

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos  
Área de Produção e Controle Farmacêuticos

Avaliação de extratos de plantas da região amazônica quanto à  
atividade inibitória da tirosinase

Daclé Juliani Macrini

Dissertação para obtenção do grau de  
MESTRE

Orientadora:  
Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara

São Paulo  
2004

**Ficha Catalográfica**

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Macrini, Daclé Juliani

M174a Avaliação de extratos de plantas da região amazônica  
quanto à atividade inibitória da tirosinase / Daclé Juliani  
Macrini. -- São Paulo, 2004.

1v. (Paginação irregular)

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Ohara, Mitsuko Taba

1. Cosméticos : Controle de qualidade 2. Farmacognosia  
3. Dermatologia I. T. II. Ohara, Mitsuko Taba, orientador.

668.55 CDD

Daclé Juliani Macrini

Avaliação de extratos de plantas da Região Amazônica quanto à atividade  
inibitória da tirosinase

Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Mitsuko Taba Ohara  
orientador/presidente

Profa. Dra. Ivana Barbosa Suffredini  
1º. examinador

Profa. Dra. Maria Martha Bernardi  
2º. examinador

São Paulo, 09 de Setembro de 2004.

Dedico este trabalho

Aos meus filhos, Fabian e Thiago,  
o maior presente de minha vida

Ao meu marido, Cesar  
pelo amor e apoio incondicional

À minha mãe, Norma  
e meu pai, Henrique (*“in memoriam”*)  
pela *“minha existência e tudo que sou”*

“Nunca se afaste de seus sonhos. Porque, se eles se forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir”.

Mark Twain

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à professora Dra. Mitsuko Taba Ohara por ter me dado a oportunidade de realizar este trabalho, oferecendo-se para ser minha orientadora e por todos os ensinamentos, dedicação e atenção dispensadas.

À professora Dra. Ivana Barbosa Suffredini pelo auxílio na seleção e fornecimento dos extratos vegetais, por permitir a utilização do laboratório, mas principalmente pela sua amizade e pelos valiosos ensinamentos no decorrer de todo o trabalho.

À toda a equipe do Laboratório de extração da UNIP, a auxiliar Evanete Alves da Cruz, a técnica Daniela Câmara, o farmacêutico Sérgio Frana e o biólogo Mateus Paciência, pelo auxílio e colaboração.

Ao Prof. Dr. Antonio Dráuzio Varella e Prof. Dr. Riad Naim Younnes por permitir a utilização do Laboratório da UNIP.

Ao Sr. Hildebrando J. Rossi Filho e seus assistentes Maria Cecília Dadão, Marcelo V. de Almeida e Clarice O. Cruz pela acolhida sempre carinhosa no prédio do Objetivo da unidade "Paulista".

Ao Prof. Dr. Nicolau Tortamano e Prof. Dr. José Jam de Melo pelos ensinamentos profissionais, e incentivo ao ingresso no mestrado.

A todos os funcionários da unidade Indianópolis da UNIP que de alguma maneira auxiliaram para a realização deste trabalho.

À Coordenadoria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos do departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e em especial aos funcionários Elizabete Claro S. Paiva, Elaine M. Ychico, Jorge de Lima e Maria José da Silva.

À professora Dra. Maria Valéria Robles Velasco pelo incentivo inicial e apoio durante todo o curso, mas em especial pela grande amizade e carinho que sempre se renova com novas atitudes.

Às professoras Dras. Maria Martha Bernardi, Vladi O. Consiglieri, Telma M. Kaneko e Terezinha de Jesus pela contribuição e apoio de maneiras diversas.

Aos amigos Renata Rabelo Soriani, Cláudio de Jesus Ribeiro, Robson V. Machado de Oliveira e André Rolim Baby pela amizade e companheirismo.

À Luciana Meneghelli pela sua amizade, companheirismo, apoio e carinho.

Acima de tudo agradeço a Deus, por me capacitar a chegar até aqui e me mostrar que sempre podemos sonhar.

## RESUMO

Problemas dermatológicos relacionados com a pigmentação resultam em hiperpigmentações ou hipopigmentação cutâneas. Produtos cosméticos e farmacêuticos com atividade despigmentantes são utilizados para o tratamento de pacientes que apresentam distúrbios de hiperpigmentação. Os despigmentantes atualmente utilizados não são totalmente eficazes ou seguros, razão pela qual há intensa pesquisa, principalmente em países asiáticos, com a finalidade de se obter novos agentes com esta ação, em especial, inibidores de enzimas envolvidas na melanogênese como a tirosinase. Considerando-se que algumas substâncias obtidas de plantas apresentam essa atividade, a flora brasileira constitui-se uma fonte potencial de obtenção de novos despigmentantes. No presente trabalho, 24 extratos aquosos e 23 extratos orgânicos de plantas da Floresta Amazônica, 01 aquoso e 01 orgânico da Mata Atlântica, foram avaliados quanto à inibição da tirosinase, pelo método enzimático, com leitura espectrofotométrica. Do total de 49 extratos testados, 09 mostraram atividade. Estes extratos foram retestados e os valores de concentração da atividade inibitória 50%(AI 50%), determinados. O mais ativo foi o extrato orgânico de *Ruprechtia* sp com AI 50% de 33,76µg/mL, seguido do extrato orgânico de *Rapanea parviflora* com AI 50% de 64,19µg/mL.

## ABSTRACTS

Dermatological disorders related to pigmentation result in cutaneous hyperpigmentation or hypopigmentation. Cosmetic and pharmaceutical products with despigmentant activity are used for the treatment of patients who have hyperpigmentation disorders. Nowadays, skin whitening agents are not too effective and safe, reason for intense researches in order to obtain new agents with action especially ones which inhibit enzymes involved in melanogenesis like tyrosinase, mainly in Asian countries. Since some substances from plants have this activity, the flora of Brazil is a potential source of new skin whitening agents. In this study 24 aqueous extracts and 23 organic ones of plants from Amazonian region, and 1 aqueous extract and 1 organic extract from Atlantic Forest were tested to inhibition of tyrosinase using enzymatic method with photometric reader. Out of the 49 tested extracts, 9 showed activity in the screening. These extracts were tested again and 50% tyrosinase inhibitory activity concentration (IA 50%) was calculated. The most active of them was the organic extract of *Ruprechtia* sp with IA 50% 33,76µg/mL and the organic extract of *Rapanea parviflora* with IA 50% 64,19µg/mL.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	01
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	03
<b>2.1</b>	<b>Melanina e cor da pele</b>	03
2.1.1	Definição e Características	03
2.1.2	Classificação	06
2.1.3	Melanogênese	07
<b>2.2</b>	<b>Hipercromias</b>	10
<b>2.3</b>	<b>Agentes despigmentantes</b>	15
2.3.1	Substâncias químicas	16
2.3.2	Plantas e extratos	21
<b>2.4</b>	<b>Famílias das plantas testadas</b>	23
<b>2.5</b>	<b>Avaliação de despigmentantes</b>	26
2.5.1	Ensaio “in vitro”	26
2.5.2	Ensaio “in vivo”	28
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	29
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	30
<b>4.1</b>	<b>Material</b>	30
4.1.1	Extratos de plantas	30
4.1.2	Reagentes e solventes	32
4.1.3	Equipamentos	32
4.1.4	Outros materiais	33
<b>4.2</b>	<b>Métodos</b>	34
4.2.1	Preparo dos extratos	34
4.2.2	Preparo das soluções	34

4.2.3	Ensaio da reação enzimática da tirosinase .....	36
4.2.4	Ensaio de validação do método .....	36
4.2.5	Determinação da concentração de ácido kójico a ser utilizado como controle positivo no ensaio de inibição da tirosinase com 120U/ml no meio .....	37
4.2.6	Ensaio dos extratos vegetais para avaliação da inibição da tirosinase .....	38
4.2.7	Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% do ácido kójico no meio com 480U/ml de enzima .....	38
4.2.8	Determinação da concentração correspondente à atividade inibitória 50% dos extratos que apresentaram atividade .....	39
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Seleção do comprimento de onda de leitura</b> .....	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Seleção da temperatura</b> .....	<b>42</b>
<b>5.3</b>	<b>Influência da solução de DMSO 2,5% em água</b> .....	<b>43</b>
<b>5.4</b>	<b>Determinação da concentração de ácido kójico a ser utilizado como controle positivo no ensaio de inibição da tirosinase com 120U/ml no meio</b> .....	<b>44</b>
<b>5.5</b>	<b>Ensaio dos extratos vegetais na inibição da tirosinase</b> .....	<b>46</b>
<b>5.6</b>	<b>Determinação da atividade inibitória 50% do ácido kójico</b> .....	<b>49</b>
<b>5.7</b>	<b>Ensaio com os extratos vegetais selecionados</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>58</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>59</b>

## **ANEXOS**

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Melanócito .....	03
Figura 2	Epiderme .....	04
Figura 3	Vias metabólicas da formação dos pigmentos melânicos .....	09
Figura 4	Despigmentantes .....	17
Figura 5	Ácido azeláico .....	20
Figura 6	Reação da tirosinase determinada em 450 e 490nm .....	40
Figura 7	Reação da tirosinase determinada em 450 e 490nm em meio de DMSO 2,5% .....	41
Figura 8	Reação da tirosinase determinada com incubação a 30 e 35°C .....	42
Figura 9	Reação da tirosinase determinada em meio com e sem DMSO .....	43
Figura 10	Reação da tirosinase 120 U/ml em presença de ácido kójico em diferentes tempos .....	44
Figura 11	Porcentagem de atividade inibitória do ácido kójico sobre a tirosinase 120U/ml em diferentes tempos .....	45
Figura 12	Reação da tirosinase 480 U/ml em presença de ácido kójico em diferentes tempos .....	49
Figura 13	Porcentagem de atividade inibitória do ácido kójico sobre a tirosinase 480U/ml em diferentes tempos .....	50

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Plantas da Floresta Amazônica - Nomes científicos das plantas utilizadas e suas respectivas famílias.....	30
Tabela 02	Extratos vegetais de plantas da Floresta Amazônica, utilizados para avaliação da inibição da tirosinase .....	31
Tabela 03	Reação da tirosinase determinada em 450 e 490nm .....	40
Tabela 04	Reação da tirosinase em meio com 60µL de DMSO 2,5% em água determinada em 450 e 490nm.....	41
Tabela 05	Reação da tirosinase com incubação a 30 e 35°C .....	42
Tabela 06	Reação da tirosinase com e sem a solução de DMSO 2,5% determinada em 490nm .....	43
Tabela 07	Reação enzimática da tirosinase 120 U/ml em presença de ácido kójico em diferentes tempos.....	44
Tabela 08	Atividade inibitória em porcentagem das diferentes concentrações do ácido kójico nos diferentes tempos de reação.....	45
Tabela 09	Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais – ensaio 1o.....	46
Tabela 10	Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais – ensaio 2o .....	46
Tabela 11	Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais – ensaio 3o .....	47
Tabela 12	Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 1a .....	47
Tabela 13	Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 2a .....	48
Tabela 14	Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 3a .....	48
Tabela 15	Reação enzimática da tirosinase em presença de ácido kójico em diferentes tempos de reação.....	49
Tabela 16	Porcentagem de inibição da reação da tirosinase pelas diferentes concentrações do ácido kójico .....	50
Tabela 17	Reação da tirosinase na presença dos extratos em diferentes concentrações com leitura de absorbâncias após 60 min de reação .....	51

Tabela 18	Valores de p do Teste T (comparadas as absorvâncias dos extratos com as absorvâncias do controle) .....	52
Tabela 19	Atividade inibitória da tirosinase pelos extratos vegetais .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs = Absorbância

AK = Ácido kójico

AI = Atividade inibitória

DMSO = Dimetil sulfóxido

DP = Desvio padrão

n = número de réplicas

mg = miligramas

mL = mililitros

min = minutos

nm = nanômetros

$R^2$  = coeficiente de correlação linear

U = unidades

U/mL = unidades por mililitros

UNIP = Universidade Paulista

UV = Ultravioleta

$\mu$ g = microgramas

$\mu$ L = microlitros

## 1 INTRODUÇÃO

Por muitos séculos o homem tem feito tentativas de alterar artificialmente a cor da pele, através de seu clareamento ou escurecimento, isto está relacionado com sua filosofia de vida, crenças, religiosidade e principalmente com sua vaidade (Shevlin, 1974). Com o envelhecimento da população mundial, torna-se imprescindível o tratamento dos distúrbios pigmentares (Benech, 2002), pois o aspecto da pele é uma característica importante, influenciando até mesmo no relacionamento social do indivíduo, principalmente em casos de graves anomalias (Grimes, 1999).

Desordens de pigmentação, tanto a hiperpigmentação como a hipopigmentação são tratadas com produtos farmacêuticos ou cosméticos e também por procedimentos como o “peeling” (esfoliação da pele) mecânico aliado a substâncias químicas e tratamento com raios “laser” (Grimes, 1999).

As substâncias despigmentantes mais efetivas, como a hidroquinona, inibem a síntese da melanina, e um dos mecanismos envolvidos é a inibição da tirosinase (Lee & Choi, 1998).

Considerando que a inibição da tirosinase pode ser obtida por substâncias que apresentam estrutura fenólica que incluem flavonóides, taninos, tocoferóis e derivados do ácido cinâmico, e como essas substâncias ocorrem praticamente em todas as plantas superiores, justifica-se a intensa busca por novos inibidores da melanogênese, em extratos de plantas, por parte de muitas empresas farmacêuticas e cosméticas (Lee & Choi, 1998; Castro *et al*, 1997; Kubo *et al*, 1994; Kubo *et al*, 1995; Kubo & Kinst-Hori, 1999(a); Iida *et al*, 1995; No *et al*, 1999 ).

A pesquisa de produtos naturais, como plantas e animais terrestres e marinhos, tem sido o celeiro de grandes descobertas de fármacos potenciais (Suffredini, 2000). A variedade de plantas existentes no planeta é muito grande, e ainda poucas foram estudadas cientificamente em relação a suas atividades específicas para as células dos

tecidos cutâneos (Guterres & Ziegler, 2002). No Brasil, a biodiversidade existente é estimada em 20% do total terrestre e só na Amazônia, 17% dessa diversidade pode ser encontrada. Existe uma proporção direta entre diversidade biológica e diversidade de estruturas químicas biossintetizadas, que estão relacionadas com as diferenças metabólicas existentes surgidas durante o processo evolutivo de cada espécie, levando à variabilidade genética peculiar a cada uma (Suffredini, 2000).

Na literatura estão relatados diversos trabalhos de triagem pesquisando a atividade inibitória da tirosinase em extratos vegetais de várias partes do mundo como África (Kubo & Kinst-Hori, 1999(b)), Bolívia (Kubo *et al*, 1995), China (Miao *et al*, 1997; Iida *et al*, 1995; Masamoto *et al*, 1980), Japão (No *et al*, 1999), Bangladeshi (Khanom *et al*, 2000), entre outras. Muitos resultados positivos em relação a essa atividade, foram obtidos e alguns autores prosseguiram as análises a fim de isolar e identificar as substâncias ativas responsáveis por tal atividade.

Considerando que, as terapias atualmente utilizadas não têm demonstrado resultados totalmente satisfatórios, ou apresentam efeitos citotóxicos, como é o caso da hidroquinona, além da baixa estabilidade destes componentes nos produtos formulados nota-se a necessidade de se pesquisar novas drogas com esta atividade (Su, 1999). Portanto, pelos resultados satisfatórios obtidos de estudos de triagem já realizados, relativos à identificação de atividade inibitória da melanogênese em inúmeras plantas de outros países, a flora brasileira representa uma fonte em potencial de plantas com atividade despigmentante.



## 2 REVISÃO DA LITERATURA

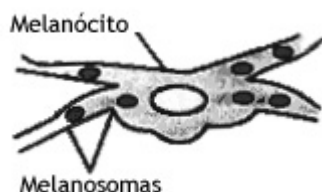
### 2.1 Melanina e cor da pele

#### 2.1.1 Definição e características

O termo melanina não se refere a um único composto. Melanina é um termo genérico comumente utilizado para descrever um grupo diversificado de biopolímeros heterogêneos, pigmentados, polifenólicos de alto peso molecular, responsável não apenas pela cor da pele, mas também de cabelos e pêlos.

Apesar de apresentarem precursores semelhantes, incluindo uma fenoxidase nos estágios iniciais da síntese, as melaninas possuem origem, composição química e propriedades físicas diversas (Chedekel & Zeise, 1996).

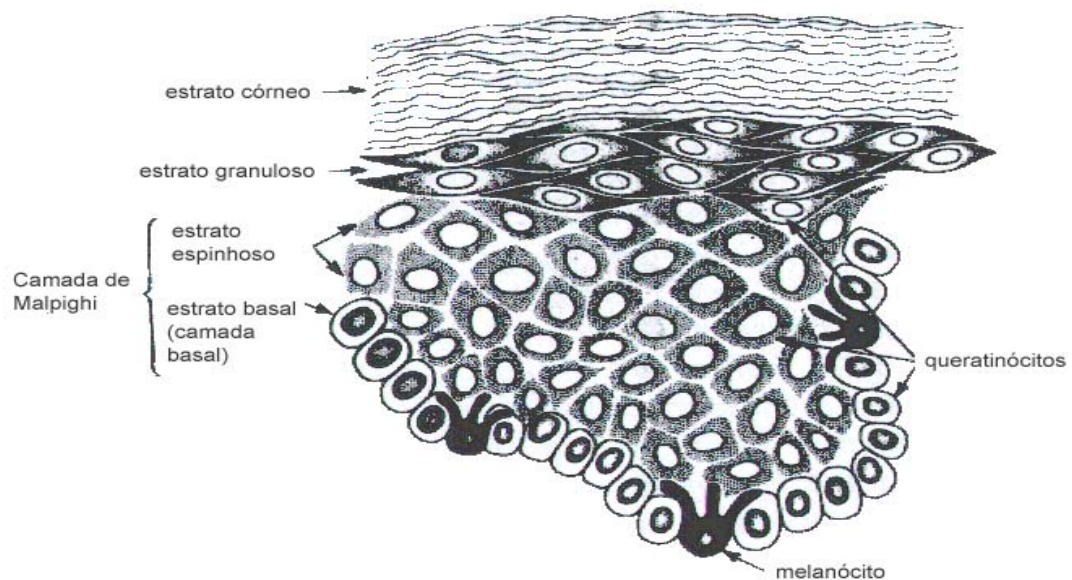
A melanina é um pigmento endógeno do tegumento produzido pelos melanócitos (Figura 1), células que derivam de outras da crista neural, e se separam do tubo neural durante seu fechamento, no embrião precoce (Kessel, 2001; Steiner, 1996(a)). Os melanócitos são células especializadas com várias ramificações longas e delgadas que se estendem entre os queratinócitos localizados na base da epiderme. Os queratinócitos são células assim denominadas devido à presença abundante da proteína queratina. A parte interna da epiderme contém as células vivas e os queratinócitos e a parte externa, os esqueletos de células, denominados corneócitos. Durante a diferenciação, o queratinócito é transformado em corneócito por meio da especialização aumentada seguida pela morte programada (Kessel, 2001).



**Figura 1** - Melanócito

Fonte: (Majmudar & Smith, 1998)

Na pele, os melanócitos são normalmente encontrados na camada basal da epiderme (Figura 2), entre os queratinócitos basais onde seu número varia de 2000 a 2500 por  $\text{mm}^2$  nas regiões expostas à luz e nos genitais, e no restante do corpo de 1000 a 1500 por  $\text{mm}^2$  (Robins, 1991). Estas células dendríticas especializadas constituem 5 a 10% do total da população celular da epiderme e juntamente com os queratinócitos e células de Langerhans, formam a unidade melanocitária. A razão de queratinócitos e melanócitos é de aproximadamente 35:1 (Silva, 1998; Robins, 1991; Pawelek *et al*, 1992; Beny, 2000).



**Figura 2** - Epiderme

Fonte: adaptado de: ([www.histo-moleculaire.com/epiderme](http://www.histo-moleculaire.com/epiderme))

Nos seres humanos, a cor da pele é determinada pela composição de fatores como vascularização, quantidade de carotenos e, principalmente, pelo nível de melanina presente, sofrendo influência de fatores genéticos e raciais, hormonais e fatores externos, como a radiação ultravioleta (Su, 1999; Steiner, 1996(a); Steiner, 1996(c)).

O hormônio estimulador do melanócito (MSH ou melanotropina) produzido pela glândula pituitária é o principal hormônio responsável pela melanogênese, porém os estrógenos e a progesterona também interferem na pigmentação. A radiação solar, pela ação dos raios ultravioleta A (UVA) e ultravioleta B (UVB), incrementam a produção e conseqüentemente a quantidade do pigmento melânico (Pawelek *et al*, 1992; Steiner, 1996(c)).

A quantidade de melanina formada depende da velocidade de transferência dos melanosomas dos melanócitos para os queratinócitos e dos próprios queratinócitos pela síntese e secreção de fatores que estimulam a formação de dendritos e melanização dos melanócitos (Garcia, 2001). O número de melanócitos não aumenta, porém essas células crescem no tamanho, aumentando a atividade das enzimas presentes. A cor da pele dos diferentes grupos raciais ocorre basicamente devido às nuances na quantidade e distribuição da melanina (Steiner, 1996(b)).

A melanina, além de ser responsável pela coloração da pele, protege o genoma celular contra os efeitos deletérios da radiação Ultra Violeta. A luz visível e a radiação ultravioleta (radiação UV), é absorvida pelos melanócitos da camada basal da epiderme, que por sua vez libera a melanina para os queratinócitos algumas horas após a lesão de seu DNA pela radiação UV. Parte da melanina fica em torno dos núcleos dos queratinócitos vizinhos da camada basal, atuando na proteção da pele contra danos provocados pelas radiações, especificamente UVA e UVB; outra parte age nos queratinócitos de outras camadas que passam pelo processo normal de migração em direção à superfície da pele, até se descamarem (Garcia, 2001; Paweleck *et al*, 1992).

O pigmento protege a pele nas futuras exposições à radiação ultravioleta, e essa proteção é mais efetiva enquanto não ocorre a descamação das células que contêm a melanina formada. As peles geneticamente negras oferecem uma proteção de dez a quinze vezes maior contra a radiação solar ultravioleta do que a branca (Garcia, 2001).

O câncer de pele, tipo carcinoma basocelular e espinocelular, é menos encontrado nos negróides, devido à maior proteção à radiação solar oferecida pela cor. O melasma também é mais freqüente nos brancos (Steiner, 1996(b)).

A melanina é responsável ainda pela termorregulação em alguns animais, pela neutralização de radicais livres e superóxidos, e como reguladora da síntese de vitamina D (Chedekel & Zeise, 1996; Silva, 1998; Castro *et al*, 1997).

### **2.1.2 Classificação**

As melaninas podem ser classificadas em eumelanina e feomelanina.

A eumelanina é um pigmento insolúvel, de coloração variável de marrom a preto, contendo pequena quantidade de enxofre. É um bioplímero com estrutura indol, produzido pela co-polimerização da dopa-oxidase e de seus produtos de ciclização, particularmente 5,6-dihidroxiindol (DHI) e 5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA) (Chedekel & Zeise, 1996). Portanto, a eumelanina é uma substância resultante da polimerização oxidativa de compostos indólicos derivados da DOPA (dihidroxifenilalanina), que se complexa a proteínas dentro do melanossoma formando a melanoproteína (Silva, 1998). Esse tipo de melanina encontra-se na epiderme, cabelos, pêlos e todos os outros tecidos relacionados (Hernandez & Mercier-Fresnel, 1999; Beny, 2000).

A oximelanina é uma variante estrutural da eumelanina obtida provavelmente pela fusão parcial de unidades de 5,6-dihidroxiindol com peróxido de hidrogênio (Fitspatrick *et al*, 2001).

A feomelanina é um pigmento heterogêneo, de coloração variável de amarelo a marrom avermelhado e sintetizado a partir de tirosina e cisteína. É solúvel em álcalis e resulta da polimerização da cisteinil DOPA e produtos de ciclização, particularmente a 1,4-benzotiazina. Degradada facilmente pela radiação ultravioleta, é menos fotoestável do que a eumelanina (Silva, 1998). As feomelaninas são encontradas nos cabelos ruivos

humanos, em pêlos de alguns mamíferos e em penas de aves (Hernandez & Mercier-Fresnel, 1999; Beny, 2000).

Os tricocromas fazem parte do grupo das feomelaninas, sendo uma variedade de baixo peso molecular. Contêm ferro e encontram-se nos cabelos loiros e ruivos (Fitspatrick *et al*, 2001).

### 2.1.3 Melanogênese

A melanogênese é o processo de produção e subsequente distribuição de melanina pelos melanócitos.

Os melanócitos possuem organelas complexas, denominadas melanossomos, os quais contêm várias enzimas, dentre as quais a tirosinase, que media a formação da melanina a partir da tirosina (Robins, 1991).

A tirosinase, também denominada polifenol oxidase, é uma enzima multifuncional que contém cobre e é encontrada em tecidos animais, cogumelos e algumas plantas. É a enzima chave no primeiro estágio do caminho da melanogênese, catalisando a conversão da L-Tirosina em L-Dopaquinona (Khanom *et al*, 2000).

São identificadas 4 formas ligeiramente diferentes de tirosinase (isoenzimas), denominadas T<sub>1</sub>, T<sub>2</sub>, T<sub>3</sub> e T<sub>4</sub>. A T<sub>4</sub> é a mais efetiva na conversão da DOPA e dopacromo em melanina, enquanto que a T<sub>1</sub> retarda a atividade, e as formas T<sub>2</sub> e T<sub>3</sub>, solúveis no citoplasma, são responsáveis por aproximadamente 10% da atividade total da enzima (Ribeiro, 2003).

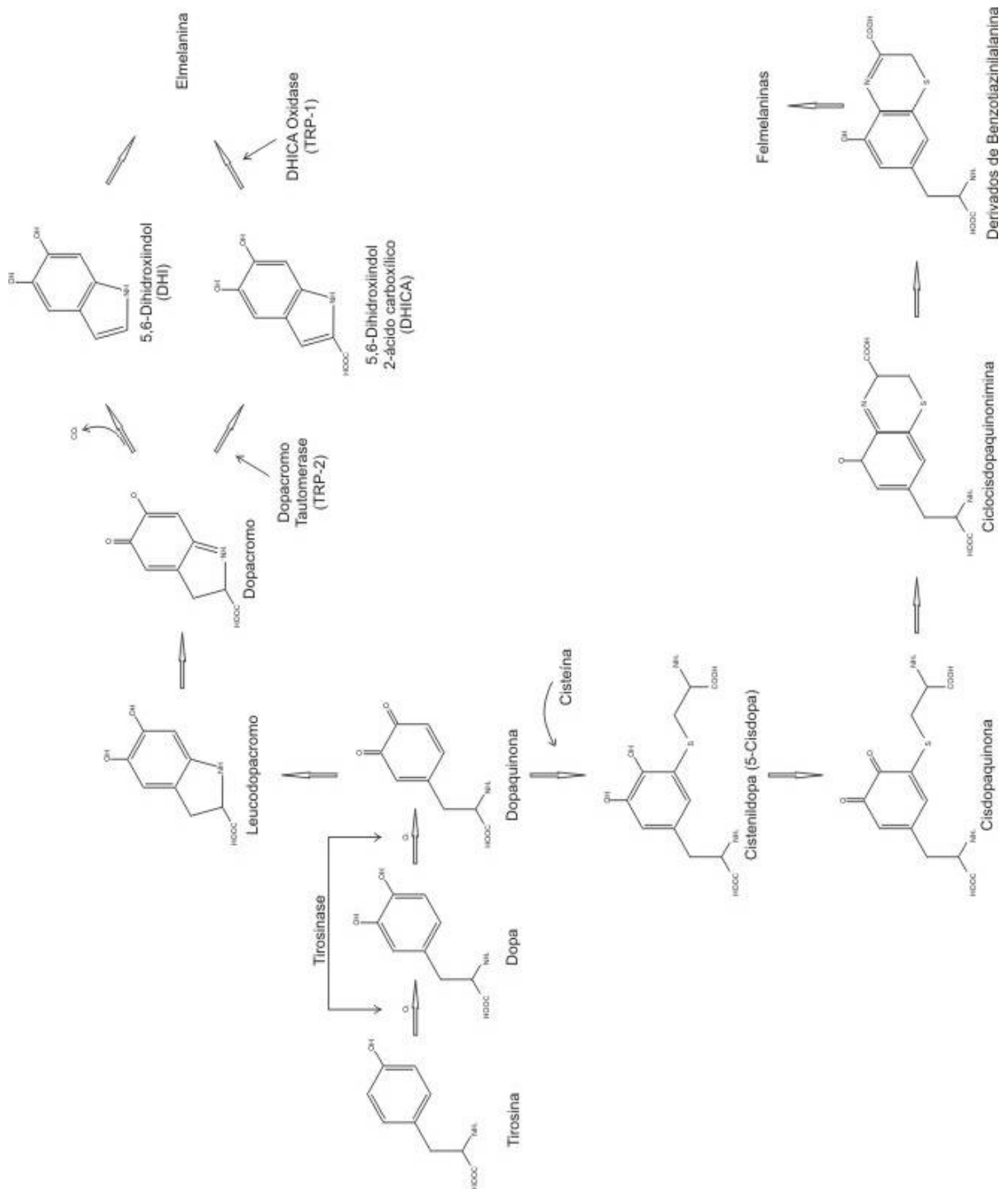
Além da tirosinase e de outras enzimas como a TRP-1 (Tyrosine-related-protein-1) ou DHICA oxidase (5,6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico oxidase) e a TRP-2 (Tyrosine-related-protein-2) ou dopacromo tautomerase, fatores não enzimáticos interferem na síntese do pigmento, tais como pH, concentrações de tióis e íons metálicos ou oligoelementos como o cálcio (Ca<sup>++</sup>).

A síntese de melanina (Figura 3) é uma reação oxidativa que ocorre em aerobiose estimulada principalmente pela radiação UV.

O início da síntese ocorre com a hidroxilação da tirosina a DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) que por sua vez, é oxidada a DOPAquinona. Ambas as conversões são catalisada pela tirosinase que desempenha papel catalítico crítico nessas duas etapas da síntese de melanina (Prota, 1992; Silva, 1998).

Após estas reações, a via pode seguir dois caminhos distintos em função do tipo de melanina a ser formada, feomelanina ou eumelanina (Curto *et al*, 1999). Através dos dendritos os pigmentos de melanina formados são transferidos para os queratinócitos adjacentes (Virador *et al*, 1999).

A formação da melanina é reduzida com o envelhecimento do indivíduo devido a uma diminuição natural da atividade enzimática (Silva, 1998).



**Figura 3** - Vias metabólicas da formação dos pigmentos melânicos

(Fonte: Adaptado de: Prota, 1980; Steiner, 1996(c), Zuidhoff & Rijsbergen, 2001)

## 2.2 Hiperchromias

São anomalias de pigmentação caracterizadas pelo aumento da concentração de melanina ou ao acúmulo de hemossiderina ou hiper胡萝卜素 na pele. As manchas melânicas ocorrem, em geral, devido a um aumento da pigmentação local (Castro *et al*, 1997).

As hiperchromias (ou hiperpigmentações da pele) ocorrem devido a vários fatores, como envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais, exposição ao sol em diferentes graus. As radiações da luz solar são as principais responsáveis pela maioria dessas anomalias, pois quando a pele é exposta à luz do sol, podem ocorrer várias reações que aumentam a transferência de melanina para os queratinócitos aumentando assim a pigmentação; os hormônios são a segunda causa principal para o acometimento dessas anomalias, seguidos de outros fatores externos (Hernández & Mercier-Fresnel, 1999; Castro *et al*, 1997; Sanchez *et al*, 1986).

Algumas hiperchromias podem ser tratadas utilizando substâncias despigmentantes, com é o caso principalmente do melasma, cloasma , lentigens senis, melanose de Riehl e melonodermia residual. (Hernández & Mercier-Fresnel, 1999; Castro *et al*, 1997).

- **Cloasma**

O cloasma é uma hipermelanose adquirida que ocorre predominantemente, na face, sendo exacerbada pela luz (Ponzio & Cruz, 1993).

São manchas escuras pardacentas ou de cor café-com-leite de formas, tamanhos e números variáveis, contornos irregulares e limites imprecisos (Alchorne & Cestari, 2001).



O papel da luz é indiscutível no desencadeamento e ou exacerbação das lesões. O comprimento de onda envolvido neste processo varia desde a faixa da radiação UV-B até a do espectro visível (Ponzio & Cruz, 1993).

É um tipo de hiperpigmentação facial que se desenvolve lenta e simetricamente, principalmente em mulheres. Na maioria das vezes está associado à gravidez e as manchas persistem após o parto em grande número de casos. Quando o cloasma aparece no período da gravidez é também denominado de “máscara de gravidez”. Os cloasmas podem também estar relacionadas a distúrbios hormonais, uso de cosméticos fotossensibilizantes e exposição ao sol, uso de anovulatórios e outros medicamentos. Aparecem em peles claras ou escuras e em qualquer idade (Ponzio & Cruz, 1993; Grimes, 1995; Alchorne & Cestari, 2001).

Nas endocrinopatias, na gravidez ou pelo uso de certos hormônios, pode ocorrer o desenvolvimento de lesões, por mecanismos não esclarecidos, mas acredita-se na participação importante do hormônio melano-estimulante (MSH), liberado em excesso nessas situações (Ponzio & Cruz, 1993).

Clinicamente, observa-se que as manchas podem ter uma distribuição nas regiões malares (bochechas), na fronte (testa), têmporas, região nasal, mandibular e lábio superior formando verdadeiras máscaras. O acúmulo do pigmento pode ocorrer na epiderme, derme ou nas duas camadas. (Ponzio & Cruz, 1993; Grimes, 1995; Steiner, 1996(c)).

O cloasma pode ser classificado pela topografia das manchas que o formam (classificação clínica), ou conforme o sítio do pigmento melânico (padrão histológico).

Topograficamente classifica-se em central e periférico. O central engloba os casos em que as lesões predominam no centro da face, ou seja, frontal, nasal, malar, lábio superior e mentonano (queixo). O cloasma periférico corresponde ao comprometimento das regiões fronto-temporais, pré-auriculares e ao longo dos ramos mandibulares.

O padrão histológico é determinado pela biópsia da pele, e exame histopatológico, que permite estabelecer o nível de deposição anormal do pigmento melânico na pele. São denominados de epidérmicos os cloasmas cuja pigmentação restringe-se às camadas superiores: basal e suprabasal, estendendo-se até a camada córnea. O tipo dérmico inclui, além da presença de pigmento na epiderme, sua posição na derme superior e média, no interior dos macrófagos (Ponzio & Cruz, 1993).

Em pacientes com melasma é de grande ajuda diagnóstica o uso da “Luz de Wood”, que além de indicar se a pigmentação se encontra na epiderme ou na derme, auxilia na escolha do melhor tratamento a seguir, evitando a prática desnecessária da biópsia cutânea e permitindo um bom acompanhamento evolutivo do processo durante seu tratamento (Sandoval, 1999).

- **Efélides ou sardas**

São pequenas manchas acastanhadas de cerca de 1 a 2mm de diâmetro, em número variado e encontradas em áreas de exposição solar. Ocorrem devido ao aumento da atividade dos melanócitos, levando a um aumento na quantidade de melanina na epiderme, mas principalmente apresentam caráter hereditário (herança autossômica dominante).

São estimuladas pela radiação ultravioleta, surgindo, portanto, após exposição à luz solar e acentuando muito no verão, quando essa exposição torna-se mais efetiva. Atinge principalmente crianças, adolescentes ou adultos jovens de pele clara (Steiner, 1996(a); Alchorne & Cestari, 2001; Ribeiro & Ohara, 2002).

- **Lentigens senis**

Também conhecidas por “manchas de luz do sol”, são manchas escuras de tamanhos variados (0,5 a 2cm) que aparecem em áreas expostas ao sol, como rosto, braços e antebraços em pessoas com mais de 40 anos de idade, principalmente em peles muito claras e com histórico repetido de exposição à luz solar.

Histologicamente, trata-se de proliferação simultânea de queratinócitos e melanócitos com alongamento das cristas interpapilares (Steiner, 1996(c)).

- **Melanose de Riehl**

Apresenta uma pigmentação difusa que atinge as têmporas, a face, a testa e o colo. Acontece como consequência de fatores tais, como uso de cosméticos, problemas endócrinos e problemas nervosos. São manchas com pontas de pequeno tamanho que se ampliam, formando um reticulado nos dois lados do pescoço e na base do bulbo capilar.

Histologicamente, existe uma sobrecarga pigmentar de melanófagos dérmicos induzida por fotossensibilidade crônica a alguns perfumes (Castro *et al*, 1997).

- **Melanodermia residual ou pós-inflamatória**

A hiperpigmentação ocorre devido ao aumento de melanófagos na derme como resposta a um processo inflamatório crônico que pode produzir zonas melanodérmicas que, em várias ocasiões, são difíceis de erradicar, principalmente em peles escuras. É causada pelo aumento da síntese de melanina pelos melanócitos na epiderme e pode ser difusa ou localizada dependendo da distribuição do processo inflamatório precedente. Várias desordens podem levar a hiperpigmentação pós-inflamatória, incluindo afecções cutâneas como impetigo, eczemas, líquen plano, pênfigos, reações alérgicas, como por

picadas de insetos, reações a medicamentos, erupções fototóxicas e agentes físicos (Pandya & Guevera, 2000; Alchorne & Cestari, 2001).

### 2.3 Agentes despigmentantes

As hiperpigmentações podem ser tratadas por diferentes técnicas tais como a utilização de substâncias químicas despigmentantes, “peeling” (esfoliação da pele) com substâncias químicas e tratamento com raios “laser” (Grimes, 1999; Lam *et al*, 2001).

As substâncias despigmentantes atuam diretamente na região discrômica hiperpigmentada e podem ser formuladas em diferentes produtos cosméticos e diferentes apresentações (Castro *et al*, 1997).

A atividade dos despigmentantes pode ser decorrente de diversos mecanismos de ação, como supressão da síntese ou maturação da tirosina; inibição da síntese da tirosinase; inibição direta ou inibição competitiva e não competitiva da atividade da tirosinase; inibição indireta da tirosinase via quelação de oligoelementos; toxicidade seletiva aos melanócitos; esfoliação; adsorção de melanina pré-formada; reação de redução e estimulação da eliminação da melanina dos queratinócitos (Zuidhoff & Rijsbergen, 2001; Silva, 1998; Maeda & Fukuda, 1991).

No “peeling” com substâncias químicas o ácido retinóico (tretinoína) é utilizado como agente de despigmentação devido a seu efeito de descamação da pele. O mecanismo de ação da tretinoína consiste no aumento do “turnover”(renovação celular) de células epidermais, que diminui o tempo de contato entre os queratinócitos e os melanócitos, promovendo uma rápida perda de pigmentação (Castro *et al*, 1997; Katsambas & Stratigos, 2001).

A concentração recomendada de uso em produtos é de 0,025 a 0,1% e reduz a pigmentação, principalmente, no caso do melasma epidérmico. Recomenda-se a utilização concomitantemente de filtro solar para prevenir as reações adversas como eritema, prurido, descamação e sensação de picada, dependendo da concentração utilizada (Castro *et al*, 1997; Katsambas & Stratigos, 2001).

O ácido glicólico, também usado como agente de descamação, não apresenta os efeitos indesejáveis de outros agentes queratolíticos. Como cosmético, está sendo usado em concentrações de 4, 8, 10, e 15%. Para obter o efeito de “peeling”, utiliza-se, sob supervisão médica, concentrações de 30, 50 e até 70%, aumentando-se a concentração e o período de tempo de acordo com as necessidades dos pacientes (Castro *et al*, 1997).

Estudos utilizando “peeling” com ácido salicílico em peles escuras para tratamento de hiperpigmentação pós-inflamatória e melasma apresentaram bons resultados (Grimes, 1999).

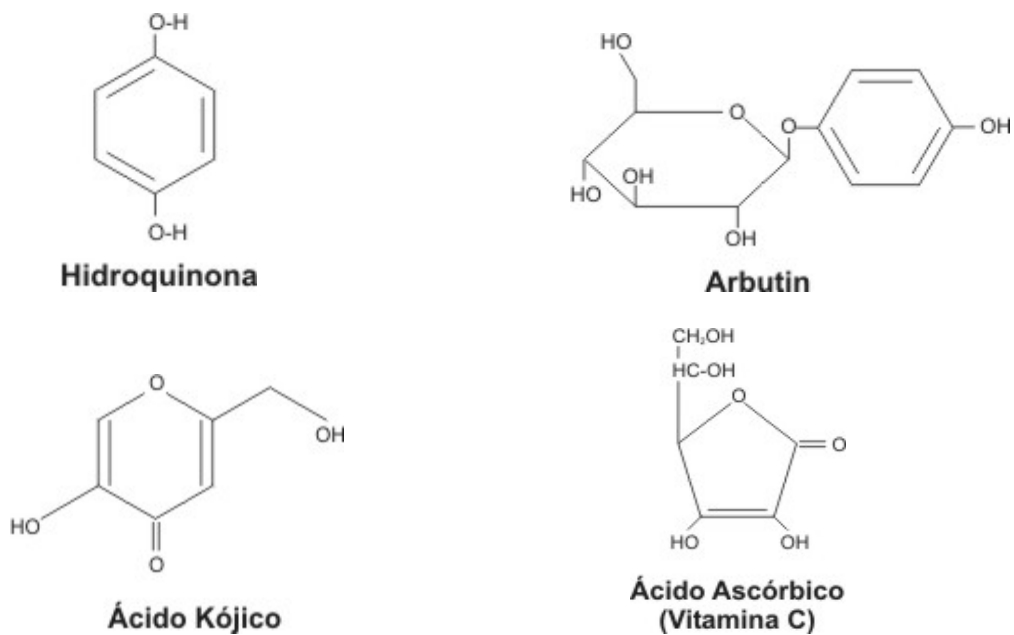
O desenvolvimento do “laser” revolucionou o tratamento de lesões melanocíticas dermais, incluindo tatuagem e “Nevus de Ota” (Lam *et al*, 2001).

O “q-switched ruby laser” (“Spectrum”) atua no comprimento de onda próximo ao da melanina (em torno de 500nm), e por isso o seu mecanismo de ação em relação às lesões pigmentadas é extremamente específico e o resultado final é o tratamento dessas lesões sem cicatrizes (Borelli, 1994).

### **2.3.1 Substâncias químicas**

Dentre as substâncias químicas despigmentantes mais utilizadas (figura 4) destacam-se a hidroquinona, o arbutin, o ácido kójico e o ácido ascórbico e seus derivados (Masuda *et al*, 1999; Su, 1999; Zhai & Maibach, 2001).

Além desses compostos, é também comum o uso do ácido azeláico, do Antipollon<sup>®</sup>, do Melawhite<sup>®</sup>, dos ácidos linoléico e linolênico (Vitamina F), entre outros (Su, 1999; Zhai & Maibach, 2001; Ribeiro & Ohara, 2002).



**Figura 4 – Despigmentantes**

Fonte: (Zhai & Maibach, 2001).

- **Hidroquinona**

A hidroquinona inibe a conversão da tirosina a Dopa e da Dopa a Dopaquinona por inibição da enzima tirosinase. Outros mecanismos envolvidos são a inibição da síntese de DNA e RNA nos melanócitos, interferência na formação e degradação de melanossomas, e a destruição de melanócitos (Grimes, 1995; Katsambas & Stratigos, 2001; Zhai & Maibach, 2001).

A hidroquinona ainda é considerada o despigmentante mais eficaz. É hidrossolúvel e fácil de ser incorporada na formulação. Entretanto, apresenta problemas de instabilidade e sabe-se também, que esta substância tem efeito citotóxico sobre os melanócitos e potencial mutagênico para as células de mamíferos. Pode causar sérias irritações na pele, além de causar a ocronose exógena, o que resultou em sua proibição em países como África do Sul, Tailândia e outros. Além disso, a despigmentação obtida

com a hidroquinona é reversível com a suspensão da aplicação do produto (Castro *et al.*, 1997; Su, 1999).

Embora a hidroquinona seja utilizada há muito tempo, vem sendo substituída por novos clareadores da pele devido a essas questões de segurança. Apesar disso este composto serve como referência para estudo comparativo com outros clareadores em avaliações de eficácia (Su, 1999).

A hidroquinona pode ser utilizada e comercializada em produtos farmacêuticos na quantidade 2 a 4% (segundo o FDA) da fórmula (Ribeiro & Ohara, 2002; Curto *et al.*, 1999; Su, 1999).

Com o objetivo de se obter compostos eficazes e sem os efeitos tóxicos da hidroquinona, outros compostos derivados da hidroquinona ou substâncias com estrutura semelhante estão sendo testados (Patrick *et al.*, 1999).

- **Ácido kójico**

O ácido kójico foi isolado pela primeira vez a partir do *Aspergillus orizae* em 1907, mas recentemente, foi descoberto, que é produzido por espécies de *Aspergillus* e *Penicillium* e grande número de espécies fúngicas, isoladas a partir de alimentos fermentados procedentes do Japão.

A estrutura química desse metabólito foi descrita pela primeira vez em 1916 e corresponde ao 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4-pirona. É facilmente solúvel em água, etanol e acetona.

Tem sido demonstrado, que o ácido kójico inibe a tirosinase de cogumelo e a polifenoloxidase (PPO) purificada da batata (Sandoval, 1999).

O ácido kójico apresenta vários níveis de ação que coloca em evidência a propriedade despigmentante, pois inativa a tirosinase principalmente por quelação do íon cobre em sítios ativos da enzima, suprimindo a tautomerização do Dopacromo 5,6-



dihidroxiindol-2-ácido carboxílico. Também atua como um antioxidante e inibe a conversão de o-quinonas da L-Dopa, Norepinefrina e Dopaquinona correspondente (Ribeiro & Ohara, 2002; Kobayashi *et al*, 1995; Su, 1999).

É hidrossolúvel e pode ser facilmente incorporado à formulação, mas também tem problemas de estabilidade. Não é tóxico e muito pouco irritante (Su, 1999). Este composto mostrou ser menos eficaz que a hidroquinona a 2% em fórmula quando considerado como componente único (Katsambas & Stratigos, 2001).

- **Arbutin**

O arbutin é um glicosídeo da hidroquinona, e é transformado nesta substância localmente, após sua absorção pela pele. Seu mecanismo de ação consiste na competição com DOPA no sítio receptor da tirosinase (Patrick *et al*, 1999).

O arbutin é menos tóxico que a hidroquinona, não causa irritação e praticamente não apresenta reação de sensibilização, o que permite o uso continuado por longos períodos de tempo e tem efeito clareador moderado. É hidrossolúvel e fácil de ser incorporado à formulação. A concentração de uso deste despigmentante em formulações varia de 1 a 10%, e embora seja mais estável do que a hidroquinona ainda apresenta um potencial de instabilizar-se na formulação. (Zhai & Maibach, 2001; Su, 1999).

As substâncias ativas propostas, como o arbutin e ácido kójico dentre outros, não têm demonstrado serem eficazes clinicamente quando os resultados foram analisados cuidadosamente em estudos cientificamente controlados (Curto *et al*, 1999; Su, 1999).

- **Ácido ascórbico**

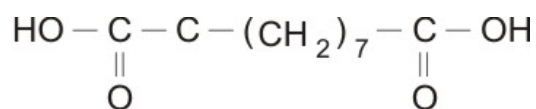
O ácido ascórbico e seus derivados atuam como redutores sobre os compostos intermediários da melanina, bloqueando a reação oxidativa em vários pontos. Também

pode alterar a melanina negra para uma mais clara (Ribeiro & Ohara, 2002; Zhai & Maibach, 2001).

O ácido ascórbico é instável quimicamente em soluções aquosas, sendo oxidado e decomposto. Em produtos despigmentante, são utilizados os ésteres de ácido ascórbico, que são mais estáveis em meio aquoso. Na pele são hidrolisados por fosfatases liberando a vitamina C (Katsambas & Stratigos, 2001; Zhai & Maibach, 2001).

- **Ácido azeláico**

O ácido azeláico interfere com a atividade da tirosinase “in vitro” e pode também inibir a síntese de DNA e oxiredutase mitocondrial, no entanto, parece não afetar o melanócito. No tratamento de lentigens e sardas esta substância parece não apresentar resultados clínicos satisfatórios. É utilizado em concentrações de 15 a 20% (Ribeiro & Ohara, 2002).



**Figura 5:** Ácido azeláico

Fonte: ([www.altavista.com.br](http://www.altavista.com.br))

- **Antipollon HT®**

Silicato de alumínio sintético finamente granulado com capacidade de absorção da melanina (Su, 1999).

Este composto apresenta atividade despigmentante gradual, e é indicado no tratamento do cloasma (Castro *et al*, 1997). Não é irritante, nem sensibilizante, podendo ser usado durante o dia e a concentração usualmente empregada nas formulações é de 1 a 4% (Silva, 1998).

- **Melawhite®**

É uma solução de peptídeos seletivamente fracionados. Atua como inibidor específico, competitivo da tirosinase (Castro *et al*, 1997). Minimiza a formação de manchas na pele devido a sua ação no estágio inicial da melanogênese e sua concentração usual em formulações é de 2 a 5% (Silva, 1998).

- **Ácidos linoléico e linolênico**

Os ácidos linoléico e linolênico, também denominados vitamina F, agem inibindo a produção de melanina e aumentando a renovação do estrato córneo, importante na remoção do pigmento de melanina da epiderme. A vitamina F a partir de 2% aumenta a regeneração celular por estimular a mitose em nível epidérmico (Ribeiro & Ohara, 2002; Ando *et al*, 1998).

### **2.3.2 Plantas e extratos**

Diversas plantas são utilizadas com finalidade cosmética pelas populações de diferentes etnias. No Brasil, um levantamento efetuado por Agra e Silva (1993) em consulta a coletores e vendedores de plantas medicinais da Paraíba, relata a indicação de bonina (*Mirabilis jalapa* L. – família Nyctaginaceae ) e cacau (*Theobroma cacao* L. – família Sterculiaceae) para o tratamento de manchas na pele. Segundo os mesmos autores, outras plantas com a mesma finalidade de uso, como mamão (*Carica papaya* L. – família Caricaceae), espinafre (*Spinacia oleracea* L. – família Chenopodiaceae), salsa (*Ipomoeae asarifolia* Desr. – família Convolvulaceae), pepino (*Cucumis sativus* L. – família Cucurbitaceae), amendoim (*Arachis hypogaea* L. – família Leguminosae), e alho (*Allium sativum* L. – família Poaceae), são citadas.

No mercado de produtos cosméticos são utilizadas muitas matérias primas de origem natural. Extratos de plantas são componentes comuns em fórmulas para diferentes finalidades (Agra & Silva, 1993).

- **Melfade®**

Um dos despigmentantes comercialmente disponíveis é o extrato da uva ursi (*Arctostaphylos uva-ursi* (Linné) Sprengel) (Melfade®). Segundo Castro (1997), este produto inibe o escurecimento da pele e reduz a pigmentação existente interferindo nas etapas enzimáticas da síntese da melanina. Inibe a tirosinase e degrada naturalmente a melanina já existente na pele, alterando a membrana das organelas dos melanócitos e acelerando a degradação dos melanossomos (Castro *et al*, 1997; Su, 1999).

- **Biowhite®**

Complexo vegetal cuja ação baseia-se na inibição da síntese de melanina pela inativação da tirosinase. Apresenta alta atividade mesmo com o uso de baixas concentrações e é estável em variações de pH de ligeiramente ácido a ligeiramente alcalino (Ribeiro & Ohara, 2002).

- **Chá verde**

Os extratos de chá verde (*Thea sinensis* L. – Família Theaceae) e de camomila (*Chamomilla recutita* L. (Rauschert) - Família Asteraceae) são muito utilizados no mercado Japonês (No *et al*, 1999; Masuda *et al*, 1996).

O chá verde inibe o transporte do melanossoma dos melanócitos para os queratinócitos e também inativa a tirosinase. No entanto, sua eficácia não é tão pronunciada como a dos inibidores da tirosinase, atualmente utilizados (Ribeiro & Ohara, 2002).

## 2.4 Famílias das plantas testadas

- **Annonaceae**

Muitos membros da família Annonaceae, contêm alcalóides do tipo isoquinolina e acetogeninas. Essa família é de grande importância na medicina e a graviola (*Annona muricata* L.), um representante muito conhecido e apreciado, é popularmente usado contra várias afecções e tem sido estudada quanto aos princípios ativos existentes (Evans, 1996; Alali *et al*, 1999; Chiu *et al*, 2003).

- **Apocynaceae**

A família contém diversas espécies que apresentam alcalóides indólicos e esteroidais como constituintes freqüentes, além de outros como glicosídeos cianogênicos, leucoantocianinas, saponinas, taninos, cumarinas, ácidos fenólicos e triterpenos (Evans, 1996).

- **Clusiaceae**

Na família Clusiaceae estão os gêneros *Garcinia*, *Callophylum* e *Hypericum*, que freqüentemente é tratado como uma família à parte, Hypericaceae. Os constituintes químicos encontrados nas espécies dessa família são as resinas, os óleos voláteis, alcalóides, xantonas e óleo de semente (Evans, 1996).

- **Dilleniaceae**

A *Davilla rugosa* Poir pertence à família das Dilleniaceae. Todas as espécies de *Davilla* contêm ramnetina e isoramnetina e quase todas contêm leucoantocianinas e 4'-metil canferol (Fillips *et al*, 2000).

- **Euphorbiaceae**

A família das Euphorbiaceae possui espécies com grande interesse comercial, como a mamona (*Ricinus communis* L.), a seringueira (*Hevea* sp. Aubl.) e a mandioca (*Manihot* sp. Mill.) e desperta interesse também pela presença de compostos químicos terpenóides e glicosídeos cianogênicos (Oliveira *et al*, 2002).

- **Flacourtiaceae**

Tanto a família das Flacourtiaceae como das Passifloraceae pertencem à ordem Violales e os glicosídeos cianogênicos aparecem em ambas. As Flacourtiaceae incluem ainda ácidos fenólicos e taninos (Evans, 1996).

- **Passifloraceae**

Além dos glicosídeos cianogênicos, as Passifloraceae apresentam flavonóides, óleos voláteis e alcalóides (Evans, 1996).

- **Leguminosae**

A família das Leguminosae, pertencente à ordem Primulales é a segunda maior família das plantas com flores. É subdividida em 3 sub-famílias: as Papilionaceae, ou Faboidae, Mimosoideae e Caesalpinioideae. Apresentam como constituintes glicosídeos cianogênicos, saponinas, taninos, mucilagens, antocianinas e alcalóides (Evans, 1996).

- **Myrsinaceae**

Essa família, pertencente à ordem Primulales apresenta flores que são particularmente rica em flavonóides. Em algumas espécies, estão presentes saponinas, ésteres e éteres fenólicos. Os alcalóides parecem estar ausentes e

pigmentos antociânicos são comuns, com exceção de betacianinas e betaxantinas (Evans, 1996).

- **Polygonaceae**

Polygonaceae é a única família da ordem Polygonales. Os constituintes mais comuns das espécies dessa família são os pigmentos antociânicos, os flavonóides e os flavonóis. Quinonas também são encontradas em algumas espécies (Evans, 1996).

- **Rubiaceae**

Essa família inclui várias espécies, como por exemplo o café (*Coffea arabica* L.) e a ipecacuanha (*Cephaelis ipecacuanha* Brot. A. Rich.). São comuns a presença de alcalóides, indólicos, oxiindólicos, quinolínicos e purínicos. Possuem, ainda, antraquinonas, antocianinas, glicosídeos iridóides, diterpenóides e triterpenóides (Evans, 1996).

## **2.4 Avaliação de despigmentantes**

A eficácia de um clareador da pele pode ser avaliada por ensaios “in vitro” e ensaios “in vivo”.

### **2.5.1 Ensaios “in vitro”**

Dentre os ensaios “in vitro” são propostos métodos enzimáticos, de cultura celular e cultura de tecidos.

Os métodos enzimáticos são empregados para verificar a atividade inibitória de agentes despigmentantes sobre a atividade de enzimas envolvidas na melanogênese, principalmente sobre a tirosina e L-Dopa. Entretanto, esses métodos não detectam a atividade sobre outras etapas da melanogênese. Neste método, a tirosinase, em geral retirada de cogumelos, é adicionada ao substrato tirosina ou L-DOPA, em presença e ausência do agente despigmentante em estudo. A atividade inibitória é então avaliada pela medida da produção de intermediários da via melanogênica pela leitura espectrofotométrica dos valores de absorbância (Masuda *et al*, 1996).

Os métodos de cultura celular podem avaliar o efeito inibitório dos compostos ativos sobre qualquer etapa da biossíntese da melanina, como a inibição da síntese de açúcar de cadeia lateral ou a transferência de enzimas entre organelas, mas não são aplicáveis para produtos acabados com formulação incompatível com a cultura.

Nesse método, os despigmentantes são adicionados a um meio de cultura para avaliar seu efeito inibitório sobre a melanogênese em células de melanoma de camundongo ou melanócito humano cultivados, originários geralmente de pele de cirurgia de mama ou de pele de prepúcio de recém-nascidos (Masuda *et al*, 1996; Majmudar & Smith, 1998).



O método de cultura de tecidos é empregado para avaliar a eficácia de substâncias despigmentantes em produtos acabados, mas ainda não substituem totalmente a pele humana (Lee e Kim, 1995; Masuda *et al*, 1996; Su, 1999).

Esse método é, algumas vezes usado para estudar a interação dos melanócitos, com suas células vizinhas e com os tecidos. Geralmente, são empregados folículos dissecados de camundongos ou pele de cobaia (Masuda *et al*, 1996).

Apesar das limitações, os testes “in vitro” têm provado sua utilidade para avaliação de segurança e eficácia além da escolha de substâncias ativas (Majmudar & Smith, 1998).

Modelos organotípicos de pele consistem em métodos não animais e de custo apropriado para avaliar a irritabilidade e eficácia das propriedades de vários produtos cosméticos e dermatológicos. O Melanoderm<sup>®</sup>, por exemplo, é um produto que consiste em um modelo tridimensional de pele com alta diferenciação, contendo melanócitos normais humanos, podendo ser ferramenta útil para avaliar agentes de clareamento e bronzeamento da pele. (Nicoletti *et al*, 2002; Klausner *et al*, 2000; Majmudar & Smith, 1998; Majmudar *et al*, 1998).

O primeiro passo na triagem de materiais vegetais com efeitos despigmentantes consiste na investigação do efeito inibitório dos extratos vegetais sobre a atividade da tirosinase, além da pesquisa dos efeitos inibitórios sobre a síntese de melanina em um sistema de cultura celular de melanócitos (Majmudar & Smith, 1998).

### 2.5.2 Ensaio “in vivo”

Os testes “in vivo”, são aplicados aos materiais que apresentaram eficácia nos ensaios “in vitro”. Esses testes podem ser realizados em animais, como ratos pretos e cobaias, mas como existem diferenças bioquímicas e estruturais significativas entre a pele dos animais e a pele humana, os resultados podem não ser precisos (Patrick *et al*, 1999; Majmudar & Smith, 1998). Outra forma de avaliação é o estudo clínico em seres humanos, utilizado geralmente para aferir a eficácia de um produto acabado (Masuda *et al*, 1996). Os testes clínicos em humanos utilizam-se fundamentalmente das técnicas de cromametria, fotografia e mexametria.

Na cromametria, caracteriza-se o grau de pigmentação da pele através de quatro níveis denominados: muito pigmentado, pigmentado, mediano e claro (feita através de avaliação clínica).

No caso do uso da fotografia, procede-se da seguinte forma: seleciona-se uma zona, a qual servirá de referência e fotografa-se a área antes e após o tratamento nas mesmas condições (utilizando-se a mesma máquina fotográfica, trabalhando com o mesmo operador, distância constante, iluminação idêntica, mesma hora do dia, etc). A resposta clínica é graduada por um investigador que avalia a série de fotografias (Benech, 2002; Castro, 2001; Grimes, 1999).

Na mexametria faz-se o uso do aparelho Mexameter<sup>®</sup> MX16 ou MX18 efetuando-se leituras nos comprimentos de onda dos dois pigmentos melânicos onde é determinado o índice M que caracteriza a cor da mancha sem interferência da presença de hemoglobina (Benech, 2002; Castro, 2001).

### 3 OBJETIVOS

O presente trabalho proposto tem como objetivo

- Avaliar os extratos de plantas da região amazônica quanto à atividade inibitória da tirosinase visando, a obtenção de novos agentes despigmentantes da pele a serem empregados em produtos cosméticos e ou farmacêuticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Extratos de plantas

Extratos aquosos liofilizados e orgânicos secos das plantas obtidos de folhas, caule e partes aéreas, foram fornecidos pelo Laboratório de Extração da Universidade Paulista (UNIP).

As espécies e suas respectivas famílias das quais foram obtidos os extratos aquosos e orgânicos são citados na tabela1 apresentada a seguir:

**Tabela 1 -** Plantas da Floresta Amazônica – Nomes científicos das plantas utilizadas e suas respectivas famílias

<b>Espécies</b>	<b>Família</b>
<i>Aparisthium cordatum</i> (A. Juss) Baill.	Euphorbiaceae
<i>Calophyllum brasiliense</i> Cambess	Clusiaceae
<i>Casearia javitensis</i> Kunth	Flacourtiaceae
<i>Couma utilis</i> (Mart.) Mill. Arg.	Apocynaceae
<i>Crudia amazonica</i> Spruce ex Benth.	Leguminosae Caesalpinioideae
<i>Davilla rugosa</i> Poir.	Dilleniaceae
<i>Duguetia uniflora</i> (DC.) Mart.	Annonaceae
<i>Guatteria riparia</i> R. E. Fr.	Annonaceae
<i>Hevea microphylla</i> Ule	Euphorbiaceae
<i>Himatanthus attenuatus</i> (Benth) Woodson	Apocynaceae
<i>Mabea nitida</i> Spruce ex Benth.	Euphorbiaceae
<i>Macrolobium acaciifolium</i> Benth.	Leguminosae Caesalpinioideae
<i>Palicourea grandifolia</i> Standl.	Rubiaceae
<i>Passiflora</i> sp. L.	Passifloraceae
<i>Piranhea trifoliolata</i> Baill.	Euphorbiaceae
<i>Rapanea parviflora</i> Aubl. **	Myrsinaceae
<i>Ruprechtia</i> sp. C. A. Mey.	Polygonaceae
<i>Taralea oppositifolia</i> Aubl.	Leguminosae Faboidae
<i>Triplaria surinamensis</i> Juss	Polygonaceae

\*\* Mata Atlântica

Abaixo, na tabela 2, são dados os códigos dos extratos, os nomes das espécies vegetais, a parte da planta utilizada para se fazer os extratos e o número de coleta de cada espécie vegetal que foram usadas para a avaliação da inibição da tirosinase.

**Tabela 2** - Extratos vegetais de plantas da Floresta Amazônica, utilizados para avaliação da inibição da tirosinase

<b>Extrato O/A*</b>	<b>Espécie</b>	<b>Parte da planta</b>	<b>Número de coleta</b>
01/O 02/A	<i>Calophyllum brasiliense</i>	Caule	PS187
03/O 04/A	<i>Ruprechtia</i> sp.	Folhas e caule	PS387
05/O 06/A	<i>Mabea nitida</i>	Folhas e caule	PS81
07/O 08/A	<i>Piranhea trifoliata</i>	Folhas	PS88
09/A	<i>Aparisthium cordatum</i>	Órgãos aéreos	PS393
10/O 11/A	<i>Piranhea trifoliata</i>	Frutos	PS88
12/O 13/A	<i>Calophyllum brasiliense</i>	Frutos	PS187
14/O 15/A	<i>Mabea nitida</i>	Frutos	PS81
16/O 17/A	<i>Himatanthus attenuatus</i>	Órgãos aéreos	IBS10
18/O 19/A	<i>Calophyllum brasiliense</i>	Folhas	PS187
20/O 21/A	<i>Duguetia uniflora</i>	Casca do caule	PS357
22/O 23/A	<i>Guatteria riparia</i>	Caule	PS115
24/O 25/A	<i>Crudia amazonica</i>	Caule	PS90
26/A	<i>Guatteria riparia</i>	Folhas	PS115
27/O 28/A	<i>Couma utilis</i>	Folhas	AAO3336
29/O 30/A	<i>Macrolobium acaciifolium</i>	Frutos	PS137
31/O 32/A	<i>Hevea microphylla</i>	Caule	PS196
33/O 34/A	<i>Taralea oppositifolia</i>	Folhas	PS108
35/O 36/A	<i>Taralea oppositifolia</i>	Frutos	PS108
37/O 38/A	<i>Piranhea trifoliolata</i>	Caule	PS88
39/O 40/A	<i>Triplaria surinamensis</i>	Caule	AAO3294

41/O 42/A	<i>Davilla rugosa</i>	Órgãos aéreos	AAO3457
43/O 44/A	<i>Passiflora sp.</i>	Órgãos aéreos	AAO3421
45/O 46/A	<i>Rapanea parviflora</i>	Órgãos aéreos	AAO3458
47/O 48/A	<i>Palicourea grandifolia</i>	Órgãos aéreos	AAO3542
49/O	<i>Casearia javitensis</i>	Órgãos aéreos	AAO4067

Obs.:

\* O = extrato orgânico; A = extrato aquoso

#### 4.1.2 Reagentes e solventes

- Tirosina - ( $C_9H_{11}NO_3$ )

beta-(p-hidroxifenil) alanina ou ácido alfa-amino-p-hidroxihidrocínamico – Sigma

Frasco com 25g

- Tirosinase obtida do cogumelo *Agricus biporus* - Sigma

25 KU - 3960 U/mg em frasco com 6,4mg

- Ácido kójico - Galena - Teor: 99%
- Dimetil sulfóxido p.a. - ( DMSO ) - Nuclear
- Fosfato de potássio p.a. - (  $KH_2PO_4$  ) - Synth
- Hidróxido de sódio p.a. - ( NaOH ) - Synth
- Metanol p.a. - Merck
- Diclorometano p.a. - Merck

#### 4.1.3 Equipamentos

Estufa de circulação de ar - Fanem 330/5

Moinho de martelo - Holmes

Evaporador rotativo - Buchii

Liofilizador - Virtis

Freezer -27°C - Revco

Aparelho para purificação de água - Millipore Milli-Q

Medidor de pH - Analyser Orion pH 20

Balança analítica - Ohaus Explorer

Leitor espectrofotométrico de Microplacas Universal (“Spectrophotometer reader”) -

Bio-Tek ELX 800

Estufa de cultura - Leo 895

Estufa de secagem e esterilização - Fanem 515

#### **4.1.4 Outros materiais**

Microplacas de 96 poços

Pipeta automática de 1 a 10  $\mu\text{L}$

Pipeta automática de 10 a 100  $\mu\text{L}$

Pipeta automática multicanal de 10 a 100  $\mu\text{L}$

Vidrarias em geral

## **4.2 Métodos**

### **4.2.1 Preparo dos extratos**

O material foi coletado em florestas de Igapó ou florestas de Terra Firme, de acordo com uma aproximação quimiosistemática, levando em consideração que a coleta foi realizada de maneira adequada, respeitando-se a densidade das espécies no local, de modo a não interferir de maneira prejudicial no seu pronto restabelecimento populacional (Suffredini, 2000).

Após colhido, o material foi identificado e as exsiccatas obtidas depositadas no Herbário UNIP. O material identificado foi acondicionado em sacos de algodão e transportado para o laboratório, a fim de ser seco a 40° C, depois de seco o material foi triturado e processado. Os extratos foram obtidos por maceração em uma mistura de solventes composta por metanol e diclorometano (1:1) por 24 horas, seguida de maceração por 24 horas com água obtida por sistema Milli-Q. Os extratos orgânicos foram evaporados à pressão reduzida (Buchii) e os aquosos foram liofilizados. Por fim, foram estocados a – 27° C até a utilização (Younes *et al*, 2000).

### **4.2.2 Preparo das soluções**

- **Soluções dos extratos**

Para utilização no teste, 28 mg dos extratos foram pesados em balança analítica e transferidos para um frasco. Os extratos aquosos foram dissolvidos em 10 mL de água obtida por sistema Milli-Q e os orgânicos em solução de DMSO 25% em água (V/V). Alíquotas de 1ml foram diluídas para 10 mL de água.

- **Solução de tirosina**

Foram pesados 30 mg de tirosina e dissolvidos em 100 mL de água Milli-Q.



- **Solução de tirosinase**

Solução tirosinase 480 U/mL: o conteúdo do frasco contendo 6,4 mg de enzima (25.000 U), foi dissolvido em 52,1 mL de água.

Solução de tirosinase 120 U/mL: foi retirada uma alíquota de 2,5 mL da solução anterior e diluída em 10 mL de água.

- **Solução Tampão fosfato pH 6,8 ( USP XXVI )**

Preparo da Solução A – Foram pesados 27,218 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e dissolvidos em 1,0 L de água (solução de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  27,218 g/L).

Preparo da Solução B – Uma quantidade de 8,0 g de NaOH foi dissolvida em 1,0 L de água.

Volumes de 50 mL da solução A e 22,4 mL da solução B foram misturados e o volume foi completado para 200 mL com água destilada.

- **Solução de ácido kójico**

Foi pesada quantidade correspondente a 28 mg de ácido kójico, transferido para um balão volumétrico de 100 mL, dissolvido em água obtida por sistema Milli-Q e completado o volume com a mesma água.

Essa solução de 0,280 mg/mL foi submetida a diluições seriadas com água, obtendo-se soluções de 0,140 mg/mL, 0,070 mg/mL, 0,035 mg/mL, 0,0175 mg/mL, 0,00875 mg/mL, e assim por diante.

### 4.2.3 Ensaio da reação enzimática da Tirosinase

Foi realizado conforme o ensaio enzimático utilizado por Kobayashi *et al* (1995) e Khanom *et al* (2000), com algumas modificações.

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados: 10,0 µL de solução aquosa de tirosinase de cogumelo 120 ou 480 U/mL , 70 µL de solução tampão pH 6,8 e 60µL de solução controle ( água ou solução 2,5% de DMSO em água). A essa mistura foram então adicionados 70 µL de solução de L-tirosina, totalizando um volume final de 210 µL. A absorbância foi medida a 490 nm num Leitor espectrofotométrico de microplacas no início da reação (leitura no tempo zero). As microplacas foram incubadas a  $30 \pm 1$  °C durante 180 min, efetuando-se as leituras das absorbâncias a cada uma hora (para a enzima 480 U/mL, as leituras foram feitas a cada 10 min). Os dados foram registrados num computador acoplado ao aparelho. Dos valores de absorbância obtidos nos diferentes tempos de reação, foram subtraídos os valores correspondentes ao tempo zero.

### 4.2.4 Ensaios de Validação do Método

- **Seleção do Comprimento de onda de leitura**

A avaliação foi realizada com o ensaio da reação da tirosinase de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3, efetuando-se as leituras em 450 e 490 nm.

- **Seleção da Temperatura de incubação**

A avaliação foi realizada com o ensaio da reação da tirosinase, em microplacas, com réplicas de 15 poços, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3, incubando-se uma microplaca a 30 °C e outra a 35 °C. As leituras das absorbâncias foram efetuadas em 490 nm.

- **Influência da solução de 2,5% de DMSO em água**

O teste foi realizado com o ensaio da reação da tirosinase, com 08 réplicas, de acordo com o procedimento descrito no item 4.2.3, colocando em uma das placas 60 $\mu$ L de água, como controle e em outra o mesmo volume com meio de 2,5% de DMSO.

Os dados foram analisados estatisticamente utilizando o teste de Student (Teste T).

#### **4.2.5 Determinação da concentração do ácido kójico a ser utilizado como controle positivo no ensaio de inibição da tirosinase com 120 U/mL no meio**

Em microplacas de 96 poços, foram adicionados: 10,0  $\mu$ L de solução aquosa de tirosinase de cogumelo 120 U/mL, 70 $\mu$ L de solução tampão pH 6,8 e 60  $\mu$ L de água ou das soluções de ácido kójico. A essa mistura foram então adicionados 70  $\mu$ L de água destilada contendo 0,3 mg/mL de L-tirosina, totalizando volume final de 210  $\mu$ L. As concentrações de ácido kójico testadas foram: 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 4  $\mu$ g/mL, 3  $\mu$ g/mL, 2,5 $\mu$ g/mL, 1,25  $\mu$ g/mL e 0,625  $\mu$ g/mL. Cada concentração do ácido kójico, e a água foram testadas em oito réplicas. A absorbância foi medida em 490 nm no Leitor espectrofotométrico de microplacas no início da reação (leitura no tempo zero). As microplacas foram incubadas em estufa a  $30 \pm 1$  °C, durante 180 min, efetuando-se as leituras das absorbâncias a cada uma hora. Os dados foram registrados num computador acoplado ao aparelho. Dos valores de absorbância obtidos nos diferentes tempos de reação, foram subtraídos os valores referentes ao tempo zero (valores de absorbância obtidos no início da reação). Foram calculadas as médias e as atividades inibitórias em porcentagem, de cada concentração de ácido kójico aplicando-se a seguinte fórmula:

$$AI (\%) = [(C - S)/C].100$$

Onde: AI = Atividade inibitória

C = Absorbância do controle a 490 nm;

S = Absorbância da amostra a 490 nm;

A concentração correspondente à atividade inibitória 50% (AI50%) do ácido kójico foi calculada a partir da equação da reta, obtida da relação porcentagem de atividade inibitória pela concentração.

#### **4.2.6 Ensaio dos extratos vegetais para avaliação da inibição da tirosinase**

Os ensaios foram realizados como descrito no item 4.2.5, com 60  $\mu$ L de solução de extratos incluídos nos poços, contendo 60  $\mu$ L de água ou 2,5% de DMSO, dependendo da natureza do extrato testado, aquoso ou orgânico e mesmo volume de solução de extratos. A concentração do extrato no poço foi de 80  $\mu$ g/mL e do ácido kójico 5  $\mu$ g/mL. O tempo de reação foi de 120 min.

#### **4.2.7 Determinação da concentração correspondente a atividade inibitória 50% do ácido kójico no meio com 480 U/mL de tirosinase**

Procedeu-se da mesma forma descrita no item 4.2.5, utilizando-se solução de tirosinase com 480 U/mL. As concentrações de ácido kójico testadas foram: 10  $\mu$ g/mL, 5  $\mu$ g/mL, 2,5  $\mu$ g/mL, 1,25  $\mu$ g/mL e 0,625  $\mu$ g/mL. As microplacas foram incubadas em estufa a 30 °C, durante 60 min, efetuando-se as leituras das absorbâncias a cada dez minutos.

#### **4.2.8 Determinação da concentração correspondente a atividade inibitória 50% dos extratos que apresentaram atividade**

Os testes foram executados como descrito no item anterior (4.2.7), substituindo-se as soluções de ácido kójico por soluções de extratos. As concentrações dos extratos incluídas no ensaio foram de 80 µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL e 10 µg/mL.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Seleção do Comprimento de onda de leitura

Os dados da Tabela 3 são as médias e os desvios padrões de 8 leituras de absorbância, nos comprimentos de onda de 450 e 490 nm, nos ensaios da reação da tirosinase. Na Figura 6 estão representados a reação no decorrer do tempo, nos dois comprimentos de onda, e os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ).

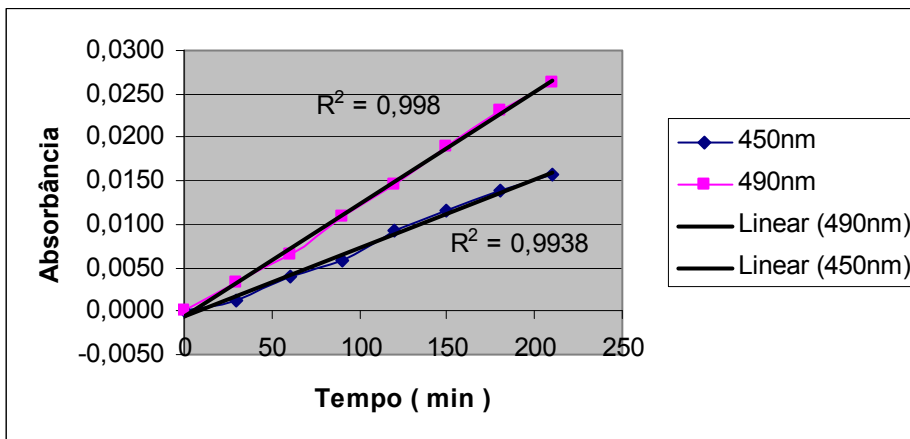
**Tabela 3 - Reação da tirosinase determinada em 450 e 490 nm**

Tempo (minutos)	Abs em 450nm		Abs em 490 nm	
	Média*	DP	Média*	DP
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
30	0,0013	0,0018	0,0034	0,0020
60	0,0039	0,0027	0,0064	0,0032
90	0,0058	0,0032	0,0109	0,0041
120	0,0093	0,0036	0,0145	0,0044
150	0,0115	0,0042	0,0189	0,0052
180	0,0139	0,0049	0,0230	0,0054
210	0,0158	0,0049	0,0264	0,0058

Abs = Absorbância (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n = 8



**Figura 6 – Reação da tirosinase determinada em 450 e 490 nm**

As médias e os desvios padrões de 8 leituras de absorbância, nos comprimentos de onda de 450 e 490nm, nos ensaios realizados com 60  $\mu$ L de solução a 2,5% de DMSO

em água, constam na Tabela 4. Na Figura 7 estão representados a reação da tirosinase no decorrer do tempo e o valor de  $R^2$ .

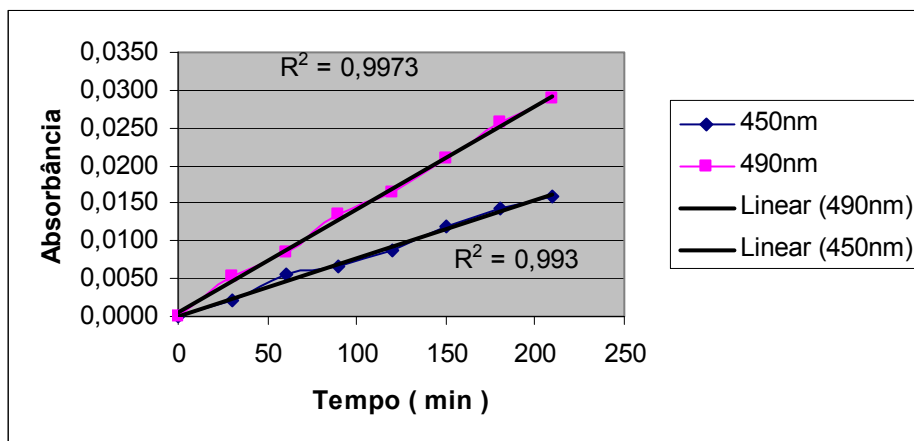
**Tabela 4 - Reação da tirosinase em meio com 60  $\mu$ L de DMSO 2,5% em água determinada em 450 e 490nm**

Tempo (minutos)	Abs em 450nm		Abs em 490nm	
	Médias*	DP	Médias*	DP
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
30	0,0021	0,0028	0,0053	0,0029
60	0,0055	0,0044	0,0086	0,0044
90	0,0066	0,0052	0,0135	0,0053
120	0,0088	0,0067	0,0164	0,0062
150	0,0119	0,0065	0,0209	0,0066
180	0,0144	0,0073	0,0256	0,0075
210	0,0159	0,0077	0,0288	0,0078

Abs = Absorbância (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n = 8



**Figura 7 – Reação da tirosinase determinada em 450 e 490 nm em meio de DMSO 2,5%**

## 5.2 Seleção da Temperatura

Os dados da Tabela são as médias e os desvios padrões de 15 valores de absorbância, dos ensaios realizados com incubação a 30 e 35°C. A Figura 8 foi construída com os dados da Tabela 5.

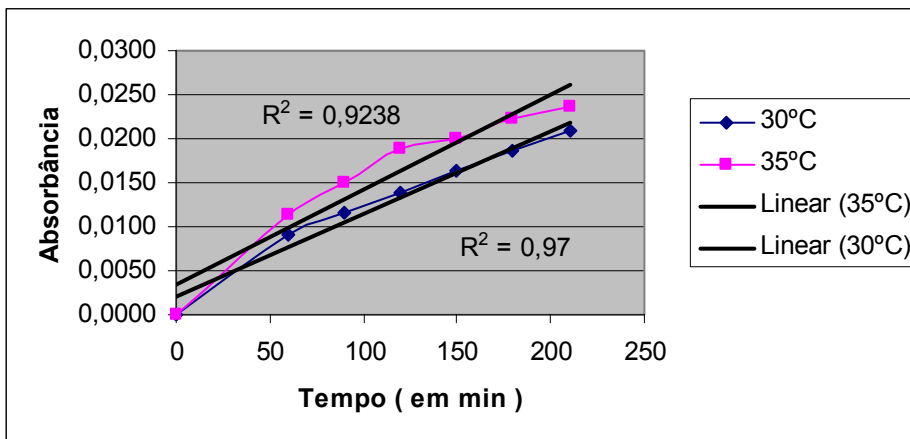
**Tabela 5 - Reação da tirosinase com incubação a 30 e 35°C**

Tempo (minutos)	Abs			
	30°C		35°C	
	Médias*	DP	Médias*	DP
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
60	0,0091	0,0058	0,0114	0,0092
90	0,0117	0,0066	0,0151	0,0102
120	0,0139	0,0060	0,0189	0,0104
150	0,0163	0,0057	0,0200	0,0108
180	0,0187	0,0054	0,0222	0,0107
210	0,0209	0,0055	0,0237	0,0107

Abs = Absorbância (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = desvio padrão

\*n = 15



**Figura 8 – Reação da tirosinase determinada com incubação a 30 e 35°C**



### 5.3 Influência da solução de DMSO 2,5% em água

Os dados da Tabela 6 são as médias, os desvios padrões e os valores de p do teste T de 8 leituras de absorbância, nos comprimentos de onda de 490 nm, nos ensaios realizados com e sem a solução de DMSO 2,5% da reação da tirosinase. Na Figura 9 estão representados a reação no decorrer do tempo, nos dois meios, e os coeficientes de correlação linear ( $R^2$ ).

**Tabela 6 - Reação da tirosinase com e sem a solução de DMSO 2,5% determinada em 490nm**

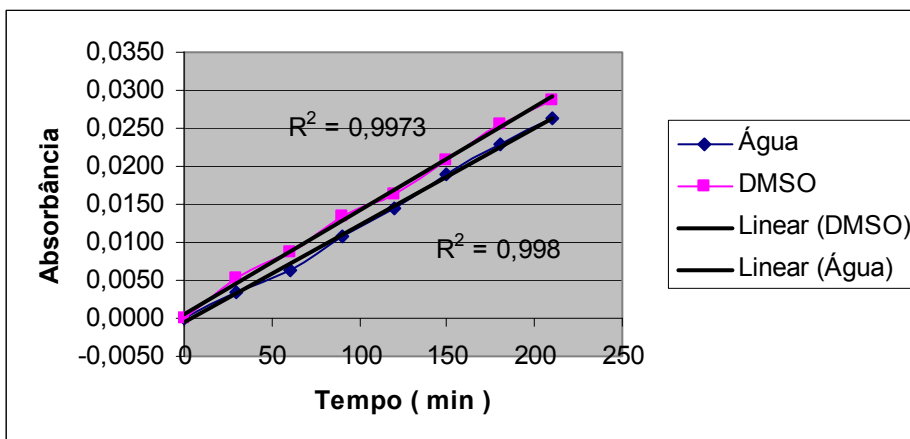
Tempo (minutos)	Abs (meio aquoso)		Abs (DMSO 2,5%)		p
	Médias*	DP	Médias*	DP	
0	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
30	0,0034	0,0020	0,0053	0,0029	0,1494
60	0,0064	0,0032	0,0086	0,0044	0,2719
90	0,0109	0,0041	0,0135	0,0053	0,2910
120	0,0145	0,0044	0,0164	0,0062	0,4913
150	0,0189	0,0052	0,0209	0,0066	0,5118
180	0,0230	0,0054	0,0256	0,0075	0,4395
210	0,0264	0,0058	0,0288	0,0078	0,4964

Abs = Absorbância (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = desvio padrão

\*n = 8

p = valor de p no teste T



**Figura 9 – Reação da tirosinase determinada em meio com e sem DMSO**

#### 5.4 Determinação da concentração de ácido kójico a ser utilizado como controle positivo no ensaio de inibição da tirosinase com 120 U/mL no meio

Os dados utilizados para selecionar a concentração do ácido kójico a ser utilizada como controle positivo, na triagem dos extratos, constam na Tabela 7 e na Figura 10. A Figura 11 foi obtida a partir dos dados da Tabela 8.

**Tabela 7 - Reação enzimática da tirosinase 120 U/mL em presença de Ácido Kójico em diferentes tempos**

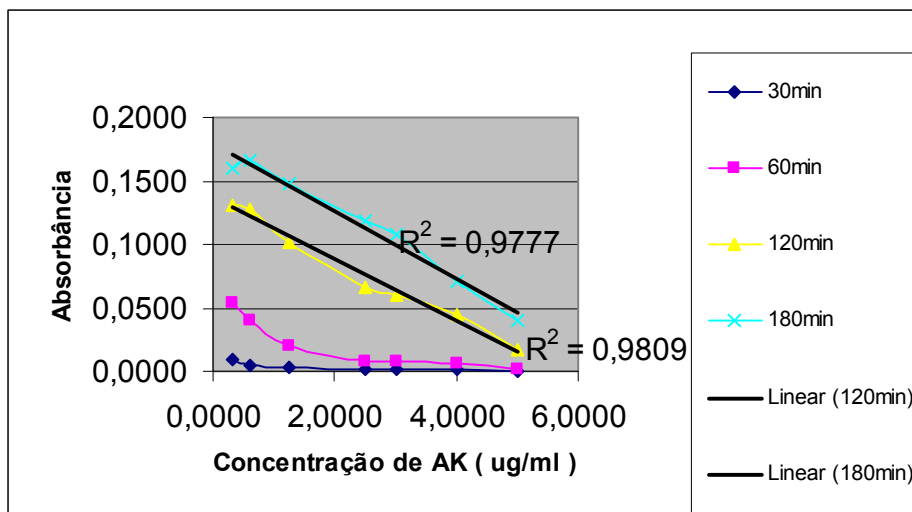
Conc AK	Abs 30min		Abs 60min		Abs 120 min		Abs 180 min	
	Médias*	DP	Médias*	DP	Médias*	DP	Médias*	DP
0,0000	0,0115	0,0024	0,0599	0,0026	0,1271	0,0045	0,1509	0,0049
0,3125	0,0086	0,0017	0,0533	0,0075	0,1308	0,0127	0,1599	0,0143
0,6250	0,0050	0,0024	0,0403	0,0108	0,1283	0,0165	0,1665	0,0178
1,2500	0,0024	0,0014	0,0206	0,0074	0,1009	0,0196	0,1480	0,0234
2,5000	0,0015	0,0007	0,0072	0,0025	0,0660	0,0110	0,1188	0,0127
3,0000	0,0015	0,0070	0,0076	0,0031	0,0603	0,0094	0,1081	0,0131
4,0000	0,0013	0,0004	0,0067	0,0020	0,0439	0,0060	0,0711	0,0089
5,0000	0,0004	0,0007	0,0017	0,0011	0,0175	0,0116	0,0396	0,0232

Abs = Absorbância (Diferenças das absorbâncias lidas)

Conc AK = concentração de ácido kójico

DP = Desvio padrão

\*n = 8

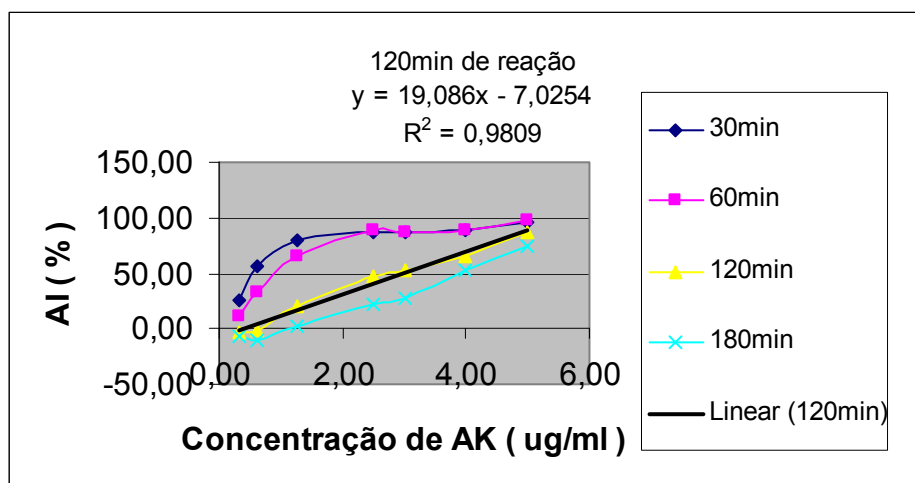


**Figura 10** – Reação da tirosinase 120 U/mL em presença de ácido kójico em diferentes tempos

**Tabela 8 - Atividade Inibitória em porcentagem das diferentes concentrações do ácido kójico nos diferentes tempos de reação**

Conc AK	Porcentagem de inibição			
	30min	60min	120min	180min
0,31	25,00	11,07	-2,85	-5,97
0,63	56,52	32,78	-0,89	-10,36
1,25	79,35	65,55	20,65	1,91
2,50	86,96	87,89	48,08	21,29
3,00	86,96	87,27	52,61	28,33
4,00	89,13	88,73	65,48	52,86
5,00	96,74	97,08	86,23	73,74

Conc AK = concentração de ácido kójico



AI (%) = Porcentagem de atividade inibitória  
 AK = Ácido kójico

**Figura 11 – Porcentagem de atividade inibitória do ácido kójico sobre a tirosinase 120U/ml em diferentes tempos**

- **Atividade inibitória 50% do ácido kójico**

O valor da atividade inibitória 50% do ácido kójico na reação com 120 U/mL de tirosinase, calculada a partir da equação no tempo de 120 minutos de reação (melhor coeficiente de correlação da reta) foi de 2,99 µg/mL.

## 5.5 Ensaios dos extratos vegetais na inibição da tirosinase

As médias e os desvios padrões de 8 leituras de absorbância da reação da tirosinase em presença dos extratos vegetais orgânicos assim como os valores do controle negativo e os correspondente ao ensaio com 5 µg/mL de ácido kójico, encontram-se nas Tabelas 9, 10 e 11. Constam, nas mesmas Tabelas, as porcentagens de inibição da reação da tirosinase. Os mesmos dados referentes aos extratos aquosos constam nas Tabelas 12, 13 e 14.

**Tabela 9 - Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais – ensaio 1o**

Extrato	60 min reação			120 min reação		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
<b>01/O</b>	0,0120	0,0005	-39,13	0,0218	0,0007	30,40
<b>03/O</b>	0,0064	0,0031	<b>26,09</b>	0,0113	0,0039	64,00
<b>05/O</b>	0,0116	0,0005	-34,78	0,0195	0,0017	37,60
<b>07/O</b>	0,0063	0,0007	<b>27,54</b>	0,0098	0,0007	68,80
<b>10/O</b>	0,0134	0,0015	-55,07	0,0395	0,0017	-26,40
<b>12/O</b>	0,0130	0,0010	-50,72	0,0314	0,0016	-0,40
<b>14/O</b>	0,0169	0,0008	-95,65	0,0301	0,0011	3,60
<b>16/O</b>	0,0161	0,0012	-86,96	0,0316	0,0015	-1,20
<b>DMSO 2,5%</b>	0,0086	0,0038		0,0313	0,0053	
<b>AK 5µg/mL</b>	0,0026	0,0036	69,57	0,0038	0,0043	88,00

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

**Tabela 10 - Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais - ensaio 2o**

Extrato	60min reação			120min reação		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
<b>18/O</b>	0,0188	0,0023	-82,93	0,0311	0,0028	7,78
<b>20/O</b>	0,0200	0,0007	-95,12	0,0300	0,0007	11,11
<b>22/O</b>	0,0230	0,0007	-124,39	0,0413	0,0010	-22,22
<b>24/O</b>	0,0160	0,0016	-56,10	0,0271	0,0019	19,63
<b>27/O</b>	0,0159	0,0006	-54,88	0,0293	0,0007	13,33
<b>29/O</b>	0,0123	0,0068	-19,51	0,0213	0,0102	37,04
<b>31/O</b>	0,0253	0,0016	-146,34	0,0479	0,0018	-41,85
<b>33/O</b>	0,0176	0,0011	-71,95	0,0329	0,0015	2,59
<b>DMSO 2,5%</b>	0,0103	0,0033		0,0338	0,0044	
<b>AK 5µg/mL</b>	0,0008	0,0004	92,68	0,0018	0,0007	94,81

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

**Tabela 11 - Reação da tirosinase em presença de extratos orgânicos vegetais – ensaio 3o**

Extrato	60min reação			120min reação		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
<b>35/O</b>	0,0125	0,0026	-49,25	0,0369	0,0054	-18,95
<b>37/O</b>	0,0153	0,0022	-82,09	0,0160	0,0023	48,39
<b>39/O</b>	0,0178	0,0017	-111,94	0,0273	0,0024	12,10
<b>41/O</b>	0,0103	0,0008	-22,39	0,0160	0,0009	48,39
<b>43/O</b>	0,0159	0,0008	-89,55	0,0385	0,0011	-24,19
<b>45/O</b>	0,0066	0,0005	<b>20,90</b>	0,0116	0,0007	62,50
<b>47/O</b>	0,0278	0,0052	-231,34	0,0489	0,0053	-57,66
<b>49/O</b>	0,0179	0,0015	-113,43	0,0231	0,0021	25,40
<b>DMSO 2,5%</b>	0,0084	0,0017		0,0310	0,0055	
<b>AK 5µg/mL</b>	0,0015	0,0013	82,09	0,0025	0,0017	91,94

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

**Tabela 12 - Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 1a**

Extrato	60min reação			120min reação		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
<b>02/A</b>	0,0111	0,0017	-270,83	0,0220	0,0028	-79,59
<b>04/A</b>	0,0050	0,0005	-66,67	0,0076	0,0025	37,76
<b>06/A</b>	0,0068	0,0013	-125,00	0,0125	0,0013	-2,04
<b>08/A</b>	0,0048	0,0007	-58,33	0,0058	0,0027	53,06
<b>09/A</b>	0,0070	0,0019	-133,33	0,0096	0,0017	21,43
<b>11/A</b>	0,0015	0,0012	<b>50,00</b>	0,0029	0,0013	76,53
<b>13/A</b>	0,0049	0,0008	-62,50	0,0090	0,0012	26,53
<b>15/A</b>	0,0025	0,0005	<b>16,67</b>	0,0053	0,0025	57,14
<b>17/A</b>	0,0078	0,0011	-158,33	0,0128	0,0013	-4,08
<b>Água</b>	0,0030	0,0007		0,0123	0,0012	
<b>AK 5µg/mL</b>	0,0013	0,0007	58,33	0,0014	0,0032	88,76

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

Tabela 13 - Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 2a

Extrato	60 min reação			120 min reação		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
23/A	0,0051	0,0091	-51,85	0,0178	0,0092	-46,39
19/A	0,0121	0,0018	-259,26	0,0216	0,0027	-78,35
21/A	0,0026	0,0024	<b>22,22</b>	0,0121	0,0051	0,00
25/A	0,0040	0,0013	-18,52	0,0118	0,0026	3,09
26/A	0,0170	0,0024	-403,70	0,0294	0,0047	-142,27
28/A	0,0044	0,0014	-29,63	0,0106	0,0033	12,37
30/A	0,0115	0,0021	-240,74	0,0204	0,0033	-68,04
32/A	0,0031	0,0013	<b>7,41</b>	0,0060	0,0022	50,52
34/A	0,0023	0,0008	<b>33,33</b>	0,0046	0,0021	61,86
Água	0,0034	0,0005		0,0121	0,0024	
AK 5µg/mL	0,0008	0,0015	77,78	0,0018	0,0019	85,57

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

Tabela 14 - Reação da tirosinase em presença de extratos aquosos vegetais – ensaio 3a

Extrato	60min			120min		
	Abs*	DP	AI %	Abs*	DP	AI %
36/A	0,0064	0,0023	-112,50	0,0181	0,0046	-72,62
38/A	0,0201	0,0028	-570,83	0,0286	0,0025	-172,62
40/A	0,0044	0,0010	-45,83	0,0053	0,0036	50,00
42/A	0,0046	0,0009	-54,17	0,0066	0,0009	36,90
44/A	0,0008	0,0007	<b>75,00</b>	0,0021	0,0014	79,76
46/A	0,0091	0,0011	-204,17	0,0164	0,0017	-55,95
48/A	0,0045	0,0012	-50,00	0,0129	0,0030	-22,62
Água	0,0030	0,0014		0,0105	0,0040	
AK 5µg/mL	0,0020	0,0021	33,33	0,0015	0,0007	85,71

Abs = Média das Absorbâncias (Diferenças das absorbâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\*n= 8

AI % = Porcentagem de atividade inibitória

AK = Ácido kójico

## 5.6 Determinação Atividade Inibitória 50% do ácido kójico

Os valores médios e os desvios padrões de 8 leituras de absorvâncias nos ensaios realizados com diferentes concentrações do ácido kójico em diferentes tempos estão apresentados na Tabela 15 . Os valores de porcentagem de inibição para cada concentração constam na Tabela 16. A partir desses valores foram obtidos as equações das retas (Figura 13) e o valor da atividade inibitória 50% (AI 50%) do ácido kójico sobre a tirosinase, foi calculado utilizando a equação no tempo 60min de reação, pois foi onde obteve-se o melhor coeficiente de correlação.

**Tabela 15 - Reação enzimática da tirosinase em presença de ácido kójico em diferentes tempos de reação**

Conc AK	10 min		20 min		30 min		40 min		50 min		60 min	
	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP
0,63	0,0519	0,0053	0,1729	0,0107	0,2813	0,0134	0,3810	0,0158	0,4571	0,0171	0,5228	0,0166
1,25	0,0338	0,0090	0,1309	0,0242	0,2280	0,0341	0,3293	0,0414	0,4088	0,0436	0,4818	0,0453
2,50	0,0190	0,0058	0,0920	0,0164	0,1744	0,0241	0,2708	0,0310	0,3571	0,0357	0,4446	0,0371
5,00	0,0069	0,0023	0,0424	0,0105	0,0929	0,2120	0,1634	0,0312	0,2350	0,0402	0,3164	0,0490
10,00	0,0007	0,0007	0,0079	0,0033	0,0240	0,0096	0,0561	0,1560	0,0973	0,0183	0,1490	0,0200

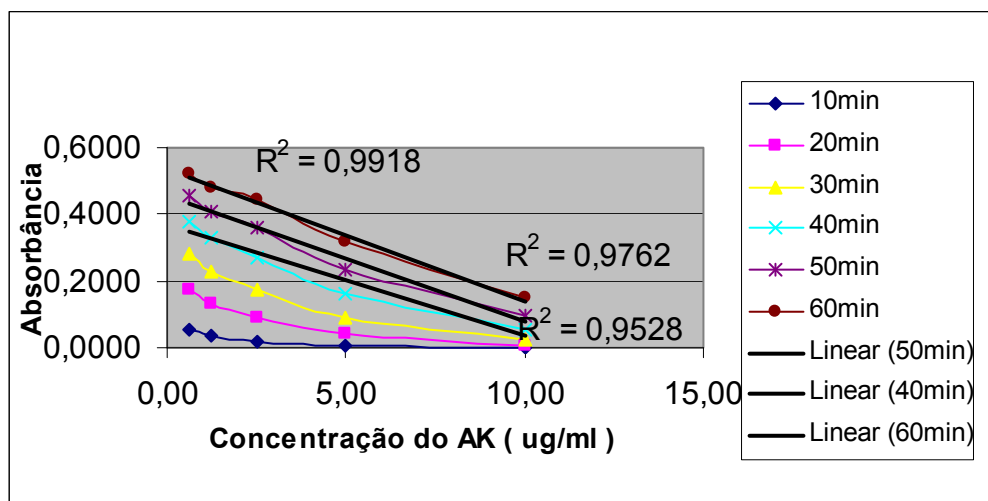
Conc = concentração

AK = Ácido kójico

Abs = Média das Absorvâncias (Diferenças das absorvâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\* n = 8

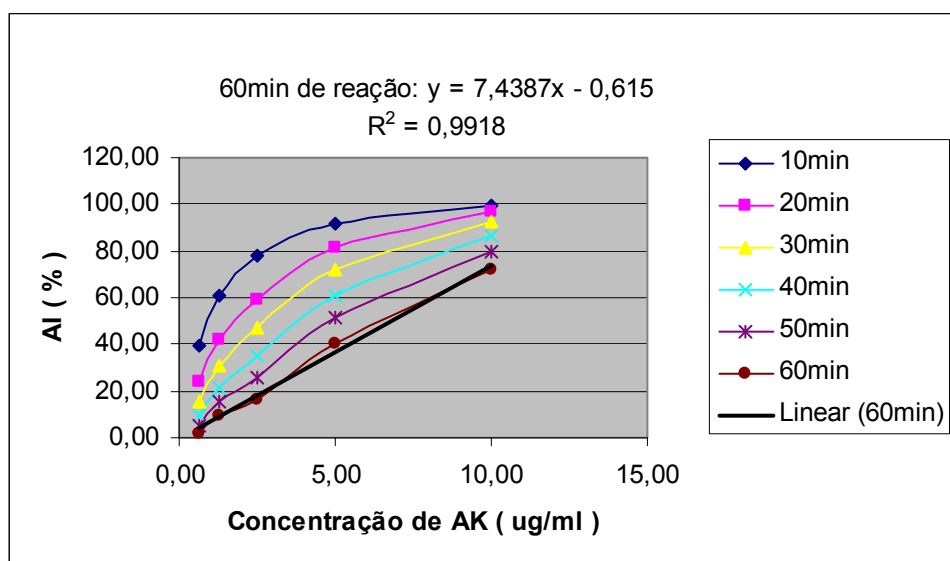


**Figura 12 – Reação da tirosinase 480U/mL em presença de ácido kójico em diferentes tempos**

**Tabela 16 - Porcentagem de inibição da reação da tirosinase 480U/mL pelas diferentes concentrações do ácido kójico**

Conc AK	Porcentagem de inibição					
	10min	20min	30min	40min	50min	60min
0,63	39,24	23,68	15,09	9,31	5,26	1,99
1,25	60,47	42,22	31,17	21,63	15,28	9,68
2,50	77,75	59,38	47,36	35,55	25,98	16,64
5,00	91,95	81,29	71,96	61,11	51,30	40,68
10,00	99,12	96,52	92,75	86,64	79,84	72,06

Conc AK = concentração de ácido kójico



**Figura 13 – Porcentagem de atividade inibitória do ácido kójico sobre a tirosinase 480U/mL em diferentes tempos**

- **Atividade inibitória 50% (AI 50%)**

Este valor foi calculado utilizando a equação da reta conseguida a partir das porcentagens de inibição da reação da tirosinase pelas diferentes concentrações do ácido kójico no tempo de 60 minutos de reação (Figura 13).

A AI 50% do ácido kójico foi de 6,85  $\mu\text{g/mL}$ .



## 5.7 Ensaios com os extratos vegetais selecionados

Os valores médios e os desvios padrões de 8 leituras de absorvâncias aos 60min de reação nos ensaios realizados com diferentes concentrações dos extratos vegetais selecionados na primeira triagem estão apresentados nas Tabela 17 e os valores de p do teste T na Tabela 18. As atividades inibitórias de cada concentração estão apresentadas na tabela 19.

**Tabela 17 – Reação da tirosinase na presença dos extratos em diferentes concentrações com leituras das absorvâncias após 60 minutos**

Extrato	Concentração do extrato µg/mL									
	0**		10		20		40		80	
	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP	Abs*	DP
<b>03/O</b>	0,5299	0,0139	0,3763	0,0123	0,2511	0,0142	0,1684	0,0249	0,0915	0,0146
<b>07/O</b>	0,5299	0,0139	0,5008	0,0086	0,5064	0,0268	0,5013	0,0699	0,4545	0,0331
<b>45/O</b>	0,5430	0,0131	0,4838	0,0539	0,4624	0,0211	0,3583	0,0136	0,2118	0,0093
<b>11/A</b>	0,5005	0,0516	0,4439	0,0064	0,4478	0,0128	0,4446	0,0056	0,4606	0,0164
<b>15/A</b>	0,5005	0,0516	0,4668	0,0205	0,4714	0,0383	0,4568	0,0223	0,4194	0,0086
<b>21/A</b>	0,5840	0,0156	0,5680	0,0064	0,5318	0,0095	0,4659	0,0117	0,3874	0,0211
<b>32/A</b>	0,5840	0,0156	0,5799	0,0122	0,5673	0,0080	0,5631	0,0236	0,5711	0,0337
<b>34/A</b>	0,5583	0,0086	0,5633	0,0216	0,5656	0,0161	0,5628	0,0227	0,5673	0,0199
<b>44/A</b>	0,5583	0,0086	0,5475	0,0263	0,5394	0,0205	0,5468	0,0251	0,5660	0,0117

Abs = Média das Absorvâncias (Diferenças das absorvâncias lidas)

DP = Desvio padrão

\* n = 8

0\*\* = Controle

**Tabela 18 – Valores de p do Teste T (comparadas as absorbâncias dos extratos com absorbâncias do controle)**

Extrato	Concentração do extrato ( µg/mL)			
	10	20	40	80
	p	p	p	p
03/O	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
07/O	0,0002*	0,0450*	0,2754	< 0,0001*
45/O	0,0092*	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
11/A	0,0082*	0,0141*	0,0087*	0,0559
15/A	0,1081	0,2211	0,0452*	0,0006*
21/A	0,0178*	< 0,0001*	< 0,0001*	< 0,0001*
32/A	0,5675	0,0175*	0,0554	0,3425
34/A	0,5527	0,2770	0,6082	0,2599
44/A	0,2882	0,0306*	0,2404	0,1559

p = valor de p do teste T  
 \* = significativo

**Tabela 19 – Atividade inibitória da tirosinase pelos extratos vegetais**

Extrato	AI(%)				Equação	R <sup>2</sup>	AI50% µg/mL
	10µg/mL	20µg/mL	40µg/mL	80µg/mL			
03/O	28,99	52,61	68,22	82,73	y = 0,9282x + 18,664	0,8032	33,76
07/O	5,50	4,40	5,40	14,23	y = 0,1529x + 1,3198	0,8748	318,37
45/O	10,91	14,85	34,02	61,00	y = 0,7559x + 1,4798	0,9935	64,19
11/A	11,31	10,54	11,16	7,97	y = 0,0446x + 6,8585	0,0872	-
15/A	6,70	5,80	8,70	16,21	y = 0,1764x + 2,1911	0,9077	271,03
21/A	2,74	8,95	20,23	33,67	y = 0,4354x + 0,0568	0,9845	114,7
32/A	0,71	2,87	3,55	2,31	y = 0,0027x + 1,0773	0,3298	-
34/A	-0,90	-1,32	-0,81	-1,61	y = - 0,0144x – 0,4975	0,5511	-
44/A	1,93	3,31	2,06	-1,32	y = 0,0293x + 2,0743	0,2537	-

AI (%) = Porcentagem de atividade inibitória  
 R<sup>2</sup> = coeficiente de correlação linear  
 AI50% = Atividade inibitória 50%

## 6 DISCUSSÃO

O aspecto da pele é uma característica importante, e tanto a hiperpigmentação como a hipopigmentação, são distúrbios pigmentares que afetam a estética e podem ser tratados. Produtos cosméticos e farmacêuticos, contendo substâncias sintéticas ou componentes naturais com atividade despigmentantes, procedimentos como “peeling” e tratamento com raios “laser” são utilizados para o tratamento de pacientes que apresentam estes distúrbios (Grimes, 1999). Nos últimos anos, os produtos para clarear a pele tiveram crescimento explosivo, entretanto, nem sempre as terapias utilizadas têm demonstrado resultados satisfatórios (Su, 1999). Essas observações fundamentam a razão pela qual ainda há intensa pesquisa na busca de novos despigmentantes, em especial, inibidores de enzimas envolvidas na melanogênese, como a tirosinase.

Considerando-se que as plantas contêm muitas substâncias que podem ter essa atividade, e seguindo a tendência atual em se buscar espécies vegetais com atividade terapêutica, foram selecionados extratos botânicos de plantas amazônicas (uma da Mata Atlântica) pertencentes a famílias que apresentam considerável produção de flavonóides, tais como a Annonaceae, Apocynaceae, Clusiaceae, Dilleniaceae, Euphorbiaceae, Flacourtiaceae, Leguminosae, Myrsinaceae, Passifloraceae, Polygonaceae e Rubiaceae. A estrutura fenólica, muitas vezes dos flavonóides, foi amplamente relacionada à inibição da tirosinase (Kubo e Kinst-Hori, 1998; No *et al*, 1999; Kubo *et al*, 1999; Kubo *et al*, 1995; Kubo *et al*, 1994; Iida *et al*, 1995).

Além disso, muitos pesquisadores estudaram espécies pertencentes a algumas dessas famílias (Euphorbiaceae, Leguminosae, Polygonaceae, e Rubiaceae ) que apresentaram compostos fenólicos, como flavonóides e taninos, como agentes biologicamente ativos sobre a tirosinase (Masamoto *et al*, 1980; Iida *et al*, 1995; Miao *et al*, 1997; Khanom *et al*, 2000 ).

O presente trabalho avaliou, pelo método espectrofotométrico o efeito de extratos de 19 plantas brasileiras (18 da região Amazônica e 01 da Mata Atlântica) sobre a melanogênese, num total de 49 extratos dentre os quais 25 são aquosos e 24 orgânicos.

O ensaio enzimático foi realizado baseando-se, principalmente, nos ensaios realizados por Kobayashi *et al*(1995) e em diversos outros trabalhos que se utilizaram como substrato a L-tirosina, caso de Khanom *et al*(2000), Chen *et al*(1991), No *et al*(1999), Iida (1995), além de outros que se utilizaram de L-Dopa como substrato (Kubo *et al*, 1994, 1995, 1998, 1999, Dawley & Flurkey 1993, e Masamoto *et al*, 1980).

A escolha do comprimento de onda de leitura foi baseada nos trabalhos citados que utilizaram para a leitura 475 nm, no entanto, No *et al* (1999) que realizou o ensaio em microplacas com a absorbância determinada em Leitor de Elisa, utilizou o comprimento de onda de 492 nm.

Considerando a disponibilidade apenas dos filtros de 450 e 490 nm no aparelho de microplacas utilizado neste trabalho, realizaram-se leituras da reação da tirosinase nos dois comprimentos de onda, tanto em água como no meio com 2,5% de DMSO, solventes respectivamente dos extratos aquosos e orgânicos. Os valores de  $R^2$  (Figuras 5 e 6) mostram que nas duas condições de ensaio, as leituras nos comprimentos de onda tanto de 450 como de 490 nm, apresentam reação com correlação linear, pois apresentaram valores superiores a 0,9900. Em meio com água o  $R^2$  foi de 0,9938 e 0,9980, e naquele com DMSO, de 0,9930 e 0,9973, respectivamente em 450 e 490 nm. Apesar de nos dois comprimentos de onda o  $R^2$  se aproximar do valor 1,0000, aqueles determinados a partir das leituras efetuadas a 490nm foram maiores. Decidiu-se pelo comprimento de onda de 490 nm baseados nesses dados e também nos trabalhos relatados na literatura que utilizaram o comprimento de onda de 492 nm.

Outro fator que influi numa reação enzimática é a temperatura do meio. Na literatura autores utilizaram diferentes temperaturas, 25, 30 e 37°C (Kobayashi *et al*,1995;

Khanom *et al*, 2000; Iida *et al*, 1995). Decidiu-se pela temperatura de 30 °C, baseada nos valores de  $R^2$ , 0,9700 e 0,9238, correspondentes a 30°C e 35°C respectivamente.

A influência do DMSO na reação foi avaliada considerando-se que seria o solvente a ser utilizado para a preparação das soluções dos extratos orgânicos. Obteve-se relação linear da reação no decorrer do tempo (Figura 8) com valor de  $R^2$  igual a 0,9973, enquanto que em sua ausência  $R^2$  foi de 0,9980. Após ter sido efetuada a análise estatística, verifica-se que, os valores de absorbância nos diferentes tempos de reação com ou sem o solvente DMSO, não são significativas.

O ácido kójico foi adotado como controle positivo da inibição da reação, pois sabe-se que esta substância é um potente inibidor da tirosinase “in vitro” (Sandoval, 1999). Além disso, é um composto utilizado para clarear a pele com pouca ação citotóxica, hidrossolúvel, que não se oxida facilmente em contato com o ar (Su, 1999; Sandoval, 1999). O ácido kójico atua na conversão da tirosina a dopa e desta última a dopaquinona por inibição parcial e incompleta da ação enzimática da tirosinase. Reduz a conversão de dopacromo a 5-6-dihidroxi-indol 2-carboxílico, sugerindo um possível inibição da atividade da tautomerase e por inibição da conversão de 5-6-dihidroxi-indol 2-carboxílico ao polímero eumelanina (Sandoval, 1999).

O ácido kójico também foi utilizado como substância de comparação em alguns ensaios de inibição da tirosinase (Benech, 2002; Khanom *et al*, 2000; Iida *et al*, 1995).

Para a determinação da concentração do ácido kójico ser incluída no ensaio com os extratos, como controle positivo, foi efetuado ensaio com algumas concentrações da substância. O tempo de reação com maior coeficiente de correlação foi de 120 minutos ( $R^2$  de 0,9809) e o valor de AI 50% sobre a tirosinase 120 U/mL, calculado utilizando a equação da reta correspondente a esse tempo foi de (tabela 8 e figura 10) 2,99 µg/mL. A partir desses dados, foi determinada a concentração de 5 µg/mL, a ser incluída, como controle positivo, nas placas do ensaio preliminar dos extratos vegetais. A atividade

inibitória é avaliada pela medida dos intermediários da melanina, por absorbância (Masuda *et al*, 1996).

Na primeira triagem foi utilizada quantidade de enzima correspondente a 120 U/mL de atividade, menor que a relatada na literatura, para aumentar a sensibilidade do método, pois no ensaio com extratos vegetais é interessante detectar mesmos aqueles com atividade inibitória baixa, para posterior estudo. Pelo fato de não se conhecer a composição destes extratos, convém em estudos futuros verificar a existência de substâncias que teriam alta atividade inibitória da tirosinase e que podem ser posteriormente isoladas.

O cálculo da atividade inibitória dos extratos sobre a melanogênese baseou-se na comparação dos dados entre os testes com os extratos e o controle negativo (reação sem o extrato).

Os extratos que apresentaram valores de porcentagem de atividade inibitória positiva, nos primeiros 60 minutos (tabelas 9 a 14), no caso 03 orgânicos (Extratos 03/O, 07/O e 45/O) e 06 aquosos (Extratos 11/A, 15/A, 21/A, 32/A, 34/A e 44/A), e o ácido kójico, foram submetidos a novos ensaios para a determinação dos valores de AI 50% para avaliar sua atividade. Nestes ensaios, foi utilizada quantidade de tirosinase correspondente a 480 U/mL, uma vez que os extratos a serem testados já mostraram atividade inibitória na primeira triagem.

O valor da atividade inibitória 50% do ácido kójico sobre a tirosinase calculado a partir das porcentagens de inibição da reação em diferentes concentrações (figura 9) foi de 6,85 µg/mL.

Nessa etapa, os extratos também apresentaram atividades inibitórias positivas (com exceção do extrato 34/A) como pode ser observado na tabelas 19, no entanto a linearidade das curvas para os cálculos das AI50%, nem sempre foi o ideal (acima de 0,9000), como ocorreu com os extratos 45/O, 15/A e 21/A.

Quando comparados os valores de AI50% dos extratos com a do ácido kójico verificou-se que o extrato que apresentou maior atividade foi o 03/O (*Ruprechtia* sp – folhas e caule - família das Polygonaceae) com AI50% de 33,76 µg/mL, mas a relação dose dependência não foi tão boa ( $R^2 = 0,803$ ) como no caso do extrato 45/O (*Rapanea parviflora* – órgãos aéreas – família das Myrsinaceae) com AI50% de 64,19 µg/mL, e ótima linearidade ( $R^2 = 0,9935$ ). Esta última é a única planta que pertence ao grupo de plantas da Mata Atlântica.

No trabalho de Khanom (2000), o ácido kójico apresentou atividade inibitória de tirosinase 50% de 7,5 µg/mL e o extrato mais ativo (*Glycyrrhiza glabra* - alcaçuz) apresentou atividade inibitória da tirosinase 50% = 21,2 µg/mL.

Pelos dados obtidos, pode-se considerar que os extratos de *Ruprechtia* sp (folhas e caules) *Piranhea trifoliolata* (folhas), *Rapanea parviflora* (órgãos aéreos), *Piranhea trifoliolata* (frutos) *Mabea nítida* (frutos), *Duguetia uniflora* (casca do caule), *Hevea microphyla* (caule), *Taralea oppositifolia* (folhas), *Passiflora* sp.(órgãos aéreos), apresentam atividade anti-tirosinase e que podem ser de interesse para novos estudos “in vitro” em sistemas mais complexos, como cultura de melanócitos, e após avaliação da toxicidade em testes “in vitro”, podem ser testados em pesquisas “in vivo” para seres humanos.

## 7 CONCLUSÃO

Os extratos orgânicos de *Ruprechtia* sp., *Piranhea trifoliolata*, *Rapanea parviflora* e os aquosos de *Piranhea trifoliata*, *Mabea nítida*, *Duguetia uniflora*, *Hevea microphyla*, *Taralea oppositifolia*, *Passiflora* sp., apresentaram atividade inibitória da tirosinase nos testes “in vitro” por espectrofotometria.



## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ACIDO AZELAICO. Imagens. Disponível em [www.altavista.com.br](http://www.altavista.com.br) Acesso em 05 Jun 2004

AGRA, M.F.; SILVA, M.G. Plantas medicinais usadas como cosméticos na Paraíba (Brasil) e na literatura. **Rev. Bras. Farm.**, Rio de Janeiro, v.74, n.2, p.42-44, 1993.

ALALI F.Q.; LIU, X.X.; Mac LAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.**, Cincinnati, v.62, n.3, p.504-540, 1999.

ALCHORNE, M.M.A.; CESTARI, S.C.P. Tratamento dermatológico das hiperpigmentações. **Revista Brasileira de Medicina**, São Paulo, v.58, n.3, p.162-163, 2001.

ANDO, H.; RYU A.; HASHIMOTO, A; OKA M.; ICHIHASHI, M. Linoleic Acid and Alpha-linolenic Acid Lightens Ultraviolet-Induced Hyperpigmentation of the Skin. **Arch Dermatol Res**, Berlin, v.290, n.7, p.375-381, 1998.

BENECH, G. Novo ativo clareador extraído de cítricos. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.14, p.51-53, 2002.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.12, p.44-50, 2000.

BORELLI, S. S. **Cuidados com a pele: Mitos e verdades**. São Paulo: Iglu, 1994. p.75-81.

CASTRO, A.C.; PIMENTEL, L.C.; DORANDE, I.. Tratamento da hiperpigmentação: uva-ursina versus hidroquinona. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.9, p.39-43, 1997.

CHANG, F.R.; LIAW, C.C.; LIN, C.Y.; CHOU, C.J. CHIU, H.F.; WU, Y.C. New adjacent tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona muricata* **Planta Médica**, Stuttgart, v.69, n.03, p.241-246, 2003.

CHEDEKEL, M.R.; ZEISE, L. Melanina: novo ingrediente cosmético. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.8, n.1, p.40-43, 1996.

\* De acordo com a NBR 6023/2002, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas. As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (Cassi) 2002.

- CHEN, J.S.; WEI, C.; MARSHALL, M.R. Inhibition Mechanism of Kójic Acid on Polyphenol Oxidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.39, n.11, p.1897-1901, 1991.
- CURTO, E.V.; KWONG, C.; HERMERSDÖRFER, H.; GLATT, H.; SANTIS, C.; VIRADOR, V.; HEARING, JR V.J.; DOOLEY, T.P. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: *in vitro* comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. **Biochemical Pharmacology**, Amsterdam, v.57, p.663-672, 1999.
- DAWLEY, R. M.; FLURKEY, W.H. 4-Hexylresorcinol, a potent inhibitor of mushroom tyrosinase. **Journal of Food Science**, Oxford, v. 58, n.3, p. 609-610, 1993.
- EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. 14ed. London: WB Saunders Company Ltda, 1996. 612p.
- FILLIPS, R.A.; MORS, W.B.; RIZZINI, C.T.; PEREIRA, N.A. **Medicinal Plants of Brazil**. Algonac: Reference Publications Inc, 2001. p.192-217.
- FITZPATRICK, T.B.; JOHNSON, R.A.; WOLFF, C. **Color Atlas and Synopsis of Clinical Dermatology**. 4.ed. New York: Mc Graw-Hill, 2001, p.192-217.
- GARCIA, C.R. O farmacêutico e a proteção solar. **Infarma – Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia**, São Paulo, v. 13, n.11/12, p.81-86, 2001.
- GRIMES, P.E. Melasma.Etiologic and therapeutic considerations. **Arch. Dermatol.**, Chicago, v.131, p.1453-1457, 1995.
- GRIMES, P.E. The safety and efficacy of salicylic acid chemical peels in darker racial-ethnic groups. **Dermatol\_Surg**, New York, v.25, p.18-22, 1999.
- GUTERRES, S.; ZIEGLER, S. Matérias-primas vegetais com ação antiinflamatória empregadas em produtos dermo-cosméticos. **Infarma – Informativo Profissional do Conselho Federal de Farmácia**, São Paulo, v.14, n.1/2, p.79-83, 2002.
- HERNANDES, M.; MERCIER-FRESNEL, .M.M. **Manual de Cosmetologia**, 3.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 1999. 355p.
- IIDA, K.; HASE K.; SHIMOMURA, K.; SUDO, S.; KADOTA, S.; NAMBA, T. Potent inhibitors of tyrosinase activity and melanin biosynthesis from *Rheum officinale*. **Planta Médica**, Stuttgart, v.61, p.425-428, 1995.

- INDEX, Merck: An Encyclopedia of Chemicals drugs and Biologicals. 12.ed.White house station: Merck Research Laboratories, 1996. 1741p.
- JUEZ, J.L.P.; GIMIER, L.P. **Ciência Cosmética: Bases Fisiológicas y Critérios Práticos**, Madrid:Heliotipia Artística S.L., 1995. 793p.
- KATSAMBAS, A. D.; STRATIGOS, A. J. Depigmenting and Bleaching Agents: Coping with Hyperpigmentation. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v.19, p.483-488. 2001.
- KESSEL, R.G. **Histologia Médica Básica**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.318-331.
- KHANOM, F.; KAYAHARA, H.; TADASA, K. Tyrosinase inhibitory activity of bangladeshi indigenous medicinal plants. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.64, n.9, p.1967-1969, 2000.
- KLAUSNER, M.; NEAL, P.; BREYFOGLE, B; KUBILUS, J. Melanoderm, um tecido epidérmico para avaliar os agents de clareamento e bronzeamento da pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.12, n.6, p.69, 2000.
- KOBAYASHI,Y.; KAYAHARA, H.; TADASA, K.; NAKAMURA, T.; TANAKA,H. Synthesis of amino acid derivates of kojic acid and their tyrosinase inhibitory activity. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.59, n.9, p. 1745-1746, 1995.
- KUBO, I.; HORI, I.K. Flavonol from saffron flower: tirosinase inhibitory activity and inhibition mechanism. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.47, p.4121-4125, 1999(a).
- KUBO, I.; HORI, I.K. 2-Hidroxy-4-methoxybenzaldehyde: A potent tyrosinase inhibitor from african medicinal plants. **Planta Médica**, Stuttgart, v.65, p.19-22, 1999(b).
- KUBO, I.; HORI, I.K.; YOKOKAWA, Y. Tyrosinase inhibitors from *Anacardium Occidentale* fruits. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.57, n.4, p.545-551, 1994.
- KUBO, I.; YOKOKAWA, Y.; HORI, I.K.; Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants, **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v.58, n.5, p. 739-43, 1995.
- LAM, A.Y.M.; WONG, D.S.Y.; LAM, L.K.; HO, W.S.; CHAN, H.H.L. A Retrospective Study on the Efficacy and Complications of Q-Switched Alexandrite Laser in

Treatment of Acquired Bilateral Nevus of Ota-like Macules. **Dermatologic Surgery**, New York, v.27, p.937-942, 2001.

LEE, K.K.; CHOI, J.D.; *Areca catechu* L. extract.II. Effects on inflammation and melanogenesis. **Journal of Cosmetic Science**, Washington v.49, p.351-359, 1998.

LEE, O.S.; KIM, E.J. Skin Lightening. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.110, p.51-56, 1995.

MAEDA, K.; FUKUDA, M. In Vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, New York, v.42, p.361-368, 1991.

MAJMUDAR, G.; SMITH, M. In vitro Screening Techniques in Dermatology. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.113, p. 69-74, 1993.

MAJMUDAR, G.; JACOB, G.; LABOY, Y.; FISHER, L. An in vitro method for Screening skin-whitening products. **Journal of Cosmetic Science**, Washington, v.49, p.361-7, 1998.

MASAMOTO Y.; IIDA S.; KUBO M. Inhibitory effect of chinese crude drugs on tyrosinase, **Planta Médica**, Stuttgart, v.40, p.361-365, 1980.

MASUDA M.; TEJIMA T.; SUZUKI T. Skin Lighteners. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.111, p.65-77, 1996.

MIAO, Z.; KAYAHARA, H.; TADASA, K. Superoxide-scavenging and tyrosinase-inhibitory activities of the extracts os some chinese medicines. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v.61, n.12, p.2106-2108, 1997.

MIMAKI, Y.; KAMEYAMA, A.; SASHIDA, Y.; MIYATA, Y.; FUJII, A. A novel hexaydrodibenzofuran derivative with potent inhibitory activity on melanin biosynthesis of cultered B-16 melanoma cells from *Lindera umbellata* bark. **Chem. Pharm. Bull.**, Tokyo, v.43, n.5, p.893-895, 1995.

NICOLETTI, M.A.;ORSINE, E.M.A.; DUARTE, A.C.N.; BUONO, G.A. Hiper Cromias: Aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.14, n.3, p.46-53, 2002.

NO, J.K.; SOUNG, D.Y.; KIM, Y.J.; SHIM, K.H.; JUN, Y S; RHEE, S.H.; YOKOZAWA, T.; CHUNG, H.Y. Inhibition of Tyrosinase by Green Tea Components. **Life Sciences**, Oxford, v.65, n.21, p.241-246, 1999.

- OLIVEIRA, R.B.; GODOY, S.A.P.; COSTA, F.B. **Plantas Tóxicas: Conhecimento e Prevenção**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2002. p.27.
- PANDYA, A.G.; GUELVARA, J.L. Disorders of hyperpigmentation. **Dermatologic Clinics**, Philadelphia, v.37, n.1, p.91-8, 2000.
- PATRICK, E.P.; JUBERG, D.R.O.; DONOGHUE, J.; MAIBACH, H.I. Depigmentation with Ter-butyl hidroquinone using black guinea pigs. **Food and Chemical Toxicology**, Philadelphia, v.37, p.169-175, 1999.
- PAWELEK, J.M.; CHARRABORTY, A.K.; OSBER, M.P.; BOLOGNIA, J.L. Ultraviolet Light and Pigmentation of the Skin. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.107, p.61-7, 1992.
- PONZIO, H.A.; CRUZ, M.F. Acurácia do exame sob a lâmpada de Wood na classificação dos cloasmas. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v.68, n.6, p.325-328, 1993.
- PROTA, G. Recent Advances in the Chemistry of Melanogenesis in Mammals. **The Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v.75, p.122-127, 1980.
- PROTA, G. **Melanins and Melanogenesis**. San Diego: Academic Press Inc, 1992. 289p.
- RIBEIRO, C.J. **Padronização de cultura de pele humana para a avaliação de toxicidade e eficácia de produtos cosméticos**, São Paulo, 2003. 81p. (Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- RIBEIRO, C.J.; OHARA, M.T. Hiperpigmentação Localizada da Pele – Manifestação inestética que exige cuidados. **Revista Racine**, São Paulo, v.67, p.62-66, 2002.
- ROBINS, A.H. **Biological perspectives on human pigmentation**, Great British: Cambridge University Press Ed., 1991. 253p.
- SANCHEZ, N.P.; SANCHEZ, J.L.; VASQUEZ-BOTET, M. Mechanisms of Hyperpigmentation. **P. R. Health Sci. J.**, San Juan, v.5, n.3, p.123-132, 1986.
- SANDOVAL, B. Tratamiento del melasma con Ácido Kójico. **Folia Dermatológica Peruana**, Lima, v.10, n.1, p.53-56, 1999 .
- SHEVLIN, E. J. Skin lighteners and bleach creams. In: Balsam MS, Sagarin E (eds). **Cosmetics**, v.1, 2.ed. New York, 1974. p.223-239.

- SILVA, E.C., **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade da formulações contendo arbutina, associada ou não ao ácido glicólico**, São Paulo, 1998. 181p. (Dissertação de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP)
- STEINER, D. Discromias – Parte I: Generalidades. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.8, n.1, p.31-32, 1996(a).
- STEINER, D. As influências raciais e a pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.8, n.3, p.28-31, 1996(b).
- STEINER, D. Pigmentação e pele. **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.8, n.6, p.30-31, 1996(c).
- SU, E.G. Formulando com branqueadores da pele, **Cosmetics & Toiletries**, São Paulo, v.11, n.2, p.57-63, 1999.
- SUFFREDINI, I.B. **Avaliação da atividade citotóxica e antitumoral de espécies vegetais amazônicas pertencentes às Apocynaceae**, São Paulo, 2000. (Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP).
- TARIS, A.; TARIS, M. Histologie Moleculaire de L'epiderme. Disponível em: <http://www.histomoleculaire.com/epiderme>. Acesso em 20 out 2001. [Figura].
- UNITED States Pharmacopeia. 26.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2003. p.2524-2525.
- VIRADOR, V.M.; KOBAYASHI, N.; MATSUNAGA, J.; HEARING, V.J.; A Standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, New York, v.270, p.207-219, 1999.
- YOUNES, R.N.; SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D. Extração e rastreamento de novas drogas em plantas brasileiras. **Acta Oncol. Bras.**, São Paulo, v.20, n.1, p.15-19, 2000.
- ZHAI, H.; MAIBACH, H.I. Skin – Whitening Agents. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.1, p.21-25, 2001.
- ZUIDHOFF, H. W.; VAN, RIJSBERGEN J.M. Whitening Efficacy of frequently used whitening ingredients. **Cosmetics & Toiletries**, Carol Stream, v.116, n.1, p.53-9, 2001.

## ANEXOS

A numeração dos extratos apresentada nos anexos foi a do Laboratório de Extração da UNIP, entretanto no trabalho esses extratos receberam novos números. A correspondência da numeração dos extratos do trabalho com a do anexo consta na tabela seguinte.

Número do extrato no trabalho	Número do extrato nos anexos	Número do extrato no trabalho	Número do extrato nos anexos
01/O -	29	26/A -	204
02/A -	30	27/O -	231
03/O -	57	28/A -	232
04/A -	58	29/O -	289
05/O -	89	30/A -	290
06/A -	90	31/O -	377
07/O -	91	32/A -	378
08/A -	92	33/O -	411
09/A -	94	34/A -	412
10/O -	95	35/O -	413
11/A -	96	36/A -	414
12/O -	99	37/O -	529
13/A -	100	38/A -	530
14/O -	109	39/O -	591
15/A -	110	40/A -	592
16/O -	129	41/O -	785
17/A -	130	42/A -	786
18/O -	143	43/O -	821
19/A -	144	44/A -	822
20/O -	145	45/O -	841
21/A -	146	46/A -	842
22/O -	151	47/O -	1121
23/A -	152	48/A -	1122
24/O -	169	49/O -	1539
25/A -	170		

Obs.:\* O = extrato orgânico; A = extrato aquoso

## ANEXO A 1

### Dados de Leitura da absorbância em 450nm

0 min 450nm	c/ DMSO	Diferença de Abs	c/ água	Diferença de Abs
	Abs lida		Abs lida	
	0,0500	0,0000	0,0530	0,0000
	0,0440	0,0000	0,0420	0,0000
	0,0480	0,0000	0,0460	0,0000
	0,0440	0,0000	0,0420	0,0000
	0,0420	0,0000	0,0450	0,0000
	0,0420	0,0000	0,0420	0,0000
	0,0410	0,0000	0,0430	0,0000
	0,0420	0,0000	0,0430	0,0000
<b>média</b>	<b>0,0441</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0445</b>	<b>0,0000</b>
<b>DP</b>	<b>0,0030</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0000</b>
30 min 450nm	c/ DMSO	Diferença de Abs	c/ água	Diferença de Abs
	Abs lida		Abs lida	
	0,0540	0,0040	0,0530	0,0000
	0,0480	0,0040	0,0430	0,0010
	0,0560	0,0080	0,0510	0,0050
	0,0460	0,0020	0,0420	0,0000
	0,0420	0,0000	0,0480	0,0030
	0,0410	-0,0010	0,0430	0,0010
	0,0410	0,0000	0,0440	0,0010
	0,0420	0,0000	0,0420	-0,0010
<b>média</b>	<b>0,0463</b>	<b>0,0021</b>	<b>0,0458</b>	<b>0,0013</b>
<b>DP</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,0028</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0018</b>
60 min 450nm	c/ DMSO	Diferença de Abs	c/ água	Diferença de Abs
	Abs lida		Abs lida	
	0,0550	0,0050	0,0550	0,0020
	0,0520	0,0080	0,0460	0,0040
	0,0620	0,0140	0,0560	0,0100
	0,0490	0,0050	0,0450	0,0030
	0,0510	0,0090	0,0510	0,0060
	0,0420	0,0000	0,0450	0,0030
	0,0430	0,0020	0,0450	0,0020
	0,0430	0,0010	0,0440	0,0010
<b>média</b>	<b>0,0496</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0484</b>	<b>0,0039</b>
<b>DP</b>	<b>0,0065</b>	<b>0,0044</b>	<b>0,0046</b>	<b>0,0027</b>
90 min 450nm	c/ DMSO	Diferença de Abs	c/ água	Diferença de Abs
	Abs lida		Abs lida	
	0,0560	0,0060	0,0560	0,0030
	0,0540	0,0100	0,0480	0,0060
	0,0650	0,0170	0,0590	0,0130
	0,0510	0,0070	0,0470	0,0050
	0,0510	0,0090	0,0530	0,0080
	0,0420	0,0000	0,0460	0,0040
	0,0440	0,0030	0,0470	0,0040
	0,0430	0,0010	0,0460	0,0030
<b>média</b>	<b>0,0508</b>	<b>0,0066</b>	<b>0,0503</b>	<b>0,0058</b>
<b>DP</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,0052</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0032</b>



120 min 450nm	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0600	0,0100	0,0580	0,0050
	0,0570	0,0130	0,0530	0,0110
	0,0710	0,0230	0,0630	0,0170
	0,0550	0,0110	0,0510	0,0090
	0,0440	0,0020	0,0560	0,0110
	0,0440	0,0020	0,0490	0,0070
	0,0460	0,0050	0,0510	0,0080
	0,0460	0,0040	0,0490	0,0060
<b>média</b>	<b>0,0529</b>	<b>0,0088</b>	<b>0,0538</b>	<b>0,0093</b>
<b>DP</b>	<b>0,0090</b>	<b>0,0067</b>	<b>0,0046</b>	<b>0,0036</b>

150 min 450nm	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0600	0,0100	0,0580	0,0050
	0,0590	0,0150	0,0560	0,0140
	0,0740	0,0260	0,0660	0,0200
	0,0580	0,0140	0,0540	0,0120
	0,0550	0,0130	0,0580	0,0130
	0,0460	0,0040	0,0510	0,0090
	0,0480	0,0070	0,0540	0,0110
	0,0480	0,0060	0,0510	0,0080
<b>média</b>	<b>0,0560</b>	<b>0,0119</b>	<b>0,0560</b>	<b>0,0115</b>
<b>DP</b>	<b>0,0085</b>	<b>0,0065</b>	<b>0,0046</b>	<b>0,0042</b>

180 min 450nm	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0620	0,0120	0,0600	0,0070
	0,0620	0,0180	0,0590	0,0170
	0,0770	0,0290	0,0700	0,0240
	0,0610	0,0170	0,0570	0,0150
	0,0600	0,0180	0,0600	0,0150
	0,0470	0,0050	0,0520	0,0100
	0,0500	0,0090	0,0560	0,0130
	0,0490	0,0070	0,0530	0,0100
<b>média</b>	<b>0,0585</b>	<b>0,0144</b>	<b>0,0584</b>	<b>0,0139</b>
<b>DP</b>	<b>0,0092</b>	<b>0,0073</b>	<b>0,0052</b>	<b>0,0049</b>

210 min 450nm	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0650	0,0150	0,0610	0,0080
	0,0630	0,0190	0,0620	0,0200
	0,0800	0,0320	0,0710	0,0250
	0,0630	0,0190	0,0590	0,0170
	0,0600	0,0180	0,0620	0,0170
	0,0480	0,0060	0,0540	0,0120
	0,0510	0,0100	0,0580	0,0150
	0,0500	0,0080	0,0550	0,0120
<b>média</b>	<b>0,0600</b>	<b>0,0159</b>	<b>0,0603</b>	<b>0,0158</b>
<b>DP</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0049</b>	<b>0,0049</b>

## ANEXO A 2

### Dados de Leitura da absorvância em 490nm

<b>0 min 490nm</b>	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0400	0,0000	0,0430	0,0000
	0,0350	0,0000	0,0320	0,0000
	0,0380	0,0000	0,0350	0,0000
	0,0340	0,0000	0,0320	0,0000
	0,0330	0,0000	0,0340	0,0000
	0,0320	0,0000	0,0330	0,0000
	0,0320	0,0000	0,0320	0,0000
	0,0330	0,0000	0,0320	0,0000
<b>média</b>	<b>0,0346</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0341</b>	<b>0,0000</b>
<b>DP</b>	<b>0,0027</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0035</b>	<b>0,0000</b>
<b>30 min 490nm</b>	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0480	0,0080	0,045	0,0020
	0,0420	0,0070	0,034	0,0020
	0,0490	0,0110	0,043	0,0080
	0,0390	0,0050	0,034	0,0020
	0,0360	0,0030	0,039	0,0050
	0,0340	0,0020	0,035	0,0020
	0,0350	0,0030	0,035	0,0030
	0,0360	0,0030	0,035	0,0030
<b>média</b>	<b>0,0399</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0375</b>	<b>0,0034</b>
<b>DP</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0029</b>	<b>0,0041</b>	<b>0,0020</b>
<b>60 min 490nm</b>	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0490	0,0090	0,0470	0,0040
	0,0470	0,0120	0,0370	0,0050
	0,0560	0,0180	0,0490	0,0140
	0,0440	0,0100	0,0370	0,0050
	0,0390	0,0060	0,0430	0,0090
	0,0360	0,0040	0,0370	0,0040
	0,0370	0,0050	0,0370	0,0050
	0,0380	0,0050	0,0370	0,0050
<b>média</b>	<b>0,0433</b>	<b>0,0086</b>	<b>0,0405</b>	<b>0,0064</b>
<b>DP</b>	<b>0,0066</b>	<b>0,0044</b>	<b>0,0048</b>	<b>0,0032</b>
<b>90 min 490nm</b>	c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs
	0,0530	0,0130	0,049	0,0060
	0,0510	0,0160	0,042	0,0100
	0,0620	0,0240	0,055	0,0200
	0,0480	0,0140	0,041	0,0090
	0,0500	0,0170	0,047	0,0130
	0,0390	0,0070	0,04	0,0070
	0,0410	0,0090	0,042	0,0100
	0,0410	0,0080	0,044	0,0120
<b>média</b>	<b>0,0481</b>	<b>0,0135</b>	<b>0,0450</b>	<b>0,0109</b>
<b>DP</b>	<b>0,0072</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0047</b>	<b>0,0041</b>

120 min 490nm		c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs	
	0,0570	0,0170	0,0520	0,0090	
	0,0540	0,0190	0,0460	0,0140	
	0,0680	0,0300	0,0600	0,0250	
	0,0530	0,0190	0,0460	0,0140	
	0,0460	0,0130	0,0500	0,0160	
	0,0410	0,0090	0,0440	0,0110	
	0,0440	0,0120	0,0460	0,0140	
	0,0450	0,0120	0,0450	0,0130	
<b>média</b>	<b>0,0510</b>	<b>0,0164</b>	<b>0,0486</b>	<b>0,0145</b>	
<b>DP</b>	<b>0,0083</b>	<b>0,0062</b>	<b>0,0050</b>	<b>0,0044</b>	

150 min 490nm		c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs	
	0,0590	0,0190	0,055	0,0120	
	0,0580	0,0230	0,051	0,0190	
	0,0730	0,0350	0,066	0,0310	
	0,0590	0,0250	0,051	0,0190	
	0,0540	0,0210	0,054	0,0200	
	0,0440	0,0120	0,048	0,0150	
	0,0480	0,0160	0,05	0,0180	
	0,0490	0,0160	0,049	0,0170	
<b>média</b>	<b>0,0555</b>	<b>0,0209</b>	<b>0,0530</b>	<b>0,0189</b>	
<b>DP</b>	<b>0,0084</b>	<b>0,0066</b>	<b>0,0054</b>	<b>0,0052</b>	

180 min 490nm		c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs	
	0,0630	0,0230	0,0580	0,0150	
	0,0620	0,0270	0,0560	0,0240	
	0,0780	0,0400	0,0700	0,0350	
	0,0640	0,0300	0,0550	0,0230	
	0,0640	0,0310	0,0580	0,0240	
	0,0470	0,0150	0,0510	0,0180	
	0,0520	0,0200	0,0550	0,0230	
	0,0520	0,0190	0,0540	0,0220	
<b>média</b>	<b>0,0603</b>	<b>0,0256</b>	<b>0,0571</b>	<b>0,0230</b>	
<b>DP</b>	<b>0,0091</b>	<b>0,0075</b>	<b>0,0053</b>	<b>0,0054</b>	

210 min 490nm		c/ DMSO		c/ água	
	Abs lida	Diferença de Abs	Abs lida	Diferença de Abs	
	0,0660	0,0260	0,06	0,0170	
	0,0640	0,0290	0,06	0,0280	
	0,0820	0,0440	0,074	0,0390	
	0,0680	0,0340	0,059	0,0270	
	0,0670	0,0340	0,061	0,0270	
	0,0500	0,0180	0,055	0,0220	
	0,0550	0,0230	0,058	0,0260	
	0,0550	0,0220	0,057	0,0250	
<b>média</b>	<b>0,0634</b>	<b>0,0288</b>	<b>0,0605</b>	<b>0,026375</b>	
<b>DP</b>	<b>0,0094</b>	<b>0,0078</b>	<b>0,0054</b>	<b>0,0058</b>	

## ANEXO B

### Análise da Atividade enzimática nas temperaturas de 30°C e 35°C

#### Leituras de Absorbâncias

0 min de reação		60 min de reação		90 min de reação		120 min de reação		
30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	
0,0320	0,0320	0,037	0,036	0,039	0,039	0,043	0,043	
0,0320	0,0320	0,052	0,045	0,055	0,049	0,058	0,053	
0,0330	0,0320	0,042	0,03	0,046	0,033	0,047	0,036	
0,0320	0,0320	0,037	0,036	0,039	0,038	0,042	0,041	
0,0340	0,0340	0,037	0,051	0,039	0,057	0,042	0,061	
0,0330	0,0330	0,039	0,035	0,043	0,038	0,046	0,044	
0,0330	0,0330	0,052	0,048	0,055	0,055	0,058	0,058	
0,0320	0,0320	0,046	0,063	0,049	0,067	0,051	0,071	
0,0320	0,0320	0,034	0,044	0,033	0,049	0,036	0,051	
0,0330	0,0330	0,042	0,056	0,044	0,057	0,046	0,061	
0,0320	0,0320	0,043	0,056	0,047	0,062	0,047	0,067	
0,0340	0,0340	0,051	0,049	0,055	0,054	0,053	0,057	
0,0320	0,0320	0,033	0,039	0,035	0,043	0,039	0,051	
0,0330	0,0330	0,04	0,037	0,042	0,037	0,045	0,04	
0,0330	0,0330	0,041	0,035	0,044	0,037	0,046	0,039	
<b>0,0327</b>	<b>0,0326</b>	<b>0,0417</b>	<b>0,0440</b>	<b>0,0443</b>	<b>0,0477</b>	<b>0,0466</b>	<b>0,0515</b>	<b>Média</b>

#### Correção das leituras (descontando a leitura no tempo zero)

0 min de reação		60 min de reação		90 min de reação		120 min de reação		
30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	
0,0000	0,0000	0,0050	0,0040	0,0070	0,0070	0,0110	0,0110	
0,0000	0,0000	0,0200	0,0130	0,0230	0,0170	0,0260	0,0210	
0,0000	0,0000	0,0090	-0,0020	0,0130	0,0010	0,0140	0,0040	
0,0000	0,0000	0,0050	0,0040	0,0070	0,0060	0,0100	0,0090	
0,0000	0,0000	0,0030	0,0170	0,0050	0,0230	0,0080	0,0270	
0,0000	0,0000	0,0060	0,0020	0,0100	0,0050	0,0130	0,0110	
0,0000	0,0000	0,0190	0,0150	0,0220	0,0220	0,0250	0,0250	
0,0000	0,0000	0,0140	0,0310	0,0170	0,0350	0,0190	0,0390	
0,0000	0,0000	0,0020	0,0120	0,0010	0,0170	0,0040	0,0190	
0,0000	0,0000	0,0090	0,0230	0,0110	0,0240	0,0130	0,0280	
0,0000	0,0000	0,0110	0,0240	0,0150	0,0300	0,0150	0,0350	
0,0000	0,0000	0,0170	0,0150	0,0210	0,0200	0,0190	0,0230	
0,0000	0,0000	0,0010	0,0070	0,0030	0,0110	0,0070	0,0190	
0,0000	0,0000	0,0070	0,0040	0,0090	0,0040	0,0120	0,0070	
0,0000	0,0000	0,0080	0,0020	0,0110	0,0040	0,0130	0,0060	
<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0091</b>	<b>0,0114</b>	<b>0,0117</b>	<b>0,0151</b>	<b>0,0139</b>	<b>0,0189</b>	<b>Média</b>
<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0058</b>	<b>0,0092</b>	<b>0,0066</b>	<b>0,0102</b>	<b>0,0060</b>	<b>0,0104</b>	<b>DP</b>

### Leituras de Absorbâncias

150 min de reação		180 min de reação		210 min de reação		
30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	
0,044	0,046	0,047	0,048	0,05	0,051	
0,059	0,05	0,061	0,054	0,063	0,056	
0,051	0,038	0,053	0,043	0,056	0,043	
0,044	0,044	0,047	0,047	0,049	0,045	
0,043	0,063	0,046	0,067	0,048	0,069	
0,049	0,039	0,051	0,042	0,053	0,044	
0,061	0,059	0,063	0,056	0,066	0,06	
0,052	0,073	0,055	0,076	0,057	0,078	
0,042	0,052	0,045	0,056	0,047	0,056	
0,049	0,06	0,051	0,062	0,053	0,064	
0,05	0,07	0,052	0,072	0,054	0,071	
0,055	0,059	0,057	0,062	0,059	0,064	
0,041	0,054	0,044	0,052	0,046	0,054	
0,047	0,042	0,049	0,043	0,051	0,045	
0,048	0,04	0,05	0,042	0,051	0,044	
<b>0,0490</b>	<b>0,0526</b>	<b>0,0514</b>	<b>0,0548</b>	<b>0,0535</b>	<b>0,0563</b>	<b>Média</b>

### Correção das leituras (descontando a leitura no tempo zero)

150 min de reação		180 min de reação		210 min de reação		
30°C	35°C	30°C	35°C	30°C	35°C	
0,0120	0,0140	0,0150	0,0160	0,0180	0,0190	
0,0270	0,0180	0,0290	0,0220	0,0310	0,0240	
0,0180	0,0060	0,0200	0,0110	0,0230	0,0110	
0,0120	0,0120	0,0150	0,0150	0,0170	0,0130	
0,0090	0,0290	0,0120	0,0330	0,0140	0,0350	
0,0160	0,0060	0,0180	0,0090	0,0200	0,0110	
0,0280	0,0260	0,0300	0,0230	0,0330	0,0270	
0,0200	0,0410	0,0230	0,0440	0,0250	0,0460	
0,0100	0,0200	0,0130	0,0240	0,0150	0,0240	
0,0160	0,0270	0,0180	0,0290	0,0200	0,0310	
0,0180	0,0380	0,0200	0,0400	0,0220	0,0390	
0,0210	0,0250	0,0230	0,0280	0,0250	0,0300	
0,0090	0,0220	0,0120	0,0200	0,0140	0,0220	
0,0140	0,0090	0,0160	0,0100	0,0180	0,0120	
0,0150	0,0070	0,0170	0,0090	0,0180	0,0110	
<b>0,0163</b>	<b>0,0200</b>	<b>0,0187</b>	<b>0,0222</b>	<b>0,0209</b>	<b>0,0237</b>	<b>Média</b>
<b>0,0057</b>	<b>0,0108</b>	<b>0,0054</b>	<b>0,0107</b>	<b>0,0055</b>	<b>0,0107</b>	<b>DP</b>



**Placa AK - AI 50% - 30min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,0400	0,0320	0,0330	0,0350	0,0340	0,0330	0,0370	0,0400	
0,0420	0,0360	0,0390	0,0330	0,0350	0,0330	0,0350	0,0380	
0,0450	0,0350	0,0330	0,0340	0,0350	0,0360	0,0430	0,0470	
0,0470	0,0350	0,0340	0,0360	0,0350	0,0350	0,0390	0,0430	
0,0480	0,0360	0,0360	0,0350	0,0370	0,0370	0,0400	0,0430	
0,0410	0,0330	0,0370	0,0410	0,0380	0,0380	0,0450	0,0440	
0,0440	0,0370	0,0370	0,0360	0,0340	0,0360	0,0350	0,0400	
0,0460	0,0360	0,0360	0,0360	0,0340	0,0340	0,0400	0,0420	
0,0441	0,0350	0,0356	0,0358	0,0353	0,0353	0,0393	0,0421	Média das Abs lidas
0,0115	0,0004	0,0013	0,0015	0,0015	0,0024	0,0050	0,0086	Diferenças das Abs
	96,74	89,13	86,96	86,96	79,35	56,52	25,00	AI %

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 30min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,0080	0,0000	0,0010	0,0010	0,0020	0,0020	0,0030	0,0080	
0,0100	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0010	0,0040	0,0050	
0,0110	0,0010	0,0010	0,0010	0,0020	0,0010	0,0040	0,0090	
0,0150	0,0000	0,0010	0,0020	0,0010	0,0030	0,0040	0,0080	
0,0150	0,0010	0,0010	0,0010	0,0020	0,0040	0,0060	0,0100	
0,0090	0,0000	0,0020	0,0030	0,0020	0,0050	0,0110	0,0110	
0,0110	0,0010	0,0010	0,0010	0,0020	0,0020	0,0030	0,0080	
0,0130	-0,0010	0,0020	0,0020	0,0000	0,0010	0,0050	0,0100	
0,0115	0,0004	0,0013	0,0015	0,0015	0,0024	0,0050	0,0086	Média das Absorbâncias
0,0024	0,0007	0,0004	0,0007	0,0007	0,0014	0,0024	0,0017	DP
	96,74	89,13	86,96	86,96	79,35	56,52	25,00	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 60min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,0930	0,0330	0,0370	0,0380	0,0450	0,0440	0,0710	0,0800	
0,0940	0,0370	0,0430	0,0370	0,0390	0,0430	0,0620	0,0770	
0,0900	0,0370	0,0370	0,0400	0,0400	0,0470	0,0710	0,0860	
0,0920	0,0350	0,0390	0,0400	0,0420	0,0510	0,0790	0,0870	
0,0970	0,0360	0,0430	0,0420	0,0420	0,0610	0,0770	0,0850	
0,0880	0,0360	0,0460	0,0490	0,0420	0,0570	0,0990	0,0940	
0,0920	0,0390	0,0440	0,0410	0,0400	0,0620	0,0610	0,0840	
0,0940	0,0380	0,0400	0,0480	0,0380	0,0630	0,0760	0,1010	
0,0925	0,0364	0,0411	0,0419	0,0410	0,0535	0,0745	0,0868	Média das Abs lidas
0,0599	0,0017	0,0067	0,0076	0,0072	0,0206	0,0403	0,0533	Diferenças das Abs
	97,08	88,73	87,27	87,89	65,55	32,78	11,06	AI %

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 60min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,0610	0,0010	0,0050	0,0040	0,0130	0,0130	0,0370	0,0480	
0,0620	0,0020	0,0050	0,0050	0,0050	0,0110	0,0310	0,0440	
0,0560	0,0030	0,0050	0,0070	0,0070	0,0120	0,0320	0,0480	
0,0600	0,0000	0,0060	0,0060	0,0080	0,0190	0,0440	0,0520	
0,0640	0,0010	0,0080	0,0080	0,0070	0,0280	0,0430	0,0520	
0,0560	0,0030	0,0110	0,0110	0,0060	0,0240	0,0650	0,0610	
0,0590	0,0030	0,0080	0,0060	0,0080	0,0280	0,0290	0,0520	
0,0610	0,0010	0,0060	0,0140	0,0040	0,0300	0,0410	0,0690	
0,0599	0,0018	0,0068	0,0076	0,0073	0,0206	0,0403	0,0533	Média das Absorbâncias
0,0026	0,0011	0,0020	0,0031	0,0025	0,0074	0,0108	0,0075	DP
	97,08	88,73	87,27	87,89	65,55	32,78	11,06	AI ( % )



**Placa AK - AI 50% - 120min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,1640	0,0350	0,0720	0,0870	0,1030	0,1000	0,1540	0,1490	
0,1630	0,0450	0,0800	0,0920	0,0840	0,1220	0,1410	0,1530	
0,1570	0,0600	0,0720	0,0880	0,0980	0,1140	0,1590	0,1610	
0,1590	0,0360	0,0690	0,0990	0,0990	0,1320	0,1740	0,1630	
0,1670	0,0600	0,0820	0,0970	0,1040	0,1400	0,1800	0,1650	
0,1530	0,0610	0,0910	0,0980	0,0950	0,1410	0,1910	0,1760	
0,1590	0,0700	0,0850	0,0810	0,1220	0,1630	0,1390	0,1570	
0,1560	0,0500	0,0750	0,1140	0,0930	0,1580	0,1620	0,1900	
0,1598	0,0521	0,0783	0,0945	0,0998	0,1338	0,1625	0,1643	Média das Abs lidas
0,1271	0,0175	0,0439	0,0603	0,0660	0,1009	0,1283	0,1308	Diferenças das Abs
	86,23	65,49	52,61	48,08	20,65	-0,88	-2,85	AI %

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 120min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,1320	0,0030	0,0400	0,0530	0,0710	0,0690	0,1200	0,1170	
0,1310	0,0100	0,0420	0,0600	0,0500	0,0900	0,1100	0,1200	
0,1230	0,0260	0,0400	0,0550	0,0650	0,0790	0,1200	0,1230	
0,1270	0,0010	0,0360	0,0650	0,0650	0,1000	0,1390	0,1280	
0,1340	0,0250	0,0470	0,0630	0,0690	0,1070	0,1460	0,1320	
0,1210	0,0280	0,0560	0,0600	0,0590	0,1080	0,1570	0,1430	
0,1260	0,0340	0,0490	0,0460	0,0900	0,1290	0,1070	0,1250	
0,1230	0,0130	0,0410	0,0800	0,0590	0,1250	0,1270	0,1580	
0,1271	0,0175	0,0439	0,0603	0,0660	0,1009	0,1283	0,1308	Média das Absorbâncias
0,0045	0,0116	0,0060	0,0094	0,0110	0,0196	0,0165	0,0127	DP
	86,23	65,49	52,61	48,08	20,65	-0,88	-2,85	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 180min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,1880	0,0390	0,0960	0,1370	0,1550	0,1350	0,1910	0,1760	
0,1880	0,0620	0,1060	0,1430	0,1310	0,1710	0,1760	0,1840	
0,1810	0,0890	0,1020	0,1380	0,1550	0,1600	0,1980	0,1900	
0,1820	0,0380	0,0920	0,1530	0,1520	0,1820	0,2150	0,1910	
0,1900	0,0890	0,1090	0,1460	0,1590	0,1880	0,2230	0,1920	
0,1760	0,0900	0,1230	0,1390	0,1460	0,1900	0,2280	0,2070	
0,1850	0,1070	0,1170	0,1180	0,1760	0,2130	0,1770	0,1840	
0,1780	0,0800	0,0990	0,1650	0,1460	0,2080	0,1980	0,2230	
0,1835	0,0743	0,1055	0,1424	0,1525	0,1809	0,2008	0,1934	Média das Abs lidas
0,1509	0,0396	0,0711	0,1081	0,1188	0,1480	0,1665	0,1599	Diferenças das Abs
	73,74	52,86	28,33	21,29	1,91	-10,36	-5,97	AI %

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 180min de reação**

Água	AK5	AK4	AK3	AK2,5	AK1,25	AK0,625	AK0,3125	
0,1560	0,0070	0,0640	0,1030	0,1230	0,1040	0,1570	0,1440	
0,1560	0,0270	0,0680	0,1110	0,0970	0,1390	0,1450	0,1510	
0,1470	0,0550	0,0700	0,1050	0,1220	0,1250	0,1590	0,1520	
0,1500	0,0030	0,0590	0,1190	0,1180	0,1500	0,1800	0,1560	
0,1570	0,0540	0,0740	0,1120	0,1240	0,1550	0,1890	0,1590	
0,1440	0,0570	0,0880	0,1010	0,1100	0,1570	0,1940	0,1740	
0,1520	0,0710	0,0810	0,0830	0,1440	0,1790	0,1450	0,1520	
0,1450	0,0430	0,0650	0,1310	0,1120	0,1750	0,1630	0,1910	
0,1509	0,0396	0,0711	0,1081	0,1188	0,1480	0,1665	0,1599	Média das Absorbâncias
0,0049	0,0232	0,0089	0,0131	0,0127	0,0234	0,0178	0,0143	DP
	73,74	52,86	28,33	21,29	1,91	-10,36	-5,97	AI ( % )



**Placa 1 org - 60min**

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 29	EXTR 57	EXTR 89	EXTR 91	EXTR 95	EXTR 99	EXTR 109	EXTR 129	
0,0420	0,0350	0,0620	0,0630	0,0740	0,0530	0,0550	0,0600	0,0700	0,0550	
0,0400	0,0340	0,0600	0,0700	0,0750	0,0540	0,0540	0,0570	0,0660	0,0550	
0,0420	0,0330	0,0610	0,0770	0,0710	0,0550	0,0530	0,0580	0,0670	0,0550	
0,0590	0,0360	0,0630	0,0640	0,0720	0,0560	0,0540	0,0590	0,0670	0,0550	
0,0430	0,0340	0,0600	0,0600	0,0710	0,0530	0,0560	0,0650	0,0680	0,0540	
0,0410	0,0360	0,0610	0,0620	0,0730	0,0520	0,0520	0,0600	0,0690	0,0550	
0,0420	0,0530	0,0610	0,0620	0,0710	0,0540	0,0540	0,0560	0,0670	0,0550	
0,0430	0,0360	0,0620	0,0630	0,0750	0,0550	0,0550	0,0580	0,0710	0,0620	
<b>0,0440</b>	<b>0,0371</b>	<b>0,0613</b>	<b>0,0651</b>	<b>0,0728</b>	<b>0,0540</b>	<b>0,0541</b>	<b>0,0591</b>	<b>0,0681</b>	<b>0,0558</b>	Médias das Abs lidas
<b>0,0086</b>	<b>0,0026</b>	<b>0,0120</b>	<b>0,0064</b>	<b>0,0116</b>	<b>0,0063</b>	<b>0,0134</b>	<b>0,0130</b>	<b>0,0169</b>	<b>0,0161</b>	Diferenças das Abs
	<b>69,57</b>	<b>-39,13</b>	<b>26,09</b>	<b>-34,78</b>	<b>27,54</b>	<b>-55,07</b>	<b>-50,72</b>	<b>-95,65</b>	<b>-86,96</b>	AI %

**Absorbância da Placa 1 org - 60min de reação**

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 29	EXTR 57	EXTR 89	EXTR 91	EXTR 95	EXTR 99	EXTR 109	EXTR 129	
0,0090	0,0010	0,0120	0,0060	0,0110	0,0060	0,0150	0,0140	0,0170	0,0160	
0,0050	0,0010	0,0110	0,0060	0,0120	0,0070	0,0120	0,0120	0,0160	0,0160	
0,0070	0,0000	0,0120	0,0140	0,0120	0,0070	0,0130	0,0130	0,0170	0,0160	
0,0180	0,0020	0,0120	0,0060	0,0120	0,0060	0,0130	0,0140	0,0170	0,0160	
0,0080	0,0020	0,0130	0,0040	0,0110	0,0070	0,0160	0,0130	0,0180	0,0150	
0,0060	0,0010	0,0120	0,0060	0,0110	0,0060	0,0110	0,0140	0,0180	0,0160	
0,0070	0,0120	0,0120	0,0060	0,0120	0,0050	0,0130	0,0110	0,0160	0,0150	
0,0090	0,0020	0,0120	0,0030	0,0120	0,0060	0,0140	0,0130	0,0160	0,0190	
<b>0,0086</b>	<b>0,0026</b>	<b>0,0120</b>	<b>0,0064</b>	<b>0,0116</b>	<b>0,0063</b>	<b>0,0134</b>	<b>0,0130</b>	<b>0,0169</b>	<b>0,0161</b>	Médias das Absorbâncias
<b>0,0038</b>	<b>0,0036</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0031</b>	<b>0,0005</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0015</b>	<b>0,0010</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0012</b>	DP
	<b>69,57</b>	<b>-39,13</b>	<b>26,09</b>	<b>-34,78</b>	<b>27,54</b>	<b>-55,07</b>	<b>-50,72</b>	<b>-95,65</b>	<b>-86,96</b>	AI %

**Placa 1 org - 120min**

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 29	EXTR 57	EXTR 89	EXTR 91	EXTR 95	EXTR 99	EXTR 109	EXTR 129	
0,0660	0,0360	0,0720	0,0670	0,0790	0,0570	0,0820	0,0780	0,0820	0,0710	
0,0600	0,0360	0,0700	0,0750	0,0810	0,0570	0,0800	0,0750	0,0790	0,0690	
0,0650	0,0340	0,0720	0,0840	0,0800	0,0580	0,0790	0,0760	0,0800	0,0700	
0,0850	0,0360	0,0730	0,0690	0,0820	0,0590	0,0800	0,0780	0,0810	0,0710	
0,0640	0,0340	0,0690	0,0650	0,0790	0,0570	0,0820	0,0810	0,0810	0,0700	
0,0630	0,0370	0,0700	0,0660	0,0820	0,0560	0,0780	0,0800	0,0830	0,0710	
0,0640	0,0560	0,0700	0,0670	0,0790	0,0580	0,0810	0,0750	0,0800	0,0700	
0,0660	0,0370	0,0720	0,0670	0,0830	0,0580	0,0800	0,0770	0,0850	0,0780	
0,0666	0,0383	0,0710	0,0700	0,0806	0,0575	0,0803	0,0775	0,0814	0,0713	Médias das Abs lidas
<b>0,0313</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0218</b>	<b>0,0113</b>	<b>0,0195</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,0395</b>	<b>0,0314</b>	<b>0,0301</b>	<b>0,0316</b>	Diferenças das Abs
	<b>88,00</b>	<b>30,40</b>	<b>64,00</b>	<b>37,60</b>	<b>68,80</b>	<b>-26,40</b>	<b>-0,40</b>	<b>3,60</b>	<b>-1,20</b>	AI %

**Absorbância da Placa 1 org - 120min de reação**

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 29	EXTR 57	EXTR 89	EXTR 91	EXTR 95	EXTR 99	EXTR 109	EXTR 129	
0,0330	0,0020	0,0220	0,0100	0,0160	0,0100	0,0420	0,0320	0,0290	0,0320	
0,0250	0,0030	0,0210	0,0110	0,0180	0,0100	0,0380	0,0300	0,0290	0,0300	
0,0300	0,0010	0,0230	0,0210	0,0210	0,0100	0,0390	0,0310	0,0300	0,0310	
0,0440	0,0020	0,0220	0,0110	0,0220	0,0090	0,0390	0,0330	0,0310	0,0320	
0,0290	0,0020	0,0220	0,0090	0,0190	0,0110	0,0420	0,0290	0,0310	0,0310	
0,0280	0,0020	0,0210	0,0100	0,0200	0,0100	0,0370	0,0340	0,0320	0,0320	
0,0290	0,0150	0,0210	0,0110	0,0200	0,0090	0,0400	0,0300	0,0290	0,0300	
0,0320	0,0030	0,0220	0,0070	0,0200	0,0090	0,0390	0,0320	0,0300	0,0350	
<b>0,0313</b>	<b>0,0038</b>	<b>0,0218</b>	<b>0,0113</b>	<b>0,0195</b>	<b>0,0098</b>	<b>0,0395</b>	<b>0,0314</b>	<b>0,0301</b>	<b>0,0316</b>	Médias das Aborbâncias
<b>0,0053</b>	<b>0,0043</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0039</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0017</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0011</b>	<b>0,0015</b>	DP
	<b>88,00</b>	<b>30,40</b>	<b>64,00</b>	<b>37,60</b>	<b>68,80</b>	<b>-26,40</b>	<b>-0,40</b>	<b>3,60</b>	<b>-1,20</b>	AI %



Placa 2 org - 60min

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 143	EXTR 145	EXTR 151	EXTR 169	EXTR 231	EXTR 289	EXTR 377	EXTR 411	
0,0420	0,0350	0,0670	0,0840	0,0790	0,0780	0,0610	0,0740	0,0650	0,0560	
0,0430	0,0340	0,0650	0,0860	0,0750	0,0780	0,0550	0,0720	0,0660	0,0590	
0,0420	0,0330	0,0650	0,0860	0,0790	0,0760	0,0580	0,0700	0,0660	0,0580	
0,0600	0,0340	0,0640	0,0870	0,0770	0,0770	0,0560	0,0720	0,0690	0,0570	
0,0440	0,0350	0,0720	0,0840	0,0780	0,0790	0,0580	0,0910	0,0650	0,0560	
0,0420	0,0370	0,0630	0,0860	0,0780	0,0790	0,0570	0,0720	0,0700	0,0570	
0,0430	0,0350	0,0670	0,0870	0,0750	0,0750	0,0550	0,0700	0,0660	0,0560	
0,0440	0,0350	0,0640	0,0880	0,0770	0,0780	0,0560	0,0750	0,0630	0,0570	
<b>0,0450</b>	<b>0,0348</b>	<b>0,0659</b>	<b>0,0860</b>	<b>0,0773</b>	<b>0,0775</b>	<b>0,0570</b>	<b>0,0745</b>	<b>0,0663</b>	<b>0,0570</b>	Médias das Abs lidas
<b>0,0103</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0188</b>	<b>0,0200</b>	<b>0,0230</b>	<b>0,0160</b>	<b>0,0159</b>	<b>0,0123</b>	<b>0,0253</b>	<b>0,0176</b>	Diferenças das Abs
	<b>92,68</b>	<b>-82,93</b>	<b>-95,12</b>	<b>-124,39</b>	<b>-56,10</b>	<b>-54,88</b>	<b>-19,51</b>	<b>-146,34</b>	<b>-71,95</b>	AI %

Absorbância da Placa 2 org - 60min de reação

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 143	EXTR 145	EXTR 151	EXTR 169	EXTR 231	EXTR 289	EXTR 377	EXTR 411	
0,0090	0,0000	0,0200	0,0200	0,0240	0,0170	0,0160	0,0090	0,0230	0,0180	
0,0080	0,0010	0,0190	0,0210	0,0220	0,0170	0,0160	0,0100	0,0240	0,0200	
0,0090	0,0000	0,0170	0,0210	0,0230	0,0140	0,0150	0,0080	0,0250	0,0180	
0,0190	0,0010	0,0180	0,0200	0,0240	0,0160	0,0150	0,0090	0,0270	0,0170	
0,0090	0,0010	0,0240	0,0200	0,0230	0,0170	0,0170	0,0300	0,0240	0,0170	
0,0090	0,0010	0,0180	0,0190	0,0230	0,0180	0,0160	0,0100	0,0260	0,0160	
0,0090	0,0010	0,0160	0,0200	0,0220	0,0130	0,0160	0,0100	0,0280	0,0170	
0,0100	0,0010	0,0180	0,0190	0,0230	0,0160	0,0160	0,0120	0,0250	0,0180	
<b>0,0103</b>	<b>0,0008</b>	<b>0,0188</b>	<b>0,0200</b>	<b>0,0230</b>	<b>0,0160</b>	<b>0,0159</b>	<b>0,0123</b>	<b>0,0253</b>	<b>0,0176</b>	Médias das Aborbâncias
<b>0,0033</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0023</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0007</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0006</b>	<b>0,0068</b>	<b>0,0016</b>	<b>0,0011</b>	DP
	<b>92,68</b>	<b>-82,93</b>	<b>-95,12</b>	<b>-124,39</b>	<b>-56,10</b>	<b>-54,88</b>	<b>-19,51</b>	<b>-146,34</b>	<b>-71,95</b>	AI %

120min azul

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 143	EXTR 145	EXTR 151	EXTR 169	EXTR 231	EXTR 289	EXTR 377	EXTR 411	
0,0650	0,0360	0,0790	0,0930	0,0970	0,0870	0,0740	0,0820	0,0870	0,0720	
0,0650	0,0340	0,0770	0,0960	0,0930	0,0890	0,0680	0,0800	0,0900	0,0750	
0,0660	0,0350	0,0780	0,0960	0,0980	0,0880	0,0710	0,0770	0,0890	0,0730	
0,0860	0,0340	0,0760	0,0970	0,0960	0,0880	0,0700	0,0810	0,0920	0,0720	
0,0670	0,0360	0,0860	0,0940	0,0960	0,0900	0,0710	0,1090	0,0870	0,0710	
0,0650	0,0380	0,0750	0,0960	0,0960	0,0920	0,0700	0,0810	0,0920	0,0730	
0,0670	0,0370	0,0790	0,0970	0,0930	0,0860	0,0690	0,0770	0,0890	0,0700	
0,0670	0,0360	0,0760	0,0990	0,0950	0,0890	0,0700	0,0810	0,0850	0,0720	
0,0685	0,0358	0,0783	0,0960	0,0955	0,0886	0,0704	0,0835	0,0889	0,0723	Médias das Abs lidas
0,0338	0,0017	0,0311	0,0300	0,0413	0,0271	0,0293	0,0213	0,0479	0,0329	Diferenças das Abs
	94,81	7,78	11,11	-22,22	19,63	13,33	37,04	-41,85	2,59	AI %

Absorbância da Placa 2 org - 120min de reação

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 143	EXTR 145	EXTR 151	EXTR 169	EXTR 231	EXTR 289	EXTR 377	EXTR 411	
0,0320	0,0010	0,0320	0,0290	0,0420	0,0260	0,0290	0,0170	0,0450	0,0340	
0,0300	0,0010	0,0310	0,0310	0,0400	0,0280	0,0290	0,0180	0,0480	0,0360	
0,0330	0,0020	0,0300	0,0310	0,0420	0,0260	0,0280	0,0150	0,0480	0,0330	
0,0450	0,0010	0,0300	0,0300	0,0430	0,0270	0,0290	0,0180	0,0500	0,0320	
0,0320	0,0020	0,0380	0,0300	0,0410	0,0280	0,0300	0,0480	0,0460	0,0320	
0,0320	0,0020	0,0300	0,0290	0,0410	0,0310	0,0290	0,0190	0,0480	0,0320	
0,0330	0,0030	0,0280	0,0300	0,0400	0,0240	0,0300	0,0170	0,0510	0,0310	
0,0330	0,0020	0,0300	0,0300	0,0410	0,0270	0,0300	0,0180	0,0470	0,0330	
0,0338	0,0018	0,0311	0,0300	0,0413	0,0271	0,0293	0,0213	0,0479	0,0329	Médias das Aborbâncias
0,0044	0,0007	0,0028	0,0007	0,0010	0,0019	0,0007	0,0102	0,0018	0,0015	DP
	94,81	7,78	11,11	-22,22	19,63	13,33	37,04	-41,85	2,59	AI %





Placa 3 org - 60min

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 413	EXTR 529	EXTR 591	EXTR 785	EXTR 821	EXTR 841	EXT 1121	EXT 1539	
0,0410	0,0380	0,0480	0,0760	0,0790	0,0750	0,0510	0,0580	0,0730	0,1060	
0,0430	0,0440	0,0460	0,0740	0,0760	0,0730	0,0500	0,0580	0,0700	0,1080	
0,0450	0,0340	0,0470	0,0780	0,0730	0,0710	0,0500	0,0560	0,0690	0,1100	
0,0420	0,0340	0,0400	0,0750	0,0720	0,0730	0,0510	0,0550	0,0700	0,1070	
0,0430	0,0440	0,0470	0,0780	0,0740	0,0680	0,0520	0,0560	0,0690	0,1060	
0,0430	0,0380	0,0470	0,0730	0,0800	0,0740	0,0520	0,0560	0,0700	0,1080	
0,0420	0,0420	0,0450	0,0740	0,0730	0,0760	0,0500	0,0560	0,0700	0,1050	
0,0440	0,0350	0,0490	0,0760	0,0720	0,0730	0,0530	0,0570	0,0710	0,1070	
0,0429	0,0386	0,0461	0,0755	0,0749	0,0729	0,0511	0,0565	0,0703	0,1071	Médias das Abs lidas
0,0084	0,0015	0,0125	0,0153	0,0178	0,0103	0,0159	0,0066	0,0278	0,0179	Diferenças das Abs
	82,09	-49,25	-82,09	-111,94	-22,39	-89,55	20,90	-231,34	-113,43	AI %

Absorbância da Placa 3 org - 60min de reação

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 413	EXTR 529	EXTR 591	EXTR 785	EXTR 821	EXTR 841	EXT 1121	EXT 1539	
0,0050	0,0010	0,0150	0,0140	0,0160	0,0120	0,0150	0,0070	0,0300	0,0160	
0,0080	-0,0010	0,0130	0,0150	0,0200	0,0100	0,0150	0,0070	0,0300	0,0170	
0,0110	0,0010	0,0130	0,0190	0,0170	0,0090	0,0150	0,0060	0,0290	0,0200	
0,0090	0,0010	0,0060	0,0150	0,0170	0,0100	0,0160	0,0060	0,0290	0,0180	
0,0100	0,0020	0,0120	0,0180	0,0180	0,0100	0,0160	0,0070	0,0290	0,0200	
0,0090	0,0020	0,0130	0,0120	0,0210	0,0100	0,0170	0,0070	0,0140	0,0180	
0,0070	0,0040	0,0130	0,0160	0,0160	0,0110	0,0160	0,0070	0,0310	0,0160	
0,0080	0,0020	0,0150	0,0130	0,0170	0,0100	0,0170	0,0060	0,0300	0,0180	
0,0084	0,0015	0,0125	0,0153	0,0178	0,0103	0,0159	0,0066	0,0278	0,0179	Médias das Aborbâncias
0,0017	0,0013	0,0026	0,0022	0,0017	0,0008	0,0008	0,0005	0,0052	0,0015	DP
	82,09	-49,25	-82,09	-111,94	-22,39	-89,55	20,90	-231,34	-113,43	AI %

Placa 3 org - 120min

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 413	EXTR 529	EXTR 591	EXTR 785	EXTR 821	EXTR 841	EXT 1121	EXT 1539	
0,0530	0,0390	0,0730	0,0770	0,0860	0,0800	0,0730	0,0640	0,0930	0,1100	
0,0670	0,0450	0,0730	0,0740	0,0850	0,0780	0,0730	0,0630	0,0910	0,1130	
0,0700	0,0340	0,0730	0,0790	0,0830	0,0770	0,0720	0,0620	0,0910	0,1160	
0,0660	0,0360	0,0570	0,0750	0,0810	0,0800	0,0730	0,0600	0,0910	0,1110	
0,0670	0,0440	0,0710	0,0790	0,0840	0,0750	0,0760	0,0600	0,0900	0,1120	
0,0680	0,0390	0,0730	0,0740	0,0910	0,0800	0,0750	0,0600	0,0910	0,1150	
0,0650	0,0440	0,0710	0,0750	0,0830	0,0810	0,0730	0,0610	0,0920	0,1110	
0,0680	0,0360	0,0730	0,0770	0,0820	0,0780	0,0750	0,0620	0,0920	0,1110	
0,0655	0,0396	0,0705	0,0763	0,0844	0,0786	0,0738	0,0615	0,0914	0,1124	Médias das Abs lidas
0,0310	0,0025	0,0369	0,0160	0,0273	0,0160	0,0385	0,0116	0,0489	0,0231	Diferenças das Abs
	91,94	-18,95	48,39	12,10	48,39	-24,19	62,50	-57,66	25,40	AI %

Absorbância da Placa 3 org - 120min de reação

DMSO 2,5%	AK 5ug	EXTR 413	EXTR 529	EXTR 591	EXTR 785	EXTR 821	EXTR 841	EXT 1121	EXT 1539	
0,0170	0,0020	0,0400	0,0150	0,0230	0,0170	0,0370	0,0130	0,0500	0,0200	
0,0320	0,0000	0,0400	0,0150	0,0290	0,0150	0,0380	0,0120	0,0510	0,0220	
0,0360	0,0010	0,0390	0,0200	0,0270	0,0150	0,0370	0,0120	0,0510	0,0260	
0,0330	0,0030	0,0230	0,0150	0,0260	0,0170	0,0380	0,0110	0,0500	0,0220	
0,0340	0,0020	0,0360	0,0190	0,0280	0,0170	0,0400	0,0110	0,0500	0,0260	
0,0340	0,0030	0,0390	0,0130	0,0320	0,0160	0,0400	0,0110	0,0350	0,0250	
0,0300	0,0060	0,0390	0,0170	0,0260	0,0160	0,0390	0,0120	0,0530	0,0220	
0,0320	0,0030	0,0390	0,0140	0,0270	0,0150	0,0390	0,0110	0,0510	0,0220	
0,0310	0,0025	0,0369	0,0160	0,0273	0,0160	0,0385	0,0116	0,0489	0,0231	Médias das Aborbâncias
0,0055	0,0017	0,0054	0,0023	0,0024	0,0009	0,0011	0,0007	0,0053	0,0021	DP
	91,94	-18,95	48,39	12,10	48,39	-24,19	62,50	-57,66	25,40	AI %



**Placa 4 aq. - 60min**

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 30	EXTR 58	EXTR 90	EXTR 92	EXTR 94	EXTR 96	EXTR 100	EXTR 110	EXTR 130	
0,0460	0,0360	0,0670	0,0550	0,0640	0,0790	0,0740	0,0440	0,0530	0,0580	0,0580	
0,0360	0,0380	0,0670	0,0540	0,0580	0,0710	0,0690	0,0440	0,0440	0,0580	0,0540	
0,0380	0,0380	0,0710	0,0540	0,0640	0,0720	0,0630	0,0480	0,0530	0,0680	0,0690	
0,0380	0,0370	0,0620	0,0560	0,0620	0,0700	0,0670	0,0470	0,0460	0,0620	0,0570	
0,0370	0,0340	0,0710	0,0530	0,0630	0,0710	0,0710	0,0480	0,0440	0,0570	0,0590	
0,0380	0,0360	0,0670	0,0520	0,0600	0,0690	0,0670	0,0540	0,0440	0,0560	0,0630	
0,0380	0,0350	0,0630	0,0520	0,0620	0,0680	0,0970	0,0430	0,0450	0,0590	0,0570	
0,0380	0,0350	0,0650	0,0540	0,0610	0,0680	0,0670	0,0440	0,0460	0,0580	0,0590	
0,0386	0,0361	0,0666	0,0538	0,0618	0,0710	0,0719	0,0465	0,0469	0,0595	0,0595	Média das Abs lidas
0,0030	0,0013	0,0111	0,0050	0,0068	0,0048	0,0070	0,0015	0,0049	0,0025	0,0078	Diferenças de Abs
	58,33	-270,83	-66,67	-125,00	-58,33	-133,33	50,00	-62,50	16,67	-158,33	AI %

**Absorbância da Placa 4 - 60min de reação**

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 30	EXTR 58	EXTR 90	EXTR 92	EXTR 94	EXTR 96	EXTR 100	EXTR 110	EXTR 130	
0,0030	0,0000	0,0110	0,0050	0,0090	0,0050	0,0060	0,0010	0,0060	0,0020	0,0080	
0,0030	0,0010	0,0100	0,0050	0,0050	0,0050	0,0070	0,0010	0,0040	0,0030	0,0060	
0,0020	0,0020	0,0130	0,0050	0,0070	0,0060	0,0060	0,0000	0,0050	0,0030	0,0060	
0,0030	0,0010	0,0090	0,0050	0,0070	0,0040	0,0060	0,0030	0,0050	0,0030	0,0080	
0,0030	0,0010	0,0140	0,0040	0,0080	0,0040	0,0060	0,0010	0,0040	0,0020	0,0080	
0,0040	0,0020	0,0120	0,0050	0,0060	0,0050	0,0060	0,0040	0,0040	0,0020	0,0090	
0,0040	0,0010	0,0090	0,0050	0,0050	0,0040	0,0120	0,0010	0,0060	0,0030	0,0080	
0,0020	0,0020	0,0110	0,0060	0,0070	0,0050	0,0070	0,0010	0,0050	0,0020	0,0090	
0,0030	0,0013	0,0111	0,0050	0,0068	0,0048	0,0070	0,0015	0,0049	0,0025	0,0078	Média Absorbâncias
0,0007	0,0007	0,0017	0,0005	0,0013	0,0007	0,0019	0,0012	0,0008	0,0005	0,0011	DP
	58,33	-270,83	-66,67	-125,00	-58,33	-133,33	50,00	-62,50	16,67	-158,33	AI %

Placa 4 aq. - 120min

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 30	EXTR 58	EXTR 90	EXTR 92	EXTR 94	EXTR 96	EXTR 100	EXTR 110	EXTR 130	
0,0560	0,0370	0,0780	0,0510	0,0690	0,0730	0,0770	0,0450	0,0560	0,0590	0,0630	
0,0430	0,0360	0,0780	0,0570	0,0650	0,0730	0,0680	0,0460	0,0480	0,0600	0,0590	
0,0470	0,0310	0,0830	0,0570	0,0700	0,0740	0,0670	0,0520	0,0570	0,0690	0,0740	
0,0480	0,0400	0,0710	0,0590	0,0680	0,0730	0,0710	0,0480	0,0490	0,0630	0,0610	
0,0460	0,0330	0,0840	0,0580	0,0690	0,0740	0,0740	0,0490	0,0490	0,0650	0,0640	
0,0480	0,0400	0,0780	0,0560	0,0650	0,0700	0,0720	0,0550	0,0480	0,0570	0,0690	
0,0470	0,0370	0,0730	0,0560	0,0670	0,0690	0,0970	0,0430	0,0480	0,0650	0,0620	
0,0480	0,0360	0,0750	0,0570	0,0670	0,0700	0,0700	0,0450	0,0530	0,0600	0,0640	
0,0479	0,0363	0,0775	0,0564	0,0675	0,0720	0,0745	0,0479	0,0510	0,0623	0,0645	Média das Abs lidas
0,0123	0,0014	0,0220	0,0076	0,0125	0,0058	0,0096	0,0029	0,0090	0,0053	0,0128	Diferenças de Abs
	88,78	-79,59	37,76	-2,04	53,06	21,43	76,53	26,53	57,14	-4,08	AI %

Absorbância da Placa 4 - 120min de reação

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 30	EXTR 58	EXTR 90	EXTR 92	EXTR 94	EXTR 96	EXTR 100	EXTR 110	EXTR 130	
0,0130	0,0010	0,0220	0,0010	0,0140	-0,0010	0,0090	0,0020	0,0090	0,0030	0,0130	
0,0100	-0,0010	0,0210	0,0080	0,0120	0,0070	0,0060	0,0030	0,0080	0,0050	0,0110	
0,0110	-0,0050	0,0250	0,0080	0,0130	0,0080	0,0100	0,0040	0,0090	0,0040	0,0110	
0,0130	0,0040	0,0180	0,0080	0,0130	0,0070	0,0100	0,0040	0,0080	0,0040	0,0120	
0,0120	0,0000	0,0270	0,0090	0,0140	0,0070	0,0090	0,0020	0,0090	0,0100	0,0130	
0,0140	0,0060	0,0230	0,0090	0,0110	0,0060	0,0110	0,0050	0,0080	0,0030	0,0150	
0,0130	0,0030	0,0190	0,0090	0,0100	0,0050	0,0120	0,0010	0,0090	0,0090	0,0130	
0,0120	0,0030	0,0210	0,0090	0,0130	0,0070	0,0100	0,0020	0,0120	0,0040	0,0140	
0,0123	0,0014	0,0220	0,0076	0,0125	0,0058	0,0096	0,0029	0,0090	0,0053	0,0128	Média Absorbâncias
0,0012	0,0032	0,0028	0,0025	0,0013	0,0027	0,0017	0,0013	0,0012	0,0025	0,0013	DP
	88,78	-79,59	37,76	-2,04	53,06	21,43	76,53	26,53	57,14	-4,08	AI %



Placa 5 aq. - 60min

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 152	EXTR 144	EXTR 146	EXTR 170	EXTR 204	EXTR 232	EXTR 290	EXTR 378	EXTR 412	
0,0360	0,0340	0,0630	0,0600	0,0720	0,0510	0,0730	0,0550	0,0540	0,0390	0,0400	
0,0390	0,0370	0,0800	0,0670	0,0690	0,0480	0,0660	0,0520	0,0530	0,0370	0,0370	
0,0380	0,0330	0,0560	0,0670	0,0710	0,0480	0,0670	0,0530	0,0490	0,0420	0,0370	
0,0390	0,0340	0,0590	0,0690	0,0700	0,0500	0,0730	0,0580	0,0530	0,0380	0,0370	
0,0370	0,0340	0,0590	0,0710	0,0720	0,0520	0,0730	0,0570	0,0530	0,0370	0,0370	
0,0360	0,0460	0,0690	0,0750	0,0690	0,0490	0,0730	0,0580	0,0560	0,0380	0,0370	
0,0430	0,0380	0,0570	0,0660	0,0700	0,0510	0,0750	0,0540	0,0570	0,0390	0,0380	
0,0400	0,0350	0,0600	0,0640	0,0680	0,0470	0,0760	0,0470	0,0570	0,0390	0,0400	
0,0385	0,0364	0,0629	0,0674	0,0701	0,0495	0,0720	0,0543	0,0540	0,0386	0,0379	Média das Abs lidas
0,0034	0,0008	0,0051	0,0121	0,0026	0,0040	0,0170	0,0044	0,0115	0,0031	0,0023	Diferenças de Abs
	77,78	-51,85	-259,26	22,22	-18,52	-403,70	-29,63	-240,74	7,41	33,33	AI %

Absorbância da Placa 5 aq. - 60min de reação

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 152	EXTR 144	EXTR 146	EXTR 170	EXTR 204	EXTR 232	EXTR 290	EXTR 378	EXTR 412	
0,0030	0,0010	0,0120	0,0090	0,0040	0,0060	0,0180	0,0050	0,0100	0,0020	0,0020	
0,0040	0,0010	0,0120	0,0110	0,0030	0,0040	0,0130	0,0040	0,0120	0,0020	0,0020	
0,0030	0,0010	0,0080	0,0130	0,0040	0,0040	0,0130	0,0050	0,0080	0,0060	0,0020	
0,0030	0,0010	0,0100	0,0120	0,0040	0,0040	0,0190	0,0070	0,0120	0,0030	0,0020	
0,0030	0,0010	0,0080	0,0140	0,0010	0,0040	0,0170	0,0030	0,0090	0,0020	0,0010	
0,0030	-0,0030	-0,0060	0,0150	-0,0030	0,0040	0,0180	0,0040	0,0130	0,0030	0,0020	
0,0040	0,0020	-0,0140	0,0110	0,0050	0,0050	0,0190	0,0050	0,0140	0,0030	0,0030	
0,0040	0,0020	0,0110	0,0120	0,0030	0,0010	0,0190	0,0020	0,0140	0,0040	0,0040	
0,0034	0,0008	0,0051	0,0121	0,0026	0,0040	0,0170	0,0044	0,0115	0,0031	0,0023	Média Absorbâncias
0,0005	0,0015	0,0091	0,0018	0,0024	0,0013	0,0024	0,0014	0,0021	0,0013	0,0008	DP
	77,78	-51,85	-259,26	22,22	-18,52	-403,70	-29,63	-240,74	7,41	33,33	AI %



Placa 5 aq. - 120min

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 152	EXTR 144	EXTR 146	EXTR 170	EXTR 204	EXTR 232	EXTR 290	EXTR 378	EXTR 412	
0,0450	0,0350	0,0770	0,0670	0,0840	0,0620	0,0860	0,0620	0,0620	0,0410	0,0410	
0,0510	0,0380	0,0940	0,0780	0,0770	0,0530	0,0750	0,0580	0,0630	0,0400	0,0390	
0,0440	0,0340	0,0670	0,0790	0,0810	0,0560	0,0750	0,0610	0,0550	0,0460	0,0390	
0,0470	0,0350	0,0710	0,0780	0,0820	0,0600	0,0880	0,0660	0,0610	0,0420	0,0390	
0,0460	0,0350	0,0680	0,0800	0,0770	0,0570	0,0880	0,0630	0,0620	0,0380	0,0400	
0,0420	0,0460	0,0840	0,0850	0,0760	0,0570	0,0850	0,0610	0,0660	0,0390	0,0390	
0,0520	0,0390	0,0690	0,0750	0,0850	0,0550	0,0890	0,0630	0,0670	0,0440	0,0390	
0,0510	0,0370	0,0740	0,0730	0,0750	0,0580	0,0890	0,0500	0,0670	0,0420	0,0460	
0,0473	0,0374	0,0755	0,0769	0,0796	0,0573	0,0844	0,0605	0,0629	0,0415	0,0403	Média das Abs lidas
0,0121	0,0017	0,0178	0,0216	0,0121	0,0118	0,0294	0,0106	0,0204	0,0060	0,0046	Diferenças de Abs
	85,57	-46,39	-78,35	0,00	3,09	-142,27	12,37	-68,04	50,52	61,86	AI %

Absorbância da Placa 5 - 120min de reação

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 152	EXTR 144	EXTR 146	EXTR 170	EXTR 204	EXTR 232	EXTR 290	EXTR 378	EXTR 412	
0,0120	0,0020	0,0260	0,0160	0,0160	0,0170	0,0310	0,0120	0,0180	0,0040	0,0030	
0,0160	0,0020	0,0260	0,0220	0,0110	0,0090	0,0220	0,0100	0,0220	0,0050	0,0040	
0,0090	0,0020	0,0190	0,0250	0,0140	0,0120	0,0210	0,0130	0,0140	0,0100	0,0040	
0,0110	0,0020	0,0220	0,0210	0,0160	0,0140	0,0340	0,0150	0,0200	0,0070	0,0040	
0,0120	0,0020	0,0170	0,0230	0,0060	0,0090	0,0320	0,0090	0,0180	0,0030	0,0040	
0,0090	-0,0030	0,0090	0,0250	0,0040	0,0120	0,0300	0,0070	0,0230	0,0040	0,0040	
0,0130	0,0030	-0,0020	0,0200	0,0200	0,0090	0,0330	0,0140	0,0240	0,0080	0,0040	
0,0150	0,0040	0,0250	0,0210	0,0100	0,0120	0,0320	0,0050	0,0240	0,0070	0,0100	
0,0121	0,0018	0,0178	0,0216	0,0121	0,0118	0,0294	0,0106	0,0204	0,0060	0,0046	Média Absorbâncias
0,0024	0,0019	0,0092	0,0027	0,0051	0,0026	0,0047	0,0033	0,0033	0,0022	0,0021	DP
	85,57	-46,39	-78,35	0,00	3,09	-142,27	12,37	-68,04	50,52	61,86	AI %



Placa 6 aq. - 60min

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 414	EXTR 530	EXTR 592	EXTR 786	EXTR 822	EXTR 842	EXT 1122	
0,0360	0,0330	0,0460	0,0830	0,0400	0,0550	0,0440	0,0470	0,0570	
0,0390	0,0520	0,0420	0,0820	0,0460	0,0500	0,0450	0,0460	0,0560	
0,0380	0,0340	0,0410	0,0810	0,0390	0,0440	0,0430	0,0480	0,0560	
0,0370	0,0350	0,0420	0,0670	0,0390	0,0410	0,0450	0,0500	0,0520	
0,0390	0,0400	0,0440	0,0700	0,0470	0,0420	0,0450	0,0470	0,0550	
0,0350	0,0340	0,0380	0,0790	0,0400	0,0430	0,0470	0,0510	0,0540	
0,0410	0,0360	0,0420	0,0800	0,0430	0,0430	0,0450	0,0540	0,0590	
0,0370	0,0410	0,0430	0,0710	0,0410	0,0430	0,0570	0,0500	0,0660	
0,0378	0,0381	0,0423	0,0766	0,0419	0,0451	0,0464	0,0491	0,0569	Média das Abs lidas
0,0030	0,0020	0,0064	0,0201	0,0044	0,0046	0,0008	0,0091	0,0045	Diferenças de Abs
	33,33	-112,50	-570,83	-45,83	-54,17	75,00	-204,17	-50,00	AI %

Absorbância da Placa 6 - 60min de reação

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 414	EXTR 530	EXTR 592	EXTR 786	EXTR 822	EXTR 842	EXT 1122	
0,0030	0,0010	0,0110	0,0240	0,0040	0,0040	0,0000	0,0090	0,0050	
0,0040	0,0070	0,0070	0,0200	0,0040	0,0030	0,0010	0,0070	0,0050	
0,0030	0,0010	0,0050	0,0210	0,0030	0,0060	0,0000	0,0100	0,0050	
0,0040	0,0020	0,0070	0,0160	0,0040	0,0040	0,0010	0,0100	0,0020	
0,0000	0,0030	0,0080	0,0160	0,0040	0,0050	0,0010	0,0080	0,0050	
0,0020	0,0010	0,0040	0,0220	0,0040	0,0050	0,0010	0,0090	0,0030	
0,0050	0,0010	0,0060	0,0230	0,0060	0,0050	0,0020	0,0100	0,0050	
0,0030	0,0000	0,0030	0,0190	0,0060	0,0050	0,0000	0,0100	0,0060	
0,0030	0,0020	0,0064	0,0201	0,0044	0,0046	0,0008	0,0091	0,0045	Média Absorbâncias
0,0014	0,0021	0,0023	0,0028	0,0010	0,0009	0,0007	0,0011	0,0012	DP
	33,33	-112,50	-570,83	-45,83	-54,17	75,00	-204,17	-50,00	AI %

Placa 6 aq. - 120min

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 414	EXTR 530	EXTR 592	EXTR 786	EXTR 822	EXTR 842	EXT 1122	
0,0420	0,0330	0,0610	0,0910	0,0420	0,0570	0,0450	0,0530	0,0660	
0,0470	0,0460	0,0550	0,0910	0,0510	0,0520	0,0460	0,0520	0,0670	
0,0440	0,0350	0,0530	0,0900	0,0410	0,0460	0,0450	0,0570	0,0660	
0,0490	0,0350	0,0540	0,0760	0,0440	0,0440	0,0450	0,0570	0,0570	
0,0480	0,0390	0,0570	0,0790	0,0490	0,0440	0,0470	0,0550	0,0650	
0,0360	0,0350	0,0430	0,0880	0,0330	0,0450	0,0500	0,0590	0,0610	
0,0520	0,0370	0,0540	0,0870	0,0400	0,0440	0,0470	0,0610	0,0690	
0,0440	0,0410	0,0550	0,0790	0,0420	0,0450	0,0570	0,0570	0,0710	
0,0453	0,0376	0,0540	0,0851	0,0428	0,0471	0,0478	0,0564	0,0653	Média das Abs lidas
0,0105	0,0015	0,0181	0,0286	0,0052	0,0066	0,0021	0,0164	0,0129	Diferenças de Abs
	85,71	-72,62	-172,62	50,00	36,90	79,76	-55,95	-22,62	AI %

Absorbância da Placa 6 - 120min de reação

ÁGUA	AK 5ug	EXTR 414	EXTR 530	EXTR 592	EXTR 786	EXTR 822	EXTR 842	EXT 1122	
0,0090	0,0010	0,0260	0,0320	0,0060	0,0060	0,0010	0,0150	0,0140	
0,0120	0,0010	0,0200	0,0290	0,0090	0,0050	0,0020	0,0130	0,0160	
0,0090	0,0020	0,0170	0,0300	0,0050	0,0080	0,0020	0,0190	0,0150	
0,0160	0,0020	0,0190	0,0250	0,0090	0,0070	0,0010	0,0170	0,0070	
0,0090	0,0020	0,0210	0,0250	0,0060	0,0070	0,0030	0,0160	0,0150	
0,0030	0,0020	0,0090	0,0310	-0,0030	0,0070	0,0040	0,0170	0,0100	
0,0160	0,0020	0,0180	0,0300	0,0030	0,0060	0,0040	0,0170	0,0150	
0,0100	0,0000	0,0150	0,0270	0,0070	0,0070	0,0000	0,0170	0,0110	
0,0105	0,0015	0,0181	0,0286	0,0053	0,0066	0,0021	0,0164	0,0129	Média Absorbâncias
0,0040	0,0007	0,0046	0,0025	0,0036	0,0009	0,0014	0,0017	0,0030	DP
	85,71	-72,62	-172,62	50,00	36,90	79,76	-55,95	-22,62	AI %

## ANEXO E

Análise da inibição do Ácido kójico sobre a tirosinase 480unidades/mL para se conseguir a Atividade Inibitória 50%

### Placa AK - AI 50% - 0min de reação

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,0370	0,0340	0,0360	0,0330	0,0340	0,0380	
0,0350	0,0350	0,0330	0,0340	0,0340	0,0350	
0,0350	0,0340	0,0340	0,0340	0,0350	0,0340	
0,0360	0,0360	0,0900	0,0400	0,0350	0,0370	
0,0370	0,0410	0,0550	0,0360	0,0350	0,0420	
0,0360	0,0360	0,0340	0,0350	0,0360	0,0340	
0,0340	0,0350	0,0380	0,0390	0,0350	0,0480	
0,0340	0,0340	0,0380	0,0390	0,0340	0,0350	
0,0355	0,0356	0,0448	0,0363	0,0348	0,0379	Média das Abs lidas

### Absorbância inicial ( considerada zero ) da Placa de Identificação da AI ( % )

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	Absorbância inicial
0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	DP

### Placa AK - AI 50% - 10min de reação

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,1200	0,0340	0,0420	0,0550	0,0710	0,0900	
0,1170	0,0360	0,0400	0,0490	0,0670	0,0790	
0,1170	0,0340	0,0410	0,0420	0,0630	0,0880	
0,1170	0,0370	0,0940	0,0640	0,0670	0,0890	
0,1200	0,0420	0,0600	0,0500	0,0510	0,0880	
0,1260	0,0370	0,0420	0,0570	0,0690	0,0870	
0,1150	0,0350	0,0440	0,0590	0,0820	0,0990	
0,1350	0,0360	0,0500	0,0660	0,0780	0,0980	
0,1209	0,0364	0,0516	0,0553	0,0685	0,0898	Média das Abs lidas
0,0854	0,0007	0,0069	0,0190	0,0338	0,0519	Diferenças das Abs

### Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 10min de reação

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,0830	0,0000	0,0060	0,0220	0,0370	0,0520	
0,0820	0,0010	0,0070	0,0150	0,0330	0,0440	
0,0820	0,0000	0,0070	0,0080	0,0280	0,0540	
0,0810	0,0010	0,0040	0,0240	0,0320	0,0520	
0,0830	0,0010	0,0050	0,0140	0,0160	0,0460	
0,0900	0,0010	0,0080	0,0220	0,0330	0,0530	
0,0810	0,0000	0,0060	0,0200	0,0470	0,0510	
0,1010	0,0020	0,0120	0,0270	0,0440	0,0630	
0,0854	0,0007	0,0069	0,0190	0,0338	0,0519	Média das Absorbâncias
0,0065	0,0007	0,0023	0,0058	0,0090	0,0053	DP
	99,12	91,95	77,75	60,47	39,24	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 20min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,2610	0,0410	0,0850	0,1320	0,1740	0,2190	
0,2550	0,0460	0,0770	0,1200	0,1660	0,1960	
0,2630	0,0390	0,0790	0,0930	0,1560	0,2120	
0,2520	0,0460	0,1090	0,1510	0,1620	0,2070	
0,2570	0,0450	0,0950	0,1140	0,1130	0,1990	
0,2720	0,0410	0,0800	0,1280	0,1660	0,2110	
0,2560	0,0420	0,0760	0,1380	0,1990	0,2150	
0,2800	0,0480	0,0960	0,1500	0,1890	0,2270	
0,2620	0,0435	0,0871	0,1283	0,1656	0,2108	Média das Abs lidas
0,2265	0,0079	0,0424	0,0920	0,1309	0,1729	Diferenças das Abs

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 20min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,2240	0,0070	0,0490	0,0990	0,1400	0,1810	
0,2200	0,0110	0,0440	0,0860	0,1320	0,1610	
0,2280	0,0050	0,0450	0,0590	0,1210	0,1780	
0,2160	0,0100	0,0190	0,1110	0,1270	0,1700	
0,2200	0,0040	0,0400	0,0780	0,0780	0,1570	
0,2360	0,0050	0,0460	0,0930	0,1300	0,1770	
0,2220	0,0070	0,0380	0,0990	0,1640	0,1670	
0,2460	0,0140	0,0580	0,1110	0,1550	0,1920	
0,2265	0,0079	0,0424	0,0920	0,1309	0,1729	Média das Absorbâncias
0,0093	0,0033	0,0105	0,0164	0,0242	0,0107	DP
	96,52	81,29	59,38	42,22	23,68	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 30min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,3690	0,0560	0,1460	0,2160	0,2760	0,3360	
0,3600	0,0700	0,1260	0,2010	0,2640	0,3040	
0,3650	0,0460	0,1350	0,1560	0,2520	0,3200	
0,3550	0,0680	0,1330	0,2420	0,2590	0,3130	
0,3580	0,0590	0,1460	0,1940	0,1860	0,3040	
0,3780	0,0520	0,1330	0,2110	0,2640	0,3210	
0,3600	0,0520	0,1250	0,2300	0,3090	0,3180	
0,3890	0,0740	0,1570	0,2350	0,2920	0,3370	
0,3668	0,0596	0,1376	0,2106	0,2628	0,3191	Média das Abs lidas
0,3313	0,0240	0,0929	0,1744	0,2280	0,2813	Diferenças das Abs

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 30min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,3320	0,0220	0,1100	0,1830	0,2420	0,2980	
0,3250	0,0350	0,0930	0,1670	0,2300	0,2690	
0,3300	0,0120	0,1010	0,1220	0,2170	0,2860	
0,3190	0,0320	0,0430	0,2020	0,2240	0,2760	
0,3210	0,0180	0,0910	0,1580	0,1510	0,2620	
0,3420	0,0160	0,0990	0,1760	0,2280	0,2870	
0,3260	0,0170	0,0870	0,1910	0,2740	0,2700	
0,3550	0,0400	0,1190	0,1960	0,2580	0,3020	
0,3313	0,0240	0,0929	0,1744	0,2280	0,2813	Média das Absorbâncias
0,0112	0,0096	0,0212	0,0241	0,0341	0,0134	DP
	92,75	71,96	47,36	31,17	15,09	AI ( % )

**Placa AK – AI 50% - 40min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,4600	0,0890	0,2200	0,3160	0,3810	0,4330	
0,4490	0,1060	0,1930	0,2960	0,3640	0,4040	
0,4570	0,0650	0,2100	0,2410	0,3490	0,4220	
0,4430	0,1070	0,1800	0,3490	0,3750	0,4130	
0,4450	0,0840	0,2170	0,2810	0,2660	0,3980	
0,4690	0,0790	0,2040	0,3040	0,3690	0,4240	
0,4460	0,0910	0,1980	0,3300	0,4130	0,4150	
0,4760	0,1130	0,2430	0,3390	0,3950	0,4420	
<b>0,4556</b>	<b>0,0918</b>	<b>0,2081</b>	<b>0,3070</b>	<b>0,3640</b>	<b>0,4189</b>	Média das Abs lidas
<b>0,4201</b>	<b>0,0561</b>	<b>0,1634</b>	<b>0,2708</b>	<b>0,3293</b>	<b>0,3810</b>	Diferenças das Abs

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 40min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,4230	0,0550	0,1840	0,2830	0,3470	0,3950	
0,4140	0,0710	0,1600	0,2620	0,3300	0,3690	
0,4220	0,0310	0,1760	0,2070	0,3140	0,3880	
0,4070	0,0710	0,0900	0,3090	0,3400	0,3760	
0,4080	0,0430	0,1620	0,2450	0,2310	0,3560	
0,4330	0,0430	0,1700	0,2690	0,3330	0,3900	
0,4120	0,0560	0,1600	0,2910	0,3780	0,3670	
0,4420	0,0790	0,2050	0,3000	0,3610	0,4070	
<b>0,4201</b>	<b>0,0561</b>	<b>0,1634</b>	<b>0,2708</b>	<b>0,3293</b>	<b>0,3810</b>	Média das Absorbâncias
<b>0,0116</b>	<b>0,0156</b>	<b>0,0312</b>	<b>0,0310</b>	<b>0,0414</b>	<b>0,0158</b>	DP
	<b>86,64</b>	<b>61,11</b>	<b>35,55</b>	<b>21,63</b>	<b>9,31</b>	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 50min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,5220	0,1310	0,2960	0,4050	0,4640	0,5130	
0,5150	0,1510	0,2680	0,3830	0,4490	0,4780	
0,5200	0,1070	0,2880	0,3180	0,4320	0,5010	
0,5050	0,1530	0,2270	0,4430	0,4440	0,4860	
0,5060	0,1190	0,2890	0,3640	0,3400	0,4710	
0,5310	0,1140	0,2770	0,3860	0,4470	0,5010	
0,5090	0,1320	0,2720	0,4200	0,4960	0,4930	
0,5360	0,1560	0,3210	0,4280	0,4760	0,5170	
<b>0,5180</b>	<b>0,1329</b>	<b>0,2798</b>	<b>0,3934</b>	<b>0,4435</b>	<b>0,4950</b>	Média das Abs lidas
<b>0,4825</b>	<b>0,0973</b>	<b>0,2350</b>	<b>0,3571</b>	<b>0,4088</b>	<b>0,4571</b>	Diferenças das Abs

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 50min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,4850	0,0970	0,2600	0,3720	0,4300	0,4750	
0,4800	0,1160	0,2350	0,3490	0,4150	0,4430	
0,4850	0,0730	0,2540	0,2840	0,3970	0,4670	
0,4690	0,1170	0,1370	0,4030	0,4090	0,4490	
0,4690	0,0780	0,2340	0,3280	0,3050	0,4290	
0,4950	0,0780	0,2430	0,3510	0,4110	0,4670	
0,4750	0,0970	0,2340	0,3810	0,4610	0,4450	
0,5020	0,1220	0,2830	0,3890	0,4420	0,4820	
<b>0,4825</b>	<b>0,0973</b>	<b>0,2350</b>	<b>0,3571</b>	<b>0,4088</b>	<b>0,4571</b>	Média das Absorbâncias
<b>0,0110</b>	<b>0,0183</b>	<b>0,0402</b>	<b>0,0357</b>	<b>0,0436</b>	<b>0,0171</b>	DP
	<b>79,84</b>	<b>51,30</b>	<b>25,98</b>	<b>15,28</b>	<b>5,26</b>	AI ( % )

**Placa AK - AI 50% - 60min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,5730	0,1830	0,3810	0,4900	0,5370	0,5780	
0,5670	0,2030	0,3530	0,4730	0,5260	0,5470	
0,5730	0,1570	0,3750	0,4020	0,5070	0,5690	
0,5560	0,2080	0,2850	0,5350	0,5150	0,5500	
0,5550	0,1660	0,3730	0,4520	0,4070	0,5350	
0,5830	0,1670	0,3630	0,4720	0,5240	0,5680	
0,5600	0,1830	0,3510	0,5090	0,5690	0,5600	
0,5840	0,2100	0,4080	0,5140	0,5470	0,5780	
0,5689	0,1846	0,3611	0,4809	0,5165	0,5606	Média das Abs lidas
0,5334	0,1490	0,3164	0,4446	0,4818	0,5228	Diferenças das Abs

**Absorbância da Placa de Identificação da AI ( % ) - 60min de reação**

Água	AK 10	AK 5	AK 2,5	AK 1,25	AK 0,625	
0,5360	0,1490	0,3450	0,4570	0,5030	0,5400	
0,5320	0,1680	0,3200	0,4390	0,4920	0,5120	
0,5380	0,1230	0,3410	0,3680	0,4720	0,5350	
0,5200	0,1720	0,1950	0,4950	0,4800	0,5130	
0,5180	0,1250	0,3180	0,4160	0,3720	0,4930	
0,5470	0,1310	0,3290	0,4370	0,4880	0,5340	
0,5260	0,1480	0,3130	0,4700	0,5340	0,5120	
0,5500	0,1760	0,3700	0,4750	0,5130	0,5430	
0,5334	0,1490	0,3164	0,4446	0,4818	0,5228	Média das Absorbâncias
0,0110	0,0200	0,0490	0,0371	0,0453	0,0166	DP
	72,06	40,68	16,64	9,68	1,99	AI ( % )





**Placa extratos orgânicos 57 e 91 - 60min de reação**

W/DMSO	AK 5	E-57-80	E-57-40	E-57-20	E-57-10	E-91-80	E-91-40	E-91-20	E-91-10	
0,5540	0,4420	0,1640	0,2250	0,3120	0,4140	0,5040	0,5810	0,5500	0,5490	
0,5540	0,3660	0,1410	0,2130	0,3080	0,4050	0,5540	0,4860	0,5260	0,5190	
0,5470	0,3300	0,1600	0,2090	0,2620	0,4120	0,4330	0,5020	0,5290	0,5420	
0,5880	0,3540	0,1680	0,1580	0,3110	0,4090	0,5050	0,7170	0,6100	0,5480	
0,5550	0,2920	0,1190	0,2170	0,2920	0,4290	0,5060	0,5050	0,5670	0,5340	
0,5850	0,3380	0,1640	0,2250	0,2910	0,4080	0,5060	0,5280	0,5230	0,5350	
0,5740	0,3420	0,1570	0,2570	0,2860	0,4420	0,5360	0,5260	0,5370	0,5370	
0,5650	0,3810	0,1640	0,2390	0,3050	0,4150	0,4890	0,5040	0,5280	0,5410	
<b>0,5653</b>	<b>0,3556</b>	<b>0,1546</b>	<b>0,2179</b>	<b>0,2959</b>	<b>0,4168</b>	<b>0,5041</b>	<b>0,5436</b>	<b>0,5463</b>	<b>0,5381</b>	<b>Média Abs lidas</b>
<b>0,5299</b>	<b>0,3190</b>	<b>0,0915</b>	<b>0,1684</b>	<b>0,2511</b>	<b>0,3763</b>	<b>0,4545</b>	<b>0,5013</b>	<b>0,5064</b>	<b>0,5008</b>	<b>Diferenças das médias das Abs lidas</b>
	<b>39,80</b>	<b>82,73</b>	<b>68,22</b>	<b>52,61</b>	<b>28,99</b>	<b>14,23</b>	<b>5,40</b>	<b>4,44</b>	<b>5,50</b>	<b>AI %</b>

**Absorbância da Placa 57 / 91 - 60min de reação**

W/DMSO	AK 5	E-57-80	E-57-40	E-57-20	E-57-10	E-91-80	E-91-40	E-91-20	E-91-10	
0,5180	0,4070	0,1020	0,1730	0,2650	0,3670	0,4550	0,5390	0,5120	0,5120	
0,5190	0,3210	0,0730	0,1650	0,2630	0,3640	0,5060	0,4430	0,4880	0,4820	
0,5130	0,2960	0,0970	0,1620	0,2190	0,3730	0,3840	0,4620	0,4900	0,5040	
0,5500	0,3190	0,1010	0,1120	0,2590	0,3700	0,4520	0,6720	0,5650	0,5090	
0,5190	0,2570	0,0610	0,1690	0,2490	0,3900	0,4550	0,4630	0,5300	0,4970	
0,5490	0,3020	0,1010	0,1730	0,2480	0,3680	0,4580	0,4860	0,4840	0,4980	
0,5400	0,3040	0,0950	0,2040	0,2440	0,4020	0,4850	0,4840	0,4990	0,5000	
0,5310	0,3460	0,1020	0,1890	0,2620	0,3760	0,4410	0,4610	0,4830	0,5040	
<b>0,5299</b>	<b>0,3190</b>	<b>0,0915</b>	<b>0,1684</b>	<b>0,2511</b>	<b>0,3763</b>	<b>0,4545</b>	<b>0,5013</b>	<b>0,5064</b>	<b>0,5008</b>	<b>Média das Abs</b>
<b>0,0139</b>	<b>0,0409</b>	<b>0,0146</b>	<b>0,0249</b>	<b>0,0142</b>	<b>0,0123</b>	<b>0,0331</b>	<b>0,0699</b>	<b>0,0268</b>	<b>0,0086</b>	<b>DP</b>
	<b>39,80</b>	<b>82,73</b>	<b>68,22</b>	<b>52,61</b>	<b>28,99</b>	<b>14,23</b>	<b>5,40</b>	<b>4,44</b>	<b>5,50</b>	<b>AI %</b>



**Placa extratos orgânicos - 841 - 60min de reação**

W/DMSO	AK 5	E-841-80	E-841-40	E-841-20	E-841-10	
0,6060	0,3810	0,2770	0,3960	0,5200	0,5640	
0,5820	0,3530	0,2660	0,3950	0,5140	0,5620	
0,5640	0,3750	0,2930	0,4060	0,4990	0,5750	
0,5910	0,2850	0,2690	0,4070	0,5090	0,5800	
0,5930	0,3730	0,2690	0,3990	0,5230	0,4520	
0,5690	0,3630	0,2750	0,4020	0,5110	0,5460	
0,5700	0,3510	0,2670	0,4420	0,5090	0,4630	
0,5660	0,4080	0,2850	0,4080	0,4530	0,4540	
<b>0,5801</b>	<b>0,3611</b>	<b>0,2751</b>	<b>0,4069</b>	<b>0,5048</b>	<b>0,5245</b>	<b>Média Abs lidas</b>
<b>0,5430</b>	<b>0,3164</b>	<b>0,2118</b>	<b>0,3583</b>	<b>0,4624</b>	<b>0,4838</b>	<b>Diferenças das médias das Abs lidas</b>
	<b>41,74</b>	<b>61,00</b>	<b>34,02</b>	<b>14,85</b>	<b>10,91</b>	<b>AI 50%</b>

**Absorbância da Placa 841 - 60min de reação**

W/DMSO	AK 5	E-841-80	E-841-40	E-841-20	E-841-10	
0,5710	0,3450	0,2200	0,3490	0,4780	0,5220	
0,5450	0,3200	0,2060	0,3450	0,4720	0,5230	
0,5280	0,3410	0,1980	0,3600	0,4590	0,5350	
0,5470	0,1950	0,2010	0,3570	0,4650	0,5380	
0,5520	0,3180	0,2120	0,3510	0,4800	0,4080	
0,5330	0,3290	0,2190	0,3540	0,4680	0,5060	
0,5360	0,3130	0,2110	0,3920	0,4680	0,4220	
0,5320	0,3700	0,2270	0,3580	0,4090	0,4160	
<b>0,5430</b>	<b>0,3164</b>	<b>0,2118</b>	<b>0,3583</b>	<b>0,4624</b>	<b>0,4838</b>	<b>Média das Abs</b>
<b>0,0131</b>	<b>0,0490</b>	<b>0,0093</b>	<b>0,0136</b>	<b>0,0211</b>	<b>0,0539</b>	<b>DP</b>
	<b>41,74</b>	<b>61,00</b>	<b>34,02</b>	<b>14,85</b>	<b>10,91</b>	<b>AI 50%</b>



**Placa extratos aquosos 146 e 378 - 60min de reação**

Água	AK 5	E-146-80	E-146-40	E-146-20	E-146-10	E-378-80	E-378-40	E-378-20	E-378-10	
0,6410	0,3920	0,4600	0,5210	0,5590	0,6090	0,5500	0,6080	0,6040	0,6080	
0,5950	0,4580	0,4520	0,4940	0,5690	0,6060	0,6580	0,6040	0,6010	0,6010	
0,6250	0,3690	0,4410	0,4900	0,5850	0,6070	0,6460	0,6100	0,6090	0,6260	
0,6340	0,4300	0,4290	0,5210	0,5830	0,6130	0,5860	0,6100	0,5930	0,6140	
0,6250	0,4340	0,4500	0,5110	0,5680	0,5950	0,5950	0,6200	0,6060	0,5890	
0,6050	0,3510	0,3950	0,5160	0,5820	0,6080	0,5840	0,6080	0,6140	0,6220	
0,6040	0,3740	0,4680	0,5170	0,5750	0,5940	0,6180	0,5430	0,5990	0,6250	
0,6220	0,3480	0,4250	0,5280	0,5660	0,6060	0,6190	0,5830	0,5870	0,6250	
<b>0,6189</b>	<b>0,3945</b>	<b>0,4400</b>	<b>0,5123</b>	<b>0,5734</b>	<b>0,6048</b>	<b>0,6070</b>	<b>0,5983</b>	<b>0,6016</b>	<b>0,6138</b>	<b>Médias Abs lidas</b>
<b>0,5840</b>	<b>0,3588</b>	<b>0,3874</b>	<b>0,4659</b>	<b>0,5318</b>	<b>0,5680</b>	<b>0,5705</b>	<b>0,5633</b>	<b>0,5673</b>	<b>0,5799</b>	<b>Diferenças das médias das Abs lidas</b>
	<b>38,57</b>	<b>33,67</b>	<b>20,23</b>	<b>8,95</b>	<b>2,74</b>	<b>2,31</b>	<b>3,55</b>	<b>2,87</b>	<b>0,71</b>	<b>AI 50%</b>

**Absorbância da Placa 146/378 - 60min de reação**

Água	AK 5	E-146-80	E-146-40	E-146-20	E-146-10	E-378-80	E-378-40	E-378-20	E-378-10	
0,6070	0,3590	0,4100	0,4740	0,5120	0,5720	0,5130	0,5750	0,5700	0,5730	
0,5590	0,4210	0,3980	0,4500	0,5310	0,5670	0,6210	0,5710	0,5680	0,5680	
0,5900	0,3320	0,3870	0,4460	0,5450	0,5710	0,6090	0,5720	0,5730	0,5920	
0,6010	0,3940	0,3780	0,4760	0,5360	0,5770	0,5500	0,5750	0,5580	0,5810	
0,5870	0,3970	0,3950	0,4630	0,5300	0,5600	0,5600	0,5860	0,5710	0,5560	
0,5680	0,3140	0,3430	0,4650	0,5410	0,5720	0,5480	0,5730	0,5800	0,5890	
0,5710	0,3390	0,4130	0,4720	0,5340	0,5560	0,5820	0,5070	0,5650	0,5890	
0,5890	0,3140	0,3750	0,4810	0,5250	0,5690	0,5810	0,5470	0,5530	0,5910	
<b>0,5840</b>	<b>0,3588</b>	<b>0,3874</b>	<b>0,4659</b>	<b>0,5318</b>	<b>0,5680</b>	<b>0,5705</b>	<b>0,5633</b>	<b>0,5673</b>	<b>0,5799</b>	<b>Média das Abs</b>
<b>0,0156</b>	<b>0,0382</b>	<b>0,0211</b>	<b>0,0117</b>	<b>0,0095</b>	<b>0,0064</b>	<b>0,0328</b>	<b>0,0236</b>	<b>0,0080</b>	<b>0,0122</b>	<b>DP</b>
	<b>38,57</b>	<b>33,67</b>	<b>20,23</b>	<b>8,95</b>	<b>2,74</b>	<b>2,31</b>	<b>3,55</b>	<b>2,87</b>	<b>0,71</b>	<b>AI 50%</b>



Placa extratos aquosos 412 e 822 - 60min de reação

Água	AK 5	E-412-80	E-412-40	E-412-20	E-412-10	E-822-80	E-822-40	E-822-20	E-822-10	
0,6130	0,3020	0,5860	0,6040	0,5930	0,5700	0,6120	0,5740	0,5740	0,6050	
0,5910	0,3700	0,5850	0,6190	0,6230	0,5960	0,6120	0,5690	0,5290	0,5410	
0,5910	0,3130	0,5850	0,6020	0,5740	0,5640	0,6060	0,5930	0,5880	0,6110	
0,5900	0,2940	0,6080	0,5930	0,5920	0,5930	0,6150	0,5610	0,5710	0,5810	
0,5860	0,2840	0,6320	0,6190	0,6100	0,6080	0,6130	0,5460	0,5990	0,5650	
0,5850	0,2840	0,5810	0,5500	0,5880	0,6110	0,5830	0,6070	0,5690	0,5970	
0,5900	0,3610	0,6250	0,6160	0,6100	0,6380	0,6220	0,6310	0,5780	0,5560	
0,6020	0,3430	0,6230	0,5830	0,6180	0,6010	0,6010	0,6130	0,6010	0,6170	
<b>0,5935</b>	<b>0,3189</b>	<b>0,6031</b>	<b>0,5983</b>	<b>0,6010</b>	<b>0,5976</b>	<b>0,6080</b>	<b>0,5868</b>	<b>0,5761</b>	<b>0,5841</b>	Média Abs lidas
<b>0,5583</b>	<b>0,2825</b>	<b>0,5673</b>	<b>0,5628</b>	<b>0,5656</b>	<b>0,5633</b>	<b>0,5656</b>	<b>0,5468</b>	<b>0,5398</b>	<b>0,5475</b>	Diferenças das médias das Abs lidas
	<b>49,40</b>	<b>-1,61</b>	<b>-0,81</b>	<b>-1,32</b>	<b>-0,90</b>	<b>-1,32</b>	<b>2,06</b>	<b>3,31</b>	<b>1,93</b>	AI 50%

Absorbância da Placa 412/822- 60min de reação

Água	AK 5	E-412-80	E-412-40	E-412-20	E-412-10	E-822-80	E-822-40	E-822-20	E-822-10	
0,5760	0,2680	0,5520	0,5690	0,5580	0,5370	0,5690	0,5380	0,5390	0,5680	
0,5540	0,3320	0,5480	0,5850	0,5880	0,5620	0,5710	0,5330	0,4940	0,5060	
0,5550	0,2760	0,5480	0,5670	0,5380	0,5290	0,5650	0,5550	0,5500	0,5760	
0,5570	0,2590	0,5720	0,5590	0,5560	0,5580	0,5720	0,5160	0,5330	0,5330	
0,5500	0,2490	0,5970	0,5850	0,5750	0,5750	0,5730	0,5090	0,5640	0,5300	
0,5490	0,2430	0,5460	0,5130	0,5520	0,5740	0,5380	0,5700	0,5350	0,5630	
0,5570	0,3240	0,5890	0,5790	0,5750	0,6030	0,5790	0,5790	0,5420	0,5220	
0,5680	0,3090	0,5860	0,5450	0,5830	0,5680	0,5580	0,5740	0,5610	0,5820	
<b>0,5583</b>	<b>0,2825</b>	<b>0,5673</b>	<b>0,5628</b>	<b>0,5656</b>	<b>0,5633</b>	<b>0,5656</b>	<b>0,5468</b>	<b>0,5398</b>	<b>0,5475</b>	Média das Abs
<b>0,0086</b>	<b>0,0323</b>	<b>0,0199</b>	<b>0,0227</b>	<b>0,0161</b>	<b>0,0216</b>	<b>0,0119</b>	<b>0,0251</b>	<b>0,0203</b>	<b>0,0263</b>	DP
	<b>49,40</b>	<b>-1,61</b>	<b>-0,81</b>	<b>-1,32</b>	<b>-0,90</b>	<b>-1,32</b>	<b>2,06</b>	<b>3,31</b>	<b>1,93</b>	AI 50%





**Placa extratos aquosos 96/110 - 60min de reação**

Água	AK10	Ext96-80	Ext96-40	Ext96-20	Ext96-10	Ext110-80	Ext110-40	Ext110-20	Ext110-10	
0,5260	0,1670	0,5020	0,4800	0,4990	0,4790	0,4660	0,4770	0,4650	0,5150	
0,5360	0,1130	0,4950	0,4940	0,5030	0,4840	0,4910	0,4800	0,4760	0,4740	
0,5810	0,1750	0,5030	0,4830	0,5050	0,4770	0,4740	0,5530	0,5260	0,5330	
0,5800	0,1430	0,5130	0,4800	0,4860	0,4760	0,4710	0,5080	0,5540	0,5160	
0,4860	0,1620	0,5590	0,4870	0,4700	0,4830	0,4840	0,4840	0,4900	0,4850	
0,4990	0,1630	0,5020	0,4840	0,4860	0,4980	0,4660	0,5100	0,4880	0,5200	
0,4890	0,1470	0,5170	0,4960	0,4740	0,4790	0,4900	0,5120	0,5120	0,5240	
0,6640	0,1470	0,4970	0,4890	0,4770	0,4720	0,4850	0,5220	0,5880	0,4780	
<b>0,5451</b>	<b>0,1521</b>	<b>0,5110</b>	<b>0,4866</b>	<b>0,4875</b>	<b>0,4810</b>	<b>0,4784</b>	<b>0,5058</b>	<b>0,5124</b>	<b>0,5056</b>	<b>Média Abs lidas</b>
<b>0,5005</b>	<b>0,1155</b>	<b>0,4606</b>	<b>0,4446</b>	<b>0,4478</b>	<b>0,4439</b>	<b>0,4194</b>	<b>0,4568</b>	<b>0,4714</b>	<b>0,4668</b>	<b>Diferenças das médias das Abs lidas</b>
	<b>76,92</b>	<b>7,97</b>	<b>11,16</b>	<b>10,54</b>	<b>11,31</b>	<b>16,21</b>	<b>8,74</b>	<b>5,82</b>	<b>6,74</b>	<b>AI 50%</b>

**Asorbância da Placa 96/110 - 60min de reação**

Água	AK10	Ext96-80	Ext96-40	Ext96-20	Ext96-10	Ext110-80	Ext110-40	Ext110-20	Ext110-10	
0,4850	0,1330	0,4550	0,4370	0,4610	0,4430	0,4090	0,4300	0,4260	0,4760	
0,4960	0,0780	0,4440	0,4540	0,4640	0,4480	0,4300	0,4340	0,4370	0,4380	
0,5360	0,1390	0,4530	0,4420	0,4650	0,4400	0,4160	0,5020	0,4870	0,4940	
0,5350	0,1040	0,4620	0,4390	0,4420	0,4400	0,4110	0,4580	0,5090	0,4780	
0,4480	0,1250	0,5010	0,4450	0,4330	0,4460	0,4260	0,4370	0,4480	0,4470	
0,4530	0,1280	0,4530	0,4420	0,4460	0,4580	0,4090	0,4580	0,4470	0,4790	
0,4470	0,1090	0,4650	0,4520	0,4320	0,4400	0,4300	0,4620	0,4700	0,4830	
0,6040	0,1080	0,4520	0,4460	0,4390	0,4360	0,4240	0,4730	0,5470	0,4390	
<b>0,5005</b>	<b>0,1155</b>	<b>0,4606</b>	<b>0,4446</b>	<b>0,4478</b>	<b>0,4439</b>	<b>0,4194</b>	<b>0,4568</b>	<b>0,4714</b>	<b>0,4668</b>	<b>Média das Absorbâncias</b>
<b>0,0516</b>	<b>0,0185</b>	<b>0,0164</b>	<b>0,0056</b>	<b>0,0128</b>	<b>0,0064</b>	<b>0,0086</b>	<b>0,0223</b>	<b>0,0383</b>	<b>0,0205</b>	<b>DP</b>
	<b>76,92</b>	<b>7,97</b>	<b>11,16</b>	<b>10,54</b>	<b>11,31</b>	<b>16,21</b>	<b>8,74</b>	<b>5,82</b>	<b>6,74</b>	<b>AI %</b>