoriamente neste estudo, apresentou atividade anti-tirosinásica mediana (32%).

Os resultados da atividade anti-tirosinásica dos padrões encontram-se na **FIG.9**.

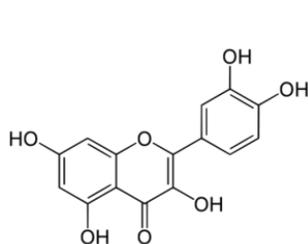
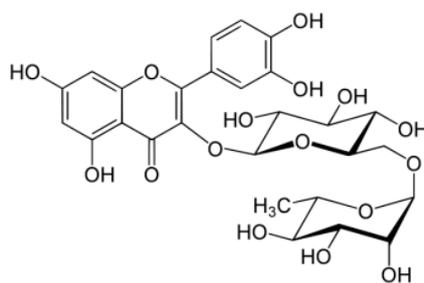
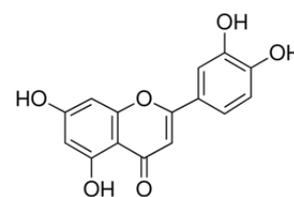
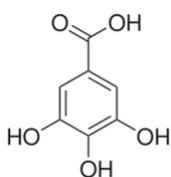
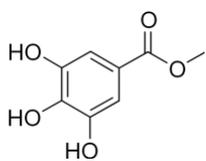
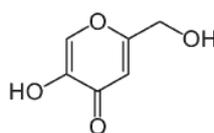
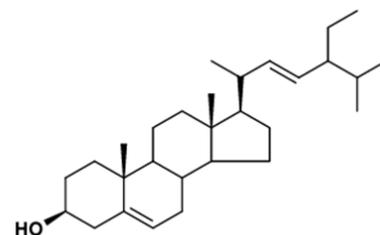


IC-C = controle; IC-AK = ácido kójico; IC-AC = ácido cafeico; IC-AG = ácido gálico; IC-GM = galato de metila; IC-HQ = hidroquinona; IC-LT = luteolina; IC-QC= quercetina; IC-RT = rutina; IC-BA =  $\beta$ -amirina; IC-ST = estigmasterol.

**FIGURA 9** – Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase para os padrões testados.

Dentre as substâncias testadas e descritas como capazes de inibir a tirosinase ou que possuem estrutura muito semelhante à de inibidores conhecidos desta enzima, três (não considerando o ácido kójico) apresentaram atividade superior a 10% de inibição nas condições do teste, o ácido gálico (14), o galato de metila (15) e a quercetina (8). As demais substâncias inibiram muito pouco a ação da enzima ou não foi detectada tal inibição, mesmo algumas possuindo similaridade estrutural com as substâncias que se mostraram ativas. A inibição causada pelo ácido kójico (23), como visto no item 1.4 (p. 11) pode ser do tipo competitiva (quelação do cobre no sítio ativo da enzima), mista (quelação do cobre associada à redução da *o*-quinona a *o*-difenol, prevenindo a formação da melanina) ou não competitiva (complexação com um sítio diferente do ativo) (Chang, 2009; Sendovski *et al.*, 2011),

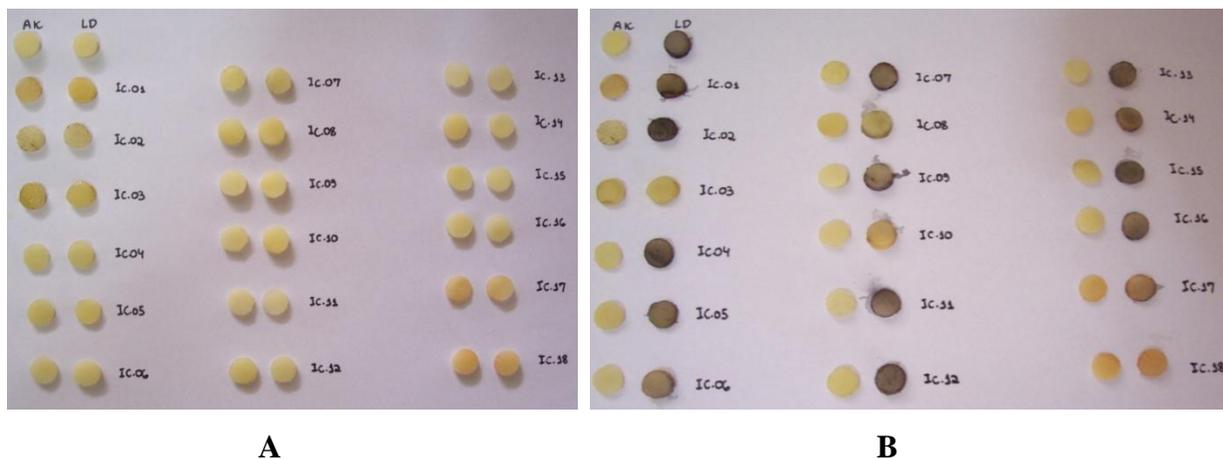
sendo que tal flexibilidade de opções explicaria o porquê de sua excelente capacidade inibitória da tirosinase. A inibição pelo galato de metila (**15**) e pelo ácido gálico (**14**) é do tipo competitiva, sendo que esses compostos competem com o L-Dopa pelo sítio ativo onde ocorre a oxidação (item 1.3, p. 6) (Shahidi & Naczk, 1995). A quercetina (**8**) também inibe competitivamente a tirosinase, porém o que justifica sua atividade é a presença, em sua estrutura, de uma porção 3-hidroxi-4-ceto (vide sua similaridade com o ácido kójico) capaz de quelar o cobre no sítio ativo da enzima, levando à inativação irreversível desta última (Kubo & Kinst-Hori, 1999a; Kubo *et al.*, 1994; Kubo *et al.*, 2000; Kubo *et al.*, 2007). Comparada à quercetina, a luteolina (**10**) apresenta atividade anti-tirosinásica quase quatro vezes menor, o que, do ponto de vista da relação estrutura  $\times$  atividade, é justificado pela ausência da hidroxila na posição 3 nesta última, já que, no restante, as fórmulas estruturais de ambas são idênticas. A rutina (**9**), um glicosídeo da quercetina, mostrou-se inativa neste estudo, evidenciando que a porção glicosídica prejudica sua interação com a tirosinase, já que sua aglicona mostrou-se bem mais ativa (15%). O estigmasterol (**35**), apesar de não ter sido mencionado como inibidor da tirosinase em revisões literárias recentes (Kim & Uyama, 2005; Chang, 2009, Sendovski *et al.*, 2011), apresentou um percentual de inibição de 9%.

**8****9****10****14****15****23****35**

Em relação às três substâncias mais ativas mencionadas acima, e considerando os três extratos mais ativos (IC-03, IC-17 e IC-08), a presença de ácido gálico foi descrita por Lima *et al.* (2009) para o extrato de cascas do tronco de *S. terebinthifolius* (IC-17) e confirmada nas análises cromatográficas como será mostrado adiante; galato de metila foi descrito como presente no extrato de folhas de *S. terebinthifolius* (IC-08) (Ceruks *et al.*, 2007; Salvi Jr, 2009).

### 3.5. Teste de inibição da tirosinase usando discos de batata

Girelli *et al.* (2004) descreveram bioensaios de inibição de polifenol-oxidases por dipeptídeos em fatias de batatas e maçãs, respectivamente um tubérculo e uma fruta contendo tirosinase em quantidades significativas. Tendo em mãos os resultados dos testes espectroscópicos de inibição da tirosinase, realizou-se o bioensaio com discos de batata para determinar a confiabilidade desta metodologia alternativa. Os controles empregados foram discos isentos de L-Dopa aos quais foi adicionado apenas tampão fosfato pH 7 ou soluções-amostra, para comprovar que estes, por si só, não escurecem os discos de batata. Como escurecimento, entende-se a modificação da cor do disco após a adição de L-Dopa e ou dos inibidores. A quantificação desse processo foi obtida empregando-se o programa computacional Adobe Photoshop<sup>®</sup> v. 7, a partir de fotografias registradas nos tempos inicial e final do experimento (**FIG. 10**).



**FIGURA 10** – Fotos dos discos de batata no início (A,  $t = 0$  min) e no fim (B,  $t = 30$  min) do bioensaio para avaliação da atividade anti-tirosinásica dos extratos. Fotos: Isaac F. Corradi.

Os discos AK e LD correspondem, respectivamente, aos controles positivo e negativo do experimento. Os discos à esquerda de cada coluna representam os controles utilizados para comprovar que os extratos, por si só, não provocaram o escurecimento do substrato.

Utilizando o programa Photoshop<sup>®</sup>, pontos específicos das imagens da **FIG. 10** foram convertidos em coordenadas numéricas através do sistema de coordenadas cromáticas CIE-L\*a\*b\*, um recurso disponível naquele programa. Assim, as leituras de cada amostra foram obtidas a partir da média de três valores de pontos diferentes das áreas consideradas (pontos de aplicação das amostras e do L-Dopa) a fim de se obter medidas uniformes de cor. As diferenças entre cada conjunto de duas cores entre os tempos inicial (0 min) e final (30 min), determinadas em termos de L, a\* e b\*, foram expressadas pela medida da variação total de cor ( $\Delta E^*$ ) através da **EQ. 3**.

$$\Delta E^* = [(\Delta L)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

**EQUAÇÃO 3** – Equação para cálculo da variação total de cor a partir de coordenadas numéricas do sistema espacial de cores L\*a\*b\*.

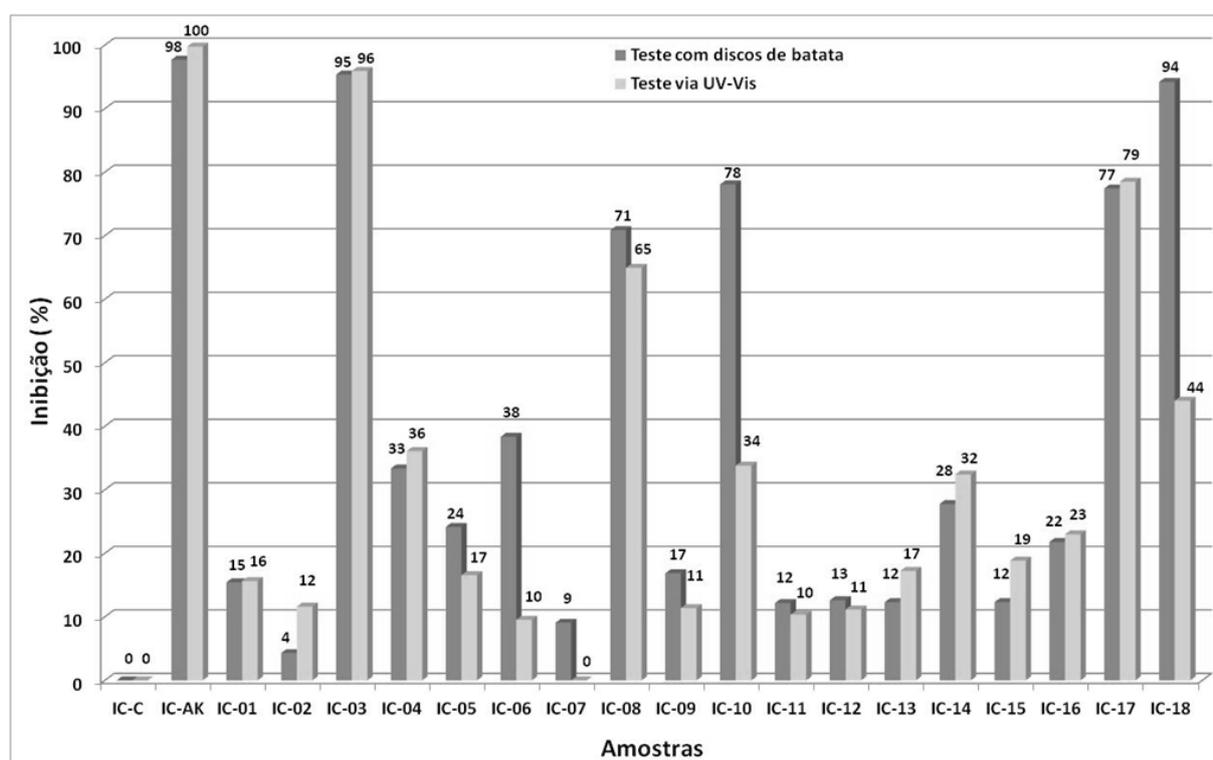
Em seguida, a eficiência de inibição da tirosinase por cada amostra foi medida através da inibição percentual de escurecimento e expressada como

$$\% \text{ inibição da tirosinase} = (\Delta E^*_{\text{controle}} - \Delta E^*_{\text{inibidor}}) \times 100 / \Delta E^*_{\text{controle}}$$

**EQUAÇÃO 4** – Equação utilizada no cálculo do percentual de inibição da tirosinase a partir dos valores de variação total de cor ( $\Delta E^*$ ).

Na equação anterior,  $\Delta E^*_{\text{controle}}$  refere-se à variação total de cor observada no disco de batata ao qual se adicionou apenas L-Dopa, e  $\Delta E^*_{\text{inibidor}}$  refere-se à variação de cor observada nos discos de batata aos quais se adicionaram o inibidor padrão ácido kójico ou os extratos vegetais testados.

A comparação dos resultados dos testes usando discos de batata e espectroscópicos são apresentados na **FIG. 11**. Embora tenham sido observados diversos resultados confluentes, houve discrepâncias em relação aos resultados obtidos para os extratos IC-02 (4 e 12%), IC-05 (24 e 17%), IC-06 (38 e 10%), IC-07 (9 e 0%), IC-10 (78 e 34%) e IC-18 (94 e 44%).



**FIGURA 11** – Diagrama comparativo dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos para os extratos vegetais analisados pelo teste com discos de batata e pelo teste via espectroscopia no UV-Vis.

A partir dos resultados observados no teste espectroscópico de inibição da tirosinase, reduziu-se o número de alvos de estudo de dezoito extratos iniciais para os três mais ativos: IC-03, IC-17 e IC-08. Os extratos IC-10 e IC-18 não foram selecionados por terem apresentado valores elevados de inibição enzimática somente no bioensaio com discos de batata. Esta escolha foi baseada no fato de que o método espectroscópico, quando comparado ao bioensaio com discos de batata, é muito mais confiável e menos sujeito a erros causados por variáveis de controle difícil ou impossível, tal como as que inevitavelmente ocorrem em ensaios de natureza biológica, como, por exemplo, o escurecimento natural da batata com o tempo neste caso em específico. Logo, mesmo levando em consideração que o teste com discos de batata é prático e de boas repetibilidade e reprodutibilidade, o mesmo não substitui, de modo algum, o método espectrométrico na avaliação da atividade anti-tirosinásica. Todavia, ele é útil como um modo alternativo e de baixo custo para se adquirir informações complementares sobre a inibição da tirosinase.

### 3.6. Padronização e caracterização dos extratos e dos padrões por CLAE

Os extratos e os padrões selecionados, exceto o estigmasterol, devido à sua baixa solubilidade em metanol, foram analisados por CLAE-UV. Na obtenção dos perfis cromatográficos, partiu-se inicialmente do método descrito por Prediger *et al.* (2008), aplicado na análise de extratos similares, porém de espécies distintas das pesquisadas neste estudo. Para otimizar as análises, o método de Prediger *et al.*, cujo tempo total de eluição era de 60 min, foi alterado nos tempos de cada estágio de eluição e na acidificação das fases móveis (uso de ácido acético ao invés de ácido fórmico) até se chegar ao método descrito neste trabalho, cujo tempo total de eluição foi de 50 min para cada amostra.

Os cromatogramas obtidos para os extratos foram compilados nos diagramas comparativos da **FIG. 12, p 43**. De um modo geral, em ambos os comprimentos de onda dos canais de detecção do sistema, 280 e 350 nm, os cromatogramas dos extratos testados apresentaram maior abundância de substâncias em tempos de retenção compreendidos entre 0 e 5 min, entre 15 e 20 min e entre 30 e 45 min, conforme evidenciado pela existência de picos nesses intervalos. Nos cromatogramas dos três extratos mais ativos (IC-03, IC-17 e IC-08), buscou-se observar a presença de picos que os caracterizassem, visto que não é rara a ocorrência de mais de uma planta com o mesmo nome popular, o que infere a necessidade de métodos que possam ser usados para garantir a origem de um determinado extrato vegetal. O cromatograma de IC-03 apresentou três picos entre 15 e 18 min em 350 nm, indicativos de compostos polifenólicos (Monteiro *et al.*, 2002; Jacomassi *et al.*, 2007). No cromatograma do extrato IC-08, observaram-se duas substâncias correspondentes a dois picos em 5 e 7,5 min e um grupo de substâncias relativas a uma sequência de picos mais intensos e sobrepostos entre 13 e 17 min, sendo

todos eles detectados em 280 nm. Neste mesmo comprimento de onda, o cromatograma de IC-17 apresentou uma substância com tempo de retenção de 5 min cujo pico foi um pouco mais intenso e largo do que aquele observado em IC-08. Porém, para as substâncias com tempos de retenção entre 13 e 17 min em IC-17, a intensidade e a sobreposição de picos foi menor do que em IC-08, lembrando que estes dois extratos foram obtidos de partes diferentes da mesma espécie.

Os cromatogramas obtidos para padrões foram compilados nos diagramas comparativos da **FIG. 13, p 44**. Os tempos de retenção (TR) e os melhores comprimentos de onda para a detecção dos padrões foram os seguintes: ácido kójico (5 min, 280 nm), ácido gálico (5 min, 280 nm); hidroquinona (6-7 min, 280 nm), galato de metila (10-13 min, 280 nm), ácido cafeico (15 min, 280 nm), rutina (18 min, 350 nm), quercetina (22 min, 350 nm) e luteolina (23 min, 350 nm). A  $\beta$ -amirina praticamente não apresentou absorções significativas nestes comprimentos de onda.

Comparando-se os cromatogramas dos extratos com aqueles dos padrões, foi possível inferir sobre a presença destes compostos nos extratos. Ácido gálico (TR = 5 min) está presente no extrato de cascas do tronco de *S. terbinthifolius* (IC-17), confirmando Lima *et al.* (2009); este ácido também foi encontrado no extrato de cascas do tronco de *S. adstringens* (IC-18), coincidindo com Santos *et al.* (2002) e no extrato de partes aéreas de *R. alba* (IC-14), o que explicaria a atividade anti-tirosinásica nessas amostras. Em literatura recente consultada para *R. alba*, não foi encontrada citação sobre a presença desta substância (Dobrevá & Kovacheva, 2010). Ácido cafeico (TR = 16 min) está presente nos extratos de *S. terbinthifolius* (IC-08 e IC-17), em conformidade com El Massry *et al.* (2009), sendo que, no extrato das folhas, o mesmo é evidenciado por um pico bastante intenso. Galato de metila (TR = 12 min) deveria estar presente nos extratos de *S. terbinthifolius* (IC-08 e IC-17), conforme descrito por Ceruks *et al.* (2007) e Salvi Jr (2009), porém o pico característico desta substância, cuja absorção máxima ocorre em 280 nm e sem praticamente nenhuma alteração significativa na absorção em 350 nm, não aparece nos cromatogramas destes extratos, ou, no caso de IC-08, parece ter ocorrido aos 14 min, com um pequeno atraso no TR. Rutina (TR = 18 min), cuja absorção mais intensa se dá em 350 nm, foi observada nos extratos IC-01 (*J. caroba*, folhas), IC-03 (*B. gaudichaudii*, folhas), IC-04 (*K. pinnata*, folhas), IC-14 (*R. alba*, partes aéreas).  $\beta$ -Amirina (TR = 33 min) está presente nos extratos de *B. gaudichaudii* (IC-03 e IC-06) (Monteiro *et al.*, 2002), mas a pequena intensidade do pico deste padrão e a interferência causada pela sobreposição de picos relativos a outras substâncias com tempos de retenção próximos ao dele limitaram a identificação de seu pico na amostra. Os cromatogramas dos extratos de *J. caroba* (IC-01 e IC-05) não apresentaram os picos característicos da hidroquinona (TR = 18 min) e da luteolina (TR = 24 min), conforme seria esperado (Gachet & Schühly, 2009). A presença da quercetina (TR = 22 min) não foi observada em nenhum dos extratos.

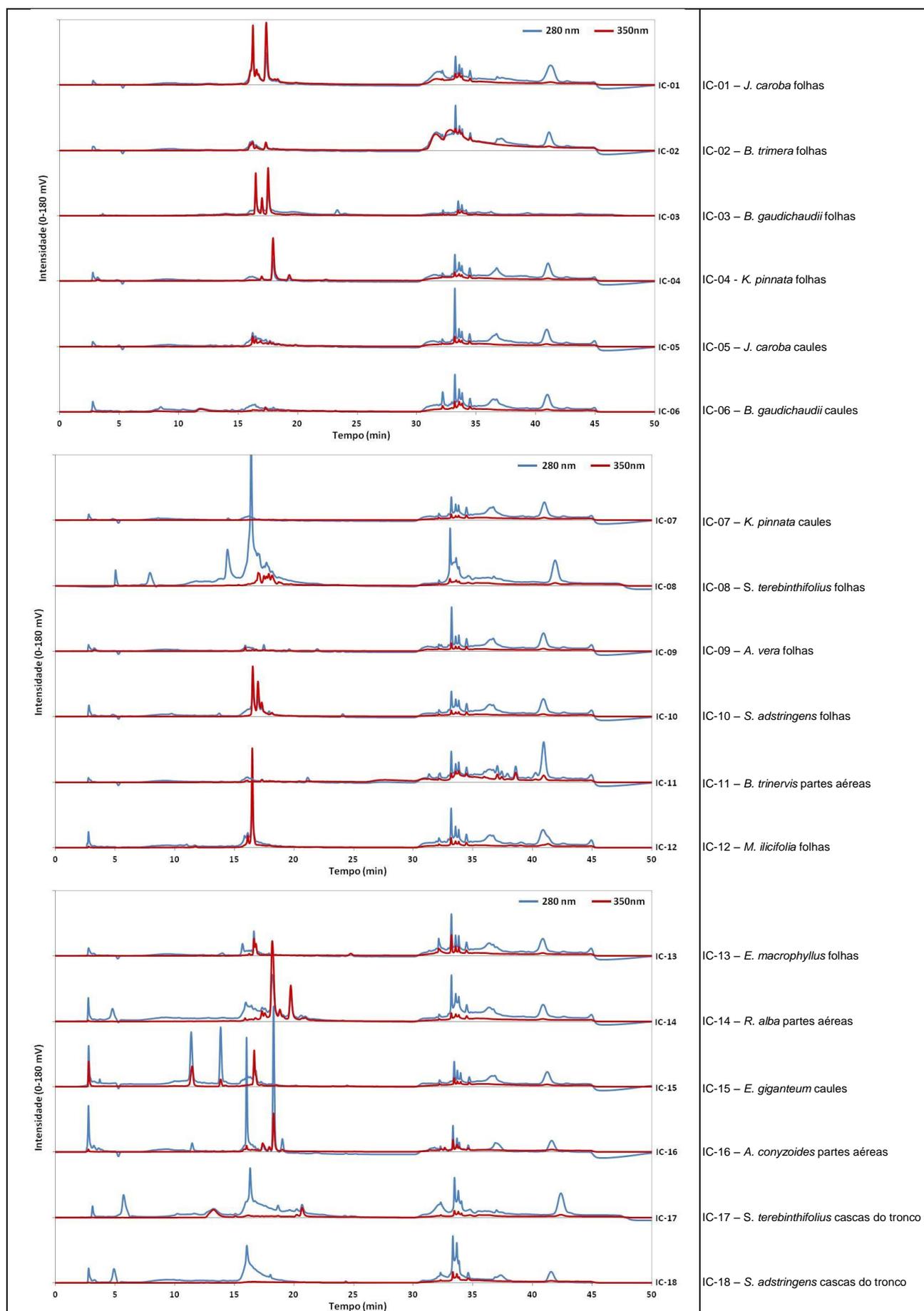
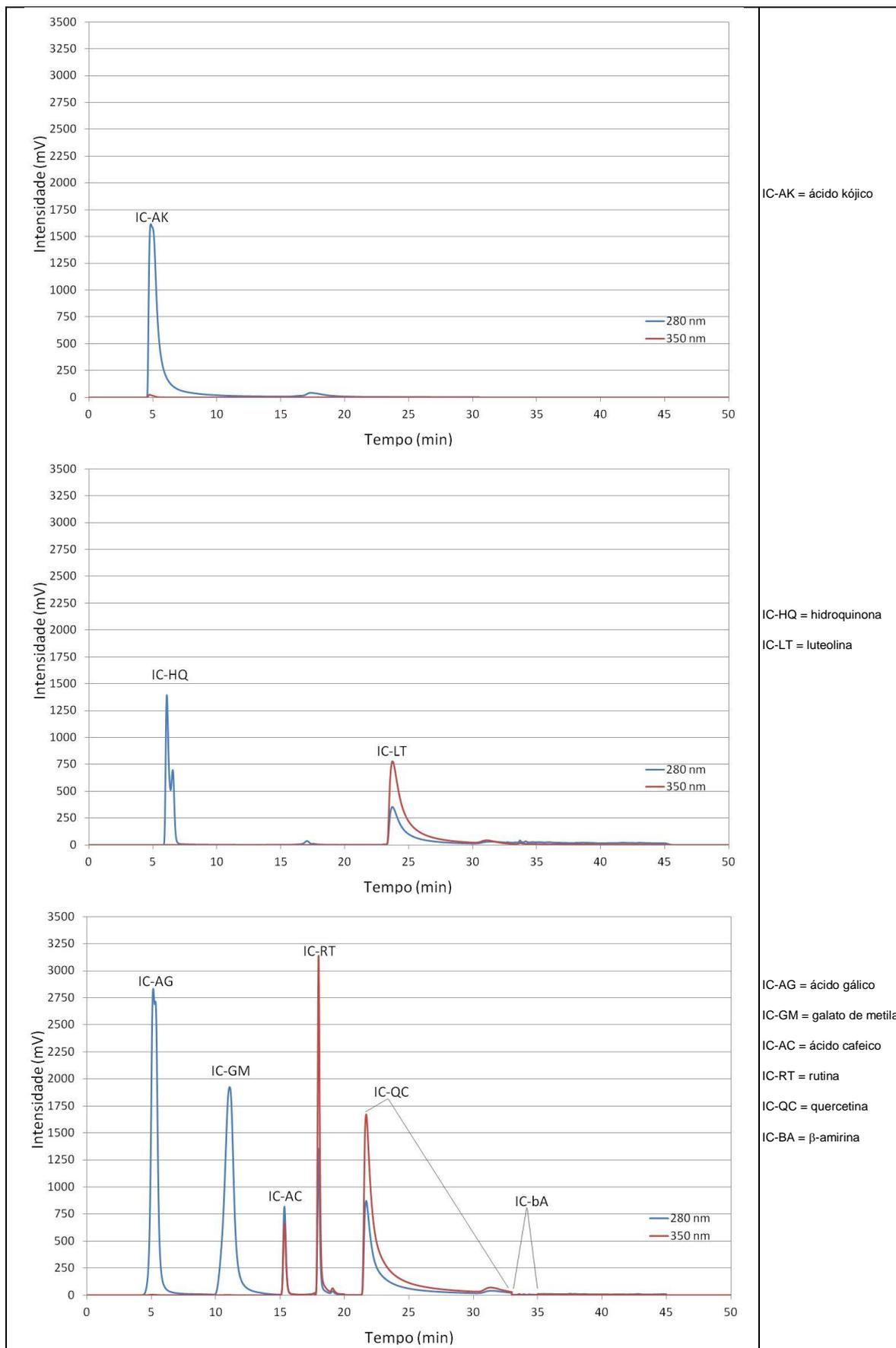


FIGURA 12 – Diagramas comparativos mostrando os cromatogramas (CLAE) dos extratos.



**FIGURA 13** – Diagrama comparativo dos cromatogramas obtidos por CLAE, sozinhos ou em sobreposição, dos padrões testados.

### 3.7. Caracterização dos extratos e dos padrões por espectroscopia no IV

O uso de espectros no infravermelho (IV) para padronizar extratos é descrito por Egwaikhide & Gimba (2007), inclusive com o uso de técnicas sofisticadas, como o uso de suporte de leitura por refletância total atenuada (ATR), que permite a análise direta de substâncias sem qualquer tratamento prévio. Com o objetivo de gerar resultados que pudessem ser utilizados em estudos mais sofisticados no futuro, os extratos vegetais estudados e alguns padrões selecionados (ácidos cafeico, gálico e kójico, galato de metila, hidroquinona, quercetina, rutina,  $\beta$ -amirina e estigmasterol) foram caracterizados via espectroscopia no IV. Os espectros obtidos (ANEXO 5, p. 106-114) foram comparados com aqueles disponíveis no Banco de Dados de Espectros Para Compostos Orgânicos (SDBS, 2012) do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Industrial Avançada do Japão (AIST). Como o espectro no IV da  $\beta$ -amirina não estava disponível no SDBS, a mesma foi caracterizada utilizando-se as bandas características principais conforme Lopes & Fascio (2004) e Martins (2009). As TABs. 6 e 7 resumem as principais bandas observadas nos espectros no IV para os padrões e extratos analisados.

**Tabela 6:** Principais bandas de absorção observadas nos espectros no IV para os padrões analisados.

Código	Padrão	Principais bandas observadas nos espectros no IV, $\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )
IC-AC	Ácido cafeico	3400 (O-H); 1500 (C=C); 960 (C-H de alqueno <i>trans</i> ).
IC-AG	Ácido gálico	3300 (O-H); 1700 (C=O de ácido carboxílico); 1500 (C=C); 1050 (C-O).
IC-AK	Ácido kójico	3200 (O-H); 1670 (C=O); 1080 (C-O).
IC-BA	$\beta$ -Amirina	3300 (O-H); 2900 (C-H de alceno); 1400 (-CH <sub>3</sub> de grupo gem-dimetila); 990 (C-H de alqueno).
IC-GM	Galato de Metila	3400 (O-H); 1750 (C=O de éster); 1500 (C=C aromático).
IC-HQ	Hidroquinona	3200 (O-H); 1500 (C=C aromático); 1150 (C-O); 790 (C-H de benzeno <i>p</i> -substituído); 600 (-OH).
IC-QC	Quercetina	3275 (O-H); 1650 (C=O); 1525 (C=C aromático); 1050 (C-O).
IC-RT	Rutina	3300 (O-H); 1650 (C=O); 1525 (C=C aromático); 1150 (C-O).
IC-ST	Estigmasterol	3400 (O-H); 1400 (-CH <sub>3</sub> de grupo gem-dimetila); 1070, 980 (-C=C-).

**Tabela 7:** Principais bandas de absorção observadas nos espectros no IV dos extratos.

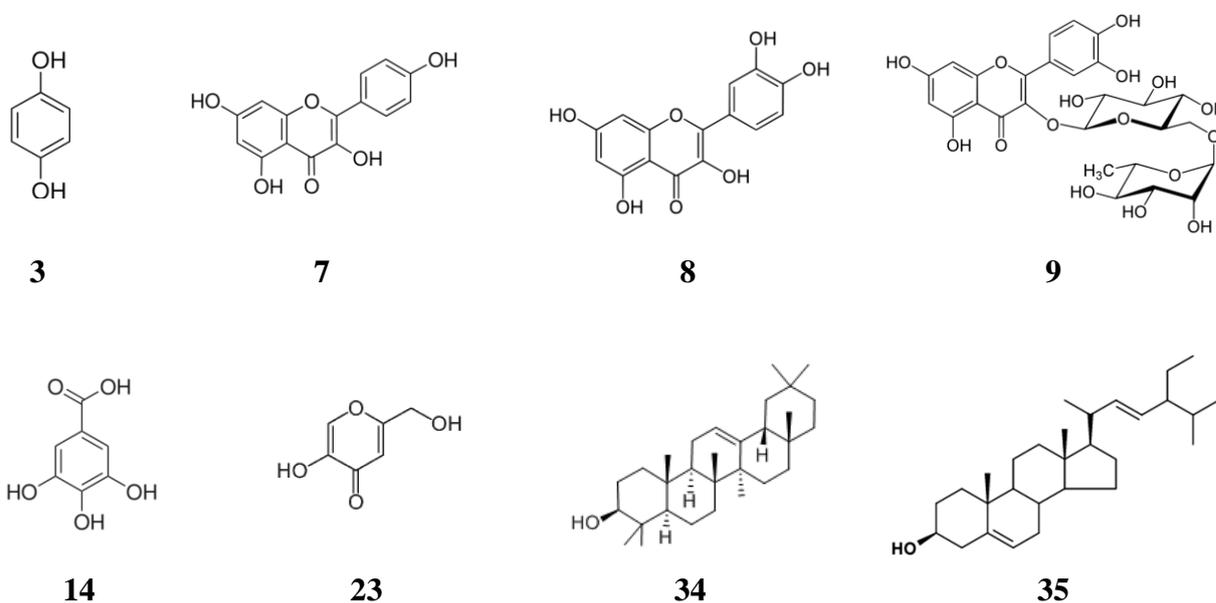
Código do extrato	Principais bandas observadas nos espectros no IV, $\bar{\nu}$ (cm <sup>-1</sup> )
IC-01	3300 (O-H); 3000 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1580, 1450 (C=C aromático); 1030 (O-H).
IC-02	3200 (O-H), 3000 (C-H aromático ou olefínico), 1630 (C=O), 1030 (O-H).
IC-03	3200 (O-H), 3000 (C-H aromático ou olefínico), 1650 (C=O), 1580, 1450 (C=C aromático); 1050 (O-H).
IC-04	3300 (O-H), 2900 (C-H aromático ou olefínico), 2850 (C-H de alceno), 1640 (C=O), 1050 (O-H).
IC-05	3300 (O-H), 2900 (C-H aromático ou olefínico), 2850 (C-H de alceno), 1030 (O-H).
IC-06	3300 (O-H), 1640 (C=O), 1030 (O-H).
IC-07	3300 (O-H), 3000 (C-H aromático ou olefínico), 1640 (C=O).
IC-08	3200 (O-H); 2900 (C-H aromático ou olefínico); 2850 (C-H de alceno); 1640 (C=O); 1030 (OH).
IC-09	3200 (O-H); 3000 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1030 (O-H).
IC-10	3400 (O-H, banda pouco intensa); 3000 (C-H aromático); 2850 (C-H de alceno); 1500; 1450 (C=C aromático).
IC-11	3400 (O-H, banda pouco intensa); 2900 (C-H olefínico); 2850 (C-H de alceno).
IC-12	3300 (O-H); 3000 (C-H olefínico); 1640 (C=O); 1050 (O-H).
IC-13	3200 (O-H); 1640 (C=O); 1030 (O-H).
IC-14	3200 (O-H); 3000 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1030 (O-H).
IC-15	3200 (O-H); 3000 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1030 (O-H).
IC-16	3200 (O-H); 1640 (C=O); 1030 (O-H).
IC-17	3200 (O-H); 2950 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1500, 1450 (C=C aromático); 1050 (O-H).
IC-18	3200 (O-H); 3000 (C-H aromático ou olefínico); 1640 (C=O); 1500, 1450 (C=C aromático); 1050 (O-H).

Os resultados obtidos a partir das análises por espectrometria no IV foram úteis para evidenciar as principais funções químicas presentes nos constituintes dos extratos, tais como fenóis, alcoóis, alquenos, grupos aromáticos, carbonilas (indício da presença de ácidos, ésteres, cetonas, aldeídos, etc.). Apesar de não ter sido possível obter muitas informações que pudessem diferenciar os extratos mais

ativos dos demais, os espectros no IV corroboram a idéia de que sua atividade anti-tirosinásica está relacionada especialmente à presença de compostos polifenólicos e aromáticos em sua composição.

### 3.8. Análise e caracterização dos padrões e dos extratos mais ativos por ressonância magnética nuclear (RMN)

Alguns padrões – hidroquinona (**3**), kaempferol (**7**), quercetina (**8**), rutina (**9**), ácidos gálico (**14**) e kójico (**23**),  $\beta$ -amirina (**34**) e estigmasterol (**35**) – foram selecionados e submetidos a uma análise por RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , visando à sua autenticação.



O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIG 14, p. 48**) do ácido gálico (**14**), foi observado um simpleto em  $\delta$  7,06, característico dos hidrogênios H-2 e H-6, que têm o mesmo deslocamento químico devido à simetria da molécula. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido gálico (**FIG 15, p 48**), o sinal da carbonila de ácido carboxílico foi visualizado em  $\delta$  170,6 enquanto o sinal dos carbonos C-2 e C-6, carbonos metínicos de acordo com o subespectro DEPT (**FIG 16, p. 49**) está presente em  $\delta$  110,5. Os demais sinais dos carbonos quaternários foram visualizados em  $\delta$  122,1 (C-1), 139,7 (C-4) e 146,5 (C-3 e C-5). Os resultados encontrados coincidem com dados da literatura (Ascari, 2011).

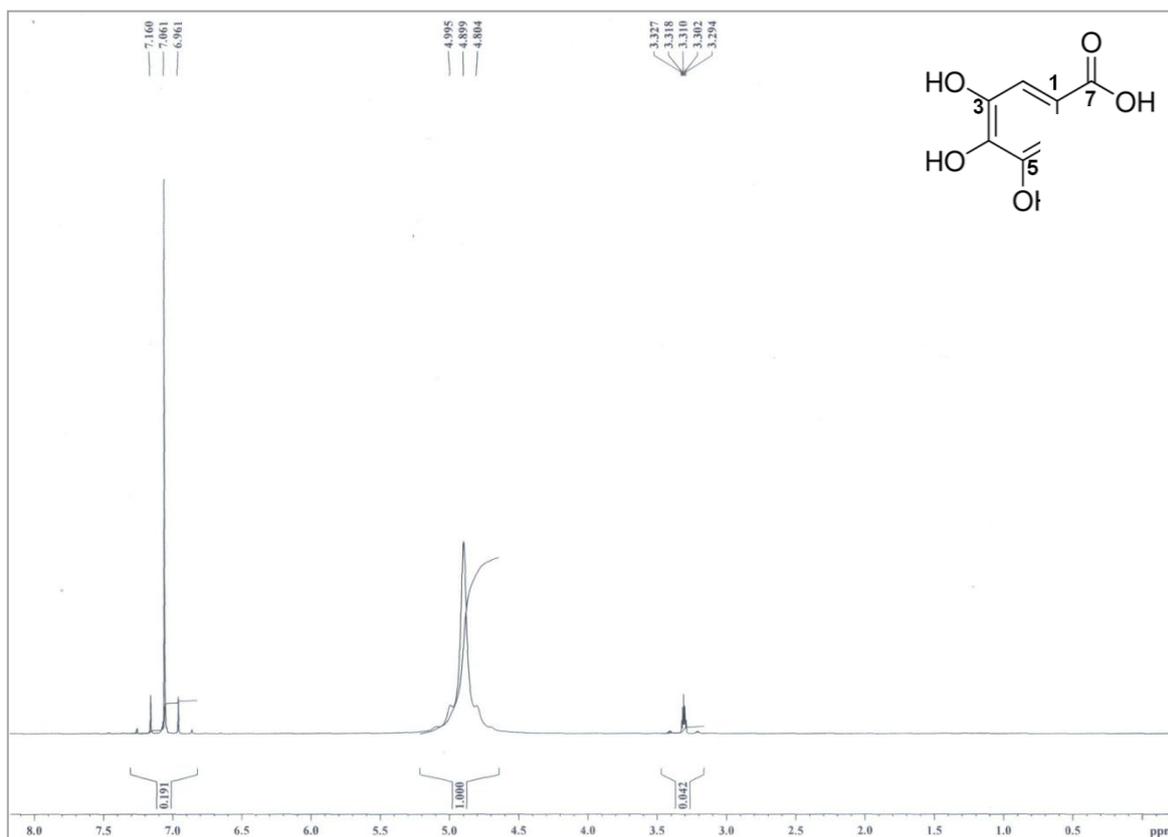


FIGURA 14 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do ácido gálico (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

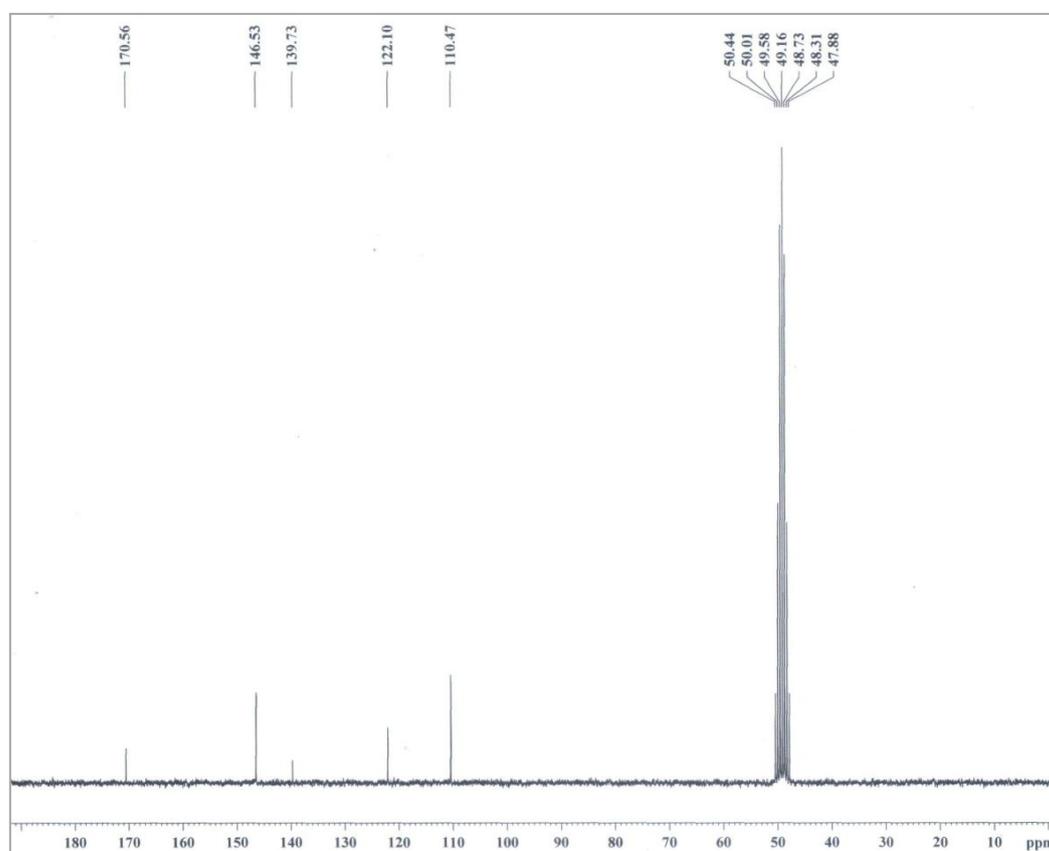
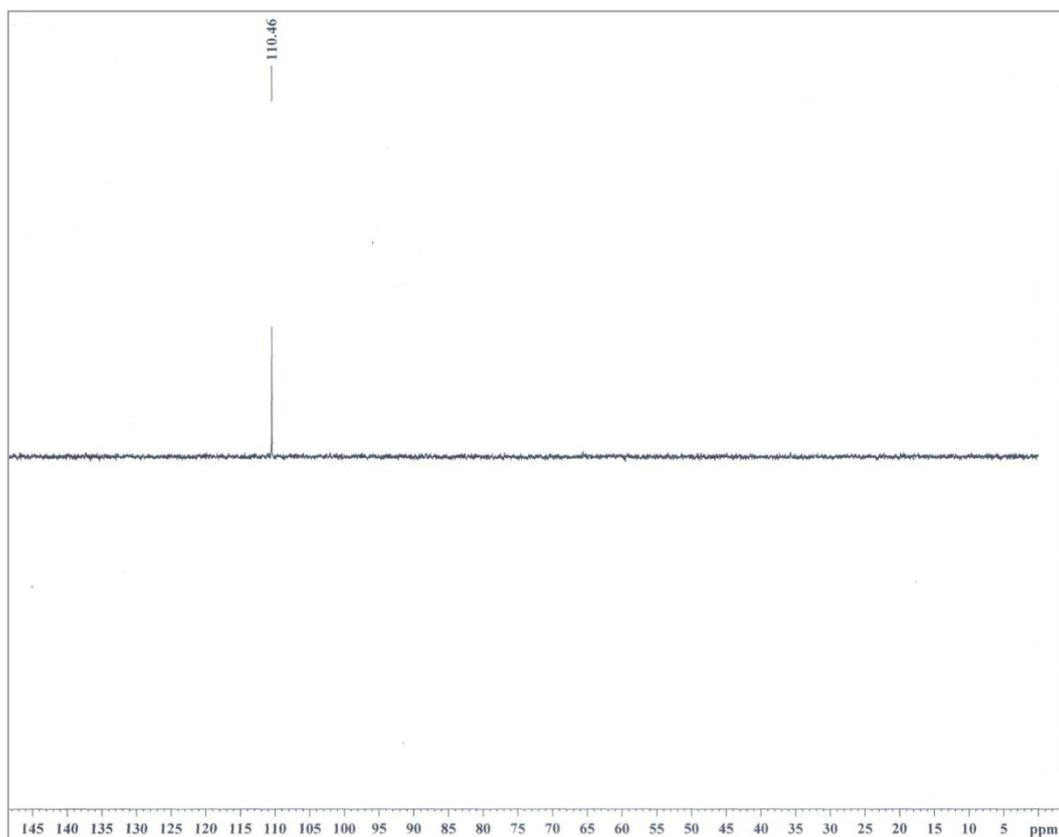


FIGURA 15 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do ácido gálico (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**FIGURA 16** – Subespectro DEPT do ácido gálico (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

O ácido kójico (**23**) foi caracterizado pelo seu espectro RMN de <sup>1</sup>H (**FIG 17, p. 50**) através da presença de dois simpletos (integrados para 1H cada) em  $\delta$  6,50 e 7,95 referentes a H-3 e H-6, respectivamente, além de um simpleto (2H) associado aos hidrogênios metilênicos de C-7 em  $\delta$  4,41. O sinal deste carbono foi visualizado em  $\delta$  61,3 no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**FIG 18, p. 50**) bem como os sinais dos carbonos metínicos C-3 ( $\delta$  110,9) e C-6 ( $\delta$  141,2). O carbono carbonílico insaturado C-4 apresentou deslocamento químico em  $\delta$  177,0. Esta atribuição está consistente com o subespectro DEPT (**FIG 19, p. 51**). Os resultados observados coincidem com os de Bracarense (2008).

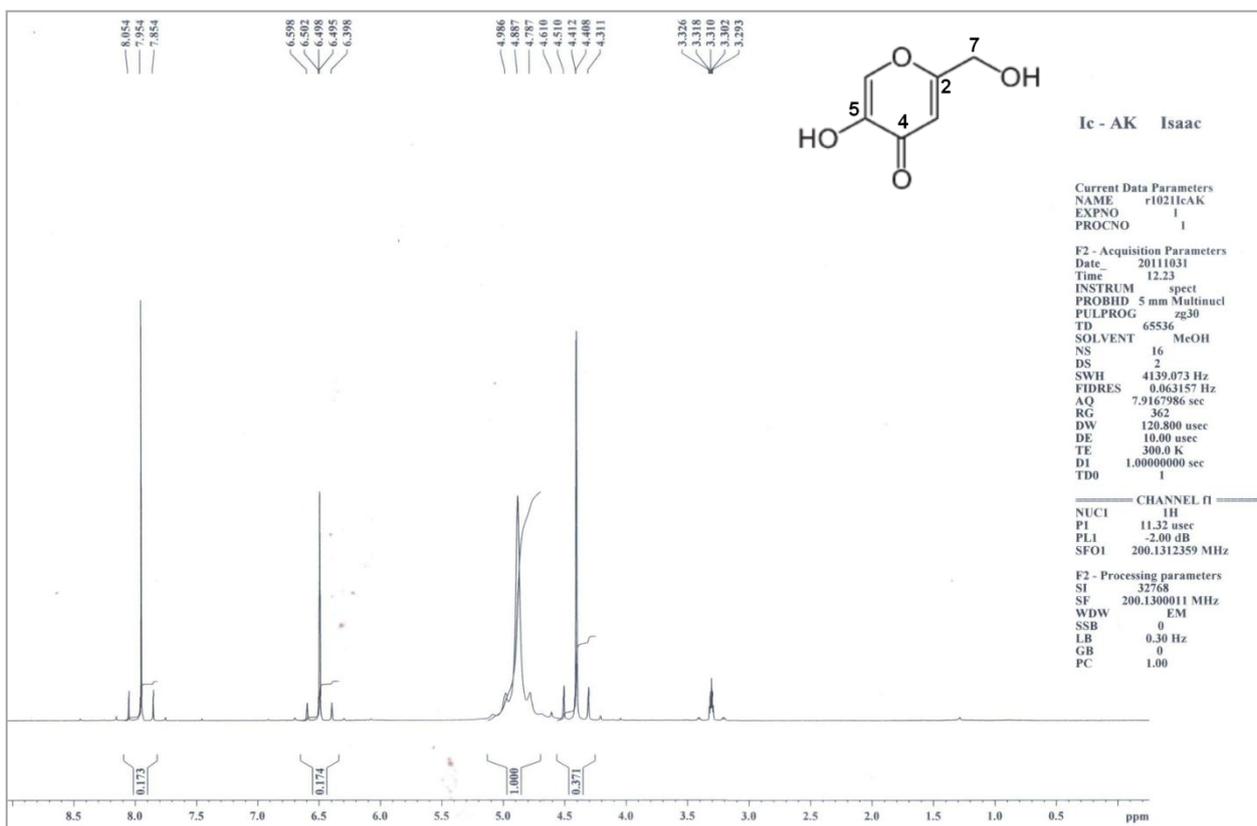


FIGURA 17 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do ácido kójico (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

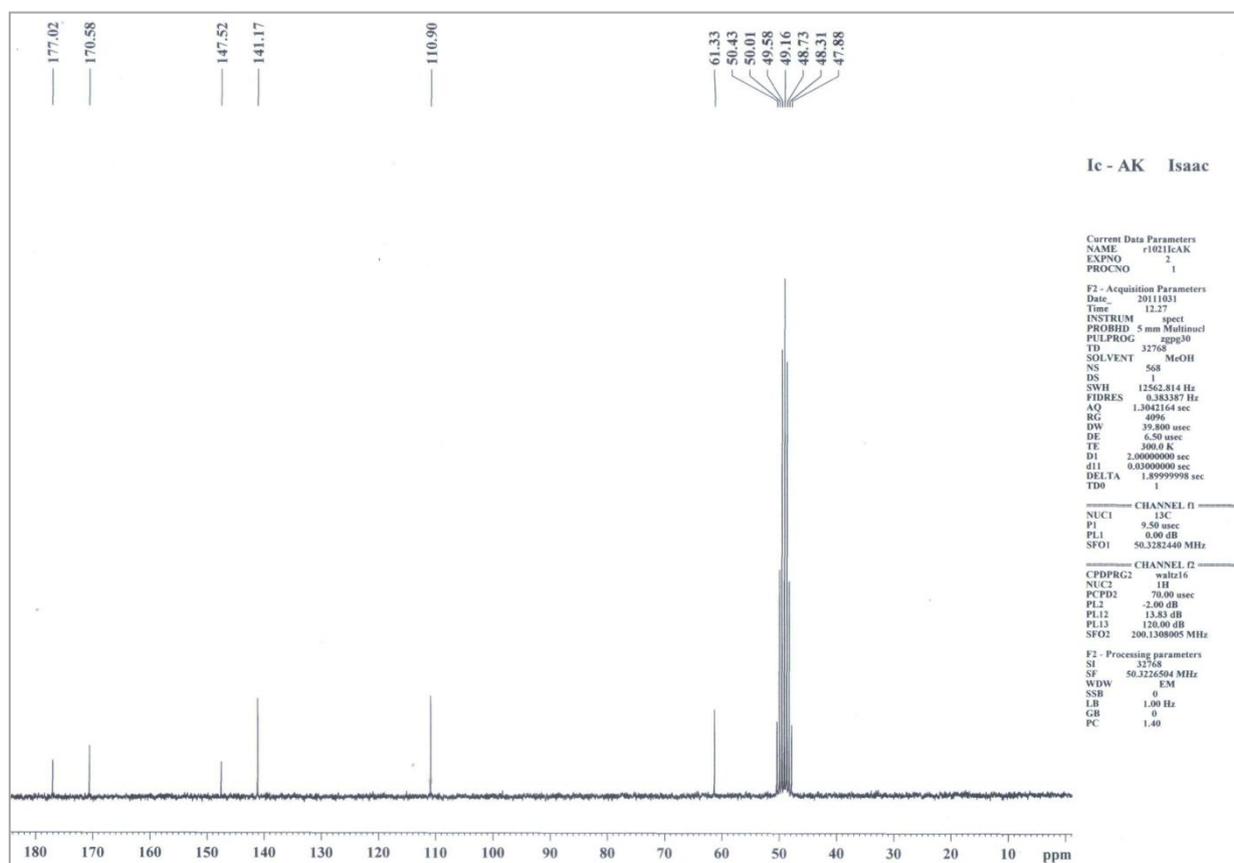
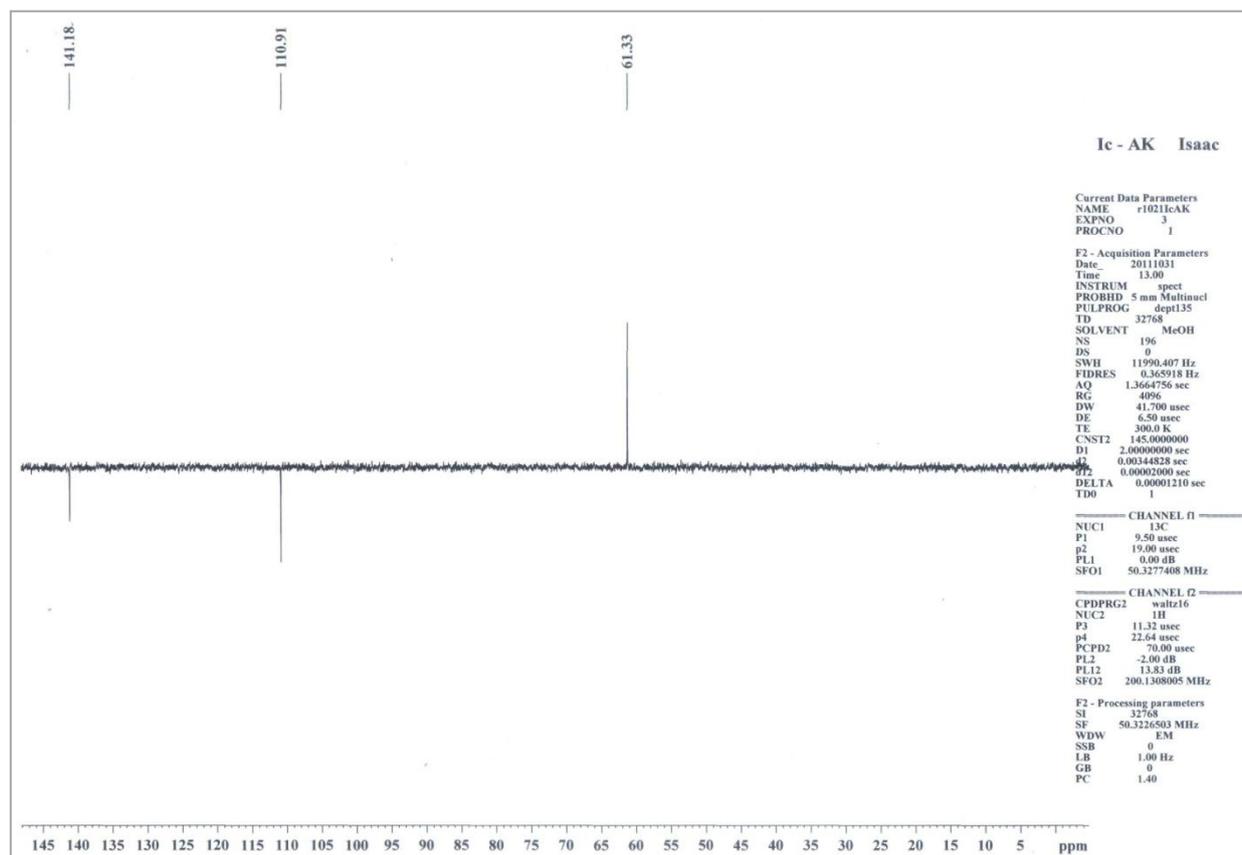


FIGURA 18 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do ácido kójico (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**FIGURA 19** – Subespectro DEPT do ácido kójico (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD). Nota: o sinal atribuído ao carbono metilênico encontra-se em fase (orientado para cima).

A hidroquinona (**3**) apresentou, no espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**FIG 20**, p. 52), um simpleto característico dos hidrogênios aromáticos desta molécula simétrica em  $\delta$  6,62, enquanto o espectro de RMN de <sup>13</sup>C (**FIG 21**, p. 52) apresentou dois sinais, sendo o primeiro em  $\delta$  117,0, referente aos carbonos metínicos 2, 3, 5 e 6, de acordo com o subespectro DEPT (**FIG 22**, p. 53) e, o segundo, em  $\delta$  151,4, referente aos carbonos aromáticos hidroxilados C-1 e C-4.

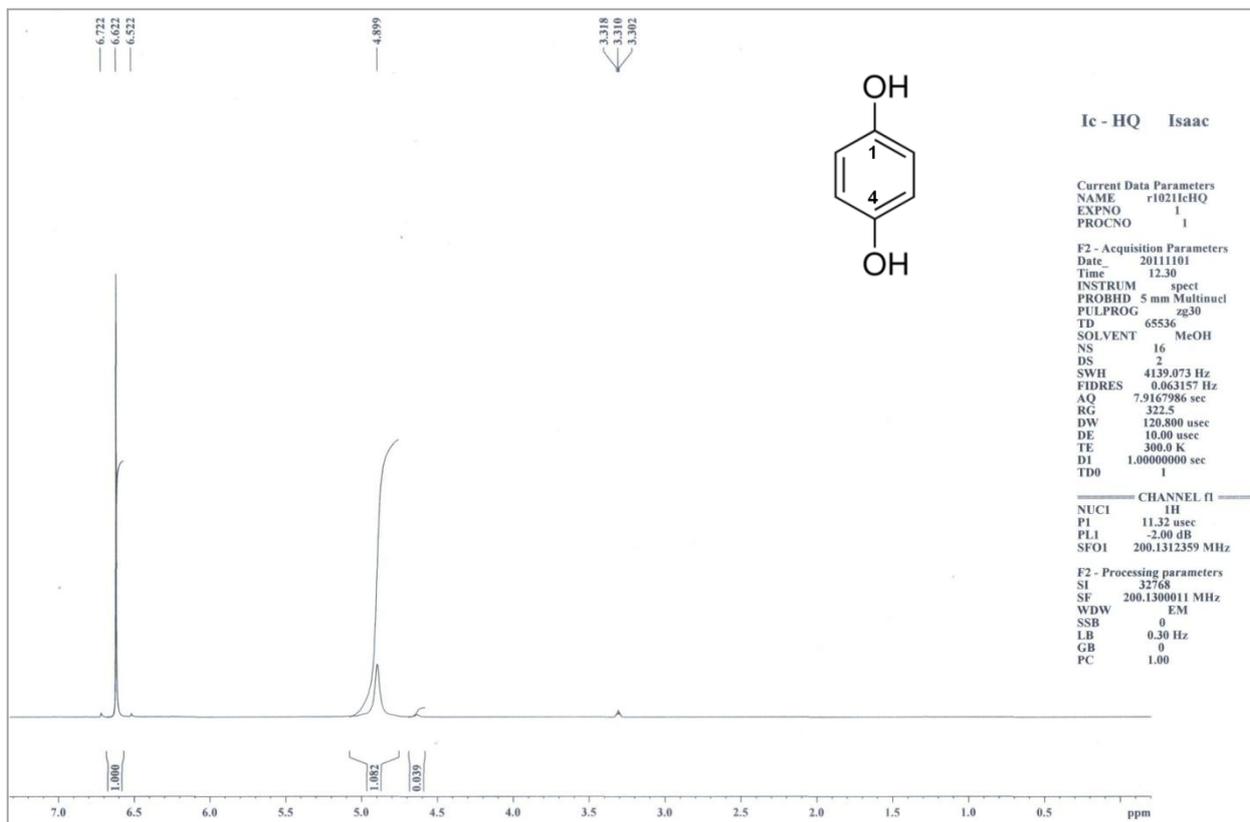


FIGURA 20 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da hidroquinona (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

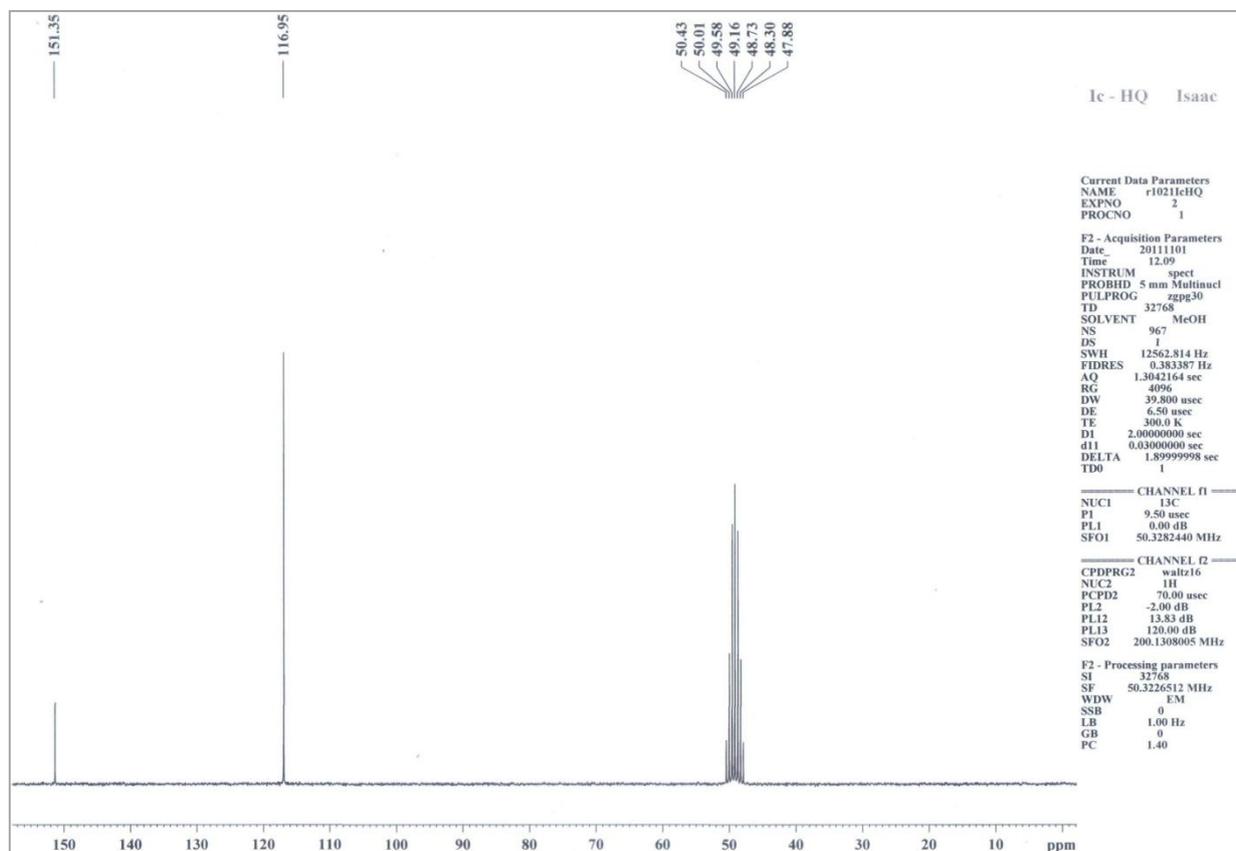


FIGURA 21 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da hidroquinona (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**FIGURA 22** – Subspectro DEPT da hidroquinona (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**FIG 23**, p. 54) do kaempferol (**7**), foram observados dois dupletos em  $\delta$  6,92 e 8,11, integrando para 2H cada, referentes aos hidrogênios aromáticos H-2'/H-6' e H-3'/H-5', com constantes de acoplamento de  $J = 9,0$  e  $J = 7,0$  Hz, respectivamente. Dupletos em  $\delta$  6,40 ( $J = 2,0$  Hz) e 6,18 ( $J = 2,2$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-6 e H-8, respectivamente. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C do kaempferol (**FIG 24**, p. 54) e o subspectro DEPT (**FIG 25**, p. 55) foram consistentes com a estrutura deste padrão, sendo observados quatro sinais de carbonos metínicos em  $\delta$  94,6, 99,4, 116,5 e 130,8. Os resultados obtidos estão de acordo com aqueles descritos por Pastene *et al.* (2001).

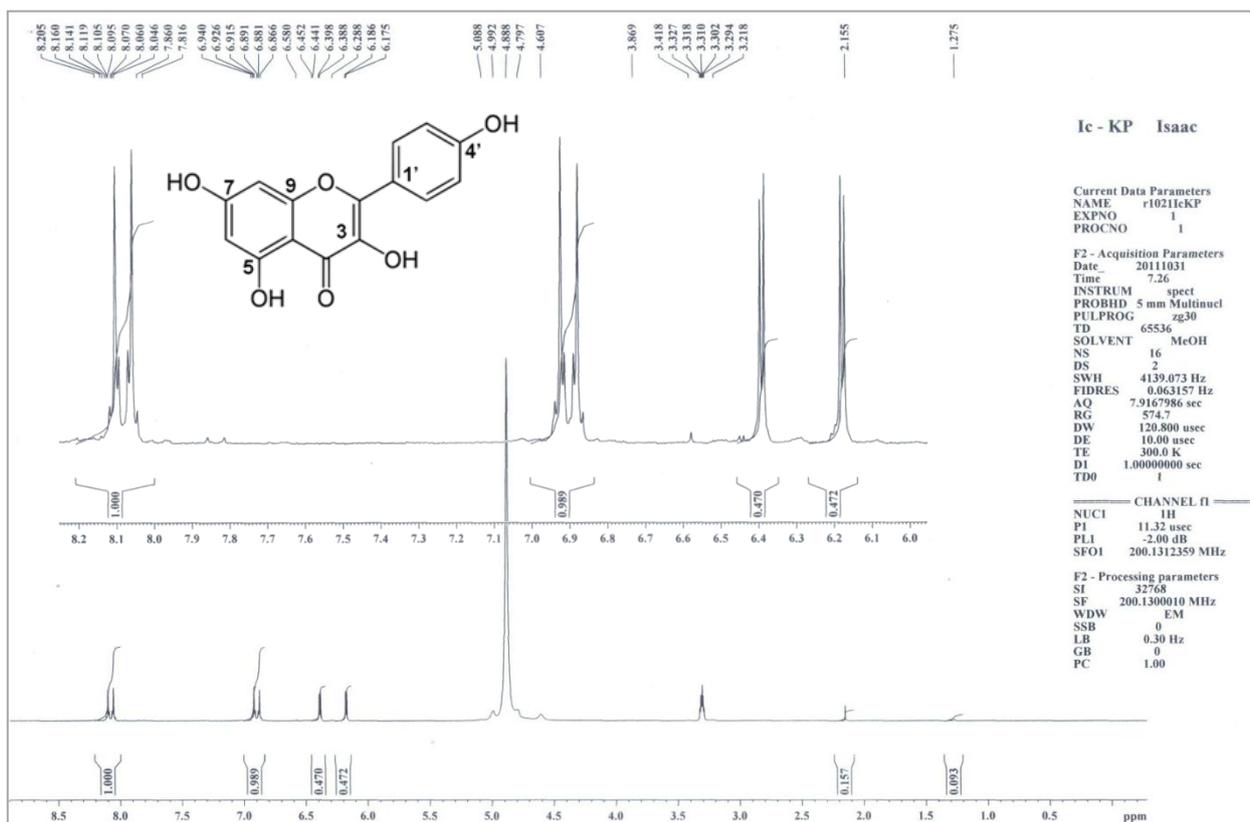


FIGURA 23 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do kaempferol (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

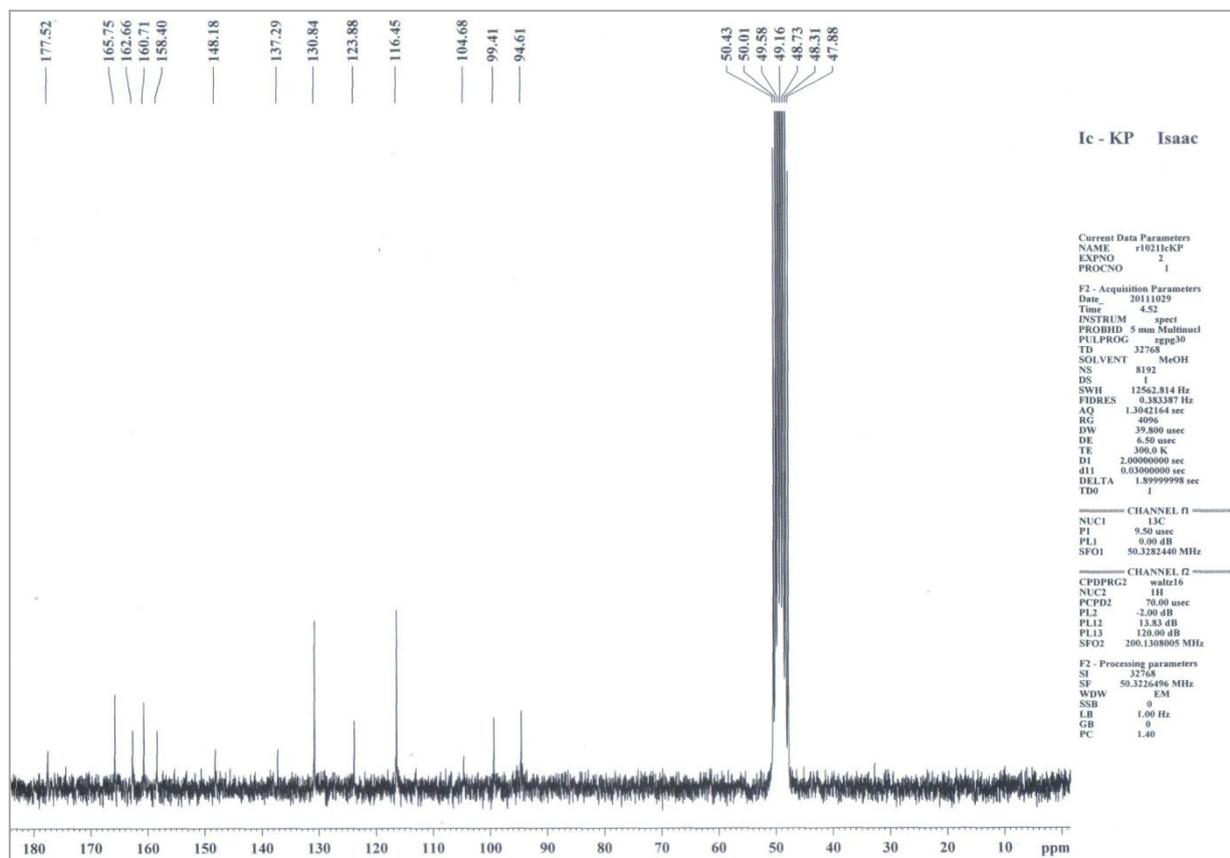
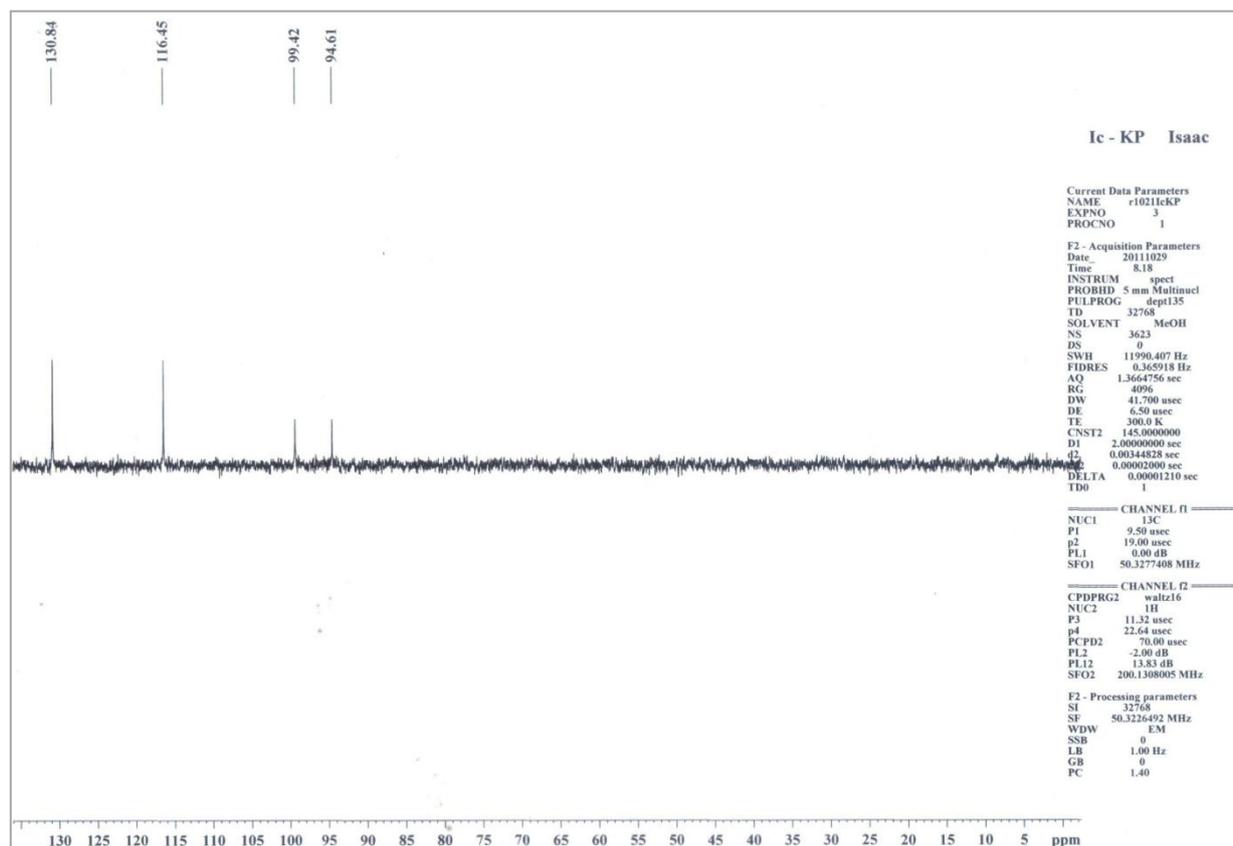


FIGURA 24 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do kaempferol (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**FIGURA 25** – Subespectro DEPT do kaempferol (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (**FIG. 26, p. 56**) da quercetina (**8**) apresentou quatro dupletos em  $\delta$  6,18 ( $J = 2,2$  Hz), 6,38 ( $J = 2,2$  Hz), 6,88 ( $J = 8,4$  Hz) e 7,73 ( $J = 2,2$  Hz) relativos aos hidrogênios aromáticos 6, 8, 5' e 2', respectivamente. Além disso, foi observado um dupletos duplo em  $\delta$  7,63 ( $J = 8,4$  e 2,2 Hz), referente ao H-6', cujas duas constantes de acoplamento corroboram a presença de dois hidrogênios na vizinhança, o H-5' em orto e o H-2', em meta. O espectro de RMN de <sup>13</sup>C da quercetina (**FIG. 27, p. 56**) apresentou treze sinais devido à coincidência de deslocamentos químicos (Martins *et al.*, 2006). A presença dos cinco carbonos aromáticos metínicos foi confirmada pela expansão do espectro de RMN de <sup>13</sup>C da quercetina (**FIG. 28, p. 57**).

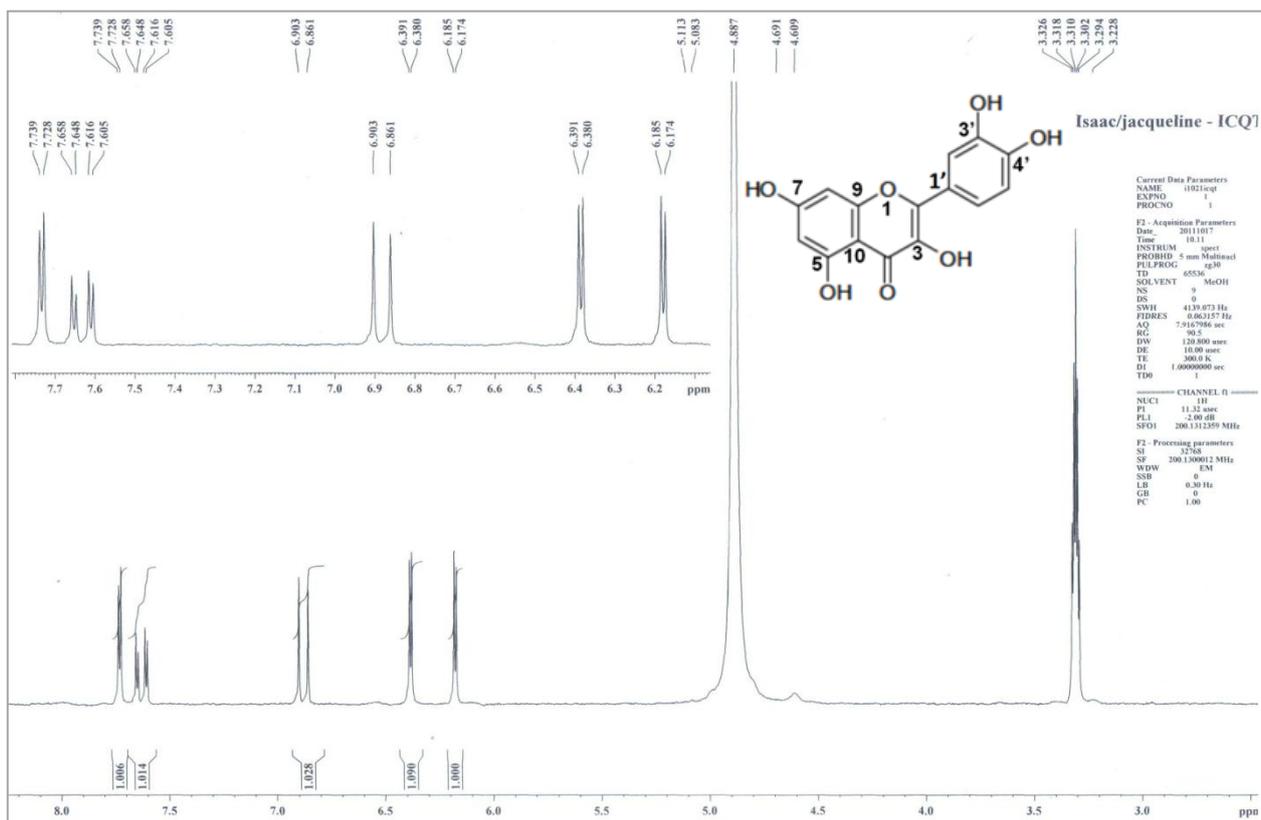


FIGURA 26 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H da quercetina (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

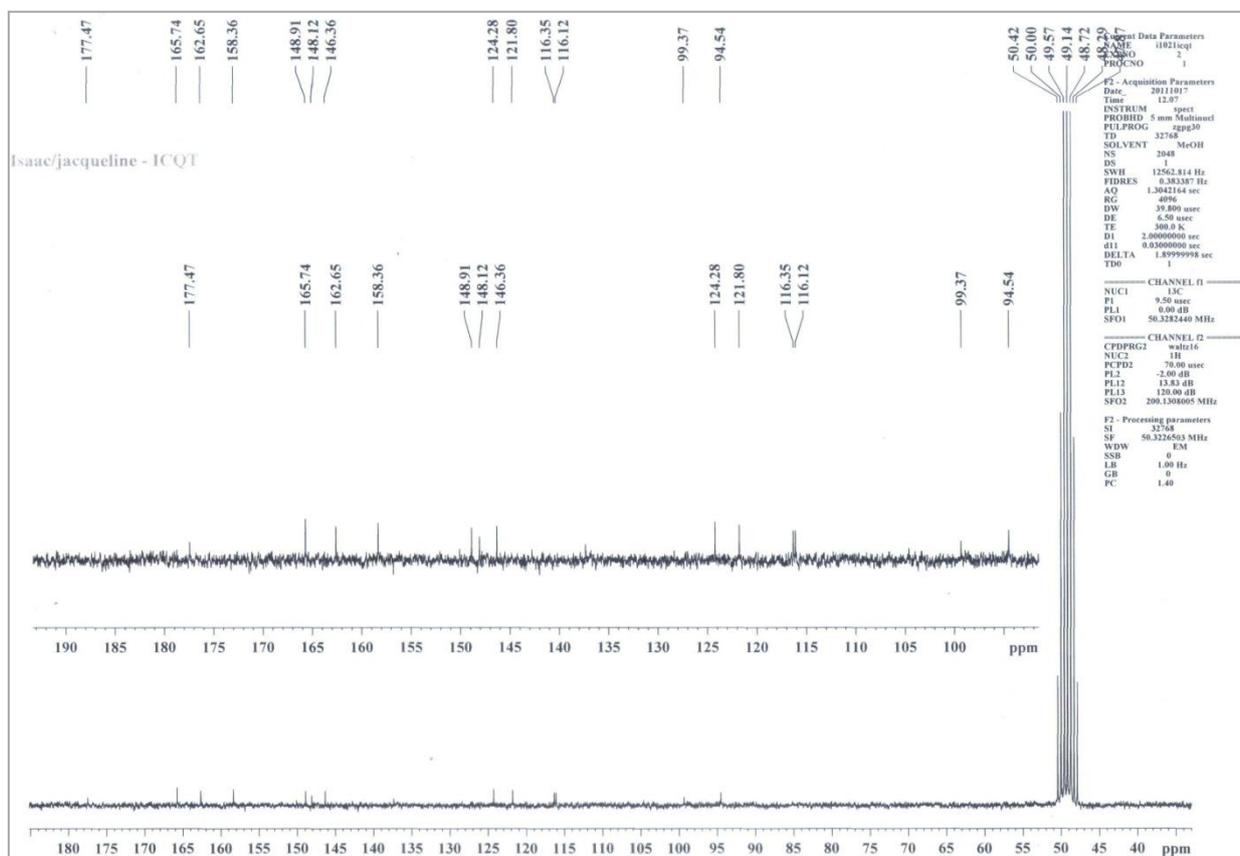
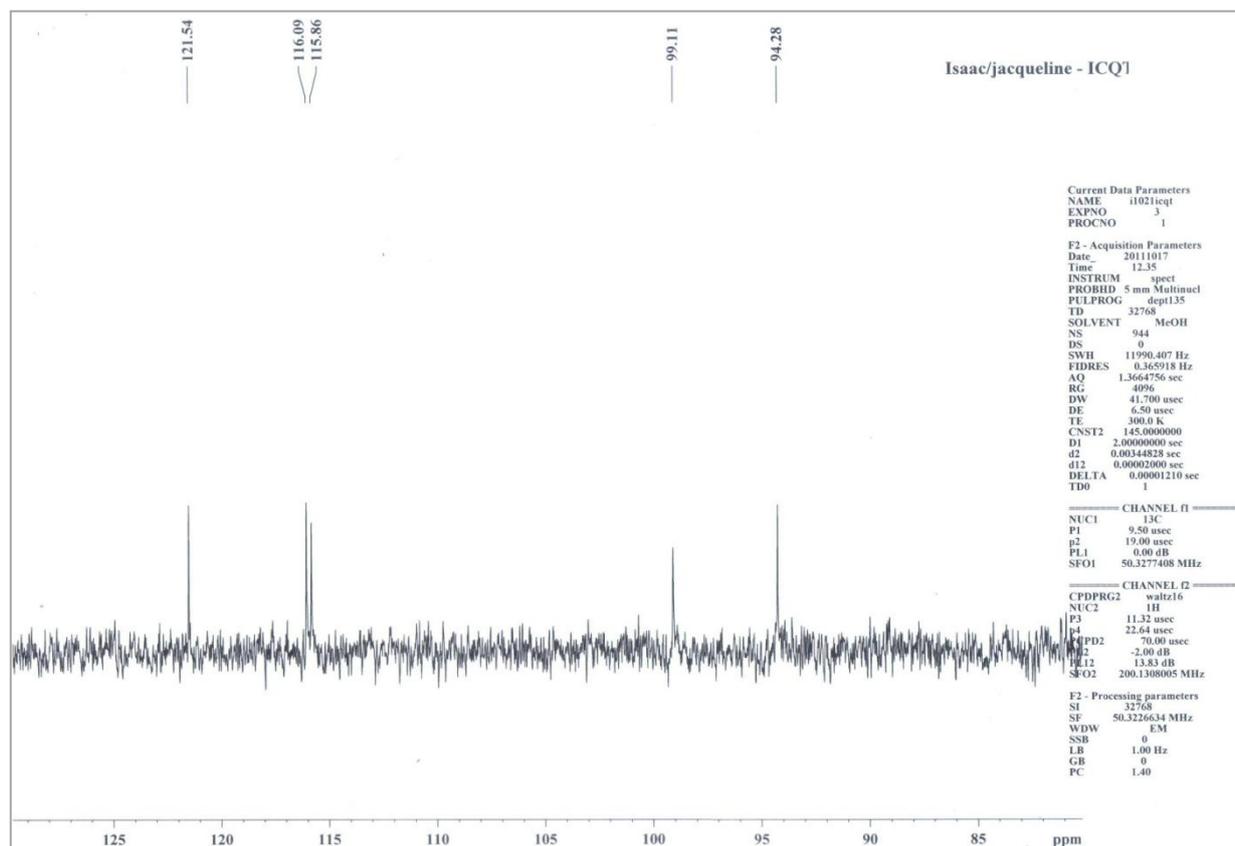


FIGURA 27 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C da quercetina (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).



**FIGURA 28** – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da quercetina (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIG 29**, p. 58) obtido para a rutina (**9**), foi observado um conjunto de sinais registrados entre  $\delta$  3,20 e  $\delta$  3,90 referente aos hidrogênios da porção glicosídica. Também foram observados quatro dupletos em  $\delta$  6,20 ( $J = 2$  Hz), 6,39 ( $J = 2$  Hz), 6,87 ( $J = 8,2$  Hz) e 7,61 ( $J = 2,2$  Hz) correspondentes aos hidrogênios aromáticos 6, 8, 5' e 2', respectivamente. Outro duplete, observado em  $\delta$  1,12 ( $J = 6,2$  Hz), integrando para 3 H, é relativo aos hidrogênios metilênicos H-6'''. No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da rutina (**FIG 30**, p. 58) e em sua expansão (**FIG 31**, p. 59), deu-se destaque à presença dos sinais em  $\delta$  179,5, relativo ao carbono C-4 carbonílico,  $\delta$  123,2, correspondente ao carbono C-1', e  $\delta$  102,5, referente ao carbono C-1''. Todos estes resultados coincidem com dados da literatura (Niassy *et al.*, 2004; Endringer, 2007).

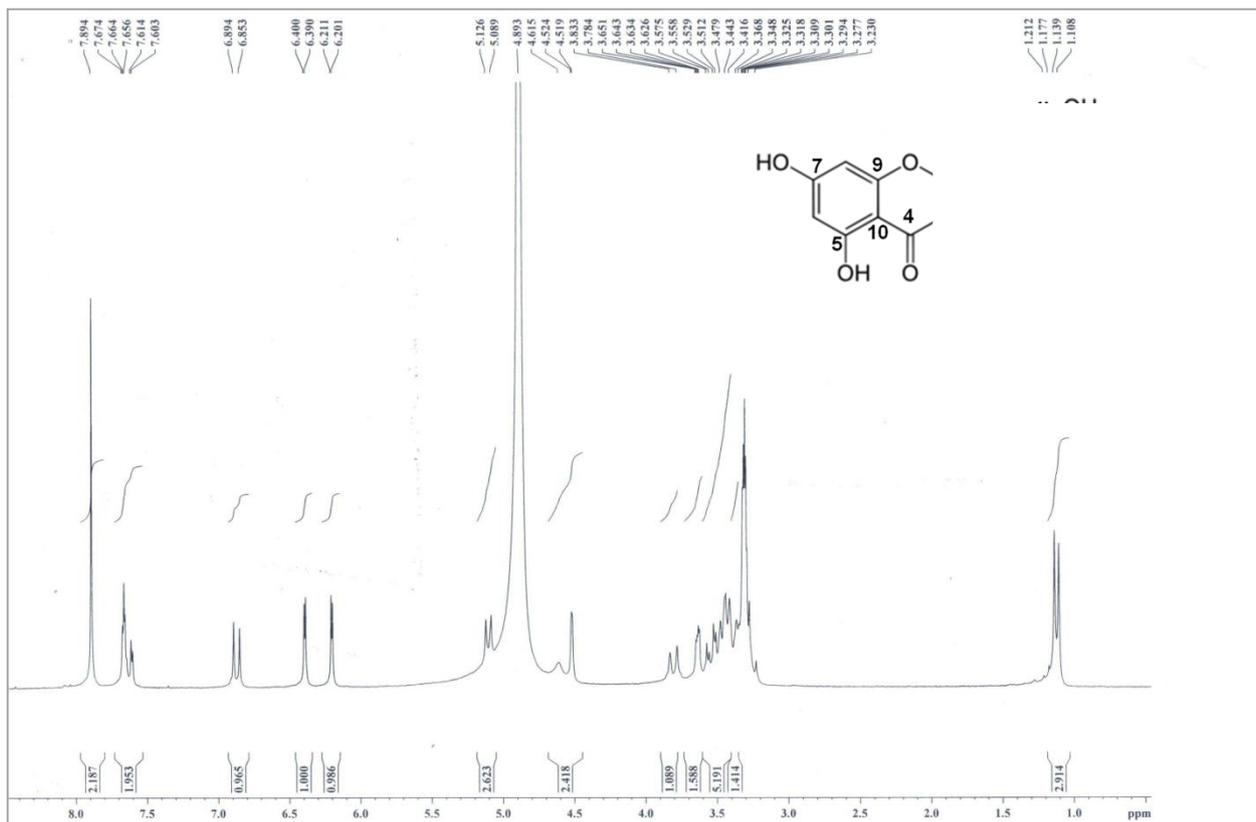


FIGURA 29 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da rutina (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

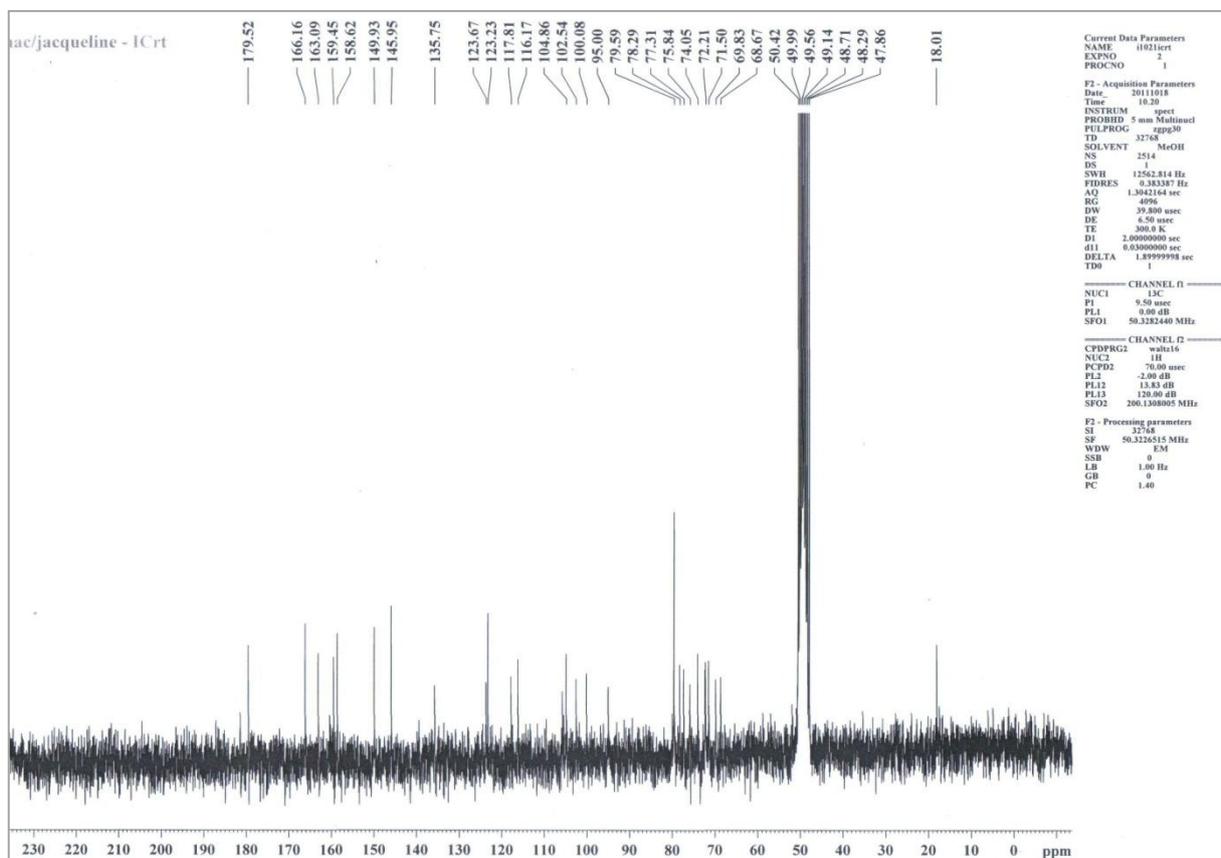
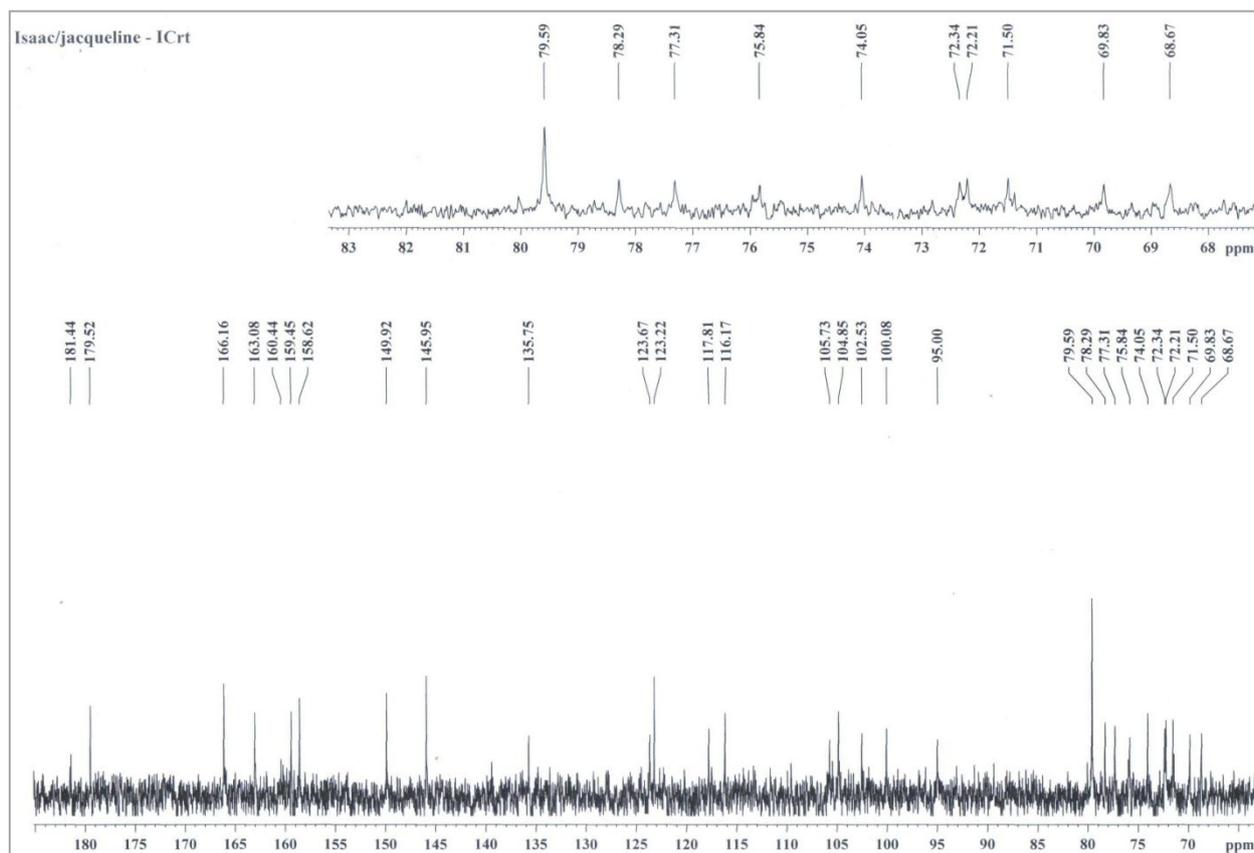


FIGURA 30 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da rutina (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**FIGURA 31** – Expansão do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da rutina (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIG 32, p. 60**) da  $\beta$ -amirina (**34**) apresentou um tripleto em  $\delta$  5,18 ( $J = 3,4$  Hz), que corresponde ao hidrogênio olefínico H-12, um duplete duplo em  $\delta$  3,22 ( $J = 6,6$  e  $5,4$  Hz), relativo ao hidrogênio carbinólico em C-3, e uma série de sete simpletos entre  $\delta$  0,79 e 1,13, referentes aos hidrogênios dos oito grupos metila, sendo que o sinal em  $\delta$  0,87, devido a sua integral, está associado aos seis hidrogênios equivalentes dos carbonos C-29 e C-30. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -amirina (**FIG 33, p. 60**) demonstrou a presença de 30 carbonos, sendo oito  $\text{CH}_3$ , dez  $\text{CH}_2$ , cinco  $\text{CH}$  e sete  $\text{C}$ , utilizando-se o subespectro DEPT (**FIG 34, p. 61**). Dentre os principais sinais de carbono observados, destacam-se aquele em  $\delta$  144,9 (quaternário), atribuído ao carbono C-13, o sinal em  $\delta$  121,4 (olefínico), relativo ao carbono C-12, e o sinal em  $\delta$  78,7, correspondente ao carbono C-3. Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  experimentais estão de acordo com dados da literatura (Duarte, 2000; Martins, 2009).

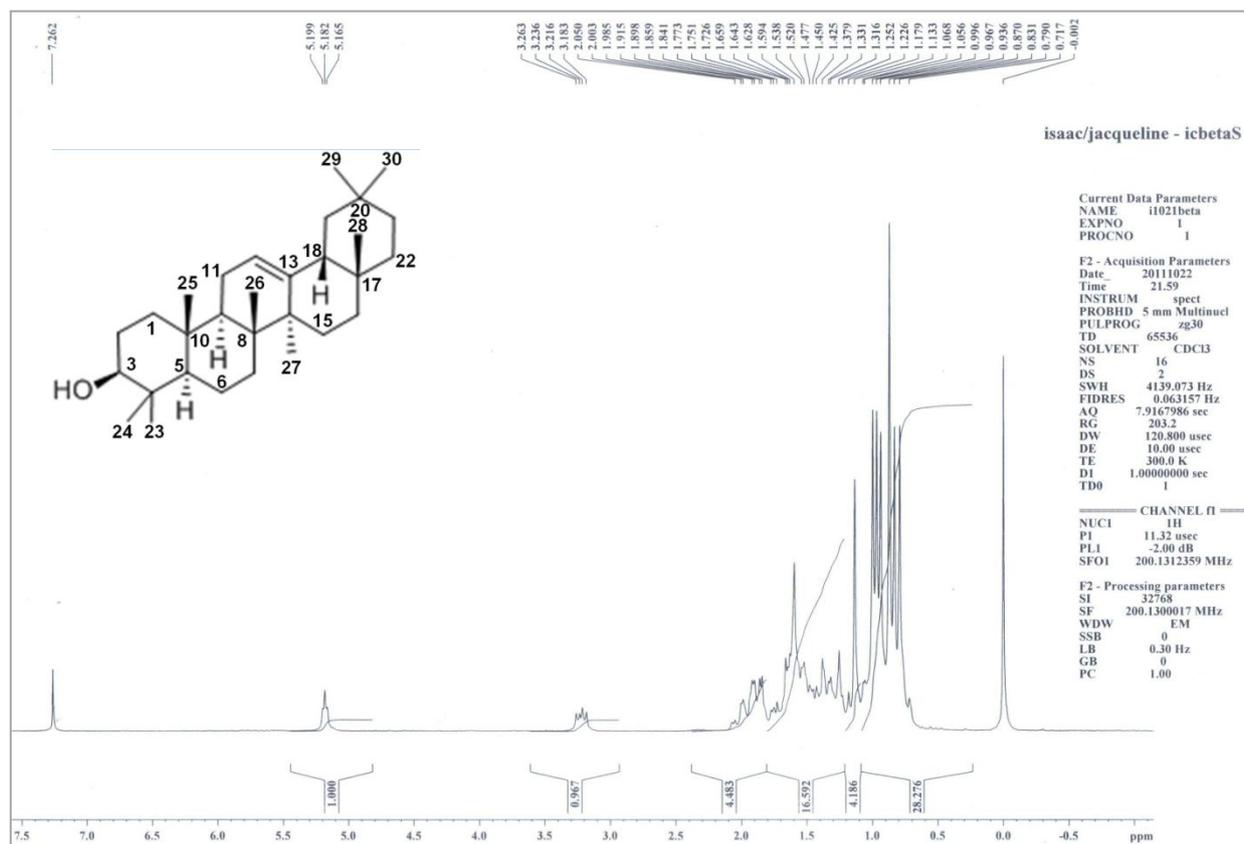


FIGURA 32 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da  $\beta$ -amirina (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

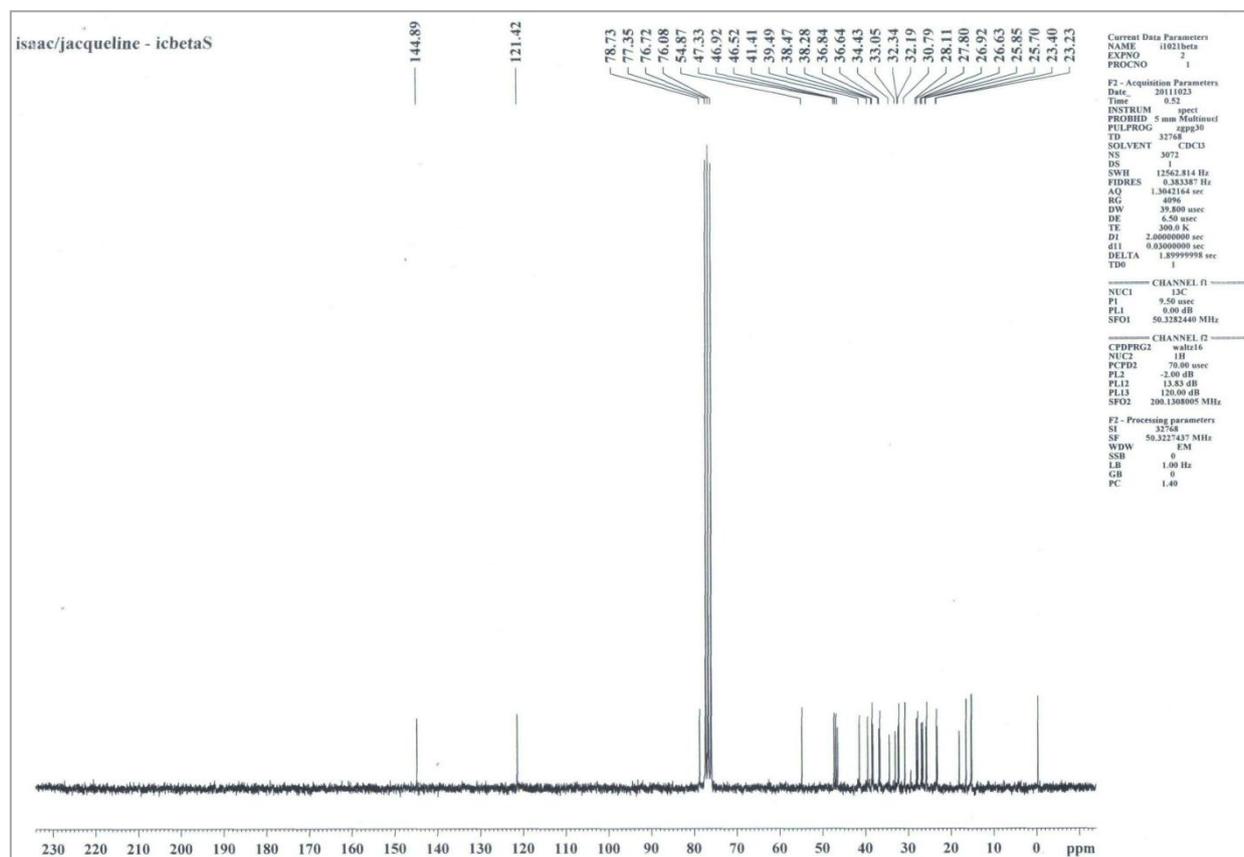
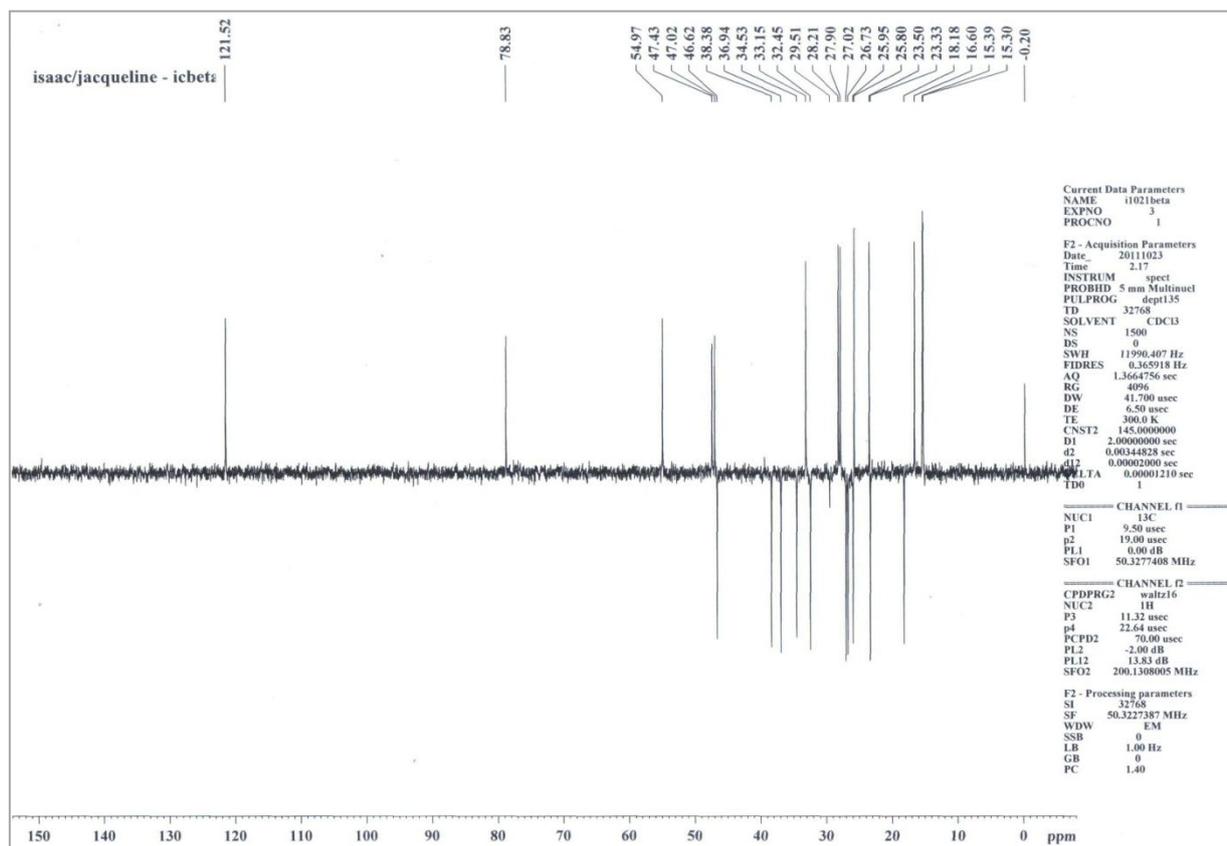


FIGURA 33 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da  $\beta$ -amirina (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**FIGURA 34** – Subespectro DEPT da  $\beta$ -amirina (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O estigmasterol (**35**) foi caracterizado por seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIG 35**, p. 62) no qual foram observados especialmente os sinais referentes a H-3 ( $\delta$  3,50) e os hidrogênios das ligações duplas C5-C6 ( $\delta$  5,33) e C22-C23 ( $\delta$  5,15). O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do estigmasterol (**FIG 36**, p. 62) mostrou os sinais característicos de C-3 em  $\delta$  71,5, e aqueles dos quatro carbonos olefínicos entre  $\delta$  121,4 e 140,4. Destes, o sinal em  $\delta$  140,4 não foi visualizado no subespectro DEPT (**FIG 37**, p. 63) mostrando ser este o sinal do carbono quaternário C-5. Os resultados encontrados experimentalmente coincidem com informações da literatura (Forgo & Kövér, 2004).

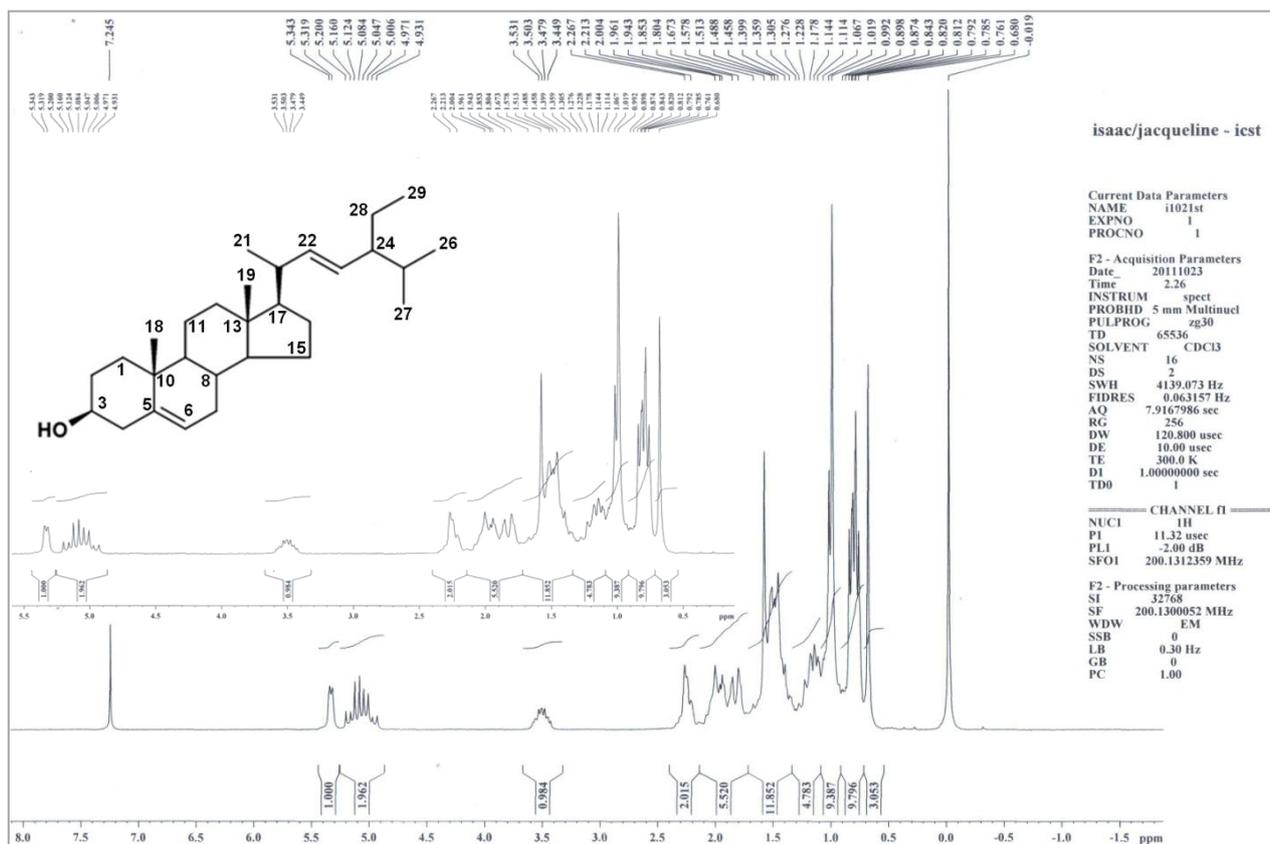


FIGURA 35 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do estigmasterol (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

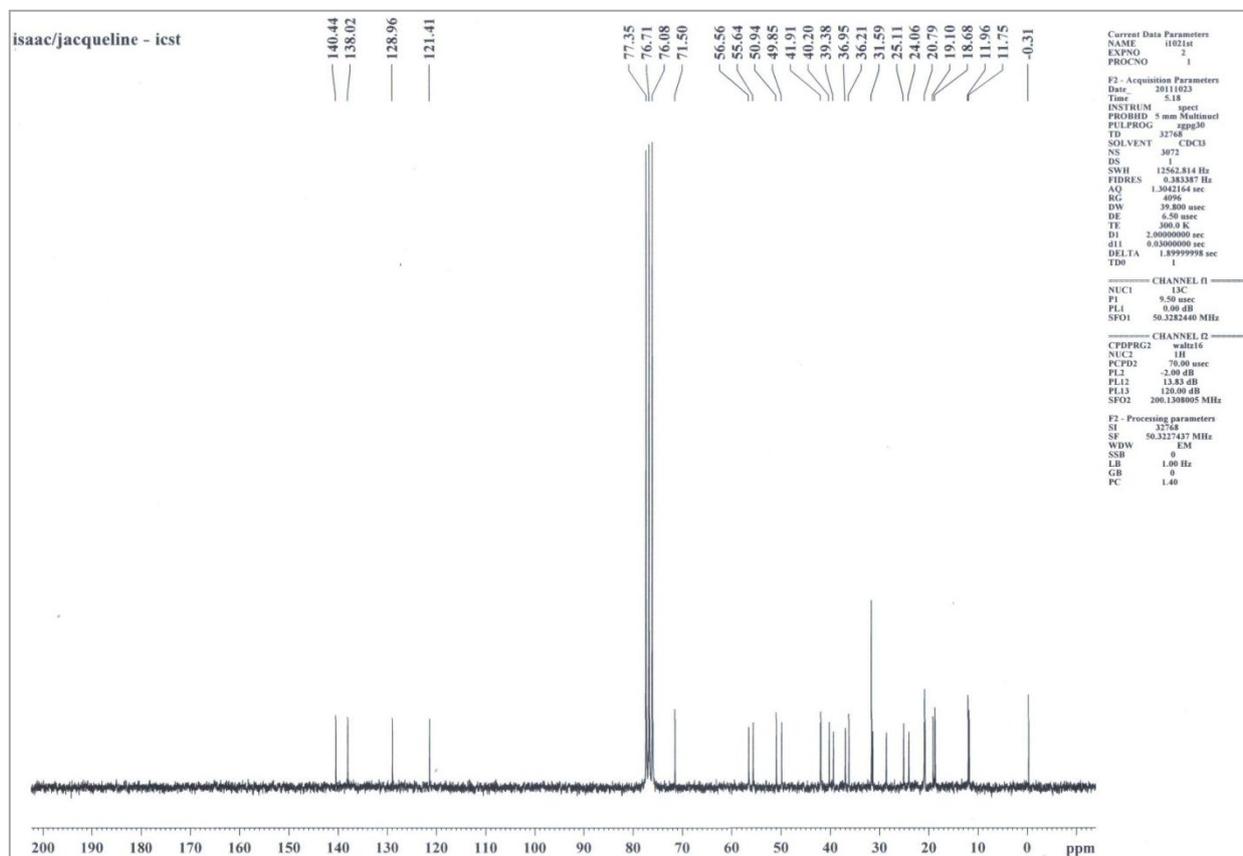
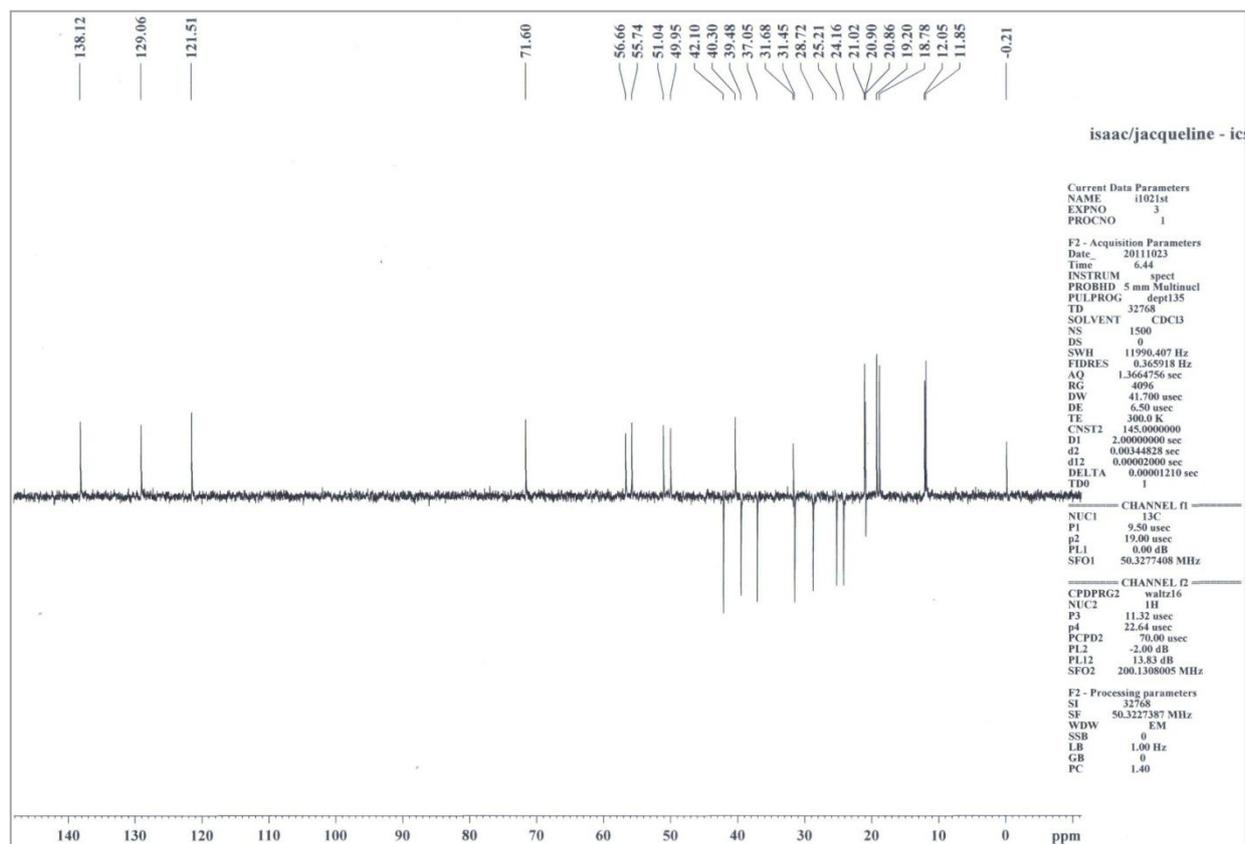


FIGURA 36 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C do estigmasterol (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**FIGURA 37** – Subspectro DEPT do estigmasterol (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

A análise por RMN dos extratos selecionados não pôde ser realizada da forma planejada, pois os espectros foram obtidos com baixa resolução, o que pode ser devido à natureza complexa das amostras ou à inadequação dos parâmetros operacionais. Entre os extratos, o que apresentou a melhor resolução de sinais nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (FIG. 38, p. 64) e de  $^{13}\text{C}$  (FIGs. 39, p. 64 e 40, p. 64) foi o IC-08. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato IC-08 (FIG. 38, p. 64), foram detectados sinais entre  $\delta$  0,70 e 1,50, referentes a hidrogênio de alcanos, indicativos da presença de terpenos ou compostos graxos. Entre  $\delta$  2,00 e 2,50, foram notados sinais de hidrogênio ligado a carbono vizinho a carbonila; entre  $\delta$  3,00 e 3,50, sinais de hidrogênio ligado a carbono oxigenado, tal como em açúcares, por exemplo. Na região de  $\delta$  3,50 a 4,60, observaram-se sinais de baixa intensidade relacionados a hidrogênio ligado a carbono olefínico ( $\text{HC}=\text{C}$ ). Por último, entre  $\delta$  6,50 e 7,50, foram observados sinais relativos a hidrogênios aromáticos. Associando dados do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIG. 39, p. 64) e do subspectro DEPT (FIG. 40, p. 65) de IC-08, foram observados dois sinais de CH ou  $\text{CH}_3$  de alcanos em  $\delta$  14,6 e 14,8, três sinais relativos a  $\text{CH}_2$  em  $\delta$  30,9, 40,4 e 64,3 ( $\text{RCH}_2\text{OH}$ ), um sinal de CH de alcano em  $\delta$  44,3, dois sinais em  $\delta$  71,1 e 72,0 referentes a carbonos metínicos ligados a OH, um sinal de carbono olefínico C em  $\delta$  110,1, e dois sinais de carbonos olefínicos em  $\delta$  146,5 e 146,6.

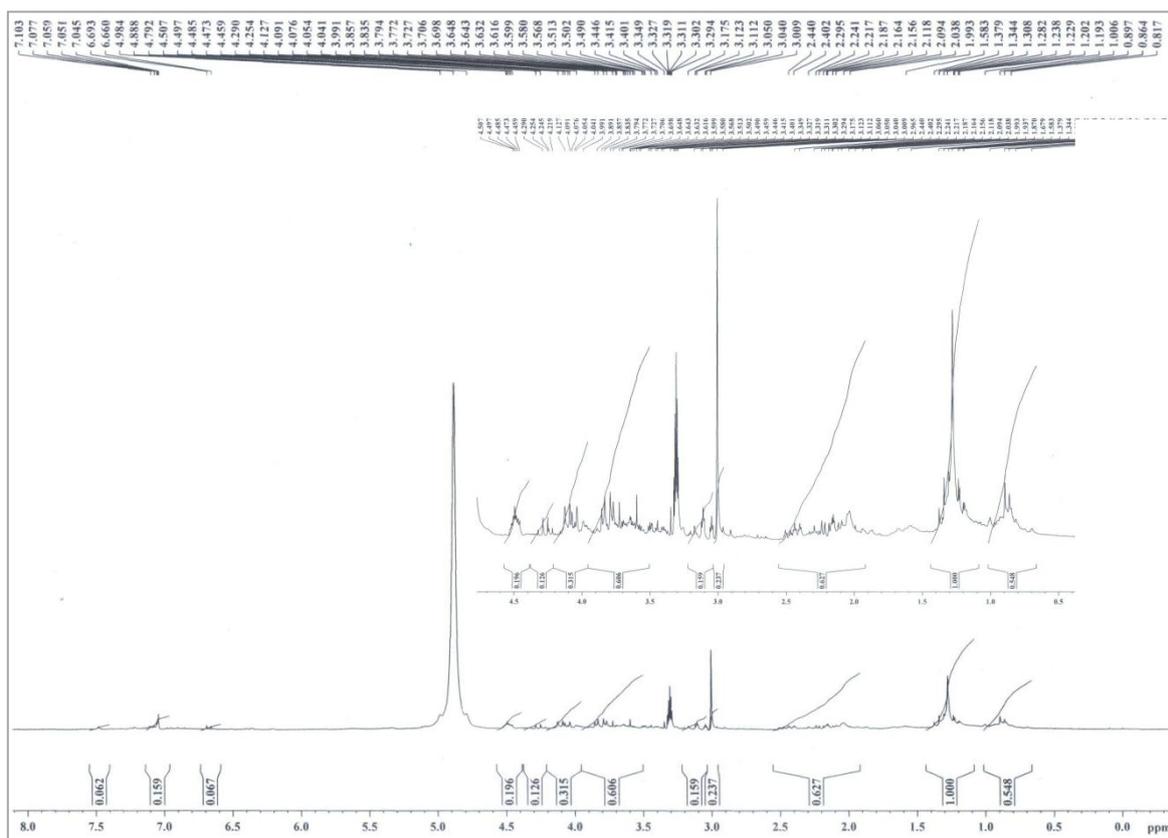


FIGURA 38 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato IC-08 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

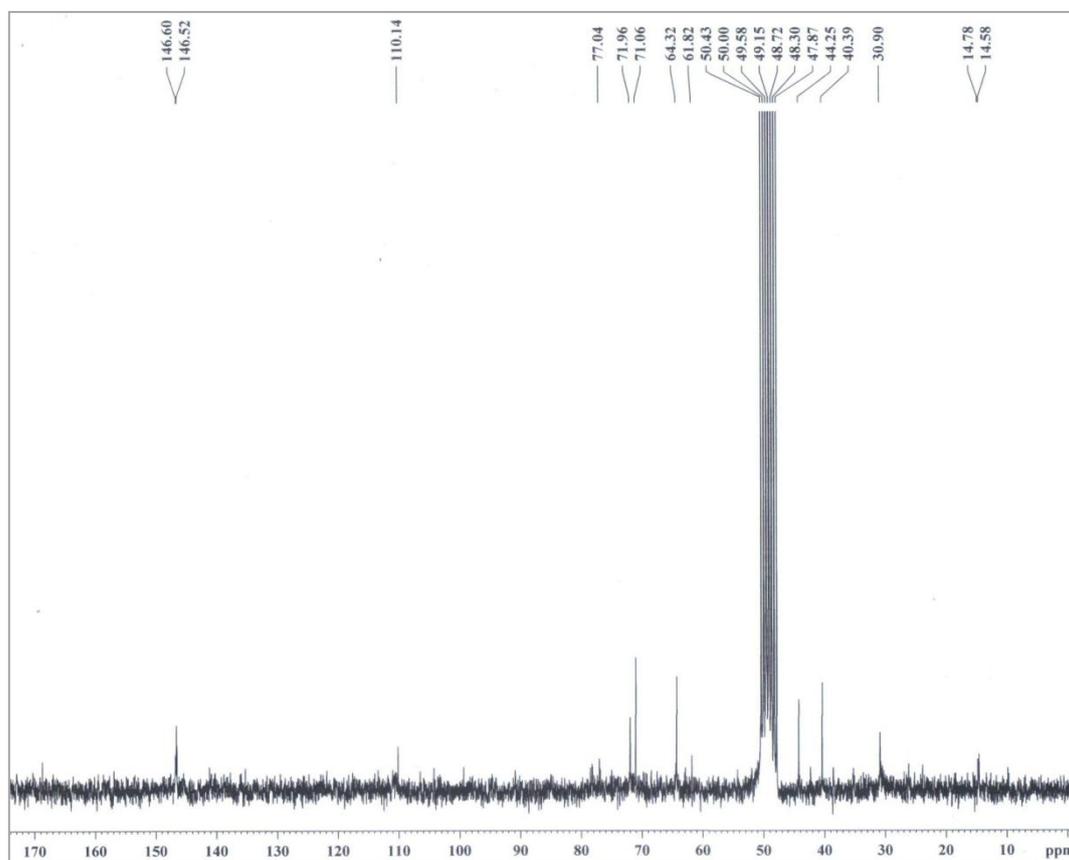
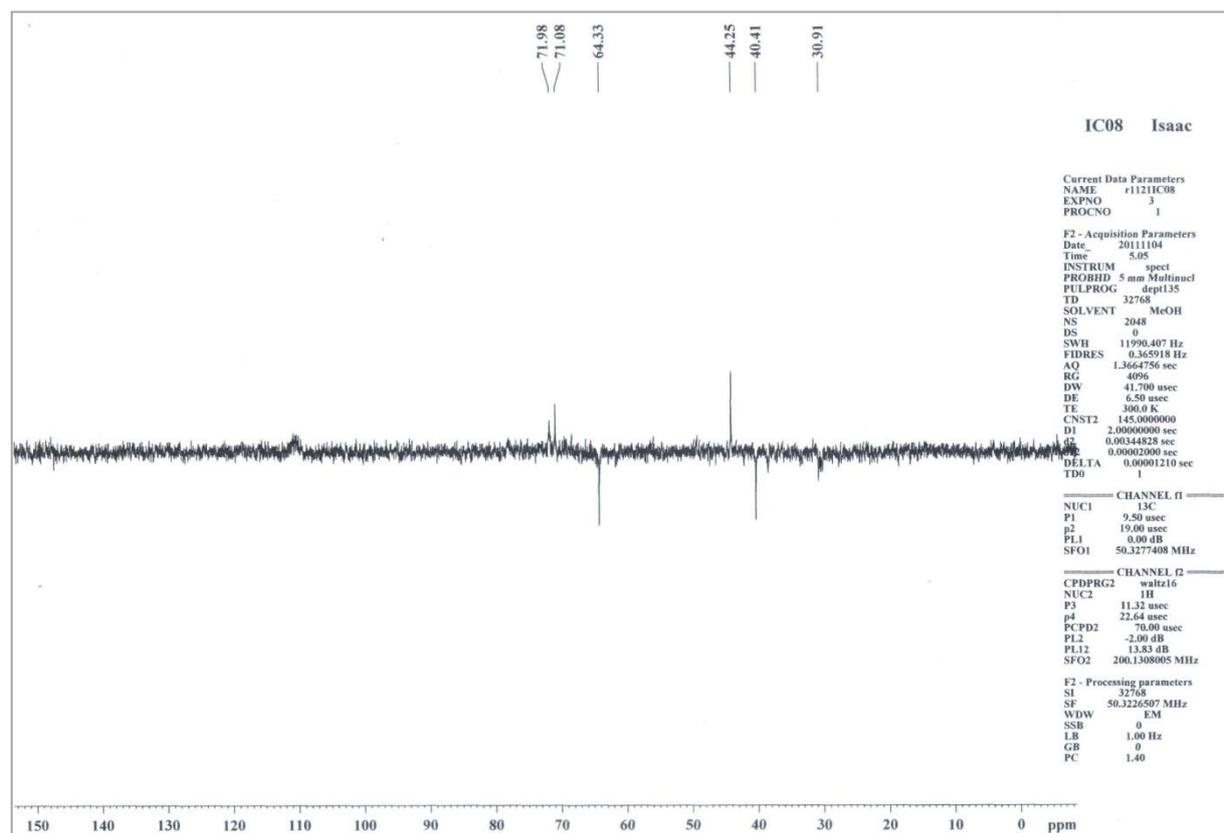


FIGURA 39 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do extrato IC-08 (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).



**FIGURA 40** – Subspectro DEPT do extrato IC-08 (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato IC-17 (**FIG. 41, p. 66**) apresentou perfil semelhante ao do extrato IC-08. Isto, em parte, já era esperado, pois se tratam de extratos de uma mesma espécie, *S. terebinthifolius*, apesar de oriundos de partes vegetais diferentes (cascas do tronco, em IC-17, e folhas, em IC-08). Os sinais observados entre  $\delta$  0,7 e 1,5 foram praticamente os mesmos de IC-08. Entre  $\delta$  2,00 e 2,50, IC-17 apresentou um sinal em  $\delta$  2,10 com intensidade um pouco maior do que os demais sinais desta região, o que não foi observado com IC-08. Com IC-17, observou-se um sinal em  $\delta$  2,60 que não está presente no espectro de IC-08. No IC-08, observou-se um sinal em  $\delta$  3,00, o qual não aparece no espectro do-IC-17. Na região entre  $\delta$  3,30 e 4,50, ambos os espectros voltam a apresentar uma relativa similaridade. Já entre  $\delta$  6,50 e 7,50, IC-17 apresenta apenas um pequeno sinal relativo a hidrogênio aromático, enquanto que, nesta região, IC-08 apresenta três sinais. Como IC-17 apresentou atividade anti-tirosinásica maior do que IC-08, espera-se que a diferença observada nesta propriedade seja causada pela ação de uma ou mais substâncias que estejam presentes apenas em IC-17. Para este extrato, infelizmente nenhum sinal foi observado na análise por RMN de <sup>13</sup>C.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H do extrato IC-03 (**FIG. 42, p. 66**) foi inserido neste trabalho apenas a título ilustrativo, dadas as limitações observadas em sua obtenção (já mencionadas na p. 63).

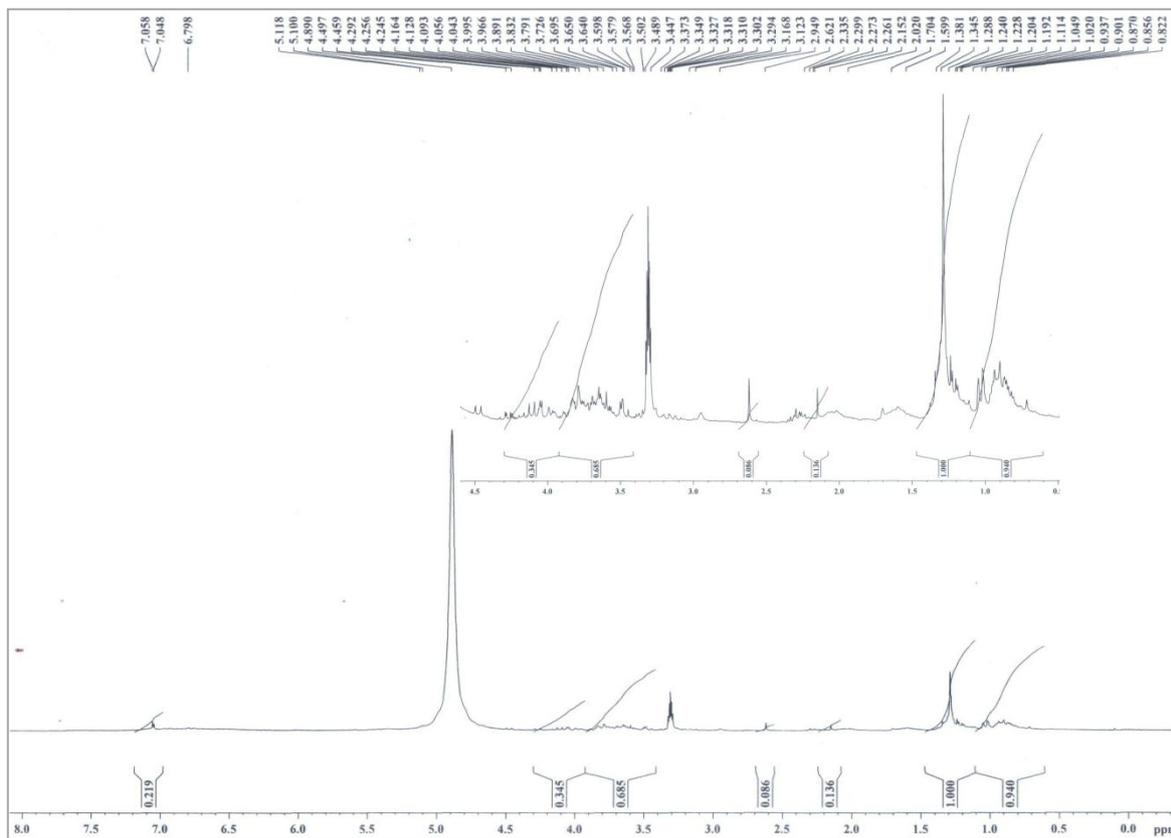


FIGURA 41 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato IC-17 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

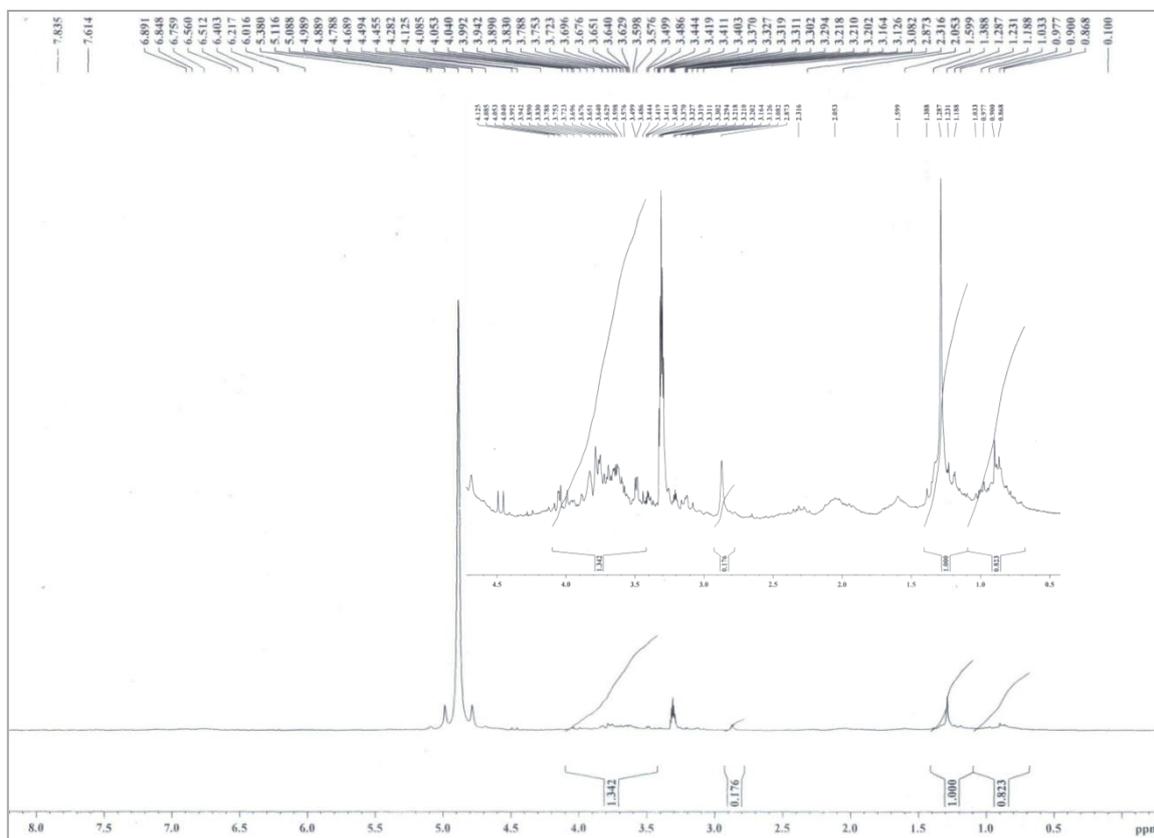


FIGURA 42 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato IC-03 (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

### 3.9. Estudo dos extratos mais ativos via CLAE-DAD e CLAE-EM

Com o objetivo de obter informações adicionais a respeito de suas composições químicas, os três extratos mais ativos foram analisados por CLAE-DAD e por CLAE-EM. É importante ressaltar que extratos vegetais devem ser padronizados para uso como fitoterápicos e que CLAE é um dos processos mais usados, sendo mais informativo nestes casos do que espectroscopia no UV, espectroscopia no IV e ressonância magnética nuclear (RMN). Embora estas técnicas sejam capazes de mostrar o perfil dos extratos (amostras complexas), CLAE também informa sobre o número de substâncias presentes e a proporção relativa entre elas. Em sistemas de CLAE-UV convencional, os detectores UV-Vis operam em comprimentos de onda fixos ou pré-determinados, fazendo com que o monitoramento da absorvância dos analitos seja feito em um único comprimento de onda por canal de leitura (Jinno, 2004). Em CLAE-DAD, o detector de arranjo de diodos é capaz de captar sinais espectrais de substâncias relativas a cada pico cromatográfico, dentro de uma faixa de comprimentos de onda. Pelo fato de operar com um feixe de luz contínua que consegue obter informações espectrais dentro de 4-20 ms, ou seja, mesmo para substâncias cujos picos são muito estreitos (com tempo de retenção muito rápido), é possível gerar espectros sem parar o fluxo, sendo muito útil por fornecer dados sobre a identidade e a pureza das substâncias correspondentes a cada pico detectado (Jinno, 2004). CLAE-EM associa a cromatografia líquida de alta eficiência, utilizada na separação de substâncias dos extratos, à espectrometria de massas, que analisa cada substância passível de ionização após sua eluição e separação por CLAE (Botsoglou, 2004).

Nas análises feitas por CLAE-DAD (**ANEXO 6, p. 115-122**), foram obtidas informações sobre a composição dos três extratos mais ativos a partir dos perfis espectroscópicos no UV-Vis das substâncias correspondentes a cada pico cromatográfico. Por questão de comparação, o extrato IC-15, mesmo não sendo um dos mais ativos, também foi analisado por esta técnica pelo fato de ter apresentado a melhor resolução de picos através de CLAE-UV (**FIG. 12, p. 43**). Os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD apresentaram os mesmos perfis daqueles obtidos por CLAE-UV. Os espectros no UV-Vis, obtidos por CLAE-DAD, relativos às substâncias correspondentes aos picos cromatográficos apresentaram, de um modo geral, bandas máximas de absorção em torno de 350 e abaixo de 300 nm. Dos extratos testados, apenas o IC-03 apresentou espectros no UV-Vis com bandas máximas de absorção em 525 nm e 400 nm, além das outras já mencionadas. Os resultados encontrados reforçam a ideia de que os inibidores da tirosinase eventualmente presentes nos extratos mais ativos pertencem à classe dos compostos aromáticos e ou polifenólicos, já que as absorções visualizadas ocorreram na região entre 350 e 280 nm (Andrade & Seabra, 2003).

Nas análises realizadas por CLAE-EM (**ANEXO 7, p. 123-134**), os perfis obtidos nos cromatogramas por CLAE-DAD foram diferentes daqueles obtidos por espectrometria de massas, o que é justificado pelo fato de que quando uma amostra é analisada por CLAE-EM, ela passa por ambos os detectores, DAD e de massas. No DAD, são detectadas as substâncias que absorvem na região do UV-Vis, enquanto que, no detector de massas utilizado, as amostras devem ser ionizadas por *eletrospray* (ESI) para serem detectadas. Nem todas as substâncias ionizáveis presentes absorvem no UV-Vis, assim como nem todas as substâncias são ionizáveis, sendo esta última afirmativa verdadeira somente no caso específico de determinadas substâncias cuja ionização depende do tipo de feixe do aparelho e das condições aplicadas na análise (Silverstein *et al.*, 2005). Isto explica a diferença entre os cromatogramas no UV-Vis e os de íons (**ANEXOS 6 e 7**). Muitas vezes, as intensidades dos picos também são diferentes devido à facilidade com que uma amostra é ionizada frente a outras, o que não está diretamente relacionado com a concentração nem com a absorvância observada no UV-Vis.

As análises por CLAE-EM foram realizadas com autofragmentação. Os espectros de massas (**ANEXO 7**) que foram identificados com a sigla +MS foram obtidos por varredura completa, enquanto aqueles identificados com +MS2 (xxx) correspondem aos espectros de fragmentação ampliados nas proximidades do pico de massa xxx a partir dos espectros +MS. Por se tratar de um processo automático, nem todos os íons são fragmentados, apenas os mais intensos. Nos espectros de massas obtidos, e dada a complexidade das amostras, procurou-se identificar principalmente os picos mais intensos e, portanto, os mais estáveis, cujas razões  $m/z$  estão relacionadas às massas molares (MM) de constituintes já descritos na literatura para cada extrato. Paralelamente, a atividade anti-tirosinásica destes constituintes foi consultada em algumas referências (Kim & Uyama, 2005; Chang, 2009; Smit *et al.*, 2009).

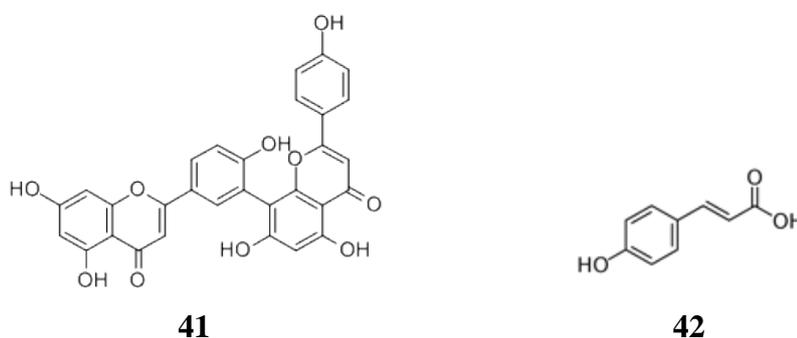
A partir de informações sobre a composição química do extrato IC-03 (folhas de *B. gaudichaudii*), descritas por Lourenço (2001), Monteiro *et al.* (2002) e Pozetti (2005), e da análise dos espectros de massas deste extrato, foram observados sinais possivelmente relacionados à presença de umbeliferona (**36**), ácido cafeico (**33**), isoorientina (**37**) e  $\beta$ -sitosterol (**38**) ou estigmasterol (**35**), (**TAB. 8, p. 69**). Destas substâncias, a umbeliferona é um conhecido inibidor da tirosinase (Matos *et al.*, 2011).



**Tabela 9:** Resultados obtidos a partir da análise dos espectros de massas de IC-08.

Tipo de espectro e tempo de retenção (min)	Razão $m/z$ do pico observado	Substância ou fragmento possivelmente associado ao pico	Massa molar (MM) da substância ou fragmento ( $\text{g mol}^{-1}$ )
+MS, 13,7 min	465,0	miricetrina	464,38
+MS2(465,1), 27,6 min	302,9	ácido elágico ou fragmento de miricetrina ( $M^+ - 16$ )	302,20 318,24
+MS2(284,4), 46,9 min	286,3	kaempferol ou luteolina	286,23 286,24

Os espectros de massas do extrato IC-17 (cascas do tronco de *S. terebinthifolius*) apresentaram sinais indicativos da presença de tetrahydroamentoflavona (**41**), ácido *p*-cumárico (**42**), fragmento de quercetina (**8**) (ou análogo) após a perda de uma molécula de água, e de kaempferol (**7**) ou luteolina (**10**) (ou um análogo destas substâncias) (**TAB. 10**), de acordo com a composição química descrita na literatura para este extrato (Carvalho *et al.*, 2003; El Massry *et al.*, 2009). Dentre os compostos citados, somente a tetrahydroamentoflavona não foi descrita como inibidor da tirosinase.

**Tabela 10:** Resultados obtidos a partir da análise dos espectros de massas de IC-17.

Tipo de espectro e tempo de retenção (min)	Razão $m/z$ do pico observado	Substância ou fragmento possivelmente associado ao pico	Massa molar (MM) da substância ou fragmento ( $\text{g mol}^{-1}$ )
+MS, 2,9 min	544,0	tetrahydroamentoflavona	544,51
+MS, 12,8 min	163,1	ácido <i>p</i> -cumárico ( $M^+ - 1$ )	164,16
+MS2(355,0), 12,8 min	163,1	ácido <i>p</i> -cumárico	164,16
+MS, 35,1 min	163,1	ácido <i>p</i> -cumárico	164,16
+MS, 47,0 min	284,3	quercetina ( $M^+ - 18$ )	302,24
+MS2(284,4), 47,0 min	286,2	kaempferol ou luteolina	286,23 286,24

### 3.10. Incorporação dos extratos mais ativos em uma formulação-base farmacêutica

Um creme-base de sensação suave ao toque, de fácil espalhabilidade e rápida absorção pela pele sem deixá-la oleosa, foi preparado segundo os princípios clássicos de formulação de emulsões do tipo O/A (óleo em água) (Ansel *et al.*, 2000). Empregou-se a fórmula de um creme normalmente utilizado como veículo em formulações farmacêuticas ou cosméticas indicadas ao cuidado da pele, tais como hidratantes e protetores solares.

Os extratos mais ativos (IC-03, IC-17 e IC-08) foram incorporados isoladamente neste creme-base de duas formas distintas: na primeira, os extratos foram solubilizados em 1 mL de etanol e, em seguida, filtrados em membrana de 0,45 µm; na segunda, os extratos foram solubilizados em etanol e incorporados diretamente no creme sem filtração. Como controle, um creme contendo ácido kójico também foi preparado nas mesmas condições que as demais formulações. Para a incorporação dos extratos e do ácido kójico no creme-base, os mesmos foram, após a solubilização em etanol, adicionados aos poucos, sob agitação e, em seguida, as preparações foram sonicadas por 30 a 60 s a fim de garantir uma boa homogeneização das amostras nas formulações.

As formulações foram submetidas a um estudo de estabilidade primária no qual foi observada a existência de variações significativas nos cremes, tais como separação de fases, mudança de cor, precipitação e outros aspectos físicos ou químicos. Não foram observadas alterações significativas após 60 dias contados a partir de seu preparo, mostrando a estabilidade primária das formulações.

### 3.11. Testes de inibição da tirosinase com as formulações contendo os extratos mais ativos

As formulações contendo os três extratos mais ativos (2,5% m/m) foram submetidas aos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia no UV-Vis e com discos de batata. Adicionalmente, devido à natureza das amostras (cremes), também foi realizada uma análise complementar através de espectroscopia no UV-Vis utilizando um acessório para leitura por reflexão difusa (DR), técnica utilizada para avaliar as propriedades dos materiais com base na luz refletida, sendo extensamente aplicada a uma ampla gama de análises químicas de gases, líquidos e sólidos, com a principal vantagem de contornar erros e limitações geralmente ocorridos quando se analisam líquidos ou materiais turvos (como é o caso de cremes) por espectroscopia no UV-Vis com leitura em

absorvância, em função do inevitável espalhamento do feixe de luz que ocorre nesta última técnica (Mamangkey *et al.*, 2010).

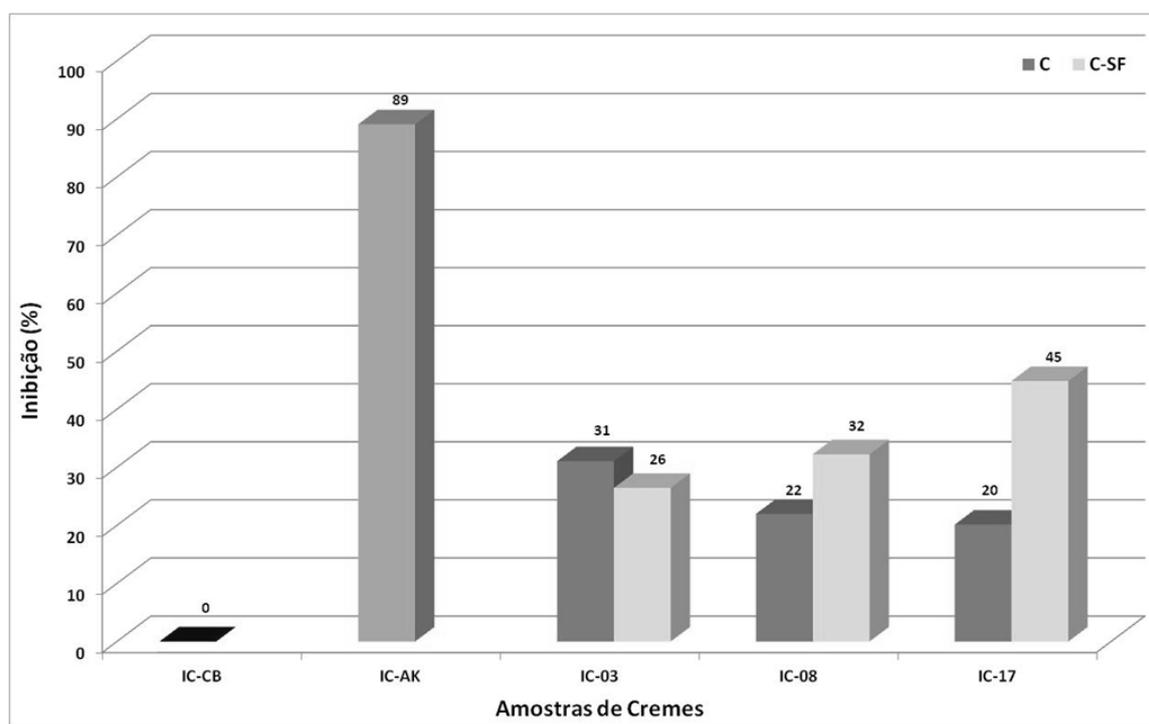
Os resultados do teste de inibição enzimática via espectroscopia no UV-Vis para os cremes são apresentados na **TAB. 11** e **FIG. 43, p. 73**. Em comparação com os inibidores puros (ácido kójico e extratos), observou-se uma redução nos valores de inibição, sendo esta mais acentuada para os extratos. Esta redução é explicada, em parte, pela menor concentração dos extratos devido à sua diluição no creme-base (2,5% m/m). Entre os cremes contendo soluções filtradas (C) e soluções não filtradas (C-SF) dos extratos, observaram-se diferenças nos valores de atividade anti-tirosinásica. A formulação contendo solução filtrada do extrato IC-03 apresentou um percentual de inibição maior (31%) quando comparada com a formulação contendo solução não filtrada deste extrato (26%). Para os extratos IC-08 e IC-17, a inibição enzimática maior foi observada com as formulações contendo soluções não filtradas destes extratos (32 e 45%, respectivamente, contra 22 e 20% registrados para os cremes contendo soluções filtradas dos extratos IC-08 e IC-17). A mesma tendência foi observada no teste via espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa e no teste com discos de batata para estes dois extratos, como apresentado adiante.

**Tabela 11:** Coeficientes de inclinação (k) das partes ascendentes das curvas de formação de dopacromo obtidas na ausência e presença dos cremes contendo ácido kójico e os três extratos vegetais mais ativos.

Amostra	0-100 s	100 – 200 s	200 – 300 s
	$k_1 / s^{-1}$	$k'_1 / s^{-1}$	$k''_1 / s^{-1}$
IC-CB	<b>0,001</b>	<b>0,002</b>	<b>0,001</b>
IC-AK-C	<b>n.d.*</b>	<b><math>8 \times 10^{-5}</math></b>	<b><math>1 \times 10^{-4}</math></b>
IC-03-C	0,001	0,001	0,001
IC-03-C-SF	0,001	0,001	0,001
IC-08-C	0,001	0,001	0,001
IC-08-SF	$7 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$	$8 \times 10^{-4}$
IC-17-C	0,001	0,001	0,001
IC-17-C-SF	$6 \times 10^{-4}$	$7 \times 10^{-4}$	$6 \times 10^{-4}$

\* n.d.: não detectado.

IC-CB e IC-AK-C referem-se aos parâmetros de controle ou comparação; os dados destacados em negrito referem-se aos extratos que apresentaram maior atividade anti-tirosinásica.

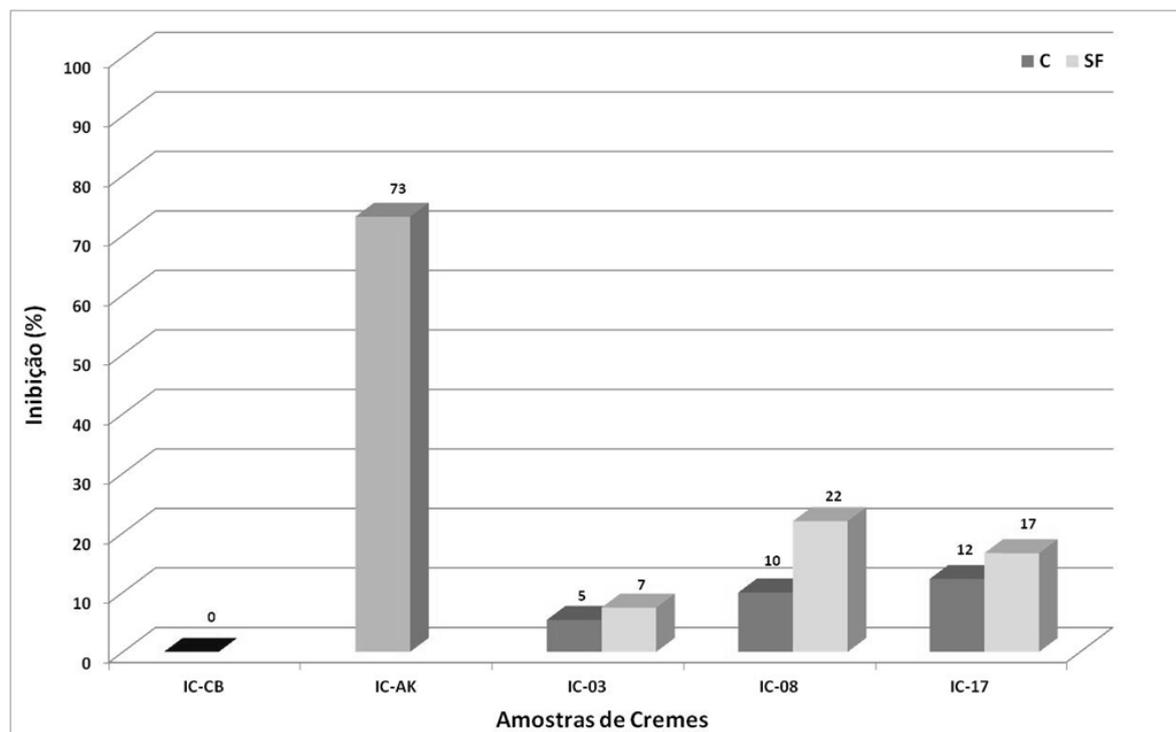


C = creme diluído ( $7 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contendo solução filtrada dos extratos; C-SF = creme diluído ( $7 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contendo solução não filtrada dos extratos.

**FIGURA 43** – Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos nos testes via UV-Vis convencional para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.

A **FIG. 44**, p. 74, mostra os resultados obtidos no teste via espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa (DR). Nele, as curvas de formação de dopacromo (**ANEXO 8**, p. 135-138) apresentam um formato diferente das curvas geradas no ensaio via UV-Vis convencional, com detecção por absorvância. Ao contrário desta última, no teste via UV-Vis-DR, a formação de dopacromo e o conseqüente escurecimento do meio são acompanhados da redução da refletância percentual, ou seja, o ponto máximo de formação de dopacromo corresponde ao ponto mínimo de reflexão, o qual foi observado em 480 nm e após 5 min (300 s) após o início da reação. Os valores de inibição encontrados foram menores do que aqueles observados no teste via espectroscopia no UV-Vis convencional. Com base na observação dos aspectos inicial e final dos meios reacionais nas cubetas em ambos os testes, essa redução é explicada pela limitação em se comparar medidas feitas na superfície (com o detector de reflexão difusa) com medidas ocorridas em profundidade (com o detector de absorvância), ou melhor, na extensão do caminho ótico (1 cm) da amostra. Na técnica de reflexão difusa, é necessário supor que o creme (e o que nele está contido) foi espalhado de forma completamente homogênea na cubeta. Por outro lado, há razões práticas para se imaginar que o dopacromo formado neste meio reacional tende a migrar das laterais para o centro e a superfície. Logo, a distribuição do creme e do dopacromo na parede da cubeta é menor que a média da sua distribuição no todo (corpo da cubeta). Como essa dúvida só poderia ser resolvida empregando-se filmes ou

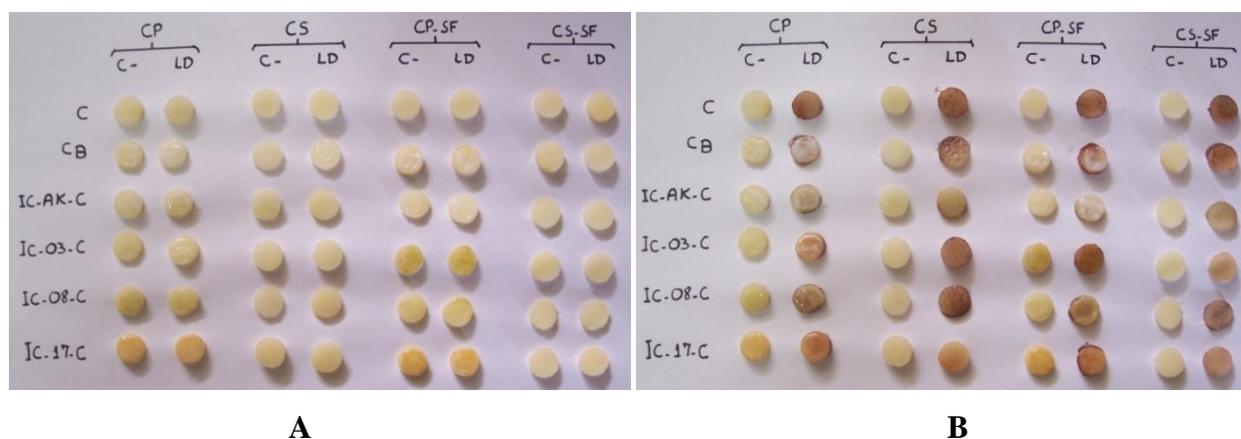
cubetas com caminho ótico menor, o que não foi realizado no presente trabalho, abre-se a perspectiva de que os resultados aqui descritos sirvam de base para estudos complementares no futuro.



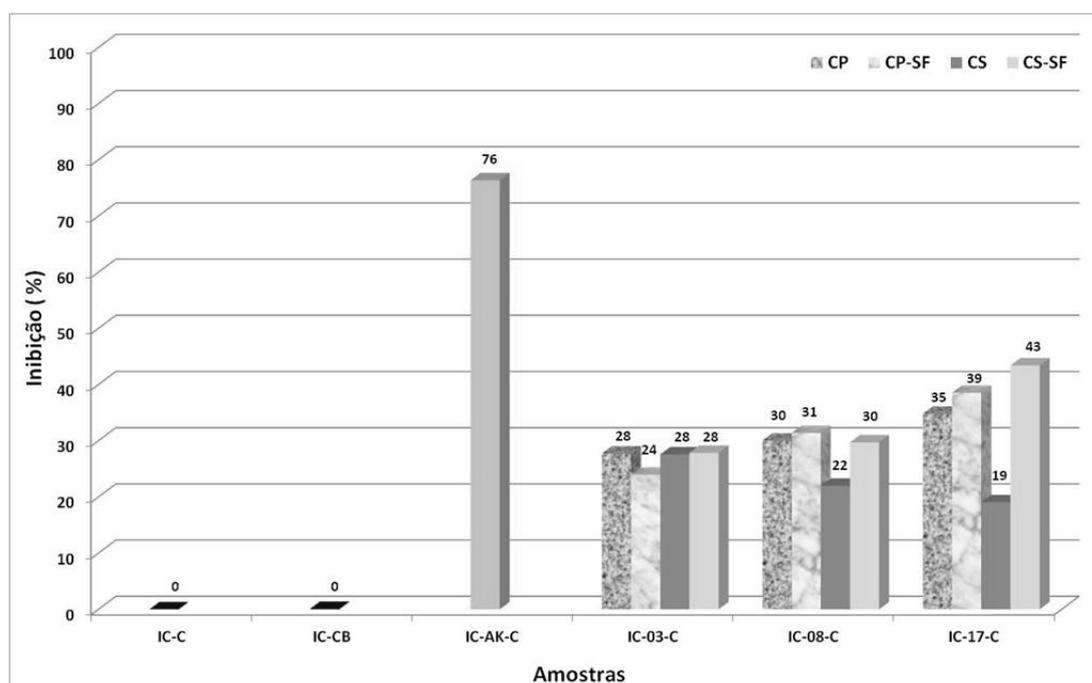
C = creme diluído ( $7 \text{ mg mL}^{-1}$ ) contendo solução filtrada do extrato; SF = creme diluído contendo solução não filtrada do extrato.

**FIGURA 44** – Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos no teste via UV-Vis com leitura por refletância difusa (DR), para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.

A **FIG. 45** e a **FIG. 46**, p. 75, mostram a evolução do teste de inibição enzimática utilizando discos de batata para avaliação das formulações obtidas.



**FIGURA 45** – Fotos dos discos de batata no início (A,  $t = 0 \text{ min}$ ) e no fim (B,  $t = 30 \text{ min}$ ) do bioensaio para avaliação da atividade anti-tirosinásica das formulações contendo ácido kójico e os extratos mais ativos. Fotos: Isaac F. Corradi.



CP = creme (sem diluição) contendo solução filtrada do extrato; CP-SF = creme (sem diluição) contendo solução não filtrada do extrato; CS = creme diluído contendo solução filtrada do extrato; CS-SF = creme diluído contendo solução não filtrada do extrato.

**FIGURA 46** – Diagrama dos valores percentuais de inibição da tirosinase obtidos no bioensaio com discos de batata para os cremes preparados com ácido kójico e com os três extratos mais ativos.

Os resultados acima são similares àqueles obtidos via UV-Vis convencional. Além disso, neste bioensaio, foi possível testar os cremes sem qualquer diluição prévia, avaliando se, no processo de filtração das soluções dos extratos, houve retenção de substâncias inibidoras da tirosinase nos filtros.

## *Capítulo 4*

# **CONCLUSÕES**

#### 4. Conclusões

Este trabalho visou a ser uma contribuição ao estudo da atividade anti-tirosinásica de extratos vegetais e ao aprimoramento do emprego de técnicas espectroscópicas e cromatográficas na análise destes extratos visando a sua aplicação no controle de qualidade de produtos cosméticos e ou farmacêuticos destinados ao tratamento de manchas de pele. Foram coletadas treze espécies vegetais nativas e exóticas do cerrado brasileiro e obtidos dezoito extratos etanólicos secos, os quais foram caracterizados e estudados via espectroscopia no ultravioleta-visível (UV-Vis), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), espectroscopia no infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (incluindo DEPT) e espectrometria de massas. A aplicação destas técnicas foi importante para a caracterização e a padronização dos extratos, além de fornecer subsídios importantes para a análise comparativa das amostras. Nesta fase do estudo, o emprego de padrões de referência foi utilizado com o objetivo de gerar de informações que serviram de suporte à análise comparativa dos resultados obtidos para os extratos. Dentre as técnicas empregadas, as que apresentaram os melhores resultados de caracterização e padronização dos extratos foram a espectroscopia no UV-Vis, CLAE-UV e CLAE-DAD, em função dos perfis de absorção e ou das características dos picos cromatográficos associadas a seus respectivos tempos de retenção observados nestas técnicas. A CLAE-EM também foi muito útil, permitindo associar fragmentos dos espectros de massas a substâncias possivelmente presentes nas amostras.

Realizaram-se bioensaios envolvendo estudos espectroscópicos e um teste alternativo com discos de batata para avaliar a capacidade dos extratos em inibir a tirosinase. Os resultados foram comparados e serviram de base para a seleção dos extratos mais ativos.

Os métodos empregados na avaliação da atividade anti-tirosinásica dos extratos e dos padrões selecionados neste trabalho demonstraram boa repetibilidade e reprodutibilidade. Embora os estudos tenham concentrado esforços nos três extratos mais ativos, atividade anti-tirosinásica ( $> 30\%$ ) foi confirmada em sete dos dezoito extratos avaliados, o que significa que cerca de 40% das plantas estudadas apresentaram ação anti-tirosinásica satisfatória, o que as tornam potencialmente adequadas para serem utilizadas no desenvolvimento de produtos farmacêuticos ou cosméticos destinados ao tratamento de manchas de pele.

O extrato de folhas de *B. gaudichaudii* (IC-03) apresentou a maior atividade anti-tirosinásica (96%), a qual foi quase igual à ação do inibidor padrão, ácido kójico (98%). Ele foi seguido por *S.*

*terebinthifolius*, com extratos de cascas do tronco (IC-17, 76%) e de folhas (IC-08, 65%). Em seguida, vieram os extratos de cascas do tronco de *S. adstringens* (IC-18, 44%), folhas de *K. pinnata* (IC-04, 36%), folhas de *S. adstringens* (IC-10, 34%) e partes aéreas de *R. alba* (IC-14, 32%). Os demais extratos apresentaram atividade anti-tirosinásica em torno ou abaixo de 25% em relação à ação do inibidor padrão. Todavia, o emprego destes extratos de menor atividade como materiais de partida não pode ser descartado apressadamente, uma vez que a baixa ação inibidora encontrada neles poderia ser explicada pela pequena concentração de agentes anti-tirosinásicos nas soluções de trabalho e não necessariamente devida à possível ausência de compostos ativos nas partes vegetais testadas.

As formulações cosméticas obtidas com os extratos mais ativos permaneceram estáveis até o prazo final de realização deste projeto, evidenciando sua viabilidade de preparo. Nos testes de inibição da tirosinase, as mesmas também apresentaram atividade inibitória, ainda que menor do que a dos extratos puros, indicando seu potencial para uso no tratamento de manchas de pele. A redução observada nos valores de inibição enzimática, em comparação com os resultados dos extratos puros, pode ser explicada pela menor concentração de ativos devido à diluição inevitável destes extratos no creme-base utilizado como veículo padronizado das formulações.

Este trabalho demonstrou como a aplicação do conhecimento científico é útil na pesquisa de plantas medicinais com atividade potencial para a inibição da tirosinase e de como métodos cromatográficos e espectroscópicos são importantes na caracterização de insumos naturais, possibilitando sua aplicação por indústrias cosméticas e ou farmacêuticas.

---

# REFERÊNCIAS

Abu-Gabal, N. S., Al Saigh, S. M. Anthraquinones from Aloe vera. *Journal of Saudi Chemical Society*, 12(4), 519-522, 2008.

Andrade, P. B., Seabra, R. M. Phenolic compounds, analysis by HPLC. *In: Cazes, J. (Ed.). Encyclopedia of chromatography - 2004 update supplement*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1679 p, 2004.

Ansel, H. C., Popovich, N. G., Allen Jr., L. V. *Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos*. 6. ed. São Paulo: Editorial Premier, 570 p, 2000.

APG II – Angiosperm Phylogeny Group II. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 141, 399-436, 2003.

Ascari, J. Estudo do epicarpo e mesocarpo externo do fruto de *Caryocar brasiliense* Camb. (pequi); síntese e biotransformação de isocariolanos e derivados para avaliação da atividade biológica. Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 424 p, 2011.

Badria, F. A., El Gayyar, M. A. A new type of tyrosinase inhibitors from natural products as potential treatments for hyperpigmentation. *Bollettino Chimico Farmaceutico*, 140, 267-271, 2001.

Bentley, R. From miso, sake and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Natural Product Reports* 23, 1046-1062, 2006.

BHP. *British herbal pharmacopoeia*, 4. ed. Guildford and King's Lynn (England). London: BHMA-British Herbal Medicine Association, 212 p, 1996.

Binder, G. M. *Harvard Business Review*, Sep-Oct., 47, 1994.

Botsoglou, N. A. Drug residues in food, detection / confirmation by LC-MS. *In: Cazes, J. (Ed.). Encyclopedia of chromatography - 2004 update supplement*. New York: Marcel Dekker, Inc., 1679 p, 2004.

- Bracarense, A. A. P. Isolamento, preparo de derivados e bioprospecção da atividade biológica de metabólitos de fungos filamentosos. Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 126 p, 2008.
- Brasil. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 61 p, 2006.
- Carvalho, M. C. R. D., Barca, F. N. T. V., Agnez-Lima, L. F., Medeiros, S. R. B. Evaluation of Mutagenic Activity in an Extract of Pepper Tree Stem Bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 42, 185–191, 2003.
- Castro, H. G., Oliveira, L. O., Barbosa, L. C. A., Ferreira, F. A., Silva, D. J. H., Mosquim, P. R., Nascimento, E. A. Teor e composição do óleo essencial de cinco acessos de mentrasto. *Química Nova* 27(1), 55-57, 2004.
- Ceruks, M., Romoff, P., Fávero, O. A., LAGO, J. H. G. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). *Química Nova*, 30 (3), 597-599, 2007.
- Chang, T.-S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors, *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 2440–2475, 2009.
- Choi, J.-S.; Lee, S.-K.; Sung, C.-K.; Jung, J.-H. Phytochemical study on *Aloe vera*. *Archives of Pharmacal Research* 19(2), 163-167, 1996.
- Conci, A. O sistema de cores subtrativas CIE-L\*A\*B\*. Rio de Janeiro: Instituto de computação (IC) da Universidade Federal Fluminense (UFF). In: <http://www.ic.uff.br/~aconci/labrorgb.html>. Acesso em 16/12/10.
- Decker, H., Schweikardt, T., Tuczek, F. The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? *Angewandte Chemie International Edition in English*, 45, 4546-4550, 2006.
- Desmarchelier, C., Schaus F. W. Sixty medicinal plants from the Peruvian Amazon: Ecology, ethnomedicine and bioactivity. Lima: Proterra Ed., 270 p, 2000.
- Dobрева, A., Kovacheva, N. Daily dynamics of the essential oils of *Rosa damascena* Mill. and *Rosa alba* L., *Agricultural Science and Technology*, 2(2), 71-74, 2010.

- Duarte, L. P. Estudo químico, estrutural e da atividade antibacteriana de triterpenos pentacíclicos isolados dos galhos e raízes de *Austroplenckia populnea*. Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 243 p, 2000.
- Egwaikhide, P. A., Gimba, C. E. Analysis of the phytochemical content and anti-microbial activity of *Plectranthus glandulosus* whole plant. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 2 (3-4), 135-138, 2007.
- El-Massry, K.F., El-Ghorab, A.H., Shaaban, H.A., Shibamoto, T. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 5265-5270, 2009.
- Embrapa. O cerrado brasileiro – Embrapa: empresa brasileira de pesquisa agropecuária. In: <http://www.cpac.embrapa.br/cerrado.htm/>. Data de acesso: 23/05/2011.
- Endringer, D. C. Química e atividades biológicas de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocyanaceae): inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) e efeito na quimioprevenção de câncer. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, 259 p, 2007.
- Espín, J.C., Jolivet. S., Wichers, H.J. Inhibition of mushroom polyphenol oxidase by agaritine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 2976-2980, 1998.
- F. Bras. V – Farmacopeia brasileira, 5. ed. Brasília: Anvisa, 2v, 2010.
- Forgo, P., Kövér, K. Gradient enhanced selective experiments in the  $^1\text{H}$  NMR chemical shift assignment of the skeleton and side-chain resonances of stigmasterol, a phytosterol derivative. *Steroids*, 69, 43-50, 2004.
- Gachet, M.S., Schühly, W. Jacaranda – an ethnopharmacological and phytochemical review. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 14-27, 2009.
- Girelli, A. M., Mattei, E., Messina, A., Tarola, A. M. Inhibition of polyphenol oxidases activity by various dipeptides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 2741-2745, 2004.

- Gosmann, G., Oliveira, C.B., Comunello, L.N. *Baccharis trimera* (Less.) DC. Carqueja. Recent Progress in Medicinal Plants, 28, 107-120, 2010.
- Ha, T.J., Tamura, S., Kubo, I. Effects of mushroom tyrosinase on anisaldehyde. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 7024-7028, 2005.
- Jacomassi, E., Moscheta, I.S., Machado, S.R. Morfoanatomia e histoquímica de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae). Acta Botanica Brasilica, 21(3), 575-597, 2007.
- Jeon, H.J., Noda, M., Maruyama, M., Matoba, Y., Kumagai, T., Suqivama, M. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54, 9827-9833, 2006.
- Jin, Y.H., Lee, S.J., Chung, M.H., Park, J.H., Park, Y.I., Cho, T.H. Aloesin and arbutin inhibit tyrosinase activity in a synergistic manner via a different action mechanism. Archives of Pharmacal. Research, 22, 232-236, 1999.
- Jinno, K. Detection principles. In: Cazes, J. (Ed.). Encyclopedia of chromatography - 2004 update supplement. New York: Marcel Dekker, Inc., 1679 p, 2004.
- Kamboj, A., Saluja, A.K. Isolation of stigmasterol and beta-sitosterol from petroleum ether extract of aerial parts of *Ageratum conyzoides* (Asteraceae). International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 3(1), 94-96, 2011.
- Kamkaen, N., Mulsri, N., Treesak, C. Screening of some tropical vegetables for anti-tyrosinase activity. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal, 2(1), 15-19, 2007.
- Kaye, P.T. Designer ligands: The search for metal ion selectivity. South African Journal of Science, 107(3/4), 439, 8 p, 2011.
- 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, 62, 1707-1723, 2005.

- Kobayashi, T., Vieira, W.D., Protterf, B., Sakai, C., Imokawa, G. Modulation of melanogenic protein expression during the switch from eu- to pheomelanogenesis. *Journal of Cell Science*, 108, 2301-2309, 1995.
- Kubo, I. Molecular design of antioxidative and antimicrobial agents. *Chemtech*, 11, 37-42, 1999.
- Kubo I., Chen, Q.X., Nihei, K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. *Food Chemistry*, 81, 241-247, 2003.
- Kubo, I., Chena, Q.-X., Niheia, K.-I., Calderón, J. S., Céspedes, C. L. 2003. Tyrosinase inhibition kinetics of anisic acid. *Zeitschrift für Naturforschung*, 58c, 713-718, 2003.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from anise oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 1268-1271, 1998a.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitors from cumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 5338-5341, 1998b.
- Kubo I. and Kinst-Hori I. Flavonols from saffron flower: tyrosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4121-4125, 1999a.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I. Tyrosinase inhibitory activity of the olive oil flavor compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 4574-4578, 1999b.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I. 2-Hydroxy-4-methoxy benzaldehyde: a potent tyrosinase inhibitor from african medicinal plants. *Planta Medica*, 65, 19-22, 1999c.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Ishiguro, K., Chaudhuri, S.K., Sanchez, Y., Oruga, T. Tyrosinase inhibitory flavonoids from *Heterotheca inuloides* and their structural functions. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 4, 1443-1446, 1994.
- Kubo, I., Kinst-Hori, I., Chaudhuri, S.K., Kubo, Y., Sánchez, Y., Ogura, T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 8: 1749-1755, 1994.

- Kubo, I., Nitoda, T., Nihei, K.-I. Effects of quercetin on mushroom tyrosinase and B16-F10 melanoma cells. *Molecules*, 12, 1045-1056, 2007.
- Lee, S.E., Kim, M.K., Lee, S.G., Ahn, Y.J., Lee, H.S. Inhibitory effects of *Cinnamomum cassia* bark-derived materials on mushroom tyrosinase. *Food Science and Biotechnology*, 9, 330-333, 2000.
- Lima, L.B., Vasconcelos, C.F.B., Maranhão, H.M.L., Leite, V.R., Ferreira, P.A., Andrade, B.A., Araújo, E.L., Xavier, H.S., Lafayette, S.S.L., Wanderley, A.G. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. *Journal of Ethnopharmacology* 126, 468-473, 2009.
- Lopes, W. A.. Fascio, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. *Química Nova*, 27 (4), 670-673, 2004.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 576 p, 2008.
- Lourenço, M. V. Estudo comparativo dos constituintes químicos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e do medicamento "V". Araraquara: Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 141 p, 2001.
- Madhosingh, C., Sundberg, L. Purification and properties of tyrosinase inhibitor from mushroom. *FEBS (Federation of European Biochemical Societies) Letters*, 49, 156-158, 1974.
- Mamangkey, N. G. F., Agatonovic, S., Southgate, P. C. Assessing pearl quality using reflectance UV-Vis spectroscopy: does the same donor produce consistent pearl quality? *Marine Drugs*, 8, 2517-2525, 2010.
- Martins, L. R. Avaliação do potencial biotecnológico de fungos brasileiros em reações de fungos brasileiros em reações de biotransformação e biorremediação. Belo Horizonte: Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, 208 p, 2009.
- Martins, L. R. R., Cortez, L. E. R., Dias-Filho, B. P., Nakamura, C. V., Ferreira, A. G., Cortez, D. A. G. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do acetato de acantoaustralida. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 16 (4), 490-496, 2006.

- Masamoto, Y., Ando, H., Murata, Y., Shimoishi, Y., Tada, M., Takahata, K. Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 67, 631-634, 2003.
- Masuda, T., Yamashita, D., Takeda, Y., Yonemori, S. Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitors from *Garcinia subelliptica*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 69 (1), 197-201, 2005.
- Matos, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Delogu, G., Corda, M., Fadda, M. B., Era, B., Fais, A. New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 3342-3345, 2011.
- Monteiro, V. F. F., Mathias, L., Vieira, I. J. C., Schripsema, J., Braz-Filho, R. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 13(2), 281-287, 2002.
- Mors, W. B., Rizzini, C. T., Pereira, N. A. *Medicinal Plants of Brazil*. Algonac, Michigan: Reference Publications, 501 p, 2000.
- Moustafa, A. M. Y., Kouam, S. F., Kulsoom, A., Ejaz, A., Ali, S., Anjum, S., Choudhary, M. I. Phytochemical investigation and biological evaluation of *Schinus terebinthifolius*. *Research Journal of Phytochemistry*, 1(1), 1-11, 2007.
- Muñoz, K., Londoño, J., Arango, G., Arenas, J., Mira, L., Ochoa, J., Sierra, J. Screening bioactives from vegetal sources as potential skin lightening agents using an enzymatic model of tyrosinase inhibition, correlations amongst activity, phenolic compounds content and cytotoxicity. *Pharmacology Online*, 3, 802-807, 2006.
- Nerya, O., Musa, R., Khatib, S., Tamir, S., Vaya, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, 65, 1389-1395, 2004.
- Niassy, B., Um, B.-H., Lobstein, A., Weniger, B., Koné, M., Anton, R. Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. *Comptes Rendus Chimie*, 7, 993-996, 2004.

- Niwa, Y., Akamatsu, H. Kojic acid scavenges free radicals while potentiating leukocyte functions including free radical generation. *Inflammation*, 15, 303-315, 1991.
- Okwu, D. E., Josiah, C. Evaluation of the chemical composition of two nigerian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, 5 (4), 357-361, 2006.
- Olivares, C., Garcia-Borron, J.C., Solano, F. Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry*, 41, 679-686, 2002.
- Olivares, C., Solano, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 22, 750-760, 2009.
- Parrish, F. W., Wiley, B. J., Simmons, E. G., Long, L. Jr. Production of aflatoxins and kojic acid by species of *Aspergillus* and *Penicillium*. *Applied Microbiology*, 14, 139, 1966.
- Pastene, E. R., Wilkomirsky, T., Bocaz, G., Havel, J., Peric, I., Vega, M., González, M., Alderete, J. Uso de espectroscopia de RMN y MALDI-TOF MS en la elucidación estructural de flavonoides antioxidantes provenientes de la planta medicinal chilena *Cheilanthes glauca* (Cav.) Mett. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, 46 (4), 449-457, 2001.
- PBRG - Palaeobiology and Biodiversity Research Group - University of Bristol, UK. Melanin, melanocytes, and melanosomes. *In*: <http://palaeo.gly.bris.ac.uk/melanosomes/melanin.html>. Data de acesso: 19/08/2011.
- Plonka, P.M., Grabacka, M. Melanin synthesis in microorganisms - biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3), 429-443, 2006.
- Pozetti, G. L. *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae): da planta ao medicamento. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 26 (3), 159-166, 2005.
- Prediger, R.D.S., Fernandes, M.S., Rial, D., Wopereis, S., Pereira, V.S., Bosse, T.S., Da Silva, C.B., Carradore, R.S., Machado, M.S., Cechinel-Filho, V., Costa-Campos, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 465-473, 2008.

- Prota, G. Progress in the chemistry of melanins and related metabolites. *Medicinal Research Reviews*, 8, 525-556, 1988.
- Queiroga, C.L., Silva, G.F., Dias, P.C., Possenti, A., Carvalho, J.E. Evaluation of the antiulcerogenic activity of friedelan-3 $\beta$ -ol and friedelin isolated from *Maytenus ilicifolia* (*Celastraceae*). *Journal of Ethnopharmacology*, 72, 465-468, 2000.
- Rajput, S.S., Soni, K.K., Saxena, R.C. Pharmacology and phytochemistry of saponin isolated from *Aloe vera* for wound healing activity. *Asian Journal of Chemistry*, 21(2), 1029-1032, 2009.
- Raposo, G., Marks, M.S. Melanosomes - dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(10), 786-797, 2007.
- Riley, P.A. Melanin. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 1235-1239, 1997.
- Rendon, W., Vila, J.L. Phytochemical study of *Baccharis trimera*. *Revista Boliviana de Quimica*, 12(1), 13-15, 1995.
- Robb, D.A. Tyrosinase. *In: Lontie, R., ed. Copper proteins and copper enzymes*, vol. 2. Boca Raton, Florida: C.R.C. Press, 207-240, 1984.
- Rojas, J., Velasco, J., Morales, A., Rojas, L., Diaz, T., Rondon, M., Carmona, J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (*Asteraceae*) collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 3(3), 369-372, 2008.
- Sabudak, T., Khan, M.T., Choudhary, M.I., Oksuz, S. Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. *Natural Product Research*, 20, 665-670, 2006.
- Salvi Jr, A. *Schinus terebinthifolius* Raddi: estudo anatômico e histoquímico das folhas e investigação do potencial farmacêutico do extrato etanólico e suas frações. Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, 83 p, 2009.
- Santos, S. C., Costa, W. F., Ribeiro, J. P., Guimarães, D. O., Ferri, P. H., Ferreira, H. D., Seraphin, J. C. Tannin composition of barbatimão species. *Fitoterapia*, 73, 292-299, 2002.

- Sayre, L.M.; Nadkarni, D.V. Direct conversion of phenols to o-quinones by copper(I) dioxygen: questions regarding the monophenolase activity. *Journal of American Chemical Society*, 116, 3157-3158, 1994.
- Schallreuter, K.U., Wood, J.W. A possible mechanism of action for azelaic acid in the human epidermis. *Archives of Dermatological Research*, 282, 168-171, 1990.
- SDBS - Spectrum database for organic compounds - National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Japan. *In*: [http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre\\_index.cgi?lang=eng](http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng). Data de acesso: 06/01/12.
- Sendovski, M., Kanteev, M., Ben-Yosef, V.S., Adir, N., Fishman, A. First structures of an active bacterial tyrosinase reveal copper plasticity. *Journal of Molecular Biology*, 405 (1), 227-237, 2011.
- Shahidi, L.M., Naczki, M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Lancaster, United Kingdom: Technomic Publishing, 331 p, 1995.
- Sharp, H., Bartholomew, B., Bright, C., Latif, Z., Sarker, S.D., Nash, R.J. 6-Oxygenated flavones from *Baccharis trinervis* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 29, 105-107, 2001.
- Shimizu, K., Kondo, R., Sakai, K. Inhibition of tyrosinase by flavonoids, stilbenes and related 4-substituted resorcinols: structure-activity investigation. *Planta Medica*, 66, 11-15, 2000.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., Kiemle, D. J. Spectrometric identification of organic compounds. 7. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc., 550 p, 2005.
- Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (org.) Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 1102 p, 2003.
- Smit, N., Vicanova, J., Pavel, S. The hunt for natural skin whitening agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 5326-5349, 2009.
- Stace, C.A. Plant taxonomy and biosystematics, 2 ed., London: Edward Arnold, 264 p, 1989.

- Sultana, N., Lee, N.H. New phenylpropanoids from *Sasa quelpaertensis* nakai with tyrosinase inhibition activities. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30(8), 1729-1732, 2009.
- Tanus-Rangel, E., Santos, S.R., Lima, J.C.S., Lopes, L., Noldin, V., Monache, F.D., Cechinel-Filho, V., Martins, D.T.O. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (*Alismataceae*). *Journal of Medicinal Food*, 13(5), 1161-1166, 2010.
- Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., Kamei, H., Miyaki, T., Oki, T. A new screening method for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *The Journal of Antibiotics*, 43(12), 1601-1605, 1990.
- Ullah, F., Hussain, H., Hussain, J., Bukhari, I. A., Khan, M. T., Choudhary, M.I., Gilani, A.H., Ahmad, V.U. Tyrosinase inhibitory pentacyclic triterpenes and analgesic and spasmolytic activities of methanol extracts of *Rhododendron collettianum*. *Phytotherapy Research*, 21, 1076-1081, 2007.
- Valadares, Y.M. *Remijia ferruginea* D.C., *Jacaranda caroba* D.C. e *Solanum paniculatum* L.: fitoquímica, atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil. 324 p, 2009.
- Wiley, J.W., Tyson, G.N., Steller J.S. The configuration of complex kojates formed with some transition elements as determined by magnetic susceptibility measurements. *Journal of American Chemical Society*, 64, 963-964, 1942.
- Ye, Y., Chou, G-X., Mu, D-D., Wang, H., Chu, J-H., Leung, A. K-M., Fong, W-F., Yu, Z-L. Screening of Chinese herbal medicines for antityrosinase activity in a cell free system and B16 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 129, 387-390, 2010.
- Yunes, R. A., Pedrosa, R. C., Cechinel Filho, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Química Nova*, 24 (1), 147-152, 2001.

# ANEXOS

ANEXO 1: Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em metanol.

ANEXO 2: Espectros no UV-Vis dos extratos em solução tamponada pH 7.

ANEXO 3: Espectros no UV-Vis dos extratos em solução tamponada pH 3.

ANEXO 4: Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos e padrões.

ANEXO 5: Espectros no IV dos padrões e dos extratos.

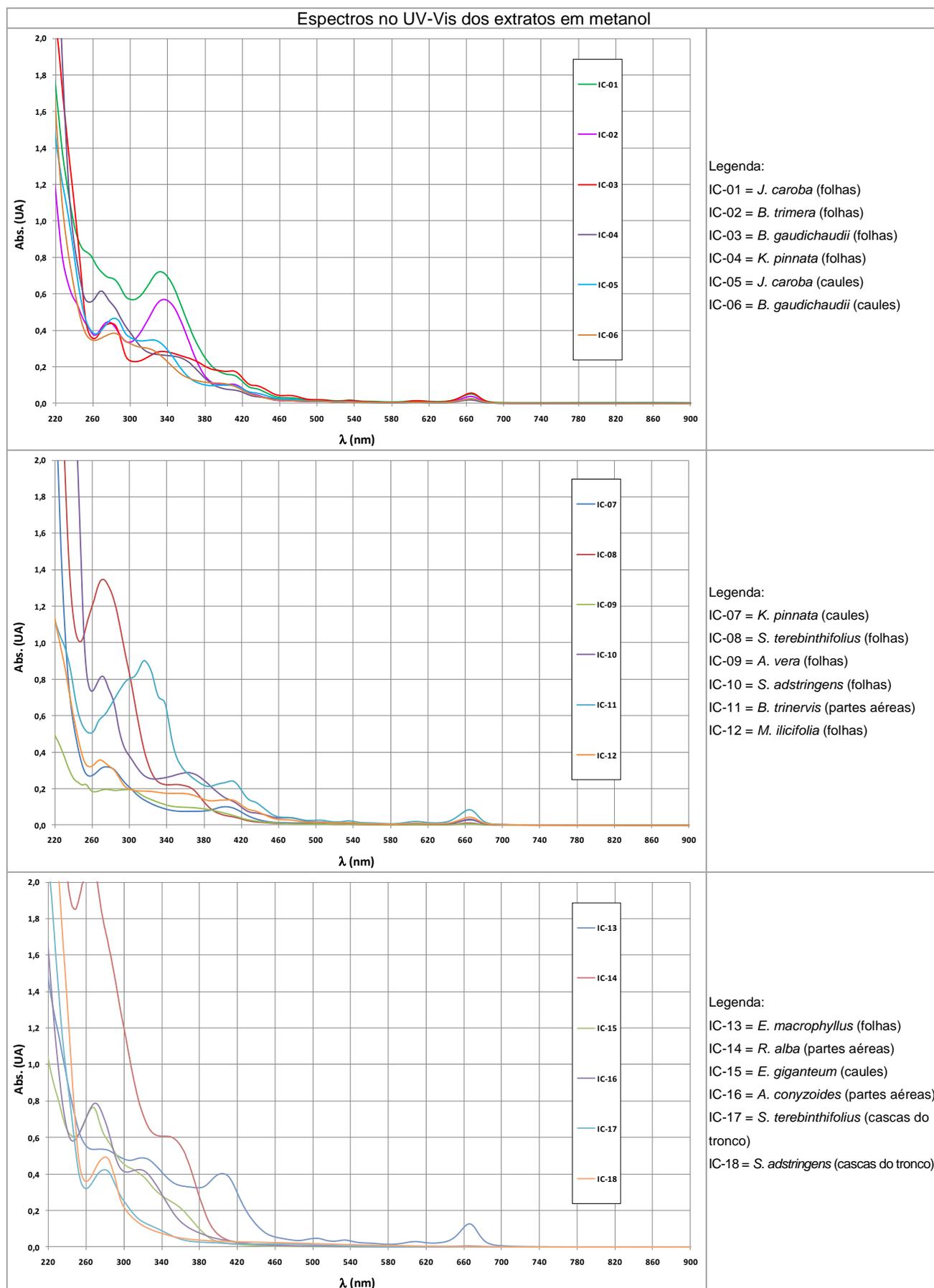
ANEXO 6: Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15.

ANEXO 7: Cromatogramas e espectros obtidos por CLAE-EM para os extratos mais ativos.

ANEXO 8: Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase por espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa para os cremes.

## ANEXO 1 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em metanol.

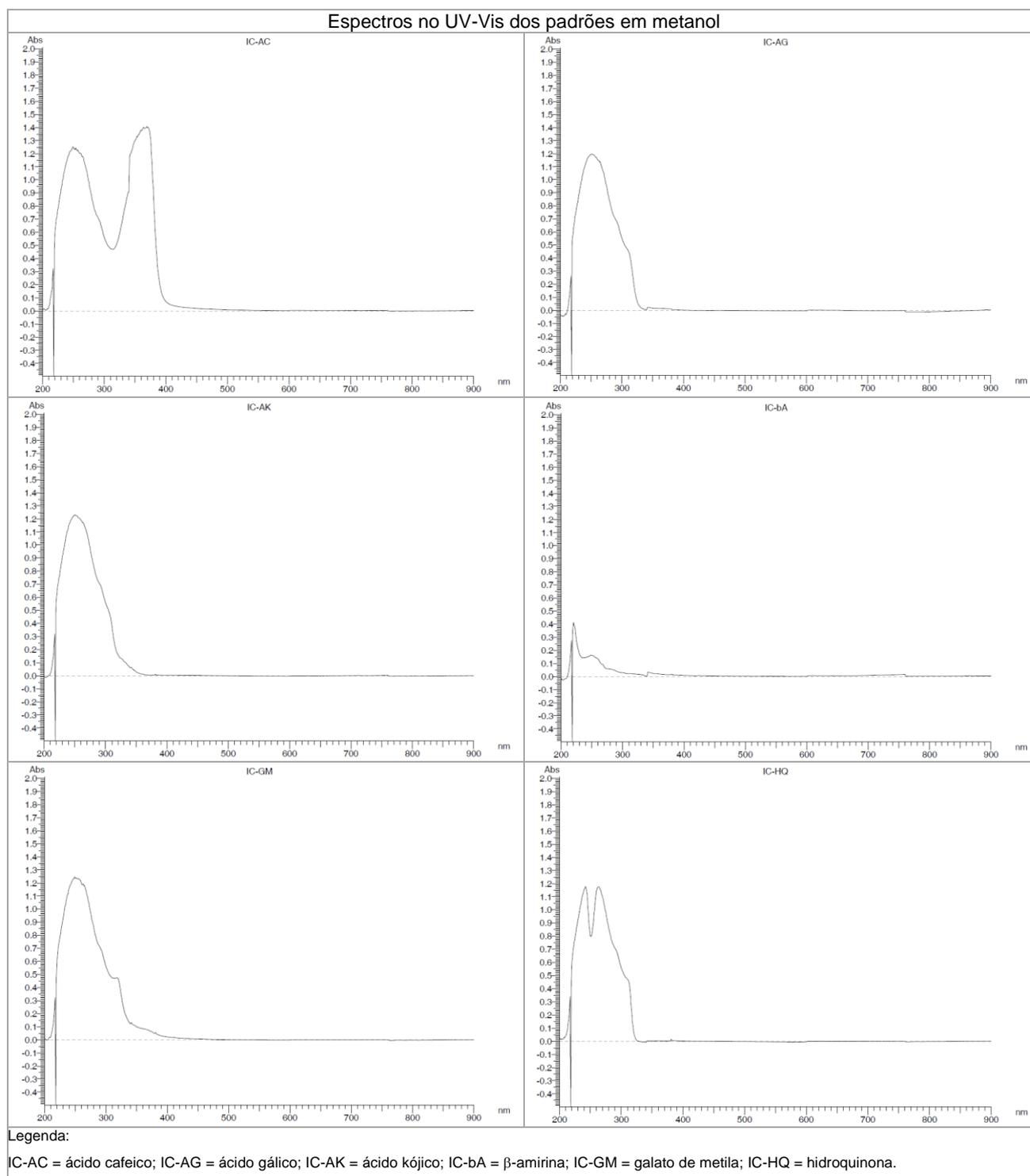
(continua)



**Condições espectrométricas nas análises dos extratos:** soluções 10 mg mL<sup>-1</sup>; solvente: metanol grau PA; cubetas: quartzo 1 cm; varredura = 900 a 220 nm; aparelho = espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo UVPC-1601 (Floras de Minas Ltda.); analista = Isaac F. Corradi; data de análise = 16/12/2010.

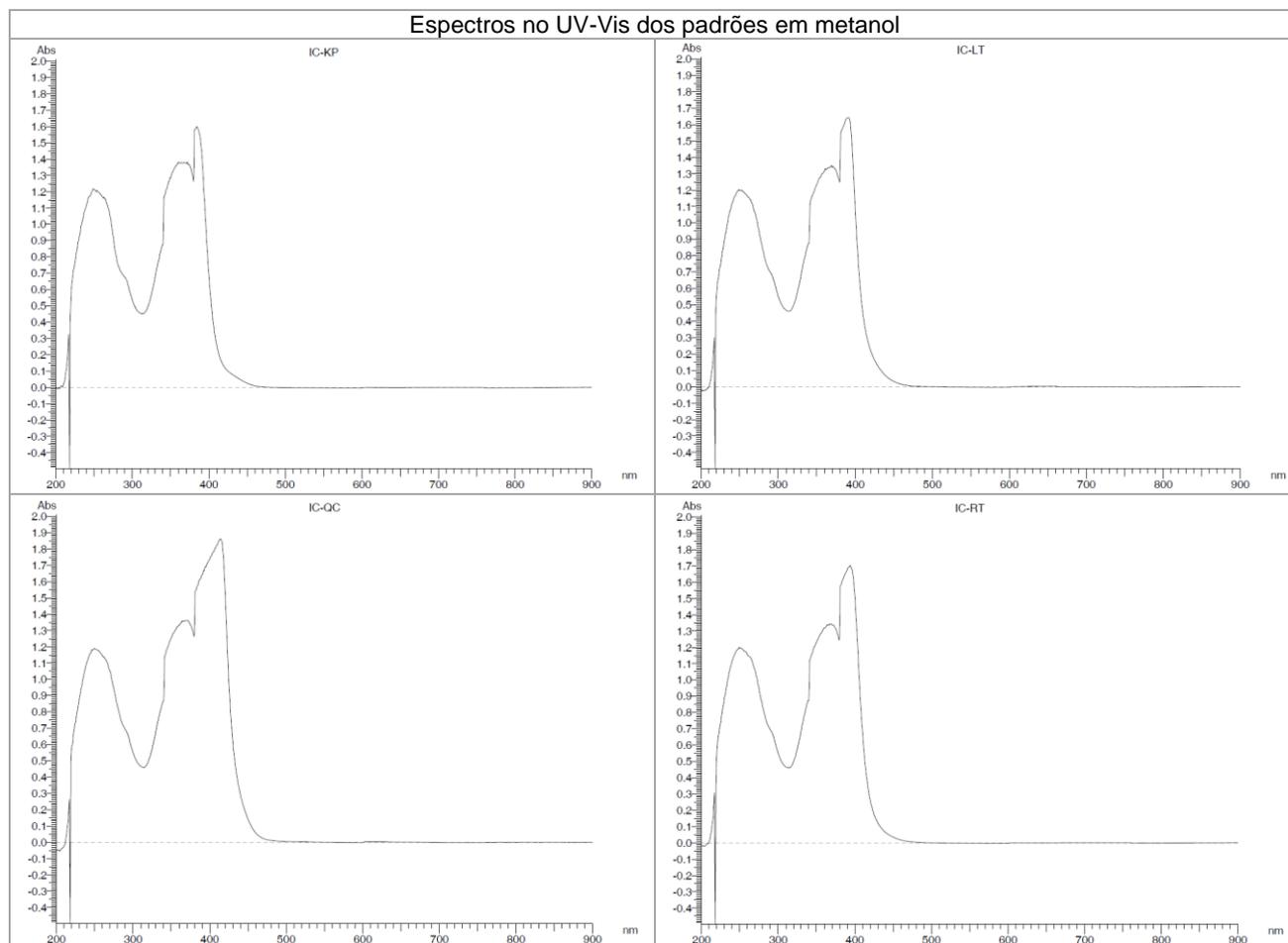
## ANEXO 1 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em metanol.

(continuação)



## ANEXO 1 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em metanol.

(conclusão)

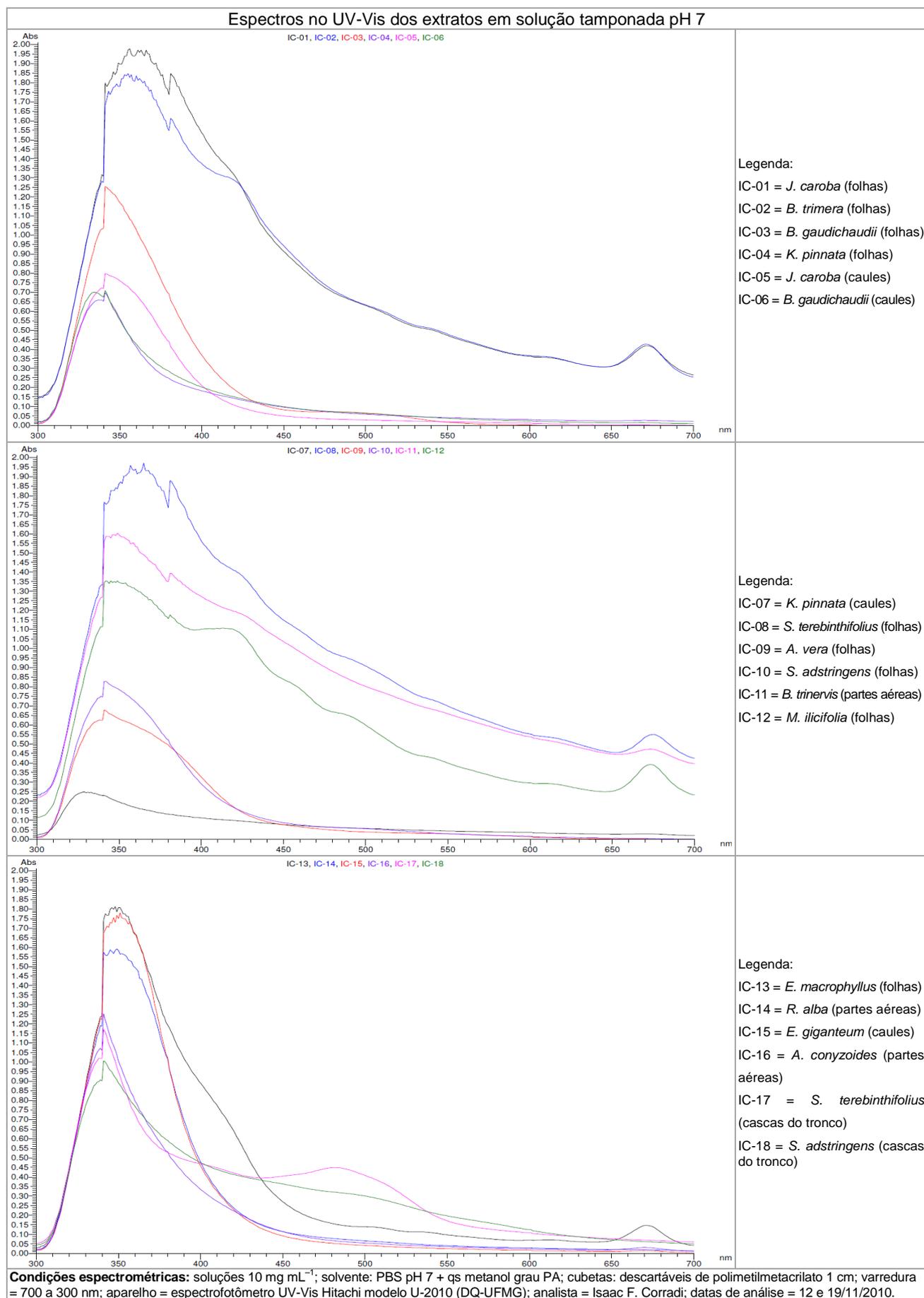


Legenda:

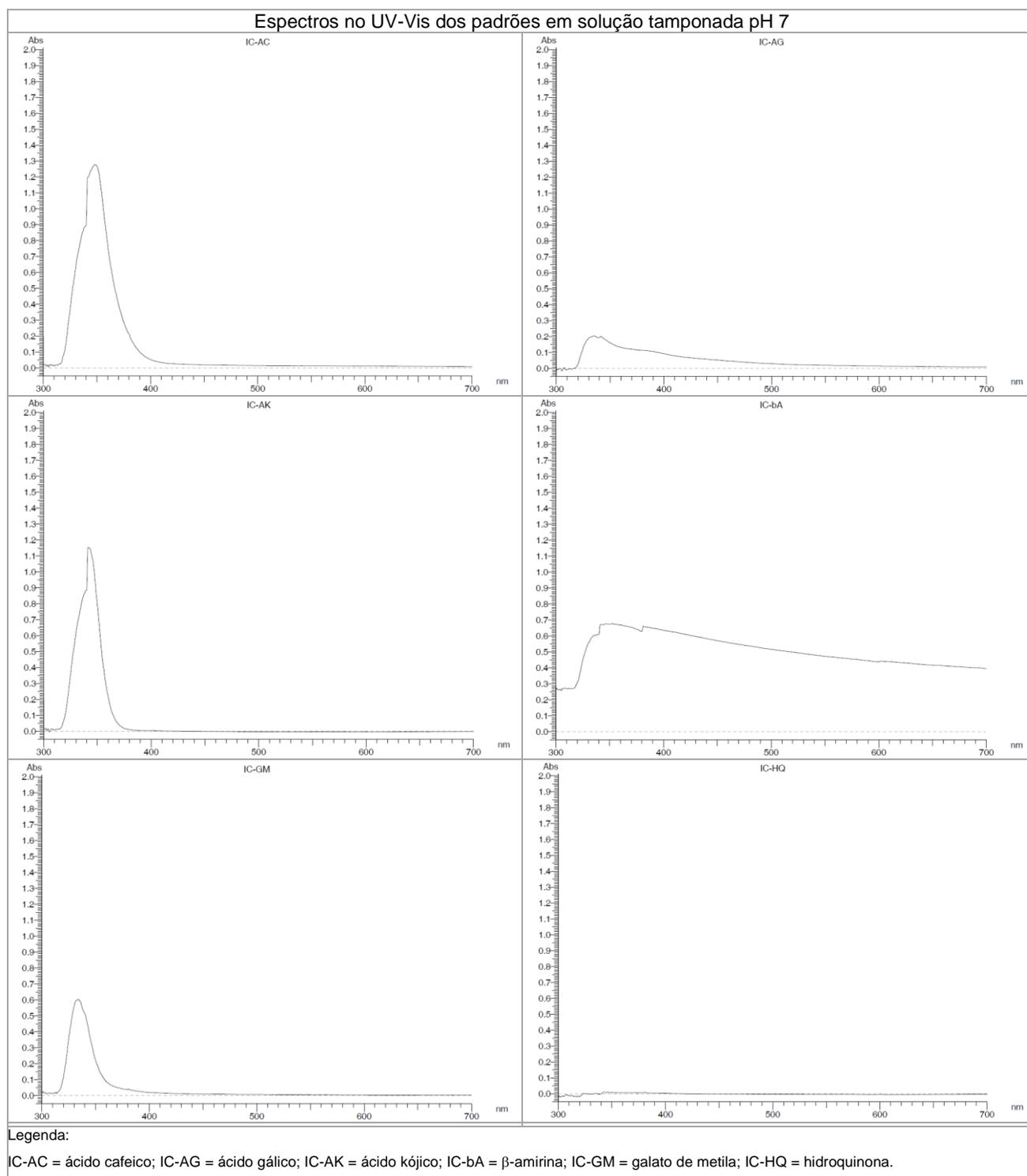
IC-KP = kaempferol; IC-LT = luteolina; IC-QC = quercetina; IC-RT = rutina.

**Condições espectrométricas nas análises dos padrões:** soluções-amostra =  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ; solvente: metanol grau PA; cubetas: quartzo 1 cm; varredura = 900 a 200 nm; aparelho = espectrofotômetro UV-Vis Hitachi modelo U-2010 DQ-UFMG; analista = Isaac F. Corradi; data de análise = 02/12/2011.

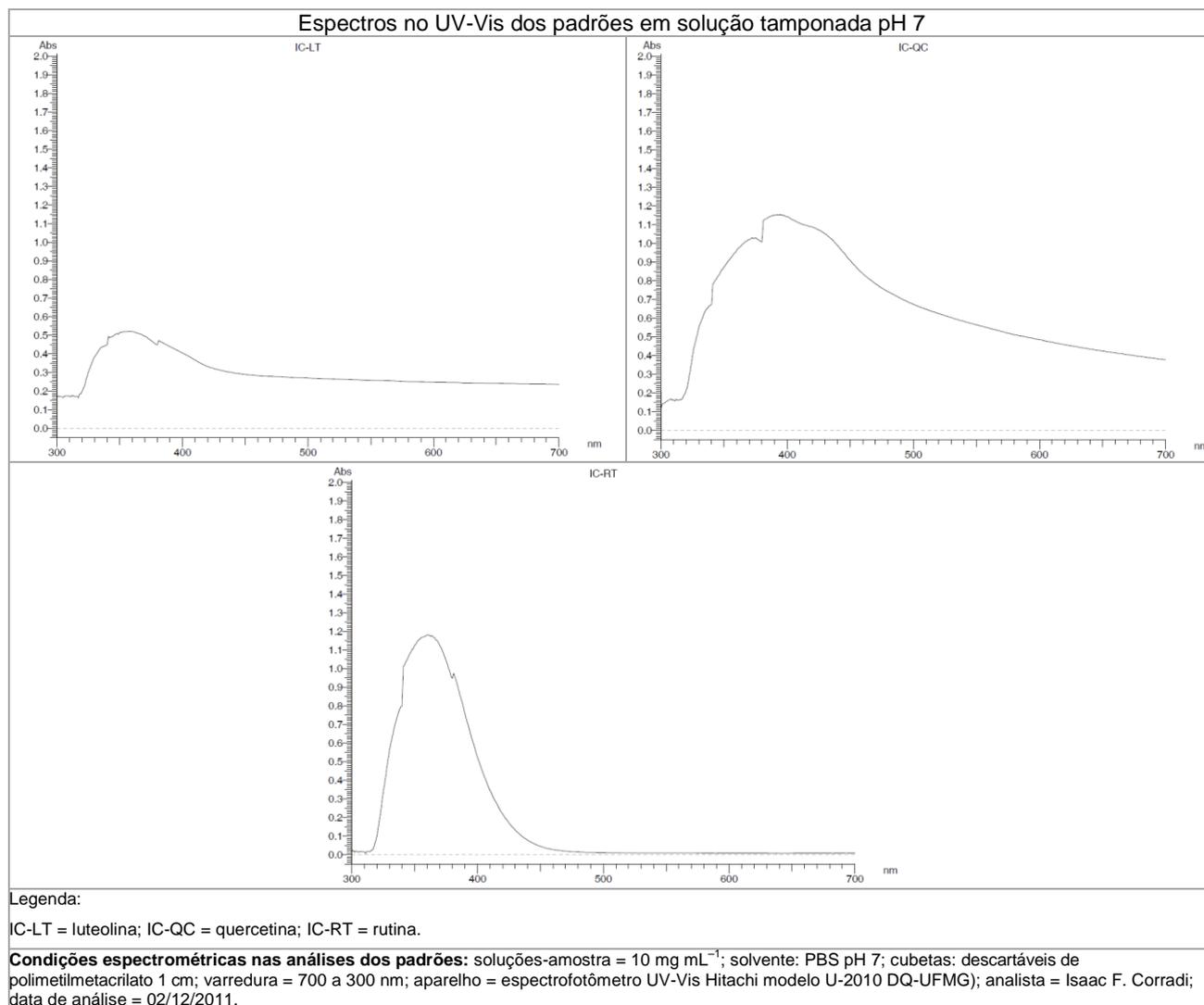
## ANEXO 2 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em solução tamponada pH 7. (continua)



## ANEXO 2 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em solução tamponada pH 7. (continuação)

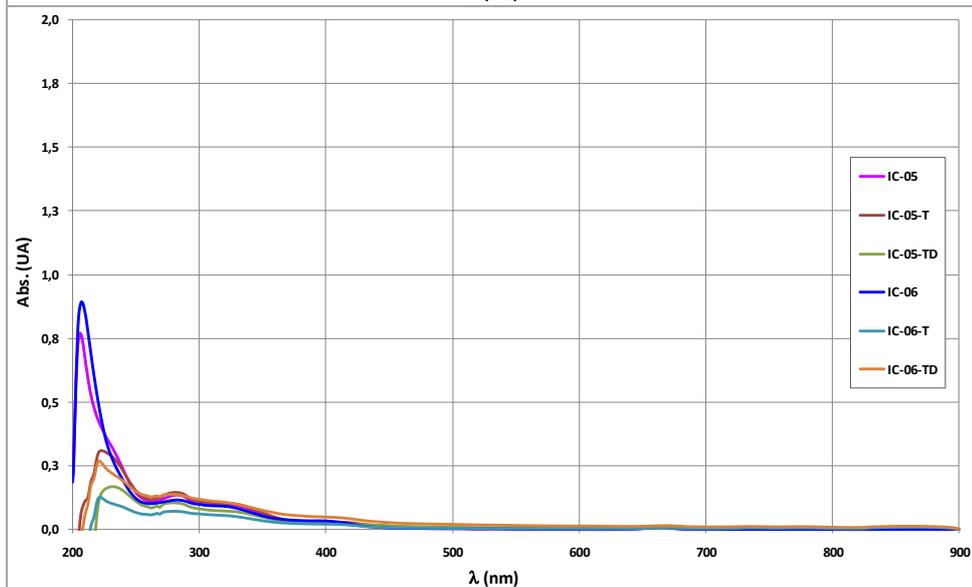
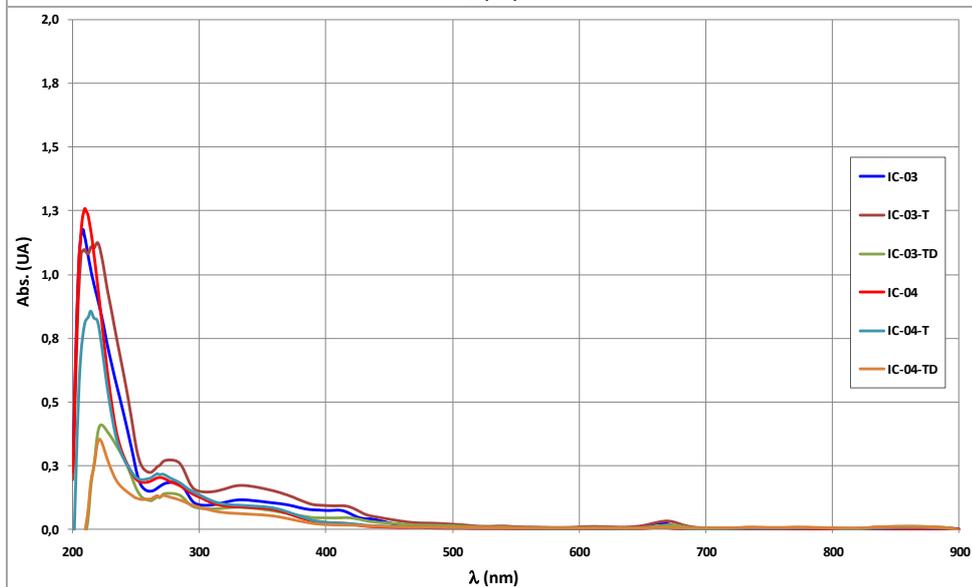
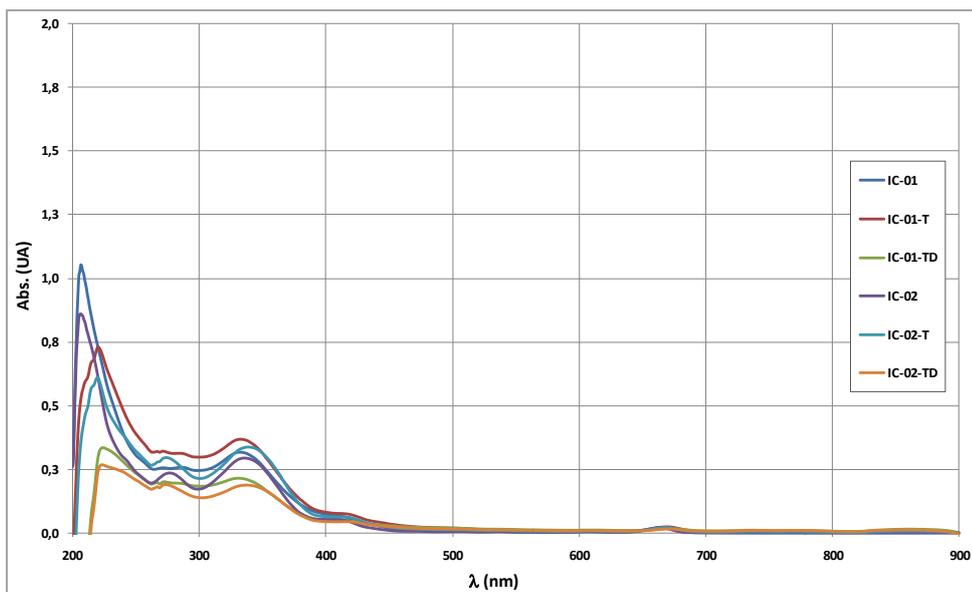


## ANEXO 2 – Espectros no UV-Vis dos extratos e padrões em solução tamponada pH 7. (conclusão)



## ANEXO 3 – Espectros no UV-Vis dos extratos em solução tamponada em pH 3.

(continua)

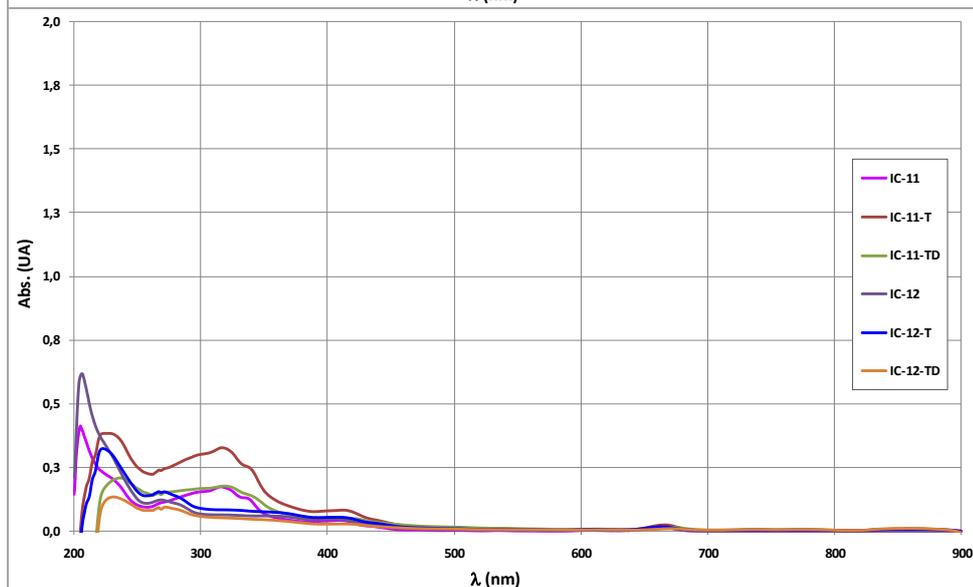
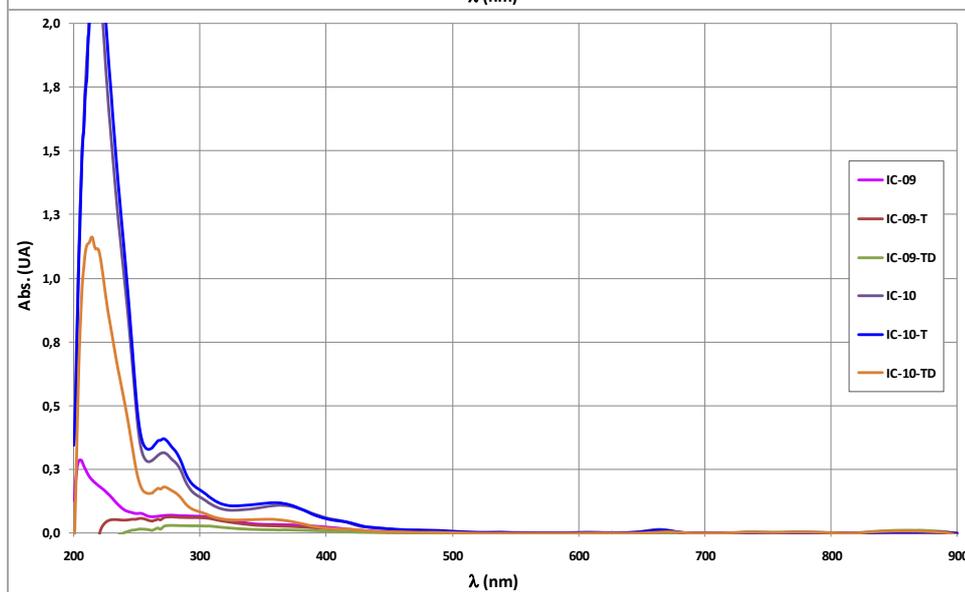
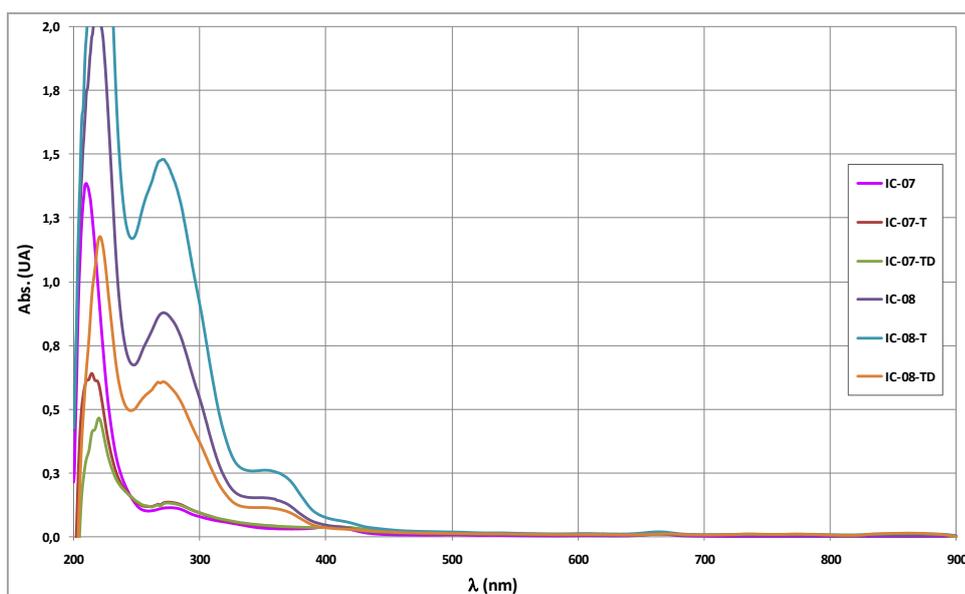
**Legenda geral:**

IC-... = extrato em 100% metanol;  
 IC-...-T = extrato em 50% metanol e 50% tampão fosfato pH 3;  
 IC-...-TD = extrato diluído pela metade em 25% metanol e 75% tampão fosfato pH 3.

**Legenda de extratos:**

IC-01 = *J. caroba* (folhas)  
 IC-02 = *B. trimera* (folhas)  
 IC-03 = *B. gaudichaudii* (folhas)  
 IC-04 = *K. pinnata* (folhas)  
 IC-05 = *J. caroba* (caules)  
 IC-06 = *B. gaudichaudii* (caules)

## ANEXO 3 – Espectros no UV-Vis dos extratos em solução tamponada em pH 3. (continuação)

**Legenda geral:**

IC-... = extrato em 100% metanol;

IC-...-T = extrato em 50% metanol e 50% tampão fosfato pH 3;

IC-...-TD = extrato diluído pela metade em 25% metanol e 75% tampão fosfato pH 3.

**Legenda de extratos:**

IC-07 = *K. pinnata* (caules)

IC-08 = *S. terebinthifolius* (folhas)

IC-09 = *A. vera* (folhas)

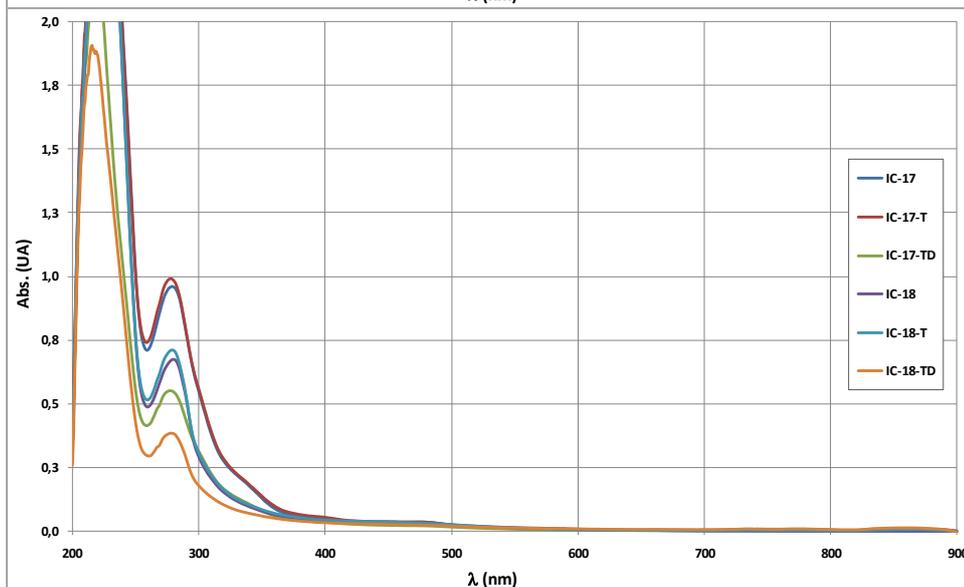
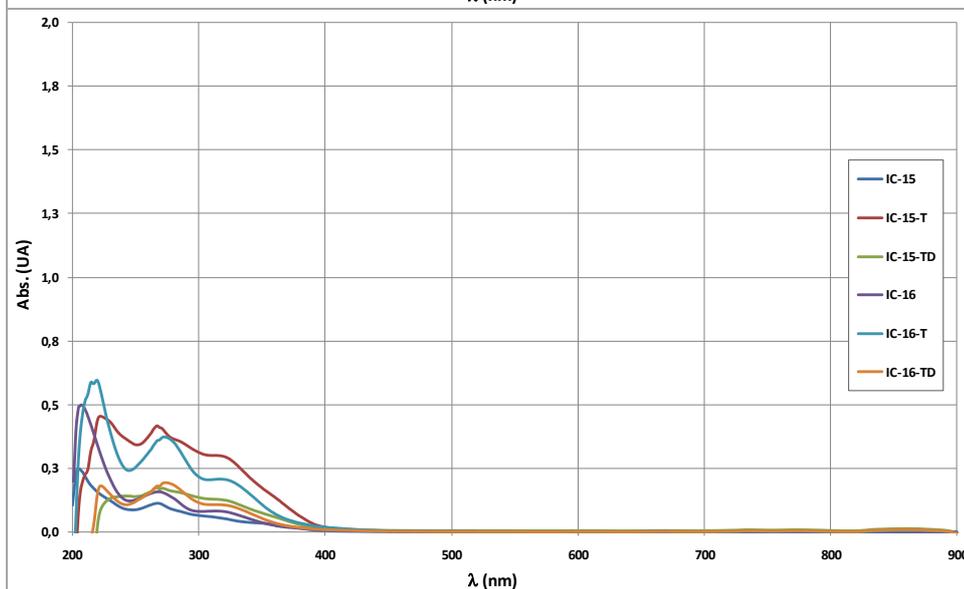
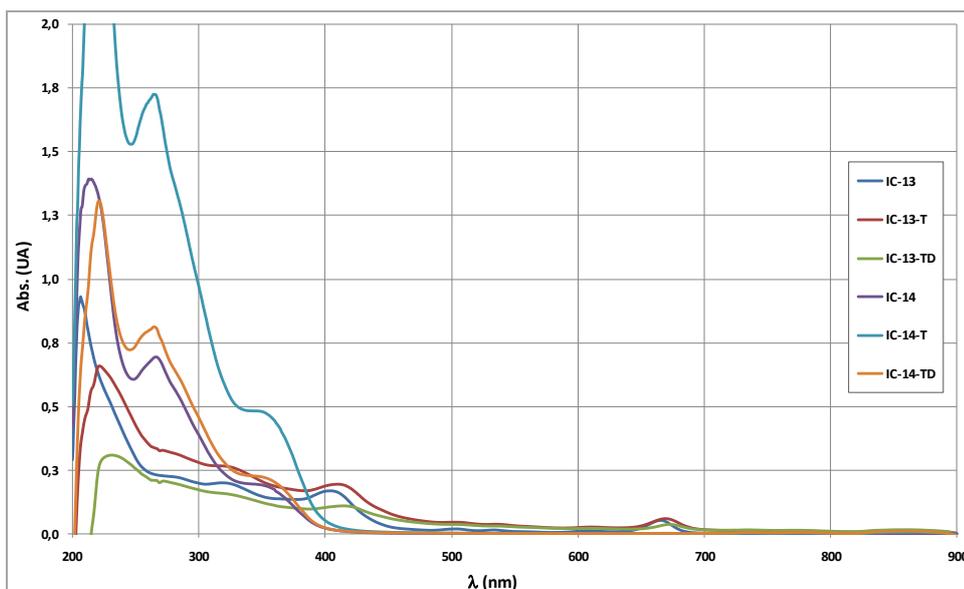
IC-10 = *S. adstringens* (folhas)

IC-11 = *B. trinervis* (partes aéreas)

IC-12 = *M. ilicifolia* (folhas)

## ANEXO 3 – Espectros no UV-Vis dos extratos em solução tamponada em pH 3.

(conclusão)

**Legenda geral:**

IC-... = extrato em 100% metanol;

IC-...-T = extrato em 50% metanol e 50% tampão fosfato pH 3;

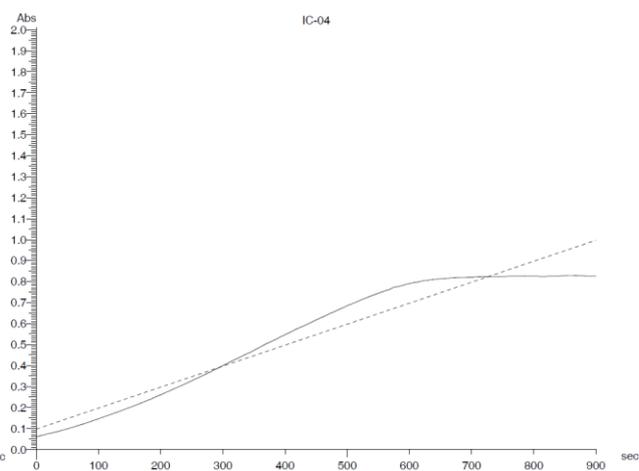
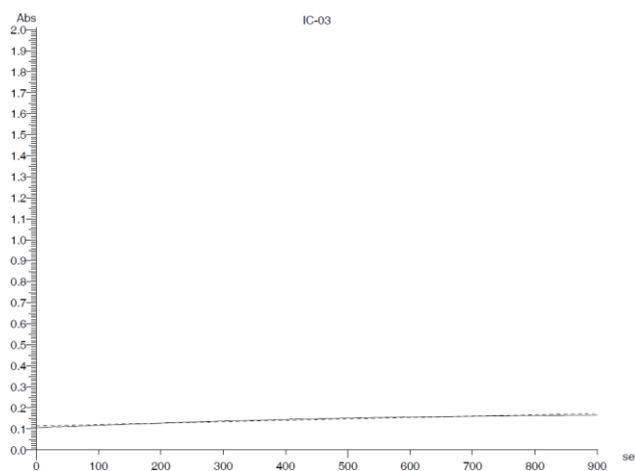
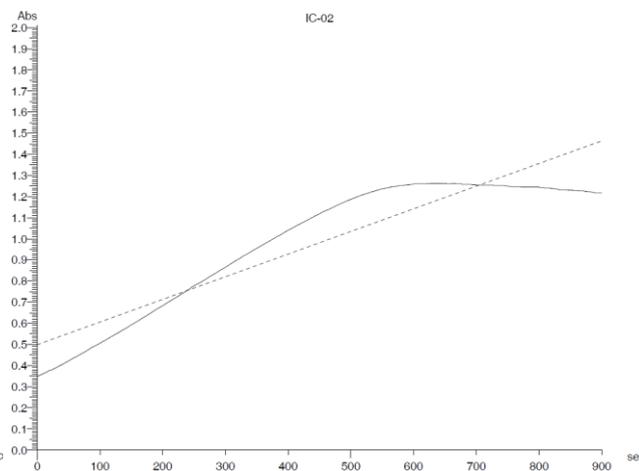
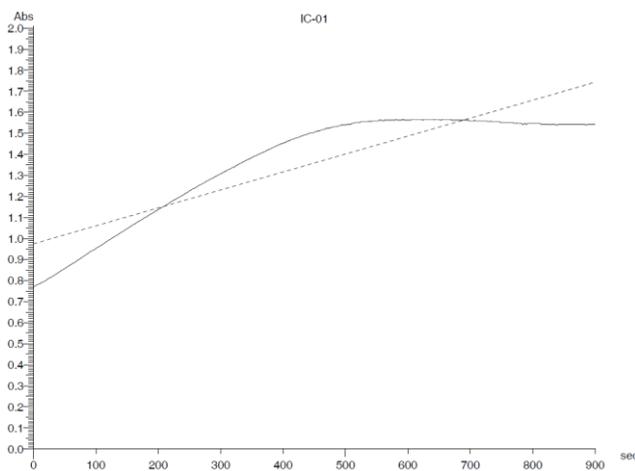
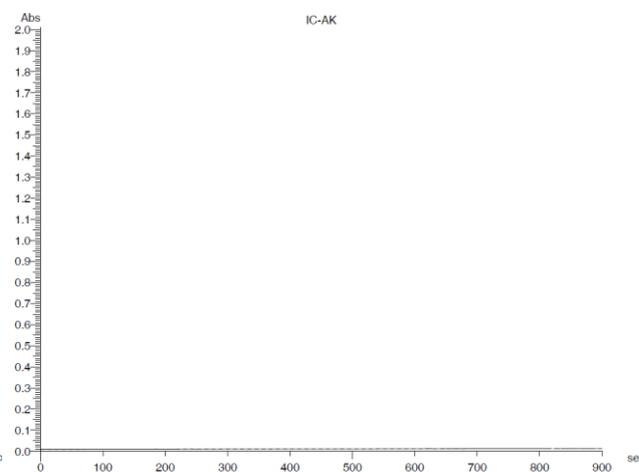
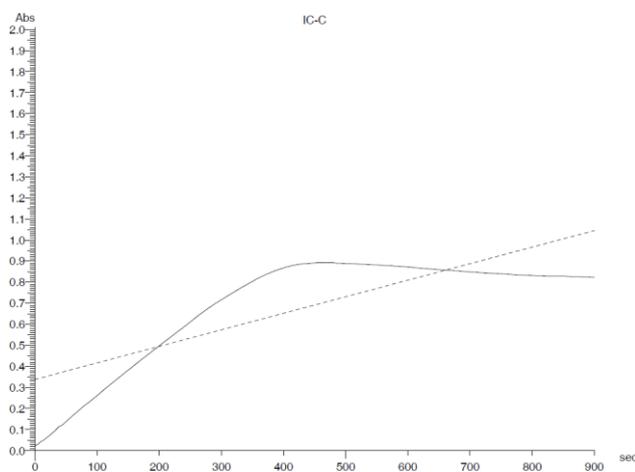
IC-...-TD = extrato diluído pela metade em 25% metanol e 75% tampão fosfato pH 3.

**Legenda de extratos:**IC-13 = *E. macrophyllus* (folhas)IC-14 = *Rosa alba* (partes aéreas)IC-15 = *E. giganteum* (caules)IC-16 = *A. conyzoides* (partes aéreas)IC-17 = *S. terebinthifolius* (cascas do tronco)IC-18 = *S. adstringens* (cascas do tronco)

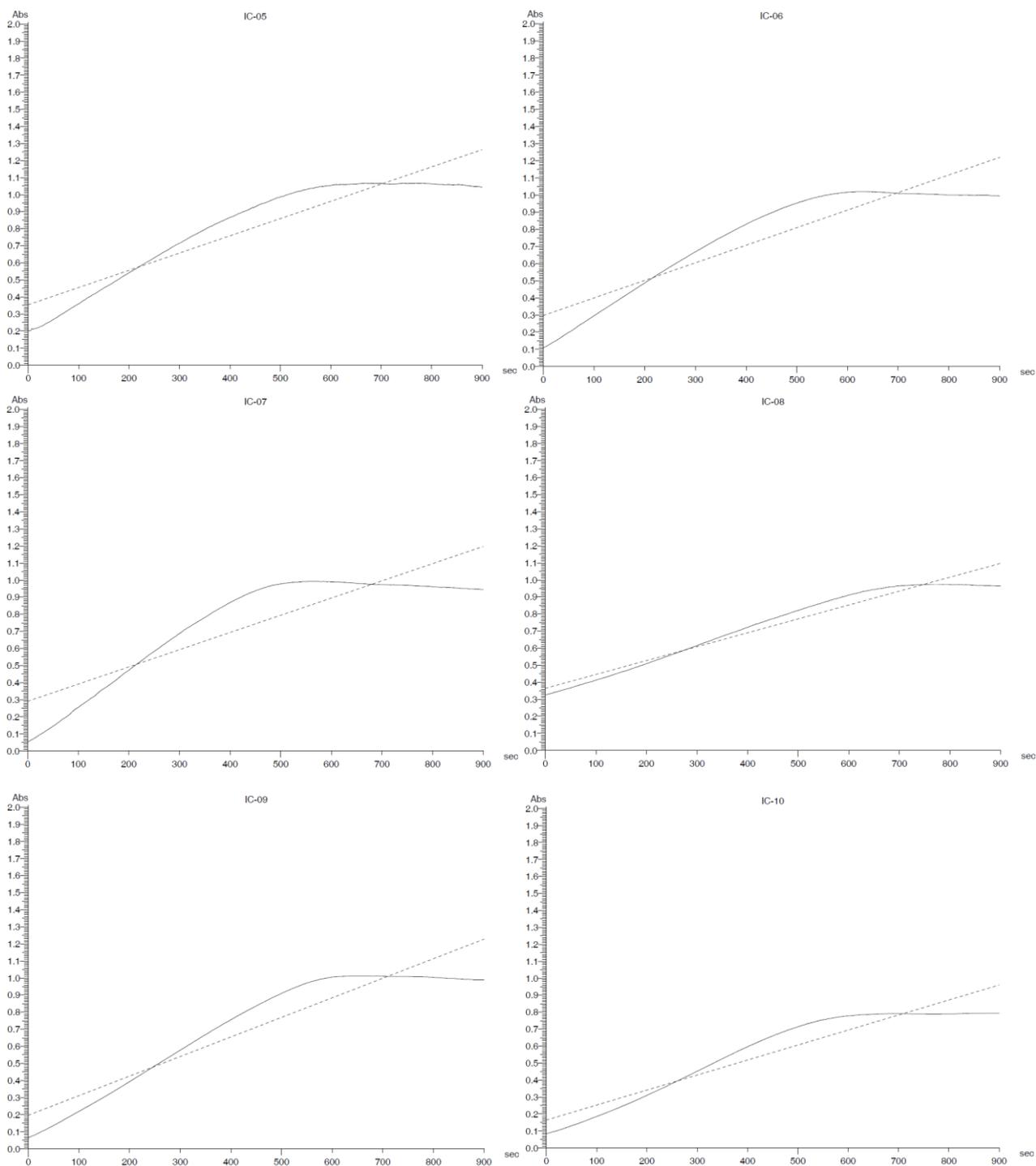
**Condições espectrométricas:** soluções-amostra = 10 mg mL<sup>-1</sup>; solventes: metanol grau PA, solução tampão fosfato pH 3 (formulada com fosfato de potássio anidro PA e ácido fosfórico 85% PA); cubetas: quartzo 1 cm; varredura = 900 a 220 nm; aparelho = espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu modelo UVPC-1601 (Florais de Minas Ltda.); analista = Isaac F. Corradi; data de análise = 27/12/2010.

ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (continua)

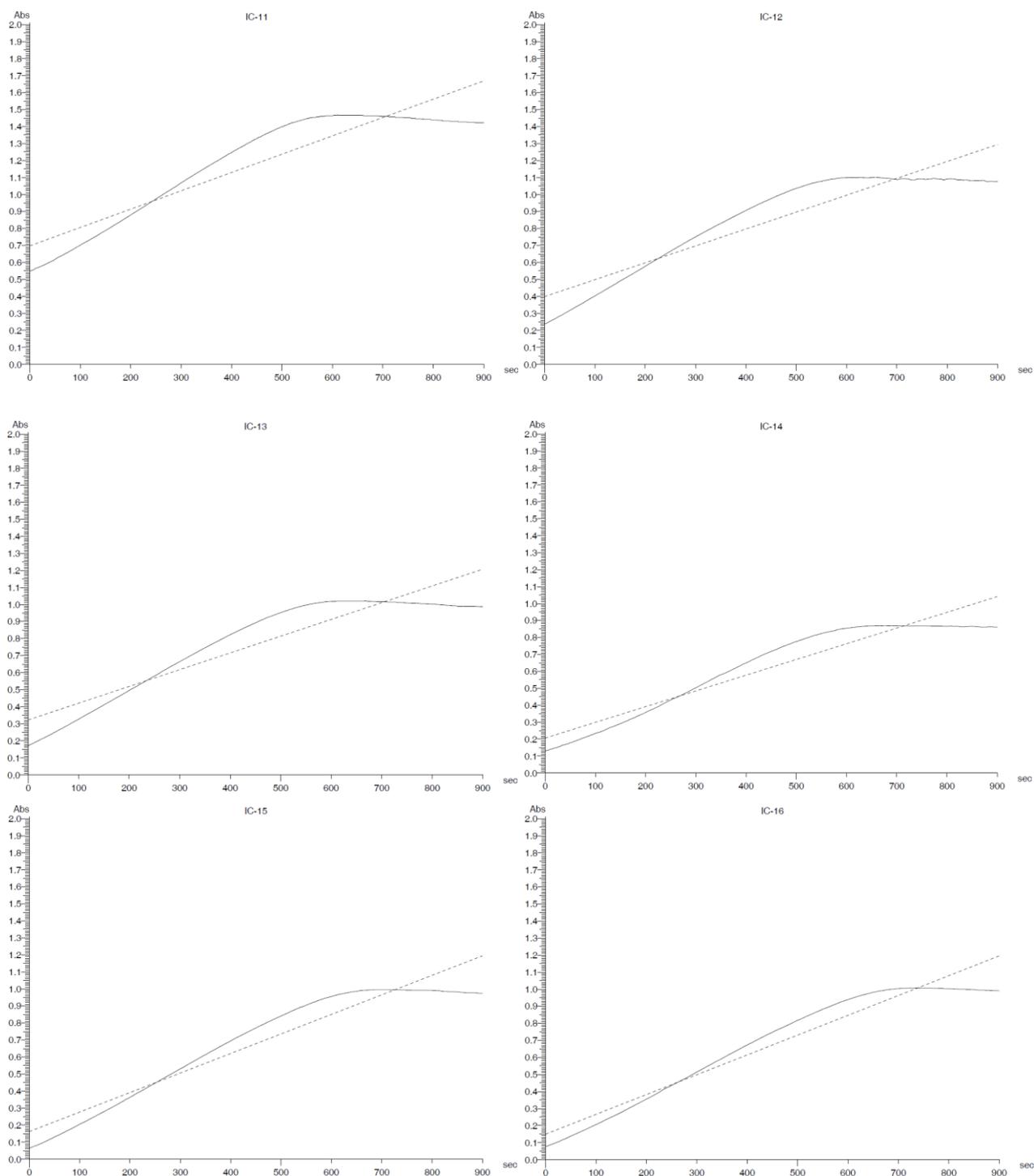
Curvas obtidas para os controles e os extratos



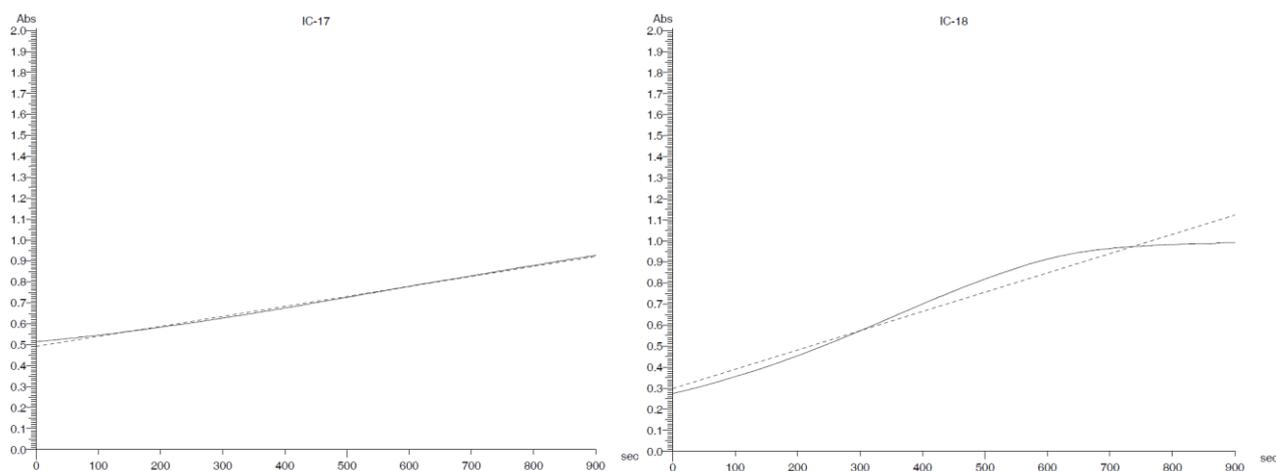
ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (continuação)



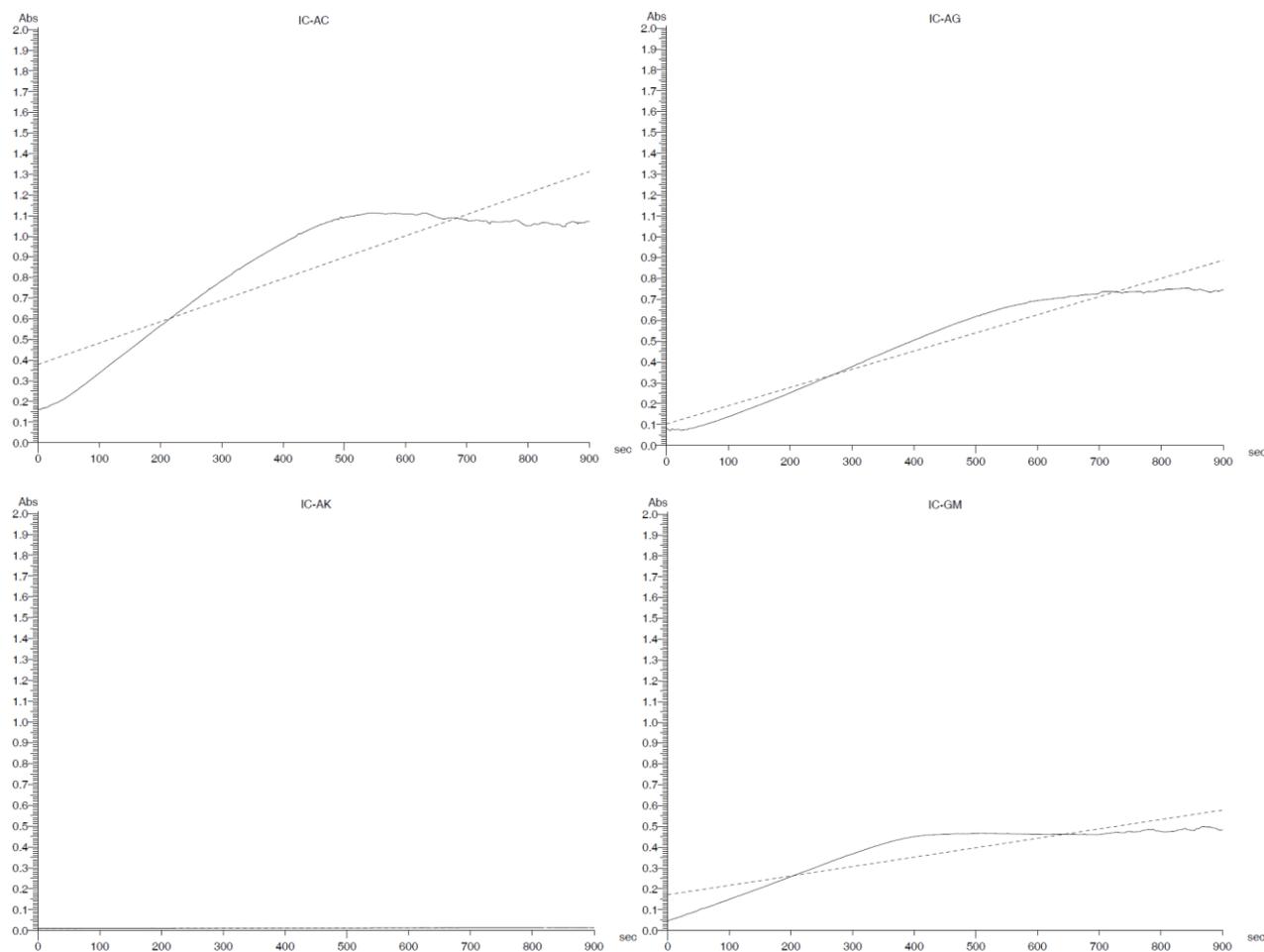
ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (continuação)



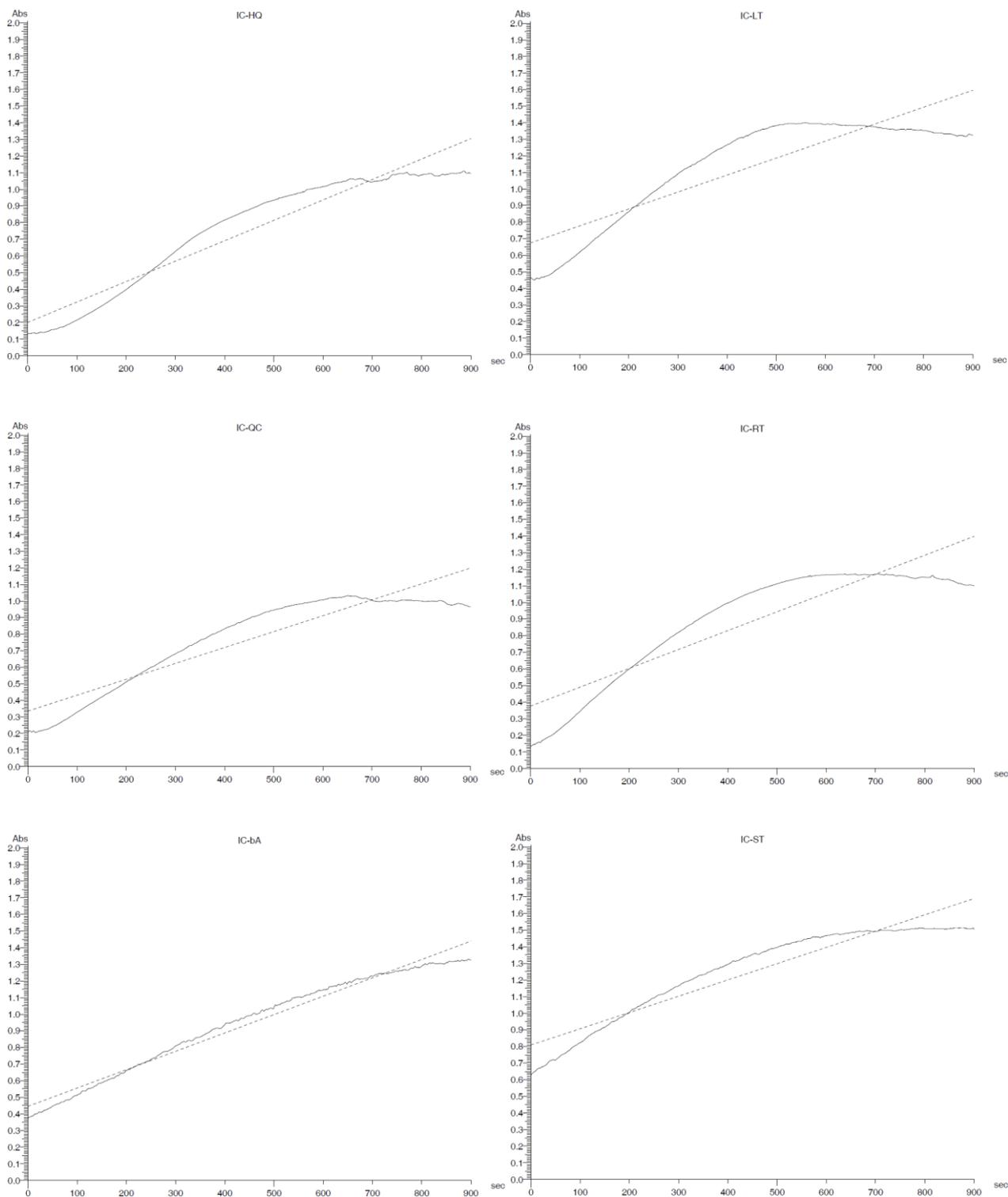
ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (continuação)



Curvas obtidas para os padrões de referência

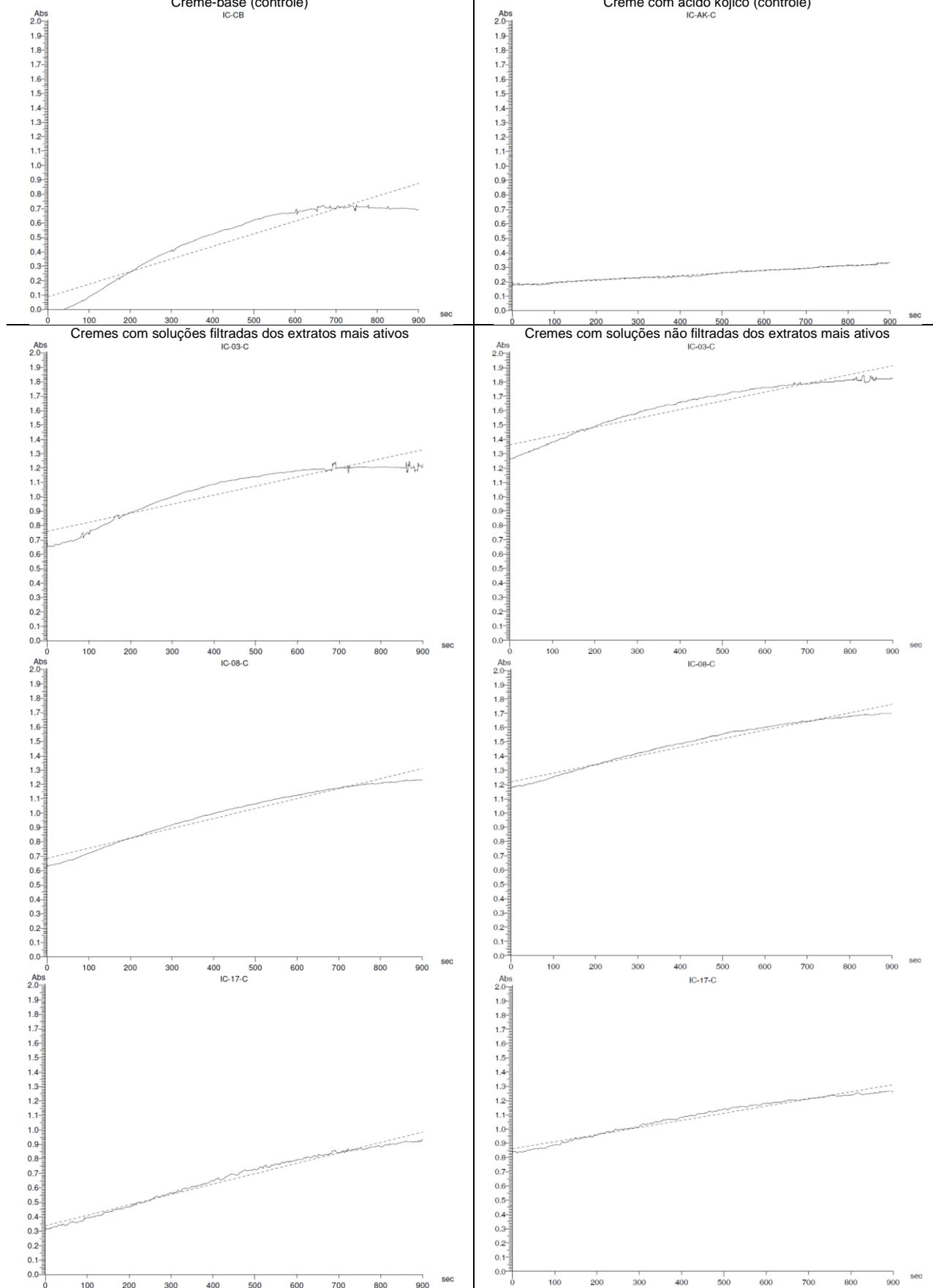


ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (continuação)



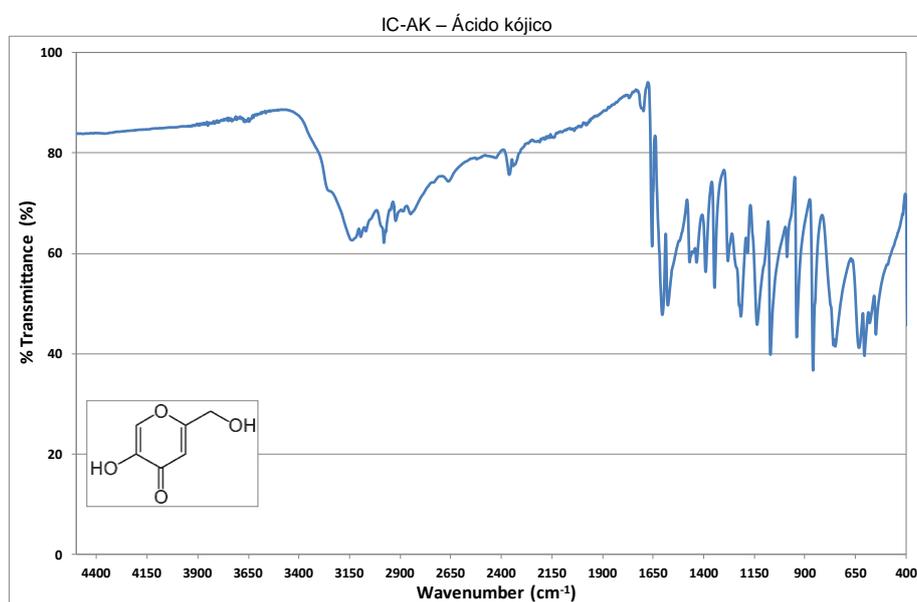
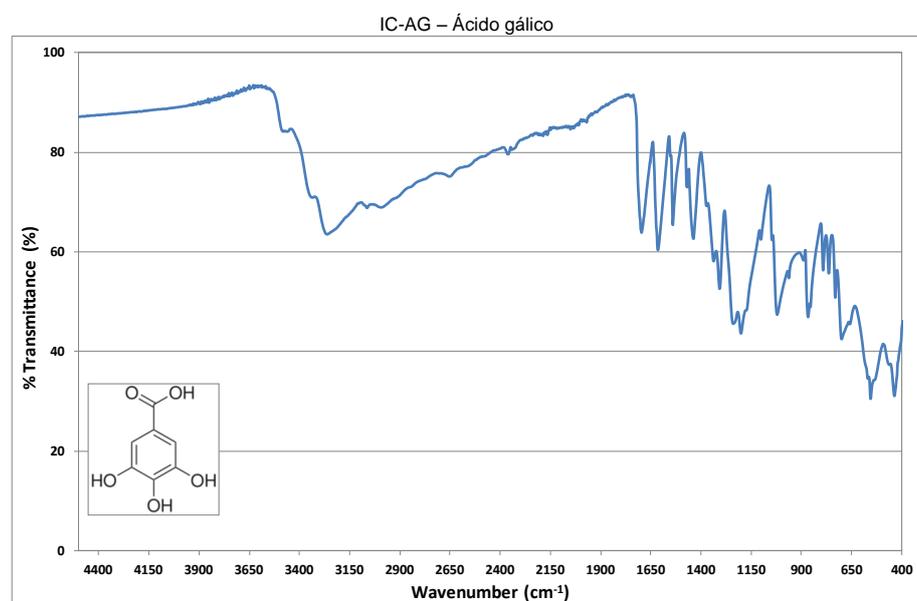
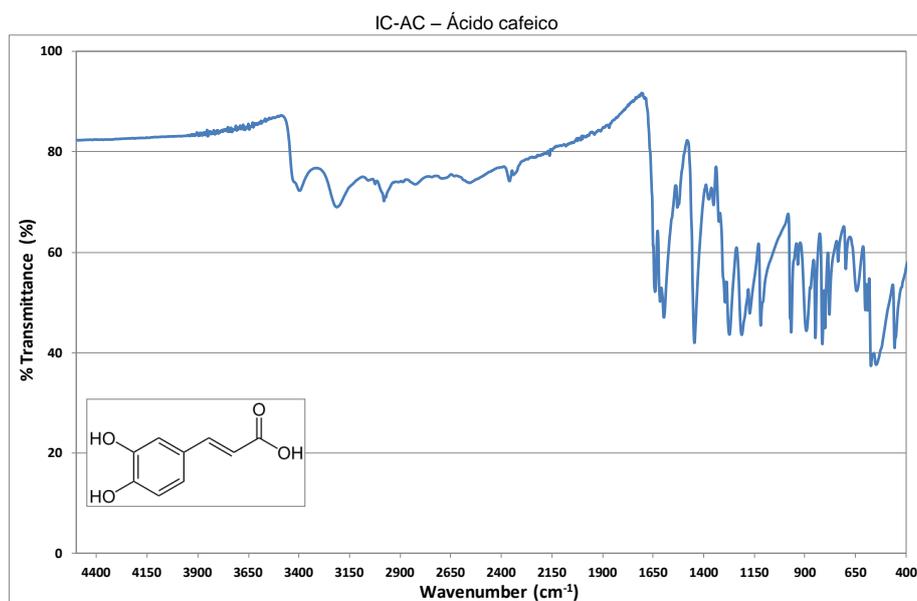
## ANEXO 4 - Curvas de formação de dopacromo obtidas nos testes de inibição da tirosinase via espectroscopia UV-Vis para os extratos, padrões e formulações. (conclusão)

Curvas obtidas para as formulações controle e as formulações contendo os extratos mais ativos



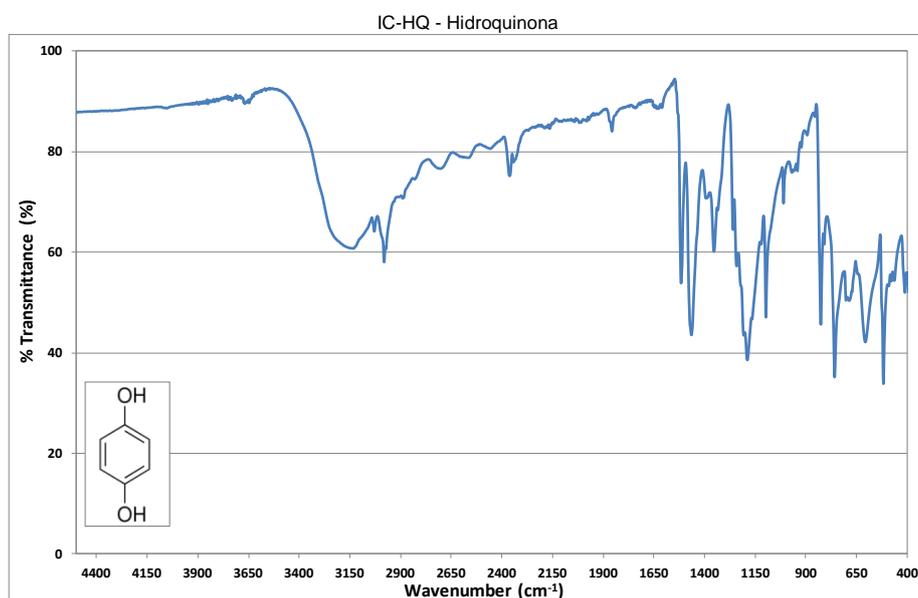
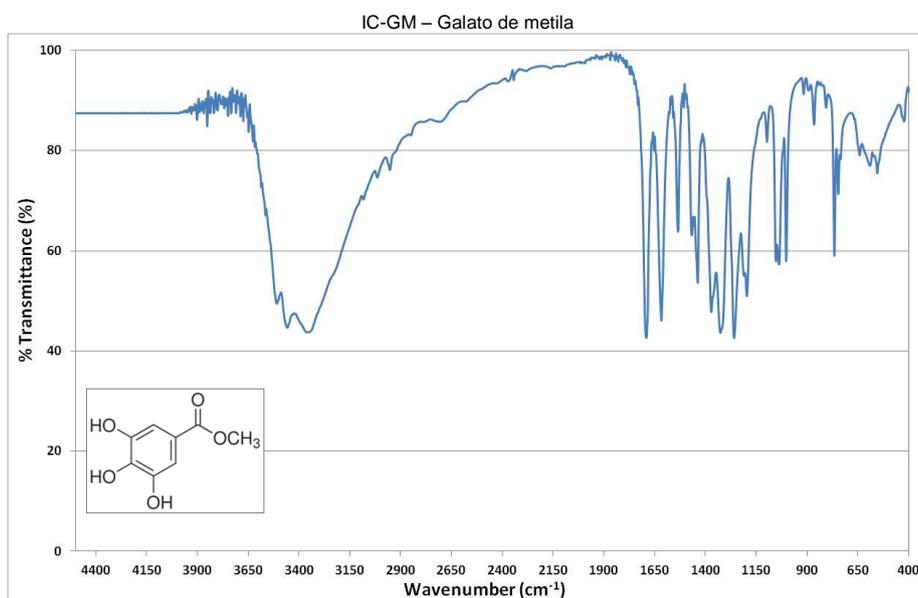
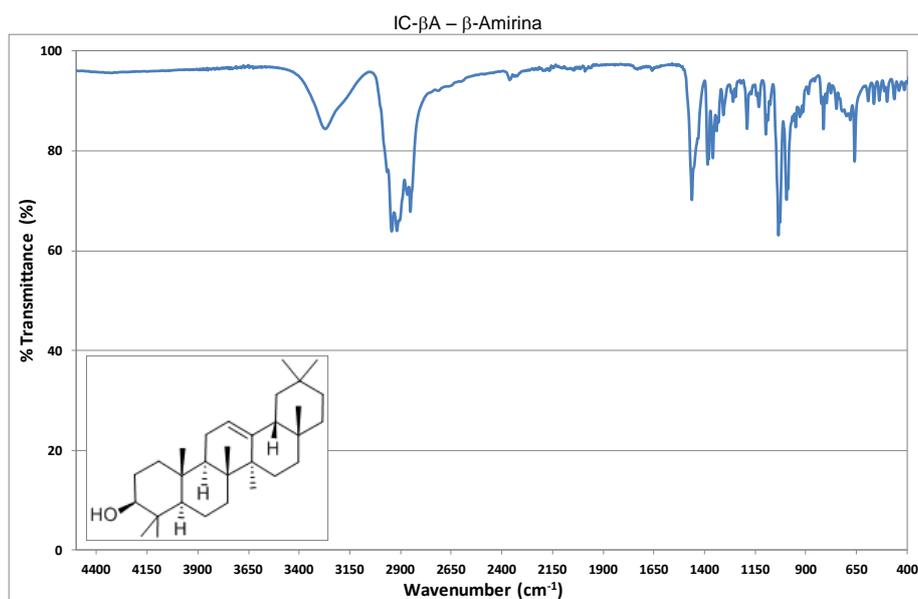
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continua)



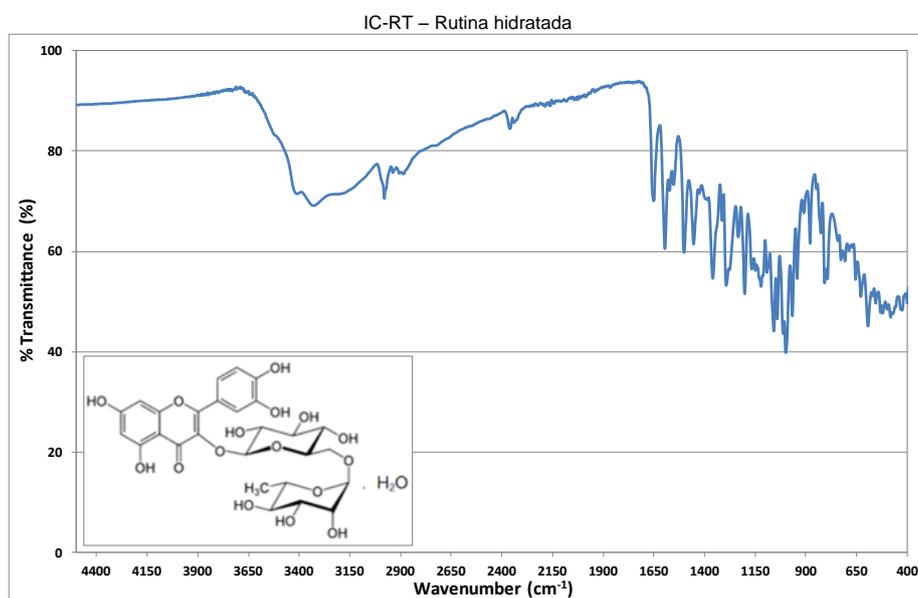
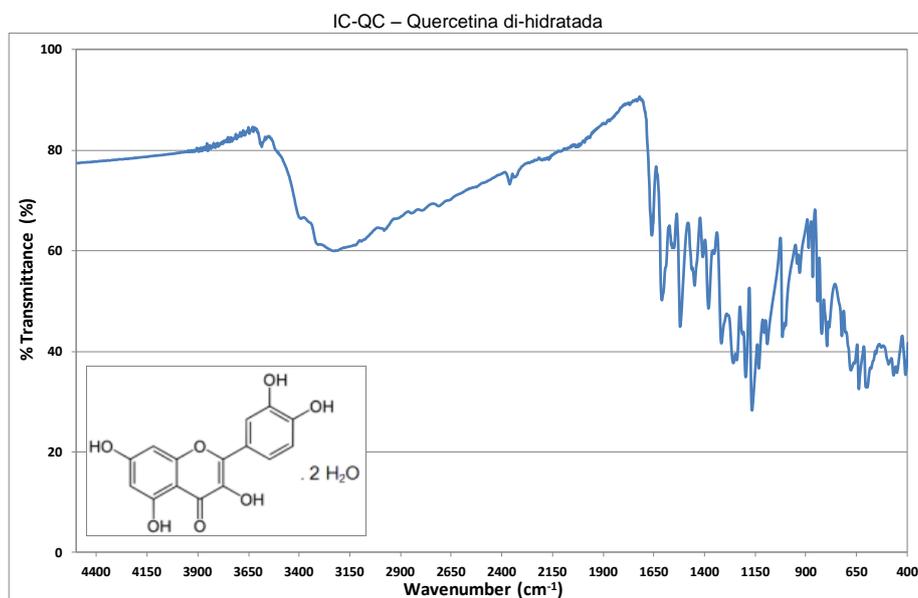
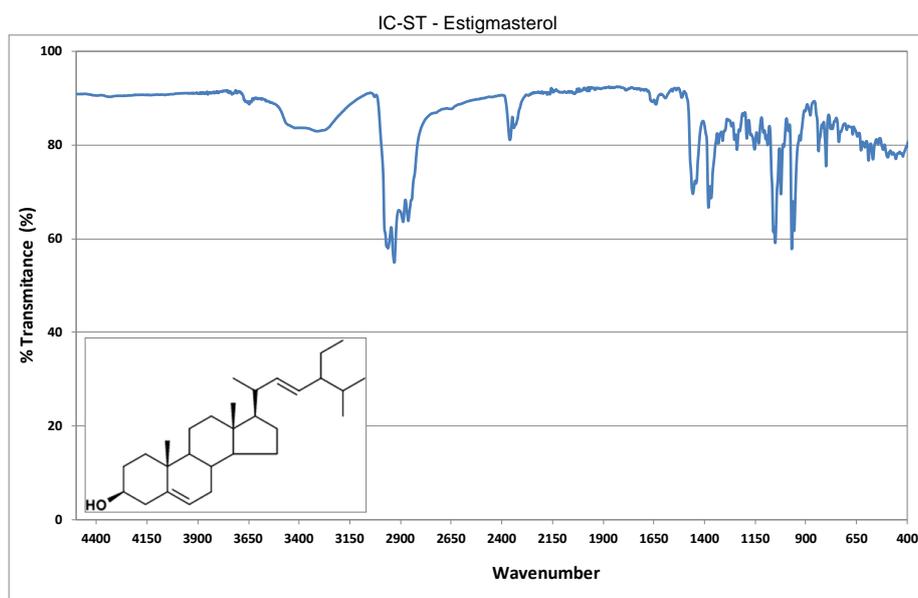
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



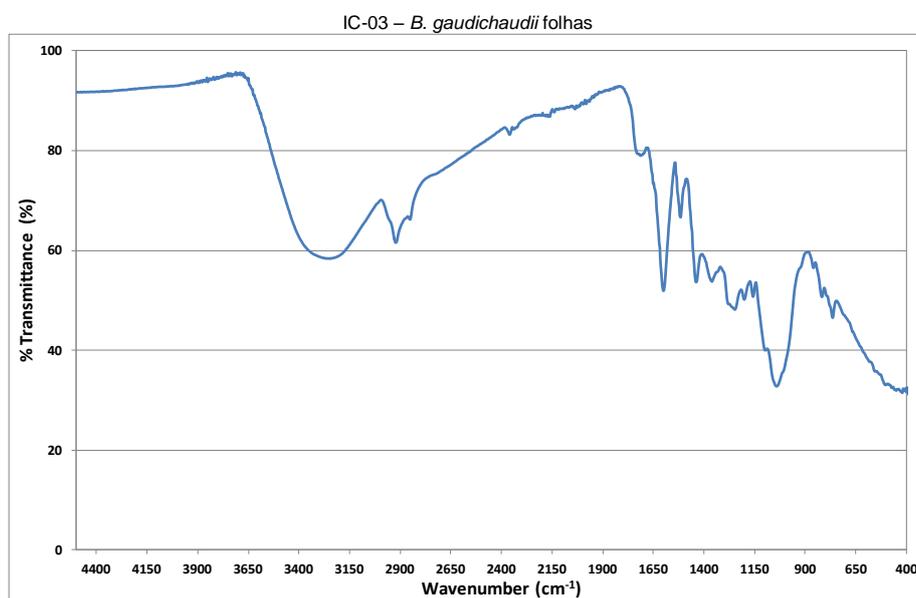
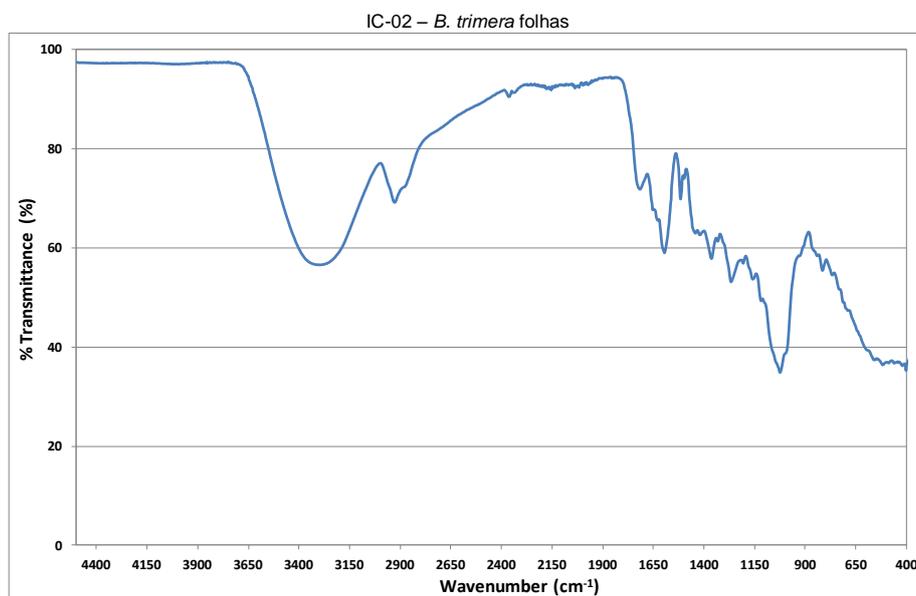
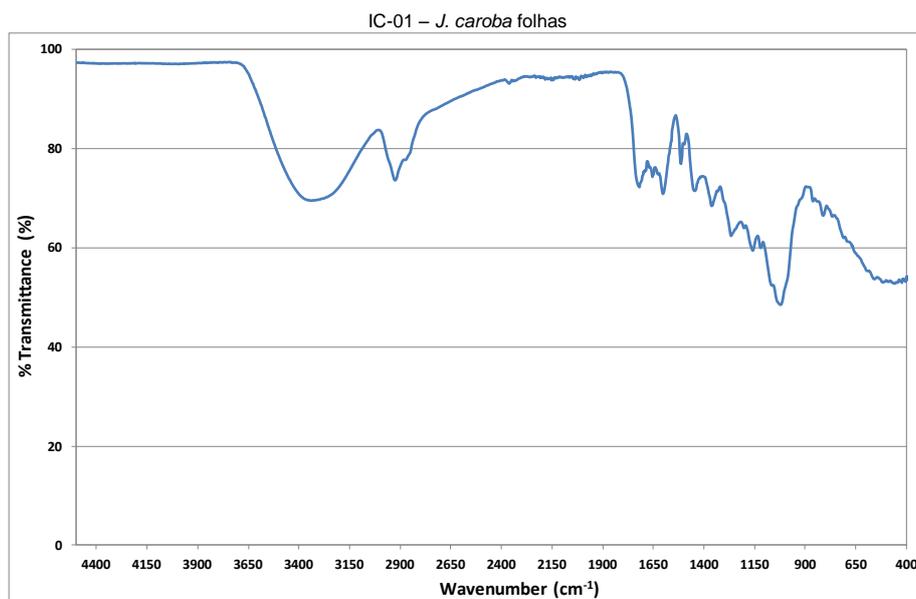
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



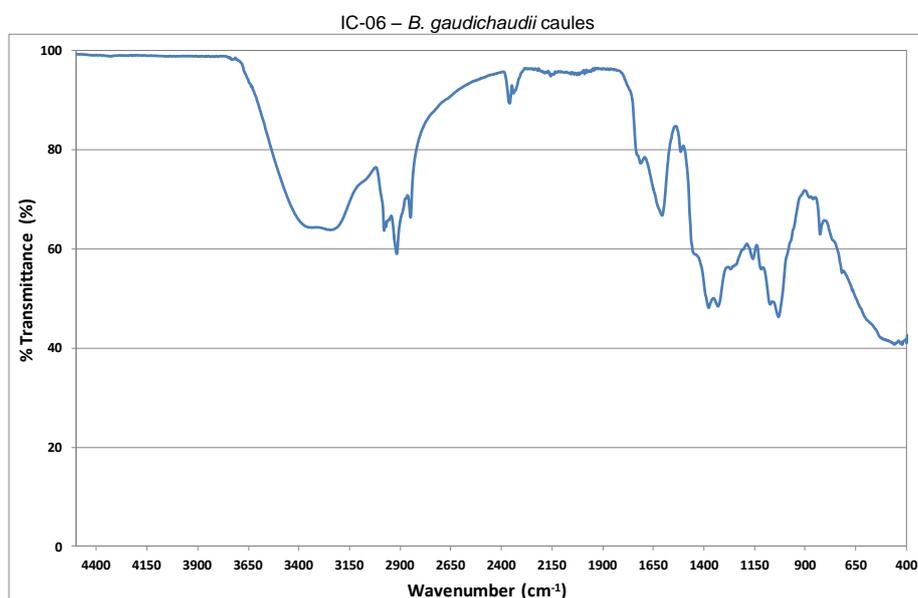
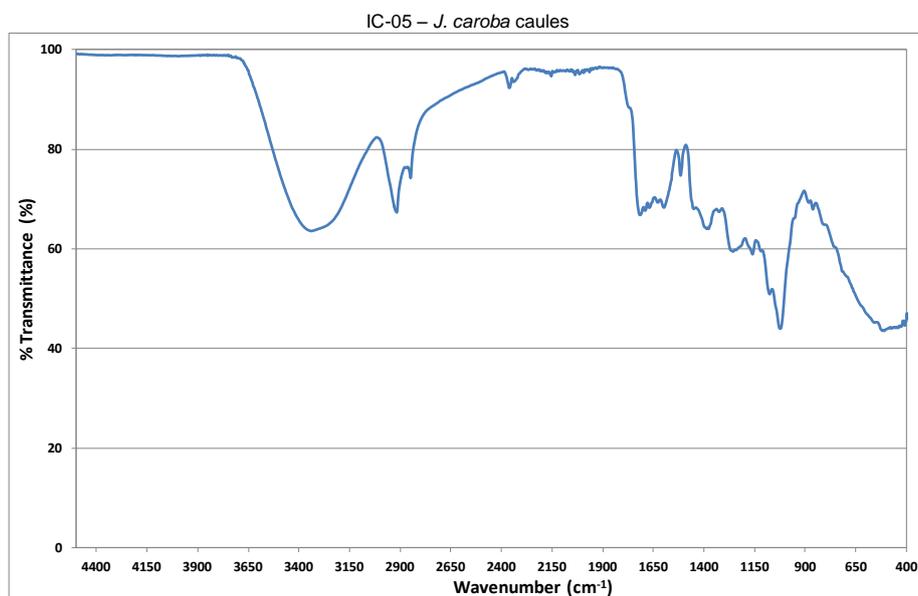
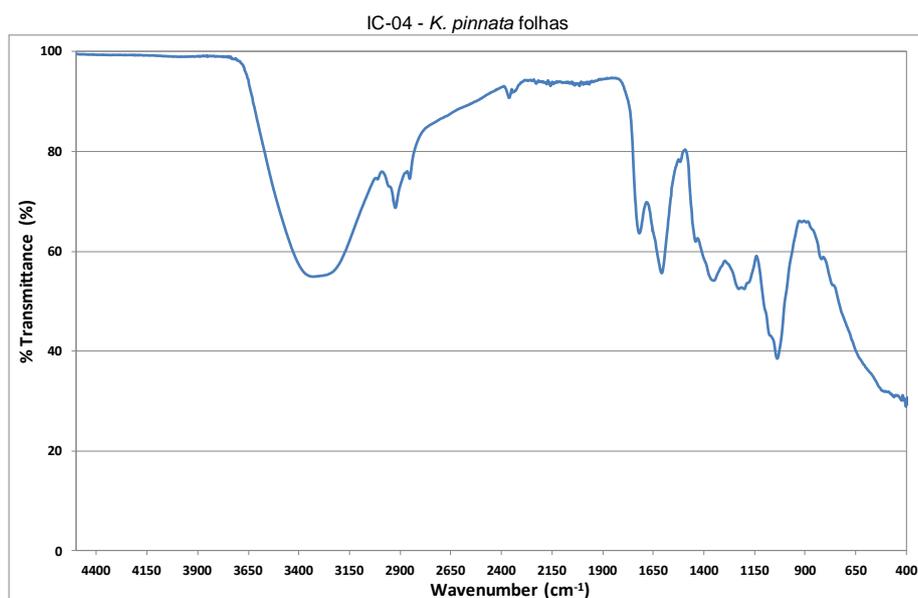
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



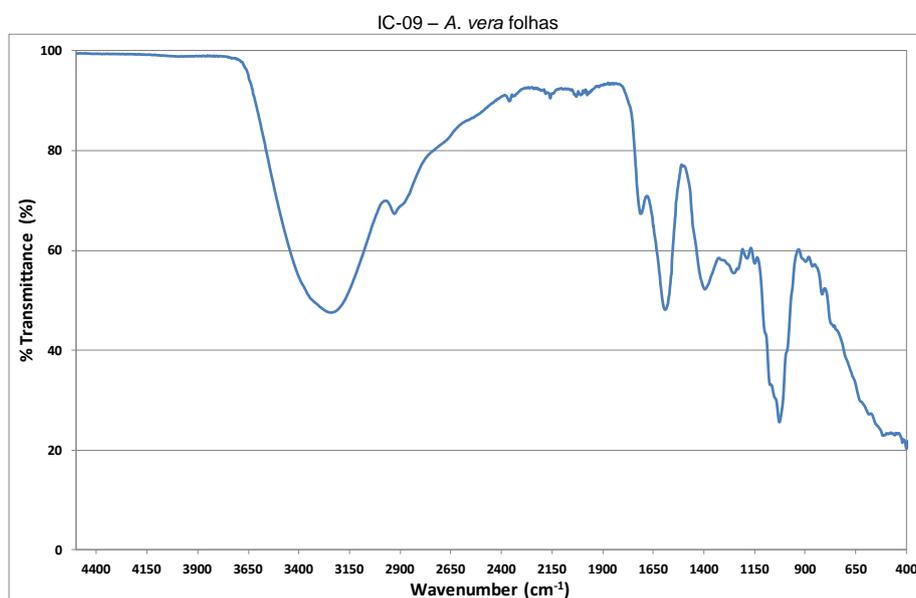
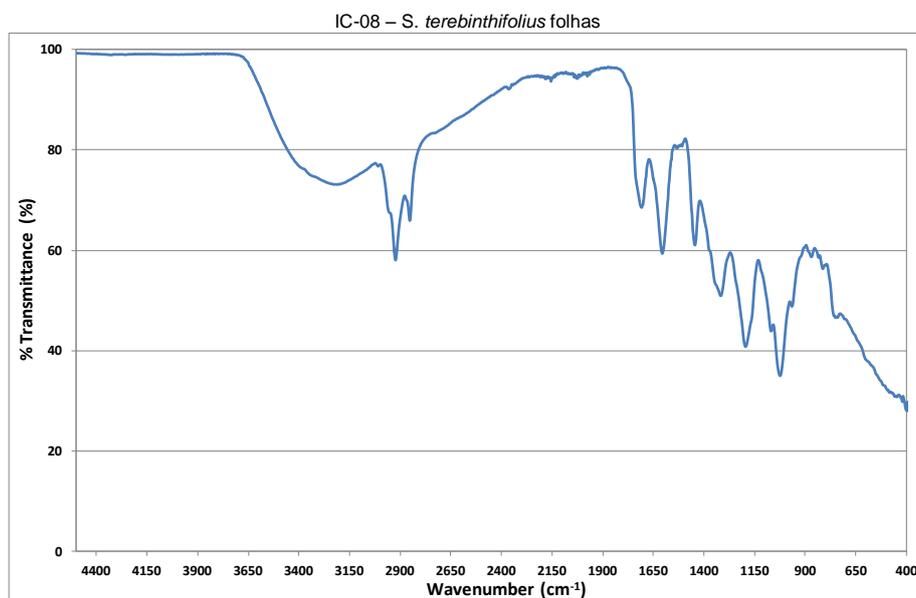
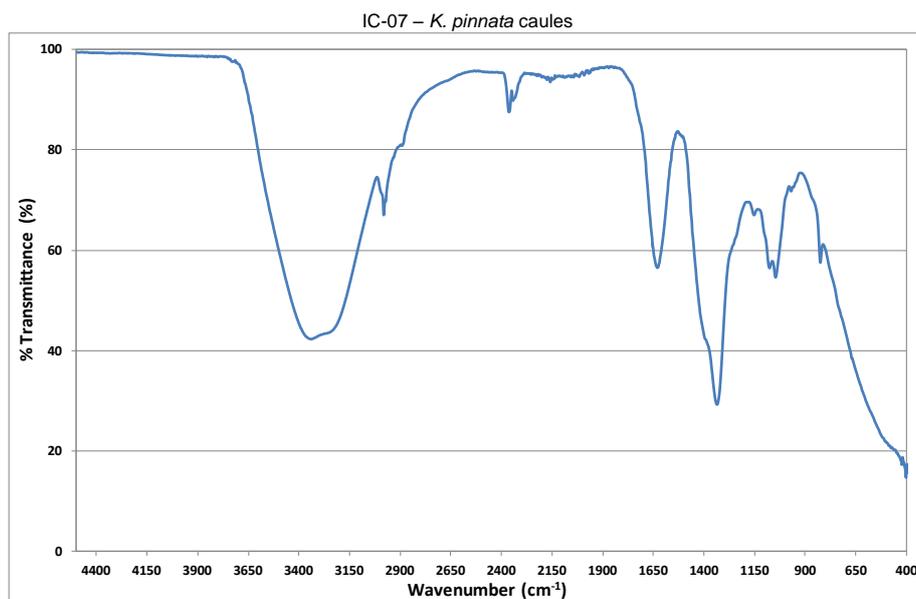
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



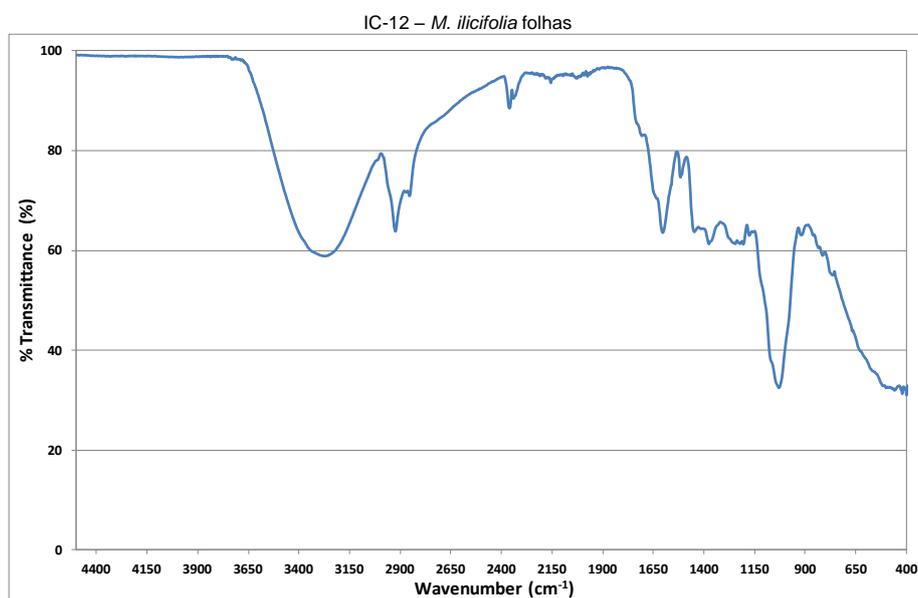
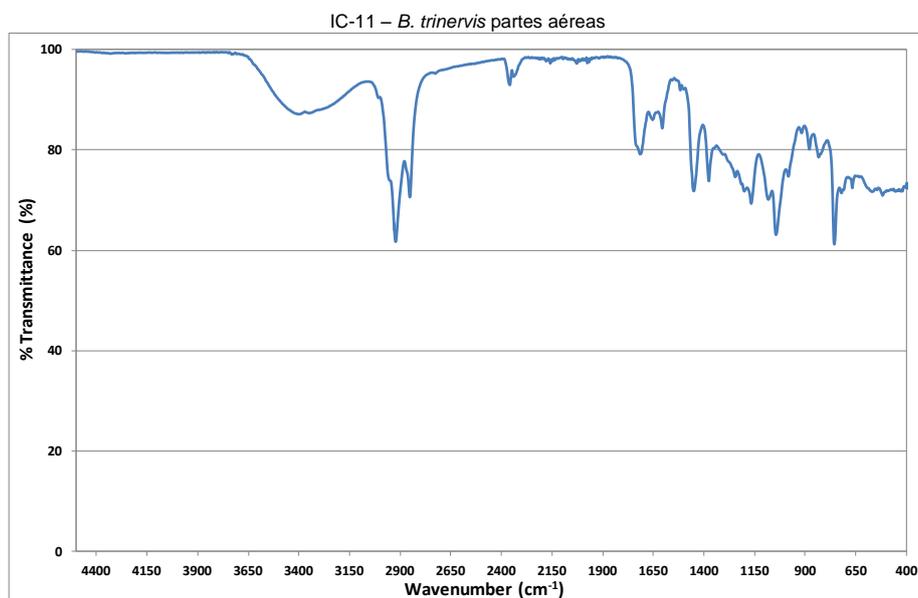
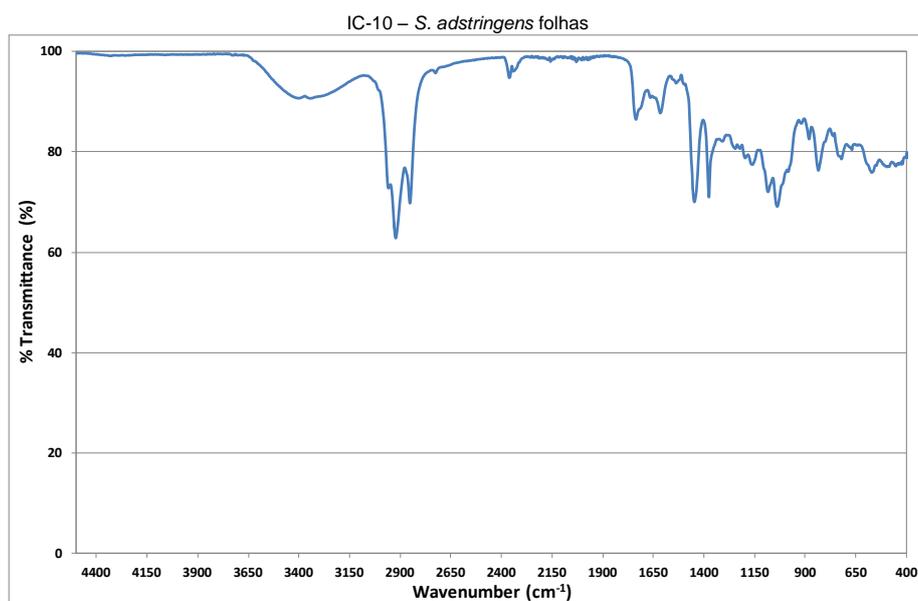
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



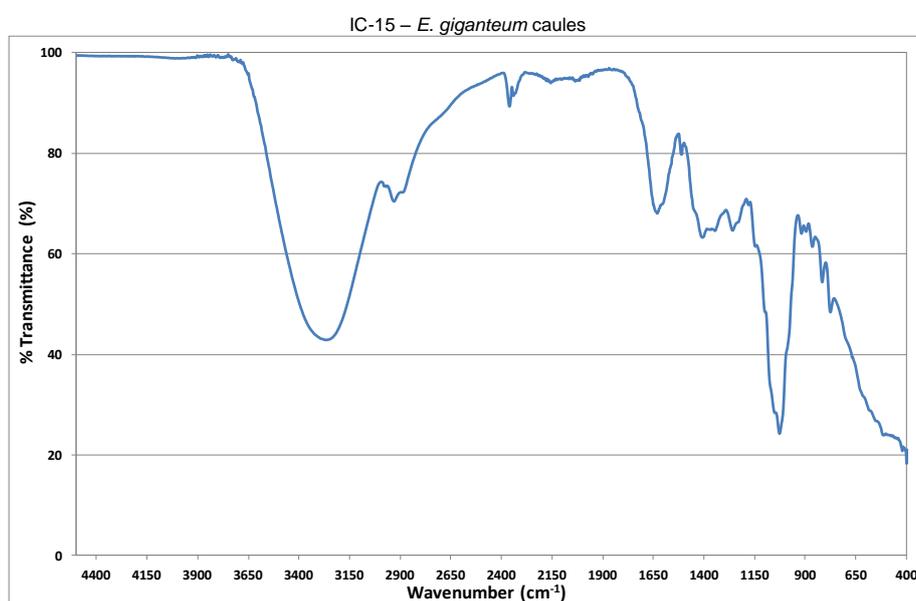
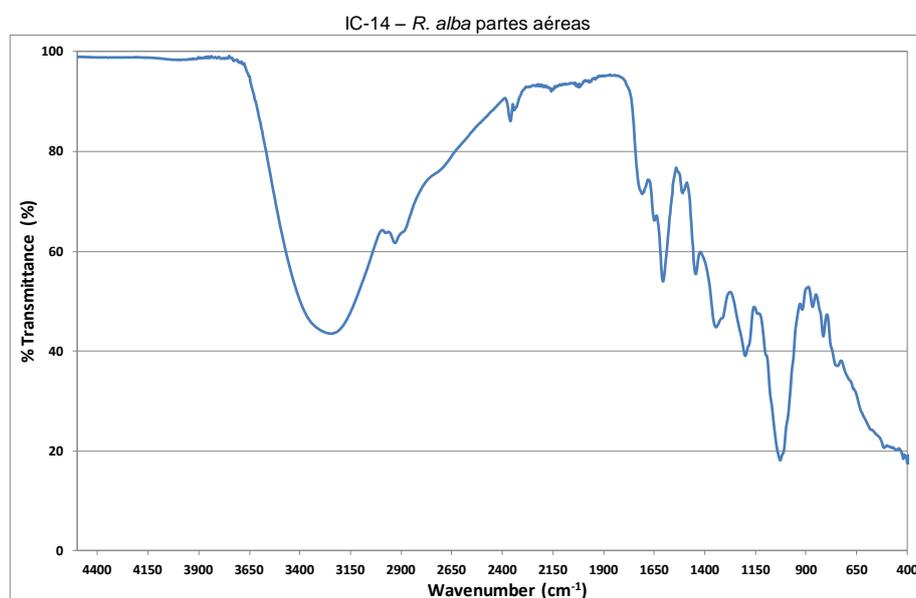
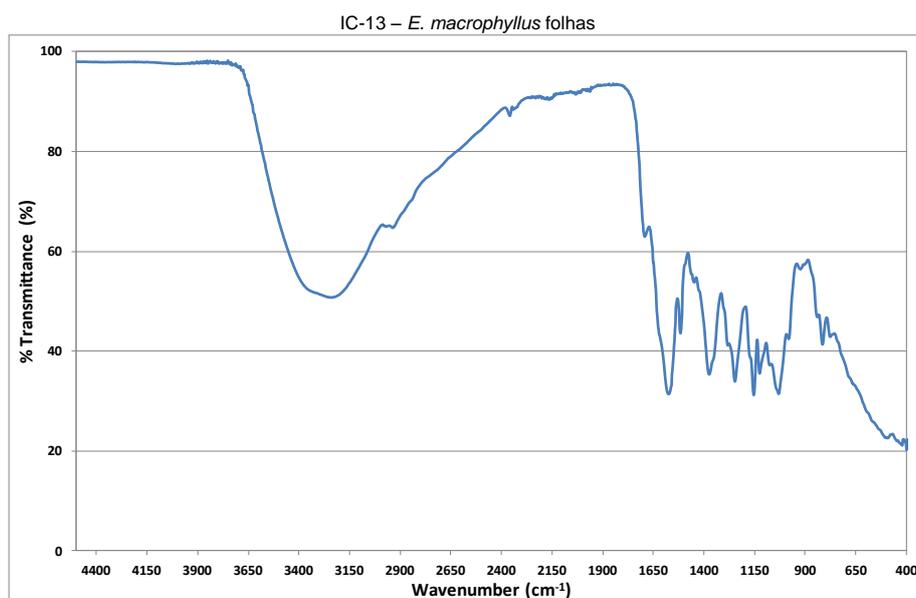
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



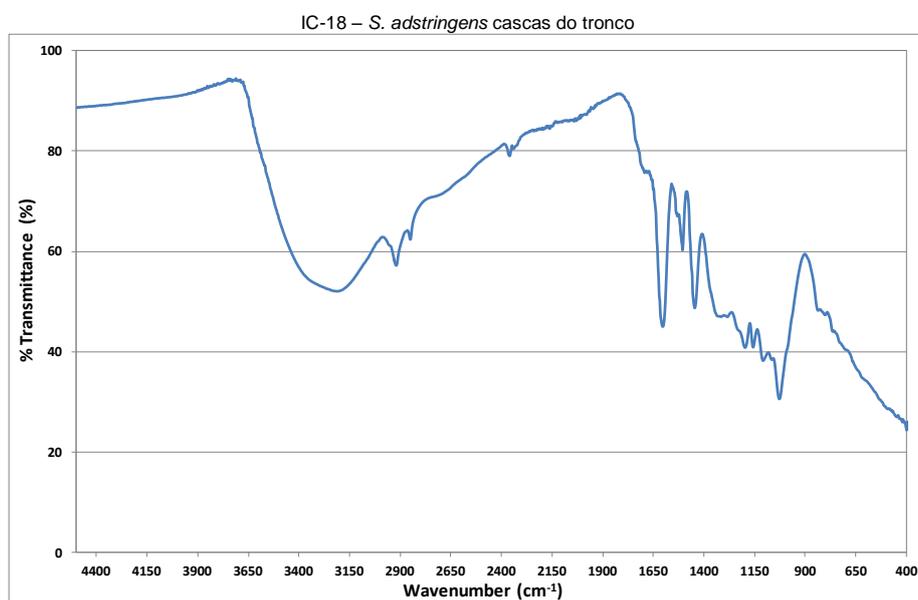
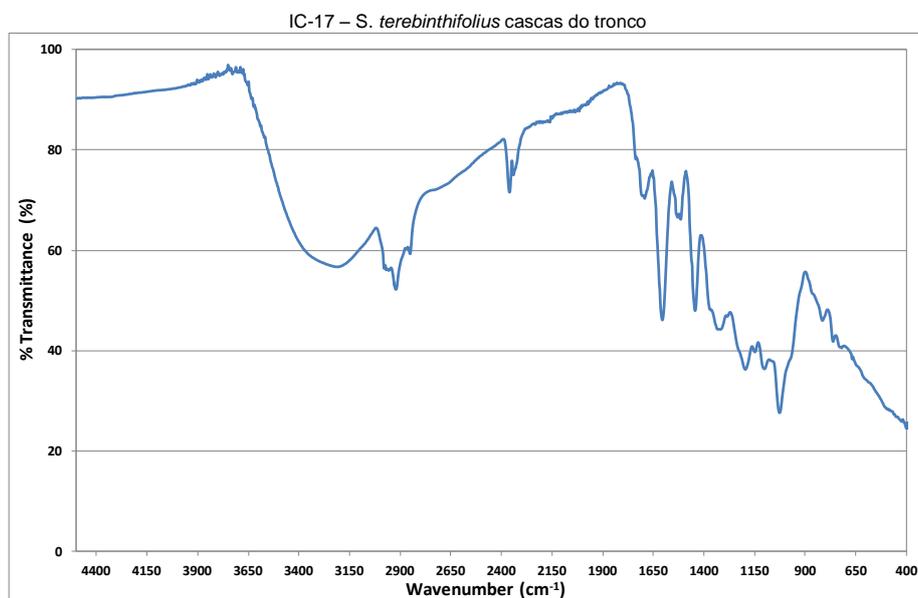
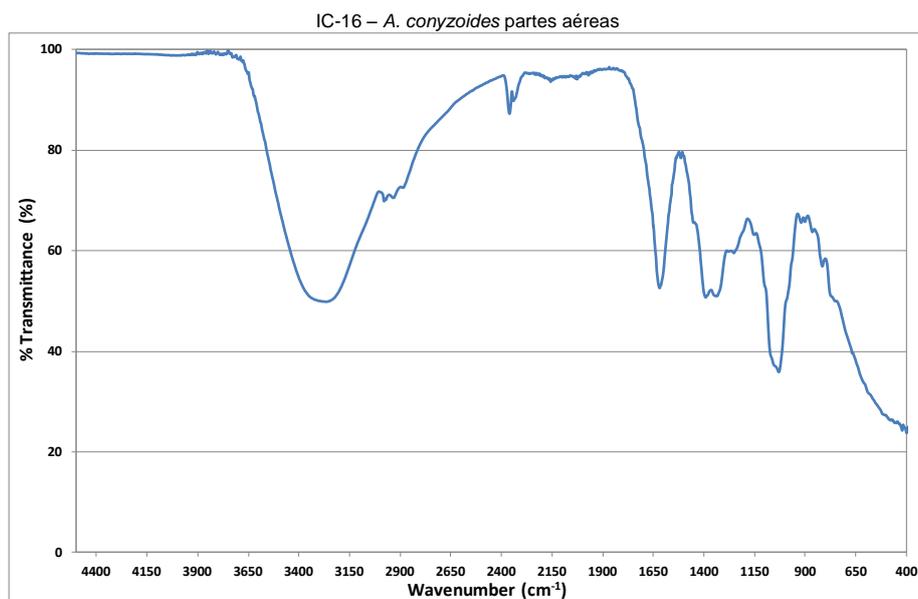
## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(continuação)



## ANEXO 5 – Espectros no IV dos padrões e extratos.

(conclusão)



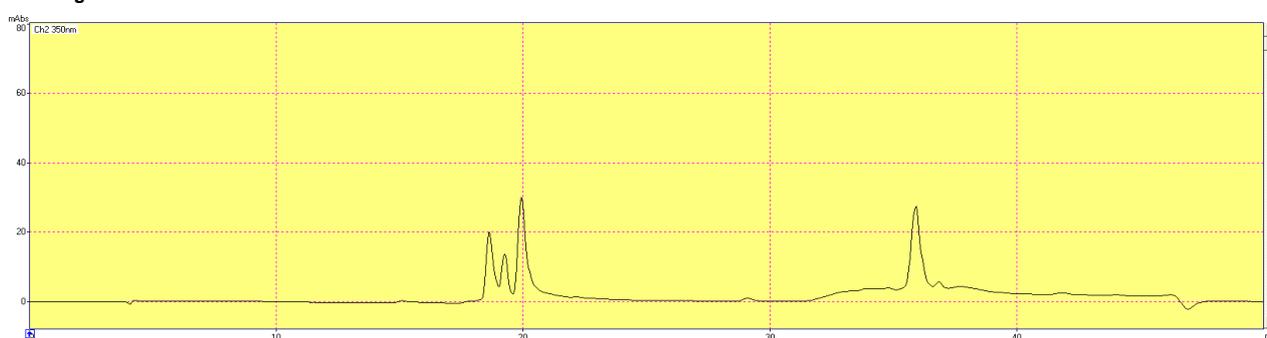
ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continua)

Amostra: IC-03 Descrição: *B. gaudichaudii* (folhas) % Inibição da tirosinase: 96%

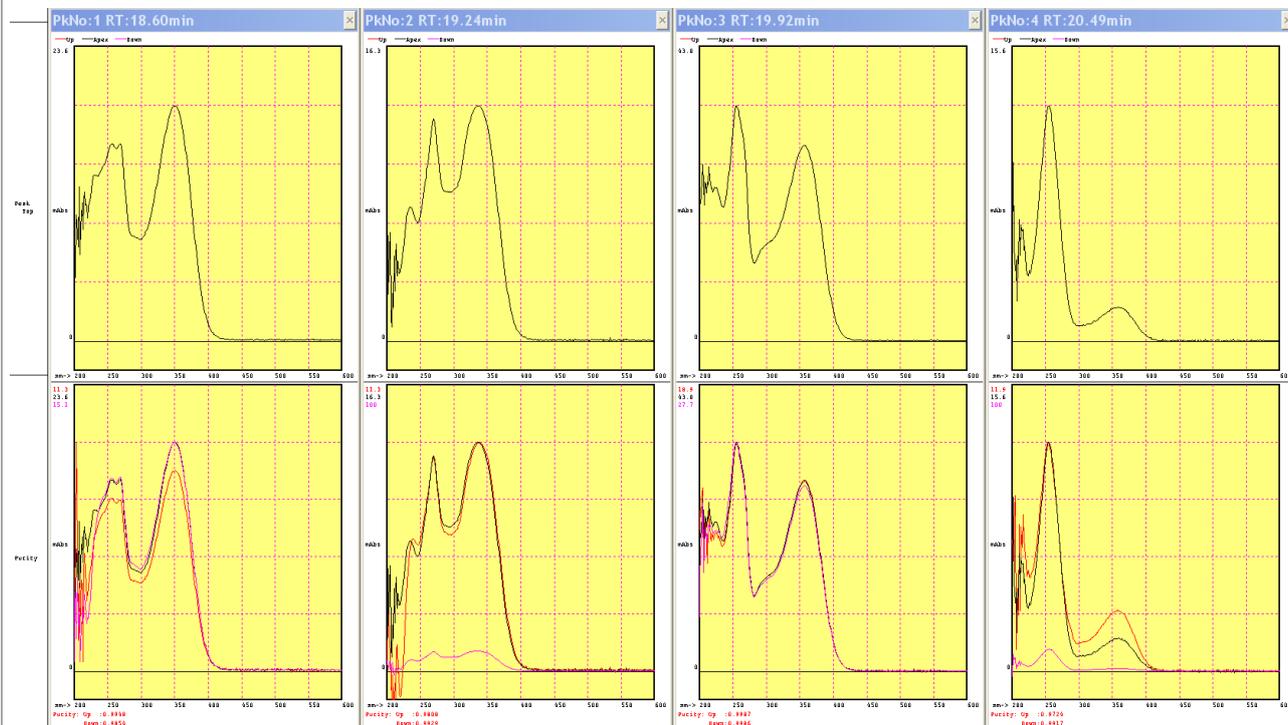
Cromatograma em 280 nm:



Cromatograma em 350 nm:



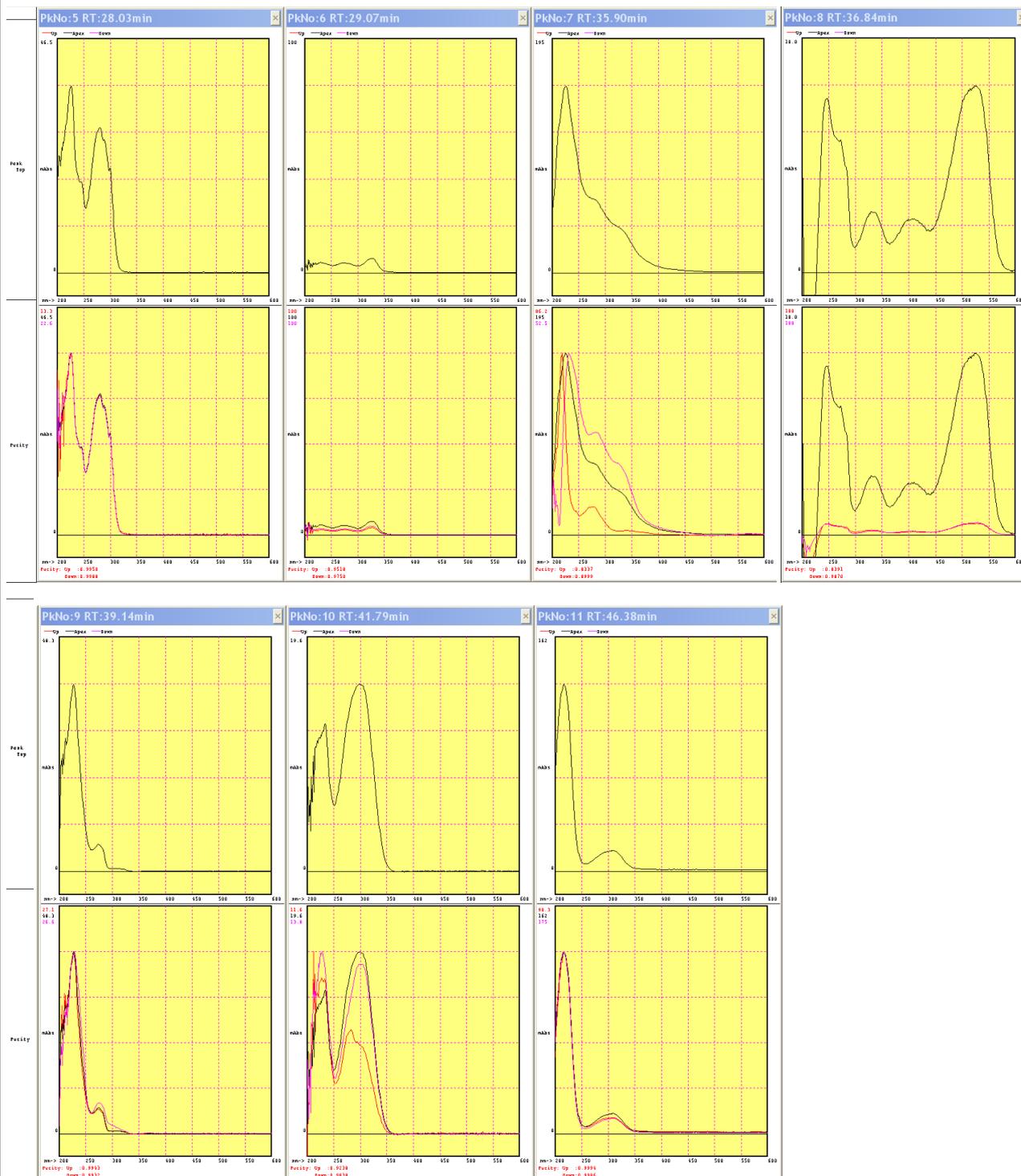
Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm:



ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)

Amostra: IC-03 Descrição: *Brosimum gaudichaudii* (extrato folhas) % Inibição da tirosinase: 96%

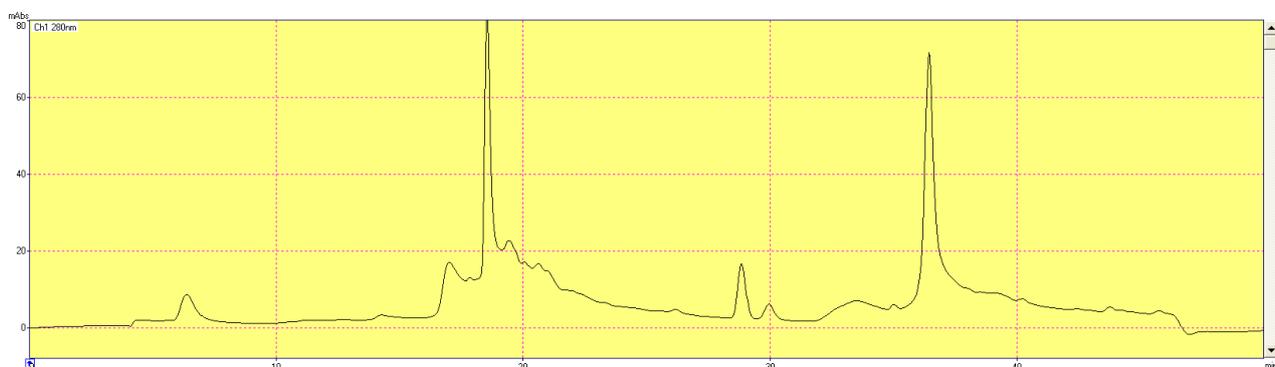
Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm:



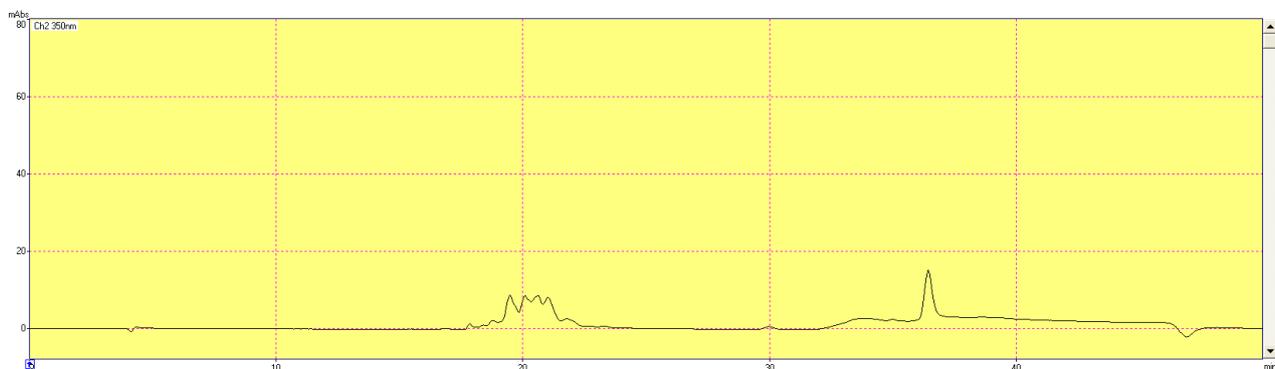
ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)

Amostra: IC-08 Descrição: *S. terebinthifolius* (folhas) % Inibição da tirosinase: 65%

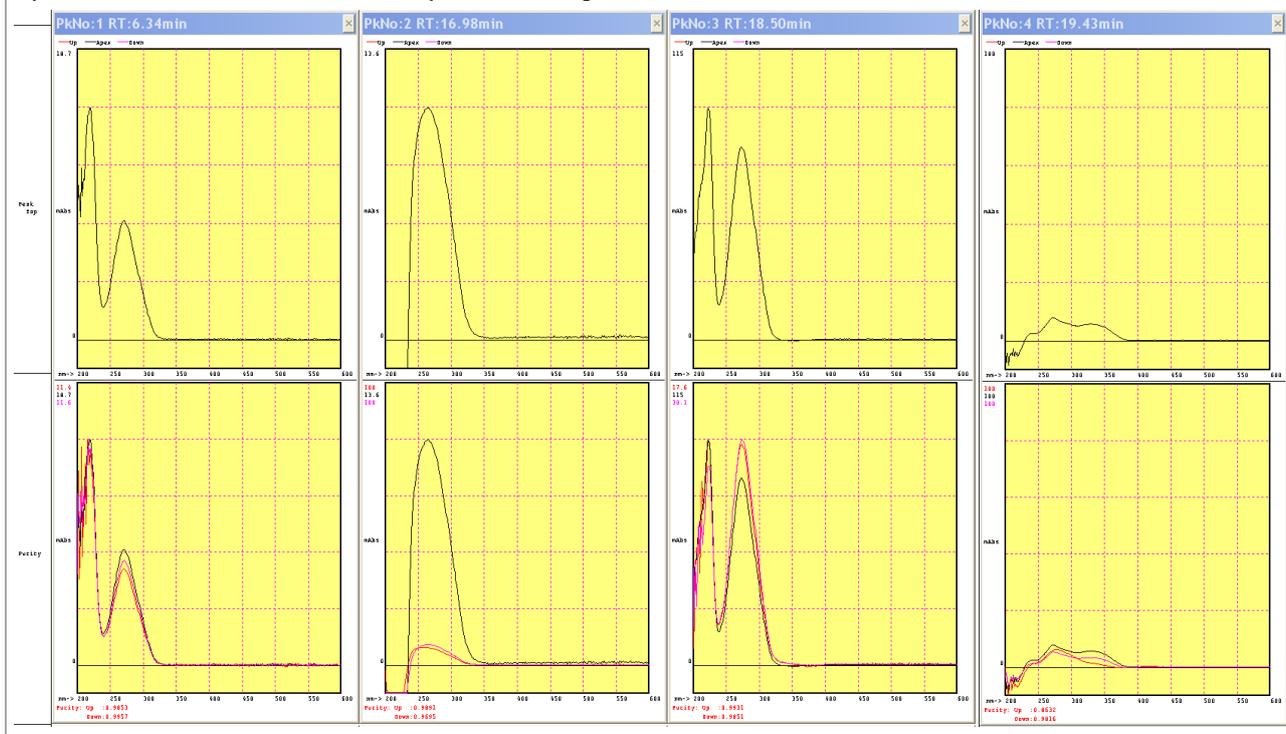
Cromatograma em 280 nm:



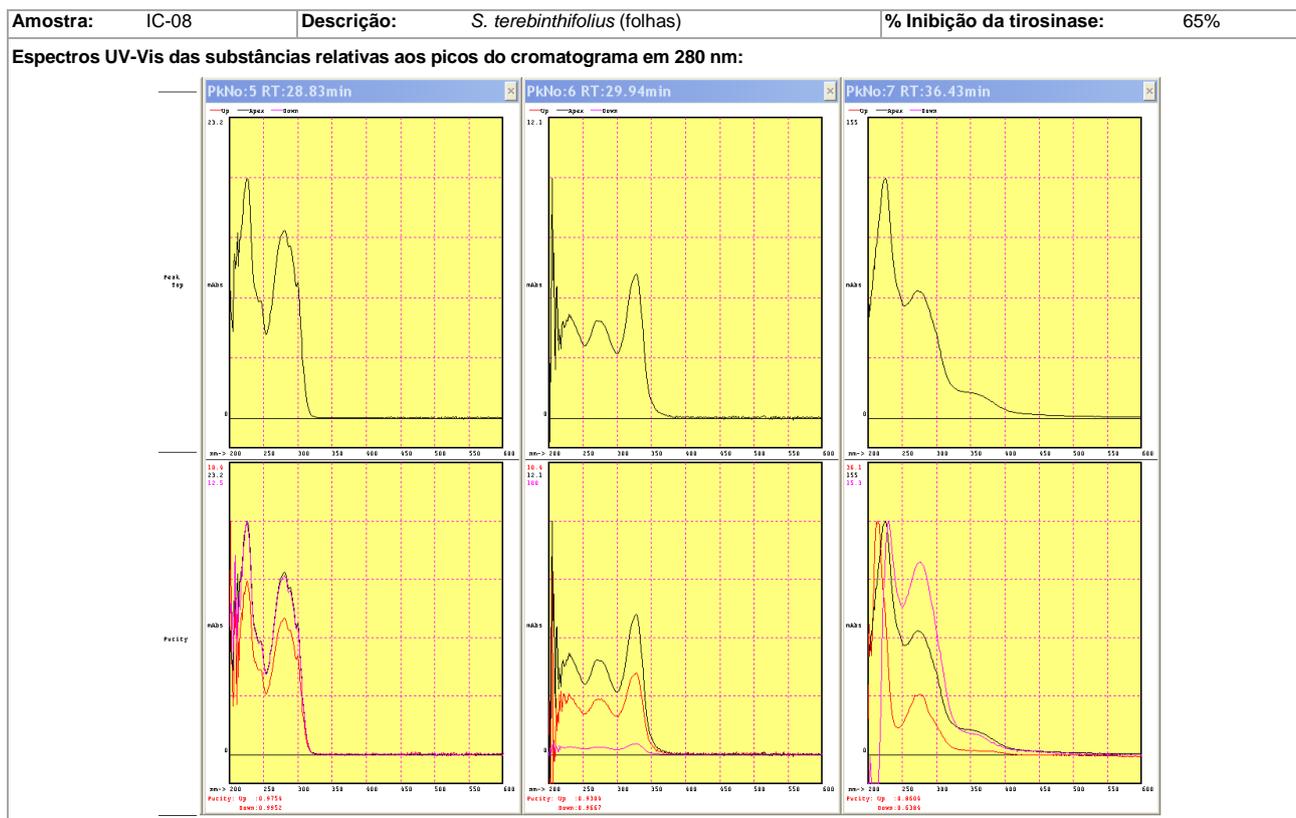
Cromatograma em 350 nm:



Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm:



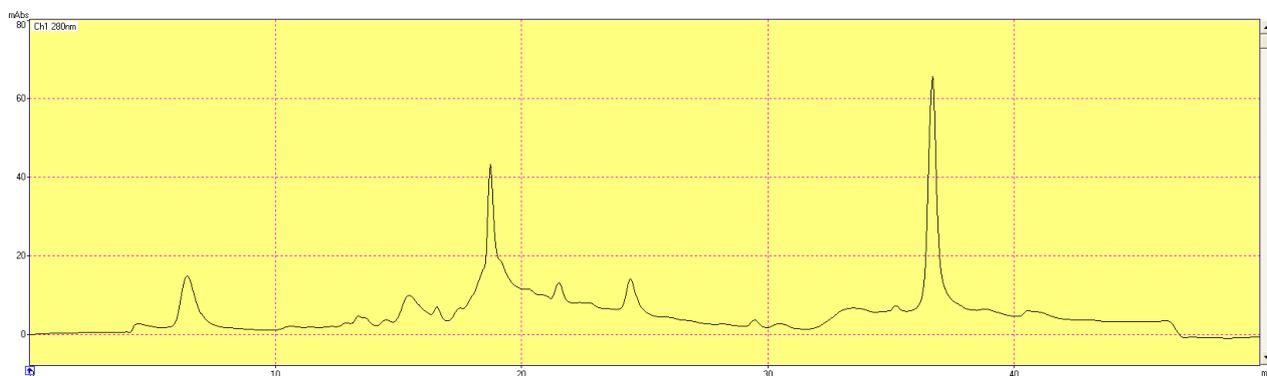
ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)



ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)

Amostra: IC-17 Descrição: *S. terebinthifolius* (cascas do tronco) % Inibição da tirosinase: 79%

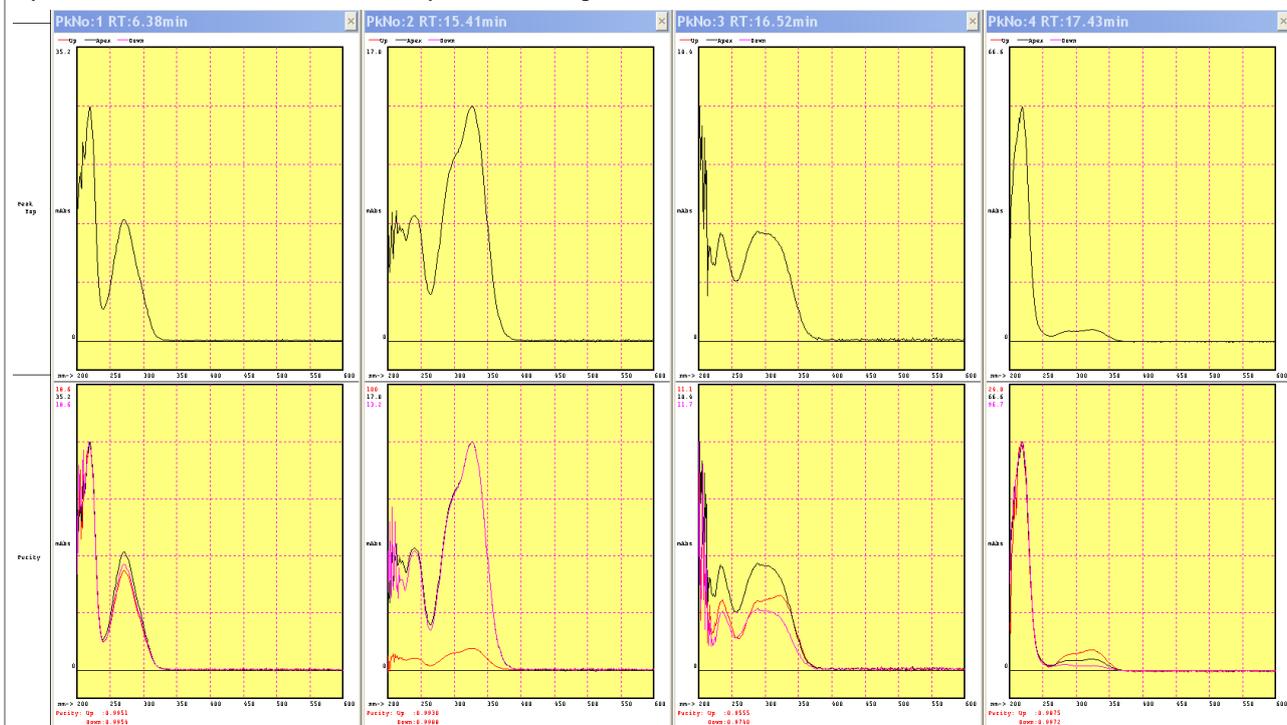
Cromatograma em 280 nm:



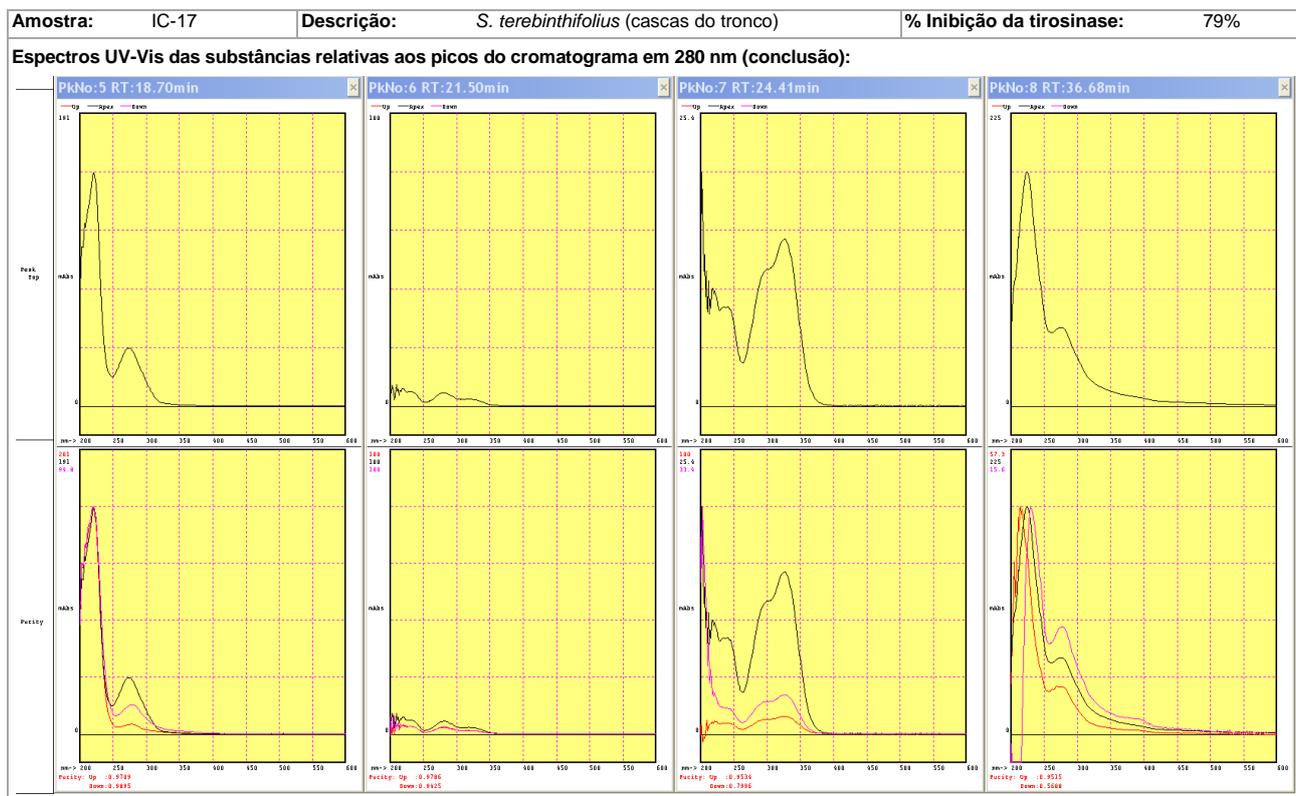
Cromatograma em 350 nm:



Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm:



## ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)



ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (continuação)

Amostra: IC-15      Descrição: *E. giganteum* (caules)      % Inibição da tirosinase: 19%\*

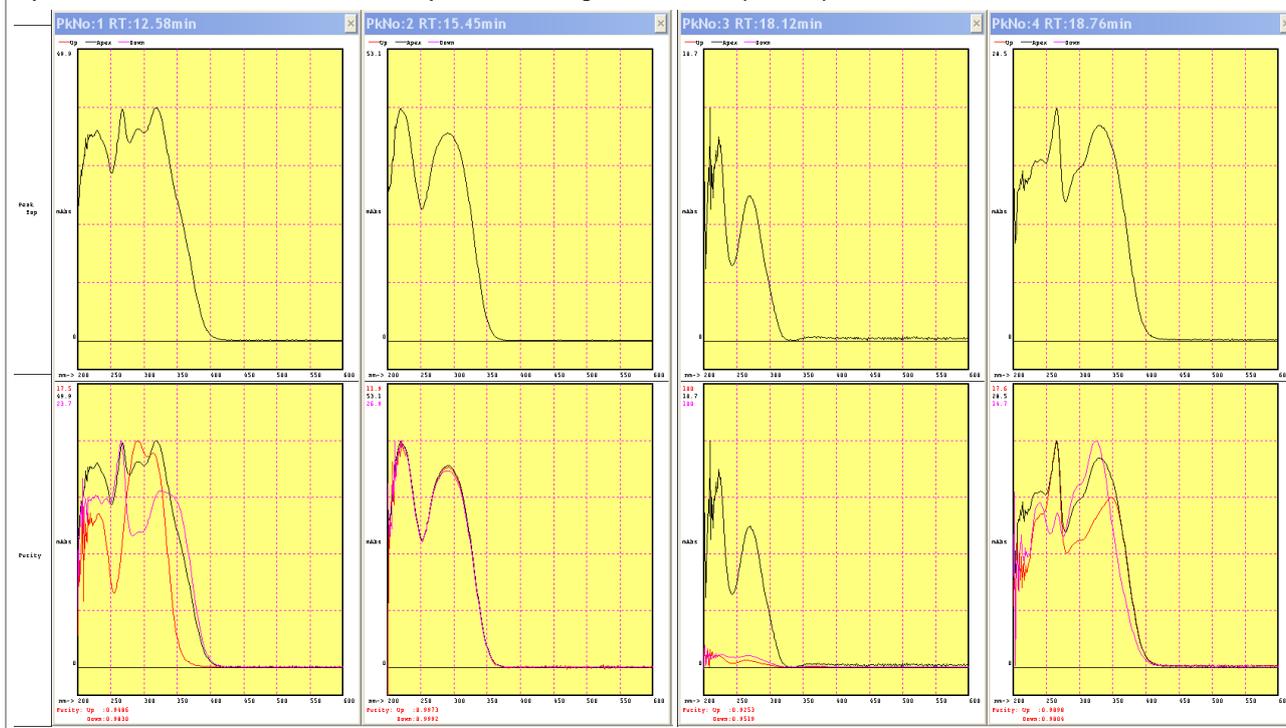
Cromatograma em 280 nm:



Cromatograma em 350 nm:



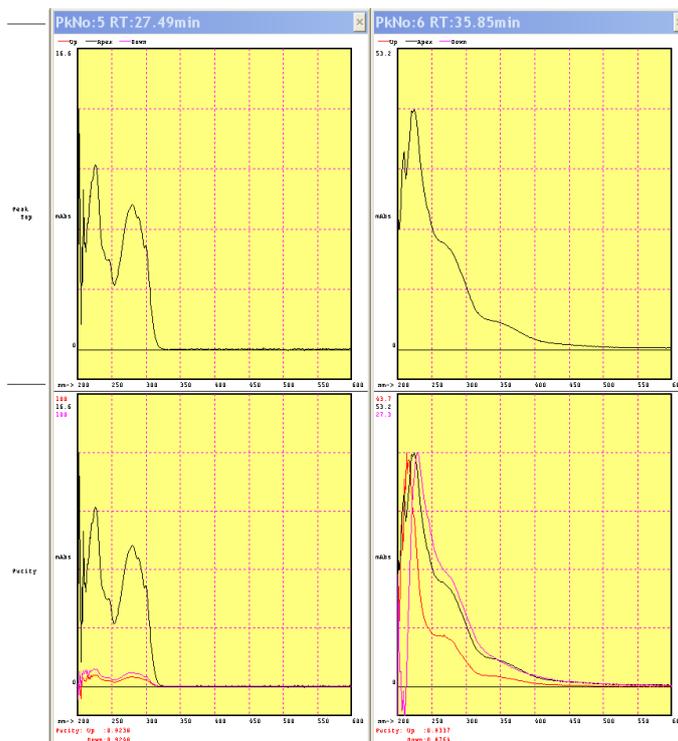
Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm (continua):



ANEXO 6 – Cromatogramas e espectros no UV-Vis obtidos por CLAE-DAD para os extratos mais ativos e o extrato IC-15. (conclusão)

Amostra:	IC-15	Descrição:	<i>E. giganteum</i> (extrato caules)	% Inibição da tirosinase:	19%*
----------	-------	------------	--------------------------------------	---------------------------	------

Espectros UV-Vis das substâncias relativas aos picos do cromatograma em 280 nm (conclusão):

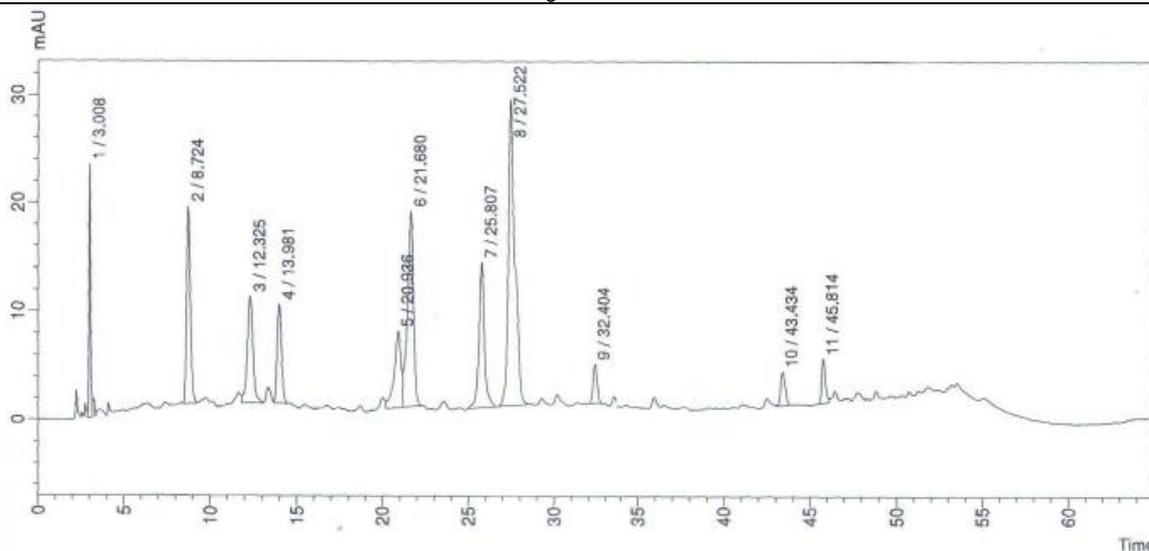


**Observação:**

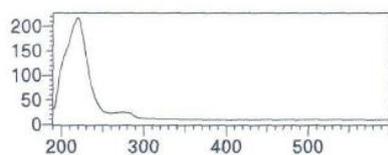
\* A amostra / extrato IC-15 apresentou uma ação anti-tirosinásica pequena. Apesar disso, seus cromatogramas e espectros UV-Vis foram gerados em HPLC-DAD pelo fato de seus cromatogramas gerados no sistema de HPLC-UV-Vis (convencional) terem apresentado uma das melhores resoluções de picos em relação às demais amostras.

ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continua)

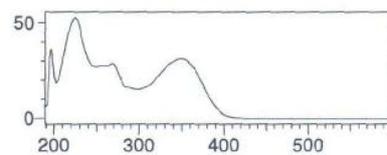
IC-03 – *B. gaudichaudii* folhas



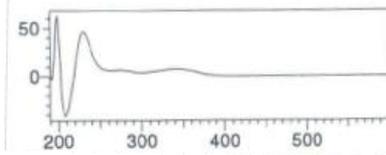
Peak# : 1  
Retention Time : 3.008



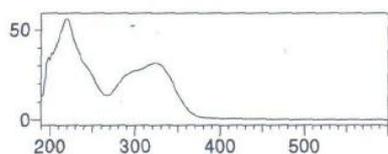
Peak# : 6  
Retention Time : 21.680



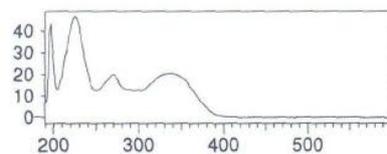
Peak# : 11  
Retention Time : 45.814



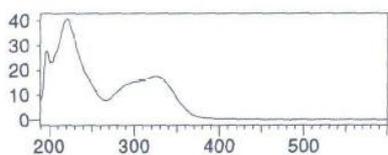
Peak# : 2  
Retention Time : 8.724



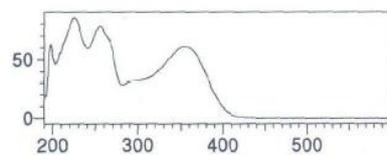
Peak# : 7  
Retention Time : 25.807



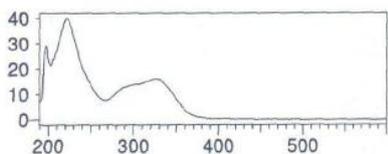
Peak# : 3  
Retention Time : 12.325



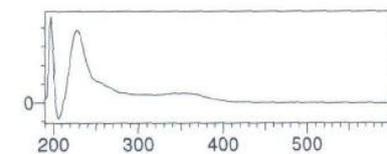
Peak# : 8  
Retention Time : 27.522



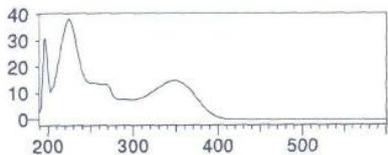
Peak# : 4  
Retention Time : 13.981



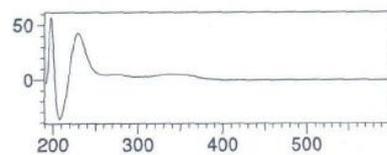
Peak# : 9  
Retention Time : 32.404



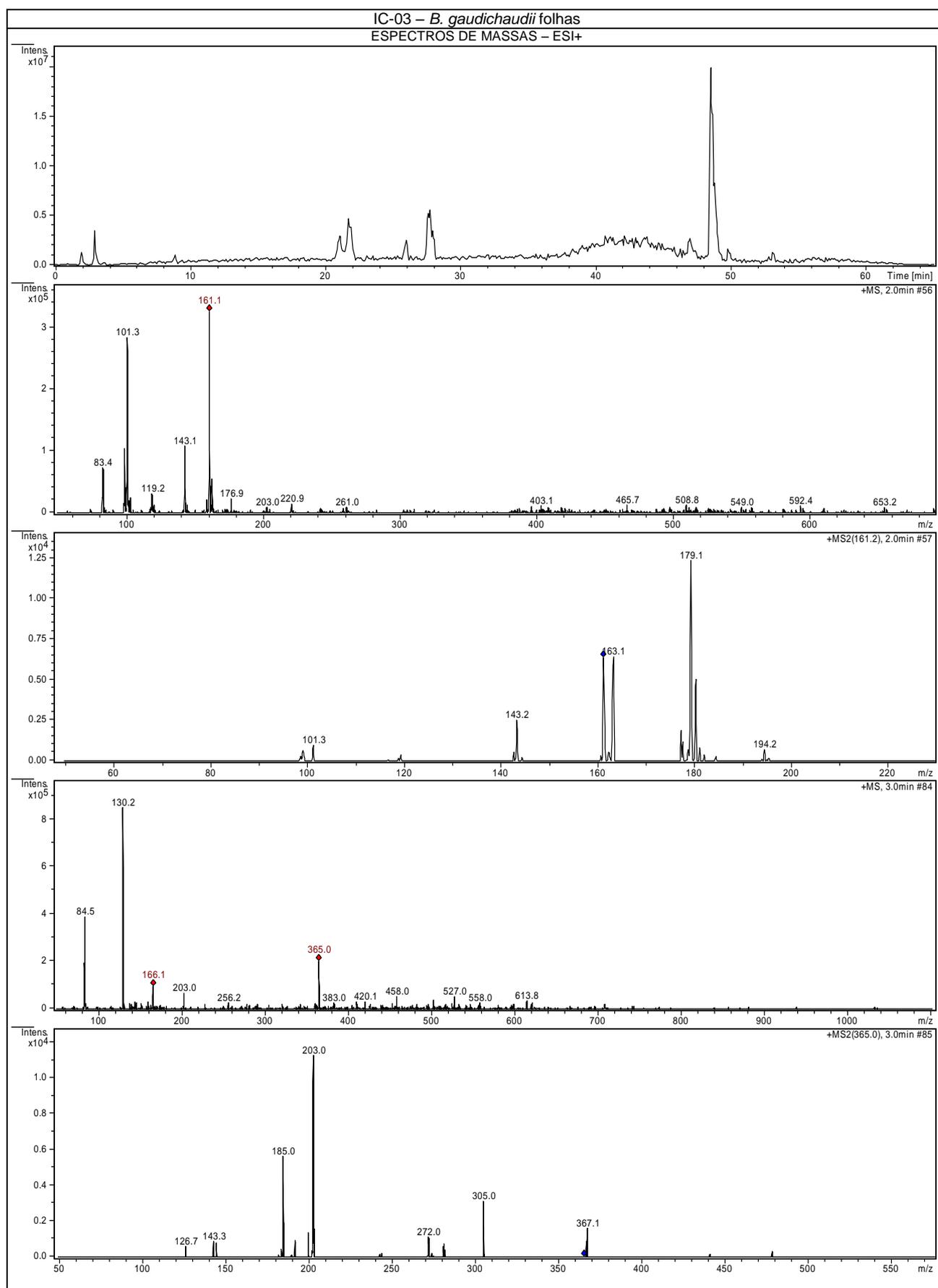
Peak# : 5  
Retention Time : 20.936



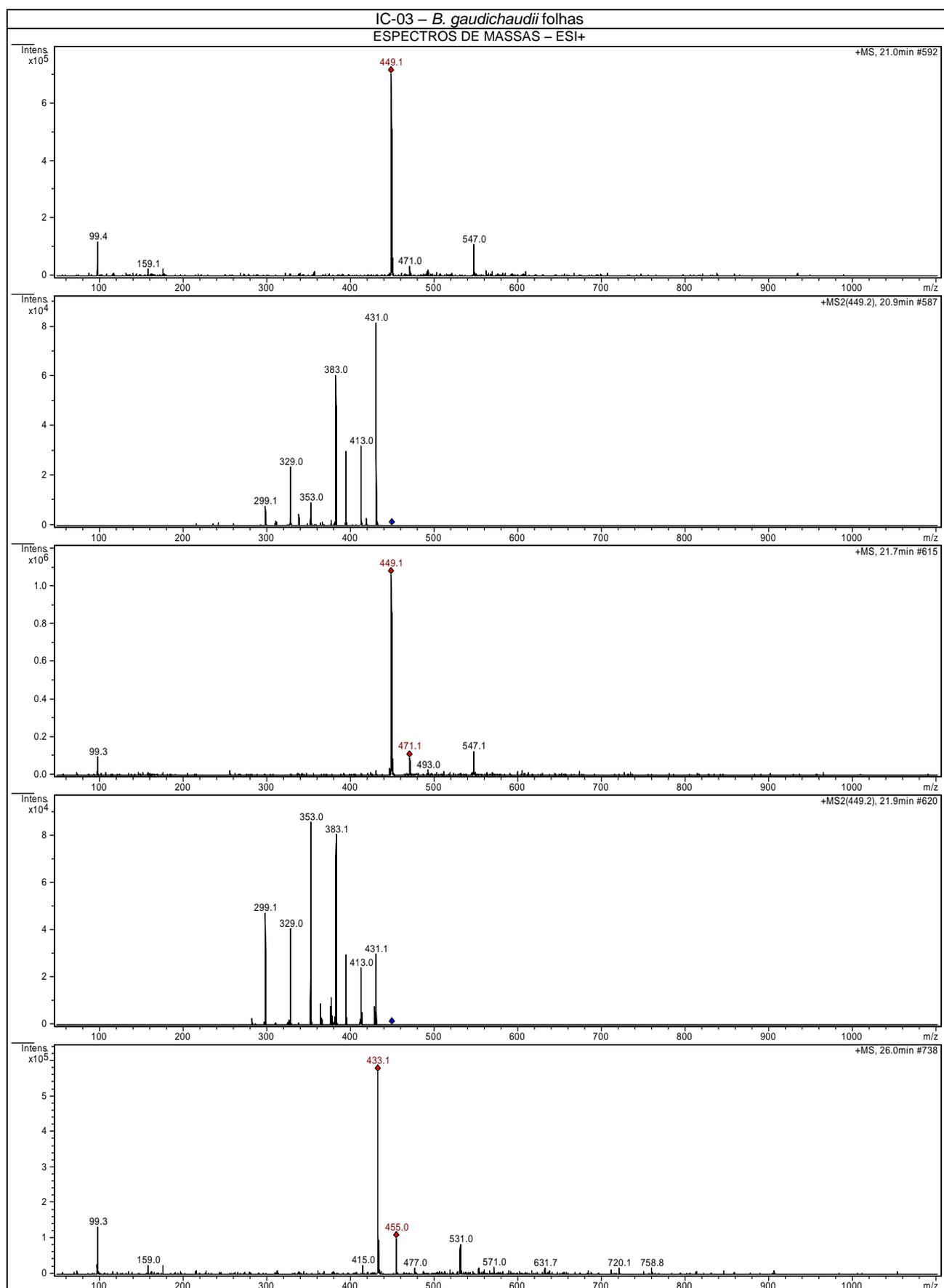
Peak# : 10  
Retention Time : 43.434



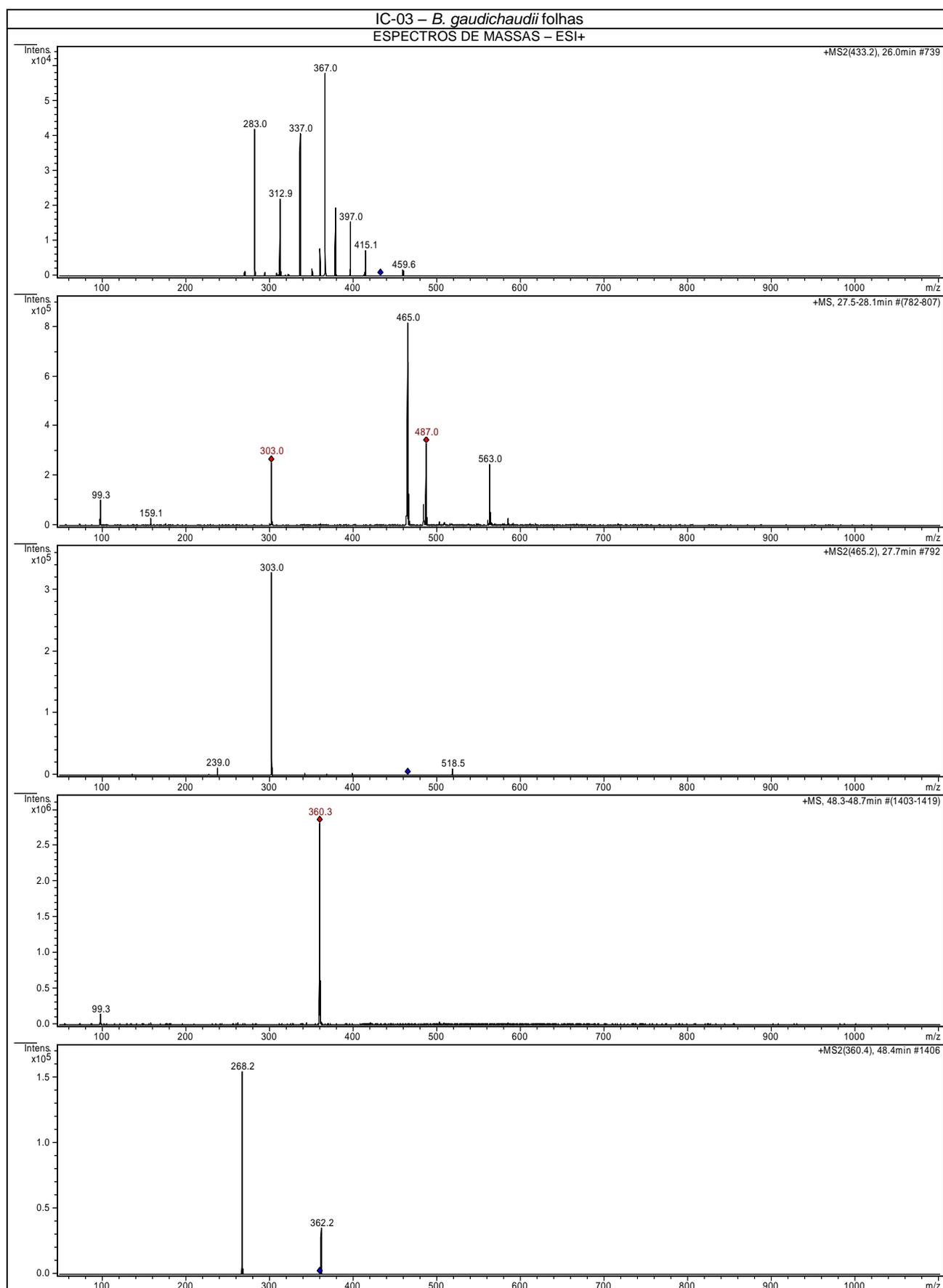
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



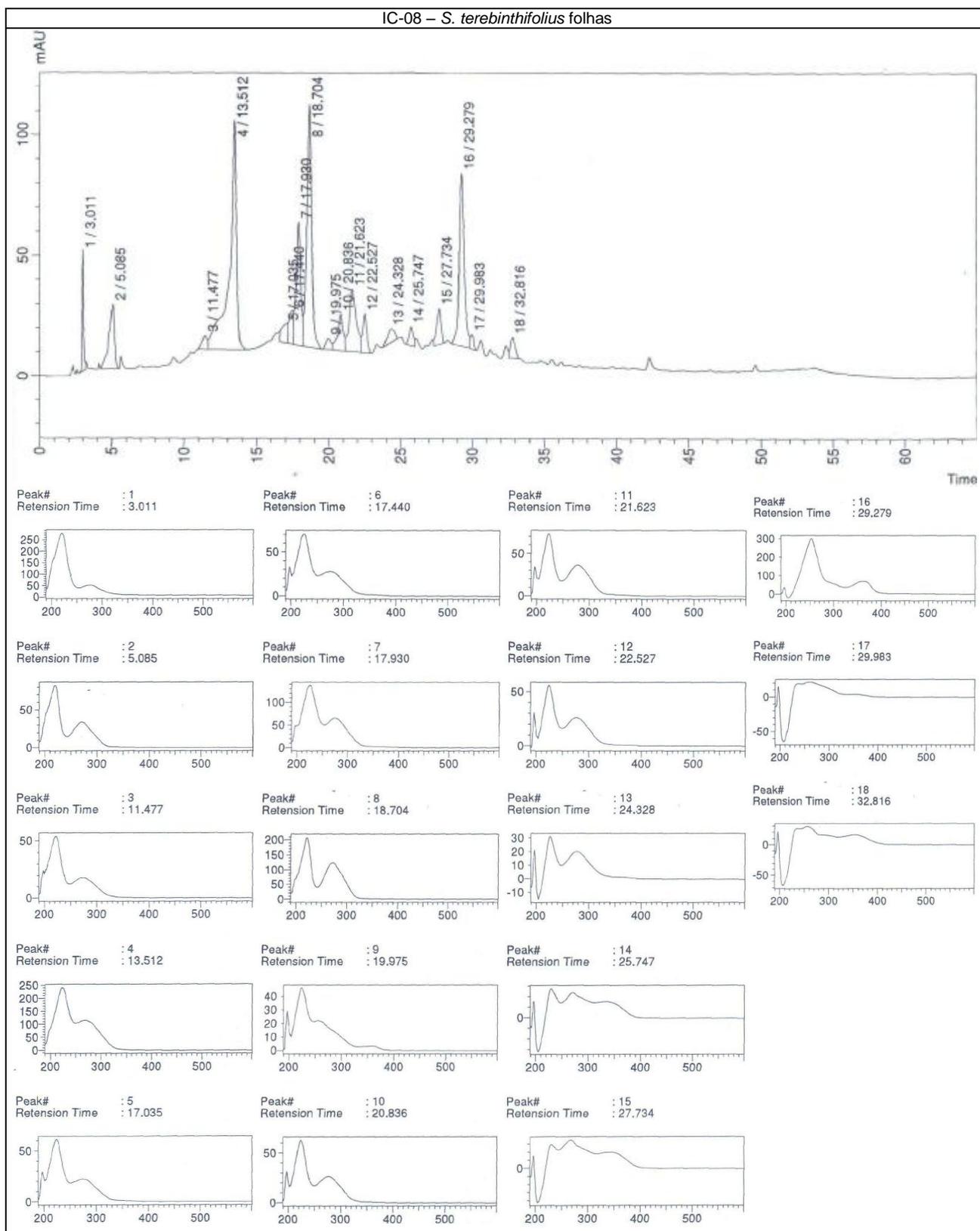
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



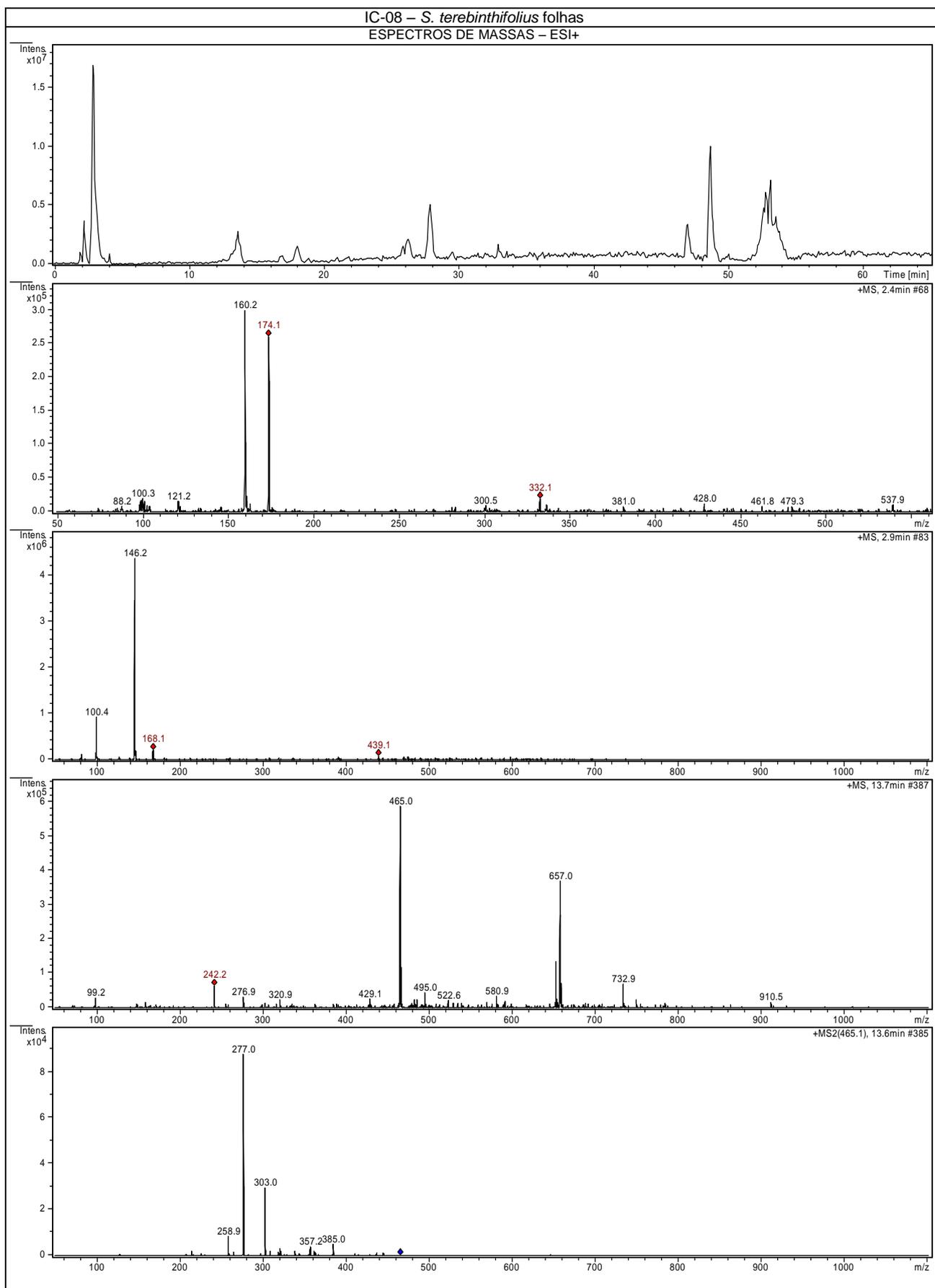
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



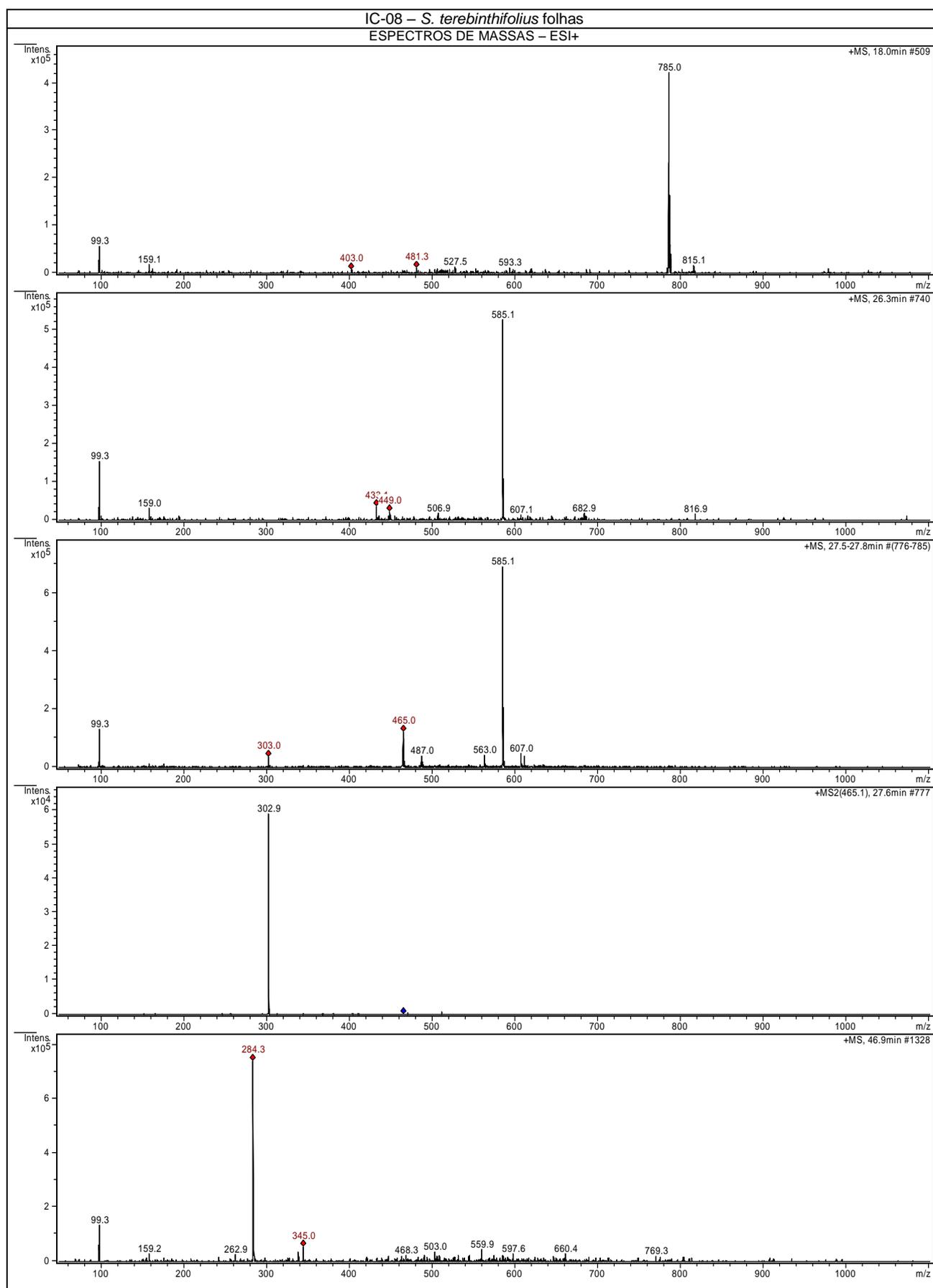
ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



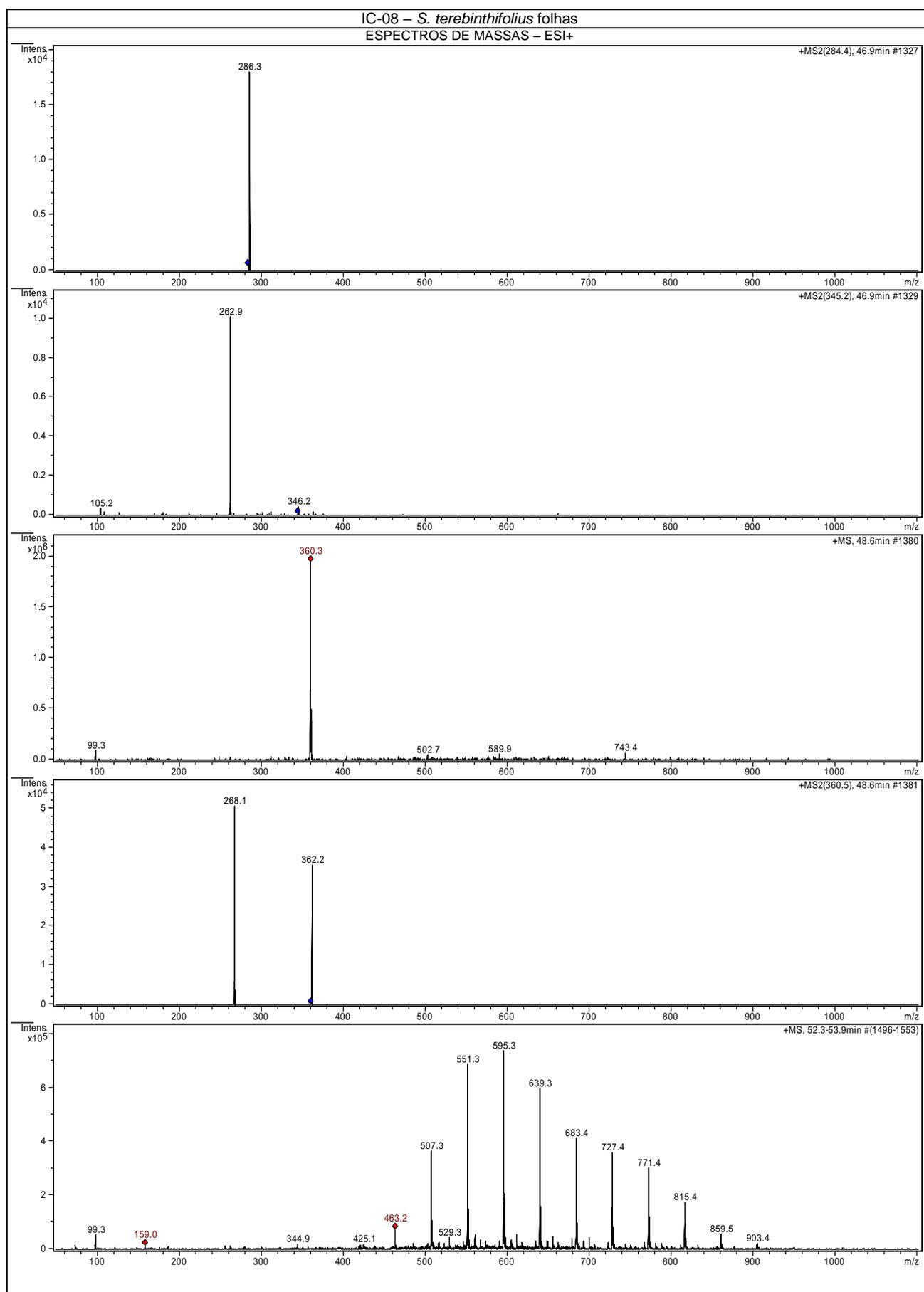
ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



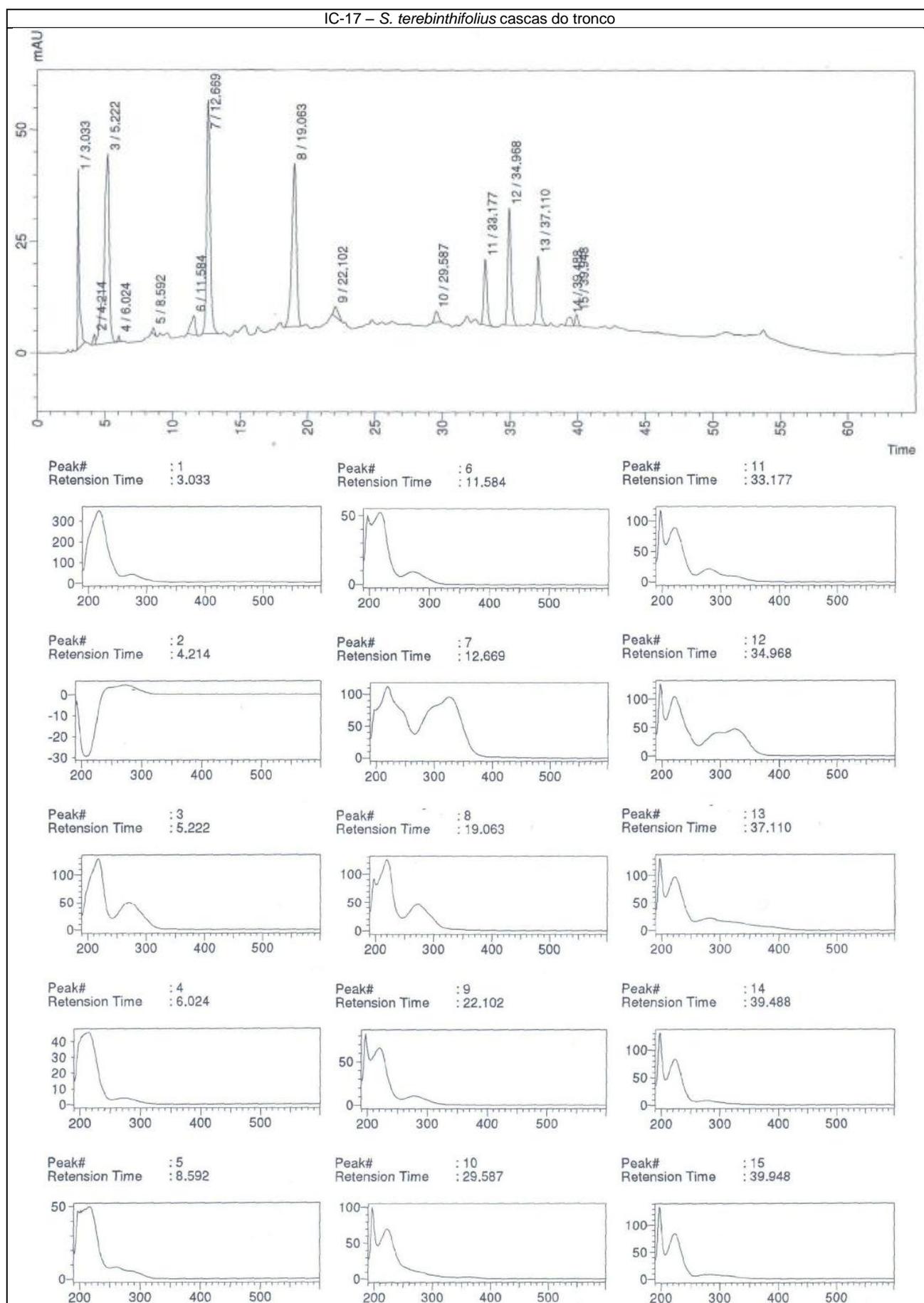
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



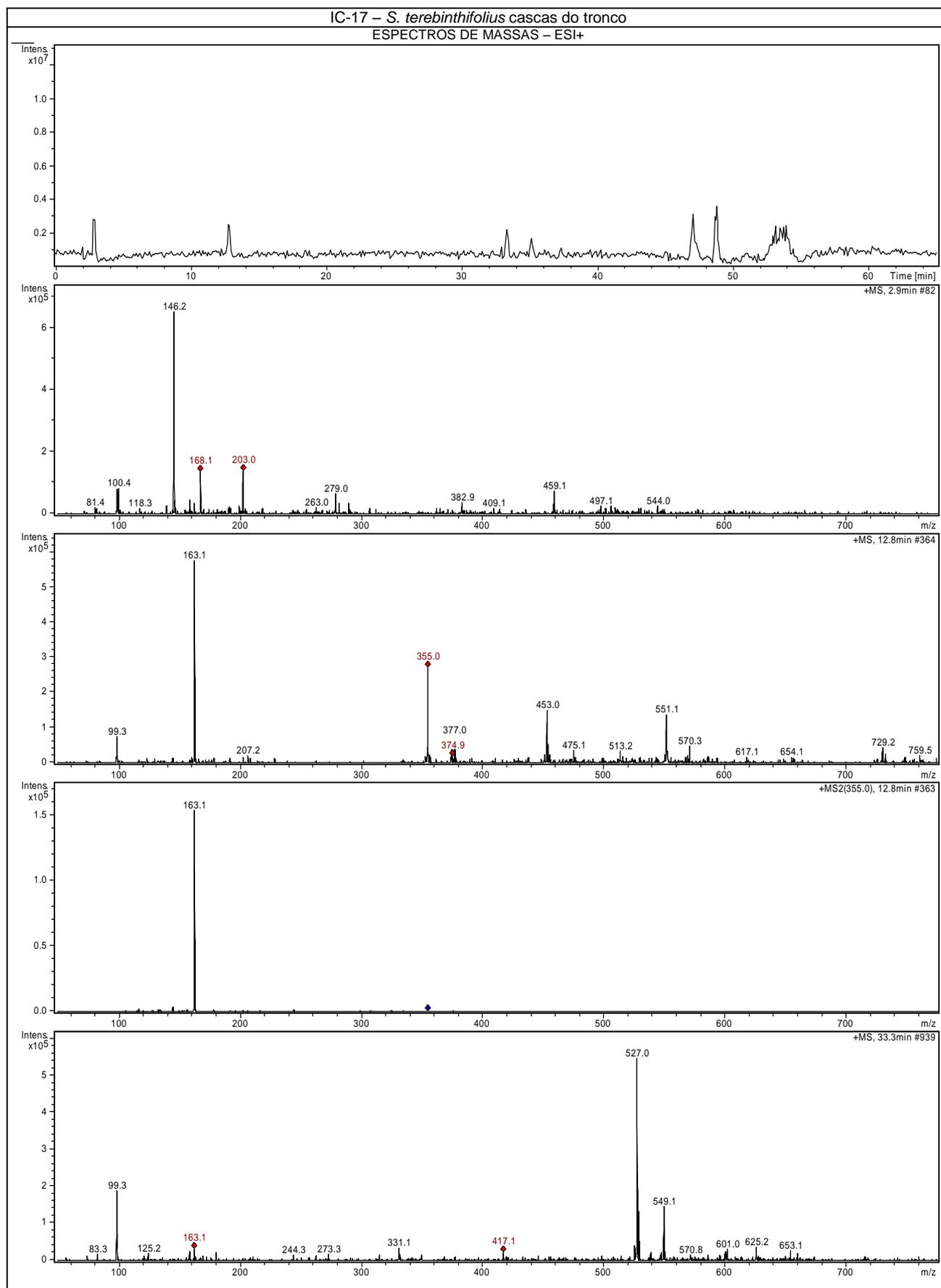
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



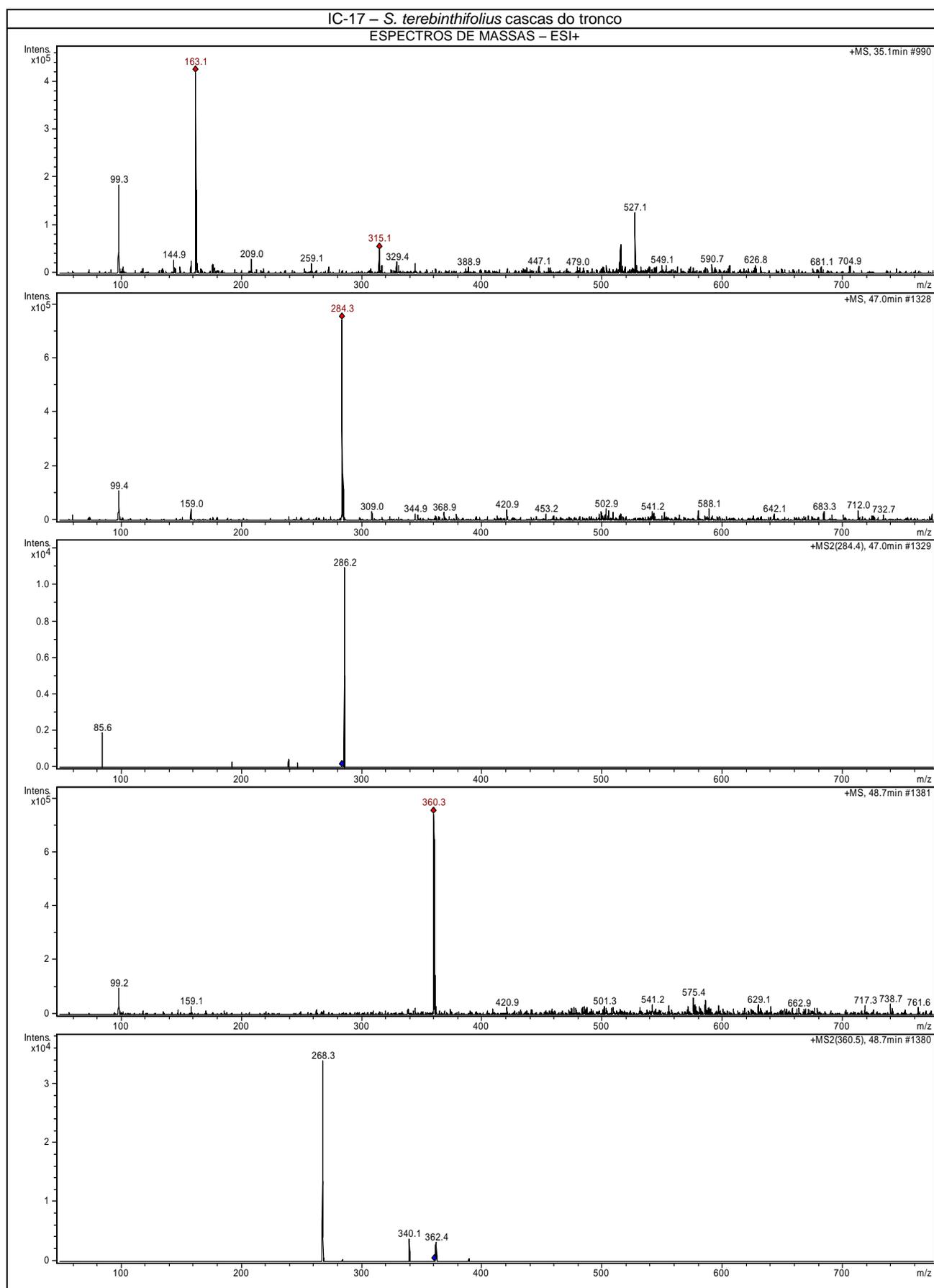
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



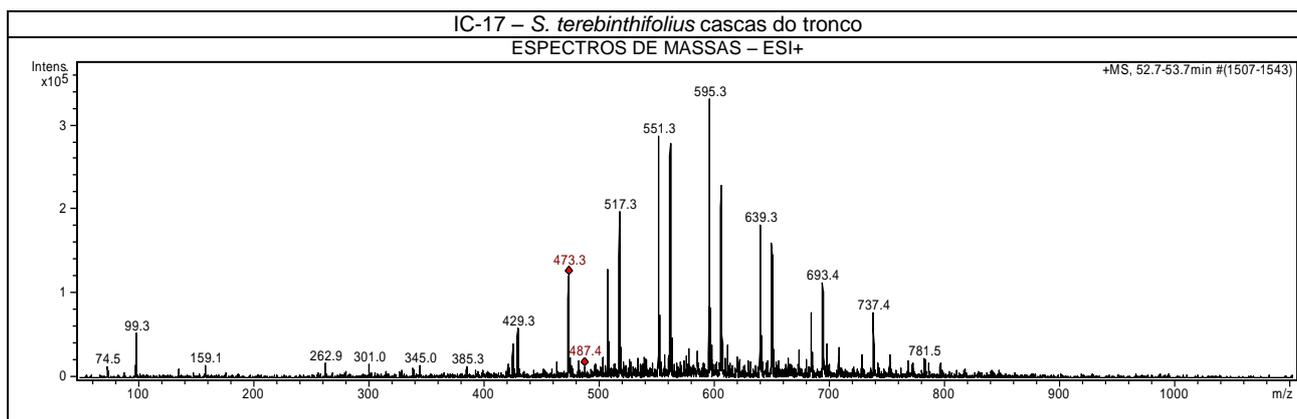
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



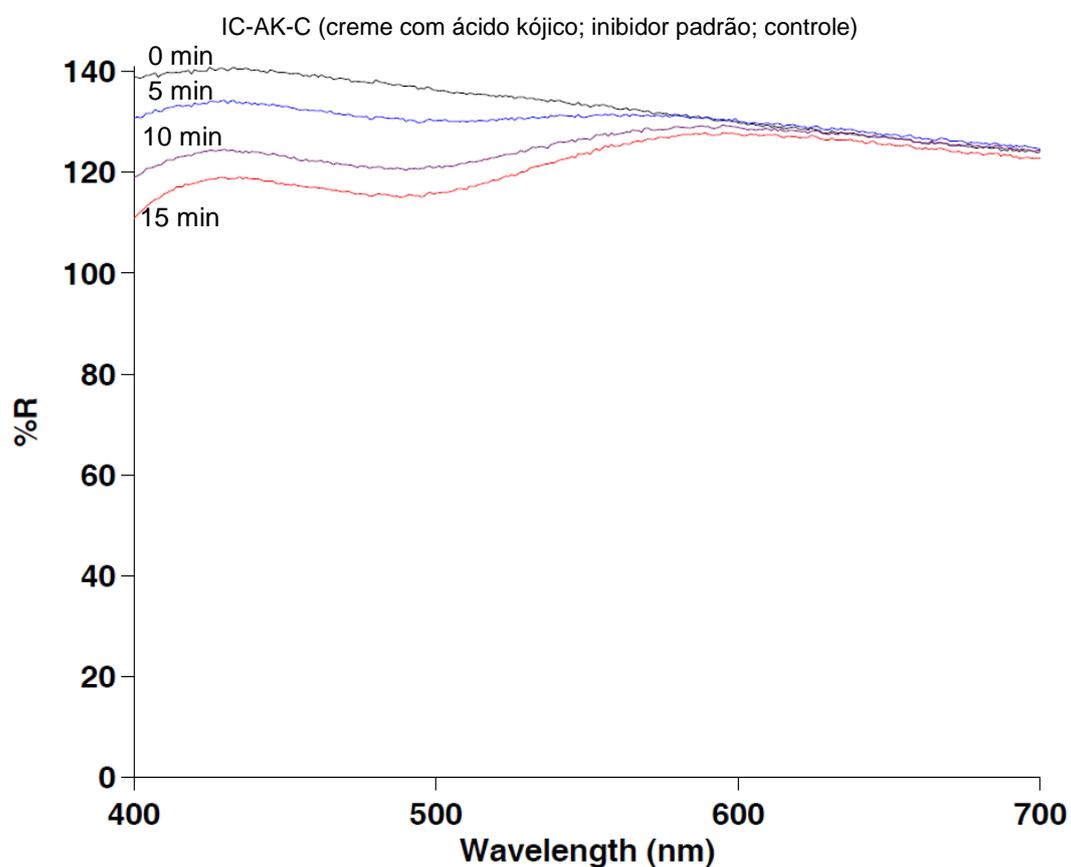
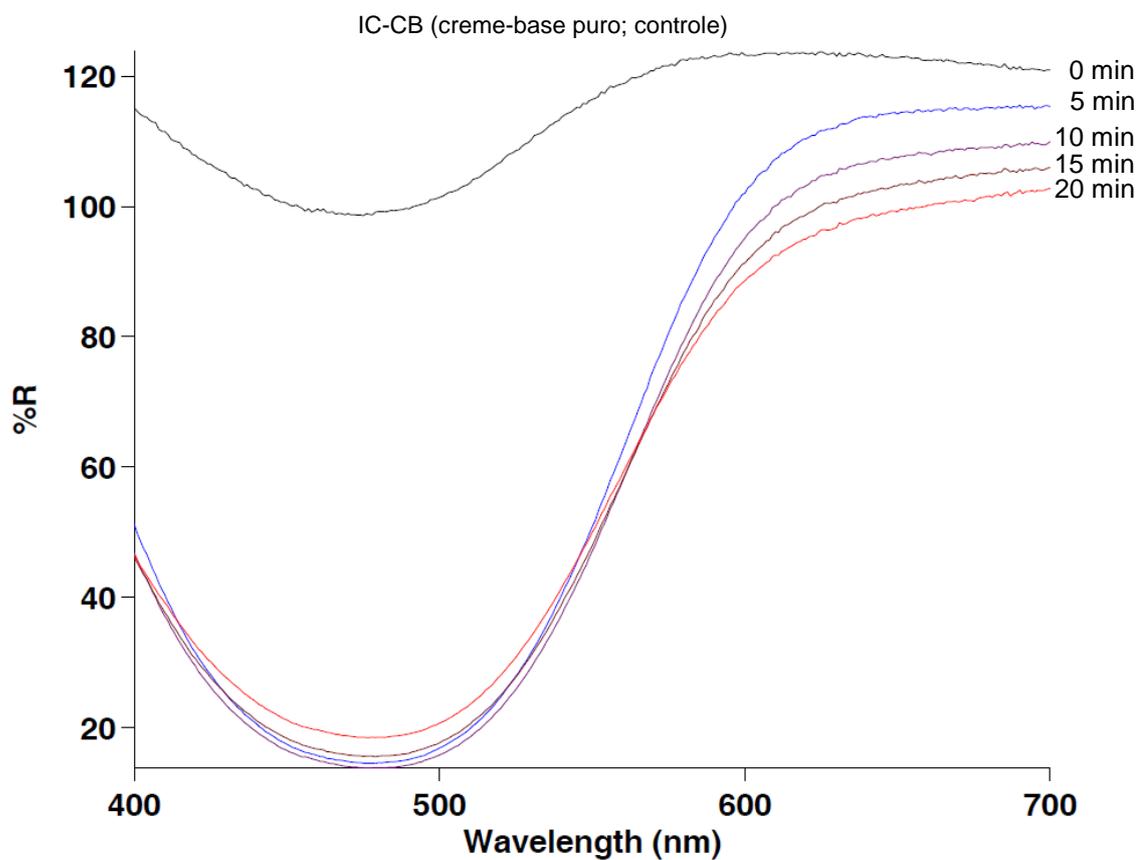
## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (continuação)



## ANEXO 7 – Cromatogramas e espectros, obtidos por CLAE-EM, dos extratos mais ativos. (conclusão)

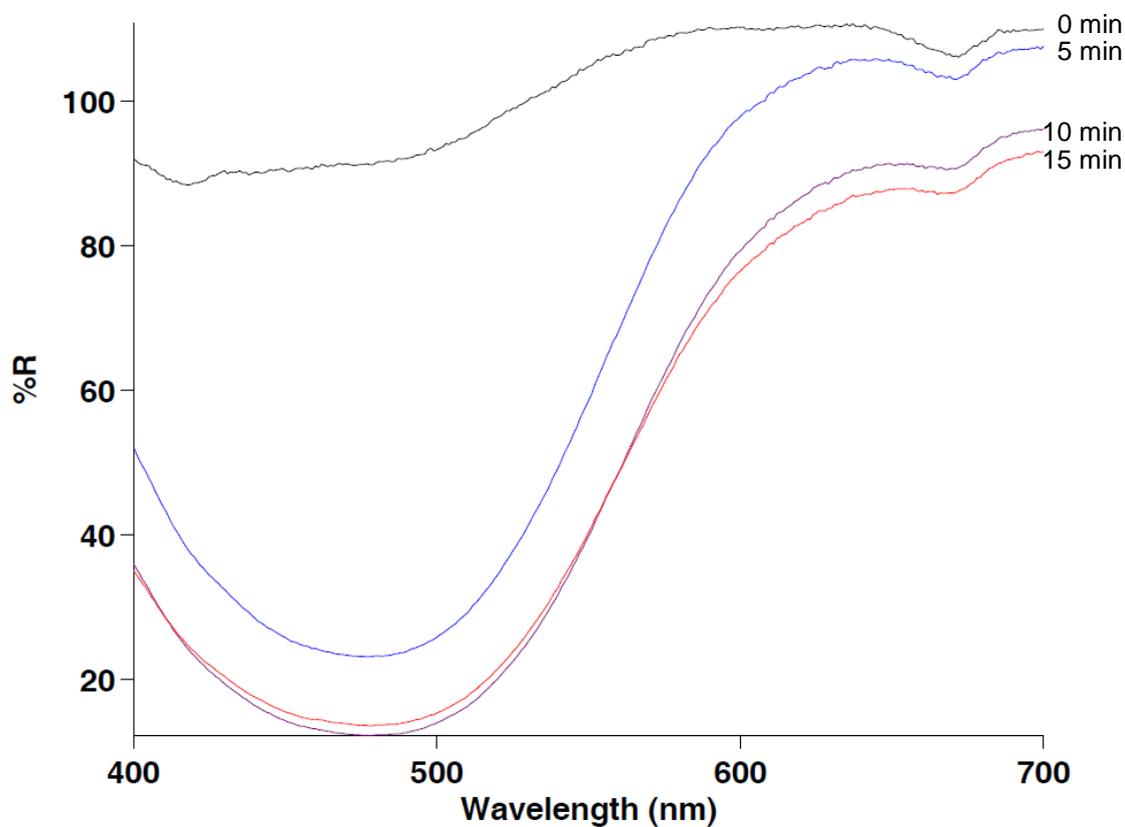


ANEXO 8 – Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase por espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa para os cremes. (continua)

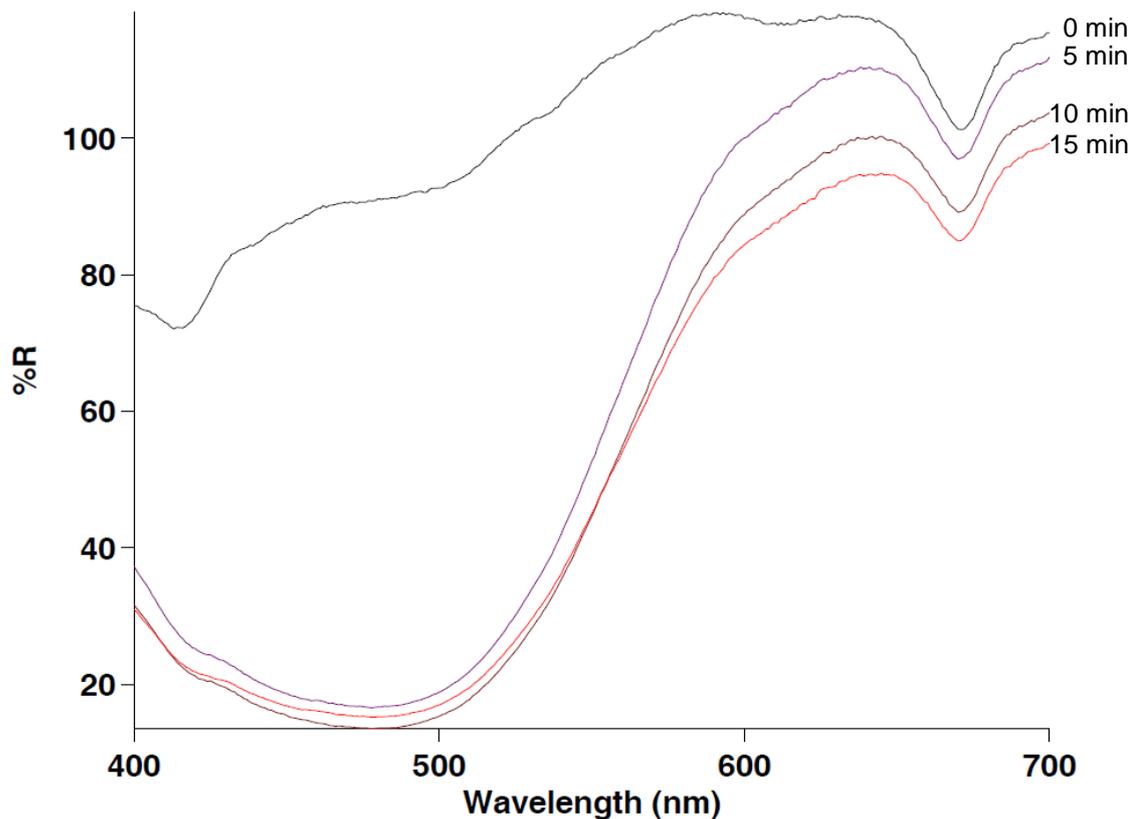


ANEXO 8 – Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase por espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa para os cremes. (continuação)

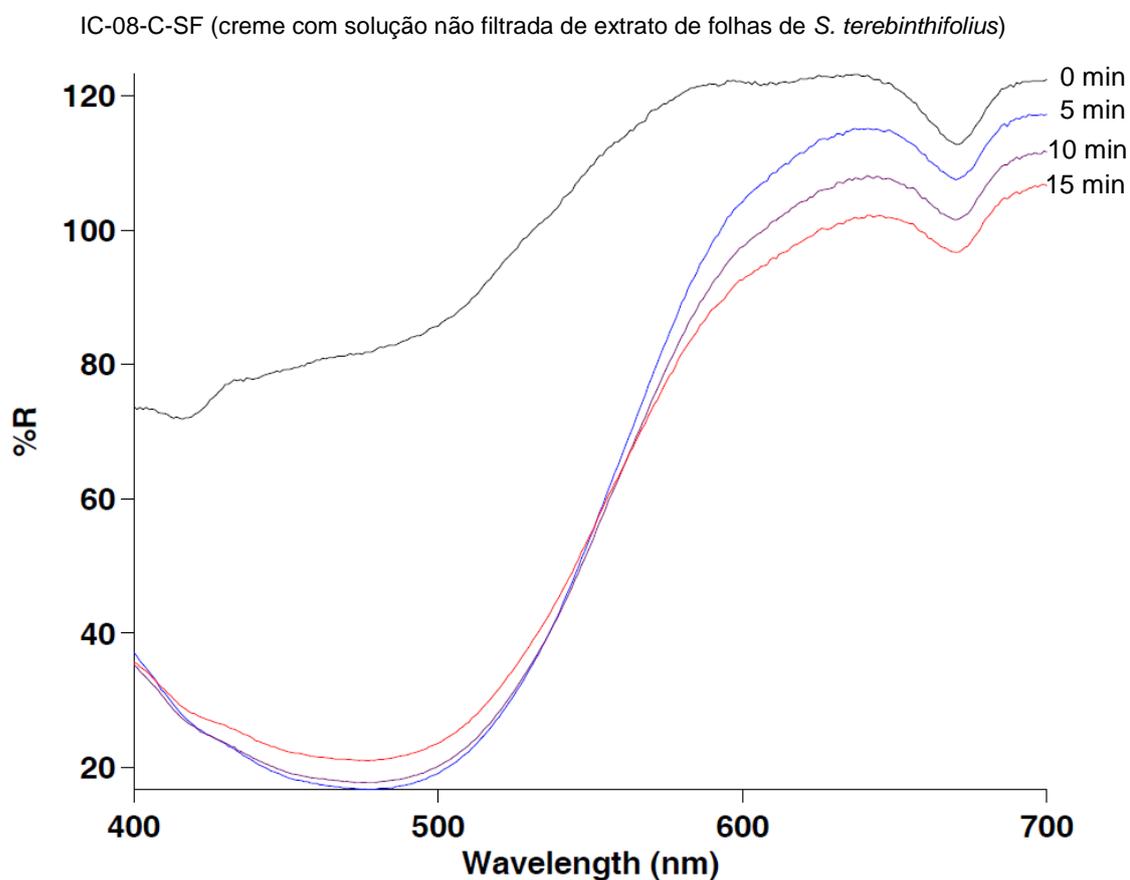
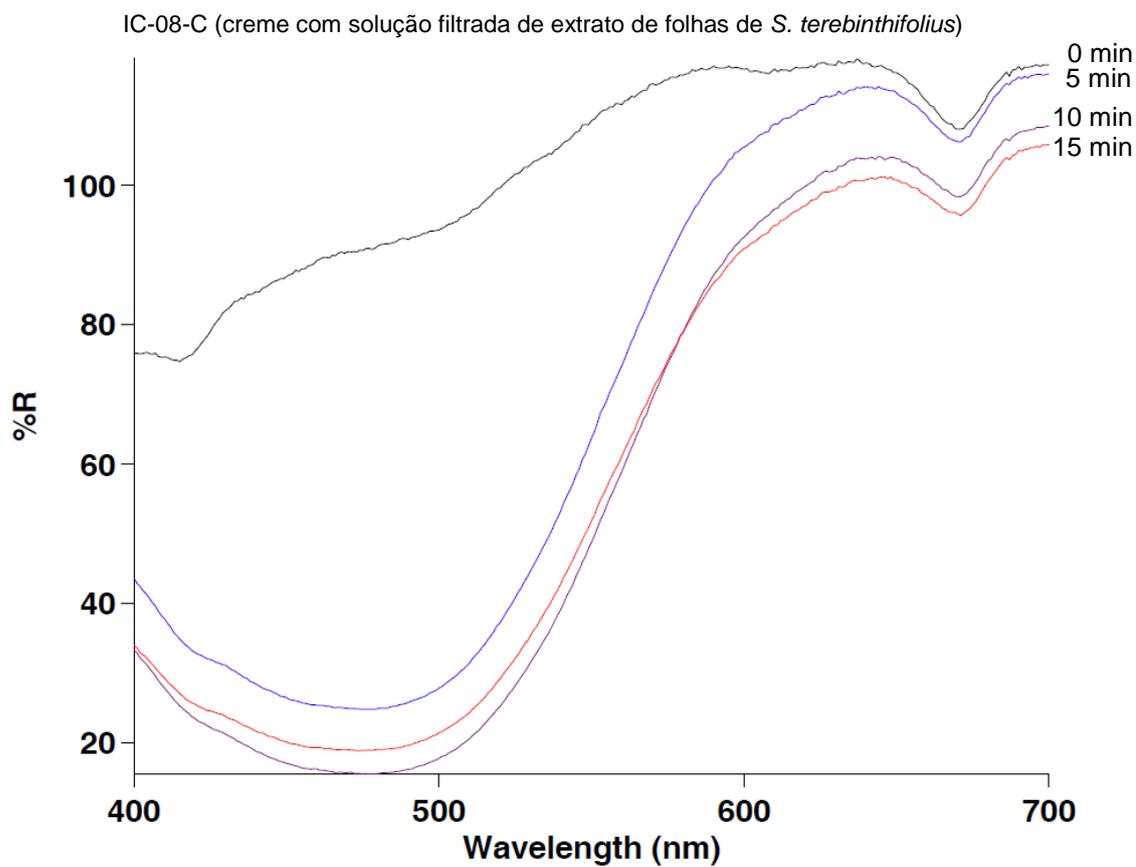
IC-03-C (creme com solução filtrada de extrato de folhas de *B. gaudichaudii*)



IC-03-C-SF (creme com solução não filtrada de extrato de folhas de *B. gaudichaudii*)

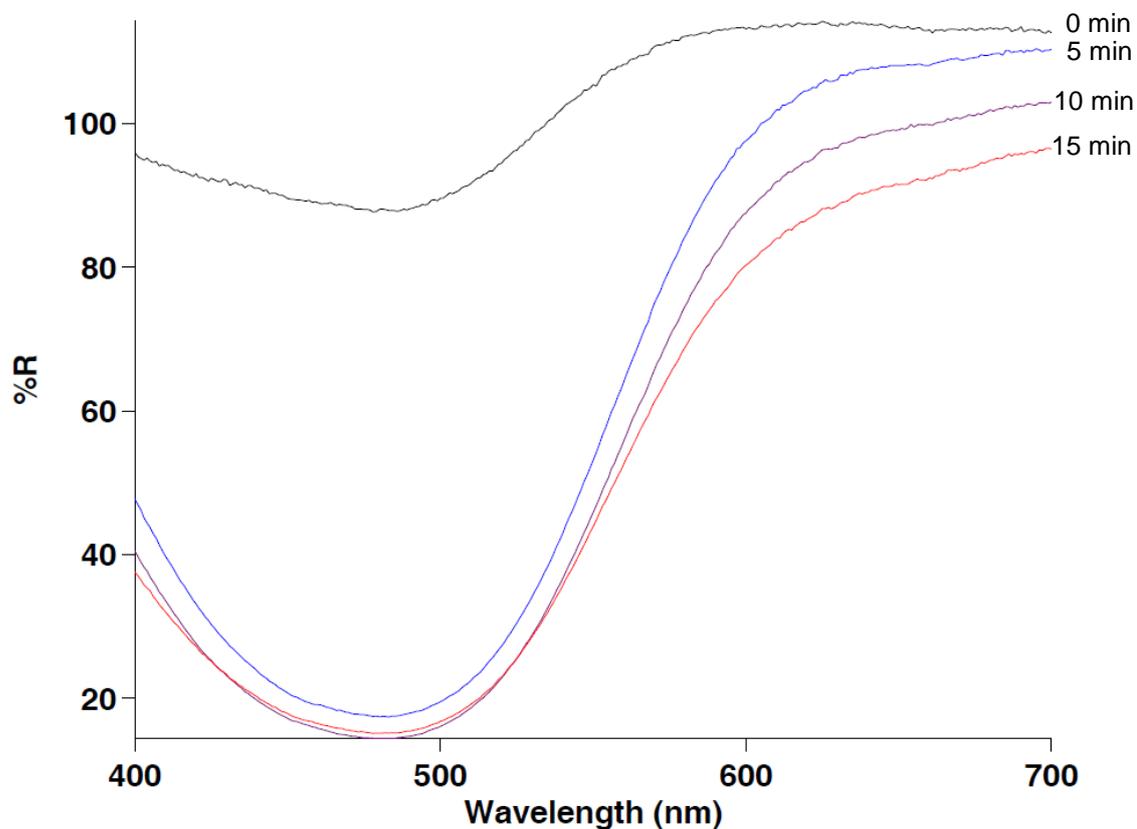


ANEXO 8 – Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase por espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa para os cremes. (continuação)



ANEXO 8 – Curvas de formação de dopacromo obtidas no teste de inibição da tirosinase por espectroscopia no UV-Vis com detecção por reflexão difusa para os cremes. (conclusão)

IC-17-C (creme com solução filtrada de extrato de cascas de tronco de *S. terebinthifolius*)



IC-17-C-SF (creme com solução não filtrada de extrato de cascas de tronco de *S. terebinthifolius*)

