

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PATRÍCIA MAZUREKI CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE MELANOGÊNESE DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DA *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi**

CURITIBA

2010

PATRÍCIA MAZUREKI CAMPOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DE MELANOGÊNESE DO EXTRATO  
HIDROALCOÓLICO DA *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr Michel Fleith Otuki

CURITIBA

2010

Cada pessoa deve trabalhar para o seu  
aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo,  
participar da responsabilidade coletiva  
por toda a humanidade.

**Marie Curie**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço, primeiramente, a Deus pela concessão dessa existência, por toda energia e força recebidas, para que esse trabalho se iniciasse e findasse da melhor forma possível.

Aos meus queridos pais, por me mostrarem o real valor do ser humano, pela responsabilidade que assumimos quando nos propomos a realizar algo e pela minha formação moral e intelectual. Pela imensa impressão deixada em mim da dedicação de vocês do melhor que puderam fazer sempre, em todos os sentidos. Às minhas queridas irmãs, cada uma contribuindo do seu jeito com o que eu precisava, seja por palavras ou ações.

Ao meu esposo e companheiro de jornada, pelo amor e paciência, por entender os numerosos períodos de ausência, por estar ao meu lado, pelas palavras de ânimo para que seguisse sempre adiante.

Ao meu orientador, pela oportunidade de aprendizado numa esfera de estudo muito engrandecedora e orientação a mim dispensada.

A todos meus amigos que mantive, fiz e permaneceram por todo o período de construção dessa pesquisa, por contribuírem de alguma forma.

Ao pessoal do Laboratório de Inflamação – Farmacologia pelo acolhimento, ensinamento e pelos momentos vividos nesse universo da pesquisa.

Ao Marcos Sobral do Departamento de Botânica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela identificação da planta e ao grupo de pesquisa coordenado pelo Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Universidade do Vale do Itajaí pela obtenção do extrato da planta.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo espaço cedido e aos colegas da universidade que colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionar essa possibilidade de crescimento profissional.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

A todos aqueles que, de alguma forma, prestaram alguma assistência para que esse trabalho se realizasse.

## RESUMO

A melanina é um pigmento presente na pele com função de proteção contra a exposição à radiação ultravioleta, controle de temperatura e produção de coloração adaptativa. Quando a pele humana se expõe à radiação ultravioleta, cosméticos inadequados, medicamentos, variações hormonais pode haver um acúmulo desigual de melanina, originando manchas de hiperpigmentação. O objetivo deste trabalho foi testar a atividade sobre a melanogênese do extrato hidroalcoólico das folhas da *Garcinia gardneriana* (EHGG) na linhagem celular de melanoma murino B16F10, pois a planta *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi apresenta perfil fitoquímico de xantonas, triterpenos lupeol e betulina, esteróide  $\beta$ -sitosterol, biflavonóides como volkensiflavona, I3-naringenin-II8-eriodictiol(GB-2a), GB-1a, fukugetina. Através dos ensaios de viabilidade celular MTT e vermelho neutro foram determinados que as concentrações de 300 e 1000  $\mu\text{g/mL}$  diminuíram a viabilidade das células B16F10. Por meio de ensaios de conteúdo de melanina foram estudadas as taxas de inibição com o tratamento do EHGG comparando com o ácido kójico 500  $\mu\text{M}$ : por melanogênese espontânea foi obtido uma inibição nas concentrações de 3, 10, 30, 100  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente,  $27,92 \pm 3,46\%$ ,  $26,63 \pm 3,92\%$ ,  $32,41 \pm 4,05\%$ ,  $34,13 \pm 10,99\%$ ; por melanogênese induzida por UVB foi conseguido nas concentrações de extrato utilizadas 10, 30 e 100  $\mu\text{g/mL}$  uma diminuição significativa, com uma inibição de  $23,84 \pm 4,03\%$ ,  $23,27 \pm 3,68\%$  e  $21,16 \pm 1,71\%$ , respectivamente; por melanogênese induzida por  $\alpha$  – MSH as concentrações de 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$  produziram uma inibição de  $27,47 \pm 1,61\%$ ,  $18,48 \pm 3,51\%$ ,  $54,31 \pm 2,50\%$ ,  $65,75 \pm 4,67\%$ ,  $60,55 \pm 3,50\%$ , respectivamente e, em todos os ensaios de conteúdo de melanina com o EHGG não houve redução da viabilidade celular e o EHGG se mostrou como inibidor da melanogênese. No ensaio da tirosinase celular, a enzima teve sua atividade diminuída em aproximadamente 19% nas concentrações de 10, 3, 1, 0,3, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. No ensaio com a tirosinase purificada observou-se uma inibição de:  $34,34 \pm 2,51\%$ ,  $32,13 \pm 4,15\%$ ,  $11,15 \pm 2,11\%$ ,  $18,07 \pm 1,81\%$ ,  $22,89 \pm 1,59\%$ ,  $19,28 \pm 1,20\%$ ,  $18,27 \pm 3,72\%$  nas concentrações de 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, portanto sua atividade inibitória está relacionada com a enzima tirosinase. Quando o biflavonóide GB – 2a foi submetido ao ensaio de conteúdo de melanina por melanogênese espontânea, as concentrações de: 0,1, 1, 10, 100 nM, induziram inibições de  $44,35 \pm 5,2\%$ ,  $48,97 \pm 5,47\%$ ,  $52,93 \pm 1,77\%$ ,  $58,60 \pm 3,91\%$ , respectivamente, sem diminuição da viabilidade das células B16F10 e no ensaio da tirosinase purificada nas concentrações de 1, 10, 100 nM foram demonstradas inibições de:  $26,82 \pm 0,81\%$ ,  $29,93 \pm 0,65\%$ ,  $26,62 \pm 0,55\%$ , respectivamente. A fim de verificar a natureza de inibição enzimática sobre a tirosinase, foi realizada a cinética enzimática do composto isolado GB – 2a com os substratos L – tirosina e L – DOPA, que inibe a atividade da tirosinase exercendo uma inibição mista, que para o substrato L – tirosina é tipo não competitiva e para L – DOPA é tipo incompetitiva. Com esta pesquisa, foi possível determinar a atividade inibitória do extrato da planta e do biflavonóide GB – 2a, consequentemente menor biossíntese de melanina, portanto com grande potencial de uso em tratamentos dermatológicos e cosméticos de manchas hipercrômicas da pele.

**Palavras chave:** melanina. hiperpigmentação da pele. tirosinase. *Garcinia gardneriana*. inibição da melanogênese.

## ABSTRACT

Melanin is a pigment present in the skin with function of protecting against exposure to ultraviolet radiation, temperature control and production of adaptive coloration. When human skin is exposed to ultraviolet radiation, inappropriate cosmetics, medicines, hormonal changes can have an uneven accumulation of melanin, resulting in patches of hyperpigmentation. The aim of this study was to test the activity on melanogenesis of hydroalcoholic extract from the leaves of *Garcinia gardneriana* (EHGG) in B16F10 murine melanoma cell line, as the plant *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi has phytochemistry profile of xanthenes, triterpenes lupeol and betulin, steroid  $\beta$ -sitosterol, biflavonoids volkensiflavona, 13-naringenin-II8-eriodictyol (GB-2a), GB-1a, fukugetina. Through the testing of cell viability: MTT and neutral red was determined that concentrations of 300 and 1000  $\mu\text{g} / \text{mL}$  decreased the cell viability of B16F10 cells. Through testing of melanin content were studied rates of inhibition after the treatment of EHGG compared with kojic acid 500  $\mu\text{M}$ : by spontaneous melanogenesis was obtained inhibition at concentrations of 3, 10, 30, 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , respectively,  $27.92 \pm 3.46\%$ ,  $26.63 \pm 3.92\%$ ,  $32.41 \pm 4.05\%$ ,  $34.13 \pm 10.99\%$ ; the melanogenesis induced by UVB radiation was achieved at concentrations of extract used 10, 30 and 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  significantly reduction, with an inhibition of  $23.84 \pm 4.03\%$ ,  $23.27 \pm 3.68\%$  and  $21.16 \pm 1.71\%$ , respectively; for melanogenesis induced by  $\alpha$  - MSH concentrations of 1, 3, 10, 30, 100  $\mu\text{g} / \text{mL}$  induced an inhibition of  $60.55 \pm 3.50\%$ ,  $65.75 \pm 4.67\%$ ,  $54.31 \pm 2.50\%$ ,  $18.48 \pm 3.51\%$ ,  $27.41 \pm 1.61\%$ , respectively, in all trials of melanin content no reduction cell viability and EHGG proved to inhibit melanogenesis. In the tyrosinase cellular assay, the enzyme reduced its activity about 19% at concentrations of 0.1, 0.3, 1, 3, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively. In the purified tyrosinase assay was observed an occurrence of inhibition:  $18.27 \pm 3.72\%$ ,  $19.28 \pm 1.20\%$ ,  $22.89 \pm 1.59\%$ ,  $18.07 \pm 1.81\%$ ,  $11.15 \pm 2.11\%$ ,  $32.13 \pm 4.15\%$ ,  $34.34 \pm 2.51\%$  at concentrations of 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively, so their activity inhibition is related to the tyrosinase enzyme. When the GB-2a biflavonoid was tested on melanin content by spontaneous melanogenesis, the concentrations of 0.1, 1, 10, 100 nM, induced inhibition of  $44.35 \pm 5.2\%$ ,  $48.97 \pm 5.47\%$ ,  $52.93 \pm 1.77\%$ ,  $58.60 \pm 3.91\%$ , respectively, without reduction of cell viability and purified tyrosinase assay at concentrations of 1, 10, 100 nM were demonstrated inhibitions:  $26.82 \pm 0.81\%$ ,  $29.93 \pm 0.65\%$ ,  $26.62 \pm 0.55\%$ , respectively. In order to ascertain the nature of enzyme inhibition on tyrosinase, it performed kinetics analysis of the GB – 2a with L - tyrosine and L – DOPA substrates, which inhibits tyrosinase activity exerting a mixed inhibition, which for the L – tyrosine substrate is a non-competitive type and L - DOPA is uncompetitive type. With this research, we determined the inhibitory activity of plant extract and GB – 2a biflavonoid, hence less melanin biosynthesis therefore with great potential for use in dermatologic and cosmetic skin hyperchromic spots.

**Key words:** melanin. skin hyperpigmentation. tyrosinase. *Garcinia gardneriana*. melanogenesis inhibition.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES .....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS .....</b>	<b>10</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>12</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS .....</b>	<b>13</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
3.1 PELE.....	21
3.2 MELANOGÊNESE.....	23
3.2.1 Melanócitos e Melanina.....	23
3.3 HIPERPIGMENTAÇÃO CUTÂNEA .....	30
3.4 SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MELANOGÊNESE.....	33
3.5 O GÊNERO <i>Garcinia</i> .....	36
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
4.1 MATERIAL.....	42
4.1.1 Linhagem celular B16F10 .....	42
4.2 MÉTODOS.....	42
4.2.1 Coleta, Extração e Preparo do Material Vegetal .....	42
4.2.2 Isolamento e purificação de composto .....	43
4.2.3 Cultura de células melanoma murino B16F10 .....	44
4.2.4 Viabilidade celular .....	44
4.2.4.1 Azul de Tripan.....	44
4.2.4.2 Ensaio MTT .....	45
4.2.4.3 Ensaio vermelho neutro.....	45
4.2.5 Ensaio de inibição <i>in vitro</i> .....	46
4.2.5.1 Conteúdo de melanina por melanogênese espontânea.....	47
4.2.5.2 Conteúdo de melanina induzido por radiação ultravioleta .....	47
4.2.5.3 Conteúdo de melanina induzido por $\alpha$ - MSH .....	48
4.2.6 Ensaio da atividade da tirosinase celular .....	48

4.2.7 Teste padronizado de reguladores de pigmentação .....	49
4.2.8 Cinética enzimática .....	50
4.2.9 Análise Estatística .....	51
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
5.1 VIABILIDADE CELULAR .....	53
5.1.1 MTT.....	53
5.1.2 Vermelho neutro.....	54
5.2 AVALIAÇÕES DO CONTEÚDO DE MELANINA COM O EXTRATO DA <i>Garcinia gardneriana</i> .....	57
5.2.1 Melanogênese espontânea e viabilidade celular.....	57
5.2.2 Melanogênese induzida por radiação ultravioleta e viabilidade celular .....	59
5.2.3 Melanogênese induzida por $\alpha$ -MSH e viabilidade celular.....	61
5.3 ENSAIO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR COM O EXTRATO DA <i>Garcinia gardneriana</i> .....	63
5.4 MEDIDA DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A TIROSINASE PURIFICADA <i>IN VITRO</i> COM O EXTRATO DA <i>Garcinia gardneriana</i> .....	64
5.5 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE MELANINA POR MELANOGÊNESE ESPONTÂNEA DO COMPOSTO ISOLADO GB-2a E VIABILIDADE CELULAR ..	65
5.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA DA TIROSINASE PURIFICADA FRENTE AO COMPOSTO GB-2a .....	68
5.7.1 L-Tirosina .....	68
5.7.2 L-DOPA.....	71
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>75</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>90</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>92</b>



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Esquema Pele Humana .....	21
FIGURA 2: Diagrama esquemático de uma porção do melanócito e dendrito com melanossomos em estágios I, II, III, IV e outras organelas relevantes.....	25
FIGURA 3: Melanogênese .....	28
FIGURA 4: Desordens de pigmentação – melasmas (A), efélides (B), melanoses solares (C), lentigens senis (D) .....	31
FIGURA 5: Estrutura molecular do ácido kójico .....	34
FIGURA 6: Árvore <i>Garcinia gardneriana</i> .....	38
FIGURA 7: Partes aéreas da <i>Garcinia gardneriana</i> Pl. & Tr. Folhas e fruto (A); foco da semente (B); foco do fruto mostrando a polpa (C). .....	39
FIGURA 8: Biflavonóides da <i>Garcinia</i> . Estrutura química dos biflavonóides volkensiflavona, fukugetina, GB-2a e GB-1a.....	43
FIGURA 9: Estruturas químicas L – tirosina (A) e L – DOPA (B) .....	50

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método MTT após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento com EHGG, veículo 0,5% etanol, ácido kójico.....	54
GRÁFICO 2 – Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método vermelho neutro após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento com EHGG, veículo 0,5% etanol, ácido kójico.....	56
GRÁFICO 3 – Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese espontânea das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 48 horas de tratamento (B).....	58
GRÁFICO 4 - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese induzida por radiação UVB das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 24 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 24 horas de tratamento (B).....	60
GRÁFICO 5 - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese induzida por $\alpha$ -MSH das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 48 horas de tratamento (B).....	62
GRÁFICO 6 – Atividade da tirosinase celular de murino após tratamento de 48 horas com o EHGG, veículo (0,15% etanol), ácido kójico.....	63
GRÁFICO 7 – Atividade da tirosinase purificada após tratamento com o EHGG e ácido kójico por 40 minutos.....	64
GRÁFICO 8 - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese espontânea das células tratadas com o GB-2a e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) das células após 48 horas de tratamento (B).....	66
GRÁFICO 9 - Atividade da tirosinase purificada após tratamento com o GB-2a e ácido kójico por 40 minutos.....	67
GRÁFICO 10 - Velocidade de formação de dopaquinona em função da crescente concentração de L – tirosina com grupos: controle e GB-2a em diversas concentrações.....	70
GRÁFICO 11 – Lineweaver – Burk para inibição do GB-2a sobre a tirosinase purificada com substrato L – tirosina (A). Formação de dopaquinona com L – tirosina 1mM com tempo variável (B).....	71

GRÁFICO 12 – Velocidade de formação de dopaquinona em função da crescente concentração de L – DOPA com grupos: controle e GB-2a em diversas concentrações (A). Lineweaver – Burk para inibição do GB-2a sobre a tirosinase purificada com substrato L – DOPA (B) .....73

## **LISTA DE TABELAS**

TABELA 1 – Parâmetros cinéticos para o substrato L - tirosina.....	70
TABELA 2 – Parâmetros cinéticos para o substrato L-DOPA .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABIPHEPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ACTH – hormônio adrenocorticotrópico

AMPc – 3', 5' - Adenosina monofosfato cíclico

ATP – adenosina trifosfato

B16F10 – linhagem celular de melanoma murino

c – kit – receptor para citoquina

DCT – dopacromo tautomerase

DHI – 5-6-dihidroxiindol

DHICA – 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (meio Eagle modificado por Dulbecco)

DNA – ácido desoxirribonucléico

EDTA – ácido etilenodiaminotetracético

EHGG – extrato hidroalcoólico das folhas de *Garcinia gardneriana*

FURB - Fundação Universidade Regional de Blumenau

GB-2a – I3-naringenin-II8-eriodictiol

GB-1a – I3-II8-binarigenin

GB-2a-II-4'-ome – I3-narigenina-II8-4'-Ome-eriodictiol

IV – infra vermelho

Km – constante de Michaelis - Menten

L – DOPA – L – 3,4 – dihidroxifenilalanina

Mitf – fator de transcrição associado a microftalmia

MATP – proteína transportadora associada a membrana

MC1R – receptor de melanocortina – 1

MTT – brometo de 3 – (4,5 – dimetiltiazol – 2 – il) – 2,5 – difeniltetrazolium

PAR-2 – antagonista de receptor ativador de protease – 2

pH – potencial hidrogeniônico

PKA – proteína quinase A

Pmel 17 – glicoproteína melanócito – específica

POMC – peptídio proópiomelanocortina

p53 – proteína 53

RMN  $^{13}\text{C}$  – ressonância magnética nuclear do carbono 13

RMN  $^1\text{H}$  – ressonância magnética nuclear de hidrogênio

RNA<sub>m</sub> – ácido ribonucleico mensageiro

SFB – soro fetal bovino

TRP-1 – proteína relacionada à tirosinase – 1

TRP-2 – proteína relacionada à tirosinase – 2

TRPs – proteínas relacionadas à tirosinase

TYR – tirosinase

UV – radiação ultravioleta

UVA – radiação ultravioleta tipo A

UVB – radiação ultravioleta tipo B

UVC – radiação ultravioleta tipo C

V<sub>máx</sub> – velocidade máxima

$\alpha$  – MSH – alfa – hormônio estimulante de melanócito

$\beta$  – MSH – beta – hormônio estimulante de melanócito

$\gamma$  - MSH – gama – hormônio estimulante de melanócito



## 1 INTRODUÇÃO

A flora brasileira encerra uma rica biodiversidade, destacando-se como um país com grande potencial exploratório para originar moléculas biologicamente ativas a partir de plantas. O Brasil possui a maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e ainda cerca de dois terços das espécies de plantas do planeta se concentra nos trópicos, somente o Brasil abriga 60.000 espécies, cerca de 20% de toda a flora mundial (GARCIA, 1995; PINTO *et al.*, 2002).

Com todo esse arsenal natural e o aprofundamento das pesquisas na área de plantas medicinais, os pesquisadores brasileiros têm realizado inúmeros trabalhos com o objetivo de embasar cientificamente, a utilização de plantas como recurso terapêutico dividindo-se nas áreas de botânica, agronomia, química, farmacologia, toxicologia e tecnologia farmacêutica. Esses esforços avaliam as potencialidades da nossa flora (SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

A descoberta de novas substâncias com atividade biológica pode levar ao desenvolvimento de novas tecnologias nacionais destinadas à área clínica de tratamentos dermatológicos e também à comercialização de produtos cosméticos destinados à venda para a população.

O mercado e a indústria de produtos cosméticos têm crescido consideravelmente nos últimos anos, conforme a Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), entidade que congrega empresas que representam 90% da produção nacional do setor. Segundo a ABIHPEC, o setor apresentou um crescimento médio deflacionado composto de 10,5% nos últimos 14 anos, tendo passado de um faturamento “ex-factory”<sup>1</sup> líquido de imposto sobre vendas, de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 24,9 bilhões em 2009. O setor apresentou, ao longo dos últimos anos, crescimento bem mais vigoroso que o restante da indústria (10,5% de crescimento médio no setor contra 2,9 do PIB Total e 2,3% da Indústria Geral) (ABIHPEC, 2010).

---

<sup>1</sup> Vendas destinadas aos pontos de venda de cosméticos que têm como foco o consumidor final.



É uma característica do setor investir continuamente na evolução qualitativa dos seus produtos para atender as demandas de um consumidor cada vez mais ávido por qualidade e por linhas de produtos cada vez mais completas.

O uso da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi surge como uma alternativa para tratamento despigmentante de manchas hiperocrômicas da pele dentre os diversos ativos farmacêuticos usados para esse fim, como hidroquinona, ácido kójico que produzem resultados insuficientes e efeitos colaterais, pois a planta *Garcinia gardneriana*, possui biflavonóides, compostos que já possuem atividade inibitória sobre a melanogênese estudada em espécies do mesmo gênero, com isso a planta *Garcinia gardneriana* e os biflavonóides revelam um grande potencial para estudo, como promissor inibidor da melanogênese.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência na melanogênese do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* (Pl. & TR.) Zappi e seu composto isolado GB – 2a em linhagem celular de melanoma murino.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade da *Garcinia gardneriana* (Pl. & TR.) Zappi na linhagem celular B16F10.
- Avaliar a capacidade despigmentante do extrato hidroalcoólico da *Garcinia Gardneriana* (Pl. & TR.) Zappi na linhagem celular B16F10.
- Avaliar as concentrações efetivas para a inibição da melanogênese.
- Investigar a participação do composto isolado GB-2a na inibição da melanogênese causada pela *Garcinia gardneriana* (Pl. & TR.) Zappi sobre a linhagem celular B16F10.
- Elucidar o mecanismo de inibição da melanogênese.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PELE

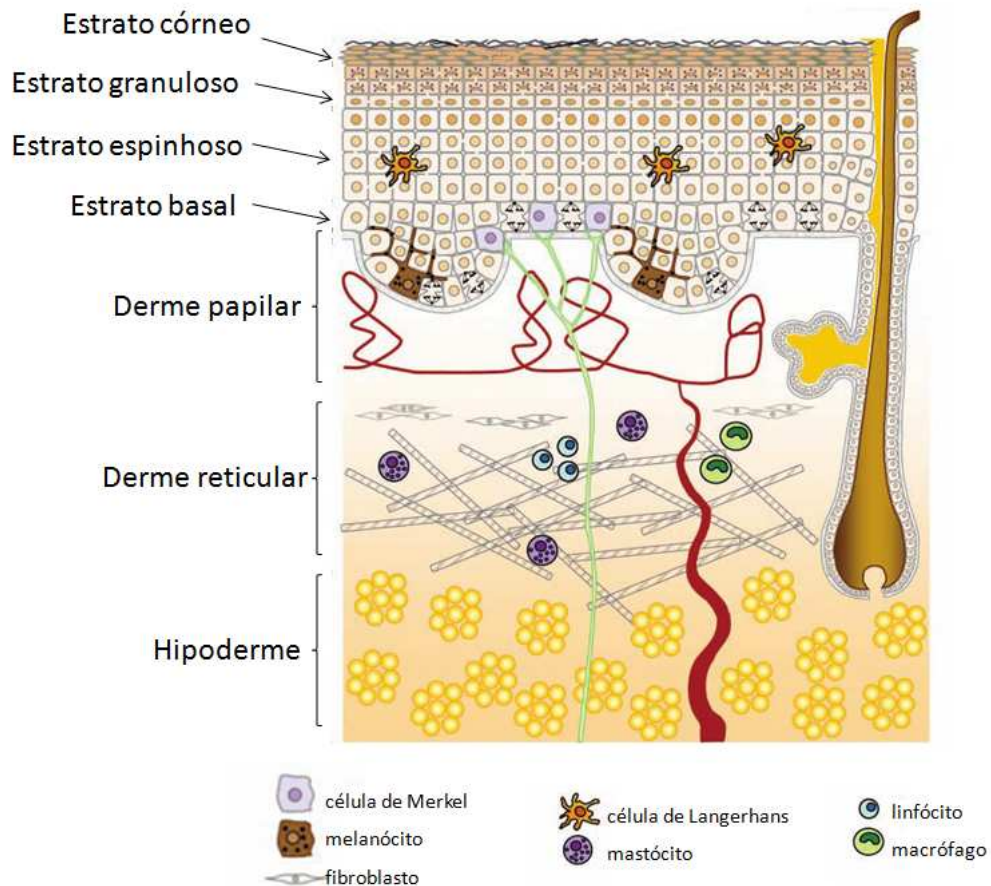


FIGURA 1: Esquema Pele Humana (adaptado WOLK *et al.*, 2010)

A pele (FIGURA 1) é um órgão complexo que protege o organismo do meio ambiente e ao mesmo tempo interage com ele, sendo considerado o maior órgão do corpo humano. A pele é dinâmica e complexa, constitui-se de um arranjo integrado de células e tecidos, que medeiam uma grande variedade de funções, dentre elas: barreira a permeabilidade física e a perda de água, proteção contra agentes infecciosos e radiação ultravioleta, responsável pela termorregulação, percepções sensoriais, cicatrização de feridas e regeneração tecidual, síntese de vitamina D e ainda, pela aparência externa das pessoas. A pele pode ser dividida histologicamente em três camadas principais: epiderme, derme e hipoderme. (SPELLBERG, 2000; CHU, 2008; WOLK, 2010).

A epiderme consiste numa estrutura de diferentes camadas formadas pelos queratinócitos, células epiteliais estratificadas, que sofrem diferenciação à medida que avançam da camada basal para a superfície da pele. Subdividem-se em estrato basal, estrato espinhoso, estrato lúcido (somente em regiões de atrito como palma das mãos e sola dos pés), estrato granuloso e estrato córneo, esse último é composto de numerosas camadas de células queratinizadas, anucleadas e sem organelas, ditos corneócitos. A transição das células do estrato basal até o estrato córneo é um processo dinâmico, novos queratinócitos são formados por meio de mitose das células da camada basal, que leva cerca de 30 dias, quando os queratinócitos perdem a adesão de membranas entre si, eles se descolam do estrato córneo (FORSLIND, 1995; GARTNER e HIATT, 2001; FREEBERG, 2010). O principal tipo celular da epiderme é o queratinócito, mas também estão presentes as células de Merkel (células sensoriais mecanorreceptoras), células do sistema imunológico como de Langerhans e mastócitos e ainda, melanócitos. A epiderme é nutrida pela difusão vinda de capilares sanguíneos da derme (GARTNER e HIATT, 2001; WOLK, 2010).

A derme fornece sustentação para a epiderme estar ancorada. A derme é um compartimento altamente vascularizado, que nutre por difusão a epiderme, que é avascular, e ainda coordena o tráfico de células para epiderme como os leucócitos. A derme tem pouca predominância de células, é formada por tecido conjuntivo denso não modelado, divide-se em duas partes, a derme papilar que fica logo abaixo da lâmina basal da epiderme, com grande quantidade de vasos sanguíneos, substância fundamental amorfa (mucopolissacarídeos), com uma arquitetura de fibrilas como a de colágeno tipo III e elásticas, entrelaçado a esta matriz estão os fibroblastos e leucócitos, capilares superficiais e canais linfáticos. Nessa porção estão numerosas fibras nervosas de axônios que chegam até a derme alcançando superficialmente a lâmina basal. A derme reticular localiza-se abaixo da derme papilar, possui fibras colágenas e elásticas espessas entrelaçadas de forma firme e robusta constituindo uma arquitetura em rede, arteríolas e vênulas que se ramificam, formando os capilares do plexo papilar, numerosos leucócitos encontram-se na derme reticular muitos deles macrófagos teciduais ou mastócitos. A existência de elastina dá a característica de flexibilidade e distensão mecânica da pele.

A hipoderme, que está abaixo da derme, é um tecido subcutâneo de natureza adiposa, cujas células adiposas estão circundadas por tecido conjuntivo frouxo. Nessa porção estão os vasos de maior calibre que se dispõem paralelamente a pele e avançam na direção da derme (FORSLIND, 1995; SPELLBERG, 2000; GARTNER e HIATT, 2001; KESSEL, 2001)

## 3.2 MELANOGENÊSE

### 3.2.1 Melanócitos e Melanina

As células produtoras de melanina são os melanócitos, que derivam da crista neural (melanoblastos) e migram durante a embriogênese para a pele (HEARING, V.J.; TSUKAMOTO, K., 1991), dispondo-se na camada basal da epiderme, sendo que uma associação entre um melanócito com 36 queratinócitos constitui a unidade melano epidérmica (DUVAL *et al.*, 2002). Os melanócitos alcançam sítios específicos, dentre eles: derme, epiderme, folículos pilosos, trato uveal do olho, vestíbulo e saco endolinfático do ouvido, leptomeninges do cérebro. Em humanos, a migração acontece entre a décima e décima segunda semana de desenvolvimento do feto para a derme, e duas semanas mais tarde para a epiderme. Uma vez alcançado seu destino final, eles se diferenciam em melanócitos, os quais por volta do sexto mês da vida fetal se dispõem na junção dermo epidérmica (HAAKE, A.; HOLBROOK, K., 1999). Várias citocinas e fatores de crescimento são aceitos como suporte para diferenciação de melanoblastos para melanócitos e migração dos mesmos. Foi mostrado que o fator de crescimento para mastócitos (c-kit) tem um papel importante na migração de melanoblastos da crista neural para seu destino final e a endotelina-1 está implicada na adesão e diferenciação (REID *et al.*, 1995; PARK *et al.*, 2008).

De acordo com HEARING, V.J. e TSUKAMOTO, K. (1991) os melanócitos sintetizam a melanina dentro de organelas, chamadas melanossomos, os quais podem variar em tamanho, número e densidade, sendo posteriormente transferidos para os queratinócitos e bulbos de cabelo. Os melanócitos são influenciados por uma variedade de fatores extracelulares determinantes para o início da síntese e o tipo de melanina a ser produzido. A síntese e distribuição de melanina na epiderme

envolvem vários passos: transcrição de proteínas necessárias para a melanogênese, biogênese de melanossomos, triagem de proteínas melanogênicas dentro de melanossomos, transporte de melanossomos para as bordas dos dendritos dos melanócitos e transferência de melanossomos para os queratinócitos. (PARK *et al.*, 2008).

Uma vez estabelecidos os melanócitos no seu destino final, eles começam a produzir melanossomos, organelas altamente organizadas de forma elíptica, delimitadas por membrana, os quais sintetizam melanina (FIGURA 2). Melanossomos são divididos em quatro estágios de maturação (I, II, III, IV) determinado pela sua estrutura, quantidade, qualidade e arranjo de melanina produzida (SEIJI *et al.*, 1963; KUSHIMOTO *et al.*, 2001). Melanossomos nascentes estão arranjados na região perinuclear próximo ao complexo de Golgi, recebendo as enzimas e proteínas estruturais requeridas para a melanogênese, os melanossomos estágio I são esféricos sem a atividade da tirosinase (TYR) e nenhum componente estrutural interno. Em melanossomos estágio II já pode ser detectado a tirosinase e a proteína estrutural Pmel17, que determina a transformação do estágio I de melanossomos para organelas fibrilares alongadas, melanossomos estágio II, que já exibem um pequeno depósito de melanina (KUSHIMOTO *et al.*, 2001; BERTSON *et al.*, 2001). Após isso, inicia a síntese de melanina e o pigmento é uniformemente depositado nas fibrilas internas, nesse estágio os melanossomos passam a ser chamados de estágio III. O último estágio de desenvolvimento (IV) é detectado em melanócitos altamente pigmentados, esses melanossomos são em forma elíptica, elétron-denso devido à completa melanização com mínima atividade de tirosinase. Esse desenvolvimento detalhado é característico para eumelanossomos (pigmentos pretos a marrons), contudo para feomelanossomos (pigmentos amarelos e vermelhos) é similar, a única diferença é que não se tornam fibrilares durante a maturação (COSTIN, G.E.; HEARING, V.J., 2007).

Dentro dos melanossomos há três enzimas que são absolutamente necessárias para sintetizar os vários tipos de melanina. Enquanto a tirosinase é responsável pela etapa crítica da melanogênese (passo limitante da biossíntese, hidroxilação da tirosina), proteína relacionada à tirosinase - 1 (TRP-1) e dopacromo tautomerase (DCT) estão mais envolvidas com a modificação da melanina em diferentes tipos. Além dessas, os melanossomos contêm outras proteínas



melanócito-específicas que têm funções estruturais ou estão envolvidas na regulação do pH dentro dos melanossomos, como a proteína P ou a proteína transportadora associada a membrana (MATP) (COSTIN, G.E.; HEARING, V.J., 2007).

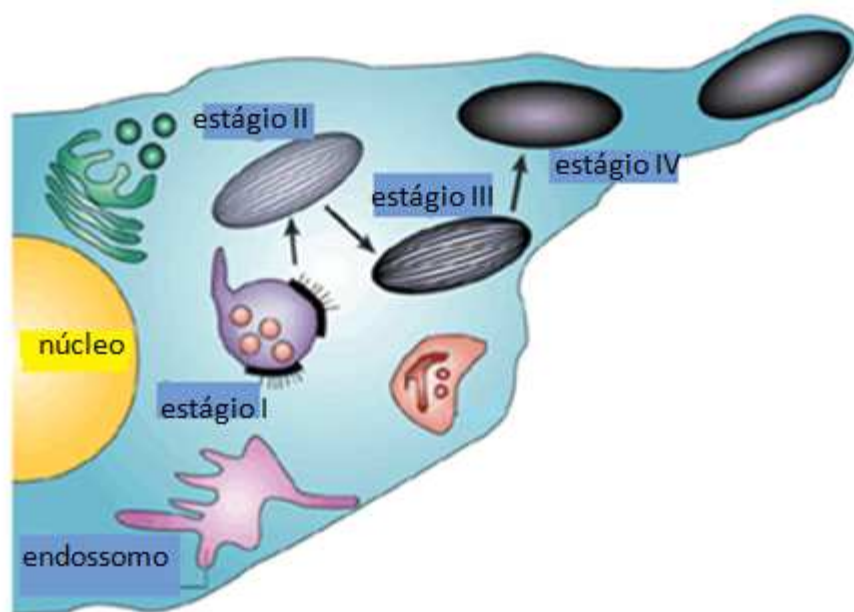


FIGURA 2: Diagrama esquemático de uma porção do melanócito e dendrito com melanossomos em estágios I, II, III, IV e outras organelas relevantes (adaptado de MARKS, M. S.; SEABRA, M. C., 2001)

A melanina está entre o mais disseminado dos pigmentos naturais. Pode ser encontrado praticamente em todos os organismos vivos, como plantas superiores, fungos e bactérias. Apesar da aparente diversidade na natureza de substratos primários, estrutura química e propriedades dos pigmentos resultantes, há uma característica bioquímica unificadora da melanogênese em plantas e animais, o sistema enzimático, comumente chamado de tirosinase, a qual catalisa as principais etapas do processo (PROTA, G., 1980).

A pigmentação da pele, olhos e cabelo depende de uma grande variedade de fatores que influenciam a função de melanócitos em vários níveis. Para a correta pigmentação, um número de passos distintos no desenvolvimento, proliferação e diferenciação devem ocorrer com alta fidelidade, os quais incluem fatores que afetam o desenvolvimento embrionário e migração de melanoblastos, sobrevivência e proliferação dos melanócitos uma vez *in situ*, funcionamento dos melanócitos em resposta aos estímulos do meio ambiente, distribuição dos grânulos e subsequente

processamento pelos queratinócitos vizinhos. Há uma grande quantidade de genes que afetam todos estes níveis acima mencionados, direta ou indiretamente. Muitos desses genes codificam proteínas que estão localizadas nos grânulos de melanina, que possuem papel importante na estruturação e funcionamento dessas organelas, tanto função catalítica na síntese de melanina como função estrutural na integridade dos melanossomos. Muitos desses genes tem sido implicados em diversas desordens de pigmentação herdadas geneticamente (HEARING, V. J., 2006).

O pigmento melanina tem uma vasta gama de importantes funções fisiológicas, como proteção dos tecidos subjacentes expostos à radiação ultravioleta (UV), controle de temperatura e produção de coloração adaptativa na pele (PROTA, G., 1980), seu papel principal na pele humana serve para atenuar a penetração de raios UV em proporções mais profundas, como em vasos sanguíneos da derme (SLOMINSKI, A. *et al.*, 2004).

Já Slominski, A. *et al.* (2004) considera que a ação da radiação UV pode trazer queimaduras solares, danos às glândulas sudoríparas, resultando em supressão da transpiração e termorregulação anormal, além de carcinogênese e inativação de nutrientes pela fotólise (p.ex. folato). Como efeito benéfico, a radiação UV é responsável conversão de 7-deidrocolesterol para pré-vitamina D<sub>3</sub>.

A proteção contra radiação UV feita pela melanina previne danos ao DNA, pela absorção e espalhamento da radiação. Sendo que a radiação UV possui comprimento de onda de 100 a 400 nm, é arbitrariamente dividida em UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) e UVC (100-280 nm), sendo a última barrada pela camada de ozônio. A absorção de energia máxima, pela melanina, é na região UV do espectro eletromagnético, sendo convertida em calor, por isso exerce seu papel de proteção (PARK, H. Y. *et al.*, 2009, NARAYANAN, D. L., 2010).

A radiação UVB é diretamente absorvida pelo DNA celular das células epidérmicas, o que leva à formação de fotoprodutos de DNA, principalmente dímeros de timina e pirimidina, tais dímeros aumentam o nível e a atividade da tirosinase, que por sua vez aumenta a pigmentação. Mais especificamente dinucleotídeos de timidina ativam a proteína 53 (p53), que estimula um incremento de RNAm de tirosinase e do gene promotor do peptídeo proópiomelanocortina (POMC), estabelecendo um sinal contínuo para a melanogênese, gerando uma coloração adaptativa (PARK, H. Y. *et al.*, 2009).

O peptídeo POMC que é sintetizado em várias regiões do cérebro, como hipotálamo, vários tecidos periféricos e órgãos, como trato gastro intestinal, gônadas e pele origina vários peptídeos bioativos representantes da família das melanocortinas, tais como  $\alpha$ -hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH),  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH, e hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (ABDEL-MALEK, Z. *et al.*, 2000). O hormônio  $\alpha$ -MSH se liga ao receptor de melanocortina-1 (MC1R) nos melanócitos resultando num aumento da produção de eumelanina (PARK, H. Y. *et al.*, 2009).

O hormônio  $\alpha$ -MSH age nas células através da elevação da concentração de AMPc resultando num aumento da produção de melanina. A ativação da proteína quinase A (PKA) é devido a esse aumento de AMPc, a proteína quinase A por sua vez aumenta a expressão do fator de transcrição associado a microftalmia (Mitf).

O fator de transcrição microftalmia associado pertence a uma família de fatores de transcrição, é crucial na regulação de proliferação e síntese de melanina em melanócitos e é o maior regulador da tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase (TRPs) como também da proteína estrutural Pmel 17, relacionados a genes ligados a promotores comuns. A ação e estabilidade do Mitf são modulados pela fosforilação da proteína (BERTOLOTTI, C. *et al.*, 1998; BUSCA, R.; BALLOTTI, R., 2000; SOLANO, F. *et al.*, 2006; PARK, H. Y. *et al.*, 2008).

O pigmento melanina é o maior determinante da coloração da pele humana, sintetizado a partir da L – tirosina. É composto por um pigmento que varia de marrom a preto, eumelanina, e outro que contém enxofre que varia de vermelho a amarelo, feomelanina (DUVAL, C. *et al.*, 2002), já Slominski, A. *et al.* (2004) propõe que há vários tipos de melanina, como eumelanina, feomelanina, neuromelanina e uma mistura de pigmentos melânicos, caracterizando-os como polímeros e biopolímeros multifuncionais.

A síntese da melanina (FIGURA 3) pode ser iniciada a partir da hidroxilação da L – fenilalanina para L- tirosina (passo não obrigatório, vigente *in vivo*) ou da L – tirosina para L – 3,4 – dihidroxifenilalanina (L-DOPA) (passo obrigatório *in vitro* e *in vivo*). L- DOPA serve como precursor para ambas as melaninas e catecolaminas, atuando em percursos distintos. A próxima etapa é a oxidação da L – DOPA para dopaquinona, intermediário comum para as vias eumelanogênicas e feomelanogênicas. A eumelanogênese envolve a transformação da dopaquinona a leucodopacromo, seguido de uma série de reações de oxirredução com a produção

dos intermediários 5-6-dihidroxiindol (DHI) e 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico (DHICA), que se submetem à polimerização para formar eumelanina. Feomelanogênese também se inicia com a dopaquinona, a qual é conjugada com cisteína e glutatona para produzir cisteinildopa e glutationildopa para depois se transformar em feomelanina. Mistura de pigmentos melânicos contém eumelanina e feomelanina. Paralelamente, a geração de catecolaminas a partir de L – DOPA requer descarboxilação, hidroxilação e metilação enzimática para produzir dopamina, norepinefrina e epinefrina, respectivamente (SLOMINSKI, A. *et al.*, 2004).

Para a primeira etapa, a hidroxilação da tirosina para L-DOPA é necessário a ação de um sistema de bomba de prótons que gera um ambiente ácido no interior dos melanossomos para a atividade da tirosinase, depois da L-DOPA formada, para a eficiência da formação da melanina, é preciso uma modificação do pH para neutro a básico para manter a estabilidade da L-DOPA (ANCANS, J. *et al.*, 2001; FULLER, B. B. *et al.*, 2001).

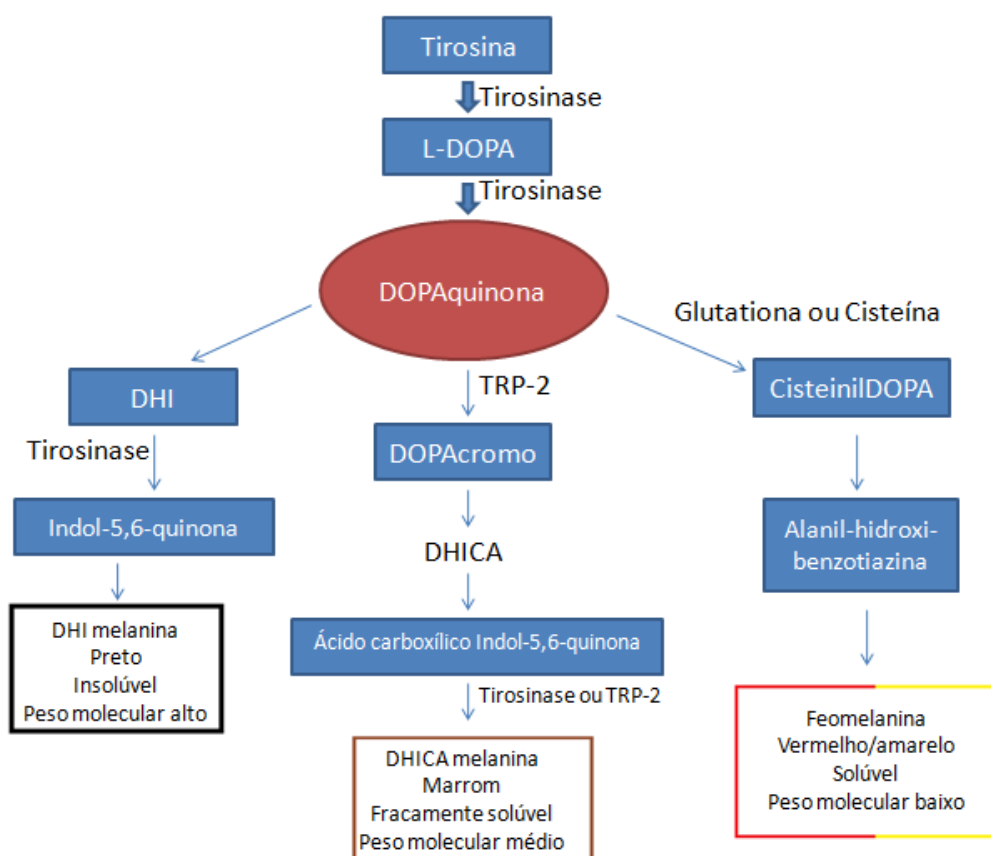


FIGURA 3: Melanogênese (adaptado PARK, H. Y. *et al.*, 2008)

Eumelanina e feomelanina estão firmemente associadas a proteínas, porém exibem diferenças nas propriedades químicas e físicas na proteção contra a radiação UV. Eumelanina é considerada um polímero fotoestável, fotoprotetor, insolúvel na maioria dos solventes, ao contrário a feomelanina é solúvel em álcalis, fotolábil, fotosensibilizadora, por produzir radicais superóxido e hidroxila e peróxido de hidrogênio após radiação solar (DUVAL, C. *et al.*, 2002; SLOMINSKI, A. *et al.*, 2004).

Os hormônios sexuais estrogênio e progesterona têm sido relatados por interagir com melanócitos, embora o mecanismo e diferenciação não tenham sido esclarecidos. Uma série de estudos estabeleceram que os melanócitos expressam receptores para esses hormônios, mas não se sabe se esses hormônios têm seus principais efeitos sobre o crescimento de melanócitos, de ativação da via melanogênica, e/ou ligação específica à melaninas diretamente. Acredita-se que o aumento da pigmentação frequentemente observada na gravidez é um efeito fenotípico da produção de estrogênio (HEARING, V.J., 2006).

Variações ambientais de temperatura podem influenciar a biologia da pele humana, consequentemente queratinócitos epidérmicos expostos ao calor, frio ou stress oxidativo, resultam na indução de inflamação cutânea, por exemplo, o aquecimento leva a formação de interleucinas 1 – alfa, prostaglandinas E<sub>2</sub> (ALLAPPATT, C. *et al.*, 2000).

KIM, D. S. *et al.*, (2003) através de estudos realizados em cultura de células Mel-Ab, cultura de melanócitos humanos e em ensaios de atividade da tirosinase *in vitro* submetidos a variações de temperatura de incubação por períodos determinados de tempo, demonstrou que mudanças ambientais como a variação de temperatura influencia a morfologia de melanócitos, grau de atividade enzimática da tirosinase e síntese de melanina; em temperaturas de 27 a 31 °C a atividade enzimática é reduzida de maneira temperatura-dependente e, portanto diminui a síntese de melanina.

A enzima chave da regulação da melanogênese, tirosinase (EC 1.14.18.1), é codificada pelo *locus* TYR que está no cromossomo 11(11q14-21) em humanos, possui uma estrutura proteica altamente conservada entre as diferentes espécies e também homologia para outras proteínas relacionadas à tirosinase (TRP-1, TRP-2). A tirosinase é sintetizada no retículo endoplasmático como uma proteína precursora

de cadeia nascente, é processada no complexo de Golgi onde açúcares neutros e ácido siálico são adicionados ao peptídeo via N- e O- ligações glicosídicas através de glicosilação. A glicosilação é importante para fazer a associação da molécula no melanossomo como também para a sua atividade. Após a glicosilação, a tirosinase madura é dobrada no retículo endoplasmático, etapa requerida para o tráfego e triagem da tirosinase dentro do complexo de Golgi, em última instância nos endossomos e finalmente melanossomos. Dentro dos melanossomos a tirosinase se dispõe na membrana tendo três domínios: melanossomal interno, melanossomal transmembrana e citoplasmático, o domínio interno contém o sítio de atividade catalítica da enzima e o local de ligação dos íons cobre, o domínio citoplasmático participa do tráfego celular da tirosinase dentro dos melanossomos e também na regulação da atividade enzimática através da fosforilação de resíduos de serina. (SLOMINSKI, A. *et al.*, 2004; PARK, H. Y. *et al.*, 2008).

Muitos compostos químicos têm demonstrado efeitos inibitórios sobre a melanogênese através da inibição da atividade enzimática da tirosinase, mas efeitos relacionados com a expressão gênica, degradação protéica, glicosilação, transferência de melanossomos e regulação de sinais celulares também foram reportados no controle da melanogênese (SOLANO, F. *et al.*, 2006).

### 3.3 HIPERPIGMENTAÇÃO CUTÂNEA

Há uma grande diversidade de cores existentes para a pele humana, que variam desde a cor pálida de pessoas de origem européia até a cor escura de peles de pessoas que moram no continente africano. Dentro dessa ordem de colorações de pele, há desordens do sistema pigmentar, o que resulta em problemas de hiperpigmentação e hipopigmentação, independente da natureza do problema, a aspiração geral é pela uniformidade da cor da pele (ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., 2008).

A hiperpigmentação da pele é a queixa mais comum entre pacientes que consultam um dermatologista, em busca de restabelecer uma cor homogênea da pele. Os tipos de manchas hipercrômicas são: melasmas (FIGURA 4A), efélides (FIGURA 4B), cloasmas, melanoses solares (FIGURA 4C), lentigens senis (FIGURA 4D), melanose de Riehl, poliquilodermia de Civatte, melanodermatite por



fotosensibilização, melanodermia residual, hiperpigmentação periorbital, hiperpigmentação pós-inflamatória (PANDYA, A.G.; GUEVARA, I.L., 2000; NICOLETTI, M. A. *et al.*, 2002)

Segundo Nicoletti, M. A. *et al.* (2002), a hiperpigmentação da pele, resultante de acúmulo anormal de melanina, é devida a vários fatores, como envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais e exposição ao sol em diferentes graus. Estudos foram conduzidos sobre diversas manifestações crônicas que afetam o aspecto pessoal e a satisfação estética. Muitos deles provam que as radiações de luz solar são as principais responsáveis pela maioria destas anomalias, seguidas pelos hormônios e/ou fatores externos.

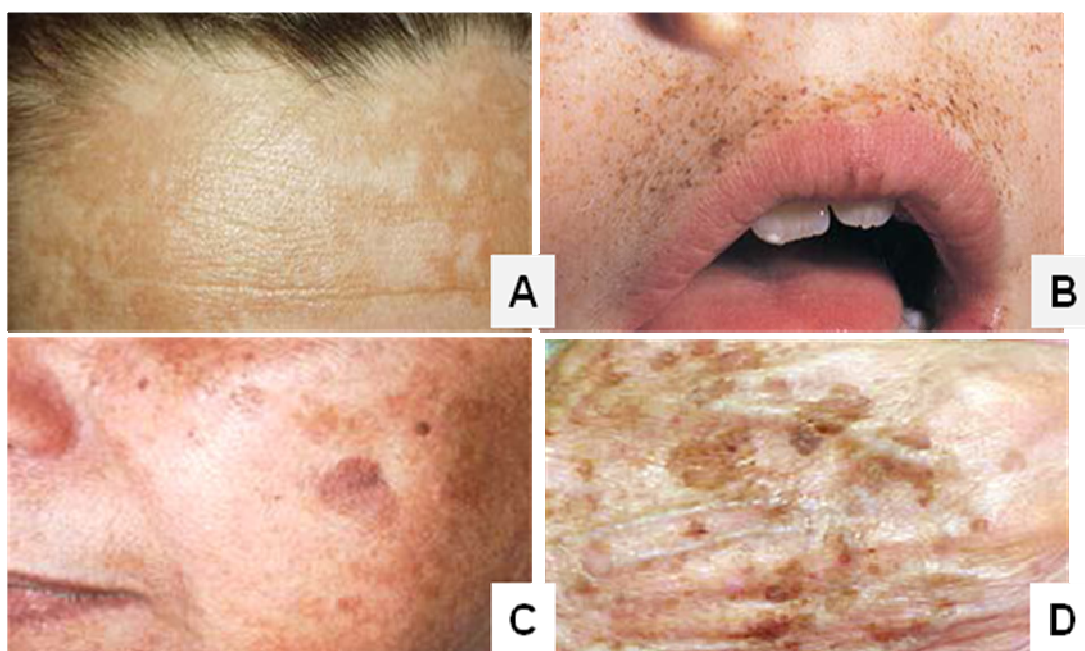


FIGURA 4: Desordens de pigmentação – melasmas (A), efélides (B), melanoses solares (C), lentigens senis (D) (adaptado de LAPEERE, H. *et al.*, 1999; DERMATOLOGIA, 2010)

A hiperpigmentação pós-inflamatória, mais recorrente em pessoas de pele escura, é resultante de uma inflamação que pode ter sido causada por lesão de acne, pêlos encravados, coceiras, picadas de inseto, porém a causa mais comum é a resposta inflamatória pós exposição solar (radiação ultravioleta), evento inflamatório agudo que através de vários mecanismos, dentre eles a estimulação direta de melanócitos por mediadores inflamatórios como a interleucina-1- $\alpha$ , endotelina-1, fator de crescimento de células tronco e espécies reativas de oxigênio,

como ânion superóxido e óxido nítrico, gerados pelo dano na pele. Além disso, dano de células epidérmicas pode liberar indutores endócrinos de pigmentação, como o hormônio  $\alpha$ -MSH. Todos esses fatores geram hiperpigmentação. A melanina produzida durante o evento inflamatório pode entrar na derme, gerando internalização pelos macrófagos desse excesso de pigmentação, sendo assim os macrófagos ficam represados na derme por longos períodos (ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., 2008).

As lentigens se caracterizam por pontos hiperpigmentados, que ocorrem nas regiões do corpo expostas ao sol (particularmente mãos, braços e face), portanto surgem devido à exposição crônica da pele à radiação ultravioleta. Sua aparência escurecida se deve em parte pela internalização da melanina depositada na derme pelos macrófagos e pela modificação na expressão genética de queratinócitos e melanócitos que compõem a região das lentigens quando comparado com as células da vizinhança que não fazem parte dos pontos escurecidos. Nessas regiões escurecidas há um aumento nos níveis de RNAm que codificam para as proteínas participantes na melanogênese, endotelinas e fator de crescimento de células tronco (ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., 2008).

Melasma são hiperpigmentações que ainda não estão bem elucidadas, ocorrem tipicamente de forma simétrica na face, principalmente em mulheres de pele escura que estão na puberdade ou em idade mais avançada. A exposição solar é provavelmente um fator de desenvolvimento de melasma como também a progesterona na gravidez ou o uso de contraceptivos orais. Nos melasmas há um acúmulo de melanina na epiderme e derme e discreto aumento de melanócitos, a anormalidade parece estar ligada a um aumento da expressão do hormônio  $\alpha$ -MSH em queratinócitos e super expressão de fator de crescimento de células tronco em fibroblastos e melanócitos. Pode se dizer que há componente genético em indivíduos predispostos (ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., 2008).

O espaço entre estudos *in vivo* e *in vitro* sugere que novas estratégias são necessárias para validar a eficácia e a segurança. Tratamentos para clareamento da hiperpigmentação devem ter associados dois ou mais agentes de diferentes mecanismos para produzir um efeito sinérgico. Além da inibição da tirosinase, outros parâmetros relacionados com a citotoxicidade, solubilidade, absorção cutânea,



penetração e estabilidade dos agentes de tratamento devem ser considerados (SOLANO, F. *et al.*, 2006).

### 3.4 SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE INIBITÓRIA DA MELANOGÊNESE

A regulação da pigmentação da pele tem sido objeto de estudo por um longo tempo para aplicações cosméticas e farmacêuticas. Muitos cosméticos e medicamentos clareadores como hidroquinona, ácido kójico e seus derivados usados para clareamento têm produzido resultados insuficientes e efeitos colaterais. Arbutin, derivado da hidroquinona, largamente utilizado como agente clareador, diminui a atividade da tirosinase celular em cultura de melanócitos, células de melanoma em concentrações não citotóxicas, o que não afeta níveis de expressão de RNAm da tirosinase (MAEDA, K; FUKUDA, M., 1996; NAKAJIMA *et al.*, 1998).

Em função de desenvolver terapias ou profilaxias para tratar ou prevenir desordens de hiperpigmentação a inibição da atividade da tirosinase tem sido geralmente o alvo. Há muitas formas de realizar essa diminuição, como mecanismos competitivos ou não-competitivos que interferem na atividade catalítica da tirosinase, por exemplo, interrupção da maturação ou diminuição da estabilidade da tirosinase, os quais reduziram a síntese e deposição de melanina (ANDO, H. *et al.*, 2007). Ainda a ação dos despigmentantes pode ser decorrente de outros mecanismos como: supressão da síntese ou maturação da tirosina, inibição da síntese de tirosinase, inibição direta da tirosinase via quelação de oligoelementos, toxicidade seletiva aos melanócitos, esfoliação, adsorção da melanina pré formada, reação de redução e estimulação da melanina dos queratinócitos (MAEDA, K.; FUKUDA, M., 1991; SILVA, E. C., 1998; ZUIDHOFF, H.W.; RIJSBERGEN, J.M. van, 2001).

O ácido kójico (FIGURA 5) é um inibidor da biossíntese de melanina por bloqueio da enzima tirosinase na síntese de 3,4 – diroxifenilalanina (NAKAGAWA, M. *et al.*, 1995). Segundo Draelos, D. Z. (2007, p. 311) o ácido kójico, um dos agentes clareadores de pele mais usados, quimicamente conhecido como 5-hidroximetil-4H-pirano-4-one, é um derivado fúngico hidrofílico obtido de espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*, popularmente empregado no Oriente para o tratamento de

melasma. Sua atividade está na habilidade de bloquear a atividade da tirosinase por se ligar ao cobre.

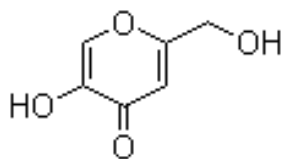


FIGURA 5: Estrutura molecular do ácido kójico

Fonte: CHEMBLINK, 2010.

As flores da planta *Arnica montana* L. (*Compositae*) são tradicionalmente usadas pelo seu efeito antiinflamatório em pomadas. Foi identificado nas flores da planta um triterpeno  $3\beta$ ,  $16\beta$ -diidroxido- $21\alpha$ -hidroperoxido- $20(30)$ -taraxasteno que faz inibição da biossíntese da melanina. O efeito de inibição da melanina do composto foi considerado como um potente inibidor isolado de plantas (MAEDA, K. *et al.*, 2007).

Da planta *Dianella ensifolia* (*Liliacea*) usada tradicionalmente na medicina chinesa para aplicações tópicas foi isolado o composto 1-(2,4-diidroxifenil)-3-(2,4-dimetoxi-3-metilfenil)-propano (UP 302) que inibiu a tirosinase, com uma potência de 22 vezes maior que o ácido kójico, parecendo possuir uma maior margem de segurança (NESTEROV, A. *et al.*, 2008).

*Polygonum hydropiper* L., planta nativa do Japão e China, está distribuída dos trópicos a zonas temperadas no Hemisfério Norte, popularmente chamado benidade, é usada como tempero e na medicina popular contra o câncer e distúrbios hemorrágicos. Essa planta possui uma fração volátil (sesquiterpenos) com ação repelente de insetos e antimicrobiana e flavonóides antioxidantes com atividade inibitória da tirosinase. O composto (2*R*,3*R*)-(+)-taxifolin isolado do broto da planta inibe a atividade da tirosinase em aproximadamente 75% comparado à atividade total da enzima frente ao substrato na ausência de qualquer inibidor (MIYAZAWA, M.; TAMURA, N., 2007).

Há vários processos para impedir a melanogênese, como inibição da estimulação melanocitária (antioxidantes, agentes anti-inflamatórios), antagonismo de receptores do hormônio  $\alpha$ -MSH, inibição de enzimas da síntese de melanina (tirosinase, proteína relacionada a tirosinase-1, proteína relacionada a tirosinase-2), inibição do transporte de melanossomos dentro dos melanócitos e transferência para

os queratinócitos (antagonista do receptor ativador de protease-2 – PAR-2 ) e ativação da degradação da melanina dentro dos queratinócitos.

O alvo clássico é a inibição da tirosinase, substâncias como a hidroquinona, ácido kójico, arbutin, ácido ascórbico, compostos com sulfidril são efetivos na interferência da atividade da tirosinase, apesar de agirem em outras partes da melanogênese, como por exemplo, compostos com sulfidril também eficientes antioxidantes (ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., 2008; CHANG, T. S., 2009).

O ácido ascórbico é um agente redutor que faz a conversão da dopaquinona a L-DOPA, impedindo a formação de dopacromo e consequentemente melanina. Inativadores não específicos como ácidos e bases que desnaturam a enzima, portanto inibem sua atividade. Inativadores específicos da tirosinase, chamados também de substratos suicidas, ligam-se de forma covalente na tirosinase, realizando uma inativação irreversível durante a reação catalítica. Porém, a maioria dos compostos liga-se de maneira reversível, reduzindo a capacidade catalítica (CHANG, T. S., 2009).

Os polifenóis representam um grupo diversificado de compostos, dentre eles os flavonóides, estão entre os mais numerosos e estudados, que são derivados de benzo-gama-pirona consistindo em anéis pireno e fenólico, podendo ser subdivididos em flavonas, flavonóis, flavononas, flavanóis, isoflavonóis, chalconas e catequinas. Compostos amplamente distribuídos nas plantas, que fazem proteção contra a radiação UV, patógenos e herbívoros. A estrutura dos flavonóides é compatível com o papel de substrato e inibidor competitivo da tirosinase. (CHANG, T. S., 2009) Glabridina foi o primeiro inibidor confirmado, 15 vezes mais ativo que o ácido kójico e exibiu alta atividade despigmentante comparado ao arbutin (YOKOTA *et al.*, 1998).

A hidroquinona, composto hidroxifenólico, inibe a conversão de L-DOPA pela inibição da tirosinase, interfere na formação dos melanossomos, inibe a síntese de RNAm em melanócitos. Sua semelhança química com precursores de melanina (tirosina e 3,4 - dihidroxifenilalanina) explica sua metabolização nos melanócitos, por isso, alguns pesquisadores afirmam que ela pode causar hipopigmentação permanente, principalmente em peles escuras (FISHER, A.A., 1982). Recentemente foi testado a biossegurança da hidroquinona como despigmentante em cultura de Melan-a melanócitos na presença e ausência da radiação ultravioleta A induzindo

estresse oxidativo, mostrando que com doses não tóxicas da radiação ultravioleta aumentou a citotoxicidade da hidroquinona, porém não alterou a expressão da enzima tirosinase (HU *et al.*, 2009).

ESPÍN, J.C. e WICHERS, H.J., (2001) concluíram em pesquisa realizada que a droga anti-hipertensiva, captopril, forma um complexo com o cobre e ponte dissulfídica entre o captopril e os domínios ricos em cisteína no sítio ativo da tirosinase, fazendo uma inibição irreversível.

Estilbenos que consistem num duplo eteno ligado substituído com um anel benzílico em ambos átomos de carbono da ligação dupla. Oxiresveratrol, isolado inicialmente da *Morus alba*, exibiu 32 vezes mais atividade inibitória do que o ácido kójico, a inibição é do tipo não competitiva da tirosinase e não afeta a expressão gênica do melanócito (SHIN, N. H. *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2002).

Ácido azelaico, isolado de culturas do fungo *Pityrosporum ovale* (associado com a pitíriase versicolor), tem ação no tratamento da acne e distúrbios de pigmentação como melasma e lentigem maligna, por interferir na ação da tirosinase e exercer ação antiproliferativa em melanócitos de melanoma. Em estudos duplo-cego, o ácido azelaico tópico nas concentrações de 15-20% alcançou uma resposta de 60-70% em pacientes com melasma comparado com hidroquinona a 2% (KATSAMBAS, A.D.; STRATIGOS, A.J., 2001).

### 3.5 O GÊNERO *Garcinia*

O achachairu (*Garcinia sp*), pertencente à família *Clusiaceae*, é uma fruta bastante apreciada na Bolívia. Os frutos têm massa de 30 gramas, globoso-oblongos, externamente são amarelo-alaranjados, com casca grossa, lisa, firme e resistente. A polpa não se adere à casca, é branca, suculenta e de textura mucilaginosa (BARBOSA, *et al.*, 2008).

O gênero *Garcinia* é composto por aproximadamente 260 espécies de árvores e arbustos distribuídos na América do Sul (também chamado *Rheedia*), África, Madagascar e Sudeste Asiático. *Garcinia macrophylla* (Mart.) Planch&Triana é uma árvore que cresce até 20 metros de altura, chamada popularmente de “bacuri”, “bacupari verdadeiro”, “bacopare”, parte desses nomes também são usados

para designar uma espécie próxima *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi (*Rheedia gardneriana* Planch. & Triana) (VAN DEN BERG, M.E., 1979). Através da extração das folhas e flores da *Garcinia macrophylla* foi obtido pela hidrodestilação óleos voláteis que possuem na sua maioria monoterpenos contendo oxigênio (ANDRADE *et al.*, 2007).

*Garcinia mangostana*, planta com amplo uso medicinal, conhecida pelas suas propriedades anti-inflamatórias, é usada no tratamento de feridas, supurações e infecções da pele, tal qual psoríase, bem como pelas propriedades antimicrobianas no tratamento de diarreia, cistite, gonorréia, desordens urinárias. E seus principais metabólitos secundários bioativos são derivados das xantonas, que ocorrem em poucas famílias de plantas, como alfa-mangostin e gama-mangostin. Foi comprovado que a *Garcinia mangostana* apresenta atividades: antioxidante, antibacteriana, antifúngica, citotóxica para células cancerígenas, anti-inflamatória, anti-histamínica. Por todos os seus benefícios, essa planta vem sendo comercializada internacionalmente como suplemento nutricional, consumido na forma de suco, porém é necessária cautela para seu consumo pela ausência de estudos em modelos *in vivo* e ensaios clínicos, mas o desenvolvimento dos nutracêuticos tem discutido em detalhes. Uma estratégia para globalização dos sistemas de conhecimento local tem sido sugerido a fim de aumentar o acesso da população pelos benefícios obtidos com o consumo da planta (OBOLSKIY, D. *et al.*, 2009).

Estudos químicos e farmacológicos da casca da raiz, folhas e frutos da *Garcinia livingstonei* relataram a presença de várias xantonas, biflavonoides e benzofenonas com atividades antiparasitária, antiviral, antifúngica, antibacteriana e citotóxica. Baseado nessas propriedades e o interesse crescente em plantas comestíveis com potencial terapêutico para a prevenção do câncer foi analisado o extrato metanólico das frutas para determinar a composição química e avaliado o efeito citotóxico sobre linhagens celulares de câncer de colo de útero pelo seu longo uso por humanos como alimento e, portanto provável segurança (YANG, H. *et al.*, 2010).

Pesquisas realizadas em plantas usadas pelos países da África identificaram que as sementes de *Garcinia kola* considerada de altíssimo valor para a medicina tradicional africana, revelaram a presença de diversas substâncias com atividade

farmacológica, como: antimicrobiano, hepatoprotetor, broncodilatador, antidiabético. Dentre os constituintes químicos presentes na *Garcinia kola*, a mesma apresentou biflavonóides em maior concentração e seu extrato metanólico com atividade inibitória da tirosinase (OKUNJI, C. *et al.*, 2007).

De acordo com Barbosa (2008, p. 264) *Garcinia gardneriana* também chamada de *Rheedia gardneriana* é uma planta nativa da Amazônia, que se encontra disseminada por todo o território nacional.

*Garcinia gardneriana* conhecida popularmente como “bacupari”, “bacopari”, “bacupary miúdo” ou “mangostão amarelo”. É uma árvore de porte médio (FIGURA 6), copa piramidal, folhas opostas, pecioladas, que floresce nos meses de agosto a setembro. Como característica de seu gênero possui fruto amarelo com polpa mucilagínosa, branca, comestível (FIGURA 7) (GUIMARÃES, C. L. *et al.*, 2004).

No sul do Brasil, a árvore da *Garcinia gardneriana* (Planch. & Triana) Zappi é uma opção para o tratamento de inflamação, especialmente afecções cutâneas, como também para dor, trato urinário e outras infecções (GUIMARÃES, C.L. *et al.*, 2004). Foi evidenciada em modelo de edema de pata a atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* após aplicação de carragenina (CASTARDO, J. C. *et al.*, 2008).



FIGURA 6: Árvore *Garcinia gardneriana* (adaptado WIKIPEDIA, 2010)

Estudos fitoquímicos com a planta *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) revelaram a presença de diversas xantonas, os triterpenos lupeol e betulina, e o esteroide  $\beta$ -sitosterol nas cascas e madeira da planta (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008,

---

<sup>2</sup> CASTARDO, J.A. *et al.* Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. *Journal of Ethnopharmacology*, Irlanda, v. 118, p. 405 – 411, 13 de agosto de 2008.

*apud* BRAZ FILHO *et al.*, 1970; DELLE MONACHE *et al.*, 1983, 1984). Também foram identificados nas folhas flavonóides, como os biflavonoides volkensiflavona, 13-naringenin-118-eriodictiol(GB-2a), GB-1a, fukugetina, (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008, *apud* BOTTA *et al.*, 1984), fukugesida (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008, *apud* LUZZI *et al.*, 1997; RODRIGUES *et al.*, 2000) e 13-narigenina-118-4'-Ome-eriodictiol (GB-2a-11-4'-Ome) (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008, *apud* CECHINEL FILHO *et al.*, 2000).

Através de análises com o extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* foi permitido isolar os compostos: GB2a-1-7-O-glucoside (0.02%) e epicatequina (0.004%), demonstrar a atividade antimicrobiana pelo método de disco-difusão em ágar e determinar as concentrações mínimas inibitória e bactericida contra bactérias das frações obtidas anteriormente, elucidando que volkensiflavona, fukugetin, fukugiside (anteriormente isolados), GB-2a-1-7-O-glucoside, epicatechin tiveram atividade contra as bactérias gram positivas testadas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprofiticus*) e por meio do teste de toxicidade da *Artemia salina* as frações não são consideradas tóxicas (VERDIA, *et al.*, 2004)

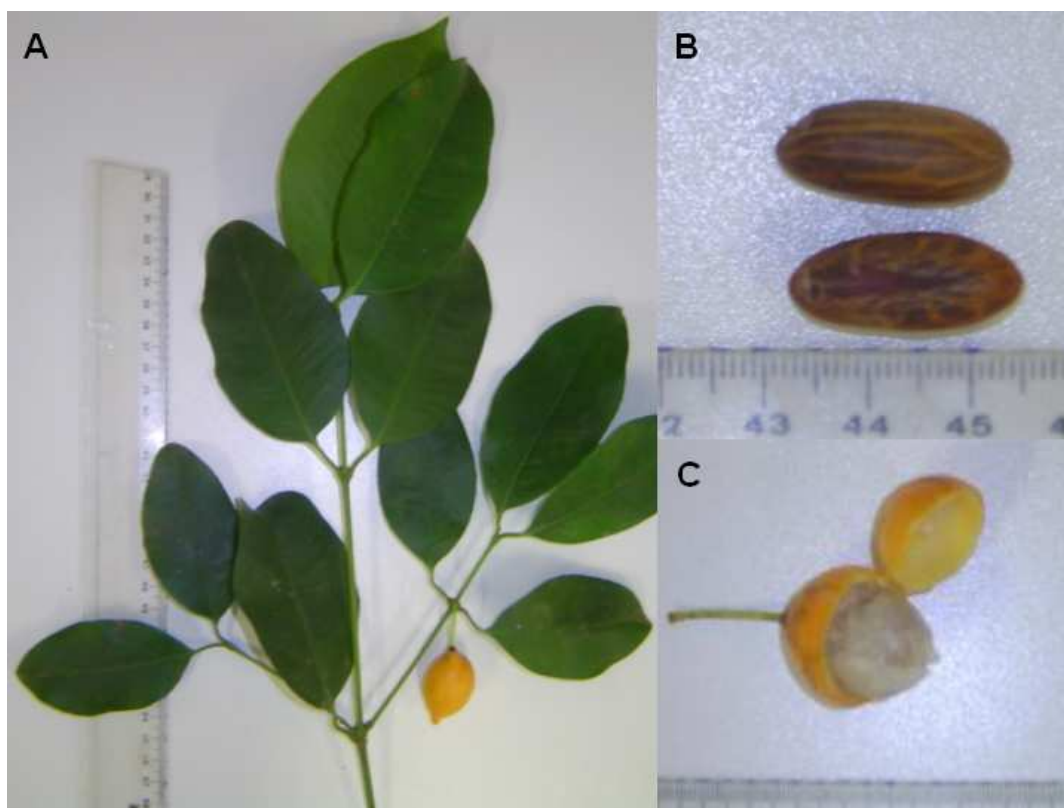


FIGURA 7: Partes aéreas da *Garcinia gardneriana* Pl. & Tr. Folhas e fruto (A); foco da semente (B); foco do fruto mostrando a polpa (C) (Cortesia Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Michel F. Otuki).

As folhas da *Garcinia gardneriana*, parte mais usada na medicina popular, possuem os biflavonoides volkensiflavona, 13-naringenina-118-eriodictiol (GB-2a), GB-1a, fukugentin, fukugesida, que apresentaram significativa ação analgésica em relação à segunda fase do teste da formalina (dor inflamatória) (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008, *apud* LUZZI *et al.*, 1997). O último biflavonoide isolado das folhas, 13-naringenina-118-4'-OMe-eriodictiol (GB-2a-11-4'-Ome), apresentou efeitos analgésicos, dependentes da dose, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina (CASTARDO<sup>2</sup> *et al.*, 2008, *apud* CECHINEL FILHO *et al.*, 2000). Cechinel Filho e colaboradores (2000) e Luzzi e colaboradores (1997), indicaram estes compostos como os principais responsáveis pelas atividades analgésicas da planta.

Existem estudos com a *Garcinia subelliptica*, a qual possui biflavonoides, fukugentina e GB-2a, com comprovada ação inibitória da tirosinase (MASUDA, T. *et al.*, 2005).





## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

Todas as soluções foram feitas em água destilada ultrapura, as substâncias químicas e reagentes de alta pureza obtidos de fornecedores como Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, Gibco<sup>®</sup>, Cultilab<sup>®</sup>, como hormônio  $\alpha$  – MSH, L – DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina), L – tirosina, tirosinase purificada, solução tampão fosfato de sódio (pH 7,2), fosfato de sódio monobásico anidro, fosfato de sódio dibásico anidro, penicilina, estreptomicina, soro fetal bovino, EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), tripsina, triton-X 100, álcool absoluto, hidróxido de sódio, ácido kójico, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetil-2-metilfenazina), cloreto de cálcio, ácido acético, formaldeído, ácido clorídrico, dimetilsulfóxido, meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM).

Para a leitura das placas foi utilizado um espectrofotômetro de placa da marca Biotek<sup>®</sup> Instruments modelo ELx800 (Operator's Manual) com programa acoplado Gen5 Elisa versão 1.08.

#### 4.1.1 Linhagem celular B16F10

Para a determinação da viabilidade celular e influência na melanogênese provocado pelo extrato de *Garcinia gardneriana* e o composto isolado GB-2a foi utilizado a linhagem celular de melanoma murino B16F10 (ATCC). A análise microscópica das células foi feita em microscópio óptico invertido da marca Medilux, modelo MDL-INV-1.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Coleta, Extração e Preparo do Material Vegetal

A *Garcinia gardneriana* foi coletada próximo à Fundação Universidade Regional de Blumenau, na cidade de Blumenau, e identificada pelo professor Marcos Sobral (Departamento de Botânica, Universidade Federal do Rio Grande do

Sul), um exemplar foi depositado no Herbário Dr. Roberto Miguel Klein (FURB, Blumenau) sob o número 534-540.

A obtenção do extrato bruto hidroalcoólico das folhas da *Garcinia gardneriana* foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Valdir Cechinel Filho do Departamento de Química da Universidade do Vale do Itajaí. Após a lavagem das folhas, foram postas em estufa a 40 °C para secagem. Em seguida, foram trituradas e deixadas em maceração por sete dias em solução hidroalcoólica (50% v/v) em frascos de vidro âmbar, sendo agitadas periodicamente. Concluída a maceração, a mistura foi filtrada em papel filtro e concentrada através de um aparelho rotaevaporador com temperatura máxima de 50 °C. O extrato obtido foi particionado com solventes de polaridades crescentes, como o hexano, diclorometano e acetato de etila, sendo obtido o extrato semipuro.

#### 4.2.2 Isolamento e purificação de composto

A partir dos extratos polares obtidos, foi isolado um composto com possível atividade inibitória da melanogênese. O isolamento do composto foi através do uso de procedimentos cromatográficos, como cromatografia em camada delgada para monitoramento e cromatografia em coluna usando sílica ou sephadex LH-20 como fase estacionária, para a separação. A elucidação estrutural dos compostos foi realizada por métodos espectroscópicos usuais, como IV, RMN  $^1\text{H}$  e RMN  $^{13}\text{C}$ . Com estruturas mostradas na FIGURA 8.

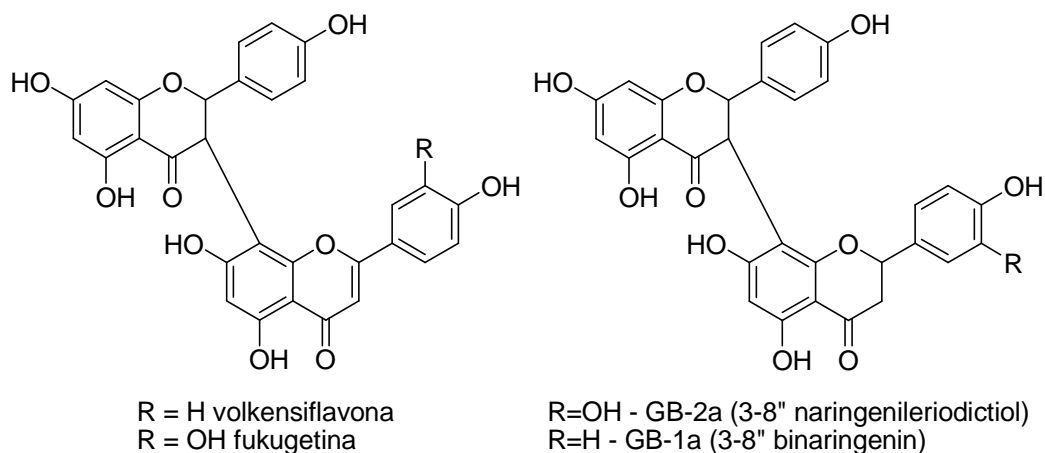


FIGURA 8: Biflavonóides da *Garcinia*. Estrutura química dos biflavonóides volkensiflavona, fukugetina, GB-2a e GB-1a.

#### 4.2.3 Cultura de células melanoma murino B16F10 e diluição do extrato de *Garcinia gardneriana*

Para os ensaios da melanogênese, foi cultivado para os experimentos a linhagem celular de melanoma murino B16F10, que foi mantida em frascos de 75 cm<sup>2</sup> em meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) para crescimento celular, suplementada com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 UI/50µg.mL<sup>-1</sup>) para prevenção de contaminação bacteriana, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Durante a incubação, o meio foi trocado a cada 2 dias, lavando com solução tampão fosfato de sódio, repondo as mesmas condições de cultivo iniciais (LEE, J. *et al.*, 2007). Um estoque de células B16F10 com 20% de soro fetal bovino, 10% de dimetilsulfóxido em DMEM foi mantido em nitrogênio líquido.

Para a dissolução do extrato da planta foi utilizado etanol absoluto e após diluições sucessivas em meio DMEM, a maior concentração de extrato 1000 µg/mL ficou com numa concentração de 0,5% de etanol, para tanto, todos os grupos de tratamento com o extrato nas diversas concentrações receberam essa concentração de etanol.

#### 4.2.4 Viabilidade celular

##### 4.2.4.1 Azul de Tripan

A viabilidade das células B16F10 utilizadas nos experimentos foi avaliada através do método de exclusão com azul de tripan (MERCHANT, D. *et al.* 1964). As células foram diluídas em solução a 0,4% de azul de tripan em solução tampão fosfato de sódio e sua viabilidade observada no microscópio óptico (Bioval L – 2000). As células viáveis se mostraram bem delimitadas, refringentes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis apresentaram-se coradas de azul, pela absorção do azul de tripan. Os experimentos foram realizados com as células que apresentaram viabilidade > 90%.

#### 4.2.4.2 Ensaio MTT

Esse ensaio de viabilidade celular serve para verificar o potencial e a proporção de morte celular causado pelos tratamentos específicos de identificação de compostos inibitórios da melanogênese. Foi feito usando brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT). O MTT, quando incubado com células viáveis, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo para um composto azul escuro (formazan). A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (BHATIA, S. K. *et al.*, 2008). As células B16F10 foram plaqueadas em placa de 96 poços na proporção  $7 \times 10^3$  em 200  $\mu$ L de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 UI/50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>) por poço. Após 24 horas, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio e tratadas com as amostras dissolvidas em veículo adequado mais meio DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 UI/50 $\mu$ g.mL<sup>-1</sup>), incubadas por períodos específicos conforme o experimento (primeiramente 24 e 48 horas e, depois dos ensaios de conteúdo de melanina). Após tratamento e no final da incubação, o meio foi retirado e as células lavadas com solução tampão fosfato de sódio, posteriormente 200  $\mu$ L de solução de MTT (0,5mg/mL em meio DMEM) foram adicionados em cada poço. Após incubação a 37°C por 3 horas, o meio foi cuidadosamente removido e 200 $\mu$ L de etanol foi adicionado. A absorbância de cada poço foi medida em 570nm usando espectrofotômetro (SILVA *et al.*, 2004; LIM, Y.L. *et al.*, 2009). O número de células foi observado sob um microscópio invertido em três campos aleatoriamente selecionados. Porcentagem de confluência foi avaliada antes do tratamento com a planta e novamente antes de realizar o ensaio de MTT, a absorbância das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B., 1998; VIRADOR, V.M. *et al.*, 1999).

#### 4.2.4.3 Ensaio vermelho neutro

O vermelho neutro (cloridrato de 3-amino-7-dimetil-2-metilfenazina) é um corante supravital, fracamente básico e solúvel em água que se acumula em lisossomos de células viáveis. Após incubação de 24 horas de  $7 \times 10^3$  células por

poço em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 UI/50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em placa de 96 poços. As células foram tratadas com o extrato hidroalcoólico de *Garcinia gardneriana* (EHGG) em diversas concentrações e ácido kójico 500  $\mu\text{M}$  (MIYAKE, M. *et al.*, 2010) diluídos em meio de cultivo com apenas 1% de soro fetal bovino, deixadas por 24 e 48 horas em incubação a 37°C. Decorrido o tempo, as amostras foram retiradas e as células lavadas com solução tampão fosfato de sódio. Após lavagem, foi adicionado o corante vermelho neutro (40  $\mu\text{g/ml}$ ) dissolvido em meio DMEM. As células foram incubadas durante 3 horas (37°C), tempo necessário para incorporação do corante nas células vivas. Em seguida, o meio foi cuidadosamente retirado e feito uma lavagem com a mistura de  $\text{CaCl}_2$  1% p/V e de formaldeído 0,5% V/V, eficiente em remover o corante externo. Após, foram adicionados 200  $\mu\text{l}$  de solução de ácido acético 1% com etanol 50% V/V deixados por 10 minutos à temperatura ambiente e agitação por poucos segundos. A absorbância correspondente foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A absorbância das células não tratadas foi considerada como 100% de viabilidade celular (DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B., 1998).

#### 4.2.5 Ensaio de Conteúdo de Melanina

Evidencia a capacidade inibitória da melanogênese das substâncias em melanócitos vivos, mimetizando condições fisiológicas. Após o crescimento celular, as células foram soltas da superfície interna do frasco de cultivo com uma solução de tripsina, suspendidas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e coletadas após a centrifugação por 5 minutos a 1100 rpm. Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante, as células foram contadas em câmara de Neubauer e plaqueadas em placas de 24 poços, com densidade celular de  $4 \times 10^4$  células por poço, cultivadas por 24 horas em DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina (100 UI/50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Após as 24 horas, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio para depois receberem o tratamento. As células foram tratadas com as concentrações de 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$  do EHGG (conforme o ensaio de conteúdo de melanina) e com o composto isolado GB-2a nas concentrações de 100, 10, 1, 0,1 nM (ensaio de conteúdo de melanina para melanogênese espontânea), ácido kójico 500  $\mu\text{M}$  (MIYAKE, M. *et al.*, 2010) como

controle positivo, e células sem nenhum tratamento como controle negativo, sendo sempre as amostras dissolvidas em 1% de soro fetal bovino, penicilina/estreptomicina ( $100 \text{ UI}/50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em meio DMEM. Para mensurar a quantidade de melanina existente no final do experimento, considerou-se o grupo controle (100%) como a quantia total de produção de melanina no período experimental e os grupos de tratamento proporcionais a esse padrão, a taxa de inibição foi o valor de melanina produzido subtraído de 100 (MAEDA, K. *et al.*, 2007; NESTEROV, A. *et al.*, 2008; LIM, Y.L. *et al.*, 2009).

#### *4.2.5.1 Conteúdo de melanina por melanogênese espontânea*

O conteúdo de melanina produzido pelos melanócitos foi mensurado após cultivo em condições específicas descritas no tópico anterior, a fim de quantificar a capacidade inibitória da melanogênese. No experimento de melanogênese espontânea as células ficaram em tratamento com o EHGG por 48 horas a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , sem nenhum estímulo indutor. Terminado o período de tratamento, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio. As células aderidas, no fundo do poço, receberam  $500 \mu\text{L}$  de uma solução de hidróxido de sódio 1N contendo 10% V/V de dimetilsulfóxido, sendo mantidas a  $80^\circ\text{C}$  em estufa por uma hora para lisar a célula e dissolver a melanina formada. A absorbância de cada poço foi lida em espectrofotômetro leitor de microplaca a 490 nm (HOSOI, A. J.; SUDA, K.T., 1985; CHEN, L.G. *et al.*, 2009).

#### *4.2.5.2 Conteúdo de melanina induzido por radiação ultravioleta*

O conteúdo de melanina produzido pelos melanócitos nesse experimento foi primeiramente induzido por radiação ultravioleta tipo B (comprimento de onda de 290 – 320 nm) na dose de  $50\text{mJ}/\text{cm}^2$  de radiação ultravioleta total (95% de UVB e 5% de UVC) utilizando-se lâmpadas TL01 (Philips, Eindhoven, Netherlands) dentro do fluxo laminar sobre a placa de cultura sem tampa. A dose da radiação ultravioleta foi monitorada por um radiômetro (VLX-3, Vilbert Loumat). Estímulo que simula o ocorrido na pele humana quando recebe radiação ultravioleta. Após o plaqueamento das células e cultivo por 24 horas, foi feita a lavagem com solução tampão fosfato de

sódio. A irradiação das células foi feita na mesma solução de lavagem acima descrita, depois da irradiação é retirada essa solução e feita a incubação das células com as amostras por 24 horas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado o período de tratamento, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio. As células aderidas, no fundo do poço, recebem 500 µL de uma solução de hidróxido de sódio 1N contendo 10% V/V de dimetilsulfóxido, sendo mantidas a 80 °C em estufa por uma hora para lisar a célula e dissolver a melanina formada. A absorbância de cada poço foi lida em espectrofotômetro leitor de microplaca a 490 nm (ROMÉRO, C. *et al.*, 1994; CHEN, L.G. *et al.*, 2009; ITOH, K. *et al.*, 2009).

#### 4.2.5.3 Conteúdo de melanina induzido por $\alpha$ - MSH

O conteúdo de melanina produzido pelos melanócitos, nesse ensaio, foi induzido pelo hormônio  $\alpha$  – MSH na concentração de 100 nM. Essa indução hormonal dos melanócitos simula o que acontece fisiologicamente quando o hormônio  $\alpha$  – MSH se liga ao receptor de melanocortina – 1 na membrana dos melanócitos. Aqui, após 48 horas do plaqueamento das células, as mesmas foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio e receberam simultaneamente o tratamento do hormônio mais o EHGG em diversas concentrações por um período de 48 horas, os quais ficaram a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Terminado o período de tratamento, as células foram lavadas com solução tampão fosfato de sódio. As células aderidas, no fundo do poço, recebem 500 µL de uma solução de hidróxido de sódio 1N contendo 10% V/V de dimetilsulfóxido, sendo mantidas a 80 °C em estufa por uma hora para lisar a célula e dissolver a melanina formada. A absorbância de cada poço foi lida em espectrofotômetro leitor de microplaca a 490 nm (WANG, H. *et al.*, 2009).

#### 4.2.6 Ensaio da atividade da tirosinase celular

A atividade da tirosinase celular foi feita para verificar a atividade da tirosinase celular em B16F10 medindo a taxa de oxidação de L-DOPA. Células de melanoma murino B16F10 foram plaqueadas numa densidade celular de  $7 \times 10^3$  por



poço em placas de 96 poços em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e penicilina/estreptomicina ( $100 \text{ UI}/50\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) mantidas em atmosfera úmida a  $37^\circ\text{C}$  com  $5\%\text{CO}_2$  por 24 horas. Decorrido o tempo, foi adicionado solução tampão fosfato de sódio para realizar a lavagem, retirando essa solução usada de cada poço. Para o tratamento foi adicionado o EHGG nas diversas concentrações e ácido kójico  $500 \mu\text{M}$ , dissolvidos em veículo adequado e em meio DMEM suplementado com 1% SFB e penicilina/estreptomicina ( $100 \text{ UI}/50\mu\text{g. mL}^{-1}$ ) incubando a  $37^\circ\text{C}$  com  $5\% \text{CO}_2$  por 48 horas. Após esse período, as amostras foram retiradas dos poços, lavando as células com tampão fosfato de sódio gelado e lisando-as com tampão fosfato de sódio contendo 1% V/V de triton-X ( $90 \mu\text{L}/\text{poço}$ ), levando posteriormente ao congelamento da placa a  $-80^\circ\text{C}$  por 30 minutos. Após descongelamento, esperou-se atingir a temperatura ambiente, nessa etapa as células sofrem ruptura pelo congelamento seguido de descongelamento. Os poços foram homogeneizados e adicionados  $10 \mu\text{L}$  1% p/V L-DOPA em tampão fosfato de sódio a cada um. Em seguida, incubou-se a  $37^\circ\text{C}$  por 2 horas e leitura a  $490 \text{ nm}$  em espectrofotômetro (KIM *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2010).

#### 4.2.7 Teste padronizado de reguladores de pigmentação

O teste padronizado de reguladores de pigmentação, também conhecido como STOPR (standardized testing of pigmentary regulators) é utilizado para testar possíveis compostos reguladores de pigmentação, são inicialmente rastreados usando tirosinase purificada, a fim de testar se são capazes de inibir a melanogênese. Foi testado o EHGG em várias concentrações 1000, 300, 100, 30, 10, 3,  $1 \mu\text{g/mL}$  e o composto isolado GB-2a ( $10 \mu\text{L}$ ) nas concentrações 0,1, 1, 10,  $100\text{nM}$  frente à  $20 \mu\text{L}$  enzima tirosinase ( $500 \text{ U/mL}$ ), em microplaca de 96 poços. Adicionou-se a cada poço  $170 \mu\text{L}$  de uma mistura de L-tirosina  $1 \text{ mM}$ , tampão fosfato de potássio,  $\text{H}_2\text{O}$  (10:10:9), sendo o meio reacional aquoso. A microplaca foi incubada a  $37^\circ\text{C}$  por 40 minutos. A quantia de dopaquinona proveniente da reação da amostra foi determinada, baseada na densidade óptica a  $490 \text{ nm}$ , usando espectrofotômetro. O efeito inibitório da atividade da tirosinase foi determinado em função da taxa de absorbância baseado na densidade óptica a  $490 \text{ nm}$  usando espectrofotômetro (VIRADOR, V.M. *et al.*, 1999; LIM, Y.L. *et al.*, 2009). Como

controle positivo foi usado 10 µL ácido kójico 500 µM e controle negativo 10 µL de água destilada. Todas as reações foram feitas em triplicata.

#### 4.2.8 Cinética enzimática

Os parâmetros cinéticos de inibição enzimática avaliados são a constante Michaelis-Menten ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{m\acute{a}x}$ ) da atividade da tirosinase determinados pela análise de parcela recíproca por Lineweaver-Burk com várias concentrações de substrato: L- tirosina e L-DOPA (FIGURA 9) 250, 500, 1000, 2000 mM num sistema tampão fosfato de sódio 50 mM e água destilada (proporção 10: 10: 9), 10 µL do composto isolado GB-2a nas concentrações de 30, 150, 300, 600 µg/mL e concentração constante da enzima tirosinase 500 U/mL (20 µL) em solução tampão fosfato de sódio 50 mM. A microplaca de 96 poços foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Com leitura em espectrofotômetro de placa em 490 nm.

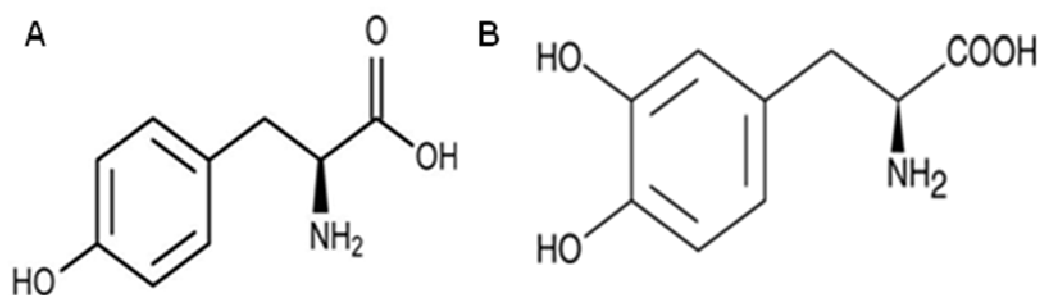


FIGURA 9: Estruturas químicas L – tirosina (A) e L – DOPA (B)

Fonte: CHEMISTRY.COM, 2010; CAYMANCHEM, 2010.

Num segundo momento foi mantida constante a concentração de L- tirosina em 1000 mM e tirosinase 500 U/mL, o GB-2a nas concentrações 30, 150, 300, 600 µg/mL, ácido kójico 500µM com a placa incubada a 37 °C com tempo variável, com leitura a cada 10 minutos no mesmo comprimento de onda. O programa Enzyme Kinetics Module of GraphPad Software Prism foi usado para calcular os parâmetros cinéticos e a natureza da inibição. A eficiência e reprodutibilidade desse programa estão bem estabelecidas (KIM, Y. J. *et al.*, 2005; CHAWLA *et al.*, 2008; ZHANG, X. *et al.*, 2009).

#### 4.2.9 Análise Estatística

Os dados obtidos das amostras foram avaliados por análise de variância (ANOVA uma via) seguida pelo teste de múltipla comparação Newman-Keuls, para determinação do nível de significância das diferenças. Foram considerados estatisticamente significativos:  $P < 0,05 \rightarrow *$ ;  $P < 0,01 \rightarrow **$ ;  $P < 0,001 \rightarrow ***$ . Os resultados foram expressos graficamente (GraphPad Software Prisma, versão 3.0, San Diego California, EUA), a partir dos valores absolutos, como porcentagem média em relação ao controle  $\pm$  erro padrão da média (EPM), com intervalo de confiança de 95%.



## 5 RESULTADOS

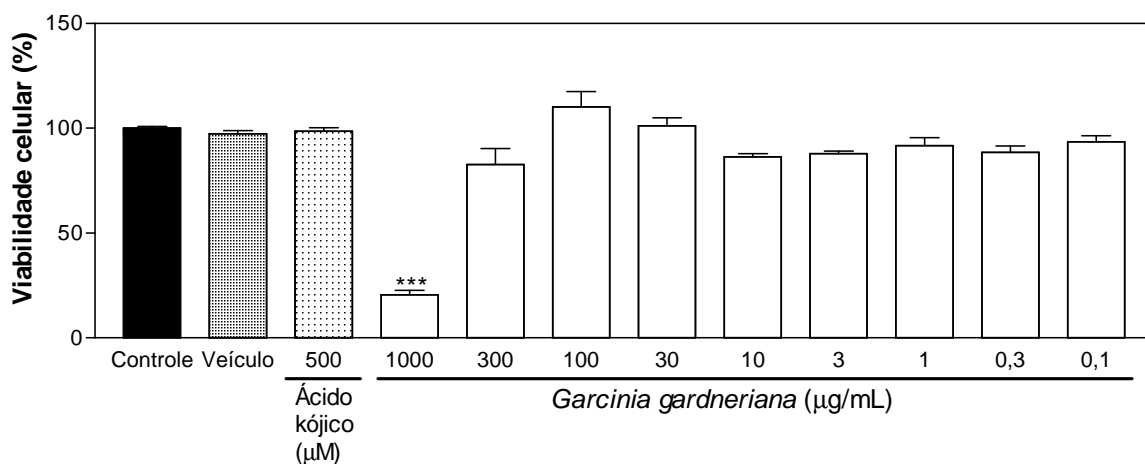
### 5.1 VIABILIDADE CELULAR

#### 5.1.1 MTT

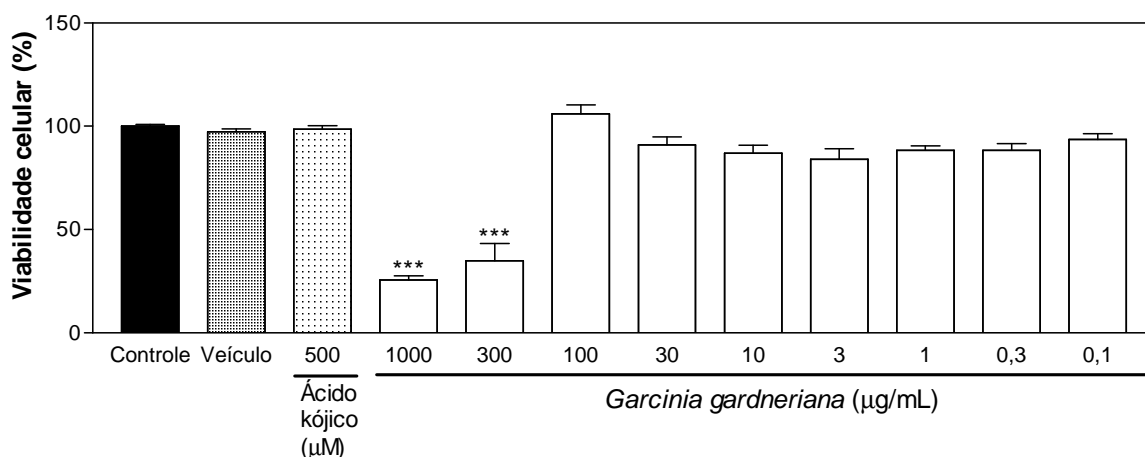
A fim de verificar os possíveis efeitos citotóxicos sobre as células B16F10 dos tratamentos: EHGG nas concentrações de 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 µg/mL e ácido kójico 500 µM, foram avaliados através do ensaio de viabilidade celular pelo método do MTT, no qual células vivas possuem enzimas mitocondriais viáveis que conseguem fazer a degradação do sal, formando um composto azul escuro, o qual é detectado pelo espectrofotômetro em 570 nm. Nesse ensaio foi possível notar redução da viabilidade celular advinda da concentração de 1000 µg/mL no período de 24 horas, reduzindo para  $20 \pm 2,11\%$  (GRÁFICO 1A) e em 1000 e 300 µg/mL no período de 48 horas, para  $25,69 \pm 1,89\%$  e  $34,93 \pm 8,44 \%$ , respectivamente, em relação ao controle (GRÁFICO 1B). Já nas concentrações de 100, 30, 10, 3, 1, 0,3 e 0,1 µg/mL e ácido kójico 500µM não houve diminuição da viabilidade celular em nenhum dos períodos avaliados.

Como a dissolução do extrato da planta foi feita em etanol absoluto e após diluições sucessivas em meio DMEM, a maior concentração de extrato 1000 µg/mL ficou com numa concentração de 0,5% de etanol, todos os grupos de tratamento com o extrato nas diversas concentrações receberam essa concentração de etanol, o qual não prejudicou a viabilidade celular.

**A**



**B**



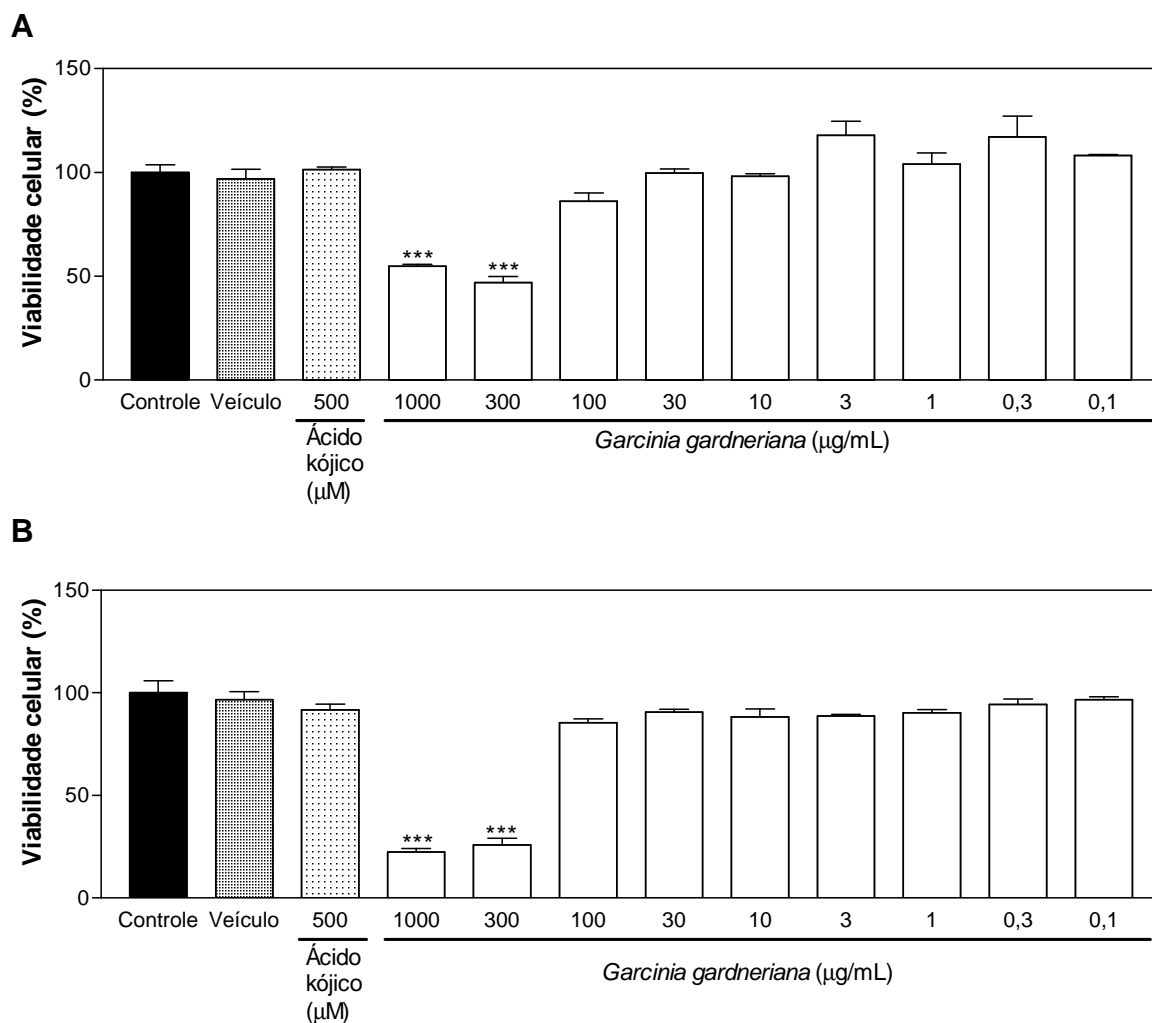
**GRÁFICO 1** – Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método MTT após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento com EHGG, veículo 0,5% etanol, ácido kójico. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*\*P<0,001

### 5.1.2 Vermelho neutro

De acordo com DOYLE, A. e GRIFFITHS, J. B. (1998) o corante vermelho neutro é incorporado através de transporte passivo pela membrana plasmática das células e armazenado dentro dos lisossomos. Portanto, células híginas conseguem fazer a incorporação do corante e células mortas ou danificadas não conseguem reter o corante dentro das células.

Com o intuito de avaliar a viabilidade celular das células B16F10 após tratamento com o EHGG nas concentrações de 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1, 0,3, 0,1 µg/mL e ácido kójico 500 µM utilizou-se o ensaio do vermelho que verifica se houve redução da viabilidade celular. Após o tratamento com o EHGG nos períodos de 24 e 48 horas, foi adicionada uma solução de ácido acético e etanol para romper as células e solubilizar o corante “internalizado”, essa solução resultante foi lida em 540 nm. Foi notável a redução da viabilidade celular no período de 24 horas (GRÁFICO 2A) nos grupos de 1000 e 300 µg/mL com valores de  $54,77 \pm 1,00\%$  e  $46,91 \pm 3,02\%$ , e no período de 48 horas (GRÁFICO 2B) com valores de  $22,37 \pm 1,69\%$  e  $25,82 \pm 3,19\%$ , respectivamente. Nas outras concentrações de tratamento com o EHGG e ácido kójico não houve redução da viabilidade celular.

Da mesma forma que no ensaio do MTT para a dissolução do extrato da planta foi utilizado etanol absoluto, no qual a maior concentração de extrato 1000 µg/mL, o etanol ficou numa concentração de 0,5%. Portanto, todos os outros grupos de tratamento com o extrato receberam essa concentração de etanol, o qual não prejudicou a viabilidade celular.



**GRÁFICO 2** – Análise da viabilidade celular das células B16F10 pelo método vermelho neutro após 24 horas (A) e 48 horas (B) de tratamento com EHGG, veículo 0,5% etanol, ácido kójico. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*\*P<0,001

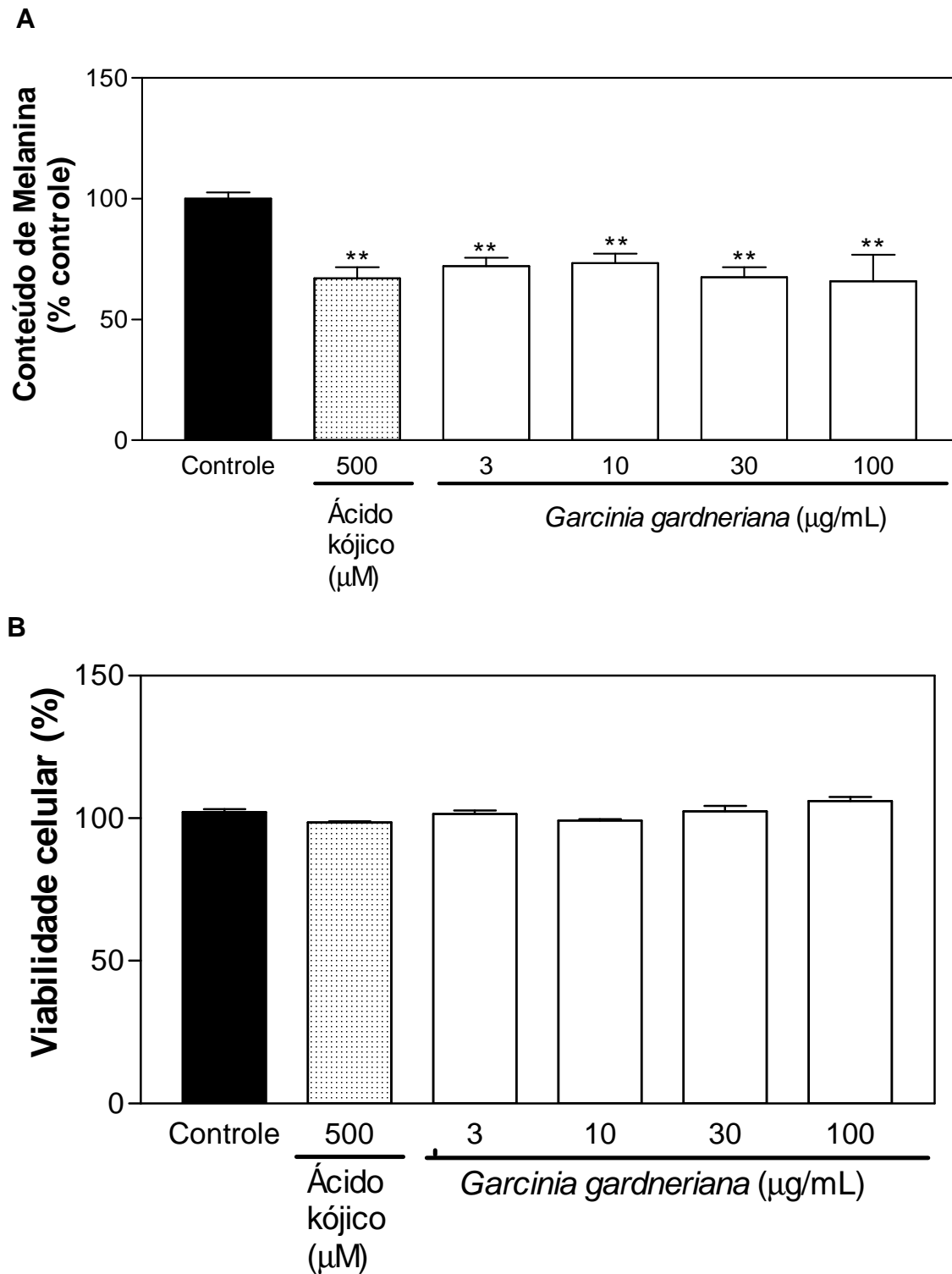


## 5.2 AVALIAÇÕES DO CONTEÚDO DE MELANINA COM O EXTRATO DA *Garcinia gardneriana*

### 5.2.1 Melanogênese espontânea e viabilidade celular

No GRÁFICO 3A, as células B16F10 ao serem analisadas em melanogênese espontânea foram mantidas em cultivo para verificar a produção de melanina, por dois dias consecutivos, sem nenhum estímulo, somente receberam, nesse período, o tratamento com EHGG nas concentrações de 3, 10, 30, 100 µg/mL e ácido kójico 500 µM, o que produziu uma taxa de inibição de  $27,92 \pm 3,46\%$ ,  $26,63 \pm 3,92\%$ ,  $32,41 \pm 4,05\%$ ,  $34,13 \pm 10,99\%$  e o controle positivo  $31,07 \pm 4,69\%$ . A melanina produzida foi solubilizada em meio alcalino, os poços de cada tratamento foram lidos em espectrofotômetro de placa. Pode-se observar que a concentração de 100 µg/mL provocou a maior taxa de inibição, com menor teor de melanina desenvolvido pelas células. Não foi possível afirmar a formação de um platô pelas concentrações maiores possuírem potencial citotóxico e não serem utilizadas.

Já, o GRÁFICO 3B mostra a viabilidade das células findado o tratamento com o EHGG e o controle positivo. Todos os grupos de células B16F10 não tiveram sua viabilidade alterada, identificado por não haver diferença estatística significativa em relação ao controle negativo, grupo que não recebeu nenhum tratamento.

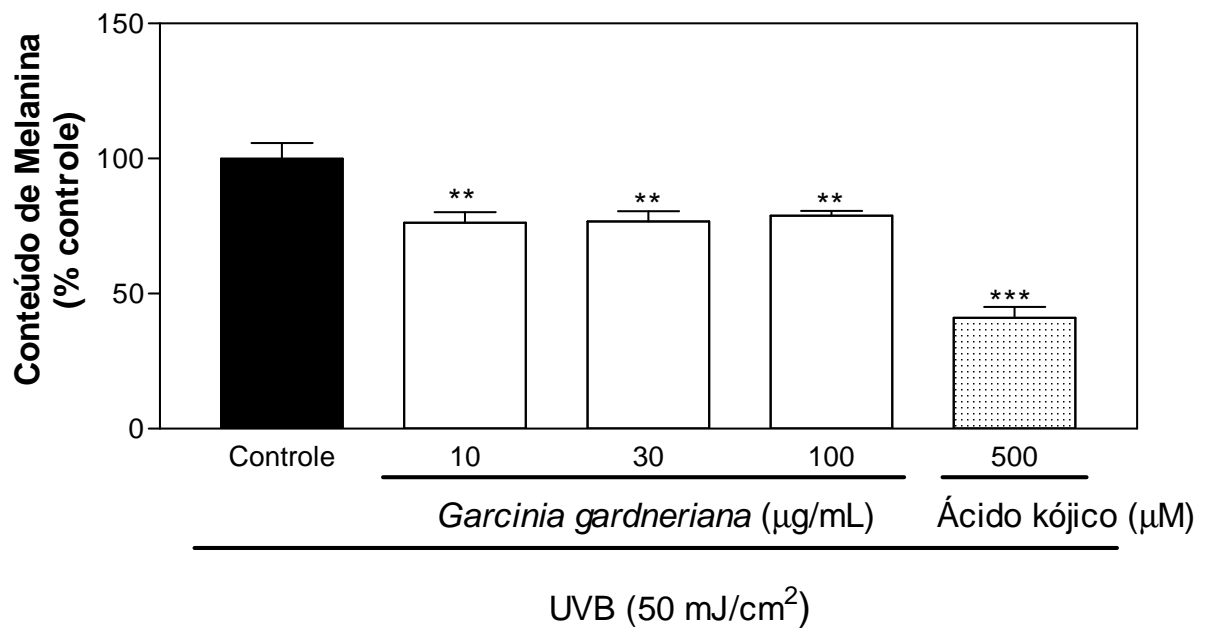


**GRÁFICO 3** – Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese espontânea das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 48 horas de tratamento (B). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*P<0,01

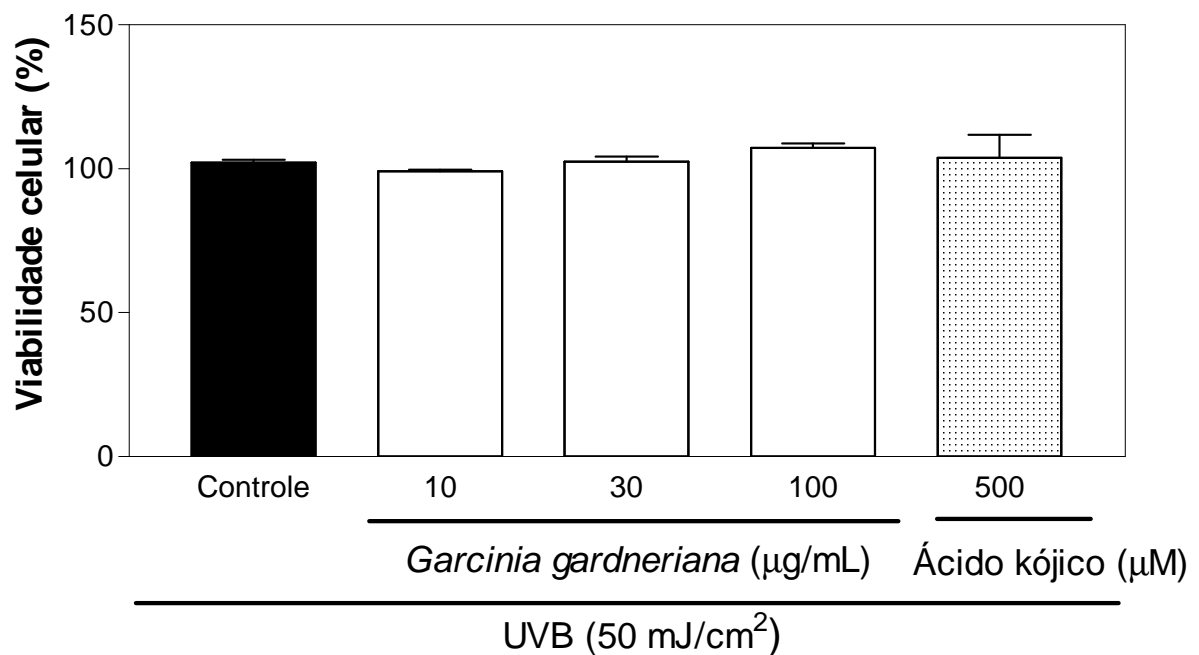
### 5.2.2 Melanogênese induzida por radiação ultravioleta e viabilidade celular

O GRÁFICO 4A mostra o perfil de produção de melanina de uma melanogênese induzida por radiação ultravioleta na dose  $50 \text{ mJ/cm}^2$  que avaliou a capacidade de resposta dos melanócitos mediante tratamento com o EHGG por 24 horas em cultivo, após o estímulo. Nas concentrações de extrato utilizadas 10, 30 e  $100 \text{ } \mu\text{g/mL}$  houve uma diminuição significativa do conteúdo de melanina, com uma inibição de  $23,84 \pm 4,03\%$ ,  $23,27 \pm 3,68\%$  e  $21,16 \pm 1,71\%$  e o ácido kójico  $500 \mu\text{M}$  produziu uma inibição de aproximadamente  $59 \pm 3,91\%$ . Paralelamente foi realizado o ensaio de viabilidade celular para verificar os efeitos do tratamento sobre a viabilidade das células durante o experimento (GRÁFICO 4B). É possível observar que o efeito inibitório na produção de melanina não é decorrente de redução de viabilidade, pois em todos os grupos de tratamento as células se mantiveram viáveis, até o término do experimento.

**A**



**B**



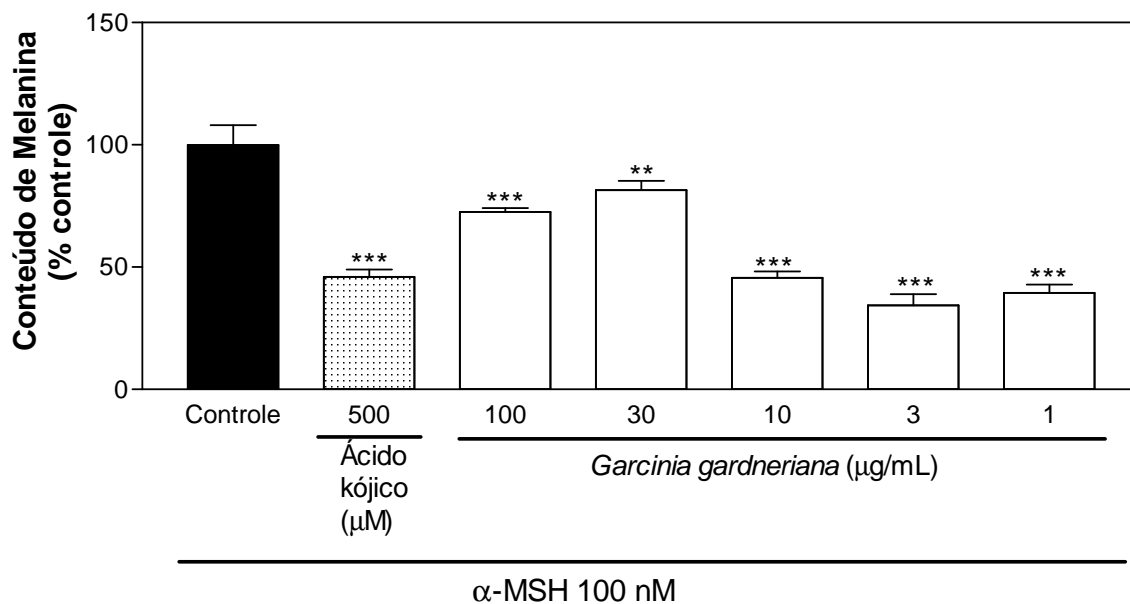
**GRÁFICO 4** - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese induzida por radiação UVB das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 24 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 24 horas de tratamento (B). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

### 5.2.3 Melanogênese induzida por $\alpha$ -MSH e viabilidade celular

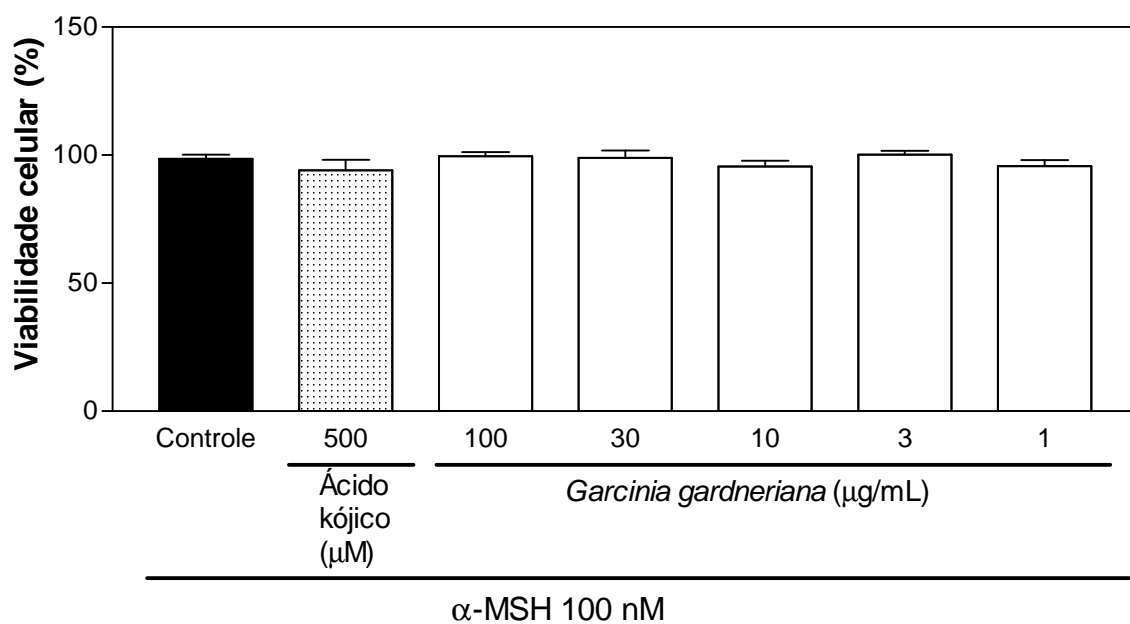
O GRÁFICO 5A demonstra o conteúdo de melanina produzido pelas células após indução com o hormônio  $\alpha$ -MSH na concentração de 100 nM, conforme metodologia anteriormente descrita. Nas concentrações de EHGG utilizadas, as concentrações de 100 e 30  $\mu\text{g/mL}$  produziram uma inibição de  $27,47 \pm 1,61\%$  e  $18,48 \pm 3,51\%$  e as concentrações de 10, 3 e 1  $\mu\text{g/mL}$  uma taxa inibitória de  $54,31 \pm 2,50$ ,  $65,75 \pm 4,67\%$  e  $60,55 \pm 3,50\%$ , respectivamente. O controle positivo ácido kójico 500  $\mu\text{M}$ , nesse ensaio, produziu uma inibição de  $53,94 \pm 3,01\%$ .

Essa diminuição da produção de melanina pelas células se deve pela presença do EHGG e não pela citotoxicidade do EHGG nas concentrações utilizadas sobre as células, pois o ensaio do MTT demonstra que, no fim do experimento, as células permaneceram viáveis, capazes de biotransformar o sal brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium. (GRÁFICO 5B)

**A**



**B**

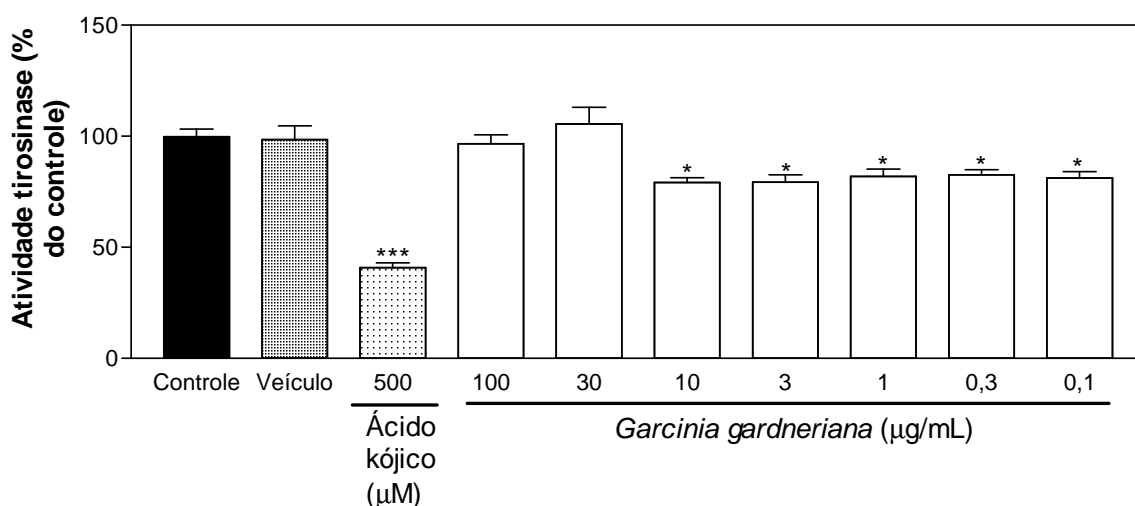


**GRÁFICO 5** - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese induzida por  $\alpha$ -MSH das células tratadas com o EHGG e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) após 48 horas de tratamento (B). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001

### 5.3 ENSAIO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE CELULAR COM O EXTRATO DA *Garcinia gardneriana*

A biossíntese de melanina tem a tirosinase como enzima chave, para isso o efeito do EHGG sobre a tirosinase foi determinado. A tirosinase celular teve sua atividade diminuída em  $20,82 \pm 2,17\%$ ,  $20,63 \pm 2,17\%$ ,  $18,12 \pm 3,32\%$ ,  $17,33 \pm 2,32\%$ ,  $18,77 \pm 2,86\%$  nas concentrações de 10, 3, 1, 0,3, 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Pode-se notar que houve uma diminuição da tirosinase de murino em aproximadamente 19,13% nas concentrações de 10 a 0,1  $\mu\text{g/mL}$ , o que indica uma inibição direta sobre a atividade da enzima, resultando numa diminuição da ação da enzima sobre o substrato L-DOPA, consequentemente menor conversão e produção de dopaquinona detectado pelo espectrofotômetro pela linhagem celular B16F10.

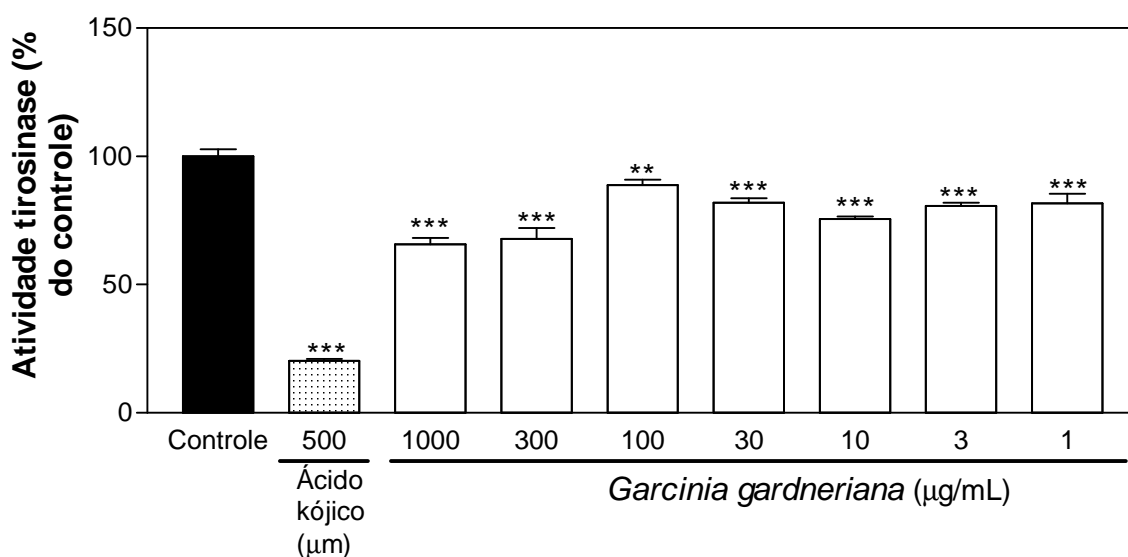
O controle positivo exerceu uma inibição de  $59,2 \pm 2,27\%$ . O grupo veículo é composto de 0,5% de etanol e essa mesma concentração de etanol esteve presente nos grupos de tratamento. (GRÁFICO 6)



**GRÁFICO 6** – Atividade da tirosinase celular de murino após tratamento de 48 horas com o EHGG, veículo (0,15% etanol), ácido kójico. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 6). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \* $P < 0,05$ , \*\*\* $P < 0,001$

#### 5.4 MEDIDA DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A TIROSINASE PURIFICADA *IN VITRO* COM O EXTRATO DA *Garcinia gardneriana*

Nesse ensaio enzimático *in vitro* utilizando a enzima tirosinase purificada 500U/mL e o substrato L-tirosina 1 mM, com o EHGG em várias concentrações (GRÁFICO 7) colocado frente a enzima tirosinase foi possível observar uma inibição de:  $34,34 \pm 2,51\%$ ,  $32,13 \pm 4,15\%$ ,  $11,15 \pm 2,11\%$ ,  $18,07 \pm 1,81\%$ ,  $22,89 \pm 1,59\%$ ,  $19,28 \pm 1,20\%$ ,  $18,27 \pm 3,72\%$  nas concentrações de 1000, 300, 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, ocorrendo uma inibição máxima na concentração de 1000  $\mu\text{g/mL}$  com um valor de aproximadamente 35%. O ácido kójico, nesse ensaio enzimático, apresentou uma taxa de inibição de  $79,72 \pm 0,72\%$ .



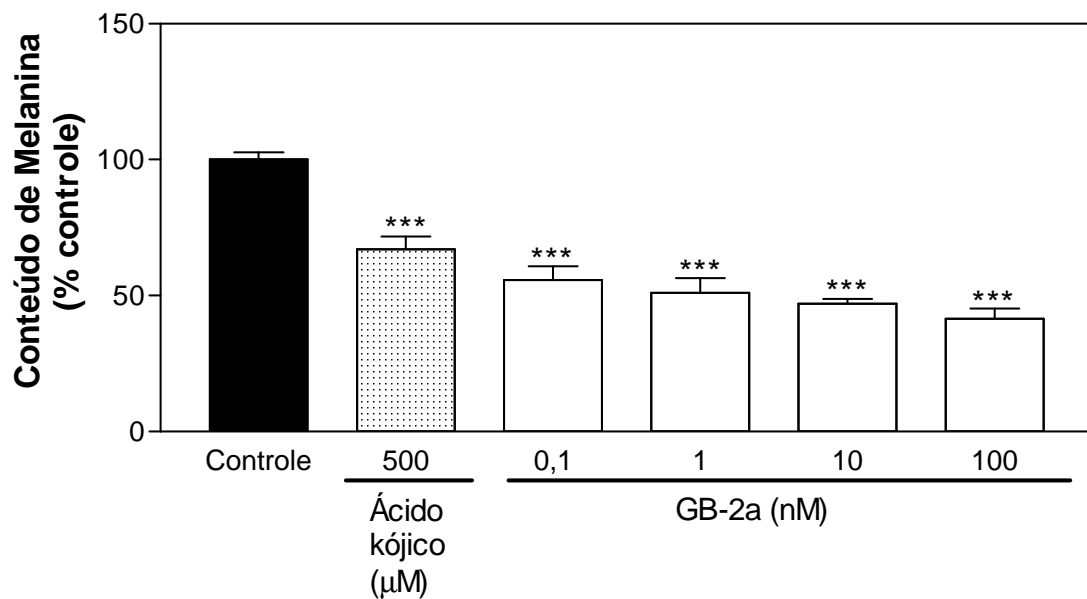
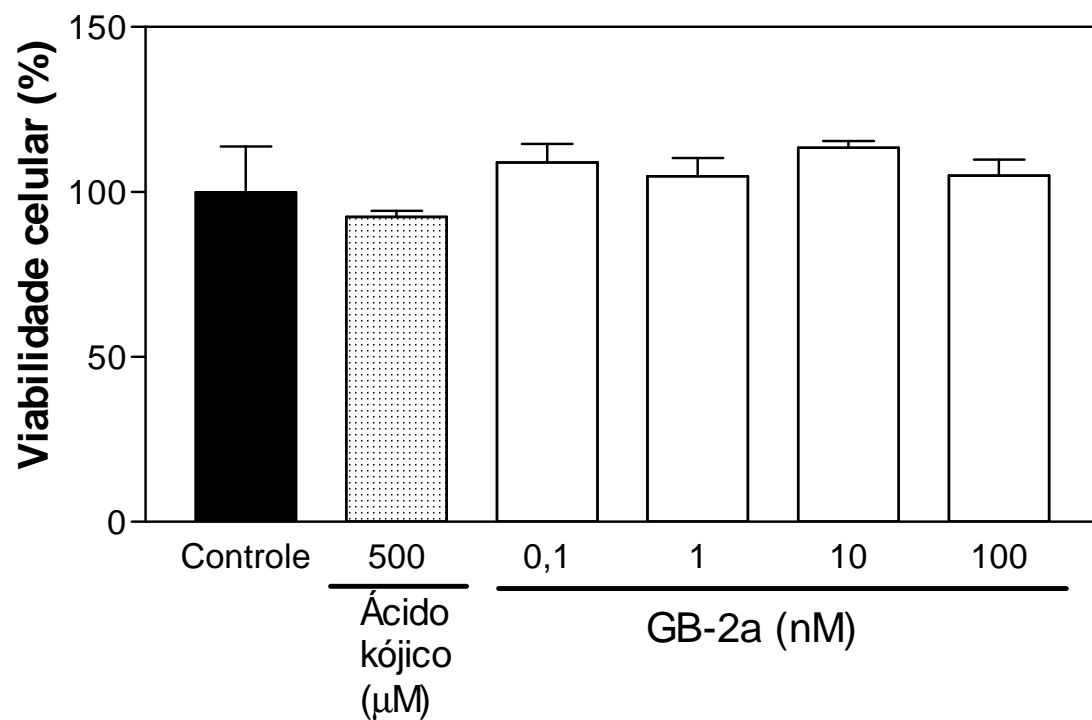
**GRÁFICO 7** – Atividade da tirosinase purificada após tratamento com o EHGG e ácido kójico por 40 minutos. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 3). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001



## 5.5 AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE MELANINA POR MELANOGÊNESE ESPONTÂNEA DO COMPOSTO ISOLADO GB-2a E VIABILIDADE CELULAR

Pelo fato de EHGG provocar atividade inibitória sobre a melanogênese, foi realizado a verificação de um possível efeito inibitório do composto biflavonóide GB-2a, através da melanogênese espontânea em células de melanoma murino B16F10. Observa-se no GRÁFICO 8A que o GB-2a nas concentrações de: 0,1, 1, 10, 100 nM induziu inibições de  $44,35 \pm 5,2\%$ ,  $48,97 \pm 5,47\%$ ,  $52,93 \pm 1,77\%$ ,  $58,60 \pm 3,91\%$ , respectivamente. Com isso, os níveis de melanina das células tiveram seus conteúdos significativamente minorados de maneira dose dependente, com maior inibição em 100 nM de GB-2a. Já, o ácido kójico provocou uma taxa de inibição de  $32,97 \pm 4,69\%$ .

Quando o GB-2a foi submetido ao teste de viabilidade celular nas concentrações de 0,1 a 100 nM utilizadas para a avaliação da sua ação sobre a melanogênese espontânea não houve redução da viabilidade celular provocado pelo composto biflavonoide, aspecto demonstrado pela não diferença estatística entre os grupos, o que justifica seu uso nessas concentrações. (GRÁFICO 8B)

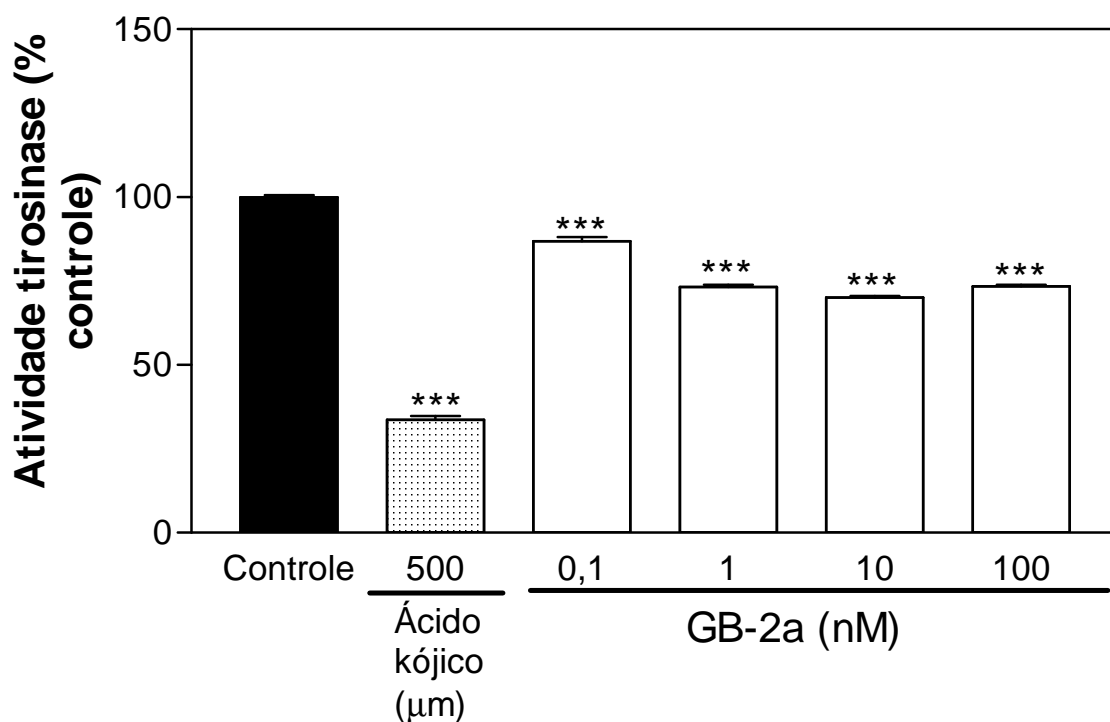
**A****B**

**GRÁFICO 8** - Conteúdo de melanina avaliado por melanogênese espontânea das células tratadas com o GB-2a e ácido kójico por 48 horas (A) e viabilidade celular (MTT) das células após 48 horas de tratamento (B). As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. (n= 4). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle.

\*\*P<0,01

## 5.6 MEDIDA DO EFEITO INIBITÓRIO SOBRE A TIROSINASE PURIFICADA *IN VITRO* DO COMPOSTO ISOLADO GB-2a

Visto o efeito do GB – 2a no conteúdo de melanina e a atividade sobre a tirosinase purificada do EHGG decidiu-se submeter no mesmo ensaio com a enzima tirosinase purificada, o composto isolado l3-naringenina-l18-eriodictiol (GB-2a). Nas concentrações de 1, 10, 100 nM de GB-2a foi demonstrado uma inibição de:  $26,82 \pm 0,81\%$ ,  $29,93 \pm 0,65\%$ ,  $26,62 \pm 0,55\%$ , respectivamente, na concentração de 0,1 nM não houve diferença estatística significativa. Na concentração de 10 nM foi obtida a inibição máxima de aproximadamente 30%, o que permitiu somente 70% da atividade enzimática, pelo composto GB-2a ter atingido um platô nas concentrações vizinhas utilizadas e o ácido kójico 500  $\mu\text{M}$  uma inibição de  $66,33 \pm 1,20\%$  (GRÁFICO 9).



**GRÁFICO 9** - Atividade da tirosinase purificada após tratamento com o GB-2a e ácido kójico por 40 minutos. As barras verticais representam a média  $\pm$  E.P.M. ( $n= 3$ ). Os símbolos representam o nível de significância quando comparados ao grupo Controle. \* $P<0,05$ , \*\* $P<0,01$ , \*\*\* $P<0,001$

Tanto no ensaio com o extrato de *Garcinia gardneriana* como com o composto isolado GB-2a, a detecção de dopaquinona formada pela reação da tirosinase sobre o substrato L-tirosina formando L-Dopa e consequentemente dopacromo, foi lida em espectrofotômetro a 490 nm, comprimento de onda capaz de captar a presença de dopaquinona. Valores de absorbância altos são resultantes de maior produção de dopacromo e valores mais baixos são resultantes de menores taxas de conversões de L-tirosina em dopacromo. Nesse último caso, a presença de um inibidor como os utilizados: extrato hidroalcoólico de *Garcinia gardneriana* e o biflavonóide GB-2a impediram essa conversão de maneira integral pelo bloqueio do funcionamento da enzima tirosinase em agir sobre seu substrato L-tirosina.

## 5.7 CINÉTICA ENZIMÁTICA DA TIROSINASE PURIFICADA FRENTE AO COMPOSTO GB-2a

Os parâmetros cinéticos enzimáticos de inibição enzimática avaliados são  $K_m$  (constante de Michaelis-Menten), que é a concentração de substrato necessária para atingir a metade da velocidade máxima da reação enzimática e  $V_{máx}$  (velocidade máxima), a velocidade de reação enzimática que aumenta com o acréscimo da concentração de substrato até um ponto em que atinge a velocidade máxima de reação, momento em que ocorre saturação da enzima, ocupação de todos os sítios ativos enzimáticos, permanecendo constante a partir desse estágio (platô de velocidade). Mesmo aumentando a concentração de substrato não ocorre modificação na velocidade da reação e conversão do substrato. Esse parâmetro de aumento de conversão poderá ser melhor avaliado se houver uma ampliação do tempo de reação, para que a enzima tenha tempo disponível para fazer a degradação de todo substrato adicionado (LEHNINGER, A. L. *et al.* 2006).

### 5.7.1 L-Tirosina

A curva do controle representa a velocidade da reação enzimática da tirosinase, frente ao aumento na concentração de substrato L-tirosina até a velocidade da reação alcançar um platô, que chega a um  $V_{máx}$  de 0,004, no eixo

$V(\Delta\text{abs}/\text{min})$ . Isso revela o comportamento enzimático da enzima tirosinase, que possui um  $K_m$  300  $\mu\text{M}$  para L-tirosina, concentração de substrato necessária para alcançar metade da velocidade máxima dessa reação enzimática. No ponto em que se estabelece a  $V_{\text{máx}}$ , pode-se perceber que é preciso uma concentração de 1 mM de L-tirosina, mantendo-se constante a partir daí a velocidade da reação, mesmo com acréscimos de substrato.

Num segundo momento, quando se avalia a presença do biflavonoide GB-2a em várias concentrações, é possível notar que, em  $4,04 \cdot 10^{-2}$  mM ocorre uma deflação de  $V_{\text{máx}}$  para aproximadamente 0,004 no eixo  $V(\Delta\text{abs}/\text{min})$  e em  $2,02 \cdot 10^{-1}$  mM,  $4,04 \cdot 10^{-1}$  mM,  $8,08 \cdot 10^{-1}$  mM a deflação fica entre 0,003 no eixo  $V(\Delta\text{abs}/\text{min})$ . Porém, em todos os perfis, o valor de  $K_m$  permanece em 300  $\mu\text{M}$ , o mesmo valor observado, na curva controle, com ausência de inibidor. Portanto, quando se adiciona o GB-2a nas várias concentrações ocorre uma diminuição do valor de  $V_{\text{máx}}$ , mesmo em concentrações de substrato mais altas. Com esse cenário, afirma-se a ocorrência de inibição da enzima tirosinase pela presença do biflavonoide GB-2a, pois a enzima não consegue atingir a velocidade máxima e, um aumento de substrato não reverte a inibição (GRÁFICO 10).

No GRÁFICO 11A, quando se insere a variável tempo, é possível notar que, com a leitura a cada 10 minutos, com o aumento do tempo de incubação e constantes concentrações de enzima e substrato, não ocorre aumento da conversão do substrato em produto. Tem-se um comportamento parecido com o ácido kójico 500 $\mu\text{M}$ , as diversas concentrações do GB-2a utilizadas.

Esse comportamento de inibição concentração versus velocidade é melhor observado através do gráfico do duplo-recíproco de Lineweaver – Burk, que apresenta os valores inversos da concentração de substrato e velocidade, adquirindo uma configuração linear. Aqui, se identifica pela continuidade da reta controle (ausência de inibidor) um valor inverso da velocidade ( $1/v$ ) na altura de 200. Quando se insere o inibidor ocorre a modificação de  $1/v$  para outros valores, intersecções em outros pontos no eixo de  $1/v$ , gerando por consequência modificações na reta que passa a apresentar outras inclinações. Sendo possível evidenciar que as diversas concentrações do composto isolado provocam vários valores de velocidade inversa, com aumento nos valores inversos de velocidade ( $1/v$ ) e nenhuma mudança nos valores de  $K_m$ . Pelo prolongamento dessas retas

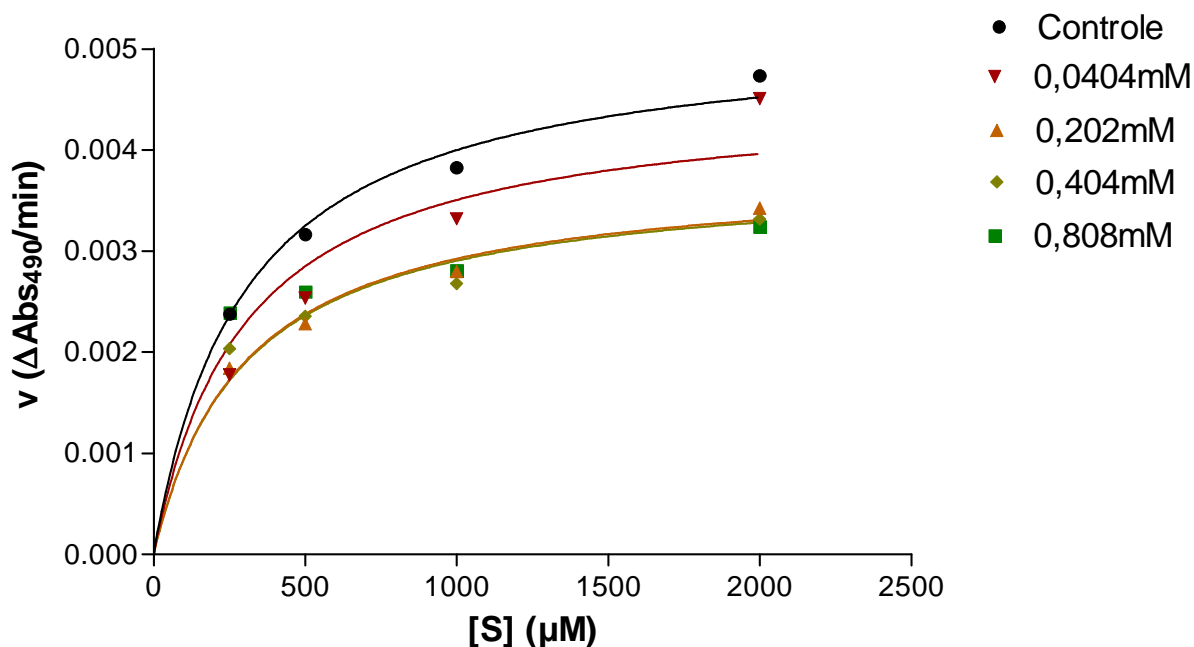
ocorrem várias intersecções em vários pontos do eixo  $1/[S]$ . Nesse tipo de gráfico com configuração linear onde a inclinação corresponde a relação  $K_m/V_{\text{máx}}$  e os valores plotados são os inversos dos reais, quanto maior a inclinação para cima, maiores serão os valores do eixo  $1/v$ , ou seja, menor a velocidade e, portanto, mais lenta se torna a reação enzimática (GRÁFICO 11B).

Todos esses parâmetros acima descritos estão sumarizados na TABELA 1.

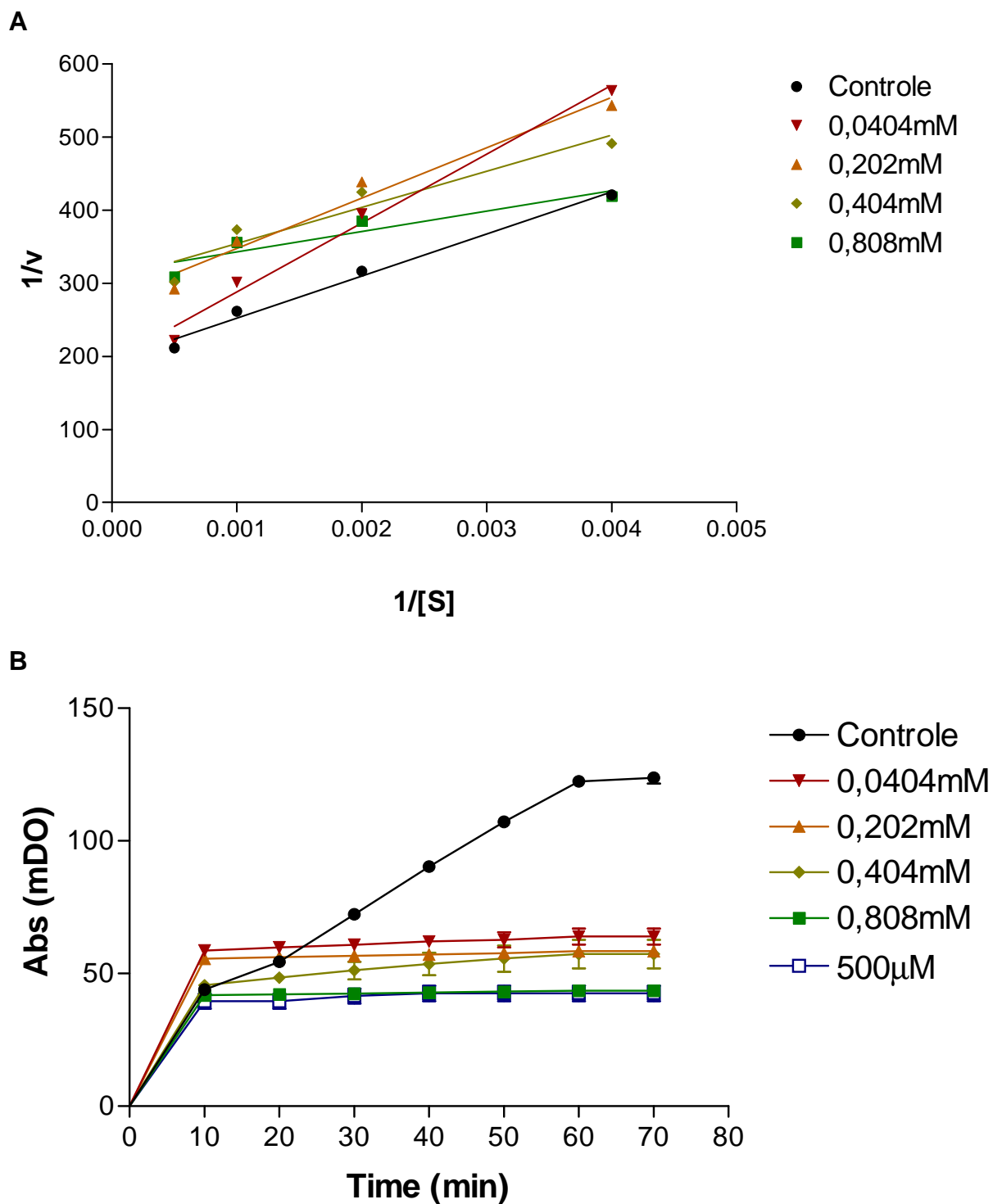
**TABELA 1** – Parâmetros cinéticos para o substrato L - tirosina

Grupos	$V_{\text{máx}}$ ( $\Delta\text{abs}/\text{min}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	Intersecção $1/v$	Intersecção $1/[S]$
Controle	$0,00520 \pm 0,0003$	$300,0 \pm 63,04$	$3.429 \pm 0.554$	$-0,001955$
GB-2a $4,04 \cdot 10^{-2}$ mM	$0,00456 \pm 0,0007$	$300,0 \pm 179,0$	$4.413 \pm 1.345$	$-0,002480$
GB-2a $2,02 \cdot 10^{-1}$ mM	$0,00380 \pm 0,0002$	$300,0 \pm 67,80$	$6.129 \pm 0.671$	$-0,004580$
GB-2a $4,04 \cdot 10^{-1}$ mM	$0,00378 \pm 0,0004$	$300,0 \pm 117,7$	$6.773 \pm 0.575$	$-0,005095$
GB-2a $8,08 \cdot 10^{-1}$ mM	$0,00324 \pm 0,0005$	$300,0 \pm 107,2$	$6.416 \pm 0.488$	$-0,007264$

FONTE: O autor



**GRÁFICO 10** - Velocidade de formação de dopaquinona em função da crescente concentração de L – tirosina com grupos: controle e GB-2a em diversas concentrações.



**GRÁFICO 11** – Lineweaver – Burk para inibição do GB-2a sobre a tirosinase purificada com substrato L – tirosina (A). Formação de dopaquinona com L – tirosina 1mM com tempo variável (B).

### 5.7.2 L-DOPA

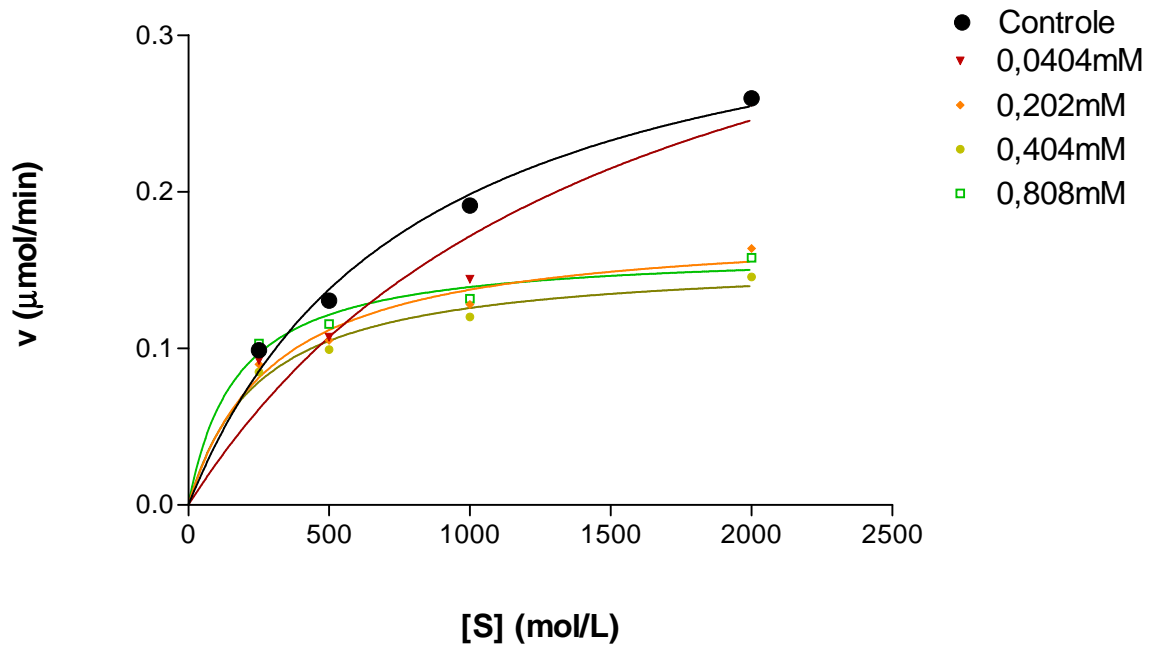
Pela característica da reação enzimática da tirosinase, primeiro agir sobre o substrato L - tirosina para formar L-DOPA, foi necessário avaliar o comportamento da enzima, frente ao segundo substrato, antes de formar a dopaquinona. Consequentemente, procedeu-se da mesma forma; porém, avaliando com concentrações crescentes de L-DOPA, na presença do biflavonoide GB-2a. No GRÁFICO 11A, a curva controle com aumentos sucessivos do substrato, alcança o platô de velocidade ( $V_{m\acute{a}x}$ ) em aproximadamente 0,35  $\mu\text{mol}/\text{min}$ , correspondendo à saturação de todos os sítios ativos da enzima e possuindo um  $K_m$  de aproximadamente 792 mol/L. Quando ocorre a inserção do GB-2a, em diversas concentrações, a velocidade de conversão substrato em produto é diminuída, o que é identificado pela queda, nos valores de velocidade de conversão do substrato em produto, menor formação de dopaquinona, composto colorido detectado pelo espectrofotômetro. Percebe-se modificações, com o substrato L-DOPA, nos valores de  $K_m$  em cada concentração de inibidor presente na reação, com valores de  $K_m$  distintos e mudanças na inclinação das curvas.

A fim de linearizar as curvas, foi delineado o gráfico de Lineweaver-Burk para L-DOPA (GRÁFICO 11B). As retas, que correspondem ao biflavonoide, em várias concentrações, interceptam o eixo em vários pontos e ainda, diferente da reta que define o comportamento enzimático da tirosinase para L-DOPA. Complementarmente, há várias intersecções no eixo  $1/[S]$  em pontos diferentes entre si. Com isso, é presumível que o GB-2a não é deslocado por aumentos de L-DOPA e inibe a enzima tirosinase na tarefa de conversão da L-DOPA; portanto, menor formação de dopaquinona.

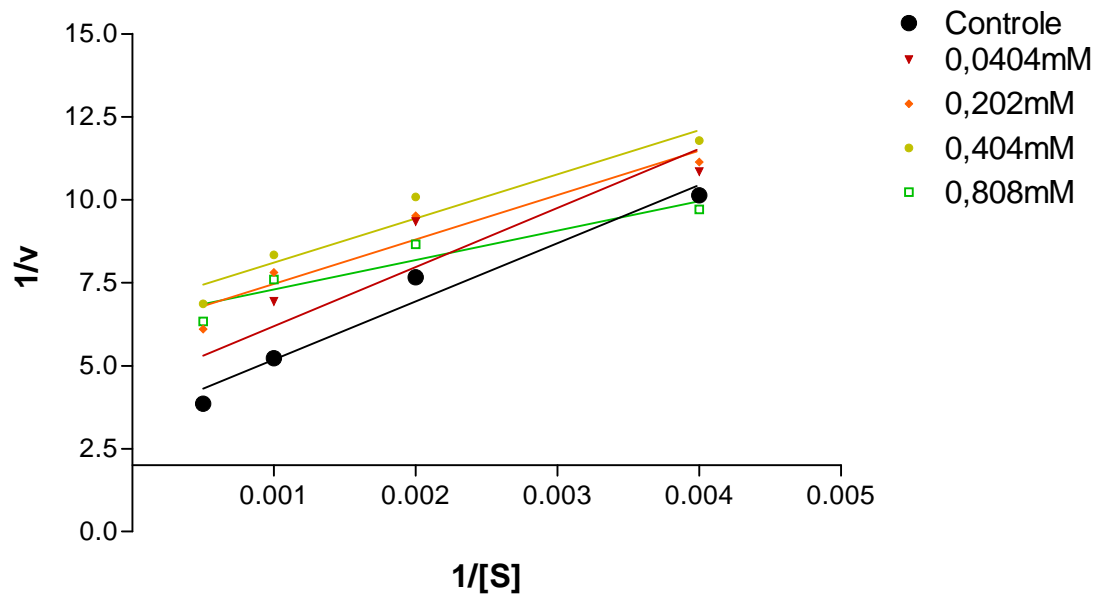
Todos esses valores para a cinética enzimática da enzima tirosinase para L-DOPA estão sumarizados na TABELA 2.



**A**



**B**



**GRÁFICO 12** – Velocidade de formação de dopaquinona em função da crescente concentração de L – DOPA com grupos: controle e GB-2a em diversas concentrações (A). Lineweaver – Burk para inibição do GB-2a sobre a tirosinase purificada com substrato L – DOPA (B)

**TABELA 2 –** Parâmetros cinéticos para o substrato L-DOPA

Grupos	V <sub>máx</sub> ( $\mu\text{mol/L}$ )	K <sub>m</sub> ( $\text{mol/L}$ )	Intersecção 1/v	Intersecção 1/[S]
Controle	0,35 $\pm$ 0,036	791,6 $\pm$ 186,8	3.429 $\pm$ 0.554	-0,001955
GB-2a 4,04.10 <sup>-2</sup> mM	0,43 $\pm$ 0,173	256,9 $\pm$ 128,8	4.413 $\pm$ 1.345	-0,002480
GB-2a 2,02.10 <sup>-1</sup> mM	0,18 $\pm$ 0,018	300,0 $\pm$ 105,3	6.129 $\pm$ 0.671	-0,004580
GB-2a 4,04.10 <sup>-1</sup> mM	0,16 $\pm$ 0,012	250,9 $\pm$ 71,2	6.773 $\pm$ 0.575	-0,005095
GB-2a 8,08.10 <sup>-1</sup> mM	0,16 $\pm$ 0,012	170,7 $\pm$ 58,5	6.416 $\pm$ 0.488	-0,007264

FONTE: O autor



## 6 DISCUSSÃO

A preocupação com a aparência da pele e o aumento da expectativa de vida da população leva as pessoas a estar sempre em busca da melhora de sua aparência, manutenção de uma pele saudável e também de coloração homogênea, pois o surgimento de manchas é um dos fatores depreciativos da pele.

A melanina possui um papel crucial no que diz respeito à proteção da pele contra os efeitos deletérios da radiação ultravioleta advinda do sol. Embora a melanina tenha essa função fotoprotetora, pode ocorrer um acúmulo anormal desse pigmento em diversas partes da pele, o que resulta em manchas hipercrômicas. A partir desse fenômeno, estudos têm sido realizados com o intuito de desvendar os principais mecanismos indutores dessas desordens de pigmentação e também pesquisar compostos com atividade bloqueadora da melanogênese exacerbada, muitos deles de origem natural e outros de fonte sintética (CHANG, T.S., 2009; CHOI, W., *et al.*, 2010).

O tratamento com agentes despigmentantes da pele, tanto do ponto de vista farmacológico como cosmetológico, deve oferecer eficácia e segurança sem o aparecimento de efeitos colaterais. O composto fenólico hidroquinona, um dos despigmentantes mais usados, com potente atividade supressora de melanócitos e consequentemente redutora de melanina, possui muitos efeitos citotóxicos e prejudiciais, por produzir um forte efeito oxidante, gerando subprodutos tóxicos no interior dos melanócitos, que podem causar uma despigmentação permanente. (DRAELOS, Z.D., 2007; HU, Z.M. *et al.*, 2009). O ácido kójico é utilizado como ativo dermatológico para clarear a pele hiperpigmentada, possui efeito adverso de sensibilização, causando, desta forma, dermatite, citotoxicidade e até mesmo câncer de pele, o que levou ao desuso em alguns países (NAKAGAWA, M. *et al.* 1995; SERRA-BALDRICH, E. *et al.*, 1998).

A espécie *Garcinia gardneriana* foi objeto de estudo para o presente trabalho, tendo em vista a crescente pesquisa em substâncias capazes de regular a melanogênese; espécies do gênero *Garcinia* já possuem atividade inibitória da tirosinase relatada. A espécie *Garcinia gardneriana* com rica constituição química em polifenóis, marcada pela presença de biflavonoides, dentre eles volkensiflona, fukugetina, I3-naringenin-II8-eriodictiol (GB-2a), GB-1a (I3-II8-binarigenin) com

estruturas moleculares mostradas na FIGURA 8 e pelo fato de a atividade reguladora da melanogênese ainda não ter sido estudada.

Primeiramente, o extrato hidroalcoólico da *Garcinia gardneriana* foi submetido a testes de viabilidade celular na linhagem B16F10, a fim de verificar a sua citotoxicidade. Como estas células apresentam resistência a tratamentos, característica de células tumorais (RUMJANEK *et al.*, 2001), pode-se concluir uma robustez nos resultados apresentados por esses testes. Um largo intervalo de concentrações de EHGG foi avaliado e apenas as concentrações mais altas (1000 e 300 µg/mL) usadas causaram efeitos deletérios às células, evidenciado pelo teste do MTT, o qual reflete funcionamento das mitocôndrias celulares. Estas organelas possuem enzimas responsáveis pela metabolização do sal. Essas, vitais para a respiração celular e síntese de adenosina trifosfato (ATP), consequentemente sobrevida da célula (PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M., 2001).

O ensaio do vermelho neutro foi realizado para melhor elucidação da citotoxicidade do EHGG. O vermelho neutro é um corante solúvel em água, que, ao atravessar a membrana plasmática, se concentra nos lisossomos de células vivas, fixando-se nos sítios aniônicos da matriz lisossomal por ligações eletrostáticas. Quando as células estão viáveis, sua membrana celular está intacta, conseguindo, desta forma, capturar o corante. Portanto, quantitativamente, uma maior absorbância lida é decorrente de maior número de células viáveis em comparação com o controle (DAGUANO *et al.*, 2007; SCHROTEROVA *et al.*, 2009).

No ensaio de citotoxicidade com o vermelho neutro, após tratamento com o EHGG, notou-se que as mesmas concentrações que provocam efeitos nocivos à linhagem celular B16F10, no ensaio do MTT, ocasionaram danos à membrana celular das células e, por consequência, ao sistema lisossomal, o que prejudica a homeostasia da célula como um todo, pois os lisossomos são responsáveis pela degradação de moléculas, reparo da membrana plasmática, ligação ao material endocitado (TURK, B.; TURK, V., 2009) e por sua vez, a membrana plasmática mantém moléculas no interior da célula e regula a entrada de moléculas, do meio extracelular, de forma seletiva (ALBERTS, B. *et al.*, 2006).

Com esses dois parâmetros avaliados – sistemas mitocondrial e lisossomal – pode-se afirmar que o EHGG nas concentrações de 1000 e 300µg/mL provocam efeitos tóxicos às células, assim não devem ser usados experimentalmente, por

induzirem a resultados falsos, sem validade, quando se trata de diminuição da atividade enzimática e produção de melanina pela célula.

LIM e cols. (2009), com o intuito de pesquisar o efeito do Arbutin na biossíntese de melanina (substância que provoca o clareamento de manchas hiperocrômicas), submeteram a linhagem celular B16F10 a várias concentrações da substância em estudo, numa faixa de 10 a 1000  $\mu\text{M}$  ao teste MTT para verificar a viabilidade celular e obteve que, nas concentrações de 10 a 250  $\mu\text{M}$  não houve citotoxicidade significativa. Já, nas concentrações de 500 e 1000  $\mu\text{M}$  houve sinais de citotoxicidade. Corroborando NAKAJIMA *et al.*, 1998 afirmam que o Arbutin, em cultura de células de melanoma humano em concentrações não-citotóxicas, diminuem a melanogênese, sem alterar os níveis de RNAm de tirosinase. Portanto, através desses ensaios de viabilidade celular é possível sustentar que, concentrações altas de substâncias como acima de 300  $\mu\text{g/mL}$  para *Garcinia gardneriana* e acima de 500  $\mu\text{M}$  para o arbutin são ponderadas como citotóxicos.

Na sequência dos ensaios de viabilidade celular, para investigar a ação do EHGG sobre a melanogênese, foi usado um modelo celular de cultivo *in vitro*; células B16F10 foram cultivadas na presença do extrato nas concentrações onde não houve citotoxicidade, com ausência de qualquer estímulo, apenas desenvolvendo a melanogênese espontânea, própria da linhagem de melanoma. Nesse experimento, as concentrações de extrato utilizadas tiveram uma importante inibição na produção de melanina de aproximadamente 30%; as células somente conseguiram produzir 70% de melanina, faixa inibitória semelhante ao ácido kójico ensaiado simultaneamente, que possui uso consagrado como ativo despigmentante, extensamente usado em cosméticos e produtos farmacêuticos, com propriedade testada e comprovada por LIM, J. T. (1999) o qual aplicou um gel, contendo ácido kójico, sobre a pele de pacientes com melasma, obtendo um clareamento de 60%, nas mulheres chinesas tratadas.

HANAMURA, T. e cols (2008) testaram a interferência na melanogênese espontânea do extrato de *Malpighia emarginata*, popularmente conhecida como acerola, uma planta rica em polifenóis, sobre a mesma linhagem B16F10, usada para testar o EHGG, obtiveram também atividade inibidora sobre o conteúdo de melanina produzido pelas células, numa faixa de concentração de extrato de 100 a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

Com a finalidade de mimetizar o que ocorre na estimulação da melanogênese com a radiação ultravioleta, radiação que regula a pigmentação da pele humana, a qual diretamente aumenta a expressão e atividade da tirosinase em melanócitos ou indiretamente estimula a liberação de fatores liberados pelos queratinócitos, que são os responsáveis por induzir o acúmulo de melanossomos em melanócitos (KIM, Y. J. *et al.*, 2005). E mais ainda, por ser provavelmente um dos maiores causadores de hiperpigmentação e seus efeitos diretos sobre a membrana de melanócitos serem a liberação de diacilglicerol e ácido araquidônico, os quais estão relacionados por desencadear processo inflamatório e como forma de resposta ocorrer bronzeamento e por também, indiretamente, induzir mitose de melanócitos, aumento de dendritos melanocitários (aumento de transferência de melanossomos para a unidade melano epidérmica) e a melanogênese induzida por radiação UV gerar fotodanos agudos e crônicos (GILCHREST, B. A. *et al.*, 1996, ABDEL-MALEK, Z. A. *et al.*, 2010) resolveu-se utilizar desse mecanismo indutor de melanogênese para estimular as células B16F10, o que revela sobremaneira a realidade. Com isso, quando a linhagem celular de melanoma de murino recebeu a radiação ultravioleta do tipo B na dose descrita, conforme a metodologia item 4.2.5.2, seguida de tratamento com o EHGG nas concentrações anteriormente determinadas como não citotóxicas, houve uma diminuição de síntese de melanina pelas células, as quais somente obtiveram 77% do conteúdo de melanina quando tratadas com a *Garcinia gardneriana*. Nesse mesmo ensaio, o ácido kójico apresentou uma inibição de 60%, porém, como relatado acima, esse ácido é portador de grande quantidade de efeitos colaterais, o que torna seu uso em terapia despigmentante limitado.

O mesmo efeito supressor da melanogênese ocorreu em estudo feito por SUH, K. S. *et al.* (2009) quando submeteram as células B16F10 ao extrato de sementes de *Euphorbia lathyris*, no qual houve uma diminuição da melanogênese quando comparado ao Arbutin.

COSTIN, G. E. e HEARING, V. J. (2007) em trabalho sobre a modulação da pigmentação da pele humana, em resposta ao estresse discute que o complexo melanócito – queratinócito responde a uma grande variedade de estímulos do meio ambiente, frequentemente de maneiras parácrina e/ou autócrinas, como a exposição à radiação ultravioleta que resulta em aumento da pigmentação, que ocorre em dois estágios: um escurecimento imediato e uma reação tardia de bronzeamento. O

escurecimento imediato é resultante da oxidação de melanina preexistente e redistribuição de melanossomos e a reação tardia, pela maior formação de melanina para prevenir posteriores exposições à radiação ultravioleta, que permanece até 3 a 5 dias, após a primeira exposição (ELLER, M. S.; GILCHREST, B. A., 2000).

Os melanócitos estão sob baixo grau de estresse oxidativo. Durante a biossíntese de melanina, um intermediário reativo é oxidado para formar a melanina pela via de acoplamento de radicais. A síntese de melanina resulta em geração de peróxido de hidrogênio, que, se inapropriadamente processado, pode levar à penetração de radicais hidroxila e outras espécies reativas de oxigênio. As reações de polimerização da melanogênese podem levar à formação do subproduto peróxido de hidrogênio. Dentro desse aspecto há várias reações oxidativas de precursores de melanina que são inibidas pela catalase, além disso, a geração de peróxido de hidrogênio durante a oxidação de precursores como DHICA e DHI tem sido demonstrado *in vitro*. Na pele humana, a tirosinase pode ser considerada como um sistema importante para a eliminação de espécies reativas de oxigênio por utilizá-los no processo da melanogênese (NAPPI, A. J.; VASS, E., 1996, LEE, *et al.*, 2010).

Espécies reativas de oxigênio podem causar danos oxidativo à pele e ocorrem regularmente, devido ao contato da mesma com oxigênio e exposição à radiação ultravioleta. Esses efeitos contribuem para o envelhecimento da pele. Assim, antioxidantes, com característica de serem sequestradores de radicais podem ter um efeito benéfico sobre a pele (PERLUIGI, M. *et al.*, 2003, LEE, *et al.*, 2010). Portanto, a planta *Garcinia gardneriana* com biflavonoides na sua composição, pode ser, supostamente, considerada com capacidade de resgatar essas espécies reativas de oxigênio, diminuindo possíveis danos oxidativos produzidos na pele quando expostas à radiação ultravioleta.

Suplementarmente ao estímulo por radiação ultravioleta é sabido que o efeito do hormônio  $\alpha$ -MSH induz à melanogênese, tanto em melanócitos de pele humana como em células de melanoma murino. Esse hormônio controla diversas funções como proliferação, síntese de eumelanina e produção de citocinas. A molécula do  $\alpha$ -MSH se liga ao receptor para melanocortina-1 que está na membrana do melanócito e via proteína G ativa adenilato ciclase que aumenta a concentração de AMPc intracelular, que, por consequência, aumenta o fator de transcrição microftalmia associado, o qual estimula o gene para expressão de tirosinase, aumentando a



produção de melanina em melanócitos humanos e melanócitos de murino (SCHWAHN, D. J. *et al.*, 2001, SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E., 2003). Por essas razões, o estímulo das células com  $\alpha$ -MSH, dissolvido no meio de cultivo, consegue precipitar condições semelhantes.

Quando as células B16F10 foram estimuladas com  $\alpha$ -MSH e tratadas com o EHGG, pode-se notar que houve uma diminuição da síntese de melanina naqueles grupos que receberam o tratamento com a planta em estudo nas concentrações 100, 30, 10, 3, 1  $\mu\text{g/mL}$ , sendo que, nas duas últimas concentrações citadas, a inibição foi superior ao ácido kójico, o que evidencia o grande potencial da planta *Garcinia gardneriana* em inibir a produção de melanina pelos melanócitos. Esse resultado é devido à penetração do EHGG nas células.

De acordo com LIN, H. C. e colaboradores (2008) em estudo, uma linhagem de melanócitos associada a uma linhagem de células epiteliais de carcinoma de ovário, modelo de co-cultura, que simula melanócitos mais queratinócitos da pele. Foi avaliado a presença do hormônio  $\alpha$  – MSH que aumenta a transferência de melanossomos dos melanócitos para os queratinócitos adjacentes e também o efeito de um inibidor de protease que afeta a distribuição desses melanossomos para as células vizinhas, o que provoca a diminuição da concentração de melanina nessas células. Portanto, um dos efeitos do  $\alpha$  – MSH, no meio com as células B16F10, é a tendência de aumentar a transferência de melanossomos, porém a presença do EHGG bloqueia algum dos mecanismos intracelulares de síntese de melanina e/ou transferência de melanina dentro dos melanossomos. Isso pode ser um dos fatores da diferença do conteúdo de melanina das células tratadas com o EHGG, das células que somente receberam o tratamento com o hormônio  $\alpha$  – MSH.

O papel do inibidor de protease do estudo de LIN, H. C. (2008) é pela sua provável atividade em receptores de protease – 2 de membrana de queratinócitos, que parecem estar envolvidos no processo de recebimento desses melanossomos e também pelos agentes despigmentantes poderem alterar essas condições de transporte e recebimento de melanossomos. Organelas possuidoras de melanina que têm seu conteúdo distribuído no citoplasma de células epidérmicas, para efetuar a pigmentação cutânea, proteção contra radiação ultravioleta e em alguns casos se acumular em regiões da pele, causando as manchas hiperocrômicas (HEARING, V. J.; YAMAGUCHI, Y., 2006).

Em experimento posterior, foi comprovado por meio do ensaio de MTT, que a diminuição no conteúdo de melanina das células tratadas com EHGG não foi devido a efeitos citotóxicos sobre a linhagem B16F10, pois as células se mantiveram viáveis até o término do experimento.

LEE, Y. S. (2010) usou o mesmo modelo, a linhagem celular B16F10, utilizando como estímulo o hormônio  $\alpha$ - MSH para aumentar a produção de melanina pelas células. Os pesquisadores também notaram que o grupo, no qual somente recebeu o hormônio houve um acréscimo da produção, chegando a aumentar a concentração de melanina intra e extracelular, porém nos grupos que receberam além do hormônio, a gliceolina, fitoalexina produto isolado da soja, que possui atividades: anti microbiana, anti estrogênica, houve uma diminuição de melanina intracelular e por conseguinte, extracelular. Através desse estudo puderam comprovar o potente efeito inibidor da melanogênese.

DING, H. Y. e colaboradores (2010) em estudo com o éster metilado do ácido rosmarínico isolado a partir do *Origanum vulgare* avaliaram a participação desse composto sobre células B16F10 após a indução da melanogênese pelo  $\alpha$  – MSH e certificaram-se que acontece uma diminuição no conteúdo de melanina produzido pelas células. Esse decréscimo está ligado às vias biossintéticas da melanogênese como a redução de expressão de: receptor de melanocortina – 1, fator de transcrição microftalmia associado, tirosinase, proteínas relacionadas à tirosinase (TRP – 1, TRP – 2) das células B16F10 e ainda, demonstraram que o composto do *Origanum vulgare* se apresentou mais efetivo na redução de melanina, quando comparados com o arbutin e ácido ascórbico e também mais seguro e menos tóxico que esses compostos já usados como despigmentantes, quando aplicados em cultura de fibroblastos.

SOLANO, F. e colaboradores (2006) em revisão de agentes despigmentantes discorrem sobre a dificuldade dos dermatologistas em tratar as desordens de hiperpigmentação e relata que, para que ocorra alguma supressão da melanogênese, os mecanismos devem passar por entre as vias bioquímicas que compõem a melanogênese, como inibição do receptor de melanocortina, supressão da atividade da tirosinase e proteínas relacionadas a tirosinase 1 e 2, inibição da maturação de melanossomos, inibição da ação do AMPc. Ainda para um resultado satisfatório deve ser feita uma associação de mais de um agente despigmentante

como estratégia clínica, isto é, combinação de terapias, com o intuito de aumentar a eficácia, diminuir o tempo de tratamento, e reduzir o risco de efeitos adversos. Explora também a riqueza do grupo fitoquímico, flavonoides em exercer a sua atividade sejam pela sua capacidade antioxidante e recrutadora de espécies reativas de oxigênio, ou pela possibilidade de quelar metais no sítio ativo de metaloenzimas, conseguindo então agir diretamente sobre a tirosinase ou na parte distal da via da melanogênese oxidativa.

Pela enzima tirosinase ser, na maioria das vezes, o foco central de trabalhos que envolvem o estudo da melanogênese e pela sua atividade essencial em biotransformar o aminoácido L – tirosina, primeiramente uma hidroxilação, para formar a 3,4 – dihidroxifenilalanina (L – DOPA), seguido de oxidação da L – DOPA para formar a dopaquinona (HEARING, V. J.; JIMENEZ, M., 1987) e pela inibição da melanogênese provocada pelo extrato de *Garcinia gardneriana* nos ensaios de conteúdo de melanina, pelos mecanismos acima expostos, não ser decorrente da citotoxicidade sobre as células B16F10, decidiu-se investigar a participação da tirosinase celular em todo esse processo. Para isso, foi usado como substrato a L – DOPA, etapa existente para a formação de melanina fisiologicamente, para verificar a capacidade de atividade da enzima das células de murino em fazer a oxidação para constituir a dopaquinona. Após o tratamento com o extrato de *Garcinia gardneriana* sobre as células, houve uma inibição da atividade enzimática em comparação com o controle que não recebeu o tratamento com o extrato. Pode-se afirmar que a planta em estudo diminuiu a ação enzimática, em aproximadamente 20%, deixando menos enzima disponível para fazer a conversão da L – DOPA, isso nas concentrações menores de extrato como: 10 a 0,1 µg/mL, portanto menor absorvância lida pela menor intensidade de dopaquinona formada e o ácido kójico conseguiu uma inibição de aproximadamente 59%.

Assim, com a diminuição do conteúdo de melanina formado pelas células B16F10 e a diminuição da ação da tirosinase nos grupos tratados com o extrato de *Garcinia gardneriana* pode-se declarar efetivamente que um possível mecanismo de diminuição da quantidade de melanina formada seja em função da ação da planta sobre a enzima tirosinase celular. Essa mesma conclusão foi tida por KIM, Y. J. (2007) quando testou o ácido gálico, composto fenólico, em ensaios de conteúdo de melanina e atividade da tirosinase celular de murino, estimando que a presença do

ácido gálico em cultura de células B16F10 podem diminuir a síntese de melanina, que se caracteriza pela inibição da tirosinase celular.

Para melhor visualização desse fenômeno de inibição provocado pelo EHGG, foi feita a avaliação do efeito do extrato em estudo sobre a tirosinase purificada retirada de cogumelos, pois SATO, K. e colaboradores (2008) obtiveram um resultado positivo para a inibição da melanogênese em células de murino B16F10 quando trataram-nas com ácido acetilsalicílico, porém quando testaram o ácido acetilsalicílico em tirosinase purificada não ocorreu inibição enzimática.

Contudo a tirosinase purificada, retirada de cogumelos, é frequentemente usada como um substituto da tirosinase humana a fim de se realizar um rastreamento de inibidores da tirosinase pela sua forma purificada ser comercialmente disponível. O uso dessa enzima pode ser problemático por ser um pouco diferente da forma humana em termos da sequência de aminoácidos (KLABUNDE, T. *et al.*, 1998; BRIGANTI, S. *et al.*, 2003; PARVEZ, S. *et al.*, 2007).

Em estudo realizado por AN e colaboradores (2010) é avaliado a diferença de comportamento de três tipos de enzimas: cogumelo, murino e humana. Discutem-se os dois substratos L-tirosina e L-DOPA e revela a fraca atividade inibitória do composto em estudo, o ácido cumárico, quando em ensaio com a tirosinase retirada de cogumelo e a forte atividade quando com enzimas tirosinase de murino e de humano em comparação com ácido kójico e arbutin e ainda, o ácido cumárico inibe a tirosinase humana em concentrações muito menores do que aquelas requeridas para a inibição de tirosinases de cogumelo e de murino.

A fim de tirar a prova, visto a atividade inibitória do EHGG em tirosinase de murino, foi realizado o ensaio com a enzima tirosinase purificada, cuja planta exerceu potente efeito inibitório em todas as concentrações usadas, chegando a uma inibição de 35% na concentração de 1000 µg/mL e o ácido kójico inibindo na faixa de 79%. Tanto o ensaio com a enzima purificada como o ensaio com a tirosinase de murino são capazes de revelar a capacidade inibitória de um agente sobre a tirosinase, visto os valores obtidos com o ácido kójico. Portanto, a expressão dos resultados para a planta *Garcinia gardneriana* podem ser considerados confiáveis, contudo, pode ser avaliada também a diferença na intensidade de inibição, por possuir uma maior inibição nas maiores concentrações de extrato usadas, quando se trata da enzima *in vitro* em comparação com uma menor inibição

nas concentrações menores de extrato, quando se trata da enzima de murino. Esse mesmo perfil foi analisado no estudo de AN e colaboradores (2010), onde o ácido cumárico exerceu atividade inibitória na tirosinase purificada com maior intensidade na concentração acima de 100 µg/mL e na tirosinase de murino nas concentrações menores que 100 µg/mL.

Outras espécies do gênero *Garcinia*, como o estudo realizado por MASUDA e colaboradores (2005) que fizeram um rastreamento de 39 plantas do litoral do Japão e dentre as que exibiram atividade inibitória da tirosinase estava a *Garcinia subelliptica*, que na concentração de 0,5 mg/mL exerceu uma inibição de 57% sobre a tirosinase. Nesse mesmo trabalho, a partir do extrato das folhas frescas da planta foram isolados dois compostos, que foram identificados por serem biflavonoides, um deles a fukugetina e o outro o GB-2a, biflavonoides, que tiveram sua estrutura química compreendida por LI, X. C. e colaboradores (2002), quando estudavam as sementes de *Rheedia acuminata*. Os biflavonoides do estudo de MASUDA e colaboradores (2005) quando foram ensaiados no ensaio da tirosinase purificada com a L – tirosina como substrato desempenharam: IC<sub>50</sub> de 2,5 µM para a fukugetina e IC<sub>50</sub> de 26 µM para o GB-2a.

Por todo o desenvolvimento do trabalho estar diante de uma inibição da melanogênese provocado pelo extrato de *Garcinia gardneriana*, e esse extrato ter sido feito a partir das folhas e nas folhas haver uma grande quantidade de biflavonóides, dentre eles, o composto isolado biflavonoide GB-2a, decidiu-se avaliar a sua participação em todo esse processo. Para tanto foi avaliado a ação do GB-2a em melanogênese espontânea, decorrido o tempo de tratamento com o composto em meio de cultura nas diversas concentrações de 0,1 nM a 100 nM. Obteve-se uma inibição na faixa de 50%, um considerável potencial de inibição e ainda, não provocou efeitos citotóxicos nessas concentrações utilizadas. É possível assegurar que o tratamento com o biflavonoide GB-2a diminui a síntese de melanina pela célula.

Quando o GB-2a foi submetido ao ensaio enzimático com a tirosinase purificada provocou uma inibição de 30% em média com as concentrações testadas comparado ao controle, o que indica um potente efeito inibitório sobre a tirosinase purificada. A diferença de inibição pelos dois métodos pode ser explicada devido ao fato da diferença conformacional das duas enzimas de espécies diferentes e

possivelmente pela concentração do GB-2a ou qualquer outro composto isolado, quando em ensaios enzimáticos *in vitro* necessitar de valores maiores, na faixa de  $\mu\text{M}$  ou  $\mu\text{g/mL}$ . Para sustentar essa última afirmativa, MOMTAZ, S. e colaboradores (2008) em estudo com compostos fenólicos isolados a partir de *Sideroxylon inerme*, uma galato epigallocatequina, com estrutura fenólica, característico de flavonóides, relata a significativa atividade inibitória sobre a tirosinase desta galato epigallocatequina, tanto em ensaio enzimático com a tirosinase purificada como em ensaio de conteúdo de melanina, a fim de verificar a sua participação na melanogênese, só que a galato epicatequina apresentou uma  $\text{IC}_{50}$  de  $30 \mu\text{g/mL}$  ( $65,5 \mu\text{M}$ ) de inibição sobre a enzima purificada, deste modo uma concentração maior usada no experimento de mesma categoria.

O composto biflavonoide GB-2a possui os anéis aromáticos e a presença de oxigênios na sua estrutura, característico de flavonoides. KIM, Y. J. e colaboradores (2005; 2006) mencionam que a atividade inibitória da tirosinase pode estar relacionada com a estrutura fenólica, relatam que o anel fenólico é importante na demonstração de atividade inibitória da tirosinase. E em outro estudo, com o ácido gálico é citado que as hidroxilas também podem mostrar essa atividade inibitória (KIM, Y. J., 2007). Então, a estrutura química do GB-2a apresenta essas duas características em duplicidade por ser um biflavonoide, logo sua atividade inibitória pode ser relacionada com esse aspecto estrutural.

Para examinar a inibição exercida pelo GB-2a, exposto na seção dos resultados, referente à cinética enzimática, permite-se comentar que a tirosinase é uma enzima que necessita de íon metálico para a sua atividade, o qual pode desempenhar um papel estrutural ou funcionar como um ácido de Lewis e também que os metais quelam o substrato, facilitando sua ligação, o que forma um complexo ligado por metal, que promove uma catálise eletrofílica no sítios de clivagem. Além do papel na ligação de enzima e substrato, metais podem se ligar diretamente à enzima para estabilizá-la em sua conformação ativa, ou talvez induzir a formação de um sítio ativo (WEINER, H., 2007). A enzima tirosinase possui um sítio ativo com dois átomos de cobre, cobre A e cobre B, assumindo que a L – tirosina se liga no sítio do cobre A e a L – DOPA se liga em ambos, cobre A e cobre B (KLABUNDE, T. *et al.*, 1998; DECKER, *et al.*, 2006; LAND, E. J. *et al.*, 2008).

Para avaliar a participação do GB-2a na cinética enzimática da tirosinase, decidiu-se verificar a sua participação quando em meio reacional com o substrato L - tirosina em concentrações crescentes e o biflavonoide com as concentrações na faixa de  $4,04 \cdot 10^{-2}$  a  $8,08 \cdot 10^{-1}$  mM. A tirosinase quando em presença do inibidor GB-2a em concentrações aumentadas tem a sua velocidade de reação diminuída e o aumento da concentração da L – tirosina não desloca o inibidor, o que seria característico de uma inibição reversível. Como para o estudo das reações de cinética enzimática, o tempo é um fator fundamental e por essa variável evidenciar o desaparecimento de substrato e o aparecimento do produto numa reação normal enzima – substrato (WEINER, H., 2007), decidiu-se incluir a variável tempo para deflagrar o curso das reações em presença do inibidor em várias concentrações com leitura a cada intervalo de 10 minutos e aumentando o tempo de reação para uma hora e 10 minutos. É percebido, nessa situação, que não ocorre deslocamento do inibidor, este não é consumido e não aparece o produto dopaquinona que seria detectado pelo espectrofotômetro.

Através da análise do gráfico duplo recíproco Lineweaver-Burk que lineariza as curvas do gráfico, concentração de substrato versus velocidade de reação, é possível avaliar que o GB-2a não compete com o substrato pelo sítio ativo da enzima, mas pode se ligar a outro lugar da enzima, constituindo uma situação mais complicada, o inibidor GB-2a se liga tanto à enzima livre como ao complexo enzima-substrato. WEINER, H. (2007) afirma que este modo de ligação leva a uma inibição de atividade mesmo em concentrações elevadas de substrato. Graficamente pode-se notar que: a enzima é impedida de converter o substrato pela diminuição da densidade óptica que deflagraria a presença do produto; uma concentração alta de substrato não conseguiria deixar toda a enzima na forma produtiva enzima-substrato; diminuição do valor de  $V_{m\acute{a}x}$ ; intersecções em vários pontos do eixo  $1/v$ ; praticamente não há mudança no valor de  $K_m$  mostrado no QUADRO 1. Pode-se atestar que o biflavonoide GB-2a quando em presença da L – tirosina exerce uma inibição do tipo não competitiva.

Numa segunda instância, quando o biflavonoide GB-2a está no meio reacional com o substrato L – DOPA para verificar sua ação sobre a tirosinase, a situação se modifica, pois aqui o delineamento do gráfico assume outro comportamento. Porém, ao avaliar o gráfico de concentração de substrato versus

velocidade de reação, a presença do biflavonoide GB-2a também provoca uma diminuição nos valores de velocidade, a enzima não consegue fazer a conversão de L – DOPA em dopaquinona, ocorre, realmente, uma inibição enzimática, mesmo aumentando a quantidade de substrato no meio reacional. Para assegurar, com certeza, a natureza de inibição é preciso observar o gráfico duplo recíproco de Lineweaver – Burk. Percebe-se os seguintes aspectos: a presença do inibidor diminui verdadeiramente a velocidade de reação; as retas que mostram o perfil de reação específico para cada concentração de inibidor se apresentam de forma mais ou menos paralelas umas às outras e em relação ao controle (ausência de inibidor); as retas cortam o eixo  $1/v$  em vários pontos; o valor de  $K_m$  muda para cada reação conforme mostrado no QUADRO 2. Todos esses requisitos expostos indicam um tipo de inibição incompetitiva (WEINER, H., 2007), que se caracteriza pelo inibidor, biflavonoide GB-2a, o qual se liga ao complexo enzima – substrato, em lugar da enzima livre.

Os dois comportamentos acima descritos para cada substrato L – tirosina e L – DOPA em relação ao biflavonoide GB-2a podem ser classificados de comportamento de reação de inibição enzimática do tipo mista; logo para reverter essa inibição deve ser retirado o composto inibidor do meio reacional. Nesses dois tipos, o inibidor se liga num sítio diferente do sítio ativo do substrato, o mesmo se liga à enzima livre ou ao complexo enzima – substrato e, conforme LEHNINGER, A. L. *et al.*, 2006 esse comportamento duplo acontece na prática com enzimas com dois ou mais substratos, que é o caso da tirosinase.

NESTEROV, A. e colaboradores (2008) relatam que os vários inibidores de tirosinase existentes possuem inibição do tipo competitiva como ácido kójico, ácido azelaico, Arbutin, hidroquinona; e aqueles, com inibição não competitiva são o ácido elágico, glabridina e oxiresveratrol. MORIMURA, K. e colaboradores (2009) ao estudarem a relação estrutura – atividade de um metabólito do fungo *Daedalea dickinsii*, notaram que uma hidroxila e um grupo carboxila do substrato L – tirosina poderia adotar conformações espaciais similares às duas hidroxilas do metabólito em estudo, o qual possuiu uma potente supressão da hidroxilação da L – tirosina em baixas concentrações pela tirosinase, caracterizado de inibição competitiva pela cinética enzimática. Já, uma mistura racêmica desse metabólito demonstrou uma fraca atividade inibitória da tirosinase.



Em estudo com um bisfenol, KIM, Y. J. e colaboradores (2005) expõem que a substância em estudo também apresenta um comportamento de inibição enzimática do tipo competitiva da tirosinase em relação ao substrato L – tirosina, que pode ser em função dos grupos hidroxila e um par de elétrons que podem ser doados na posição *para*- serem um requisito primário para agir como substrato alternativo em relação a L – tirosina para a tirosinase.

Portanto, cabe uma observação, que quanto maior a similaridade estrutural do composto em estudo com o substrato, maior será a chance de se ter uma inibição competitiva. Ao analisar a estrutura química do GB-2a é notável seu tamanho espacial e a marcante presença de grupos hidroxilas livres, o que provavelmente suplanta ao espaço do sítio ativo enzimático e explica também o tipo de inibição enzimática provocado, cuja ligação ocorre na enzima livre ou no complexo enzima – substrato.

As inibições demonstradas pelo GB-2a e o extrato da *Garcinia gardneriana* no ensaio enzimático são melhor evidenciadas com o perfil de inibição da produção de melanina quando testado em células B16F10 na melanogênese espontânea e ainda, com o extrato de *Garcinia gardneriana* nos ensaios de melanogênese induzida por radiação ultravioleta e pelo  $\alpha$  – MSH. Portanto, o GB-2a pela sua segurança evidenciada no ensaio de viabilidade celular e a sua baixa concentração de uso, comparando com os efeitos adversos provocados por compostos despigmentantes, comumente usados no tratamento de manchas hiperocrômicas e seu marcante efeito inibitório da tirosinase, pode ser considerado um composto despigmentante promissor para uso cosmético e aplicações clínicas.



## 7 CONCLUSÃO

De acordo com os estudos e experimentos realizados nas condições disponíveis para esse trabalho:

- a) O extrato hidroalcoólico das folhas de *Garcinia gardneriana* apresenta atividade inibitória da melanogênese sobre a linhagem de melanoma murino B16F10 evidenciado nos ensaios de conteúdo de melanina por melanogênese espontânea e induzidos por radiação ultravioleta e pelo  $\alpha$  – MSH;
- b) O extrato hidroalcoólico das folhas de *Garcinia gardneriana* não diminui a viabilidade celular da linhagem de melanoma murino B16F10 nas concentrações utilizadas para os ensaios de conteúdo de melanina;
- c) O extrato hidroalcoólico das folhas de *Garcinia gardneriana* possui atividade inibitória sobre as tirosinases celular e purificada;
- d) A inibição da tirosinase celular nas concentrações menores de extrato e em todas as concentrações usadas para o ensaio com a tirosinase purificada, pode ser devido à diferença de inibição provocada pelas diferentes tipos de tirosinases dentre as espécies;
- e) O biflavonoide GB-2a exerce atividade inibitória da melanogênese sobre a linhagem de melanoma murino B16F10 evidenciado no ensaio de conteúdo de melanina por melanogênese espontânea;
- f) O biflavonoide GB-2a inibe a atividade da tirosinase exercendo uma inibição mista, que para o substrato L – tirosina é tipo não competitiva e para L – DOPA é tipo acompetitiva. Isso ocorre quando o inibidor se liga à enzima num sítio próprio de ligação, a qual pode estar ligada simultaneamente ao substrato. Esse tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor.
- g) Estes resultados indicam que o biflavonoide isolado possui um efeito mais pronunciado em inibir a tirosinase que os flavonóides, portanto, sua aplicabilidade para despigmentante de pele é justificável.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-MALEK, Z., SCOTT, M. C., ITARU, S., TADA, A., IM, S., LAMOREUX, L., ITO, S., BARSH, G., HEARING, V. J., The Melanocortin-1 Receptor is a Key Regulator of Human Cutaneous Pigmentation. **Pigment Cell Research**, v.13, supl. 8, p. 156-162, 2000.

ABDEL-MALEK, Z., KADEKARO, A. L., SWOPE, V. B. Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. **Pigment Cell Melanoma Research**, v.23, p. 171–186, 2010.

ABIHPEC. Disponível em:  
<[http://www.abihpec.org.br/conteudo/Panorama\\_do\\_setor\\_20092010\\_Portugues\\_12\\_04\\_10.pdf](http://www.abihpec.org.br/conteudo/Panorama_do_setor_20092010_Portugues_12_04_10.pdf)>. Acesso em: 10.10.2010

ALAPPATT, C., JOHNSON, C. A., CLAY, K. L., AND TRAVERS, J. B., Acute keratinocyte damage stimulates platelet-activating factor production. **Archives of Dermatological Research**, v. 292,nº5, p. 256-259, 2000.

ALBERTS. B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WATSON, J. D. **Fundamentos da Biologia Celular**. 2ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2006.

AN, S. M.; KOH, J. S.; BOO, Y. C. *p*-coumaric acid not only inhibits human tyrosinase activity *in vitro* but also melanogenesis in cells exposed to UVB. **Phytoterapy Research**, v.24, p. 1175 – 1180, 2010.

ANCANS, J., TOBIN, D.J., HOOGDUIJN, M.J., SMIT, N.P., WAKAMATSU, K., THODY, A.J., Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/phaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Experimental Cell Research**, v. 268, p. 26–35, 2001.

ANDO, H., KONDOH, H., ICHIHASHI, M., HEARING, V.J. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. **Journal of Investigative Dermatology**, v.127, p. 751-761, 2007.

ANDRADE, M.S, SAMPAIO, T.S., NOGUEIRA, P.C.L., RIBEIRO, A.S., BITTRICH, V., AMARAL, M.C.E. Volatile compounds from leaves and flowers of *Garcinia macrophylla*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 43, nº2, p. 221-224, 2007.

BHATIA, S.K., YETTER, A. B. Correlation of visual cytotoxicity ratings of biomaterials with quantitative in vitro cell viability measurements. **Cell Biology and Toxicology**, v. 24, p. 315-319, 2008.

BARBOSA, W., CHAGAS, E. A., MARTINS, L., PIO, R., TUCCI, M. L. S., ARTIOLO, F. A., Germinação de sementes e desenvolvimento inicial de plântulas de achachairu. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal – São Paulo, v.30, n.1, p.263-266, 2008.

BERNHARD, D.; SCHWAIGER, W.; CRAZZOLARA, R.; TINHOFFER, I.; KOFLER, R.; CSORDAS, A. Enhanced MTT-reducing activity under growth inhibition by resveratrol in CEM-C7H2 lymphocytic leukemia cells. **Cancer Lett.**, v. 195, p. 193 – 199, 2003.

BERTOLOTTO, C.; BUSCÀ, R.; ABBE, P.; BILLE, K.; ABERDAM, E.; ORTONE, J.P.; BALLOTTI, R. Different *cis*-Acting Elements Are Involved in the Regulation of TRP1 and TRP2 Promoter Activities by Cyclic AMP: Pivotal Role of M Boxes (GTCATGTGCT) and of Microphthalmia. **Mol. Cell Biol.**, v. 18, p. 694 – 702, 1998.

BERSON, J. F.; HARPER, D. C.; TENZA, D.; RAPOSO, G., MARKS, M. S. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. **Mol. Cell Biol.**, v.12, p. 3451–3464, 2001.

BOTTA, B., MAC-QUHAE, M. M., DELLE MONACHE, G., DELLE MONACHE, F., DEMELLO, J. F., Chemical investigation of the genus *Rheedia*. V: Biflavonoids and xanthochymol. **Journal of Natural Products**, v. 47, p.1053, 1984.

BUSCÀ, R., BALLOTTI, R. Cyclic AMP a Key Messenger in the Regulation of Skin Pigmentation. **Pigment Cell Research**, v.13, p. 60 – 69, 2000

BRAZ FILHO, R., CAVALCANTE DE MAGALHÃES, G.,GOTTLIEB, O.R., Xanthoness of *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 9, p. 673, 1970.

BRIGANTI, S.; CAMERA, E.; PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigment Cell Research**, v. 16, p. 101 – 110.

CASTARDO, J.A. **Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos.** 136 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2007.

CASTARDO, J.A. *et al.* Anti-inflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **Journal of Ethnopharmacology**, Irlanda, v. 118, p. 405 – 411, 13 de agosto de 2008.

CAYMANCHEM. Disponível em: [www.caymanchem.com](http://www.caymanchem.com). Acesso 02.11.2010.

CECHINEL FILHO, V., *et al.*, 13-naringenina-118-4\_-OMe-eriodictyol: a new potential analgesic agent isolated from *Rheedia gardneriana* leaves. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55, p. 820–823, 2000.

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

CHAWLA, S.; DELONG, M.A.; VISSCHER, M.O.; WICKET, R.R.; MANGA, P. BOISSY, R.E. Mechanism of tyrosinase inhibition by deoxyArbutin and its second-generation derivatives. **British Journal of Dermatology**, v. 159, p. 1267-1274, 2008.

CHEMBLINK. **Chemical Listing of Kojic acid**. Disponível em: <http://www.chemblink.com/products/501-30-4.htm>. Acesso 01.11.2010.

CHEMISTRY. Disponível em: [www.chemistry.about.com](http://www.chemistry.about.com). Acesso 02.11.2010

CHEN, L.G.; CHANG, W. L.; CHIA, J.L.; LEE, T.L.; CHWEN, M. S.; WANG, C. C. Melanogenesis inhibition by gallotannins from chinese galls in B16 mouse melanoma cells. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 1447—1452, 2009.

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

CHU, D., Development and structure of skin. In: WOLF, K. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. New York: McGraw-Hill, 2008, p. 57-73.

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

DAGUANO, J. K. M. F., SANTOS, C., ROGERO, S.O., Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvida para uso em sistemas de implantes. **Revista Matéria**, v. 12, n. 11, p. 134 – 139, 2007.

DECKER, H., SCHWEIKARDT, T., TUCZEK, F. The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered? **Angew Chem Int Ed Engl.**, v. 45, p. 4546–4550, 2006.

DELLE MONACHE, G., BOTTA, B., Chemical investigation of the genus *Rheedia*, IV. Three new xanthenes from *Rheedia brasiliensis*. **Journal of Natural Products**, v.47, p. 620–625, 1984.

DELLE MONACHE, G., DELLE MONACHE, F., BETTOLO, G.B.M., Chemical investigation of the genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 655–659, 1983.

DELLE MONACHE, G. *et al.*, Minor xanthenes from *Rheedia gardneriana*. **Phytochemistry**, v. 23, p. 1757–1759, 1984.

DERMATOLOGIA. Disponível em:  
[http://www.dermatologia.net/novo/base/atlas/melanoses\\_solares2.shtml](http://www.dermatologia.net/novo/base/atlas/melanoses_solares2.shtml),  
<http://www.dermatologia.net/novo/base/atlas/fotoenvelhec.shtml>. Acesso em  
01.11.2010.

DING, H. Y., CHOU, T. H., LIANG, C. H., Antioxidant and antimelanogenic properties of rosmarinic acid methyl ester from *Origanum vulgare*. **Food Chemistry**, v. 123, p. 254 – 262, 2010.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J.B. **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology**. John Wiley & Sons Ltd: Chichester, 1998.

DUVAL, C., SMIT, N. P. M., KOLB, A. M., RE'GNIER, M., PAVEL, S., SCHMIDT, R., Keratinocytes control the pheo/eumelanina ratio in cultured normal human melanocytes. **Pigment Cell Research**, UK, v.15, supl. 6, p. 440-446, 2002.

DRAELOS, Z. D. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. **Dermatologic Therapy**, v. 20, p. 308 – 313, 2007.

ELLER, M. S., GILCHREST, B. A. Tanning as part of the eukaryotic SOS response. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 248 – 252, 2000.

ESPÍN, J.C.; WICHES, H.J. Effect of captopril on mushroom tyrosinase activity *in vitro*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 289-300, 2001.

FISHER, A. A. Leukoderma from bleaching creams containing 2% hydroquinone. **Contact Dermatitis**, v. 8, p. 272–3, 1982.

FORSLIND, B. The skin: upholder of physiological homeostasis. A physiological and (bio) physical study program. **Thrombosis Research**, v.80, n.1, p. 1-22, 1995.

FULLER, B.B., SPAULDING, D.T., SMITH, D.R. Regulation of the catalytic activity of preexisting tyrosinase in black and Caucasian human melanocyte cell cultures. **Experimental Cell Research**, v. 262, p. 197–208, 2001.

FREEBERG, I. **Keratinocytes**. Disponível em:<  
<http://www.aad.org/education/students/Keratinocytes.htm>>. Acesso em: 15 setembro, 2010.

GARCIA, E. S. Biodiversity, biotechnology and health. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, 11(3): 495-500, Jul/Sep, 1995.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Tratado de Histologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2ª edição, p 265–276, 2001.

GILCHREST, B. A., PARK, H. Y., MARK, M. S., YAAR, M. Mechanism of ultraviolet light - induced pigmentation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 63, n. 1, p. 1 – 10, 1996.

GUIMARÃES, C.L., OTUKI, M. F., BEIRITH, A., CABRINI, D.A., Uma revisão sobre o potencial terapêutico da *Garcinia gardneriana*—NA. **Dynamis Revista Tecnológica**, v. 12, p. 6–12, 2004.

HAAKE, A.; HOLBROOK, K. The structure and development of skin. In: FITZPATRICK, T. B. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. New York: McGraw-Hill, 1999, p. 70–114.



HANAMURA, T., UCHIDA, E., AOKI, H. Skin-lightening effect of a polyphenol extract from acerola (*Malpighia emarginata* DC) fruit on UV-induced pigmentation. **Bioscience Biotechnological Biochemistry**, v. 72, n. 12, p. 3211 – 3218, 2008.

HEARING, V. J.; JIMENEZ, M. Mammalian tyrosinase – the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation, **Int. J. Biochem.**, v. 19, p. 1141 – 1147, 1987.

HEARING, V.J.; TSUKAMOTO, K., Enzymatic control of pigmentation in mammals. **The FASEB Journal**, v.5, p. 2902-2909, 1991.

HEARING, V.J. The regulation of melanin formation. In: NORDLUND, J.J. *et al.* **The Pigmentary System: Physiology and Pathophysiology**. Massachusetts: Blackwell Publishing, 2006, 2ª edição, p. 191 – 212.

HEARING, V. J., YAMAGUCHI, Y. Melanocyte distribution and function in human skin: Effects of ultraviolet radiation. In: HEARING, V. J., LEONG, S. P. L. **From Melanocytes to Melanoma: The Progression to Malignancy**. New Jersey: Humana Press, 2006, p. 101 – 115.

HOSOI, A. J.; SUDA, K. T., Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. **Cancer Res.**, v. 45, p. 1474-1478, 1985.

HU, Z.M.; ZHOU, Q.; LEI, T.C.; DING, S. F.; XU, S. Z., Effects of hydroquinone and its glucoside derivatives on melanogenesis and antioxidation: Biosafety as skin whitening agents. **Journal of Dermatological Science**, v. 55, p. 179-184, 2009.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H. Chemical analysis of melanins and its application to the study of the regulation of melanogenesis. **Pigment Cell Res.**, v.13, n. 8, p. 103-109, 2000.

ITOH, K., HIRATA, N., MASUDA, M., NARUTO, S., MURATA, S., WAKABAYASHI, K., MATSUDA, H. Inhibitory effects of *Citrus hassaku* extract and its flavanone glycosides on melanogenesis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 32, nº3, p. 410-415, 2009.

KATSAMBAS, A.D.; STRATIGOS, A.J., Depigmenting and Bleaching Agents: Coping with Hyperpigmentation. **Clinics in Dermatology**, v.19, p. 483-489, 2001.

KESSEL, RICHARD G. **Histologia Médica Básica: A biologia das células, tecidos e órgãos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001, p. 318 – 331.

KIM, Y.M.; YUN, J.; LEE, C.K.; LEE, H.; MIN, K.R.; KIM, Y. Oxyresveratrol and hydroxystilbene compounds. Inhibitory effect on tyrosinase and mechanism of action. **J. Biol. Chem.** v. 277, p. 16340-16344, 2002.

KIM, D.S.; PARK, S. H.; KWON,S.B.;JOO, Y.H.; YOUN, S.W.; SOHN, U.D.; PARK, K.C. Temperature Regulates Melanin Synthesis in Melanocytes. **Archives Pharmacal Research**, v. 26, nº 10, p. 840-845, 2003.

KIM, Y.J.; NO, J.K.; LEE, J.H.; CHUNG, H. Y. 4,4'- Dihydroxybiphenyl as a new potent tyrosinase inhibitor. **Biol. Pharm. Bull.**, v.28, p. 323 – 327, 2005.

KIM, Y. J.; NO, J. K.; LEE, J. S.; KIM, M. S.; CHUNG, H. Y. Antimelanogenic activity of 3,4 – dihydroxyacetophenona: inhibition of tyrosinase and MITF. **Bioscience Biotechnological Biochemistry**, v. 70, p. 532 – 534, 2006.

KIM, D.S.; JEONG, Y.M.; PARK, I.P.;HAHN, H.G.; LEE, H.K.; KWON, S.B.; JEONG, J.H.; YANG, S.J.; SOHN, U.D.; PARK, K.C. A new 2-imino-1,3-thiazoline derivative, KHG22394, inhibits melanin synthesis in mouse B16 melanoma cells. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, suppl. 1, p. 180-183, 2007.

KLABUNDE, T.; EICKEN, C.; SACCHETTINI, J. C.; KREBS, B. Crystal structure of a plant catechol oxidase containing a dicopper center. **Nat. Struct. Biol.**, v. 5, p. 1084 – 1090, 1998.

KUSHIMOTO, T.; BASRUR, V.; VALENCIA, J.; MATSUNAGA, J.; VIEIRA, W. D.; FERRANS, V. J.; MULLER, J.; APPELLA, E., HEARING, V. J. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v.98, p. 10698–10703, 2001.

LAND, E. J., RAMSDEM, C. A., RILEY, P. A., STRATFORD, M. R. Evidence consistent with the requirement of cresolase activity for suicide inactivation of tyrosinase. **Tohoku J Exp Med**, v . 216, p. 231–238, 2008.

LAPEERE, H. *et al.* Hypomelanoses and hypermelanoses. In: Fitzpatrick, T. B. *et al.* **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. New York: McGraw-Hill, p. 622-640, 1999.

LEE, J., JUNG, E., LEE, J., HUH, S., BOO, Y. C., KIM, Y. S., PARK, D., Mechanism of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3 (2H)-furanone. **British Journal of Dermatology**, v. 157, p. 242-248, 2007.

LEE, M.Y.; KIM, J.H.; CHOI, J.N.; KIM, J.; HWANG, G.S.; LEE, C.H. The melanin synthesis inhibition and radical scavenging activities of compounds isolated from the aerial part of *Lespedeza cyrtobotrya*. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v.20, n.º. 6, p. 988 – 994, 2010.

LEE, Y. S., KIM, H. K., LEE, K. J., JEON, H. W., CUI, S., LEE, Y. M., MOON, B. J., KIM, Y. H., Inhibitory effect of glyceollin isolated from soybean against melanogenesis in B16 melanoma cells. **BMB reports.**, v. 43, p. 461 – 467, 2010.

LE MELLAY-HAMON, V.; CRITON, M. Phenylethylamide and Phenylmethylamide Derivatives as New Tyrosinase Inhibitors. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.32, n.º. 2, p. 301-303, 2009.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 4ªedição, São Paulo: Ed. Sarvier, 2006.

LI, X.; GUO, L.; SUN, Y.; ZHOU, J.; GU, Y.; LI, Y.; Baicalein inhibits melanogenesis through activation of the ERK signaling pathway. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 25, p. 923-927, 2010.

LI, X. C.; JOSHI, A. S.; TAN, B.; EHSOHL, H. N.; WALKER, L. A.; ZJAWIONY, J. K.; FERREIRA, D. Absolute configuration, conformation, and chiral properties of flavanone-(3→8'')-flavone biflavonoids from *Rheedia acuminata*. **Tetrahedron**, v. 58, p. 8709 – 8717, 2002.

LIM, J.T. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatologic Surgery**, v. 25, n.º4, p. 282 – 284, 1999.

LIM, Y. J., LEE, E. H., KANG, T. H., HA, S. K., OH, M. S., KIM, S. M., YOON, T. J., KANG, C., PARK, J. H., KIM, S. Y. Inhibitory effects of arbutin on melanin biosynthesis of  $\alpha$ - melanocyte stimulating hormone – induced hyperpigmentation in cultured brownish guinea pig skin tissues. **Archives of Pharmacal Research**, v. 32, n.º. 3, p. 367-373, 2009.

LIN, H. C., SHIEH, B. H., LU, M. H., CHEN, J. Y., CHANG, L. T., CHAO, C. F. A method for quantifying melanosome transfer efficacy from melanocytes to keratinocytes in vitro. **Pigment Cell Melanoma Research**, v. 21, p. 559 – 564, 2008.

LUVIZON, A. C. **Modulação fenotípica induzida por guanósina em modelo de melanoma murino (B16F10)**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia,

Parasitologia e Patologia) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

LUZZI, R., GUIMARAES, C. L., VERDI, L. G., SIMIONATTO, E. L., DELLE MONACHE, F., YUNES, R.A., FLORIANI, A. E. O., CECHINEL FILHO, V., Isolation of biflavonoids with analgesic activity from *Rheedia gardneriana* leaves. **Phytomedicine**, v. 4, p. 139–142, 1997.

MAEDA, K.; FUKUDA, M., In vitro effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. **Journal of the society of cosmetics scientists**, v. 42, p. 361 – 368, 1991.

MAEDA, K.; FUKUDA, M., Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 276, supl. 2, p. 765 – 769, 1996.

MAEDA, K., NAITOU, T., UMISHIO, K., FUKUHARA, T., MOTOYAMA, A., A novel melanin inhibitor: hidroperoxy traxastane-type triterpene from flowers of *Arnica Montana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, supl. 5, p. 873-879, 2007.

MARKS, M. S.; SEABRA, M. C., The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p. 738 – 748, 2001.

MASUDA, T. *et al.*, Screening for tyrosinase inhibitors among extracts of seashore plants and identification of potent inhibitor from *Garcinia subelliptica*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, Japão, v.69, p. 197-201, 2005.

MIYAZAWA, M., TAMURA, N. Inhibitory Compound of Tyrosinase Activity from the Sprout of *Polygonum hydropiper* L. (Benitade). **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, nº3, p. 595-597, 2007.

MERCHANT, D., KAHN, R.,MURPHY, W. **Handbook of cell and organ culture**. Burgess Publishing, Broken Arrow. 1964.

MORIMURA, K., HIRAMATSU, K., YAMAZAKI, C., HATTORI, Y., MAKABE, H., HIROTA, M. Daedalin A, a metabolite of *Daedalea dickinsii*, inhibits melanin synthesis in an *in vitro* human skin model. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 73, n. 3, p. 627 – 632, 2009.

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

NAKAGAWA, M.; KAWAI, K.; KAWAI, K. Contact allergy to kojic acid in skin care products. **Contact Dermatitis**, v.32, p.9-13, 1995.

NAKAJIMA, M., SHINODA, I., FUKUWATARI, Y., HAYASAWA, H., Arbutin increases the pigmentation of cultured human melanocytes through mechanism other than the induction of tyrosinase activity. **Pigment Cell Res.**, v.11, p. 12 – 17, 1998.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Hydrogen peroxide generation associated with the oxidations of the eumelanogenic precursors 5,6 – dihydroxyindole and 5,6 – dihydroxyindole-2-carboxylic acid. **Melanoma Research**, v. 6, p. 341 – 349, 1996.

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

NESTEROV, A., ZHAO, J., MINTER, D., HERTEL, C., MA, W., ABEYSINGHE, P., HONG, M., JIA, Q., 1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl)propane, a novel tyrosinase inhibitor with strong depigmenting effects. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, suppl. 9, p. 1292 – 1296, 2008.

NICOLETTI, M. A., ORSINE, E. M. A., DUARTE, A. C. N., BUONO, G. A., Hiperchromias: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Cosmetics & Toiletries (Edição em Português)**, São Paulo, v. 14, p. 46-51, mai-jun/2002.

OBOLSKIY, D., PISCHEL, I., SIRIWATANAMETANON, N., HEINRICH, M. *Garcinia mangostana* L.: A Phytochemical and Pharmacological Review. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1047-1065, 2009.

OKUNJI, C., KOMARNYTSKY, S., FEAR, G., POULEV, A., RIBNICKY, D. M., AWACHIE, P.I., ITO, Y., RASKIN, I., Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garcinia kola* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1151, suppl. 1-2, p.45-50, 2007.

ORTONNE, J.P.; BISSETT, D.L., Latest insights into skin hyperpigmentation. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 13, p. 10-14, 2008.

PANDYA, A.G.; GUEVARA, I.L. Disorders of Hyperpigmentation. **Dermatologic Clinics**. Dallas, Texas, v.18, supl.1, p. 91-98, jan/2000.

PAROLIN, M.B.; REASON, I.J.M., Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobiliares. **Arquivos Gastroenterologia**, v. 38, n. 2, p. 138 – 144, 2001.

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

PARK, H.Y., KOSMADAKI, M., YAAR, M., GILCHREST, B. A., Cellular mechanism regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Birkhäuser, vol. 66, no. 9, p. 1493-1506, 2009.

PARVEZ, S.; KANG, M.; CHUNG, H. S.; BAE, H. Naturally occurring tyrosinase inhibitors: mechanism and applications in skin health, cosmetics and agriculture industries. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 805 – 816.

PERLUIGI, M.; DE MARCO, F.; FOPPOLI, C.; COCCIA, R.; BLARZINO, C.; MARCANTE, M. L.; CINI, C. Tyrosinase protects human melanocytes from ROS-generating compounds. **Biochemical and Biophysical Research Communication**, v. 305, p. 250 – 256, 2003.

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

PROTA, G., Recent Advances in the Chemistry of Melanogenesis in Mammals. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 75, p. 122-127, 1980.

REID, K.; NISHIKAWA, S.; BARLETT, P. F.; MURPHY, M. Steel factor directs melanocyte development *in vitro* through selective regulation of the number of c-kit+ progenitors. **Developmental biology**, v.169, p. 568–579, 1995.

RODRIGUES, C.A., OLIVEIRA, A. E., WILLAIN, F. R., CECHINEL FILHO, C. L., GUIMARAES, C. L. YUNES, R. A., DELLE MONACHE, F., Separation of biflafonoids from *Rheedia gardneriana* using chitin-Fe complex as stationary phase. **Pharmazie**, v. 55, p. 699–700, 2000.

ROMÉRO, C.; ABERDAM, E.; LARNIER, C.; ORTONNE, J. P. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation involvement of the melanogenic enzymes expression. **Journal of Cell Science**, v. 107, p. 1095 – 1103, 1994.

RUMJANEK, V. M., TRINDADE, G. S., WAGNER-SOUZA, K., DE-OLIVEIRA, M. C., MARQUES-SANTOS, L. F., MAIA, R. C., CAPELLA, M. A. Multidrug resistance in tumour cells: characterization of the multidrug resistant cell line K562-Lucena 1. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.73, n.1, p.57-69. 2001.

SATO, K.; TAKAHASHI, H.; IRAHA, R.; TORIYAMA, M. Down-regulation of tyrosinase expression by acetylsalicylic acid in murine B16 melanoma. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.31, supl. 1, p. 33-37, 2007.

SATO, K.; MORITA, M.; ICHIKAWA, C.; TAKAHASHI, H.; TORIYAMA, M. Depigmenting mechanisms of all-trans retinoic acid and retinol on B16 melanoma cells. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 72, supl. 10, p. 2589-2597, 2008.

SCHROTEROVA, L., KRALOVA, V., VORACOVA, A., HASKOVA, P., RUDOLF, E., CERVINKA, M. Antiproliferative effects of selenium compounds in colon cancer cells: Comparison of different cytotoxicity assays. **Toxicology in vitro**, v. 23, p. 1406 – 1411, 2009.

SCHWAHN, D. J., XU, W., HERRIN, A. B., BALES, E. S., MEDRANO, E. E. Tyrosine levels regulate the melanogenic response to  $\alpha$  – melanocyte – stimulating hormone in human melanocytes: implications for pigmentation and proliferation. **Pigment Cell Research**, v. 14, p. 32 – 39, 2001.

SEIJI, M.; SHIMAO, K.; BIRBECK, M. S.; FITZPATRICK, T. B. Subcellular localization of melanin biosynthesis. **Annals of New York Academy Science**, v.100, p. 497–533, 1963.

SERRA-BALDRICH, E.; TRIBÓ, M. J.; CAMARASA, J.G. Allergic contact dermatitis from kojic acid. **Contact Dermatitis**, v. 39, nº 2, p. 86 - 87, 1998.

SHIN, N.H.; RYU, S.Y.; CHOI, E.J.; KANG, S.H.; CHANG, I.M.; MIN, K.R.; KIM, Y. Oxyresveratrol as the potent inhibitor on dopa oxidase activity of mushroom tyrosinase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 243, p. 801-803, 1998.

SILVA, E.C. **Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de formulações contendo arbutina, associada ou não com ácido glicólico**, 181 f., (Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP), São Paulo, 1998.

SILVA, T. M. A.; AOYAMA, H.; HAUN, M.; FERREIRA, C. V. Citotoxicidade do promotor de tumor e sua ação mitogênica sobre os linfócitos humanos. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 36(4), p. 237-239, 2004

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 12, n.1, p.35-40, 2002.

SLOMINSKI, A.; DESMOND, J.T.; SHIGEKI, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological reviews**. v. 84, p. 1155-1228, 2004.

SOLANO, F., BRIGANTI, S., PICARDO, M., GHANEM, G., Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. **Pigment Cell Research**, v. 19, supl. 6, p. 550-571, 2006.

SPELLBERG, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. **Life Sciences**, v. 67, p. 477-502, 2000.

SUH, K. S., BAEK, J. W., KIM, T. K., LEE, J. W. The inhibitory effect of phytoclear-EL1 on melanogenesis. **Annals of Dermatology**, v. 2, n. 4, p. 369 – 375, 2009.

SULAIMON, S. S., KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Veterinary Dermatology**, v. 14, p. 57 – 65, 2003.

THOMPSON, J. E. **A prática farmacêutica na manipulação de medicamentos**. 1ª edição. Porto Alegre: Artmed, 2006.

TURK, B.; TURK, V. Lysosomes as “suicide bags” in cell death: myth or reality? **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n.33, p. 21783–21787, 2009.

TRADE TERMS. Disponível em: <<http://www.amlinkint.com/English/resources/trade-term-exw.html>>. Acesso em: 21/07/2009.



VAN DEN BERG, M.E. Revisão das espécies brasileiras do gênero *Rheedia* L. (Guttiferae). **Acta Amazônica**, Manaus. v.9, n.1, p.43-74. 1979.

VERDIA, L. G., Verdia, PIZZOLATTIA, M.G., MONTANHERA, A.B.P., BRIGHENTEA, I.M.C., SMANIA JR, A., SMANIA, E.F.A., SIMIONATTO, E.L., MONACHE, F.D. Antibacterial and brine shrimp lethality tests of biflavonoids and derivatives of *Rheedia gardneriana*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 360-363, 2004.

VIRADOR, V.M., KOBAYASHI, N., MATSUNAGA, J., HEARING, V.J. A standardized protocol for assessing regulators of pigmentation. **Analytical Biochemistry**, v. 270, p. 207 – 219, 1999.

WEINER, H. Enzimas: classificação, cinética e controle. In: DEVLIN, T. M. *et al.* **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo: Edgar Blucher, 2007, p. 374 – 391.

WIKIPEDIA. Disponível em: [http://www.pt.wikipedia.org/wiki/Garcinia\\_gardneriana](http://www.pt.wikipedia.org/wiki/Garcinia_gardneriana). Acesso em: 04.11.2010

WOLK, K., WITTE, K., SABAT, R. Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v.30, nº 8, p. 617 – 628, 2010.

WORFEL, P.R. **Análise da viabilidade e níveis de glutatona de células de melanoma murino tratadas com flavonóides e oxigênio singlete**. 86 f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

YANG, H., FIGUEROA, M., TO, S., BAGGETT, S., JIANG, B., BASILE, M. J., WEINSTEIN, B.I., KENNELLY, E.J. Benzophenones and biflavonoids from *Garcinia livingstonei* fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.26, 2010.

YOKOTA, T.; NISHIO, H.; KUBOTA, Y.; MIZOGUCHI, M. M. The inhibitory effect of glabridin from licorice extracts on melanogenesis and inflammation. **Pigment Cell Research**, v. 11, p. 355-361, 1998.

ZHANG, X., HU, X., HOU, A., WANG, H. Inhibitory effect of 2,4,2',4'-tetrahydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)- chalcone on tyrosinase activity and melanin biosynthesis. **Biological Pharmaceutical Bulletin**. v.32, nº1, p. 86 – 90, 2009.

ZUIDHOFF, H. W., RIJSBERGEN, J.M. van. Whitening efficacy of frequently used whitening ingredients. **Cosmetics & Toiletries**, v. 116, n°1, p. 53 – 59, 2001.