



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

JÉSSICA RODRIGUES NOGUEIRA

ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aniba* DE INTERESSE COSMÉTICO

MANAUS
2015

JÉSSICA RODRIGUES NOGUEIRA

**ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aniba* DE INTERESSE COSMÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

**MANAUS
2015**

Ficha Catalográfica

N778e Nogueira, Jéssica Rodrigues
Estudo de atividades biológicas de óleos essenciais e extratos de espécies do gênero *Aniba* de interesse cosmético. / Jéssica Rodrigues Nogueira -- Manaus: Universidade do Estado do Amazonas, 2015.
82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado Amazonas - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, 2015.
Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque

1. Fotoenvelhecimento 2. Antioxidante 3.
Fitocosmético 4. Lauraceae I. Título.
CDU: 665.5

JÉSSICA RODRIGUES NOGUEIRA

**ESTUDO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS
DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Aniba* DE INTERESSE COSMÉTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas (UEA), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Recursos Naturais.

Data da aprovação ___/___/___

Banca Examinadora:

Patrícia Melchionna Albuquerque
Universidade do Estado do Amazonas

Cecilia Verônica Nunez
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia

Roberto Barbosa de Castilho
Universidade Federal do Amazonas

**MANAUS
2015**

Dedicado à maior incentivadora de meus sonhos: minha mãe Fátima.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela saúde, força e perseverança para ter chegado até aqui.

Agradeço à minha orientadora Dra. Patrícia Melchionna Albuquerque pelos muitos ensinamentos e confiança depositada em mim. Sua motivação foi imprescindível principalmente no final deste projeto.

Ao meu co-orientador Dr. Emerson Silva Lima, por me aceitar como sua orientanda, pela oportunidade de aprendizado e pela ajuda no decorrer de todo o processo.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da Universidade do Estado do Amazonas por toda a estrutura de apoio e laboratórios.

À Universidade Federal do Amazonas, em especial à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelos laboratórios cedidos para esta pesquisa.

À minha família, meus irmãos Rodrigo, Letícia e Matheus. Graça que é minha tia, mas é como se fosse uma segunda mãe pra mim. Meu pai Janivaldo que sempre teve maior orgulho de mim. Amo vocês infinitamente! Mas quero dedicar essa vitória à minha mãe que sempre fez de tudo por mim. Obrigada por você existir!!

Aos parceiros do laboratório Biophar na Ufam: Ana Paula, Márcia de Jesus, Josélia, Patrícia, Michele, Leonard, Carla, Rosilene, Rodrigo, Lucileno e aos Pibic's: Anderson, Caio e Bárbara. Pessoas que me ajudaram (muito!) inúmeras vezes e das mais variadas formas. Meu sincero muito obrigada!

Meu agradecimento especial às colegas Tatiana Pedrosa que está tá comigo desde o Pibic e que mesmo de longe me ajudou demais! Obrigada por ser essa pessoa que posso contar. Priscila Tobias, por ficar comigo por horas sem fim no laboratório mesmo em pleno sábado à noite. À querida colega que virou amiga, Luana, que foi uma parceirona e me ajudou desde o comecinho do mestrado. Meu mais sincero muito obrigada pela ajuda que você me deu.

Agradeço ao meu amor, Daniel, que sempre acreditou em mim e me incentivou demais. Meus amigos que me apoiaram indiretamente na jornada, me trazendo alegria nos momentos difíceis e apoio. Meus BFF Dorothy e Tácius e as Alaidetes (Lorena, Sabrina, Márcia, Raquel, Maura e Rosane). E aos queridíssimos colegas da Novamed que me apoiaram no finzinho dessa jornada, meu total agradecimento!

Os que esperam no Senhor renovam as suas forças.
Voam bem alto como águias. Correm e não ficam exaustos, andam e não se cansam.

Isaias 40:31

RESUMO

A pele é um epitélio de revestimento dividido em epiderme, derme e tecido subcutâneo, cujas principais funções são a proteção e a termo-regulação. Na epiderme, o principal tipo celular é o queratinócito. Outro tipo celular encontrado é o melanócito, responsável pela pigmentação. A exposição solar contínua ocasiona produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e estimula os melanócitos a produzir mais pigmento. Como consequência, pode ocasionar manchas e fotoenvelhecimento na pele. Busca-se, portanto, por compostos que possam combater o envelhecimento da pele, em especial por substâncias naturais. Dentre as inúmeras espécies da flora amazônica, a família Lauraceae tem se destacado por possuir espécies aromáticas, especialmente as do gênero *Aniba*. A *Aniba rosaeodora*, pau-rosa, é a espécie do gênero mais conhecida pela produção de um óleo essencial muito cobiçado pelas indústrias de perfumaria, porém, outras espécies do mesmo gênero são pouco conhecidas, como a *Aniba parviflora* (macacaporanga) e a *Aniba canelilla* (casca preciosa), e consequentemente, pouco se sabe sobre a atividade biológica e o potencial dessas espécies para a indústria cosmética. Nesse estudo foram avaliadas as atividades de inibição da melanogênese de óleos essenciais de *A. rosaeodora*, *A. canelilla* e *A. parviflora*, e antioxidante de extratos e frações de *A. parviflora*. Os óleos essenciais de folhas e galhos foram obtidos por hidrodestilação. Os extratos foram obtidos por maceração em etanol e submetidos a partição com diferentes solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólico). Para avaliar a inibição da melanogênese foram realizados os testes de inibição da tirosinase *in vitro* e em células utilizando melanoma murino, além da dosagem da melanina, citotoxicidade e identificação química por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM). Para avaliar a atividade antioxidante foram realizados os testes da captura do radical DPPH e ABTS, dosagem de fenóis e flavonoides, como testes de triagem para o ensaio de redução da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos, pelo método da diclorofluoroceína. O óleo das folhas de *A. canelilla* demonstrou redução do teor de melanina em comparação ao controle com estimulação da melanogênese, além de inibição da tirosinase em testes em melanoma murino, e não apresentou citotoxicidade na maior concentração estudada (100 µg/mL). Pela análise por CG-EM, vinte e dois constituintes do óleo essencial foram identificados, dos quais o 1-nitro-2-feniletano é o majoritário, constituindo 87% do óleo. As fases hidroetanólicas e acetato de etila de folhas e galhos de *A. parviflora* se destacaram pela intensa atividade antioxidante por meio da inibição da oxidação do DPPH e do ABTS em baixas concentrações, apresentando significativa quantidade de fenóis e flavonoides. O método da diclorofluoroceína confirmou a atividade antioxidante pela redução de EROs até na concentração mais baixa do estudo 6,25 µg/mL sem apresentar citotoxicidade em queratinócitos nas mesmas concentrações. Diante dos resultados obtidos, esse estudo comprova que essas espécies amazônicas possuem potencial para serem exploradas pela indústria cosmeceútica.

Palavras-chave: fotoenvelhecimento, antioxidante, fitocosmético, Lauraceae.

ABSTRACT

The skin is a lining epithelium divided into epidermis, dermis and subcutaneous tissue, whose main functions are the protection and thermal control. In the epidermis the main cell type is the keratinocyte. Another cell type found is the melanocyte, responsible for pigmentation. Continuous sun exposure causes production of reactive oxygen species (ROS) and stimulates the melanocytes to produce more pigment. As a result, it may cause stains on the skin and photoaging. Therefore, there is a need for searching compounds that can combat skin aging, particularly from natural substances. Among the many species from the Amazonian flora, Lauraceae family has stood out for having aromatic species, especially those of the genus *Aniba*. The *Aniba rosaeodora*, rosewood, is the best known species of the genus due to the production of an essential oil widely used in the perfume industry, but other species of the same genus are little known, like *Aniba parviflora* (macacaporanga) and *Aniba canelilla* (preciosa), and consequently, little is known about the biological activity and the potential of these species for the cosmetic industry. In this study the inhibiting melanogenesis activity of essential oils from *A. rosaeodora*, *A. canelilla* and *A. parviflora* was assessed, as well as the antioxidant activity of *A. parviflora* extracts and its partitions. The essential oils of leaves and stems were obtained by hydrodistillation. The extracts were macerated in ethanol and fractionated with different solvents (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and hydroalcoholic). To evaluate the inhibition of melanogenesis in vitro, tyrosinase inhibition tests using cells and murine melanoma, and dosage of melanin was performed. Cytotoxicity was also evaluated, as well as chemical identification, by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS). To evaluate the antioxidant activity, the radical capture tests with DPPH and ABTS, along with phenols and flavonoids quantification were performed as screening tests for evaluating the production of reactive oxygen species in macrophages, by the method of dichlorofluorescein. The oil from leaves of *A. canelilla* demonstrated reduction of melanin content in comparison to the control with stimulation of melanogenesis. This oil also presented inhibition of tyrosinase on murine melanoma tests, and showed no cytotoxicity at the higher concentration studied (100 µg/mL). The analysis by GC-MS enabled the identification of twenty two essential oil constituents, and 1-nitro-2-phenylethane was the major compound, constituting 87% of the oil. The hydroethanolic and ethyl acetate partitions obtained from leaves and stems of *A. parviflora* showed intense antioxidant activity by inhibiting the oxidation of DPPH and ABTS at low concentrations, presenting significant amount of phenols and flavonoids. The method of dichlorofluorescein confirmed the antioxidant activity by the reduction of ROS even at the lowest study concentration of 6.25 µg/mL in keratinocytes, without presenting cytotoxicity at the same concentration. Based on these results, this study proves that these Amazonian species have the potential to be explored by the cosmeceutical industry, thus adding value to Amazon products for research, development and innovation.

Keywords: photo-aging, antioxidant, phyto-cosmetic, Lauraceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da pele humana.....	14
Figura 2 – Estruturas químicas da Eumelanina (A) e Feomelanina (B).....	16
Figura 3 – Melanogênese.....	17
Figura 4 – Álcool terpênico linalol.....	22
Figura 5 – Árvore de <i>Aniba parviflora</i>	23
Figura 6 – Plantio de <i>A. canelilla</i> na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	25
Figura 7 - 1-nitro-2-feniletano.....	25
Figura 8 - Metileugenol e eugenol.....	26
 Capítulo I	
Figura 1 – Curva de inibição da enzima tirosinase.....	37
Figura 2 - Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue no período de 72 horas.....	38
Figura 3 – Inibição da tirosinase em células da linhagem B16F10 (A) e dosagem do teor de melanina após exposição de 48 horas ao óleo (B).....	39
Figura 4 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de <i>Aniba canelilla</i>	41
 Capítulo II	
Figura 1 - Curva de inibição da oxidação dos radicais DPPH (A) e ABTS (B) pelo padrão ácido gálico.....	60
Figura 2 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH das fases dos extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i>	60
Figura 3 - Atividade antioxidante frente ao radical ABTS das fases dos extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i>	61
Figura 4 – Atividade antioxidante das fases dos extratos de <i>Aniba parviflora</i> pelo método da diclorofluoroceína.....	63
Figura 5 – Viabilidade celular de queratinócitos (HACAT) frente às fases de extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i>	64

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1 – Percentual inibitório de óleos essenciais de espécies do gênero <i>Aniba</i> sobre a enzima tirosinase.....	36
Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas de <i>Aniba canelilla</i>	40

Capítulo II

Tabela 1 - Atividade antioxidante de partições de extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i> frente aos radicais DPPH e ABTS.....	59
Tabela 2 -Resultados dos testes de triagem fitoquímica para as partições dos extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i> com atividade antioxidante.....	62
Tabela 3 - Conteúdos totais de compostos fenólicos e flavonoides das partições dos extratos de folhas e galhos de <i>Aniba parviflora</i>	62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1 PELE.....	15
2.2 MELANÓCITOS E A PRODUÇÃO DE MELANINA	16
2.4 PRODUTOS COSMÉTICOS E FITOCOSMÉTICOS	20
2.5 A FAMÍLIA LAURACEAE	22
2.5.1 O gênero <i>Aniba</i>	23
2.5.2 <i>Aniba parviflora</i> (Meisn) Mez.	24
2.5.3 <i>Aniba canelilla</i> (H.B.K.) Mez	25
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL.....	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
CAPÍTULO I.....	29
CAPÍTULO II.....	50
4 CONCLUSÃO GERAL	72
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	83

1. INTRODUÇÃO

A pele é um órgão complexo cuja função é proteção ao meio externo contra substâncias químicas, radiação ultravioleta, micro-organismos nocivos e trauma mecânico. Além disso, previne a perda de água e eletrólitos e trabalha na regulação da temperatura corporal (HWA, BAUER e COHEN, 2012). Ao longo da vida, sofre alterações no material genético que gera redução da elasticidade. Tal reação pode ser acelerada por oxidação mediada pelos radicais livres (HIRATA, 2004; GONCHOROSKI, 2005).

A ideia de discutir a qualidade estética da pele tornou-se amplamente aceita e praticada (NARDIN e GUTERRES, 1999). O envelhecimento da pele acaba exercendo impacto sobre a aparência, o que leva ao crescente interesse das pessoas em manter uma pele jovem, isenta de rugas e manchas, o que tem, conseqüentemente, estimulado os pesquisadores da área cosmética na busca pelo conhecimento dos mecanismos responsáveis, bem como as principais alterações morfo-histológicas causadas durante o processo de envelhecimento cutâneo (RITTIÉ e FISHER, 2002; BATISTELA, CHORILLI e LEONARDI, 2007). Essa busca tem sido baseada principalmente em produtos naturais (NEMA et al., 2011).

O estresse oxidativo, ou seja, quando ocorre um desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, tem sido associado com o processo de dano da pele induzido por exposição à radiação UV, fotoenvelhecimento, além da indução da melanogênese que pode levar ao desenvolvimento de hiperpigmentação (BURTON e JAUNIAUX, 2010; PANICH, 2011).

Plantas aromáticas e seus óleos essenciais são utilizados há milhares de anos tanto na área medicinal quanto cosmética e na fabricação de perfumes e incensos. Tendo em vista que os óleos essenciais são lipossolúveis, eles são considerados o ingrediente ideal para produtos cosméticos (LAWLESS, 2013). A Amazônia possui uma vasta biodiversidade com grande fonte de plantas medicinais, fato este que não pode ser ignorado pelos pesquisadores (SOUSA et al., 2008).

Na região Amazônica há aproximadamente 350 espécies aromáticas que podem ter potencial para o uso industrial (MAIA e ANDRADE, 2009) e cosmético (KIM e UYAMA, 2005). Dentre tais espécies estão a *Aniba canelilla* e *Aniba parviflora*, pertencentes ao mesmo gênero do pau-rosa (*A. rosaeodora*), cujo óleo é muito cobiçado pela indústria de perfumaria. Entretanto, um levantamento recente mostra que ainda há pouco conhecimento sobre as atividades biológicas de extratos e óleos essenciais de tais espécies.

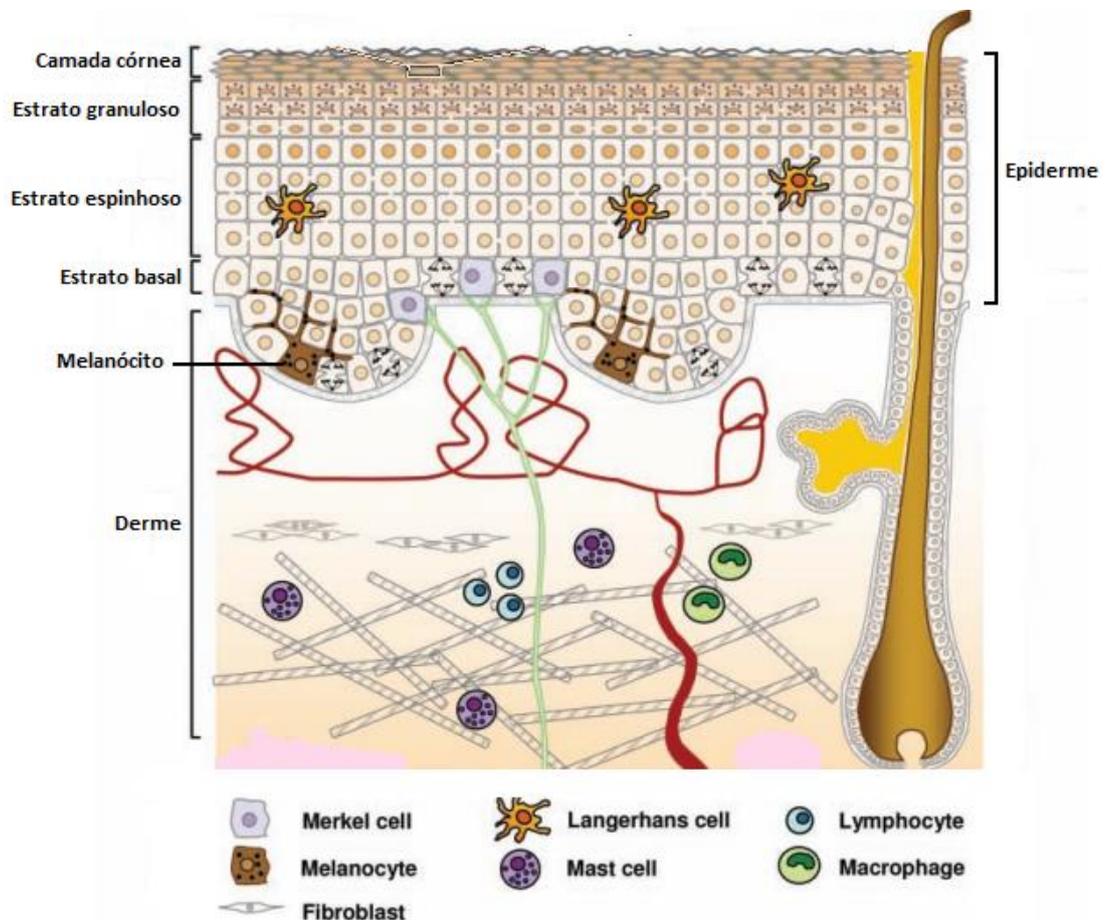
Nesse contexto, esse trabalho visa avaliar a atividade biológica de extratos e óleos de duas espécies do gênero *Aniba*, buscando assim o seu potencial como fitocosmético antienvhecimento, adicionando valor aos produtos amazônicos pela pesquisa, desenvolvimento e inovação.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 PELE

A pele é o maior órgão do corpo dos vertebrados e é composta principalmente de duas camadas: epiderme e derme (Figura 1). Estas camadas desempenham a função de proteção do organismo contra patógenos, traumas, perda de água excessiva, além de regular a temperatura corporal, sensação tátil e ser considerado um órgão imunologicamente ativo (METCALFE e FERGUSON, 2007; HWA, BAUER e COHEN, 2012).

Figura 1 – Estrutura da pele humana.



Fonte: Adaptado de Wolk, Witte e Sabat (2010).

A epiderme é a camada mais externa da pele formada de um epitélio estratificado auto-renovável. Na base desta há uma camada única de células ligada à membrana basal não celular que a separa da derme, denominada de estrato basal, constituída principalmente de queratinócitos e dois tipos de células derivadas da crista neural: células de Merkel (células

responsáveis pela transmissão da sensação tátil) e os melanócitos (TSURUTA et al., 2002; COSTIN e HEARING, 2007). Os queratinócitos estão constantemente em divisão migrando sempre para a região supra basal até que deixam de se dividir e alcançam a camada córnea ou estrato córneo, uma camada de células anucleadas chamadas de escamas que formam uma barreira insolúvel de proteção contra a perda de água pela derme formada de lipídios e proteínas (TSURUTA et al., 2002; QUINN, 2004).

Logo abaixo se encontra a derme, que consiste num tecido conectivo cuja espessura é superior a epiderme com função de suporte mecânico, elasticidade, maleabilidade, além de incluir os receptores de estímulo sensorial, vasos sanguíneos e linfáticos. Em conjunto com a epiderme interage na restauração e modelação da pele (HAAKE et al., 2000; SMITH, MALBACH e SUBER, 2000; BOWSTRA, 2003).

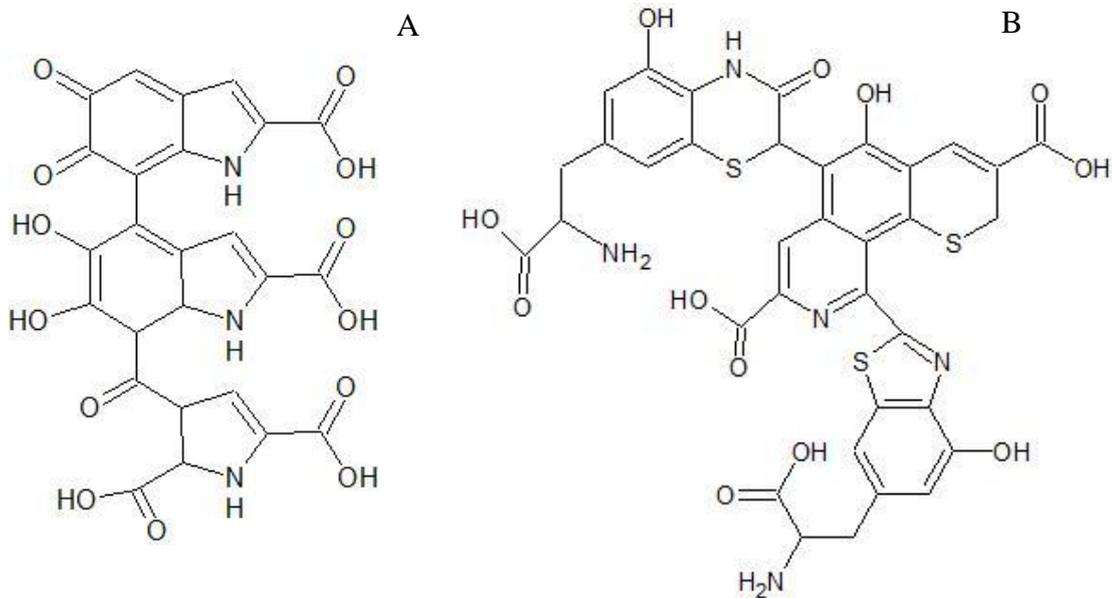
2.2 MELANÓCITOS E A PRODUÇÃO DE MELANINA

Os melanócitos são células que se encontram na camada basal da epiderme e produzem um pigmento chamado melanina dentro de estruturas denominadas melanossomas que são repassados aos queratinócitos. Tal processo é denominado melanogênese (QUINN, 2004). Eles são responsivos à radiação ultravioleta (UV), entretanto, a exposição excessiva a essa radiação pode ocasionar desordens pigmentares (PARK, et al., 2011). A melanina é um biopolímero complexo capaz de pigmentar a pele, olhos e cabelo cuja principal função é a proteção contra os danos da radiação UV. Ela protege por meio de suas propriedades ópticas e filtração química (VILLAREAL et al., 2010). Tanto a melanina natural quanto a sintética atuam como sequestradores de radicais livres por oxidação e redução de radicais e eliminam íons de metal, sendo considerado um poderoso antioxidante (RÓŻANOWSKA et al., 1999).

Os melanossomas são estruturas elípticas onde ocorrem reações de síntese de melanina. A tirosinase é a enzima chave na síntese dos dois tipos de melanina, a eumelanina com coloração preto-acastanhado e a feomelanina vermelho-amarelado (Figura 2). Essa enzima catalisa os dois passos iniciais na via de biossíntese, ou seja, a hidroxilação da tirosina em 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) (atividade monofenolase) e a oxidação de DOPA para DOPA-quinona (atividade difenolase). Esta DOPA-quinona pode então ser transformada em pigmentos de melanina através de uma série de reações enzimáticas e não-enzimáticas em duas vias separadas, levando à síntese da eumelanina ou feomelanina (Figura 3) (VILLAREAL et al., 2010; ZAIDI, et al., 2014). Após a produção da melanina, os

melanosomos são transferidos via dendritos aos queratinócitos circundantes. Estima-se que cada melanócito está em contato com 40 queratinócitos (COSTIN e HEARING, 2007).

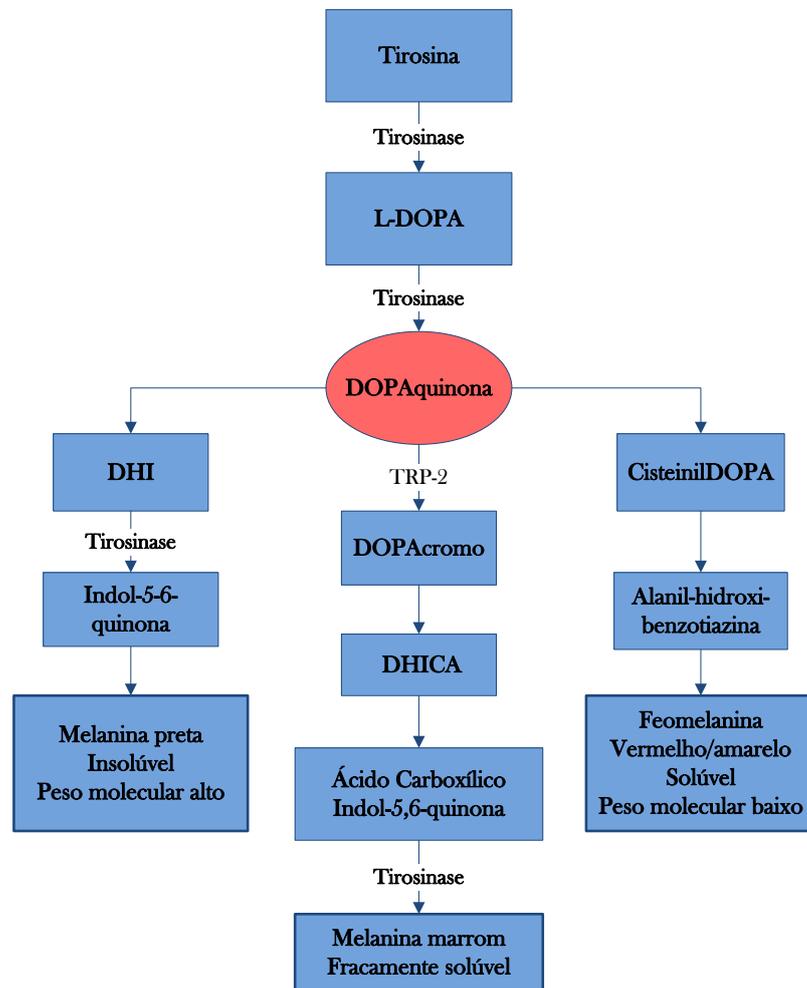
Figura 2 – Estruturas químicas da Eumelanina (A) e Feomelanina (B).



A tirosinase é uma metaloenzima que ocorre em diversos organismos, com grandes semelhanças estruturais. O sítio ativo da enzima apresenta dois átomos de cobre e cada um deles se encontra ligado a três resíduos de histidina. A tirosinase pode se apresentar em três diferentes estados (oxi-, met- ou deoxi-tirosinase). A forma oxigenada apresenta dois átomos de cobre tetragonais ligados fortemente na posição equatorial e fracamente na posição axial ao N do resíduo de histidina. O oxigênio exógeno se liga como peróxido aos átomos de cobre. A forma metirosinase apresenta dois cobres ligados entre si e a um hidróxido exógeno. A deoxitirosinase apresenta dois cobres ligados entre si sem ligação com hidroxila (CHANG, 2009; SIMON et al., 2009).

Inibidores da tirosinase têm sido utilizados para o tratamento de hiperpigmentação da pele. Um grande número de compostos de origem natural inibe a atividade fenolase e/ou difenolase da tirosinase como os polifenóis quercetina e glabridina. Derivados fúngicos como o ácido kójico e de origem sintética como a hidroquinona são extensamente utilizados na clínica como tratamento tópico para hiperpigmentação, no entanto, o uso desses compostos sintéticos frequentemente resulta em irritações na pele (KIM e UYAMA, 2005, MOMTAZ, et al., 2008).

Figura 3 – Melanogênese.



Fonte: Adaptado de Park, et al. (2008).

Melasma, sardas e manchas de idade são distúrbios de hiperpigmentação pela acumulação anormal ou excesso de produção de melanina (HUANG, et al., 2012). A hiperpigmentação pode ser concentrada em uma área ou de modo difuso. As que ficam em apenas uma área geralmente ocorrem após uma lesão, inflamação ou acne. Em outros casos, como no melasma, que consiste em manchas marrom-escuras, bem marginadas na face tem tendência de ocorrer em mulheres grávidas e em mulheres que tomam contraceptivos orais (VILLAREAL et al., 2010).

A tirosinase obtida a partir do cogumelo *Agaricus bisporus* tem homologia elevada com as dos mamíferos e pode ser usada como um modelo para o estudo da melanogênese e vias da tirosinase (MATOS et al., 2011).

2.3 ENVELHECIMENTO CUTÂNEO E OS RADICAIS LIVRES

Com o avanço da idade do indivíduo, a estrutura, as propriedades e a composição da pele variam consideravelmente. No envelhecimento cronológico cutâneo, ocorre a modificação do material genético por meio de enzimas, alterações proteicas e a proliferação celular decresce. O tecido aos poucos perde a elasticidade, a capacidade de regular as trocas aquosas e a replicação do tecido se torna menos eficiente (HIRATA, 2004).

O envelhecimento da pele é influenciado por diversos fatores, tais como, ambientais (exposição à radiação UV, xenobióticos e estresse mecânico), genéticos, mudanças hormonais e processos metabólicos que intensificam e aceleram esse fenômeno. A irradiação solar também diminui a síntese de colágeno e altera a expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs) causando danos ao tecido conjuntivo. Além de oxidações químicas e enzimáticas envolvendo a formação de Radicais Livres (RL) que causam danos diretos aos tecidos (RITTIÉ e FISHER, 2002; KIM et al., 2005).

A radiação UV ocasiona o fotoenvelhecimento que depende do grau de exposição ao sol e da pigmentação da pele. A radiação do tipo UVB gera um alto nível de espécies reativas de oxigênio (EROs) na pele resultando em prejuízos às células e matriz extracelular, além da possibilidade de dano ao DNA (PERES et al., 2011). A pele fotoenvelhecida apresenta rugas grossas, com manchas e textura áspera em contraste com a pele com apenas envelhecimento cronológico que se apresenta mais fina, seca, pálida e finamente enrugada (KIM et al., 2005).

Os RL são espécies químicas que possuem um elétron desemparelhado caracterizando-o com instabilidade energética e cinética, e para se tornarem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. Os radicais livres gerados a partir do oxigênio são chamados de EROs. Essas espécies reagem com diversas moléculas integrantes de estruturas celulares. O dano mais comum causado é a peroxidação dos ácidos graxos constituintes da dupla camada lipídica (HIRATA, 2004; CHANDA e DAVE, 2009). Além disso, as EROs estão associadas a várias doenças como aterosclerose, inflamação e câncer de pele (HALLIWELL, 1994).

Antioxidantes são substâncias que retardam ou inibem a oxidação de uma molécula em concentrações mais baixas que os RL. Os radicais formados não são reativos para propagar a reação em cadeia, ou seja, são neutralizados por reação com outro radical, formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007).

O próprio organismo possui sistemas de defesa de antioxidantes contra os RL, os chamados antioxidantes intrínsecos. Porém, outros antioxidantes podem ser obtidos

provenientes da dieta, por exemplo, os chamados extrínsecos. A superóxido dismutase (SOD) e a catalase (CAT) são as principais enzimas antioxidantes endógenas que protegem a epiderme. A SOD converte o superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), enquanto CAT degrada peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O). Entre os provenientes da dieta estão os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (SOUSA et al., 2007; PERES et al., 2011). Nos últimos anos, tem sido dada grande importância ao uso dessas substâncias tanto para profilaxia quanto para o tratamento de doenças (RATNAM, 2006).

Apesar do complexo sistema de defesa, o organismo é submetido intensamente a agressão, e conseqüentemente, o equilíbrio entre o efeito pró-oxidante e antioxidante pode ser perturbado, ocasionando o estresse oxidativo. Essa condição está relacionada a processos patológicos incluindo complicações na gravidez. Esse desequilíbrio ocorre tanto por aumento de EROs ou deficiência de antioxidantes (BURTON e JAUNIAUX, 2010). Na pele, durante o processo de envelhecimento há um declínio de antioxidantes endógenos levando ao acúmulo de danos oxidativos (PERES et al., 2011).

Nos últimos anos, os antioxidantes ganharam destaque devido ao seu potencial como profiláticos e terapêuticos em muitas doenças. O descobrimento do seu papel no câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, autoimunes, desordens neurodegenerativas e envelhecimento é considerado uma revolução médica (RATNAM et al., 2006). Em cosméticos esta atividade é muito desejada, principalmente nos anti-idade.

Alguns compostos de origem vegetal destacam-se por atividades antioxidantes como os fenóis que apresentam propriedades de oxirredução, ou seja, doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio singlete. Os fenóis são divididos em categorias que são fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA et al., 2007).

2.4 PRODUTOS COSMÉTICOS E FITOCOSMÉTICOS

A RDC nº 211, de 14 de julho de 2005 define produtos cosméticos, de higiene e perfumes como preparações constituídas por substâncias naturais ou sintéticas, para uso externo nas diversas partes do corpo humano, pele, sistema capilar, unhas, lábios, órgãos genitais externos, dentes e membranas mucosas da cavidade oral, destinados à proteção, embelezamento, limpeza ou ainda, perfumá-los, alterar a aparência, correção de odores corporais ou manutenção do bom estado (ANVISA, 2008). Já um fitocosmético é definido

como um cosmético que contém ativo natural, de origem vegetal, como extratos vegetais, tinturas, ceras, óleos vegetais, hidratos de carbono vegetais ou óleos essenciais, cuja ação define a atividade do produto. Esse produto deve passar por todas as etapas de desenvolvimento tais como proposição, criação e desenvolvimento (ISAAC et al., 2008; ALLEMANN e BAUMANN, 2009).

Óleo essencial é um líquido hidrofóbico, concentrado, armazenadas em estruturas secretoras especializadas, de tecidos ou de órgão vegetais distintos e sintetizadas pelo metabolismo secundário de plantas, e armazenados sobre a superfície da planta ou dentro de tecidos que formam as folhas, os cálices de flores, frutos e raízes (LAHLOU, 2004). Os óleos essenciais são importantes produtos florestais não-madeireiros usados em comunidades tradicionais e em indústrias de grande porte. Até meados de 2008, são mais de 3000 óleos essenciais conhecidos, mas cerca de 10% destes somente são comercialmente importantes em indústrias como a farmacêutica, agrônômica, alimentos, sanitárias, cosméticos e perfumaria (BAKKALI et al., 2008).

Esses óleos são compostos voláteis naturais, complexos, caracterizados por possuir um odor forte, produzidos como metabólitos secundários por plantas aromáticas. Em geral, são encontrados cerca de 20-60 moléculas distintas constituindo os óleos essenciais as quais podem ser classificadas em dois grupos de diferente origem biosintética. O grupo principal é constituído de terpenos e terpenóides, e o outro de moléculas aromáticas e alifáticas, todos caracterizados por possuir baixo peso molecular (MAFFEI, 2010). Nos óleos essenciais são encontradas de duas a três moléculas majoritárias, em concentrações relativamente elevadas (20-70%), em comparação com outras moléculas presentes em quantidades menores ou vestigiais (minoritárias). Os terpenos são mais frequentes nos óleos voláteis e se dividem em monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, conforme o número de unidades de isopreno (C5) em sua estrutura. Os monoterpenos são formados pelo agrupamento de duas unidades de isoprenos (C10) e são os mais representativos constituindo cerca de 90% dos óleos essenciais permitindo gerar uma grande variedade de estruturas (BETTS, 2001; PICHERSKY et al., 2006; MAFFEI, 2010).

Extratos vegetais são preparações concentradas obtidas de folhas, galhos ou outras partes de uma planta, cuja consistência pode ser sólida, líquida ou intermediária conseguidas através de um líquido extrator como etanol, água ou outros solventes. A preparação destes dá-se por percolação, maceração e a escolha do solvente se dá em função da classe de substâncias que se pretende extrair, variando de polaridade à acidez (SCHULZ, HÄNSEL e TYLER, 2002; FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Extratos vegetais podem ser incorporados

facilmente em diferentes preparações cosméticas, porém, dependendo da classe química de seus ativos podem alterar ou não a característica da formulação (ISAAC et al., 2008).

Produtos vegetais são usados há milhares de anos pelas antigas civilizações de diversas formas como na culinária, para o alívio e tratamento de doenças e como cosmético usado na forma de perfumes e produtos para embelezamento do corpo como óleos e cremes (LAWLESS, 2013). Nos últimos anos a medicina complementar e alternativa cresceu favorecendo ainda mais busca pelo naturalismo o que levou ao aumento da demanda por produtos cosméticos não somente naturais, mas também sustentáveis, orgânicos e livres de ingredientes de origem animal (ALLEMANN e BAUMANN, 2009).

Na indústria cosmética atual, produtos naturais têm sido fontes valiosas para o desenvolvimento de novos produtos com atividades cientificamente comprovadas agregando a cosméticos comuns diversas funcionalidades muito desejadas como antioxidantes, despigmentantes e anti-idade (ANGÉLICO, 2011).

2.5 A FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae tem sua distribuição de espécies em regiões com clima tropical e subtropical principalmente na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar, possuindo cerca de 2.500 a 3000 espécies subordinadas a 50 gêneros (GOTTLIEB, 1972; WERFF e RICHTER, 1996).

Essa família tem um grande valor econômico e medicinal e é considerada uma das que mais contribuem para a riqueza da flora tropical por sua distribuição na floresta úmida em qualquer altitude. Ao longo de muitos anos as Lauráceas têm sido amplamente utilizadas por sua madeira de qualidade (Itaúba - *Mezilaurus itauba*), como frutos comestíveis (Abacate - *Persea americana*), uso medicinal (Cânfora - *Cinamomum camphora*), especiarias (Canela - *Cinamomum zeylanicum*), condimento (Louro - *Laurus nobilis*), perfume (Pau Rosa - *Aniba rosaeodora*), entre outros usos (GOTTLIEB, 1972). A literatura científica relata o isolamento de neolignanais e flavonóides (ROSSI, YOSHIDA e MAIA, 1997) de Lauráceas nativas do Brasil. Ao todo são descritos 23 gêneros e 420 espécies (QUINET et al., 2010).

Apesar de sua importância, as Lauráceas continuam sendo pouco conhecidas em relação aos números de classificação e espécies. Uma explicação para tal seria o fato de serem de difícil coleta e identificação por muitas serem árvores altas e com flores pequenas (QUINET, 2005). Enquanto isso, a maioria de suas espécies tem o uso restrito às

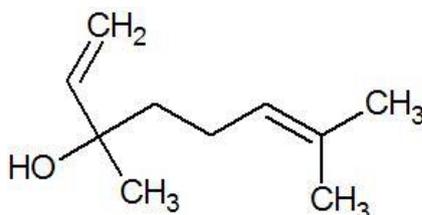
comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001).

2.5.1 O gênero *Aniba*

O gênero *Aniba* Aubl. destaca-se dentre as Lauráceas pelo número de espécies com importância econômica. É representado por 41 espécies de arbustos e árvores com centro de biodiversidade na Amazônia Central e Guiana estendendo-se pelos Andes, e em menor escala nas Antilhas e leste e sul do Brasil (QUINET, 2005). Esse gênero se caracteriza por árvores ou arvoretas com flores monoclinas, ou seja, hermafroditas, e anteras pouco diferenciadas. Apresentam folhas alternadas ou agrupadas. Os frutos são bacáceos, elipsóide ou ovóides, envolvidos por uma cúpula parcial (QUINET, 2005; WERFF, 1990).

O pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke é a espécie mais conhecida do gênero em função do óleo essencial que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol (80-90%) (Figura 4) largamente usado em indústrias de perfumaria internacionais onde pode ser facilmente convertido em outros derivados (MAIA et al., 2007; MARQUES, 2001). *A. rosaeodora* tem sido intensivamente explorada desde 1920 e por esse motivo é uma espécie ameaçada de extinção pela extração do seu óleo tradicionalmente do tronco. Uma alternativa sustentável é a extração das folhas e galhos que oferece um óleo rico em linalol assim como da madeira (MAY e BARATA, 2004). Além disso, um estudo mostrou que árvores jovens produzem óleo com qualidade muito semelhante ao de árvores mais velhas (FIDELIS, 2013). Análise sensorial feita por perfumistas também mostram que o óleo das folhas pode substituir o da madeira na indústria de perfumaria (SOUZA et al., 2011).

Figura 4 – Álcool terpênico linalol.



Outra espécie do gênero *Aniba* é considerada muito semelhante em termos de tamanho, forma e cor das folhas, e por vezes, morfológicamente é considerada indistinguível do pau-rosa, a *Aniba parviflora* (GALAVVERNA, et al., 2015).

2.5.2 *Aniba parviflora* (Meisn) Mez.

A *Aniba parviflora* (Figura 5) é conhecida popularmente como macacaporanga ou louro rosa e tem como sinónímia *Aniba fragrans* Ducke (KUBITZKI e RENNER, 1982). É uma árvore de médio porte, encontrada nos arredores de igarapés da floresta amazônica ocidental aos arredores de Santarém, Faro e Médio rio Tapajós, estado do Pará. Sua casca é vendida no mercado Ver-O-Peso em Belém-PA e sua infusão é usada nos tradicionais banhos-de-cheiro (REVILLA, 2002; MATTOSO, 2005). Popularmente, madeira e galhos dessa espécie são transformados em pó e utilizados como sachês aromatizantes (PEREIRA, 2012). O óleo das folhas tem um aroma forte, agradável e com potencial de ser um produto com alto valor no mercado (TRANCHIDA, 2008).

Essa espécie é muitas vezes confundida visualmente com o pau-rosa pela semelhança das folhas e flores, porém, as espécies apresentam diferença química e no aroma (MATTOSO, 2005). Através das técnicas de CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa) e de RMN (ressonância magnética nuclear), pode-se observar espectros diferentes e através dos picos cromatográficos identificar os constituintes majoritários (BARCELOS, BARATA e MAGALHÃES, 2012).

Figura 5 – Árvore de *Aniba parviflora*.



Em um estudo que comparou a composição do óleo das folhas no período chuvoso e seco foi observado que o componente majoritário foi o linalol com média de percentual relativo no período seco de 34,63%, seguido de espatulenol com média de 6,99% e β -felandreno com média de 6,65%. No período chuvoso houve diferença entre os componentes, o linalol com 27,83% seguido de β -felandreno com 6,67% e espatulenol com 5,52% (PEREIRA, 2012). Em outro estudo foi encontrado no óleo das folhas de macacaporanga uma proporção diferenciada de constituintes. O linalol permaneceu como constituinte majoritário, porém, com percentual maior (36%), seguido de acetato de linalil (20%), sabineno (10,05%), cariofileno (9,4%) o-cimeno (8,17%), α -felandreno (7,2%), limoneno (6%), entre outros (BARCELOS, BARATA e MAGALHÃES, 2012).

De atividades biológicas de *A. parviflora* citadas na literatura, destaca-se a anti-hemorrágica do extrato aquoso contra o veneno de *Bothrops jararaca* (MOURA, 2010) e antimicrobiana do óleo essencial (SARRAZIM et al., 2010). Além disso, o linalol, componente majoritário, mostrou atividade sedativa (SUGAWARA, 1998), anticonvulsiva (BRUM et al., 2001), bactericida (BAGAMBOULA, 2004), fungicida contra *Candida albicans* (ALVIANO, 2005), anti-inflamatória, antinociceptiva e antihiperálgia (PEANA, 2006) e anti-câncer (LOIZZO et al., 2008).

Na literatura os estudos sobre essa espécie são escassos, portanto as atividades biológicas ainda são pouco conhecidas.

2.5.3 *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez

A *Aniba canelilla* tem como sinônimas *Aniba elliptica* AC Sm. e *Cryptocarya canelilla* Kunth, é conhecida popularmente como “casca-preciosa” ou somente “preciosa” (Figura 6) (TAVEIRA et al., 2003). Dados históricos mostram que essa espécie foi confundida por Pizzaro e Orellana com árvores de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) durante a viagem de 1540 pela Amazônia e por Humbolt e Bonpland na expedição rio Orinoco em 1800 para encontrar a “canela da Amazônia” (DA SILVA et al., 2007). A infusão da casca da preciosa é utilizada popularmente para o tratamento de diarreia, como antiespasmódico e estimulante do sistema nervoso (SAMPAIO et al., 2010).

Essa espécie é nativa da região Amazônica, distribuindo-se amplamente no interior da Guiana Francesa, atravessando Suriname, Venezuela e Colômbia até à Amazônia peruana, ocorrendo no Brasil nos estados do Pará e Amazonas. Entre os inúmeros usos populares estão

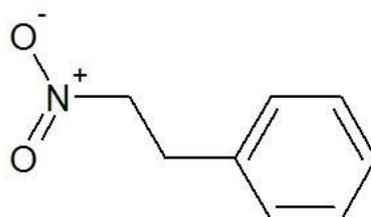
para males do sistema digestivo, resfriados, tosses, dor de cabeça e náuseas. O óleo essencial é usado contra acnes, dermatites, febre, infecções diversas e ferimentos (LUPE, 2007).

Figura 6 - Plantio de *A. canelilla* na Reserva Florestal Adolpho Ducke.



O constituinte majoritário do óleo essencial é o 1-nitro-2-feniletano (Figura 7), o composto que confere o aroma de canela. Uma molécula considerada rara em produtos naturais (SILVA et al., 2009). O teor está relacionado à estação do ano. No período chuvoso o valor encontrado é de 95%, e no período seco diminui para 39% (TAVEIRA et al., 2003).

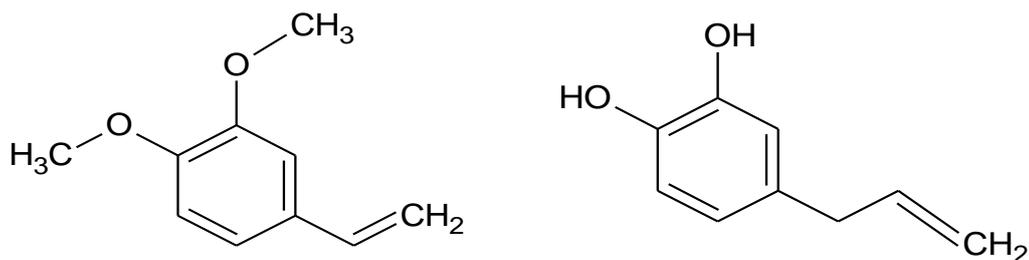
Figura 7 - 1-nitro-2-feniletano.



Além desse, destacam-se o metileugenol e eugenol (Figura 8). Eugenol já demonstrou intensa atividade antioxidante e anti-inflamatória da Cicloxigenase-2 (COX-2) *in vitro*, enquanto o metil-eugenol mostrou forte inibição da Lipoxigenase-15 (LOX-15) *in vitro*. COX e LOX são enzimas que trabalham na biosíntese de mediadores da inflamação (LEEM et al., 2011).

A concentração destes três constituintes difere entre as folhas e galhos. As folhas apresentam maior teor de eugenol (8,71%) e metileugenol (5,09%). Os galhos finos somente 0,3 e 0,42%, respectivamente. No entanto, o 1-nitro-2-feniletano é encontrado em maior quantidade nos galhos, 92,7% (MANHÃES et al., 2012).

Figura 8 - Metileugenol e eugenol.



Está descrita na literatura a atividade antioxidante do óleo essencial de *A. canelilla* e de seu constituinte majoritário 1-nitro-2-feniletano (DA SILVA et al., 2007). A molécula 1-nitro-2-feniletano apresentou atividade antinociceptiva de origem periférica (DE LIMA et al., 2009); efeitos cardiovasculares em ratos normotensos (LAHLOU, et al., 2005) e hipotensora e bradicárdica em ratos hipertensos (INTERAMINENSE et al., 2010). Além de atividade anti-leishmania moderada encontrada no óleo das folhas com baixa citotoxicidade em macrófagos peritoneais infectados (SILVA et al., 2009); antimicrobiana (SILVA, 2012) vasorrelaxante (INTERAMINENSE et al., 2013; BRITO et al., 2013), anti-inflamatória (VALE et al., 2013), atividade vasorelaxante (ARRUDA-BARBOSA, et al., 2014) inibidora da acetilcolinesterase (SILVA et al., 2014) foram descobertas em estudos mais recentes. Entretanto, a atividade inibidora da tirosinase ainda não foi reportada.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o potencial biotecnológico de óleos essenciais e extratos de três espécies de Lauráceas para fins cosméticos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antimelanogênica de óleos de *A. rosaeodora*, *A. canelilla* e *A. parviflora*;
- Identificar as substâncias majoritárias presentes no óleo essencial com atividade biológica promissora;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora*;
- Avaliar a citotoxicidade das amostras mais promissoras.

CAPÍTULO I**ÓLEO ESSENCIAL DE ESPÉCIES DO GÊNERO
Aniba COMO POTENCIAL AGENTE
DESPIGMENTANTE DA PELE**

Óleo essencial de espécies do gênero *Aniba* como potencial agente despigmentante da pele.

Nogueira, J. R.¹; Lima, E. S.²; Albuquerque, P. M.¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

A tirosinase é a enzima chave na biossíntese de melanina. Uma desregulação nessa enzima pode provocar hiperpigmentação da pele. Assim, a busca por substâncias que possam inibi-la pode ser o fator chave para o tratamento de desordens pigmentares. Dentro desse contexto, este estudo buscou analisar a atividade inibidora da tirosinase de espécies aromáticas da região amazônica (*Aniba rosaeodora*, *Aniba parviflora* e *Aniba canelilla*). Os óleos essenciais foram obtidos a partir da hidrodestilação de folhas e galhos. Para triagem, as amostras foram testadas frente à enzima tirosinase, obtida a partir de *Agaricus bisporus*. Testes em células de citotoxicidade, dosagem de melanina e inibição da tirosinase foram realizados em B16F10. Por fim, a caracterização química do óleo com maior atividade foi obtida por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). O óleo de folhas de *Aniba canelilla* (OPF) obteve destaque na inibição da melanogênese em 50 µg/mL e na diminuição significativa do teor de melanina em 25 e 50 µg/mL, não apresentando citotoxicidade na linhagem celular estudada. A substância mais frequente encontrada por CG-EM foi o 1-nitro-2-feniletano com 87,03%. Tendo como base os resultados obtidos, o óleo das folhas da preciosa demonstrou ser um potencial candidato para uso em um produto cosmético clareador da pele.

1 INTRODUÇÃO

A melanina é um biopolímero que ocasiona a pigmentação da pele, olhos e cabelo. Sua função é a proteção contra danos ao DNA pela absorção da radiação UV, convertendo-a em forma de calor ou ainda como um tampão sobre o núcleo (PARK et al., 2009; VILLAREAL et al., 2010). Sua produção é realizada pelos melanócitos dentro de estruturas denominadas melanossomos que são repassados aos queratinócitos, células majoritária presente na epiderme (QUINN, 2004).

Dentro dos melanossomos há uma enzima chave na via melanogênica, a tirosinase. Essa enzima oxida o substrato L-DOPA à DOPA-quinona, que é um intermediário comum para as vias de produção da eu-melanina e feomelanina (ZAIDI, et al., 2014). Inibidores da tirosinase como o ácido kójico, hidroquinona e, arbutina são amplamente usados na indústria cosmética como agentes despigmentantes, porém, por vezes têm seu uso limitado por apresentarem atividade insuficiente, baixa estabilidade e efeitos adversos (MOMTAZ, et al., 2008, YANG et al., 2012), o que leva à necessidade de uma busca contínua por novos inibidores, cada vez mais inovadores (MATOS, 2011).

A flora brasileira possui uma rica biodiversidade, destacando-se como um país com grande potencial para originar moléculas biologicamente ativas a partir de plantas (PINTO et al., 2002). A família Lauraceae destaca-se por apresentar espécies produtoras de óleos essenciais, principalmente as pertencentes ao gênero *Aniba*, porém, muitas espécies ainda se mantêm pouco estudadas. Uma explicação para tal seria o fato de serem de difícil coleta e identificação, por estarem presentes na floresta amazônica, além de serem árvores altas e com flores pequenas (QUINET, 2005).

O pau-rosa, *Aniba rosaeodora* Ducke é a espécie mais conhecida do gênero em função do óleo essencial que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, largamente usado em indústrias de perfumaria internacionais (QUINET, 2005). Outras espécies do

mesmo gênero são pouco estudadas como a *A. parviflora* e *A. canelilla* mantendo seu uso, em sua maioria, pelas comunidades tradicionais (MARQUES, 2001).

A. parviflora conhecida como macacaporanga é muitas vezes confundida com o pau-rosa pela semelhança visual, além da presença do linalol como componente majoritário do óleo, porém, as espécies apresentam diferença química e no aroma (MATTOSO, 2005, PEREIRA, 2012). Atividade antimicrobiana do óleo essencial (SARRAZIM et al., 2010) e sedativa (SUGAWARA, 1998), anticonvulsiva (BRUM et al., 2001) e bactericida (BAGAMBOULA, 2004) do componente majoritário, linalol, são exemplos de algumas das atividades relatadas.

A. canelilla é conhecida como preciosa e seu óleo é constituído principalmente de 1-nitro-2-feniletano (80%), do composto que confere o aroma de canela, eugenol (1%), e de metil eugenol (15%) (OGER et. al., 1994; LIMA et al., 2004) A atividade antioxidante do óleo e do 1-nitro-2-feniletano já foram relatadas (DA SILVA et al., 2007). Ação antinociceptiva (DE LIMA et al., 2009) e bradicárdica em ratos hipertensos (INTERAMINENSE et al., 2010) são algumas atividades encontradas, porém, a inibição da tirosinase pelos óleos ainda não foi descrita na literatura.

Portanto, no presente trabalho foi avaliada a capacidade inibitória da melanogênese e a citotoxicidade de óleos essenciais de folhas e galhos de espécies de Lauraceae a fim de avaliar seu potencial como fonte de um novo agente despigmentante.

2 MATERIAIS

Os reagentes: Tirosinase, L-DOPA, Alamar Blue, Fenilmetilsulfonilflúor (PMSF), Feniltiouréia, Isobutilmetil xantina (IBMX) foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich. Triton X-100, Dimetilsulfóxido (DMSO) e meios de culturas foram cedidos pelo laboratório Biophar

da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UFAM. As células foram cedidas pelo laboratório de patologia da Universidade de São Paulo.

As folhas e galhos de *A. canelilla* foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, localizada no Km 26 da Rodovia AM-010, Manaus – Itacoatiara, no município de Manaus – Amazonas. As folhas e galhos de *A. parviflora* foram coletados na fazenda Experimental Curauá- PEMATEC, localizada no município de Santarém-PA. As folhas e galhos de *A. rosaeodora* foram coletados na Fazenda Magaldi, localizada na cidade de Maués, distante 268 km de Manaus. Todas as coletas foram realizadas no período chuvoso.

3 MÉTODOS

3.1 Obtenção do óleo

As folhas e galhos foram secos em temperatura ambiente por sete dias e triturados em moinho de facas (tela de 3 mm) na forma de um pó homogêneo. O óleo das folhas e dos galhos foi obtido por hidrodestilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger pelo período de três horas para folhas e 6 horas para galhos, segundo a metodologia descrita por Chaar (2000).

3.2 Inibição da tirosinase *in vitro*

A análise da inibição da tirosinase foi realizada por metodologia colorimétrica descrita por Chan et al. (2008). A amostra foi diluída em dimetilsulfóxido (DMSO) e a enzima tirosinase e o substrato L-DOPA (3,4-dihidroxi-L-fenilalanina) (1 mM) foram diluídos em tampão fosfato 10 mM pH 6,9. Em uma microplaca foi adicionado 20 µL de óleo essencial, 80 µL de enzima e 100 µL do reagente de cor L-DOPA. Logo em seguida foi feita a primeira leitura em leitor de microplaca (tempo 0) e depois de 20 minutos no comprimento de onda de

492 nm. Como controle negativo foi utilizado DMSO e como padrão de inibição feniltiouréia.

O cálculo de inibição foi realizado com o uso da equação abaixo:

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

3.3 Cultura de células

A linhagem de células de melanoma murino (B16F10) utilizada foi obtida do laboratório de patologia da Universidade de São Paulo. As células foram mantidas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico, e incubadas à 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ (PEDROSA, 2013).

3.3.1 Citotoxicidade pelo ensaio de Alamar Blue

Para avaliar a viabilidade celular foram plaqueadas 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram tratados com concentrações de óleo de 100, 50; 25 e 12,5 µg/mL em triplicata. Passado 72 horas de exposição foi adicionado 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque a 0,4%) diluído a 1:20 em meio DMEM. Como branco da reação foram lidos os poços com célula e amostra sem Alamar Blue (resazurina). Como controle negativo foram lidos poços sem amostras. Após o tempo de metabolização da resazurina, foi realizada a leitura da fluorescência em leitora de microplaca. A viabilidade celular foi calculada conforme a equação abaixo:

$$\%viabilidade = \frac{\Delta Ft}{\Delta Fc} \times 100$$

Onde:

ΔFt = (fluorescência amostra + resazurina) - (fluorescência da amostra)

ΔFc = (fluorescência controle negativo + resazurina) - (fluorescência controle negativo)

As concentrações das amostras que causam morte de 50% das células (CI_{50}) foram calculadas por regressão linear simples (AHMED et al., 1994).

3.3.2 Inibição da melanogênese

Em placas de petri de 60 x 15 mm foram cultivadas células B16F10 na densidade de 3×10^4 células/mL num total de 5 mL. Após 24 horas, o meio de cultura foi trocado por meio contendo IBMX 25 μ M para ao estímulo da melanogênese por 24 horas e tratadas com óleo essencial a 50 e 25 μ g/mL por 48 horas. Como controle positivo foi utilizado feniltiouréia a 25 μ M. Depois as células foram retiradas das placas com tripsina e coletadas para microtubos, um contendo 1×10^6 células e o outro o restante. Após esse procedimento, as células foram lisadas com Triton X-100 a 1% em PBS com PMSF e centrifugados a 10.000 rpm a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi usado para a inibição da tirosinase e o pellet para a dosagem de melanina.

3.3.3 Atividade da tirosinase em B16F10

A atividade de tirosinase foi avaliada conforme a metodologia descrita por Tomita e Tagami (1992). Após a lise celular e obtenção do sobrenadante, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). As proteínas obtidas foram diluídas em placas de 96 poços para concentração final de 100 μ g/mL. Mensurou-se a absorbância 1 (A1) em 475 nm. Em seguida foram adicionados 100 μ L do reagente de cor L-DOPA (L-diidroxifenilalanina) a 3 mg/mL procedendo-se imediatamente a leitura em leitor de microplaca. A placa foi incubada a 37 °C e lida a cada 30 minutos durante 90 minutos, onde se obteve a absorbância final (A2) mensurada no mesmo comprimento de onda da A1. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado abaixo, onde A2 = absorbância 2 e A1 = absorbância 1.

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

3.3.4 Dosagem de melanina

A dosagem de melanina foi realizada conforme a metodologia descrita por Hosoi, et al (1985). Os pellets de B16F10 obtidos a partir de 1×10^6 células foram solubilizados em NaOH 1 N contendo 10% de DMSO em banho seco a 95°C durante 1 hora. A absorbância das soluções de melanina foi mensurada a 405 nm usando um leitor de microplacas. A quantidade de melanina foi calculada após comparação com uma curva padrão de melanina sintética (0 – 200 $\mu\text{g/mL}$).

3.4 Identificação dos constituintes voláteis por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM)

A análise dos constituintes voláteis foi realizada utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um detector de massas da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 series Ultra, utilizando software de tratamento de dados GCMS-QP2010 solution Ver. 2.6., coluna capilar 5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) nas seguintes condições de corrida: split de 1:40, temperatura do injetor de 220°C , temperatura da coluna de 60°C com taxa de aquecimento de $3^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até 240°C e temperatura do detector de 250°C , sendo utilizado o hélio como gás de arraste, numa vazão de $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O detector seletivo de massas operou a 70 eV, $m/z = 30$ a 500 u.m.a.

A identificação foi realizada por meio do cálculo dos índices de retenção dos analitos, utilizando-se a coinjeção de uma mistura de padrões de hidrocarbonetos (C8 a C22), comparação com a biblioteca eletrônica do equipamento (NIST-05) e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

3.5 Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A determinação da CI_{50} foi realizada pelo método de regressão linear simples, usando o programa Origin®. A análise estatística dos testes celulares de inibição da tirosinase e de dosagem de melanina foram realizados usando o programa GraphPad Prism 5 One-way ANOVA com teste de Tukey ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Ensaio da inibição da tirosinase *in vitro*

Esse ensaio de triagem foi realizado utilizando a enzima tirosinase de *Agaricus bisporus*, substrato L-DOPA e óleos essenciais de folhas e galhos de três espécies de Lauraceae na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Percentual inibitório de óleos essenciais de espécies do gênero *Aniba* sobre a enzima tirosinase. Valores representam médias \pm desvio padrão de três experimentos independentes.

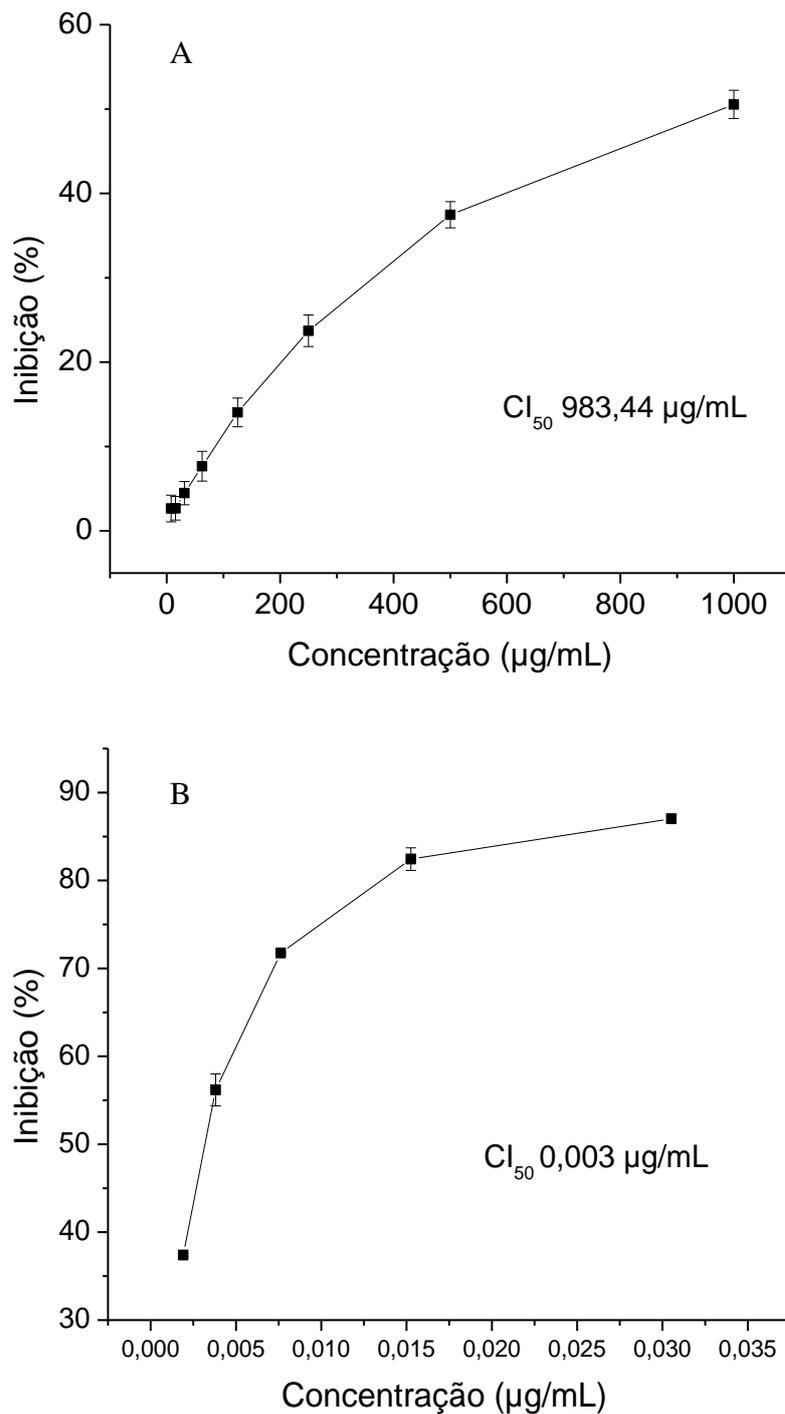
Óleo essencial (1000 $\mu\text{g/mL}$)*	Inibição (%) \pm DP
<i>A. rosaeodora</i> folhas	3,26 \pm 0,42
<i>A. rosaeodora</i> galhos	1,85 \pm 0,66
<i>A. parviflora</i> folhas	1,07 \pm 1,53
<i>A. parviflora</i> galhos	1,34 \pm 1,54
<i>A. canelilla</i> folhas	57,83 \pm 2,70
<i>A. canelilla</i> galhos	8,71 \pm 2,51

*Amostras diluídas em DMSO.

Foi considerada como atividade significativa a inibição de 50% ou mais da enzima, portanto, o óleo das folhas de *A. canelilla* (OPF) foi selecionado para a continuidade dos testes.

Foi realizada uma curva de inibição de OPF e da feniltiouréia, a fim de calcular a CI_{50} , ou seja, a concentração que inibe 50% da enzima (Figura 1).

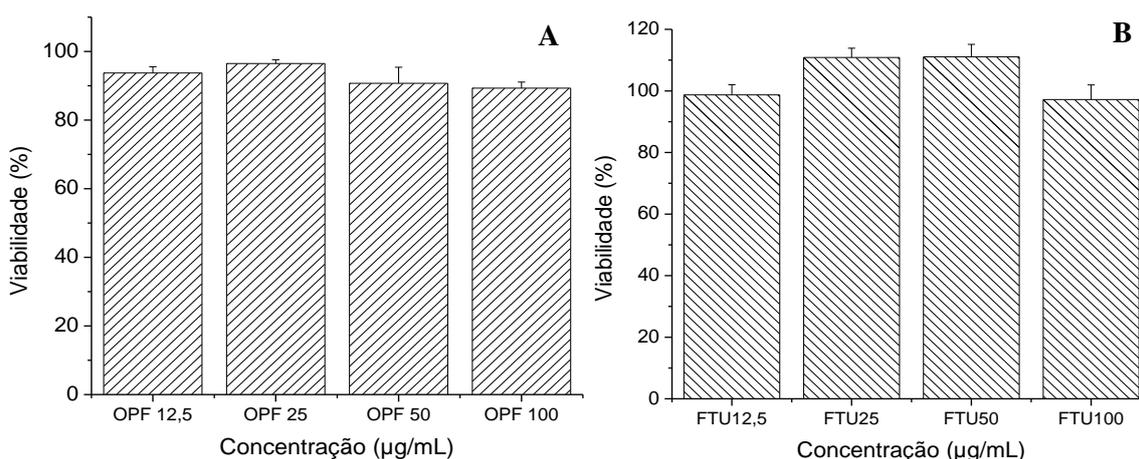
Figura 1 – Curva de inibição da enzima tirosinase. Em A: óleo essencial de folhas de *A- Aniba canelilla* e B- padrão feniltiouréia, com suas respectivas CI_{50} .



4.2 Viabilidade Celular

A fim de verificar os possíveis efeitos citotóxicos do óleo essencial de folhas de preciosa sobre as células B16F10 (melanoma murino) e do padrão feniltiouréia (FTU) usado no ensaio da inibição da melanogênese, foram utilizadas amostras em diferentes concentrações em um período de 72 horas de exposição. Os resultados estão apresentados na Figura 2.

Figura 2 - Viabilidade celular pelo método de Alamar Blue no período de 72 horas. Ensaio realizado em melanoma da linhagem B16F10. Em (A): óleo essencial de folhas de *Aniba canelilla* e em (B): padrão feniltiouréia (FTU).



Verifica-se que OPF não foi citotóxico mesmo nas concentrações mais altas de estudo: 50 e 100 µg/mL ($90,71 \pm 4,70$; $89,31 \pm 1,76$ %), e que houve a manutenção da viabilidade celular de FTU em 50 e 100 µg/mL ($111,07 \pm 4,05$; $97,21 \pm 4,73$), respectivamente. Esses resultados demonstram que essas amostras não são citotóxicas para a espécie em estudo.

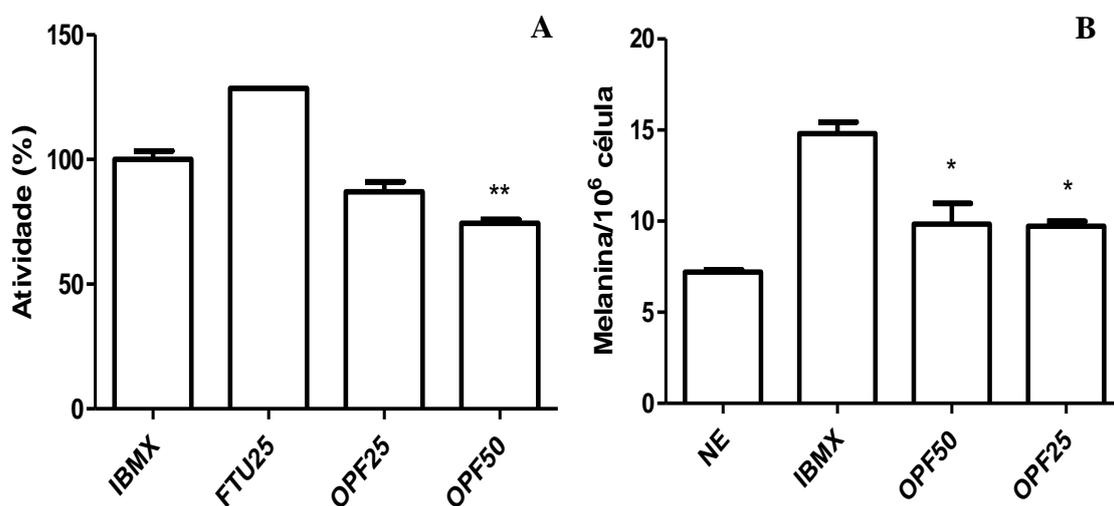
4.3 Inibição da tirosinase celular e dosagem de melanina

O efeito inibitório do óleo de preciosa na atividade da tirosinase foi estudado em células da linhagem B16F10 em duas concentrações (25 e 50 µg/mL) (Fig. 3A). Após 48

horas de tratamento, a atividade da tirosinase reduziu significativamente para 74,39% nas células tratadas com 50 µg/mL comparados com 100% de atividade do controle estimulado com 25 µM de IBMX.

O teor de melanina nas células B16F10 cultivadas na presença de OPF também foi mensurado e observou-se que a síntese de melanina foi inibida pelas duas concentrações em estudo (25 e 50 µg/mL) (Fig. 3B).

Figura 3 – Inibição da tirosinase em células da linhagem B16F10 (A) e dosagem do teor de melanina após exposição de 48 horas ao óleo (B). Onde, IBMX- controle tratado com 25 µM de isobutilmetilxantina; FTU25- células tratadas com 25 µM de feniltiouréia; OPF25- Tratamento com 25 µg/mL de óleo das folhas de preciosa e OPF50- Tratamento com 50 µg/mL de óleo das folhas de preciosa. Valores representam a média ± desvio padrão. Amostras apresentam diferença significativa em relação ao controle estimulado com 25 µM de IBMX para $p < 0.005^{**}$ e $p < 0.05^{*}$.



4.4 Análise dos Constituintes Químicos do Óleo Essencial de Folhas de *A. canelilla*

As análises de CG-EM do óleo essencial obtido a partir da hidrodestilação das folhas permitiu detectar 29 diferentes constituintes no óleo essencial de folhas de *A. canelilla*. Estes constituintes foram identificados por meio da comparação dos seus espectros de massas com espectros da literatura, e com a espectroteca eletrônica e seus índices de retenção obtidos por comparação com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares. Não foi possível identificar apenas 2 dos constituintes do óleo essencial de *A. canelilla* usando os métodos citados (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição química do óleo essencial de folhas de *Aniba canelilla*.

Picos	Moléculas	IR	Percentagem relativa	Identificação
1	Butanoato de etila	800	3,1 ± 5,2	a,b
2	Etilbenzeno	823	0,4 ± 4,1	a,b,c
3	α-pineno	934	0,6 ± 3,3	a,b,c
4	Benzaldeído	962	0,5 ± 6,1	a,b
5	β-Pineno	980	0,6 ± 7,4	a,b,c
6	Benzoacetaldeído	1045	0,4 ± 3,3	a,b,c
7	Linalol	1103	0,4 ± 2,9	a,b
8	α-Terpineol	1190	0,6 ± 4,3	a,b,c
9	1-nitro-2-feniletano	1317	87,3 ± 2,1	a,b,c
10	α-copaeno	1375	0,6 ± 8,2	a,b
11	Cariofileno	1421	0,5 ± 5,5	a,b
12	β-Selineno	1490	0,6 ± 6,2	a,b,c
13	α-Bisaboleno	1504	0,4 ± 2,1	a,b,c
14	ni	1628	0,3 ± 2,1	a,b,c
	Hidrocarbonetos monoterpênicos		2,3	
	Monoterpenos oxigenados		1,1	
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		4,2	
	Sesquiterpenos oxigenados		0,9	
	Outros (Componentes aromáticos)		91,7	
	ni		0,3	
	Total (%)		100	

^a A Identificação foi realizada pelo IR (Índice de retenção) determinado em uma coluna capilar HP-5MS utilizando uma série homóloga de n-hidrocarbonetos (índice Kovats).

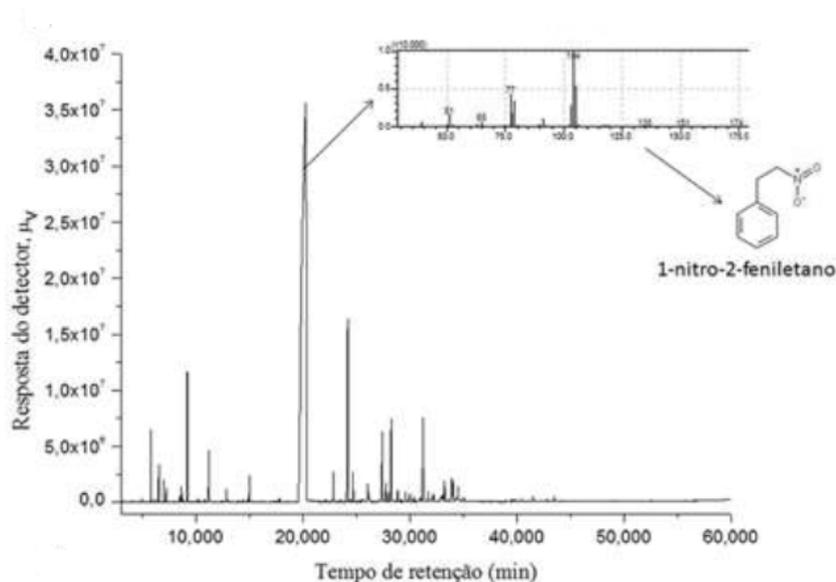
^b A Identificação foi realizada pela comparação dos espectros de GC-MS e IR com aqueles da biblioteca NIST e aqueles descritos por Adams (2007).

^c A identificação foi realizada pela comparação com o IR descritos por Babushok et al., (2011) e os disponibilizados no banco de dados online "The pherobase".

ni - não identificado

Na Figura 4 pode ser visualizado o cromatograma do óleo essencial de folhas de *A. canelilla* destacando o pico majoritário de 1-nitro-2-feniletano (87,3%).

Figura 4 - Cromatograma do óleo essencial de folhas de *Aniba canelilla*. Destaque para o pico majoritário e espectro de massa do 1-nitro-2-feniletano.



5 DISCUSSÃO

A inibição da tirosinase afeta a produção de melanina. Esse pigmento tem a função de proteção contra a radiação UV. Embora a melanina tenha essa função fotoprotetora, pode ocorrer um acúmulo anormal desse pigmento em diversas partes da pele, o que pode resultar hiperpigmentação da pele (CHOI, W., et al., 2010).

O teste preliminar de inibição em tirosinase de cogumelo é simples e prático devido essa enzima ter alta homologia com a dos mamíferos, porém, apresenta desvantagens por não refletir o comportamento de substâncias isoladas ou compostas (como óleos e extratos) em meio biológico (MATOS et al., 2011). Daí o interesse em ensaios utilizando modelos celulares para a pesquisa de novos compostos para o tratamento da hiperpigmentação como

realizado neste estudo. A literatura demonstra que certos extratos de plantas exibem atividade inibidora da tirosinase *in vitro*, porém, não reduzem o teor de melanina em células (ZHONG et al, 2006). Dentre os modelos celulares escolhidos, um dos mais utilizados são células da linhagem B16F10 (melanoma murino), por se tratar de células ricas em melanina. Esse tipo de ensaio evidencia a capacidade inibitória da melanogênese de substâncias em melanócitos, mimetizando condições *in vivo*.

O óleo das folhas de preciosa demonstrou no teste de triagem ser um potencial candidato para o estudo da inibição da melanogênese, quando comparado às outras amostras. Apesar de ser muito menos ativo que o padrão FTU, sua atividade é considerada razoável, se comparada a outros produtos naturais como os extratos hidroetanólicos e etanólicos de *Passiflora nitida* ($CI_{50} 878 \pm 0,03$ e $901 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$) (OLIVEIRA, 2011) e o extrato metanólico de *Agaricus brasiliensis* ($CI_{50} 713 \mu\text{g/mL}$) (HUANG, et al, 2014), e assim decidiu-se investigar mais a fundo sua capacidade nos testes celulares.

Apesar da FTU ter apresentado uma excelente inibição enzimática celular *in vitro*, não demonstrou a mesma ação no teste celular. OPF, no entanto, mostrou uma significativa redução da atividade na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ comparado ao controle com IBMX.

A Feniltiourea é inibidor da tirosinase utilizado desde a década de 1940. Acredita-se que seu mecanismo de ação se deve a interação com os íons de cobre no sítio ativo. Outra teoria supõe que ele é na verdade um inibidor não competitivo da tirosinase (RYAZANOVA, ALEKSEEV E SLEPNEVA, 2011).

A segurança em produtos cosméticos é um item essencial e apesar do teste do Alamar Blue ser considerado muito simples, um composto que cause citotoxicidade o torna inviável para utilização (LIANG et al. 2012). Assim, o óleo demonstrou não ser citotóxico nas concentrações estudadas e na linhagem celular em estudo.

A diminuição da produção de melanina pelas células se deve pela presença do óleo de *A. canelilla* e não pela citotoxicidade do mesmo, como demonstrado no ensaio do Alamar Blue, onde as células permanecem viáveis por um período de até 72 horas de exposição. Esse estudo também sugeriu as concentrações de OPF para os testes de inibição da melanogênese e tirosinase celular.

Outros estudos ainda são necessários para a descoberta da molécula bioativa, se esta atua isoladamente ou em sinergismo, assim como sua aplicabilidade, custo e segurança.

No óleo essencial de *A. canelilla* os componentes aromáticos voláteis foram os mais predominantes compondo até 92,06% do óleo das folhas, que pode ser explicado pela alta concentração da molécula 1-nitro-2-feniletano no óleo essencial desta planta. Hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos, e monoterpênicos e sesquiterpênicos oxigenados são outros grupos de moléculas encontrados.

A maioria dos constituintes identificados está de acordo com o que tem sido descrito na literatura, onde a molécula de 1-nitro-2-feniletano é identificada como o principal componente do óleo essencial desta espécie (LIMA et al., 2004, MANHÃES et al., 2012). Outros compostos aromáticos voláteis também foram identificados nos óleos estudados, como o etilbenzeno, benzaldeído, fenilacetaldéido e eugenol, estes compostos também foram identificados no óleo essencial desta mesma espécie em dois estudos anteriores (OGER et. al., 1994; LIMA et. al., 2004), indicando ser compostos característicos do óleo essencial desta espécie. É importante ressaltar que estes compostos não são comuns na maioria das plantas produtoras de óleos essenciais, pois possuem uma rota de síntese diferente dos terpenos.

Nas células da maioria das plantas produtoras de óleos essenciais a via dos terpenos é a mais comum (KIRBY E KEASLING, 2009). Dentre os compostos aromáticos voláteis de óleos essenciais de *A. canellila* encontrados no presente estudo, o eugenol identificado, é proveniente do álcool coniferílico, um precursor da lignina, já o composto fenilacetaldéido

também encontrado nos óleos estudados, é derivado da fenilalanina por descarboxilação oxidativa e a remoção do grupo amino, esta mesma via sugerida para a síntese do principal composto destes óleos essenciais, o 1-nitro-2-feniletano, as moléculas oriundas desta via são chamadas de fenilpropanoides (PICHERSKY et al., 2006).

Outro grupo de moléculas voláteis que contém um anel aromático oriundas da fenilalanina são os benzenoides. A síntese destes compostos envolve o encurtamento da cadeia lateral de três carbonos da fenilalanina que também leva a moléculas aromáticas tais como benzaldeído e etilbenzeno (PICHERSKY et al., 2006). Estas moléculas também foram encontradas nos óleos essenciais de *A. canelilla* envolvidas nesta pesquisa. Embora ainda se tenha pouco conhecimento a respeito das enzimas e genes responsáveis pelas etapas metabólicas que levam a síntese de fenilpropanoides e benzenoides, os compostos voláteis aromáticos compondo mais de 90% do óleo essencial de *A. canelilla* indicam que, esta espécie investe mais na síntese destas moléculas o que não é comum em plantas produtoras de óleos essenciais deste gênero. Portanto, de acordo com as rotas metabólicas dos compostos aromáticos voláteis, a presença de pequenas quantidades dos compostos aromáticos etilbenzeno, benzaldeído, fenilacetaldéido e eugenol nos óleos essenciais pode indicar que estas moléculas sejam produtos finais da degradação da fenilalanina. Sendo assim, a fenilalanina é provavelmente a origem biosintética do composto 1-nitro-2-feniletano.

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, demonstrou-se que o óleo essencial das folhas de preciosa apresenta atividade como inibidor da melanogênese podendo ser candidato no tratamento de desordens de pigmentação. Além disso, não apresenta citotoxicidade nas concentrações utilizadas na linhagem celular em estudo.

7 REFERÊNCIAS

AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy”, Allured Publishing. 2007.

BAGAMBOULA, C. F.; UYTTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, v. 21, p. 33-42. 2004.

BRADFORD, M. M.; *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.

BRUM, L. F. S.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O.; ELISABETSKY, E. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical sinaptosomes. *Neurochemical Research*, v. 26, n. 3, p. 191–194, 2001.

CHAAR, J. S., 2000. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans**. São Carlos, p. 125 Tese (Doutorado) - Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2000.

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

CHOI, W.; MIYAMURA, Y.; WOLBER, R.; SMUDA, C.; REINHOLD, H.L.; KOLBE, L.; HEARING, V.J. Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, p. 1685–1696, 2010.

DA SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9422-9426, 2007.

DE LIMA, A.B., SANTANA, M.B., CARDOSO, A.S., DA SILVA, J.K., MAIA, J.G.M., CARVALHO, J.C., SOUSA,P.J., Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent component of *Aniba canelilla* essential oil. *Phytomedicine*, v. 16, p. 555–559, 2009.

HOSOI, J., ABE, E., SUDA, T., KUROKI, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research*, v. 45, p. 1474–1478, 1985.

HUANG,H-C.; HSU, T-F.; CHAO, H-L.; CHEN, C-C.; CHIU, S-W.; CHANG, T-M. Inhibition of melanogenesis in murine melanoma cells by *Agaricus brasiliensis* methanol

extract and anti-reactive oxygen species (ROS) activity. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, p. 519-524, 2014.

INTERAMINENSE, L. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 25, n. 6, p. 661-669, 2010

INTERAMINENSE, L. F. L.; RAMOS-ALVES, F. E.; SIQUEIRA, R.J.B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; MAIA, J. G. C.; SOUSA, P. J. C.; SAAD LAHLOU. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, p. 709–716, 2013.

KIRBY, J. E KEASLING, J. D., Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 60, p. 335–55. 2009.

LAHLOU, S; MAGALHÃES, P. J. C; SIQUEIRA, R. J. B; FIGUEIREDO, A. F; INTERAMINENSE, L.F.L; MAIA, J.G.S; SOUSA, P.J.C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. *Journal Cardiovascular Pharmacology* 46 (4). p. 412-421, 2005.

LIANG, C.; LIM, J-H.; KIM, S-H.; KIM, D-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chemistry*. v. 134, 2, p. 1146-1148. 2012.

LIMA, M. P., SILVA, T. M. D., SILVA, J. D., ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 329-330, 2004.

LUPE, F.A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2007.

MANHÃES, A. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M.; FERNANDES, K. S.; SAMPAIO, P. T. B. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. *Acta Amazonica*, v. 42, p. 355-362, 2012.

MATTOSO, E. **Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 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*, v. 21, p. 3342–3345, 2011.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente* v. 8, n. 1, p. 195-206. 2001.

OGER, J. M., RICHOMINEO, P., GUINAUDEAU, H., *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil: Analysis of chemical constituents, fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, v. 6, p. 493-497, 1994.

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

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

PEDROSA, T. **Avaliação do potencial de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e o envelhecimento cutâneo.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2012.

PEREIRA, I. C. **Fitoquímica e aspectos morfofisiológicos de *Aniba parviflora* (LAURACEAE) cultivadas no município de Santarém-PA.** 2012. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém. 2012.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, v. 311, p. 808–811, 2006.

PINTO, A.C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, P.N., EPIFANIO, R. A., Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p. 45-61, 2002.

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

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, p. 563-572, 2005.

RYAZANOVA, A. D.; ALEKSEEV, A. A.; SLEPNEVA, I. A. Phenylthiourea as inhibitor of enzymatic oxidation of DOPA. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 27, p. 78–83, 2012.

SARRAZIN, L. F. S.; MOURA, V. M.; AMAZONAS, D. A.; BARATA, L. E. S.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. **Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aniba rosaeodora* Ducke e *A. parviflora* (Lauraceae).** In: VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas. Livro de Resumos. São Paulo: Unicamp, p. 130, 2011

SILVA, G. F. **Estudo do potencial biotecnológico de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez para obtenção de cosméticos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SILVA, J. R. A.; CARMO, D. F. M.; LEON, L. L.; SILVA, B. O.; REIS, É. M. R.; FERREIRA, J. L. P.; MACHADO, G. M. C.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA, N. N. S.; SILVA, J. R. A.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of *Aniba parviflora* essential oil. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 84, p. 192-198, 2014.

SUGAWARA, Y.; HARA, C.; TAMURA, K.; FUJII, T.; NAKAMURA, K-I.; MASUJIMA, T.; AOKI, T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta*, v. 365 p. 293-299, 1998

TOMITA, Y. M. K.; TAGAMI, H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Research*, p. 357–361, 1992

VILLAREAL, M. O.; HAN, J.; YAMADA, P.; SHIGEMORI, H.; ISODA, H. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. *Experimental Dermatology*, v. 19, p. 450–457, 2010.

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

ZAIDI, K. U.; ALI, A. S.; ALI, S. A.; NAAZ, I. Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemistry Research International*, v. 2014, p. 1 – 16, 2014.

ZHONG, S. ; WU, Y.; SOO-MI, A.; ZHAO, J.; WANG, K.; YANG, S.; JAE-HO, Y.; ZHU, X. Depigmentation of Melanocytes by the Treatment of Extracts from Traditional Chinese Herbs: a Cell Culture Assay. *Biology and Pharmaceutical Bull.* v. 29, n.9, p. 1947-1951, 2006.

CAPÍTULO II**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS
EXTRATOS DE *ANIBA PARVIFLORA***

Atividade antioxidante dos extratos de *Aniba parviflora*

Nogueira, J. R.¹; Lima, E. S.²; Albuquerque, P. M.¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia,
Universidade do Estado do Amazonas

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas.

RESUMO

Aniba parviflora (macacaporanga) é uma árvore de médio porte nativa da região Amazônica, encontrada nos arredores de igarapés pertencente à família Lauraceae. É uma planta aromática, produtora de óleo essencial, mas com poucas propriedades biológicas descritas na literatura. Estudos com esta espécie são escassos e se resumem à identificação dos componentes químicos do seu óleo essencial. A fim de verificar o potencial dessa espécie para uso em cosméticos, este estudo tem por objetivo avaliar a capacidade antioxidante dos extratos e partições de folhas e galhos de *A. parviflora*. Os extratos foram obtidos por maceração em etanol e submetidos à partição com solventes de diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e fase resultante: hidroetanólica). As fases obtidas da partição foram avaliadas nos testes de captura dos radicais DPPH e ABTS e dosagem de fenóis e flavonoides. Estes ensaios foram usados como triagem para o teste antioxidante celular de citotoxicidade. As fases hidroetanólicas e acetato de etila tanto de folhas e quanto de galhos se destacaram pela intensa atividade antioxidante na inibição da oxidação do DPPH e do ABTS em baixas concentrações, além de apresentarem significativa quantidade de fenóis e flavonoides. O método da diclorofluoroceína confirmou a atividade antioxidante pela redução de EROs na concentração de 50 µg/mL sem apresentar citotoxicidade em queratinócitos na mesma concentração. Esse estudo comprova que esta espécie apresenta significativo potencial como ativo antioxidante para ser empregado na indústria cosmeceútica.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui a maior biodiversidade com cerca de 20% das espécies do planeta. A Amazônia brasileira é a maior floresta equatorial e tropical úmida e destaca-se pelo grande potencial exploratório para originar moléculas biologicamente ativas a partir de plantas (PINTO et al., 2002).

Aniba parviflora é uma espécie da família Lauraceae de médio porte, encontrada nos arredores de igarapés da floresta amazônica ocidental. Frequentemente confundida com o pau-rosa pela semelhança morfológica, esta espécie apresenta poucos estudos na literatura no que diz respeito às suas atividades biológicas. Sua casca é comercializada no mercado Ver-o-Peso, em Belém-PA, com o nome de macacaporanga ou louro rosa. Estudos com esta espécie são escassos e se resumem à identificação dos componentes químicos do seu óleo essencial (TRANCHIDA et al., 2008).

Em estudos anteriores foi demonstrado que o óleo essencial de *A. parviflora* possui potencial econômico no setor de perfumaria (MAIA et al., 2001; BATISTA, 2014). Visando ampliar as potencialidades de uso da macacaporanga, o presente estudo avaliou os extratos etanólicos e as fases hexano, diclorometano e acetato de etila quanto à atividade antioxidante.

Antioxidantes são substâncias que estabilizam os radicais livres por receber esse elétron desemparelhado, prevenindo assim os danos causados por eles. Os radicais livres têm sido há algum tempo relacionados à etiopatogenia de doenças graves como o câncer e ao envelhecimento (RATNAN et al, 2006).

Os radicais livres são moléculas com elétron desemparelhado no último orbital, isso os tornam instáveis e muito reativos. Para se tornarem estáveis precisam doar ou retirar um elétron de outra molécula. Os radicais livres gerados a partir do oxigênio são chamados de Espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies causam dano celular, e o mais comum é

oriundo da peroxidação dos ácidos graxos constituintes da bicamada lipídica (HIRATA, 2004; CHANDA e DAVE, 2009). Compostos fenólicos como os ácidos fenólicos e flavonoides, presentes em produtos vegetais, estão associados constantemente a atividade antioxidante por serem doadores de hidrogênio e eliminadores de oxigênio singlete (SOUSA et al., 2007; RAZAVI et al., 2008).

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Coleta do material vegetal

Galhos finos (± 3 cm de diâmetro) e folhas das espécies *A. parviflora* foram coletados na Fazenda Pematec Santarém-PA no período chuvoso. O material vegetal foi utilizado separadamente para a produção do extrato etanólico. Foi coletado ainda, material vegetal para produção de exsiccatas para identificação da planta, realizada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), com o número de registro 254.490.

2.2 Produção dos extratos

Após os processos de secagem e moagem, o material vegetal (folhas e galhos) foi macerado com álcool etílico de cereais 92,8° em temperatura ambiente, sendo a extração realizada em três ciclos de 72 h, totalizado um período de nove dias, onde a cada 72 h o material vegetal foi filtrado e um novo solvente adicionado a este. Por fim, os filtrados foram submetidos ao rotaevaporador, sob pressão reduzida a 40°C, até a retirada total do solvente (SILVA, 2012). O extrato bruto resultante foi dissolvido em etanol-água (1:3) e submetido à partição líquido-líquido, utilizando primeiramente o hexano, seguido de diclorometano e acetato de etila. Após a partição foram obtidas fases solúveis em hexano,

diclorometano, e acetato de etila, as quais foram rotaevaporadas, e uma fração hidroalcoólica que foi liofilizada. O rendimento do extrato bruto foi calculado pela fórmula:

$$\text{Rend.} = \frac{P_{\text{ext}}}{P_{\text{m.v.}}} \times 100$$

Onde:

Rend = Rendimento total do extrato (%)

P_{ext} = Peso do extrato seco (g)

$P_{\text{m.v}}$ = Peso do material vegetal (g)

2.3 Ensaio antioxidante frente a radicais livres

2.3.1 Método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Para avaliar o potencial antioxidante das amostras utilizou-se o método descrito por Molyneux et al., (2004) adaptado para microplacas. Foram pesados 2 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto. Para o teste, foram adicionados 30 μL das diluições das partições dos extratos, nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 $\mu\text{g/mL}$, e 270 μL da solução de DPPH. A placa permaneceu incubada ao abrigo da luz por 30 minutos e após esse período, realizou-se a segunda leitura da absorbância (A_2) e mensurou-se a redução do radical livre DPPH a 492 nm no leitor DTX 800 (Beckman Coulter). Como controle negativo utilizou-se 30 μL de etanol e 270 μL de solução de DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH, calculado segundo a equação abaixo (onde A_1 = absorbância 1 e A_2 = absorbância

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

2.3.2 Método do ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico))

Para avaliar o potencial antioxidante das amostras também utilizou-se o método descrito por Re et al. (1999) com algumas adaptações. 10 mg de ABTS foram dissolvidos em 5 mL de água ultrapura, sendo adicionados 5 mL de uma solução de persulfato de potássio a 5 mM. Depois de misturada e homogeneizada, a solução foi mantida num frasco âmbar pelo mínimo de 16 horas, protegido da luz. Após isso, o ABTS adquire coloração esverdeada e para o uso é realizada uma diluição com 10 mL de etanol 96° ou até que a absorbância fique em torno de 1,0. Para o teste foram adicionados na placa 30 µL das partições dos extratos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 µg/mL, e 270 µL da solução de ABTS. Depois da incubação foi realizada leitura em 492 nm no leitor DTX 800 (Beckman Coulter). Como controle negativo utilizou-se 30 µL de etanol e 270 µL de solução de ABTS.

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

2.4 Triagem fitoquímica dos extratos de *Aniba parviflora*

Para a prospecção fitoquímica preliminar das partições dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora* foi utilizada a metodologia de Matos (2009). Para cada procedimento realizado foram preparadas soluções contendo 0,01g das amostras, diluídas em 20 mL de álcool etílico, separadamente.

Os ensaios realizados consistiram em testes para verificar a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas e taninos/fenóis.

2.4.1 Teste para alcaloides

Em um tubo de ensaio com 2 mL das amostras de *A. parviflora* acrescentaram-se três gotas do reagente de Dragendorff para a observação da presença de precipitado (precipitado loculoso é indicativo de reação positiva).

2.4.2 Teste para esteroides

Foi realizada a reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 2 mL da amostra e misturando-a a 2 mL de clorofórmio. A solução clorofórmica foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro em um tubo de ensaio. Em seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentou-se três gotas de H₂SO₄ concentrado observando-se se há o desenvolvimento de cores: coloração azul seguida de verde permanente indica presença de esteroides livres.

2.4.3 Teste para flavonoides

Foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg). Para isso adicionou-se a 2 mL da amostra, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita e 2,00 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação é determinado pelo término de efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha.

Além disso, para a confirmação dos resultados obtidos a partir do teste de cianidina, foi realizado o teste de alcalinização dos extratos utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3 mL das amostras de *A. parviflora* em um tubo de ensaio, até um pH de 11, observando-se a mudança de cor. O aparecimento de cores diversas indica a presença de vários constituintes: amarela para flavonas, flavonóis e xantonas e vermelho laranja para flavonóis.

2.4.4 Teste para saponinas

Para determinação da presença de saponinas nas amostras foram misturados 2 mL de clorofórmio junto a 2 mL de amostra e 5 mL de água destilada. Em seguida, foi separada a

fração aquosa e depois agitada para observação de uma possível formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativo da presença de saponinas.

2.4.5 Teste para fenóis e taninos

Para determinação da presença de taninos, em um tubo de ensaio contendo 2 mL de amostra foram adicionados três gotas de FeCl_3 . Após forte agitação foi observado a mudança de cor ou formação de precipitado abundante. Coloração entre azul e vermelho indica presença de fenóis e precipitado escuro de tonalidade azul ou verde indica a presença de taninos.

2.5 Quantificação de fenóis totais

A determinação quantitativa de fenóis totais presentes nas amostras foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu. Inicialmente foram adicionados 10 μL das partições dos extratos nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 $\mu\text{g/mL}$, e 50 μL da solução de Folin-Ciocalteu (1:10) em microplacas, sendo incubadas por 8 minutos. Logo após, foi adicionado carbonato de sódio a 0,4% e novamente incubou-se por 3 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura no leitor de microplaca DTX 800 (Beckman Coulter) a 715 nm. O teor de fenóis totais foi determinado através de uma curva de calibração utilizando ácido gálico como padrão (Anexo A) (7,8125 a 500 $\mu\text{g/mL}$) (SINGLETON, ORTHOFER e LAMUELA-RAVENTOS, 1999).

2.6 Quantificação de flavonoides totais

A determinação quantitativa de flavonoides totais presentes nas amostras foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Dewanto et al. (2002) com algumas adaptações. Inicialmente foram adicionados 30 μL das partições dos extratos nas

concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5625 $\mu\text{g/mL}$ a 90 μL de etanol PA. Realizou-se a primeira leitura da absorbância em 405 nm e então foram adicionados 6 μL de cloreto de alumínio, 6 μL acetato de potássio e 169 μL de etanol PA. Incubou-se por 30 minutos e realizou-se a leitura final em uma leitora DTX 800 (Beckman Coulter) a 405 nm. A concentração total de flavonoides foi estimada conforme a curva de calibração da quercetina (Anexo B).

2.7 Capacidade antioxidante em J774

Foram cultivadas 1×10^4 células por poço em placa de 96 poços. Após 24 horas o meio foi removido e os poços lavados com PBS e as células tratadas com 100 μL de tampão de Hanks contendo 10 μmol de diclorofluoresceína. Após 30 minutos de incubação, a solução foi descartada e as células lavadas com PBS. Em seguida foram adicionadas as amostras nas concentrações de 6,25; 12,5; 25; 50 $\mu\text{g/mL}$, e iniciadas imediatamente as leituras no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) com excitação em 485 nm e emissão em 535 nm a cada 5 minutos, até 60 minutos. Como padrão para o teste foi utilizada a quercetina na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$. Primeiramente foi calculado o ΔF das amostras (fluorescência aos 60 minutos – fluorescência aos 0 minutos) e os resultados então foram expressos em unidades de fluorescência comparados ao controle negativo (WOLFE e LIU, 2007).

2.8 Viabilidade celular pelo Alamar blue em HACAT

Para avaliar a viabilidade celular foram plaqueadas 1×10^4 células por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de incubação, os poços foram tratados com concentrações das partições dos extratos de 100; 50; 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$, em triplicata. Passado 72 horas de exposição foi realizada a leitura da placa antes da adição do Alamar Blue (resazurina) como branco da reação e depois então adicionados 10 μL da solução de uso de Alamar Blue

(solução estoque a 0,4%) diluído a 1:20 em meio DMEM. Como controle negativo foram lidos poços sem amostras. Após o tempo de metabolização da resazurina (2 horas), foi realizada a leitura da fluorescência em leitora de microplaca (AHMED et al. 1994).

A viabilidade celular foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\%viabilidade = \frac{\Delta Ft}{\Delta Ft} \times 100$$

2.9 Análise estatística

Todos os dados foram expressos em média \pm desvio padrão. A determinação da CI_{50} foi realizada pelo método de regressão linear simples, usando o programa Origin®. A análise estatística dos testes de capacidade antioxidante em J774 foi realizada usando o programa GraphPad Prism 5 One-way ANOVA com teste de Tukey ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Rendimento dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*

A extração de folhas e galhos de *A. parviflora* foi realizada por maceração a frio com álcool de cereais. Foram utilizados 300 g de material vegetal moído de folhas e galhos. A quantidade obtida de extrato bruto etanólico de folhas foi de 40,521 g e para galhos 30,766 g, caracterizando um rendimento de 13,5% e 10,25%, respectivamente.

3.2 Atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS

A atividade antioxidante das partições dos extratos de *A. parviflora* está descrita na Tabela 1. Observa-se atividade intensa das partições hidroetanólicas e do solvente acetato de etila de folhas e galhos. As CI_{50} mais baixas indicam a alta atividade antioxidante.

Tabela 1 – Resultados da avaliação da atividade antioxidante das fases obtidas dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora* frente aos radicais DPPH e ABTS. Resultados expressos em CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de três experimentos \pm desvio padrão. Ácido gálico foi utilizado como padrão.

Amostras	DPPH	ABTS
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
HEF	23,79 \pm 4,17	36,45 \pm 1,60
HEG	26,70 \pm 4,19	26,22 \pm 0,03
ACF	33,16 \pm 4,12	30,44 \pm 0,20
ACG	31,31 \pm 4,15	25,90 \pm 2,23
DCF	>100	>100
DCG	>100	>100
HXF	>100	79,13 \pm 8,68
HXG	>100	>100
Ácido gálico	11,92 \pm 2,13	6,61 \pm 0,21

HEF = Partição hidroetanólica de folhas; HEG = Partição hidroetanólica de galhos; ACF = Partição acetato de etila de folhas; ACG = Partição acetato de etila de galhos; DCF = Partição diclorometano de folhas; DCG = Partição diclorometano de galhos; HXF = Partição hexânica de folhas; HXG = Partição hexânica de galhos.

A Figura 1 mostra a curva analítica da atividade antioxidante do padrão ácido gálico frente os radicais DPPH e ABTS. A curva das atividades antioxidantes das fases dos extratos que apresentaram os melhores resultados (HEF, HEG, ACF, ACG), ou seja, as CI_{50} mais baixas estão expressas nas Figuras 2 e 3.

Figura 1 - Curva de inibição da oxidação dos radicais DPPH (A) e ABTS (B) pelo padrão ácido gálico.

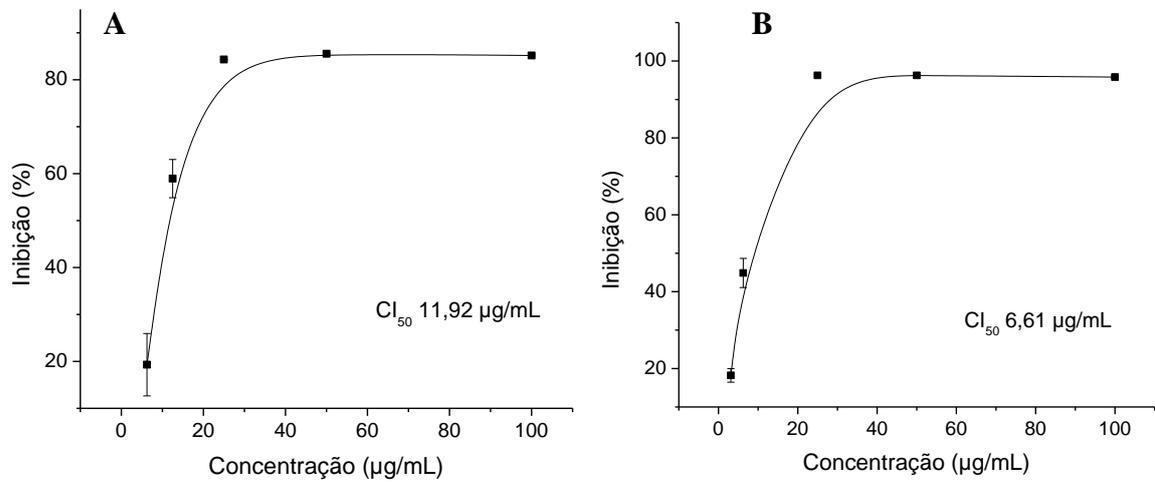


Figura 2 - Atividade antioxidante frente ao radical DPPH das fases dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*. Em A: fase hidroetanólica de folhas (HEF); em B: fase hidroetanólica de galhos (HEG); em C: fase acetato de etila de folhas (ACF); e em D: fase acetato de etila de galhos.

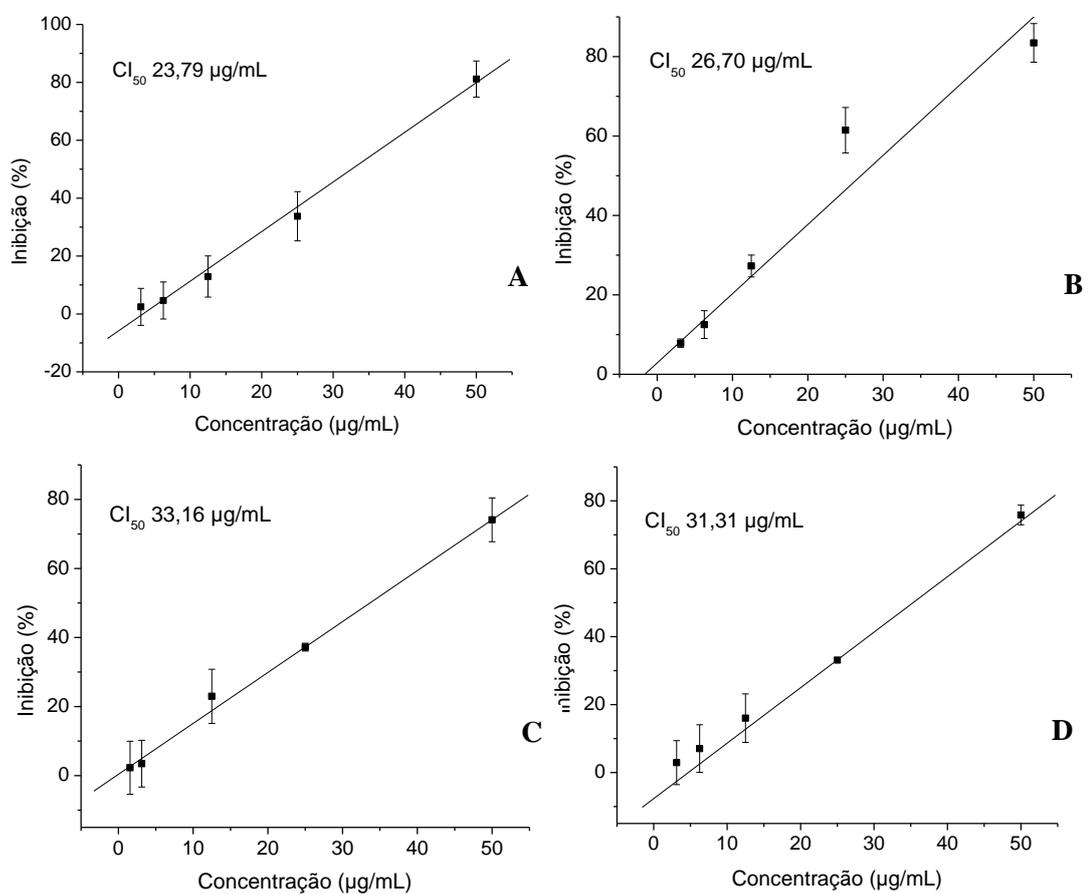
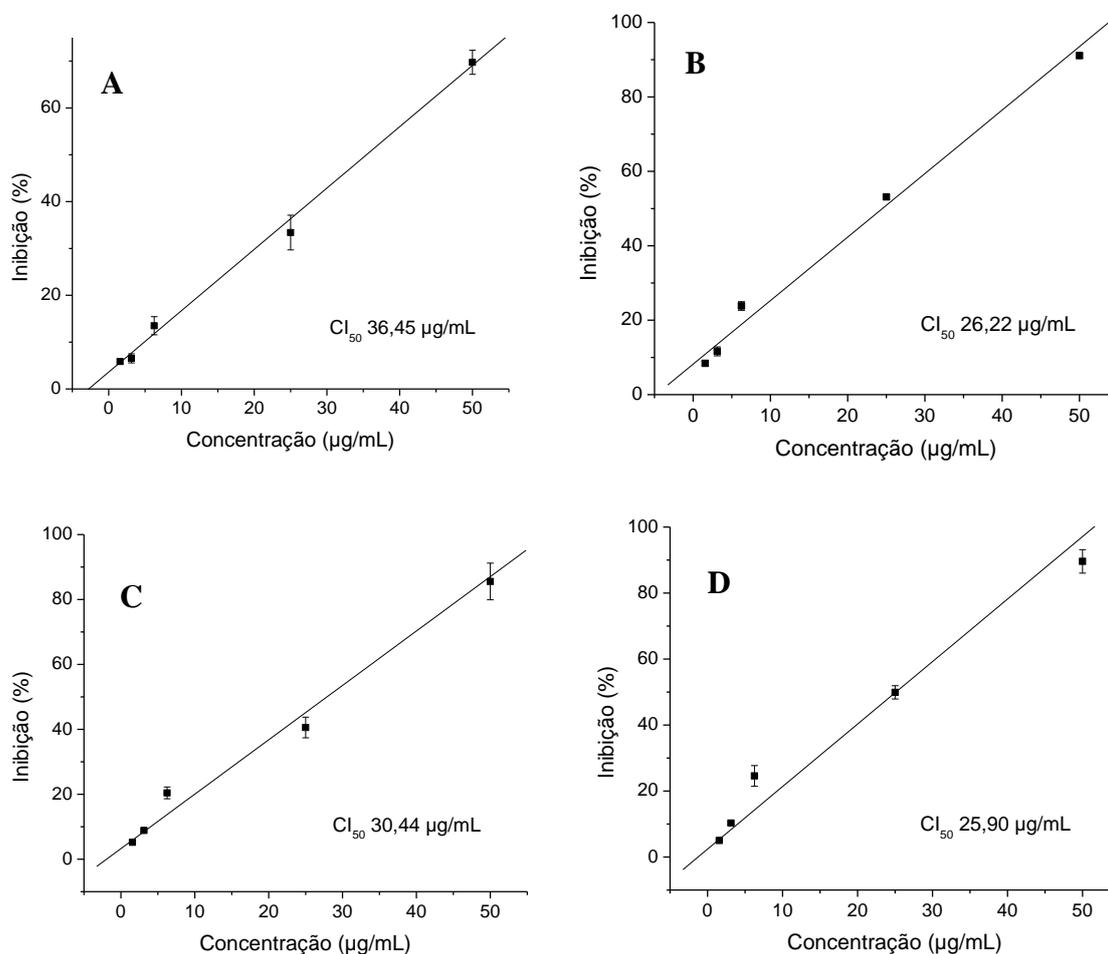


Figura 3 - Atividade antioxidante frente ao radical ABTS das fases dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*. Em A: fase hidroetanólica de folhas (HEF); em B: fase hidroetanólica de galhos (HEG); em C: fase acetato de etila de folhas (ACF); e em D: fase acetato de etila de galhos.



3.3 Triagem fitoquímica

A realização de uma pesquisa fitoquímica preliminar tem por objetivo conhecer os grupos de metabólitos secundários presentes nas espécies vegetais, podendo a mesma ser direcionada a uma classe específica de constituintes ou substâncias responsáveis por determinada atividade biológica. Na Tabela 2 estão mostrados os constituintes encontrados nas fases hidroetanólicas e acetato de etila de folhas e galhos de *A. parviflora* que apresentaram atividade antioxidante.

Tabela 2 - Resultados dos testes de triagem fitoquímica para as partições dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora* com atividade antioxidante.

Amostras	Taninos e fenóis	Alcaloides	Flavonoides	Saponinas	Esteroides e triterpenos
HEG	+	+	+	+	-
HEF	+	-	+	+	+
ACG	+	-	+	+	-
ACF	+	-	+	+	-

HEF = Fase hidroetanólica de folhas; HEG = Fase hidroetanólica de galhos; ACF = Fase acetato de etila de folhas; ACG = Fase acetato de etila de galhos.

3.4 Fenóis e flavonoides totais

A Tabela 3 mostra a porcentagem de fenóis e flavonoides presentes nas partições dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora* que apresentaram atividade antioxidante.

Tabela 3 – Conteúdos totais de compostos fenólicos e flavonoides das fases dos extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*. Valores expressos em médias de equivalentes de ácido gálico (EAG) para fenóis e equivalentes de quercetina (EQU) para flavonoides de três experimentos \pm desvio padrão.

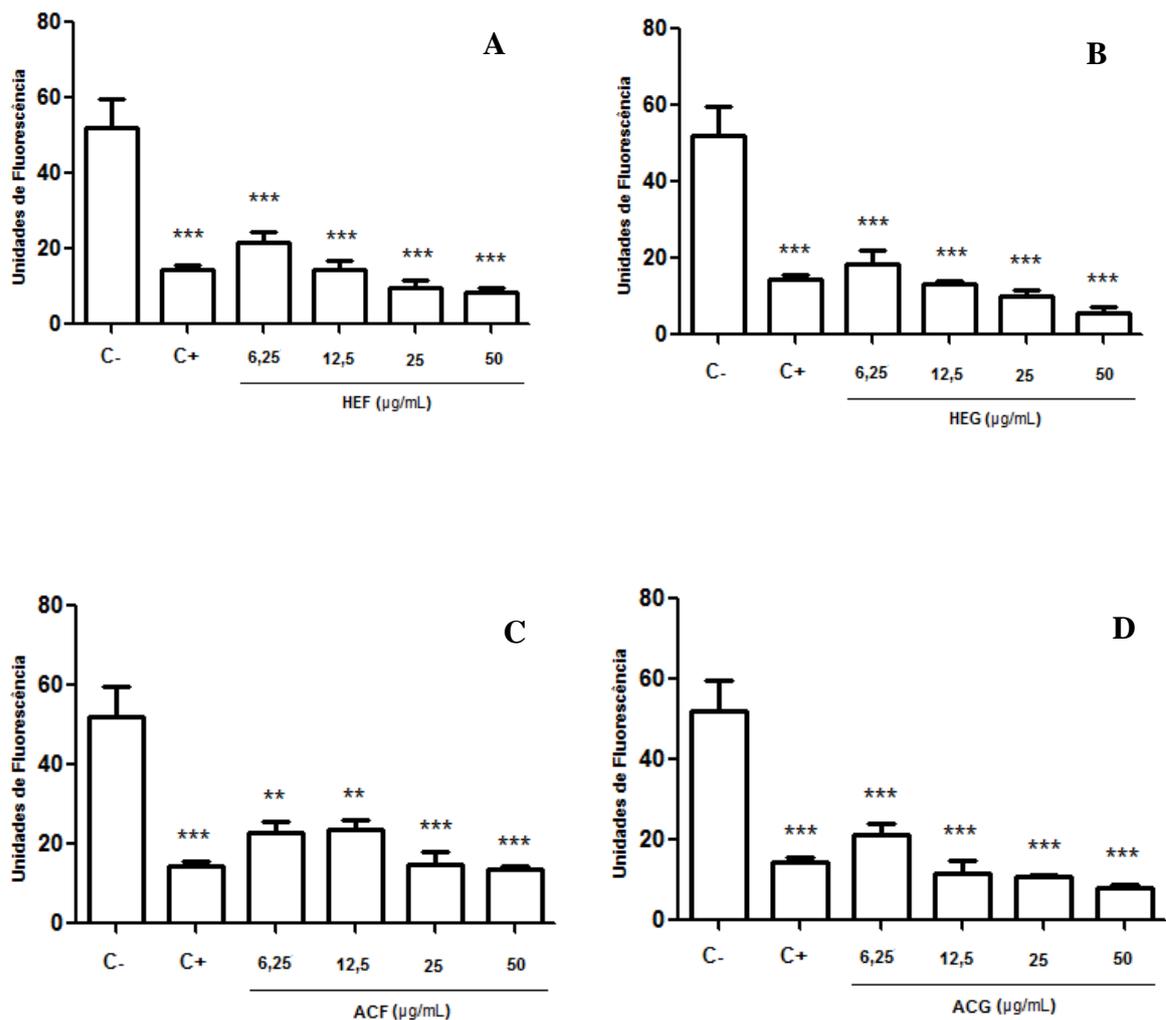
Amostras	Fenóis	Flavonoides
	(mg EAG/g de extrato)	(mg EQU/g de extrato)
HEF	91,34 \pm 3,57	24,60 \pm 1,22
HEG	178,47 \pm 0,73	1,17 \pm 0,34
ACF	75,22 \pm 0,64	14,02 \pm 0,44
ACG	87,04 \pm 1,79	9,85 \pm 0,74

HEF = Fase hidroetanólica de folhas; HEG = Fase hidroetanólica de galhos; ACF = Fase acetato de etila de folhas; ACG = Fase acetato de etila de galhos.

3.5 Capacidade antioxidante em células J774

A atividade antioxidante das partições dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora* em células está expressa na Figura 4.

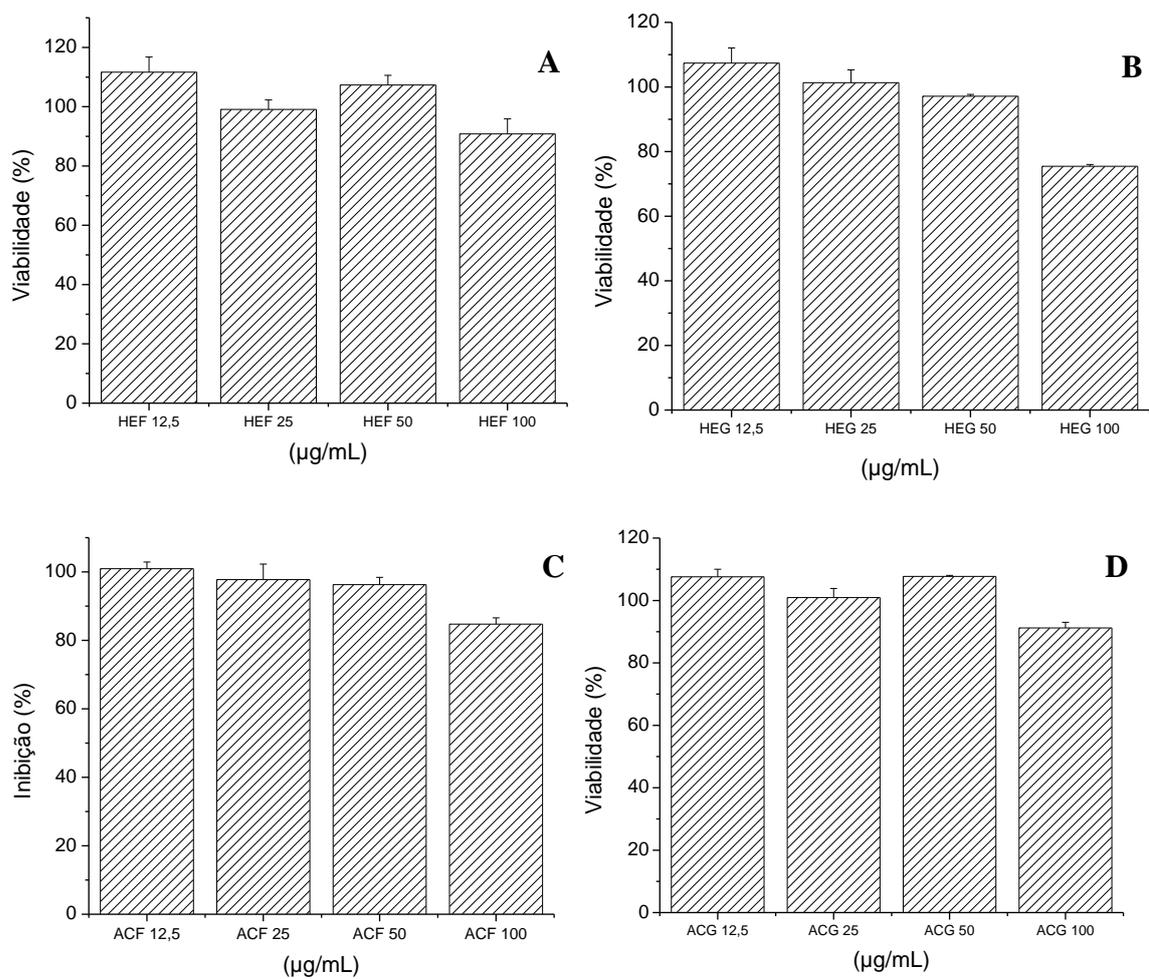
Figura 4 – Atividade antioxidante das partições das fases de *Aniba parviflora* pelo método da diclorofluoroceína. Os valores estão expressos em média \pm desvio padrão. Amostras apresentam diferença significativa em relação ao controle negativo (C-) para $p < 0.01^{***}$. Em A: fases hidroetanólica de folhas (HEF); em B: fase hidroetanólica de galhos (HEG); em C: fase acetato de etila de folhas (ACF) e em D: fase acetato de etila de galhos (ACG). Quercetina a 5 $\mu\text{g/mL}$ foi utilizada como padrão (C+).



3.6 Viabilidade Celular

Na Figura 5 estão representadas as viabilidades de queratinócitos (HACAT) no período de 72 horas de tratamento com as fases dos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora*.

Figura 5 – Viabilidade celular de queratinócitos (HACAT) frente às fases de extratos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*. Em A: fase hidroetanólica de folhas (HEF); em B: fase hidroetanólica de galhos (HEG); em C: fase acetato de etila de folhas (ACF) e em D: fase acetato de etila de galhos (ACG).



4 DISCUSSÃO

Este trabalho realizou um estudo da atividade antioxidante de extratos de *A. parviflora*. Com o intuito de selecionar as partições mais ativas do extrato para os testes celulares, inicialmente foi avaliada a capacidade de varredura dos radicais DPPH e ABTS. O princípio do ensaio do DPPH se baseia na transferência de elétron de um composto antioxidante para um radical livre, no caso o DPPH•, de coloração violeta. No momento que o mesmo reduz ele perde sua coloração púrpura adquirindo coloração amarelada. (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O método do ABTS está baseado na habilidade dos antioxidantes em capturar o cátion ABTS•+. Esta captura provoca um decréscimo na absorbância, que é lida a partir da mistura do radical com o antioxidante em diferentes tempos (PÉREZ-JIMÉNEZ e SAURA-CALIXTO, 2006). Como padrão antioxidante foi utilizado o flavonoide ácido gálico para fins de comparação.

As partições hidroetanólicas e acetato de etila de galhos e folhas apresentaram as CI_{50} mais baixas, por isso foram selecionadas para os testes subsequentes. Para se conhecer a composição química qualitativa dessas partições foi realizada a triagem fitoquímica que é um método rápido e de baixo custo, que possibilita identificar as classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico que estão presentes em determinada espécie vegetal.

Dessa forma, o estudo fitoquímico de *A. parviflora* revelou a presença de fenóis, taninos, flavonoides e saponinas nas fases hidroetanólicas e acetato de etila.

As classes de metabólitos encontrados nessa espécie possuem potencial biológico reconhecido. Taninos são substâncias fenólicas com atividade antimicrobiana e potencial anticarcinogênica (MONTEIRO, ALBUQUERQUE e ARAÚJO, 2005). As saponinas, por sua vez, são uma classe de compostos com ampla distribuição no reino vegetal, com potencial imunoadjuvante e hemolítico já reconhecido (SIMÕES, 2006). Da mesma forma, os

flavonoides são compostos aromáticos, com inúmeras atividades biológicas descritas, entre elas o potencial vasoprotetor, anti-inflamatório, antitumoral, e destacando-se principalmente o potencial antioxidante (SOUZA; MELLO e LOPES, 2011).

Outros componentes encontrados ainda foram esteroides e triterpenos no extrato HEF e alcaloides no extrato HEG.

Para conhecer o teor de fenóis totais dos extratos foi realizado o método de Folin Ciocalteu que permite quantificar compostos que tem a capacidade de ligar-se a radicais livres, inibindo processos oxidativos. Não há outros estudos publicados com a quantificação de fenóis e flavonoides desta espécie, porém, comparando a um estudo realizado com outras espécies da família Lauraceae (*Aniba panurensis*, *Licaria cannella* e *Licaria martiniana*) verifica-se que a fase hidroetanólica do extrato obtido dos galhos de macacaporanga possui maior quantidade de fenóis do que os extratos etanólicos das espécies *A. panurensis* e *L. cannella*. Somente extrato de galhos de *L. martiniana* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos ($184,82 \pm 3,34$ mg EAg/g) (MELLO, ALCÂNTARA E VEIGA-JUNIOR, 2001).

O ácido gálico é um composto fenólico. Os fenóis são conhecidos por sua atividade antioxidante e, portanto, foi utilizado como padrão para estes testes (BROINIZI et al., 2007). A quercetina é um flavonoide conhecido por suas propriedades sequestrantes de radicais livres e quelante de íons metálicos. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxila (OH) e o ânion superóxido (O₂⁻).

Os flavonóis constituem uma importante classe de polifenóis, presentes entre os metabólitos secundários de vegetais. Apesar de não haver confirmação dos responsáveis pela atividade antioxidante, os compostos fenólicos podem ser os responsáveis por tal, pois apresentam propriedades de oxirredução e são muito comuns em espécies vegetais (SOUSA et al., 2007).

Nossos estudos constataram uma redução significativa na produção de EROs de mais de 80% na maior concentração (50 µg/mL), com exceção de ACF (73%) comparado ao controle negativo. O padrão utilizado, a quercetina, demonstrou capacidade antioxidante como já relatada por WOLF e LIU (2007) em hepatócitos da linhagem HepG2.

Apesar de não ser possível inferir com exatidão quais compostos são responsáveis pela atividade antioxidante de *A. parviflora*, pode-se relaciona-la à presença de fenóis e flavonoides com grupos doadores de hidrogênio ou elétrons na sua estrutura, verificada na triagem fitoquímica. Pesquisas relatam diferentes atividades biológicas atribuídas para esta classe de compostos, destacando-se como potentes antioxidantes (ALVES et al., 2007).

Além disso, compostos fenólicos tem afinidade por solventes polares, devido a presença de hidroxilas que aumentam a sua polaridade o que explica porque as partições hidroetanólicas e de acetato de etila apresentaram maior atividade antioxidante em comparação com as partições obtidas solvente mais apolares (FURLONG et al., 2003).

Outras espécies do mesmo gênero já demonstraram atividade antioxidante frente ao radical DPPH, como o extrato metanólico de tronco de *A. canelilla* (CI₅₀ de 43,7 ± 0,14 em uma amostra e CI₅₀ de 44,4 ± 0,10 µg/mL em outra amostra) (DA SILVA et al., 2007).

Segurança é a palavra-chave quando se trata de produtos cosméticos (LIANG et al. 2012). Nossos resultados pelo ensaio de Alamar Blue mostram que as frações mais ativas de *A. parviflora* não afetaram a viabilidade celular até no período crônico de exposição da célula ao extrato, ou seja, em 72 horas de tratamento.

Os queratinócitos foram escolhidos para nossos ensaios de viabilidade por serem as células mais abundantes da epiderme (COSTIN e HEARING 2007). Esse resultado mostra, portanto, que tais frações não apresentam toxicidade para o uso sobre a pele nestas concentrações.

5 CONCLUSÃO

Tendo em vista os resultados apresentados, verifica-se que as fases hidroetanólicas e acetato de etila de folhas e galhos de *A. parviflora* apresentam significativa atividade antioxidante, sem apresentar citotoxicidade. Para tais propriedades, abre-se espaço para uma série de perspectivas de exploração industrial desses metabólitos, nas áreas fitoterápica e cosmética.

6 REFERÊNCIAS

ALVES, C. G.; BRANDÃO, H. N. DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos e Ciência**, n.12. 2007.

BATISTA, L. T. **Atividade biológica e obtenção de um fitocosmético do óleo essencial e de extratos de *Aniba parviflora* (Meisn) Mez. (Lauraceae)**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2014.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 27, n. 4, p. 902-908, out.-dez. 2007.

CHANDA, S.; DAVE, R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. **African Journal of Microbiology Research**, v. 3, n. 13, p. 981-996. 2009.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. **The FASEB Journal**, v. 21, p. 976-994, 2007.

DA SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 9422-9426, 2007.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K; LIU, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v. 50, p. 3010-4, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, n. 26, v. 2, p. 446-452, abr.-jun. 2006.

FURLONG, E. B.; COLLA, E.; BORTOLATO, D. S.; BAISCH, A. L. M.; SOUZA-SOARES, L. A. Avaliação do potencial de compostos fenólicos em tecidos vegetais. *Vetor*, v. 13, p. 105-114, 2003.

HIRATA, L. L.; SATO, M.E.O; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.23, p. 418-24, 2004.

KIM, M-S.; LEE, S. R.; HO, H. S.; KIM, D. H.; CHANG, S.; CHUNG, J. H. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clinica Chimica Acta*, v. 362, p. 161–169, 2005.

LIANG, C.; LIM, J-H.; KIM, S-H.; KIM, D-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chemistry*. v. 134, 2, p. 1146-1148. 2012.

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza, 3º ed., p: 150, 2009.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.26, p. 211-216, 2004.

MELLO, T. S., ALCÂNTARA, J. M., VEIGA-JUNIOR, V. F. Avaliação da atividade antioxidante de espécies amazônicas dos gêneros *Aniba* e *Licaria* (Lauraceae). **32º Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v. 39, p. 791-800, 2006.

PINTO, A.C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, P.N., EPIFANIO, R. A., Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p. 45-61, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine*, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RATNAN, D. Venkat; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N.V. Ravi. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 1-5. 2008.

SILVA, G. F. **Estudo do potencial biotecnológico de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez para obtenção de cosméticos**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC. p. 1104, 2006.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D. BARROS E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

SOUZA, G. H. B; MELLO, J. P. C.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. Ouro Preto: ed. UFOP, 2011. BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SINGLETON V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, v. 299, p. 152-177, 1999.

TRANCHIDA, P. Q.; SOUZA, R. C. Z.; BARATA, L. E. S.; MONDELLO, M.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Analysis of macacaporanga (*Aniba parviflora*) leaf essential oil by using comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry. *Chromatography Today*, v, 95, p. 5-9, 2008.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 55, v. 22, p. 8896-8907, 2007.

4 CONCLUSÃO GERAL

- O óleo essencial de *A. canelilla* se mostrou promissor como agente despigmentante da pele superando inicialmente as outras espécies de Lauraceae no teste de triagem da tirosinase. Posteriormente, se destacou pela inibição da enzima tirosinase e redução do teor de melanina em células de melanoma murino sendo superior ao padrão feniltiouréia. Além disso, não apresentou citotoxicidade na espécie em estudo.
- Por meio da identificação química do óleo das folhas de *A. canelilla* por CG-EM, comprovou-se que o componente majoritário é o 1-nitro-2-feniletano, porém, outros estudos a fim de identificar a molécula bioativa ainda são necessários.
- Dentre as oito fases de *A. parviflora* avaliada, as fases hidroetanólicas e acetato de etila de folhas e galhos apresentaram as melhores atividades antioxidantes nos testes de triagem pelos métodos do DPPH e ABTS. Essas fases tiveram seus teores de fenóis e flavonoides dosados e sua atividade antioxidante foi comprovada através do teste de capacidade antioxidante em macrófagos onde ocorreu o decréscimo significativo da produção de EROs. Essas amostras não apresentaram citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R.P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy”, Allured Publishing. 2007.
- AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [³H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- ALVES, C. G.; BRANDÃO, H. N. DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos e Ciência*, n.12. 2007.
- ARRUDA-BARBOSA, L.; RODRIGUES, K. M. S.; SOUZA-NETO, F. C. V.; G. P.; DUARTE,; BORGES, R. S.; MAGALHÃES, P. J. C.; SAAD LAHLOU. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethene in rat isolated aortic rings. *Vascular Pharmacology*, v. 63, p. 55–62, 2014.
- ALLEMANN, I. B.; BAUMANN, L. Botanicals in skin care products. *International Journal of Dermatology*, v. 48, p. 923–934, 2009.
- ALVIANO, W. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; ALVIANO, D. S. BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRÓN, T.; RODRIGUES, M. L.; BOLOGNESE, A. M.; ALVIANO, C. S.; SOUZA, M. M. G. Antimicrobial activity of *Croton cajucara* Benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. *Oral Microbiology Immunology*, v. 20, p. 101–105, 2005.
- ANGÉLICO, E. C. **Avaliação das atividades antibacterianas e antioxidante de *Croton heliotropifolius* Kunt e *Croton blanchetianus* Baill.** Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Centro de Saúde Tecnologia Rural. Universidade Federal de Campina Grande. Patos. 2011.
- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia de controle de qualidade de produtos cosméticos. 2.ed., Brasília. 2008.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46: p. 446-475. 2008.
- BAGAMBOULA, C. F.; UYTENDAELE, M.; DEBEVERE, J. Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, v. 21, p. 33-42. 2004.
- BARCELOS, A. C.; BARATA, L. E. S.; MAGALHÃES, A. **Diferenciação entre as folhas e óleos essenciais de *Aniba parviflora* e de *Aniba rosaeodora* via RMN e CG-MS.** In: 35ª REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA. Águas de Lindóia, São Paulo, 2012.
- BATISTELA, M. A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n. 2, p. 59-62, 2007.

BETTS, T.J., Chemical characterisation of the different types of volatile oil constituents by various solute retention ratios with the use of conventional and novel commercial gas chromatographic stationary phases. *Journal of Chromatography A*, v. 936, p. 33–46, 2001.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Review: Structure of the skin barrier and its modulation, by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p.1–36, 2003.

BRADFORD, M. M.; *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248, 1976.

BRITO, T. S.; LIMA, F. J. B.; ARAGÃO, K. S.; SIQUEIRA, R. J. B. SOUSA P. J. C; MAIA, J. G. S.; FILHO, J. D.; LAHLOU, S.; MAGALHÃES, P. J. C. The vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane involve stimulation of the soluble guanylate cyclase-cGMP pathway. *Biochemical Pharmacology*, v. 85, p. 780-788, 2013.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, n. 27, n. 4, p. 902-908, out.-dez. 2007.

BURTON, G. J., JAUNIAUX, E. Oxidative stress. Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology, v. 25 p. 287–299, 2011.

BRUM, L. F. S.; EMANUELLI, T.; SOUZA, D. O.; ELISABETSKY, E. Effects of linalool on glutamate release and uptake in mouse cortical sinaptosomes. *Neurochemical Research*, v. 26, n. 3, p. 191–194, 2001.

CHAAR, J. S., 2000. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei* Kostermans**. São Carlos, p. 125 Tese (Doutorado) --Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2000.

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

CHANDA, S.; DAVE, R. *In vitro* models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: An overview. *African Journal of Microbiology Research*, v. 3, n. 13, p. 981-996. 2009.

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

CHOI, W.; MIYAMURA, Y.; WOLBER, R.; SMUDA, C.; REINHOLD, H.L.; KOLBE, L.; HEARING, V.J. Regulation of human skin pigmentation in situ by repetitive UV exposure: molecular characterization of responses to UVA and/or UVB. *Journal of Investigative Dermatology*, v.130, p. 1685–1696, 2010.

COSTIN, G.E.; HEARING, V.J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *The Faseb Journal*, v. 21, p. 976-994, 2007.

DA SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, p. 9422-9426, 2007.

DE LIMA, A. B., SANTANA, M.B., CARDOSO, A.S., DA SILVA, J.K., MAIA, J.G.M., CARVALHO, J.C., SOUSA,P.J., Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent component of *Aniba canelilla* essential oil. *Phytomedicine*, v. 16, p. 555–559, 2009.

DEWANTO, V.; WU, X.; ADOM, K.K; LIU, R.H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *Journal of Agriculture Food and Chemistry*, v. 50, p. 3010-4, 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH•. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, n. 26, v. 2, p. 446-452, abr.-jun. 2006.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. pt. 2. 4 ed. São Paulo: Atheneu, p. 146, 2010.

FIDELIS,C. H.V.; SAMPAIO, P. T. B.; KRAINOVIC, P. M.; F. A.; BARATA, L.E.S. Correlation between maturity of tree and GC \times GC–qMS chemical profiles of essential oil from leaves of *Aniba rosaeodora* Ducke. *Microchemical Journal*, v. 109, p. 73–77, 2013.

GALAVERNA, R. S.; SAMPAIO, P. T.; BARATA, L. E. S.; EBERLINA, M. N.; FIDELIS, C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian Aniba species by mass spectrometry leaf fingerprinting. *Analytical Methods*, v. 7, p. 1984–1990, 2015.

GONCHOROSKI, D. D.; CÔRREA G. M. Tratamento de hiperchromia pós-inflamatória com diferentes formulações clareadoras. *Infarma*, v.17, p. 84-88, 2005.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, v. 11, p. 1537-1570, 1972.

HAAKE, A.; SCOTT, G.A.; HOLBROOK, K.A. Structure and function of the skin: overview of the epidermis and dermis. FREINKEIL,R.K.; WOODLEY, D.T In: **The Biology of the Skin**, 1 ed. New York: The Parthenon Publishing Group p.15-17, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence?" *The Lancet*, v. 344, n. 8924, p. 721–724, 1994.

HIRATA, L. L.; SATO, M.E.O; SANTOS, C. A. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.23, p. 418-24, 2004.

HOSOI, J., ABE, E., SUDA, T., KUROKI, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research*, v. 45, p. 1474–1478, 1985.

HWA, C.; BAUER, E. A.; COHEN, D. E. Skin biology. *Dermatologic Therapy*, Vol. 24, p. 464–470, 2011.

HUANG, H-C.; WANG, H-F.; YIH, K-H.; CHANG, L-Z.; CHANG, T-M. The Dual Antimelanogenic and Antioxidant Activities of the Essential Oil Extracted from the Leaves of *Acorus macrospadiceus* (Yamamoto) F. N. Wei et Y. K. Li. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 1-10, 2012.

HUANG,H-C.; HSU, T-F.; CHAO, H-L.; CHEN, C-C.; CHIU, S-W.; CHANG, T-M. Inhibition of melanogenesis in murine melanoma cells by *Agaricus brasiliensis* methanol extract and anti-reactive oxygen species (ROS) activity. *African Journal of Microbiology Research*, v. 8, p. 519-524, 2014.

ISAAC, V. L. B; CEFALI L. C.; CHIARI, B. G.; OLIVEIRA, C. C. L. G; SALGADO H. R.N.; CORRÊA, M. A. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 29, n. 1, p. 81-96, 2008.

INTERAMINENSE, L. F. L.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E. Cardiovascular effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in spontaneously hypertensive rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 25, n. 6, p. 661-669, 2010.

INTERAMINENSE, L. F. L.; RAMOS-ALVES, F. E.; SIQUEIRA, R. J. B.; XAVIER, F. E.; DUARTE, G. P.; MAGALHÃES, P. J. C.; MAIA, J. G. C.; SOUSA, P. J. C.; SAAD LAHLOU. Vasorelaxant effects of 1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of the essential oil of *Aniba canelilla*, in superior mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48, p. 709–716, 2013.

KIM, M-S.; LEE, S. R.; HO, H. S.; KIM, D. H.; CHANG, S.; CHUNG, J. H. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clinica Chimica Acta*, v. 362, p. 161–169, 2005.

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

KIRBY, J. E KEASLING, J. D., Biosynthesis of plant isoprenoids: Perspectives for microbial engineering. *Annual Review of Plant Physiology*, v. 60, p. 335–55. 2009.

KUBITZKI, K.; RENNER, S.; Lauraceae I (Aniba and Aiouea). In: *Flora Neotropica*, v. 31, Lauraceae I (Aniba and Aiouea). p. 1-124, 1982.

LAHLOU M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. *Phytotherapy Research*. 18(6) p. 435-448, 2004.

LAHLOU, S; MAGALHÃES, P. J. C; SIQUEIRA, R. J. B; FIGUEIREDO, A. F; INTERAMINENSE, L.F.L; MAIA, J.G.S; SOUSA, P.J.C. Cardiovascular effects of the essential oil of *Aniba canelilla* bark in normotensive rats. *Journal Cardiovascular Pharmacology* 46 (4). p. 412-421, 2005.

LAWLESS, J. **The Encyclopedia of Essential Oils**. San Francisco: Conari Press, 2013. p. 10.

LEEM, H.-H.; KIM, E.-O.; SEO, M.-J.; CHOI, S.-W. Antioxidant and anti-inflammatory Activities of Eugenol and Its Derivatives from Clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) *Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition*, v. 40, p. 1361–1370. 2011.

LIANG, C.; LIM, J.-H.; KIM, S.-H.; KIM, D.-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chemistry*. v. 134, 2, p. 1146-1148. 2012.

LIMA, M. P., SILVA, T. M. D., SILVA, J. D., ZOGHBI, M. G. B., ANDRADE, E. H. A. Essential oil composition of leaf and fine stem of *Aniba canelilla* (Kunth) Mez from Manaus, Brazil. *Acta Amazonica*, v. 34, p. 329-330, 2004.

LOIZZO, M. R.; TUNDIS, R.; MENICHINI, F.; SAAB, A. M.; STATTI, G. A.; MENICHINI, F. Antiproliferative effects of essential oils and their major constituents in human renal adenocarcinoma and amelanotic melanoma cells. *Cell Proliferation*, v. 41, p. 1002-1012, 2008.

LUPE, F.A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo. 2007.

MAFFEI, M. E. Sites of synthesis, biochemistry and functional role of plant volatiles. *South African Journal of Botany*, v. 76, p. 612-631, 2010.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E.H.A.; COUTO, H.A.R.; DA SILVA, A.C.; MARX, F.; HENKE, C., Plant sources of Amazon rosewood oil, *Química Nova*, v. 30, p. 1906–1910, 2007.

MAIA, J.G.S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. *Química Nova*, v. 32, p. 595-622, 2009.

MANHÃES, A. P.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; WIEDEMANN, L. S. M.; FERNANDES, K. S.; SAMPAIO, P. T. B. Biomass production and essential oil yield from leaves, fine stems and resprouts using pruning the crown of *Aniba canelilla* (H.B.K.) (Lauraceae) in the Central Amazon. *Acta Amazonica*, v. 42, p. 355-362, 2012.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente* v. 8, n. 1, p. 195-206. 2001.

MATOS, F.J.A. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza, 3º ed., p: 150, 2009.

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*, v. 21, p. 3342–3345, 2011.

MATTOSO, E. **Estudo de Fragrâncias Amadeiradas da Amazônia**. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica), Departamento de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP. 2005.

MAY, P.H.; BARATA, L.E.S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: options for sustainable production. *Economic Botany*, v. 58, p. 257-265, 2004.

MELLO, T. S., ALCÂNTARA, J. M., VEIGA-JUNIOR, V. F. Avaliação da atividade antioxidante de espécies amazônicas dos gêneros *Aniba* e *Licaria* (Lauraceae). **32^o Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2009.

METCALFE, A. D.; FERGUSON, M. W. J. Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 4, 413–437, 2007.

MOMTAZ, S., MAPUNYA, B. M., HOUGHTON, P. J., EDGERLY, C., HUSSEIN, A., NAIDOO, S., LALL, N. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal of Ethnopharmacology*, v.119, p. 507 – 512, 2008.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Química Nova*, v. 28, n. 5, p. 892-896. 2005.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, v.26, p. 211-216, 2004.

MOURA, V.M. **Efeito do extrato aquoso de *Aniba fragrans* em modelo de hemorragia causada pelo veneno de *Brthrops jararaca***. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, João Pessoa. Anais em congressos, p. 67, 2010.

NARAYANAN, D. L.; SALADI, R. N.; FOX, J. L. Ultraviolet radiation and skin cancer. *International Journal of Dermatology*, v. 49, p. 978–986, 2010.

NARDIN, P.; GUTERRES, S.S. Alfa-Hidroxiácidos: Aplicações Cosméticas e Dermatológicas. *Caderno de Farmácia*, v. 15, n. 1, p. 7-14, 1999.

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

OGER, J. M., RICHOMINEO, P., GUINAUDEAU, H., *Aniba canelilla* (H.B.K.) Mez essential oil: Analysis of chemical constituents, fungistatic properties. *Journal of Essential Oil Research*, v. 6, p. 493-497, 1994.

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

PARK, H.Y.; PONGPUDPUNTH, M.; LEE, J.; YAAR, M. Disorders of melanocytes. In: WOLFF, K.; GOLDSMITH, L.A.; KATZ, S.I.; GILCHREST, B.A.; PALLER, A.S.; LEFFELL, D.J. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. 7^a ed. New York: Mc Graw Hill Medical, p. 591- 608, 2008.

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

PARK, K-T.; KIMB, J-K.; HWANGA, D.; YOOA, Y.; LIMA, Y-H. Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, n. 12, p. 3038–3045, 2011.

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. Linalool inhibits in vitro NO formation: Probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. *Life Sciences*, v. 78, p. 719 – 723, 2006.

PEDROSA, T. **Avaliação do potencial de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e o envelhecimento cutâneo**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2012.

PEREIRA, I. C. **Fitoquímica e aspectos morfofisiológicos de *Aniba parviflora* (LAURACEAE) cultivadas no município de Santarém-PA**. 2012. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia), Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém. 2012.

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

PÉREZ-JIMÉNEZ, J. SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. *Food Research International*, v. 39, p. 791-800, 2006.

PICHERSKY, E., NOEL, J.P., DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, v. 311, p. 808–811, 2006.

PINTO, A.C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, P.N., EPIFANIO, R. A., Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, São Paulo, v.25, supl.1, p. 45-61, 2002.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, p. 563-572, 2005.

QUINET, A.; BAITELLO, J. B.; MORAES, P. R. L. Lauraceae. In: **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**, v. 2. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio/ Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. p. 1146-1159.

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

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 18, p. 1-5. 2008.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology Medicine*, v. 26, p. 1231–1237, 1999.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*, v. 1, p. 705–720, 2002.

ROSSI, M. H.; YOSHIDA, M.; MAIA, J. G. S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 45. n. 6, p. 1263-1269, 1997.

RÓŻANOWSKA, M.; SARNA, T.; LAND, E. J.; T. TRUSCOTT, G. Free radical scavenging properties of melanin Interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, p. 518 –525, 1999.

RYAZANOVA, A. D.; ALEKSEEV, A. A.; SLEPNEVA, I. A. Phenylthiourea as inhibitor of enzymatic oxidation of DOPA. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 27, p. 78–83, 2012.

SAMPAIO, P. T. B.; SIQUEIRA, J. A. S.; COSTA, S.; BRUNO, F. M. S. Propagação vegetativa por miniestacas de preciosa (*Aniba canellila* (H. B.K) MEZ). *Acta Amazônica*, v. 40, p. 687-692, 2010.

SARRAZIN, L. F. S.; MOURA, V. M.; AMAZONAS, D. A.; BARATA, L. E. S.; OLIVEIRA, R. B.; MOURÃO, R. H. V. **Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Aniba rosaeodora* Ducke e *A. parviflora* (Lauraceae).** In: VI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, Campinas. Livro de Resumos. São Paulo: Unicamp, p. 130, 2011.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. **Fitoterapia racional: Um guia para as ciências da saúde.** Barueri: Manole, p. 386, 2002.

SILVA, G. F. **Estudo do potencial biotecnológico de *Aniba canelilla* (H.B.K) Mez para obtenção de cosméticos.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais), Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

SILVA, J. R. A.; CARMO, D. F. M.; LEON, L. L.; SILVA, B. O.; REIS, É. M. R.; FERREIRA, J. L. P.; MACHADO, G. M. C.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA, N. N. S.; SILVA, J. R. A.; ALVES, C. N.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, J. K. R.; MAIA, J. G. S. Acetylcholinesterase inhibitory activity and molecular docking study of

1-nitro-2-phenylethane, the main constituent of *Aniba parviflora* essential oil. *Chemical Biology & Drug Design*, v. 84, p. 192-198, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFSC. p. 1104, 2006.

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

SINGLETON V. L.; ORTHOFER R.; LAMUELA-RAVENTOS R. M. Analysis of total phenols and oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods of Enzymology*, v. 299, p. 152-177, 1999.

SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SUBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: NIELLOUD, F., MARTIN-MESTRES, G. *Pharmaceutical emulsions and suspensions*. New York: Marcel Dekker, p.261, 2000.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D., BARROS E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

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

SOUZA, G. H. B; MELLO, J. P. C.; LOPES, N. P. Farmacognosia: coletânea científica. Ouro Preto: ed. UFOP, 2011. BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUZA, R. C. Z.; EIRAS, M. M.; CABRAL, E. C.; BARATA, L. E. S.; EBERLIN, M. N.; CATHARINO, R. R. The famous amazonian rosewood essential oil: characterization and adulteration monitoring by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Analytical Letters*, v. 44, p. 2417–2422, 2011.

SUGAWARA, Y., HARA, C.; TAMURA, K.; FUJII, T.; NAKAMURA, K-I.; MASUJIMA, T.; AOKI, T. Sedative effect on humans of inhalation of essential oil of linalool: Sensory evaluation and physiological measurements using optically active linalools. *Analytica Chimica Acta*, v. 365 p. 293-299, 1998.

TAVEIRA, F. S. N.; LIMA, W. M.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Seasonal essential oil variation of *Aniba canelilla*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, n. 1, p. 69-75, 2003.

TOMITA, Y. M. K.; TAGAMI, H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Research*, p. 357–361, 1992

TRANCHIDA, P. Q.; SOUZA, R. C. Z.; BARATA, L. E. S.; MONDELLO, M.; DUGO, P.; DUGO, G.; MONDELLO, L. Analysis of macacaporanga (*Aniba parviflora*) leaf essential oil by using comprehensive two-dimensional gas chromatography combined with rapid-scanning quadrupole mass spectrometry. *Chromatography Today*, v, 95, p. 5-9, 2008.

TSURUTA, D.; GREEN, K. J.; GETSIOS, S.; JONES, J. C. R. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *Trends in Cell Biology*, v. 12, n. 8, 2002.

VALE, J. K. L.; LIMA, A. B.; PINHEIRO, B. G.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K. R. MAIA, J. G. S.; SOUSA, G. E. P.; SILVA, A. B. F.; SOUSA, P. J. C.; BORGES, R. S. Evaluation and theoretical study on the anti-inflammatory mechanism of 1-nitro-2-phenylethane. *Planta Medica*, v. 79, p. 628–633, 2013.

VILLAREAL, M. O.; HAN, J.; YAMADA, P.; SHIGEMORI, H.; ISODA, H. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. *Experimental Dermatology*, v. 19, p. 450–457, 2010.

WERFF, H. A key of the the genera Lauraceae in the new world. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden Press*, v. 78, p. 377-387. 1990.

WERFF, H. WAN DER & RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. In: *Annals of the Missouri Botanical Garden*, v. 8, p. 419 – 432, 1996.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, n. 55, v. 22, p. 8896-8907, 2007.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology. *Journal of interferon & cytokine research*, n. 8, v. 30, p. 617 – 628, 2010.

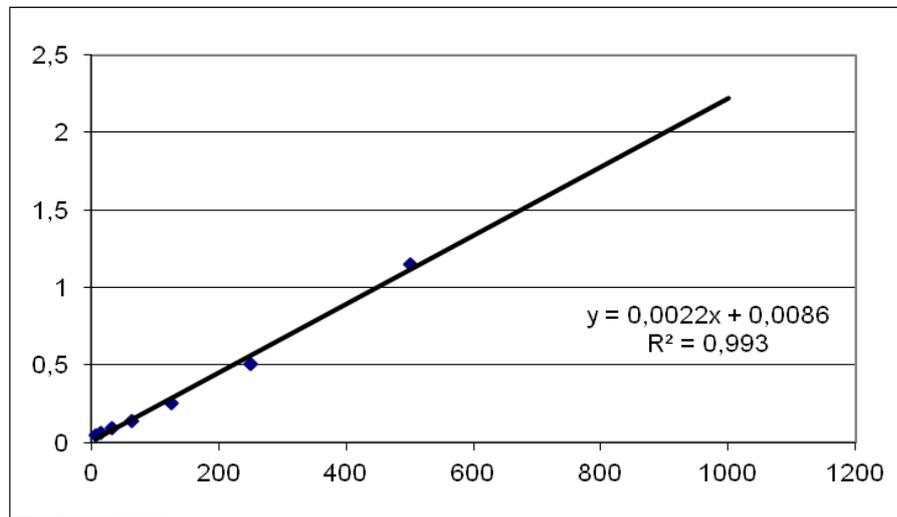
YANG, Z.; Y. ZHANG; SUN, L. ; WANGA, Y.; GAO, X.; CHENG, Y. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterizing tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Analytica Chimica Acta*, v. 719, p. 87–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

ZAIDI, K. U.; ALI, A. S.; ALI, S. A.; NAAZ, I. Microbial tyrosinases: Promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry. *Biochemisty Research International*, v. 2014, p. 1 – 16, 2014.

ZHONG, S. ; WU, Y.; SOO-MI, A.; ZHAO, J.; WANG, K.; YANG, S.; JAE-HO, Y.; ZHU, X. Depigmentation of Melanocytes by the Treatment of Extracts from Traditional Chinese Herbs: a Cell Culture Assay. *Biology and Pharmaceutical Bull.* v. 29, n.9, p. 1947—1951, 2006.

ANEXOS

A – CURVA ANALÍTICA DO ÁCIDO GÁLICO



B – CURVA ANALÍTICA DA QUERCETINA

