

CAROLINE SIENNA

EFEITOS DO EXTRATO DAS CASCAS DE *Rauwolfia sellowii* Müll Arg. E
SUAS FRAÇÕES SOBRE A VIABILIDADE E A MELANOGÊNESE EM
CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

Dissetação apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de Mestre em Biologia
Celular e Molecular, área de concentração –
Fisiologia, Programa de Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências
Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria Caliman
Filadelfi

Co-orientador: Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes
Santos

CURITIBA
2008

DEDICATÓRIA

As três pessoas que me ensinaram o
melhor da vida: pai, mãe e Emanuel.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e Sua presença sempre constante; sem Ele nada disto seria possível.

A Profa. Dra. Ana Maria Caliman Filadelfi, que me despertou o gosto pela ciência e me entusiasmou a seguir em frente. Obrigada pela orientação, apoio, incentivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, que gentilmente disponibilizou seu laboratório, os reagentes necessários e seus conhecimentos para confecção dos extratos. Sua co-orientação tornou possível a realização deste trabalho.

Aos Profs. Dr. Silvio Marques Zanata e Dra. Gláucia Regina Martinez, pelo fornecimento da linhagem de melanoma murino B16F10.

A todos os demais professores que disponibilizaram seus laboratórios para o desenvolvimento deste trabalho. Em especial, Prof. Dr. Ricardo Fernandez Perez e Prof. Dr. Luiz Cláudio Fernandes.

À Profa. Dra. Carolina A. O. Freire, pelo auxílio com a grafia no idioma inglês dos resumos de congressos e desta dissertação.

Às colegas e amigas do laboratório Dani, Carol Thays, Jéssica e Evelise, pelo auxílio na manutenção das células, nos experimentos e pelas discussões científicas e não-científicas que tornaram o nosso trabalho mais agradável.

Aos meus pais, Ernesto e Ilizete Sienna, pelo incentivo e esforço para sempre me proporcionar uma educação de qualidade. Tudo valeu a pena!

Ao meu esposo, Emanuel, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos em que não pude estar presente.

EPÍGRAFE

“As flores perecem,
mas as sementes permanecem.”

Inácio Larrañaga

RESUMO

As cascas de *Rauwolfia sellowii*, Apocynaceae, conhecida como “pau-para-tudo”, tem uso na medicina popular no tratamento de diabetes e colesterol, além de o extrato de suas raízes ser comercializado como anti-hipertensivo. Estudos químicos do gênero *Rauwolfia* demonstraram que este é rico em alcalóides indólicos bioativos, alguns dos quais já tendo sido identificados. Diversos alcalóides apresentam atividade anti-tumoral e efeitos sobre células pigmentares. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos do extrato das cascas de *R. sellowii* (ECRs) e de suas frações sobre a viabilidade celular e o conteúdo de melanina de células de melanoma murino (B16F10), visando indicar futuros agentes terapêuticos contra patologias pigmentares, como por exemplo, o melanoma. A partir do ECRs foi preparada a fração rica em alcalóides (FRA), a qual foi fracionada em coluna cromatográfica a vácuo obtendo-se: a fração metanólica (FMeOH), a fração aquosa (FAQ) e o composto isolado de *R. sellowii* (Rs-1). No ensaio de viabilidade celular as células foram diluídas em azul de *Trypan* e contadas em hemocitômetro. O conteúdo de melanina foi determinado utilizando-se de uma curva-padrão confeccionada a partir de concentrações conhecidas de melanina sintética; a absorvância das amostras foi determinada em espectrofotômetro, a 490 nm. A incubação com os extrato/frações/composto teve duração de 24 h. Os resultados demonstraram que o ECRs, a FRA e a FMeOH reduziram significativamente a viabilidade das células de melanoma murino, nas concentrações de 0,1 a 10 mg/mL ($p < 0,001$). A FMeOH também reduziu significativamente a viabilidade celular nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). A FRA na concentração de 10 mg/mL e a FMeOH em todas as concentrações testadas também aumentaram significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10 após o tratamento ($p < 0,001$). Em conclusão, o ECRs, a FRA e a FMeOH mostraram-se citotóxicos e, as duas últimas frações, hiper melanogênicas sobre as células, sugerindo que os alcalóides presentes no extrato e/ou nas frações das cascas de *R. sellowii* podem ser as substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos aqui observados e que os mesmos alcalóides apresentariam potencial na terapêutica do melanoma.

Palavras-chave: *Rauwolfia sellowii*; Apocynaceae; alcalóides; melanoma; B16F10; efeito citotóxico; viabilidade celular; conteúdo de melanina.

ABSTRACT

Barks of *Rauwolfia sellowii*, Apocynaceae, a plant popularly known as “pau-para-tudo” are commonly used in folk medicine for the treatment of diabetes mellitus and high plasma cholesterol. Root extracts have also been commercialized for their antihypertensive properties. Chemical studies have identified several bioactive indole alkaloids in species of the genus *Rauwolfia*, reported to have activity against cancer and pigment cells. The aim of this work was to characterize the effects of bark extract of *R. sellowii* (BERs) and its fractions on cellular viability and melanin content of mouse melanoma cells (B16F10). The long-term goal was to obtain new therapeutic agents that can be used against pigmentation disorders such as, for example, melanomas. BERs were used to prepare an alkaloid rich fraction (AlkF), which was fractionated using a vacuum chromatography column. Several fractions were thus obtained: a methanolic fraction (MeOHF), an aqueous fraction (AqF), and the isolated compound of *R. sellowii* (Rs-1). Cellular viability was quantified using a cell counter in the presence of *Trypan Blue*. Melanin content was determined using a standard curve with known concentrations of synthetic melanin; absorbance of the samples was determined in a spectrophotometer at 490 nm. The period of treatment with the extract/fractions/compound was 24 h. The results showed significant decrease in B16F10 cell viability by 0.1 – 10 mg/mL BERs, AlkF and MeOHF ($p < 0.001$). The MeOHF showed significant decrease in cell viability by 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0.001$). The 10 mg/mL dose of AlkF and all doses of MeOHF fractions also induced a significant increase in the melanin content of treated B16F10 cells ($p < 0.001$). In conclusion, BERs, AlkF, and MeOHF showed cytotoxic effects, and AlkF and MeOHF, hypermelanogenic effects on cells, suggesting that the alkaloids in the extract and/or in the fractions from bark of *R. sellowii* may be inducing the biological effects observed and may be considered as promising candidates for the treatment of melanoma.

Key words: *Rauwolfia sellowii*; Apocynaceae; alkaloids; melanoma; B16F10; cytotoxic effect; cell viability; melanin content.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	VIA DE MELANOGÊNESE.....	6
FIGURA 2	O GÊNERO <i>Rauwolfia</i>	14
FIGURA 3	NÚCLEO DOS ALCALÓIDES INDÓLICOS.....	15
FIGURA 4	CASCAS DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	20
FIGURA 5	DIAGRAMA DE PREPARAÇÃO DO EXTRATO DE <i>R. sellowii</i> E SUAS FRAÇÕES.....	21
FIGURA 6	COLUNA CROMATOGRÁFICA.....	24
FIGURA 7	PLACA CROMATOGRÁFICA OBSERVADA SOB LUZ UV DE ONDAS CURTAS.....	32
FIGURA 8	ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS B16F10 CULTIVADAS EM RPMI 1640, A 37° C.....	42
FIGURA 9	ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS B16F10 SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM O EXTRATO DE CASCA DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	43
FIGURA 10	ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS B16F10 SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM A FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	44
FIGURA 11	ASPECTO MORFOLÓGICO DAS CÉLULAS B16F10 SUBMETIDAS A TRATAMENTO COM A FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	44
FIGURA 12	PELLETS CELULARES OBTIDOS APÓS O TRATAMENTO COM AS FRAÇÕES DE <i>R. sellowii</i>	45

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	REAGENTES UTILIZADOS NO TRABALHO.....	19
TABELA 2	RENDIMENTO DO EXTRATO DE CASCA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> E DA FRA.....	31
TABELA 3	RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FRA.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	EFEITO DO EXTRATO DE CASCA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	34
GRÁFICO 2	EFEITO DO EXTRATO DE CASCA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS B16F10.....	34
GRÁFICO 3	EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	35
GRÁFICO 4	EFEITO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS B16F10.....	36
GRÁFICO 5	EFEITO DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	37
GRÁFICO 6	EFEITO DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	37
GRÁFICO 7	EFEITO DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS B16F10... ..	38
GRÁFICO 8	EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	39
GRÁFICO 9	EFEITO DO COMPOSTO ISOLADO DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS B16F10.....	39
GRÁFICO 10	EFEITO DA FRAÇÃO AQUOSA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS B16F10.....	40
GRÁFICO 11	EFEITO DA FRAÇÃO AQUOSA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS B16F10.....	40
GRÁFICO 12	EFEITO DO α -MSH/FORSCOLINA SOBRE O CONTEÚDO DE	

MELANINA DE CÉLULAS B16F10.....	41
---------------------------------	----

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPc	-Monofosfato de adenosina cíclico
ACTH	-Hormônio adrenocorticotrófico
CCD	-Cromatografia em camada delgada
CREB	-Proteína de ligação ao CRE
DHICA	-5-5-dihidroindol 2-ácido carboxílico
DHI	-5-6- dihidroindol
DPPH	-1,1-difenil-2 picrilhidrazil
ECRS	-Extrato de casca de <i>Rauwolfia sellowii</i>
EDTA	-Ácido Etilenodiaminotetracético
ET-1	-Endotelina-1
ET-3	-Endotelina-3
FAQRs	-Fração aquosa de <i>Rauwolfia sellowii</i>
FRA	-Fração rica em alcalóides
FMEOH Rs	-Fração metanólica de <i>Rauwolfia sellowii</i>
IBMX	-Isobutilmetilxantina
IFN- γ	-Interferon – gama
L-DOPA	-3,4 diidroxifenilalanina
MAPKs	-Proteína quinase ativada por mitógeno
MITF	-Fator de transcrição de microftalmia
8-MOP	-8-metóxi-psoraleno
α -MSH	-Hormônio estimulante de melanócitos – alfa
NF- κ B	-Fator nuclear kappa B
PKA	-Proteína quinase dependente de AMPc
PKC	-Proteína quinase C
POMC	-Pró-ópiomelanocortina
Rf	-Coeficiente de adsorção
RPMI	-Roswell Park Memorial Institute – sigla de meio de cultura celular
RS-1	-Composto isolado de <i>Rauwolfia sellowii</i>
SCF	-Fator de crescimento de células tronco
TNF- α	-Fator de necrose tumoral - alfa
TRP-1	-Dopacromo tautomerase-1
TRP-2	-Dopacromo tautomerase-2
UV	-Luz ultravioleta

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE GRÁFICOS.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 A FITOTERAPIA.....	1
1.2 MELANÓCITOS, MELANOGÊNESE E SUAS PATOLOGIAS.....	4
1.3 SUBSTÂNCIAS VEGETAIS E CÉLULAS PIGMENTARES.....	11
1.4 O GÊNERO <i>Rauwolfia</i>	13
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1 MATERIAL VEGETAL.....	20
3.2 PREPARO DO EXTRATO DE CASCA DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	21
3.3 PREPARO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DE <i>Rauwolfia sellowii</i>	23
3.4 OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES.....	23
3.4.1 Caracterização das frações.....	25
3.4.2 Purificação do composto obtido a partir das frações 3 e 4.....	26
3.4.3 Preparo da fração metanólica.....	26
3.4.4 Preparo da fração aquosa.....	27
3.5 CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	27
3.6 VIABILIDADE CELULAR.....	27
3.7 CONTEÚDO DE MELANINA.....	28
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4. RESULTADOS.....	31
4.1 RESULTADOS DO PREPARO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES.....	31
4.1.1 Cálculo dos coeficientes de adsorção (Rf).....	33

4.2 EFEITOS DO ECRs SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.....	33
4.3 EFEITOS DA FRA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.....	35
4.4 EFEITOS DA FRAÇÃO METANÓLICA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> (FMeOH) SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.....	36
4.5 EFEITOS DO COMPOSTO ISOLADO DE <i>Rauwolfia sellowii</i> (Rs-1) SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.....	38
4.6 EFEITOS DA FRAÇÃO AQUOSA DE <i>Rauwolfia sellowii</i> (FAQ) SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.....	40
4.7 RESULTADOS COMPLEMENTARES DOS DADOS JÁ APRESENTADOS.....	41
4.7.1 Efeito do hormônio α -MSH e da forskolina sobre o conteúdo de melanina das células B16F10.....	41
4.7.2 Análise morfológica das células em cultivo.....	42
4.7.3 Análise dos <i>pellets</i> celulares obtidos após os tratamentos.....	45
5. DISCUSSÃO.....	46
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 A FITOTERAPIA

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas com finalidade terapêutica talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais, portanto, a fitoterapia é valorizada por ser um processo histórico. Atualmente ela é amplamente utilizada, pois as plantas encontram-se distribuídas no ambiente e isso representa facilidade para aquisição (BARTON & OLLIS, 1986). Além disso, os medicamentos sintéticos podem ser mais agressivos ao organismo, causar maiores efeitos colaterais, sem contar o alto custo aquisitivo. Assim diversos profissionais desenvolvem pesquisas multidisciplinares para que se faça possível uma utilização racional das plantas medicinais presentes na vasta flora brasileira (MILLS & BONE, 2000).

No Paraná, nos últimos dez anos, as principais instituições de ensino têm contribuído para as pesquisas nesta área e a atividade biológica de plantas medicinais, constitui-se na área mais pesquisada (CORRÊA Jr. *et al.*, 2004). Dessa forma, por vários anos, os produtos naturais têm representado um importante recurso para a descoberta de drogas com potencial de aplicação no tratamento de doenças contemporâneas que afligem os humanos; em particular, o câncer. Plantas e drogas delas derivadas, por exemplo, podem ser utilizadas na quimioterapia para esta e no combate a outras doenças (MILLS & BONE, 2000). Mesmo assim, ainda é baixo o número de patentes registradas e de produtos resultantes de plantas medicinais, tendo em vista a imensa biodiversidade da flora de nosso país. Dentre os motivos para isto estaria a necessidade de ampliar ainda mais a pesquisa e o investimento em determinadas plantas com potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos (CORRÊA Jr. *et al.*, 2004).

A indústria de fitoterápicos vem crescendo rapidamente. As taxas de crescimento anuais atingem entre 10 a 20% na maior parte dos países, sendo os maiores índices aqueles dos Estados Unidos da América (KATE & LAIRD, 1999). A Europa também é

bastante representativa no mercado global de fitoterápicos, respondendo por aproximadamente metade das vendas registradas no mundo. Nessa região, os medicamentos de origem vegetal distribuem-se pelas principais categorias terapêuticas, como por exemplo, tônicos, digestivos, sedativos e produtos uso tópico para os tratos respiratório e cardiovascular (FERREIRA, 1998).

JOFFE & THOMAS (1989) definem o termo “megadiversidade”, um atributo dado a sete países, incluindo o Brasil, que detém, em conjunto, 50% das espécies vegetais do planeta. Os demais países, também da América do Sul, são: Colômbia, México, Zaire, Madagascar, Indonésia e Austrália. A localização destes países detentores de tamanha biodiversidade torna fácil compreender por que os trópicos são o foco de perspectiva da descoberta de novas drogas de origem vegetal.

A extensão do território brasileiro e as dificuldades de acesso dela resultantes acabam dificultando que todos os grupos humanos que ocupam esse território sejam contemplados pelo atendimento promovido pela rede pública de saúde. Este isolamento geográfico termina contribuindo para o fortalecimento da medicina popular local, porque a seleção improvisada de um recurso natural pode vir a ser estimulada por uma nova doença local e resultar na descoberta de um novo potencial medicamento. Por esta razão e pelo fato de estar entre os sete países denominados “megadiversidades”, o Brasil deveria priorizar a investigação farmacológica de novas drogas e a realização de pesquisas que resgatassem o conhecimento popular/indígena e os relacionasse aos recursos genéticos vegetais ainda desconhecidos (JOFFE & THOMAS, 1989).

Recentemente, apesar de várias drogas clássicas derivadas de plantas terem sido substituídas pelos fármacos de origem sintética, outras têm surgido e recebido atenção especial e prestígio terapêutico. Um indício do renascimento de fármacos derivados de fontes vegetais é a grande quantidade e progresso da pesquisa clínica, especialmente no campo dos agentes anticancerígenos, onde podem ser citados o taxol, a podofilotoxina e a camptotecina, bem como dos antimaláricos, como por exemplo, a artemisinina. Também merece destaque o psolareno, uma cumarina isolada de *Psorelea corylifolia*, que tem emprego contra o vitiligo, síndrome para a qual ainda se busca a cura efetiva (KINGHORN & BALADRIN, 1993; KINGHORN, 1996).

Mas talvez a mais expressiva descoberta de fármacos de fonte vegetal seja a dos alcalóides da vinca (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae): a vincristina e a vinblastina. Estes alcalóides são utilizados em todo o mundo, sendo a vincristina usada no tratamento de câncer de pele e em outras patologias não cancerosas, enquanto a vinblastina, nos casos de câncer de mama, testículo, pele e linfoma. Até o momento, foram isolados cerca de 80 alcalóides desta espécie, mas os dois princípios ativos ocorrem em concentrações muito baixas. Isto torna necessário cerca de 250 kg de talos floridos para a obtenção de uma dose de 500 mg dos mesmos (TYLER, 1999).

Após a descoberta desses alcalóides, a busca de novos fármacos a partir de fonte natural foi intensificada. No entanto, quando tais substâncias ocorrem em concentrações muito baixas nos vegetais, os fármacos correspondentes irão possuir altos valores comerciais no mercado (DAVID *et al.*, 2004). Por outro lado algumas substâncias podem ser encontradas em numerosas fontes botânicas, como o ácido betulínico, um derivado vegetal que possui inúmeras propriedades farmacológicas, inclusive, atividade anti-tumoral contra diferentes linhagens de câncer. Seu precursor é a betulina, encontrada em altas quantidades em algumas espécies, chegando a constituir, por exemplo, cerca de 22% da casca de *Betula alba* (KESSLER *et al.*, 2006).

A eficácia da quimioterapia na maioria dos tipos de câncer melhorou nas últimas décadas, entretanto os efeitos colaterais tóxicos decorrentes deste tratamento causam severa redução da qualidade de vida. Portanto, o desenvolvimento de novas drogas não tóxicas continua sendo um desafio e algumas drogas anti-câncer derivadas de vegetais teriam menores efeitos tóxicos contra tecidos saudáveis (KESSLER *et al.*, 2006; SUFFREDINI *et al.*, 2006).

Em células de melanoma B16F10, o taxol e a camptotecina (substâncias de origem vegetal) inibiram a migração e a adesão celular (WANG *et al.*, 2003). Ainda nestas células, a vincristina, um dos já citados alcalóides da vinca, pode mediar a expressão de um supressor de tumor, a proteína p53, a qual inibiria a expressão de tubulinas. Outro alcalóide da vinca, a vinblastina, também já foi utilizado como um novo adjuvante na quimioterapia combinada contra o melanoma maligno de estágio III (ARAI *et al.*, 2006).

Entretanto, não foram encontrados estudos científicos anteriores sobre possíveis efeitos de extratos brutos de *Rauwolfia sellowii* em melanoma, o que reafirma a relevância de que estes efeitos sejam investigados.

1.2 MELANÓCITOS, MELANOGÊNESE E SUAS PATOLOGIAS

A homeostase da pele é mantida por interações dinâmicas entre os diversos tipos celulares aí encontrados: melanócitos, queratinócitos, fibroblastos, células endoteliais, células imunocompetentes e matriz extracelular. Dentre estes, os melanócitos são células pigmentares de origem neuroectodérmica, contêm melanina e se localizam nas camadas (basal e espinhosa) mais profundas da epiderme (BAGNARA & HADLEY, 1973; HADLEY, 1996; KWAN & MIHM Jr., 1983).

A melanina é um biopolímero heterogêneo de estrutura complexa (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995), composta por vários tipos diferentes de monômeros que são conectados através de fortes ligações carbono-carbono. Isto torna a caracterização sistemática das melaninas muito difícil (ITO *et al.*, 2000), embora elas se constituam no principal pigmento presente nas estruturas tegumentares dos vertebrados (RILEY, 1997).

A melanina é um biopolímero produzido no interior dos melanossomos, grânulos de pigmentos liberados pelos melanócitos, para os queratinócitos circundantes. O conjunto dessas células epidérmicas (trinta e seis queratinócitos) associadas a um melanócito constitui uma unidade epidérmica de pigmentação (HADLEY, 1996).

Esse biopolímero possui várias funções biológicas facultativas. Nos humanos, acredita-se que a melanina exerça um papel fotoprotetor e genoprotetor de células expostas à radiação com energia suficiente para gerar algum tipo de dano no material genético (RILEY, 1997). A pigmentação na pele pode diminuir em 50% o risco de desenvolvimento de alguns tipos de carcinoma e em cerca de 12%, o de melanoma maligno, havendo uma forte correlação inversa entre o fenótipo pigmentado e a incidência de câncer de pele. Em áreas equatoriais, inclusive, a hipopigmentação pode ser uma doença letal (ANDRADE, 2003).

O processo de melanogênese (FIGURA 1) foi bem estudado em mamíferos e ocorre com a participação da enzima tirosinase (monofenol oxigênio redutase), uma glicoproteína que requer cobre como co-fator (MISHIMA, 1992). O gene da tirosinase está localizado no cromossomo 7 no camundongo (*locus albino*) e no cromossomo 11 no homem. A tirosinase é sintetizada como uma proteína de 55 kDa, mas o peso molecular da proteína madura é de cerca de 65-75 kDa (MARMOL e BEERMANN, 1996), visto a mesma ser passível de glicosilação no complexo de Golgi. Assim ao final de sua síntese, existem diferentes formas da enzima (T_1 , T_2 e T_3), em função da gradual adição de moléculas de carboidratos à sua estrutura. Estas moléculas podem estar relacionadas com a sinalização do transporte intracelular da tirosinase (MISHIMA, 1992).

Essa enzima tem uma importante participação na melanogênese, pois catalisa os dois primeiros passos do processo. Primeiro, devido a ação da tirosinase, a L-tirosina é transformada em 3,4-diidroxifenilalanina (L-DOPA). Em seguida, ocorre a desidrogenação desta produzindo a DOPA-quinona. Há a possibilidade das distintas ações catalíticas estarem relacionadas à presença de dois sítios ativos na enzima, um com função tirosina-hidroxilase e outro, DOPA-oxidase (PROTA, 1993).

As etapas subseqüentes da melanogênese culminam na ligação oxidativa dos vários intermediários indólicos, o que origina um polímero insolúvel. Para tanto atuam, dentre outras possíveis, duas proteínas relacionadas à tirosinase, a TRP1 e a TRP2 (dopacromo-tautomerase). Estas e a tirosinase possuem cerca de 40% de homologia em sua estrutura primária (JACKSON *et al.*, 1994). O gene da TRP-1 está localizado no cromossomo 4 (*locus brown*) no camundongo e no cromossomo 9 humano e a proteína madura glicosilada tem um peso molecular de cerca de 75 kDa. Idem para a TRP-2, cujo gene está localizado no cromossomo 14 (*locus slaty*) do camundongo e no cromossomo 13 humano (MARMOL e BEERMANN, 1996).

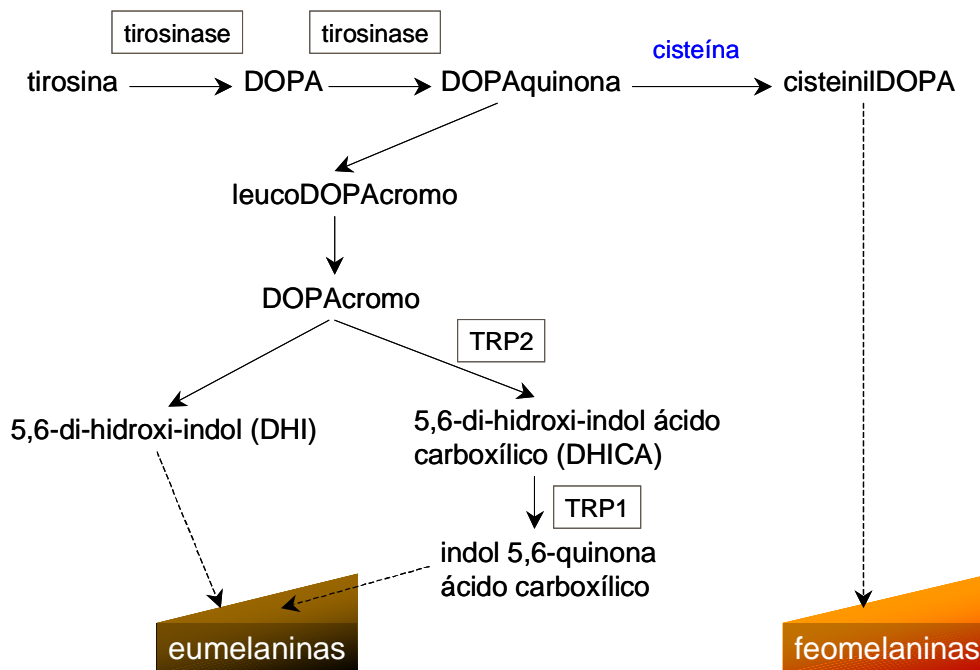


FIGURA 1 - Via de melanogênese. Setas tracejadas indicam etapas da síntese resumidas ou que não são completamente conhecidas (FONTE: modificado de WAKAMATSU & ITO, 2002).

São dois os tipos de melanina produzidos, quimicamente distintos: (1) a eumelanina, de peso molecular variável, levemente solúvel ou insolúvel, de cor preta a marrom, apresentando baixo conteúdo sulfidrílico e cujo processo de síntese gera subprodutos tóxicos; (2) a feomelanina, de baixo peso molecular, alcalino solúvel, de cor amarela a marrom-avermelhada, com alto conteúdo sulfidrílico e cuja síntese praticamente não gera subprodutos tóxicos (HEARING, 2000; PROTA, 1993).

A via de síntese de ambas é comum nas primeiras etapas, até a formação de DOPAquinona. Contudo, no interior de melanossomos com alto conteúdo sulfidrílico ocorre a feomelanogênese e, naqueles com baixo conteúdo sulfidrílico, a eumelanogênese, na qual a maior parte da DOPAquinona sofre um processo de endociclicização espontânea a leucoDOPAcromo. Este é, então, rapidamente oxidado a DOPAcromo, o qual, pela ação catalítica da TRP-2 ou DOPAcromo-tautomerase, sofre um rearranjo e origina o 5-6-dihidroxiindol 2-ácido carboxílico (DHICA), embora possam ocorrer também descarboxilações espontâneas levando à formação de 5,6-dihidroxiindol (DHI) (PROTA, 1993; RILEY, 1997). Assim a eumelanina pode ser sub-classificada em:

DHICA melanina, de baixo peso molecular, cor marrom e relativa solubilidade e DHI melanina, de alto peso molecular, cor preta e praticamente insolúvel (HEARING, 2000).

Os melanossomos, vesículas nas quais ocorre a melanogênese, passam por diversos estágios de maturação. Recentemente, foi proposto que o estágio I dos melanossomos é comum na eu- e feomelanogênese e derivado de endossomos tardios. Nos estágios subsequentes, na eumelanogênese, os melanossomos exibem forma de elipse, contêm filamentos e/ou lamelas bem organizadas (estágio II), tornam-se elétrondensos devido à deposição de melanina (estágio III) e amorfos quando completamente maduros (estágio IV). Por outro lado, os feomelanossomos são sempre esféricos e contêm somente material granular em todos os quatro estágios de maturação. Enquanto a tirosinase atua na biogênese tanto dos eu- quanto dos feomelanossomos, TRP-1 e TRP-2 são expressas exclusivamente nos eumelanossomos (JIMBOW *et al.*, 2000).

O melanossomo contém ainda proteínas estruturais, de matriz e de membrana, tendo sido identificadas duas delas, as quais são codificadas pelo locus *silver* e *pinked-eyed dilution* de camundongos. A proteína *pink* ou proteína p é uma proteína de membrana melanossomal que faz o transporte de ânions (Cl^- , SO_4^{2-} ou HCO_3^-) para compensar o balanço eletrogênico de prótons e garantir a acidificação dos melanossomos, fundamental para a síntese de melanina (BRILLIANT, 2001). Já a proteína *silver* é uma proteína interna da matriz melanossômica que se relaciona à polimerização dos intermediários melanogênicos, servindo, talvez, como uma superfície para ancoragem (OZEKI *et al.*, 1996).

Embora o número de melanócitos seja aproximadamente igual nas diferentes raças humanas, as diferenças de cor de pele existentes são devidas à maior ou menor produção de pigmento (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974). A quantidade de melanina produzida pela pele está principalmente sob o controle do hormônio estimulante de melanócitos – alfa (α -MSH), que estimula não só a melanogênese, como também a proliferação de melanócitos (HADLEY, 1988). Este hormônio, produzido na *pars intermedia* da glândula hipófise, parece ser uma melanotropina fisiologicamente relevante no controle do processo de mudança de cor em praticamente todos os vertebrados. No homem adulto, que não possui a *pars intermédia* da hipófise, o α -MSH

é produzido localmente na pele (ações parácrina e autócrina) pelas células de Langerhans, queratinócitos e pelos próprios melanócitos. Esse hormônio é um tridecapeptídeo linear e faz parte da porção inicial da molécula do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ambos derivados do mesmo precursor, a pró-ópiomelanocortina (POMC). O mecanismo de ação de α -MSH envolve aumento de níveis intracelulares de monofosfato de adenosina cíclico (AMP_c) (HADLEY, 1996) e, em melanócitos de mamíferos, também a estimulação da via das proteínas quinases C (PKCs) (GORDON & GILCHREST, 1989). Assim sinais extracelulares, como por exemplo, a radiação UV ou o hormônio α -MSH levam a um aumento nos níveis de AMP_c, o que culmina com ativação de PKA, estimulação de MITF e aumento da expressão de tirosinase (LEE *et al.*, 2007). Por esse efeito clássico indutor da melanogênese do hormônio α -MSH, esta substância pode ser usada como referência ou controle positivo na indução de resposta hiperpigmentada (OHGUCHI *et al.*, 2006).

Outro hormônio parácrino relevante é a endotelina-1 (ET-1), um peptídeo de 21 aminoácidos que pode estimular a proliferação, a quimiotaxia e a produção de pigmento em células melanocíticas. Queratinócitos humanos sintetizam e secretam ET-1, o que pode ser estimulado pela luz UVB e mediado por interleucinas. Este hormônio, por sua vez, aumenta a proliferação e afeta a melanogênese nos melanócitos humanos (IMOKAWA *et al.*, 1992; TADA *et al.*, 1998). Estudos recentes demonstraram, ainda, que em lesões de pele hiperpigmentadas, chamadas de lentigo, havia superexpressão de ET-1 e de seu receptor ET_B. Assim as lesões progrediam para nevus e melanomas malignos, sugerindo que este receptor e seu ligante, a ET-1, estariam ligados à progressão tumoral (KADONO *et al.*, 2001). Dessa forma, alguns antagonistas de receptores de ETs apresentaram efeito anti-melanoma, podendo até mesmo tornarem-se futuros agentes quimioterápicos (LAHAV *et al.*, 1999).

Além do α -MSH e das endotelinas, vários outros fatores podem atuar estimulando melanócitos, como por exemplo, o fator de crescimento de células tronco (Fator *Steel* ou *Stem Cell Factor* – SCF). Este pode atuar sinergicamente com a ET-3 induzindo a proliferação e a diferenciação de melanoblastos a partir de células da crista neural. Os efeitos mitogênicos de ET e SCF em melanócitos humanos parecem ser a

partir da ativação intracelular de PKC pelas ETs, mas também envolvem a ativação de proteína Ras, a qual, por sua vez, ativaria Raf-1, e esta, ao final, outras proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs) (IMOKAWA *et al.*, 2000; KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Dentre as inúmeras doenças que afetam a pele existem também as desordens de pigmentação. Estas, por sua vez, podem estar relacionadas a um aumento (hiperpigmentação) ou a uma redução (hipopigmentação) da quantidade de melanina na pele (KWAM & MIHM, 1983).

Por outro lado, os distúrbios de hipopigmentação podem ser classificados em difusos ou localizados. O albinismo oculocutâneo é o exemplo mais comum de hipopigmentação difusa, e é resultante de uma alteração genética levando à depressão na atividade da tirosinase. O vitiligo (leucodermia associada à ausência de melanócitos e caracterizada por manchas despigmentadas na pele) pode ser difuso, chamado de generalizado, ou localizado. No vitiligo generalizado não há melanócitos na pele afetada (LAWLEY & YANCEY, 1995). Dentre os distúrbios de hipopigmentação localizados, os tipos mais comuns são: vitiligo, leucodermia química (manchas despigmentadas originadas por produtos químicos), piebaldismo (um tipo de albinismo parcial), nevus acrômico (hipomelanose circunscrita e estável presente desde o nascimento), micoses e hipomelanoses pós-inflamatórias (LAWLEY & YANCEY, 1995).

Os distúrbios de hiperpigmentação incluem os nevus (manchas ou placas castanhas presentes em quase todos os indivíduos, normalmente benignos), o lentigo (máculas pequenas castanho-escuras ou pretas, benignas e comuns na infância), sardas (hiperpigmentação da camada basal, benignas e que podem escurecer após a exposição à luz ultravioleta), o melanoma maligno (lesão maligna fatal), dentre outros (KWAM & MIHM, 1983).

Durante o processo de transformação dos melanócitos e progressão das células de melanoma ocorrem interações recíprocas entre as células neoplásicas e as células adjacentes normais. Conseqüentemente, as células normais delimitam as características agressivas do melanoma (MEIER *et al.*, 1998).

Até hoje os mecanismos patogênicos que levam ao surgimento do melanoma ainda não foram totalmente elucidados. Estudos epidemiológicos mostram que a

exposição ao sol é o fator ambiental mais importante envolvido no surgimento de melanoma cutâneo maligno na população humana, embora o papel específico da radiação solar na gênese desse tumor ainda esteja em estudo. Além disso, fatores genéticos também estão envolvidos na gênese do mesmo (ANDRADE, 2003).

Os cânceres originados de diferentes tipos celulares são, geralmente, patologias muito diversas. Alguns podem ser apenas localmente invasivos, no entanto, o melanoma, se não for rapidamente removido, é altamente maligno e, produz metástases, resgatando a tendência migratória exibida pelos melanoblastos, precursores dos melanócitos durante o desenvolvimento. Dessa maneira, uma vez tenha feito grande número de metástases, o melanoma maligno é freqüentemente impossível de ser eliminado e, conseqüentemente, fatal (ALBERTS *et al.*, 2006). A metástase, a maior causa de mortalidade do câncer, é um fenômeno complexo em que as células do tumor invadem os tecidos adjacentes, penetram nos vasos sanguíneos e formam tumores secundários em sítios distantes (ITOH *et al.*, 2005).

Histologicamente, as lesões de pele podem ser classificadas de acordo com seu grau de desenvolvimento e progressão. A classe I representa o nevus precursor, cuja transformação maligna é rara. No entanto, em 20 a 40% dos casos de melanoma maligno, existe a evidência histológica de um nevus associado (KWAM & MIHM, 1983). Na classe II estão as lesões intermediárias nas quais as células melanocíticas encontram-se confinadas à epiderme - os melanomas *in situ* - ou com microinvasões na derme - os melanomas invasivos na fase RGP (*radial growth phase*) - onde ocorre disseminação lateral. A classe III compreende os melanomas tumorigênicos VGP (*vertical growth phase*), onde ocorre a invasão dérmica ou o crescimento vertical que levará à metástase (MEIER, 1998).

O melanoma maligno, por sua vez, nem sempre se apresenta pigmentado. Pacientes que apresentam lentigo maligno e optam pela excisão cirúrgica dos sítios afetados, podem, após a retirada, desenvolver o lentigo amelanótico melanoma maligno (ALMM), o qual tem progressão clínica similar à de um melanoma maligno, mas é despigmentado (MCKENNA *et al.*, 2000). ZHANG e col. (2006) observaram que injeções subcutâneas de células de melanoma K-1735 na língua de camundongos produziram tumores amelanóticos, mas injeções nas veias da cauda e na artéria

carótida levaram ao surgimento de tumores melanóticos no cérebro. Dessa forma supõe-se que o cérebro expressaria alguns genes envolvidos na melanogênese e, portanto, as células que invadiram este órgão, oriundas da circulação, encontrariam, ali, um microambiente favorável para desenvolver metástases melanóticas.

1.3 SUBSTÂNCIAS VEGETAIS E CÉLULAS PIGMENTARES

As células de melanoma podem ser facilmente mantidas em cultura devido a sua alta capacidade proliferativa. Assim, elas também se constituem em um excelente modelo para estudar a fisiologia das células pigmentares, inclusive no que diz respeito à resposta destas a fitoterápicos (LEAL *et al.*, 2003). Muitos trabalhos têm descrito a utilização da medicina popular e extratos vegetais aumentando a resposta anti-tumoral *in vivo* e *in vitro* e inúmeras plantas apresentam potencial para originar novos agentes similares (JIN *et al.*, 2002).

Culturas de células de melanoma humano SK-Mel 28 e C32TG, por exemplo, foram utilizadas para elucidar o mecanismo de ação do 8-metóxi-psoraleno (8-MOP), substância de origem vegetal que costuma ser empregada no tratamento fotoquímico do vitiligo e da psoríase (doença genética que causa o aparecimento de lesões vermelhas e descamativas) (SAMPAIO *et al.*, 1989). Neste estudo foi demonstrada a ação mitogênica (24h de incubação) e as ações anti-proliferativa e melanogênica (72h de incubação) desta substância, a qual apresenta, portanto, além do efeito melanogênico, um efeito bifásico sobre a proliferação (ISOLDI *et al.*, 2004).

O extrato do fruto de *Piper nigrum* e seu principal alcalóide, a piperina, também apresentam potencial para o tratamento do vitiligo, uma vez que foram testados em cultura de melanócitos normais de camundongo da linhagem Melan-a e estimularam a proliferação destas células (LIN *et al.*, 1999).

Por outro lado, foi avaliada a atividade anti-tumoral de extratos obtidos de espécies vegetais como o *Zingiber officinale* Roscoe e a *Curcuma longa* L., sobre nove linhagens celulares tumorais humanas em cultura, incluindo o melanoma UACC62. Os extratos reduziram a proliferação de diferentes linhagens celulares (LEAL *et al.*, 2003).

Vários outros compostos de origem vegetal já foram testados quanto à sua eficácia frente ao melanoma. Por exemplo, a espécie vegetal *Doliocarpus schottianus*, apresenta os ácidos betulínico e betulônico (OLIVEIRA *et al.*, 2002), derivados da betulina, que também reduzem a proliferação de linhagens de melanoma humano (KIM *et al.*, 1998; PISHA *et al.*, 1995). Além disso, em outras linhagens testadas, o ácido betulínico também reduziu a formação de colônias dos tumores com maior ocorrência na população, como por exemplo, os de pulmão, mama, próstata e cervical. O ácido ainda apresentou baixa toxicidade *in vitro* para tecidos saudáveis, sugerindo uma possível aplicação dessa substância como agente quimioterápico (KESSLER *et al.*, 2006).

Por sua vez, os alcalóides criptolepina, matadina e serpentina, isolados de raízes das espécies africanas *Cryptolepis sanguinolenta*, *Strychnos gossweileri* e *Rauwolfia serpentina*, respectivamente, apresentaram atividade citotóxica sobre as células de melanoma murino B16F10. Os alcalóides ligaram-se firmemente ao DNA, estabilizaram o complexo covalente topoisomerase II-DNA e estimularam o corte do DNA por esta enzima. Este estudo sugeriu que o DNA e a topoisomerase II são dois alvos intracelulares potenciais para o mecanismo de ação dos citados alcalóides sobre as células testadas (DASSONNEVILLE *et al.*, 1999).

Efeitos de compostos vegetais sobre a melanogênese também estão descritos em modelos de células pigmentares em cultura e em animais *in vivo*. A narigenina, uma substância de ocorrência em frutos cítricos, e extratos de *Vigna angularis* foram capazes, respectivamente, de aumentar a expressão das enzimas e estimular, de maneira dose-dependente e não citotóxica, a melanogênese em células B16 em cultura (OHGUCHI *et al.*, 2006). Este último extrato também estimulou a pigmentação em pêlos de camundongos C3H, demonstrando exibir ação não somente em células pigmentares transformadas, como as do melanoma, mas também em melanócitos normais (ITOH & FURUICHI, 2005).

Alguns extratos vegetais também já foram descritos como possíveis agentes potenciais para o tratamento de distúrbios de hiperpigmentação, como o de *Sanguisorba officinallis* (HACHIYA *et al.*, 2001) e *Althaea officinalis* (KOBAYASHI *et al.*, 2002). Os extratos reduziram a pigmentação por inibirem a secreção de ETs por

queratinócitos (HACHIYA *et al.*, 2001; KOBAYASHI *et al.*, 2002) e/ou por melanócitos humanos normais (KOBAYASHI *et al.*, 2002).

Extratos etanólicos de *Angelica dahurica* novamente inibiram a melanogênese em células B16 em cultura. Os compostos ativos desta espécie reduziram marcadamente os níveis do RNAm da tirosinase, sugerindo que esses extratos poderiam ser utilizados como novos agentes clareadores em cosméticos, embora ainda faltem estudos complementares *in vivo* (CHO *et al.*, 2006).

1.4 O GÊNERO *Rauwolfia*

O arbusto asiático *Rauwolfia serpentina* Bent. alcançou grande importância na medicina em 1954, quando suas raízes demonstraram ter propriedades hipotensoras especiais. Estas foram atribuídas à presença de dois alcalóides dentre os muitos que essas plantas possuem, a reserpina e a rescinamida, hoje empregados em grande quantidade como medicamentos hipotensores e sedativos (RIZZINI & MORS, 1995).

O gênero *Rauwolfia* possui 128 espécies descritas, pertencentes à família das Apocináceas. São árvores ou arbustos que ocorrem nas regiões tropicais do mundo inteiro, preferindo lugares secos e ensolarados, sendo menor o número de representantes silvícolas (FIGURA 2). São muitas as espécies hoje exploradas das quais se extrai reserpina e rescinamida. A raubasina ou ajmalicina é um outro alcalóide presente nas *Rauwolfias* que tem sido utilizado como anti-arrítmico, imitando a quinidina (RIZZINI & MORS, 1995).

O Brasil possui 16 espécies espalhadas por todo país. A primeira estudada foi a *R. sellowii* Müll Arg. uma árvore rara, conhecida como “Jasmim-Grado”, de até 15 metros, encontrada nas matas litorâneas nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Minas Gerais. É rica em alcalóides, embora destituída de reserpina (RIZZINI & MORS, 1995). As cascas de *R. sellowii*, popularmente conhecida como “pau-para-tudo”, tem sido utilizada no diabetes e para baixar os níveis colesterol na medicina popular, além de o extrato das cascas de suas raízes ser comercializado no Brasil como anti-hipertensivo (BATISTA *et al.*, 1997).



FIGURA 2 – O gênero *Rauwolfia* (indicado pela seta) pertencente à família das Apocináceas: possui árvores e arbustos que ocorrem em regiões tropicais (www.nature.jardim.free.fr, 2006).

Os alcalóides são considerados uma das mais interessantes classes de metabólitos secundários de plantas por suas propriedades químicas e farmacológicas. Eles são compostos básicos, isolados em sua maioria de angiospermas (plantas com flores), contêm um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura e, freqüentemente, apresentam efeitos fisiológicos no homem e em animais. A propriedade física mais importante dos alcalóides é a sua solubilidade, pois eles podem ser encontrados sob duas formas. Na forma de base livre, em que não há desequilíbrio de cargas, o alcalóide é apolar e solúvel em solvente orgânico. E na forma combinada (sal), em que possui carga iônica, é solúvel em solvente polar. Na célula vegetal eles estão armazenados em vacúolos e combinados a ácidos orgânicos, sendo solúveis no meio aquoso que os envolve. Devido aos seus diferentes tipos estruturais, vias de biossíntese e atividades farmacológicas, os alcalóides representam o maior grupo, em comparação a outros grupos de produtos naturais. Eles podem ser classificados de diferentes maneiras, mas, em geral, são divididos de acordo com sua origem biossintética. Assim podem ser chamados alcalóides verdadeiros, proto-alcalóides e pseudo-alcalóides (HEGNAUER, 1950).

Dentre os alcalóides verdadeiros, um dos grupos mais importantes são aqueles derivados do aminoácido triptofano, denominados alcalóides indólicos (FIGURA 3). Estes são definidos como produtos naturais contendo um núcleo indol ou equivalentes oxidados ou reduzidos. De acordo com sua biossíntese, os alcalóides indólicos podem ser divididos em cinco classes, em função do rearranjo do esqueleto de secogolamina. Espécies de *Rauwolfia* são ricas em alcalóides indólicos bioativos (SANTOS, 1991).

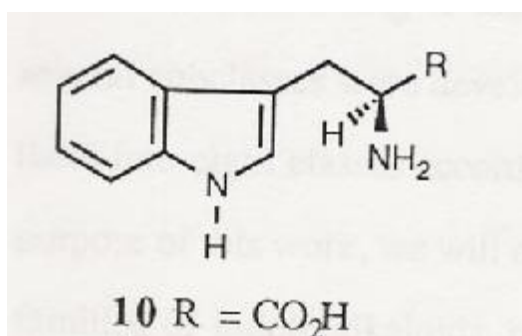


FIGURA 3 – Núcleo dos alcalóides indólicos derivados do aminoácido triptofano. (FONTE: SANTOS, 1991).

Alguns alcalóides indólicos foram isolados das cascas e folhas de *R. sellowii*, e dentre eles estão: raucaffrinolina, peraquina, peraquina dimetil acetal, sellowiina, vomilenina, 12-demetoxitabernulosina, picrinina e 19 α ,20 α -epóxi-aquamicina (BATISTA *et al.*, 1996). Os alcalóides 12-demetoxitabernulosina e picrinina já foram também produzidos a partir de culturas *in vitro* de explantes de folhas jovens de *R. sellowii*. Esta técnica de biotecnologia vegetal foi desenvolvida devido à necessidade de buscar rotas alternativas para a produção de fármacos de estrutura complexa, de difícil obtenção via síntese orgânica, bem como visando a preservação ambiental por evitar a contínua extração de matéria prima vegetal (BATISTA *et al.*, 1997).

O extrato hidroalcoólico de *R. sellowii* foi testado quanto a sua atividade antioxidante *in vitro* contra o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e também sobre a redução do complexo fosfomolibdênio. A concentração de extrato requerida

para 50% da atividade antioxidante contra o DPPH (IC₅₀) foi de 30,27 µg/ml (MENEZES *et al.*, 2002). Peróxidos podem estimular a motilidade das células cancerosas e a metástase. Portanto, uma atividade antioxidante do extrato pode estar ligada a um efeito anti-metastático (KOGAWA & MURAMATSU, 1999; YOSHIZAKI & MOGI, 1994).

Já o extrato aquoso de *R. sellowii* foi testado, utilizando-se o método de Boyden, sobre a quimiotaxia de leucócitos humanos, estimulados a migrar contra um gradiente de caseína. Os resultados apresentados demonstraram efeito inibitório significativo sobre a migração de polimorfonucleares induzida por caseína. Observou-se, por exemplo, um efeito inibitório de cerca de 20% utilizando-se a dose de 1000 µg/ml do extrato aquoso (PRESIBELLA *et al.*, 2003).

Além disso, o extrato de *Rauwolfia radix* induziu aumento da atividade de células T do sistema imune contra células do tumor Molt-4 e T98G em cultura. Nesta espécie o alcalóide reserpina é o maior constituinte ativo. As secreções de interferon-gama (IFN-γ) e do fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) foram aumentadas com a exposição ao vegetal. Além disso, ao ser administrado via oral para camundongos que possuíam o tumor EL-4, o extrato foi capaz de prolongar o período de sobrevivência dos animais, quando estes foram comparados com o grupo controle (JIN *et al.*, 2002).

Por outro lado, mulheres expostas por longos períodos a constituintes da *Rauwolfia*, no tratamento da hipertensão, podem ter risco aumentado no desenvolvimento de câncer de mama, embora maiores estudos sejam necessários para corroborar tal efeito adverso (STANFORD *et al.*, 1986). Um estudo que relacionava terapias anti-hipertensivas e malignidade concluiu que há uma associação positiva entre o câncer de mama e o uso de derivados da rauwolfia. No entanto, faz-se ainda necessário indentificar qual seria a substância envolvida, pois não foi possível confirmar a associação entre a reserpina, por exemplo, e o câncer de mama (GROSSMAN *et al.*, 2001).

Estudos prévios mostraram que os extratos hidroalcoólicos bruto e fluido de casca de *R. sellowii* induziram clareamento em peles da rã *Rana catesbeiana* (MICHEL *et al.*, 2005). Além disso o extrato fluido também inibiu significativamente a proliferação das células de melanoma murino B16F10 sem afetar sua viabilidade, exercendo, portanto, um efeito citostático e não citotóxico (SIENNA *et al.*, 2006). Por essas razões,

o potencial fitoterápico dessa espécie deve continuar sendo investigado, a fim de se descobrir qual(is) fração(ões)/compostos dos extratos iniciais são biologicamente ativos(os). Os efeitos a serem obtidos podem ser relevantes não apenas quanto à redução do crescimento tumoral, mas também no tocante a outras patologias pigmentares de hiper- ou hipopigmentação.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a influência do extrato preparado das cascas de *Rauwolfia selowii* Müll Arg. e de suas frações sobre a função de células pigmentares tumorais murinas da linhagem B16F10 com vistas a futuras aplicações dos princípios ativos resultantes na terapêutica de patologias pigmentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Caracterizar a influência do extrato preparado das cascas de *Rauwolfia sellowii* Müll Arg. e de suas frações (FRA, FMeOH, FAQ e Rs-1) sobre a viabilidade de células B16F10 em cultura.
- 2.2.2 Caracterizar a influência do extrato preparado das cascas de *Rauwolfia sellowii* Müll Arg. e de suas frações (FRA, FMeOH, FAQ e Rs-1) sobre o conteúdo de melanina de células B16F10 em cultura.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

TABELA 1 - MATERIAIS QUE FORAM UTILIZADOS NESTE TRABALHO E SEUS RESPECTIVOS FORNECEDORES

SUBSTÂNCIAS	FORNECEDOR
Acetato de etila	Vetec, Rio de Janeiro
Acetona	Sigma, EUA
Ácido clorídrico	Vetec, Rio de Janeiro
Ácido fosfomolibdico	Merck, EUA
Ácido pirúvico	Vetec, Rio de Janeiro
Álcool absoluto (etanol)	Vetec, Rio de Janeiro
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Synth, Diadema
Clorofórmio	Vetec, Rio de Janeiro
Diclorometano	Vetec, Rio de Janeiro
Dietilamina	Merck, EUA
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Vetec, Rio de Janeiro
EDTA	Vetec, Rio de Janeiro
Éter dietílico	Vetec, Rio de Janeiro
Garamicina	Schering-Plough, RJ
Hepes	Calbiochem, EUA
KCl	Synth, Diadema
KH ₂ PO ₄	Synth, Diadema
Melanina sintética	Sigma, EUA
Metanol	Merck, EUA
MgCl ₂ .6H ₂ O	Vetec, Rio de Janeiro
NaCl	Vetec, Rio de Janeiro
NaHCO ₃	Vetec, Rio de Janeiro
NaH ₂ PO ₄	Reagen, Rio de Janeiro
Na ₂ HPO ₄	Reagen, Rio de Janeiro
NaOH	Vetec, Rio de Janeiro
n-Hexano	Vetec, Rio de Janeiro
Piruvato de sódio	Vetec, Rio de Janeiro
RPMI 1640	Cultilab, SP
Sílica	Merck, EUA
Soro fetal bovino	Cultilab ou Gibco, SP
Tolueno	Merck, EUA
TPP	Biosystems, Curitiba
Triton X-100	Sigma, EUA
“Trypan Blue”	Vetec, Rio de Janeiro

(FONTE: O autor, 2007).

3.1 MATERIAL VEGETAL

As raízes de *Rauwolfia sellowii* (Muller.Arg.) – Apocynaceae (FIGURA 4) usadas neste trabalho foram coletadas entre os meses de fevereiro e dezembro de 1998, na área onde hoje está situada a represa da usina hidroelétrica de Salto Caxias, no sudoeste do Paraná. Após os exemplares terem sido identificados e classificados de acordo com o Código Internacional de Nomenclatura Botânica (MCNEILL *et al.*, 2000), um deles foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR, sob No. 42.384.



FIGURA 4 – Cascas de *Rauwolfia sellowii* (Muller. Arg.) – Apocynaceae, (www.netec.or.th, 2007).

3.2 PREPARO DO EXTRATO DE CASCA DE *Rauwolfia sellowii*

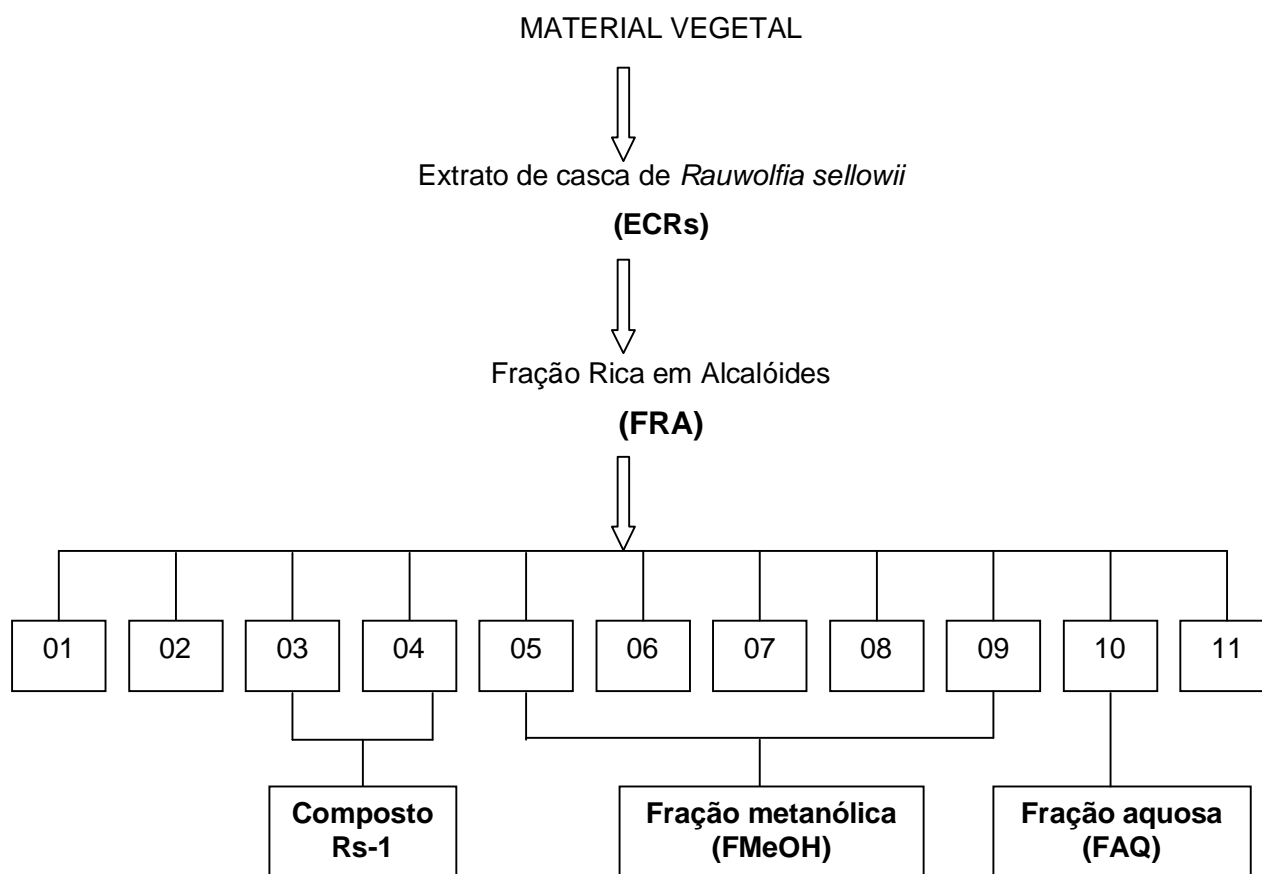


FIGURA 5 – Diagrama de preparo do extrato de *Rauwolfia sellowii* e de suas frações. Apresentados em negrito, o extrato e as frações testadas (FONTE: O autor, 2008).

O material botânico seco pulverizado (1 kg) foi umedecido com amônia diluída e em seguida macerado com 500 mL de etanol 70% por 30 minutos. Este material foi colocado em um percolador (Permuton, Curitiba), e sobre ele foi colocado um papel de filtro.

Foram adicionados 1450 mL de etanol 70% ao percolador e este foi deixado em repouso por três dias antes do início da extração, em temperatura ambiente. O extrato

foi retirado do percolador através de gotejamento, para que a extração fosse efetiva. No total, foram adicionados 6200 mL de etanol. A extração foi realizada até a detecção de reação negativa com reagente de Dragendorff, significando que não havia mais alcalóide a ser extraído na amostra. O reativo só detecta o alcalóide em pH ácido, portanto, para reação, algumas gotas do extrato foram colocadas em uma placa de Petri na qual se adicionava ácido sulfúrico diluído, seguindo-se homogeneização com bastão de vidro. A partir daí, adicionavam-se algumas gotas do reativo e a presença de precipitado branco ou turvação branca indicava resultado positivo.

O extrato percolado foi colocado em balão de fundo redondo de 1000 mL (262,38g) e evaporado em rotaevaporador (Requival, Curitiba).

O balão foi levado ao aquecimento em banho-maria (Requival, Curitiba) na temperatura de 50-55°C e com aproximadamente 100 rotações por minuto (rpm). A temperatura do banho e a rotação favoreciam a evaporação do solvente. O sistema foi conectado a uma bomba de vácuo (Fisatom, São Paulo), a qual diminuía a pressão interna do balão e, conseqüentemente, o ponto de ebulição (PE) do solvente. Este procedimento deve ter prevenido a degradação térmica de substâncias do balão. Desta forma o etanol contido no balão aquecia e evaporava a uma temperatura inferior a 78,3°C (PE). O solvente evaporado foi condensado em um condensador de espiral (Vidrolabor, São Paulo) e recolhido em um balão de fundo redondo lateral. A extração foi realizada até secura, obtendo-se então o extrato de casca de *Rauwolfia sellowii* (ECRs, FIGURA 5). Foi calculado o rendimento do ECRs obtido.

A partir do ECRs, na concentração de 1,0 g/mL, foram feitas diluições em solução de ácido clorídrico 1N (pois o pH ácido torna os alcalóides solúveis em meio aquoso) obtendo-se concentrações intermediárias que, ao final, eram diluídas em meio de cultura, resultando nas seguintes concentrações : 10; 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL. Nos experimentos de atividade biológica, foram efetuados controles com solução de ácido clorídrico na concentração final de 0,01N (a mais alta a entrar em contato com as células).

3.3 PREPARO DA FRAÇÃO RICA EM ALCALÓIDES DE *Rauwolfia sellowii*

A partir do ECRs foi realizada uma partição líquido-líquido a qual deu origem a uma fração rica em alcalóides (FRA, FIGURA 5). Para isto, os alcalóides do extrato (101,67g) foram solubilizados com solução de ácido sulfúrico a 1%, filtrados por algodão para um funil de separação de 2000mL e alcalinizados com amônia diluída. Adicionou-se gelo ao funil, para impedir que houvesse formação de emulsão, e 200mL de clorofórmio para efetuar a extração. O funil foi agitado e mantido em repouso até a separação das fases (aquosa e orgânica); neste caso, o alcalóide estava solubilizado na fase orgânica, portanto a camada clorofórmica foi recolhida em um béquer. A extração foi novamente efetuada até obtenção de reação negativa com reagente de Dragendorff. No béquer foi adicionado sulfato de sódio anidro, para retirar quaisquer resquícios de água que ainda estivessem nas frações. Em seguida estas foram filtradas por algodão para um balão de fundo redondo de 250 mL e foram evaporadas em rotaevaporador até *secura*, para ser obtida a fração rica em alcalóides (FRA).

A partir da FRA, de concentração 1,0 g/mL, foram feitas diluições em solução de ácido clorídrico 1% obtendo-se concentrações intermediárias que, ao final, eram diluídas em meio de cultura, resultando nas seguintes concentrações: 10; 5; 1; 0,5 e 0,1 mg/mL. Nos experimentos de atividade biológica foram efetuados controles com solução de ácido clorídrico na concentração final de 0,01%.

3.4 OBTENÇÃO DAS DEMAIS FRAÇÕES

As demais frações foram preparadas a partir da FRA em coluna cromatográfica à vácuo. Em um balão de fundo redondo foram adicionados 10,27 g da FRA, 27g de sílica e clorofórmio suficiente para extração da mistura. O balão foi levado ao rotaevaporador e foi obtida a FRA incorporada na sílica. Em seguida, procedeu-se ao preparo da coluna cromatográfica, montada em funil de filtro sinterizado (FIGURA 6). Para o preparo da coluna seguiu-se a seqüência: papel de filtro, FRA incorporada em sílica (70g) e outro papel de filtro cobrindo o conteúdo. O funil foi fixado a um kitasato o qual

possuía uma saída conectada a uma bomba de vácuo. Quando um solvente (500 mL) era adicionado à coluna, acionava-se a bomba para facilitar a passagem do mesmo e agilizar o processo. As frações foram recolhidas no kitasato e colocadas em balões correspondentes para serem concentradas em rotaevaporador ou banho-maria. Os solventes foram sendo adicionados iniciando-se com um apolar e aumentando gradativamente o grau de polaridade. Foram obtidas onze frações (FIGURA 5), sendo estas: (1) n-hexano, (2) diclorometano, (3) diclorometano/clorofórmio (1:1), (4) clorofórmio, (5) acetato de etila, (6) metanol 5% e acetato de etila, (7) metanol 10% e acetato de etila, (8) metanol/acetato de etila (1:1), (9) metanol, (10) aquosa e (11) água acidulada (HCl a 1%). As frações 10 e 11 foram colocadas em cápsulas para serem evaporadas até *secura* em banho-maria, pois era necessária uma temperatura mais elevada. Todas as demais frações foram ao rotaevaporador.

O mecanismo de separação neste tipo de cromatografia baseia-se nas diferentes solubilidades apresentadas pelos componentes da amostra na fase móvel e na fase estacionária. Os componentes mais solúveis na fase estacionária são seletivamente retidos por ela, enquanto que os menos solúveis são transportados rapidamente pela fase móvel (SILVERSTEIN *et al.*, 1979). Neste processo cromatográfico a sílica (apolar) é a fase estacionária e a fase móvel corresponde aos solventes aos quais a coluna foi submetida para a extração de cada fração.



FIGURA 6 – Coluna de extração sólido-líquido para fracionamento da fração rica em alcalóides FRA, obtida das cascas de *R. sellowii* (FONTE: O autor; 22 de junho, 2007).

3.4.1 Caracterização das frações

Após obtenção das frações, estas foram analisadas para verificar se algumas delas possuíam os mesmos compostos, tratando-se, portanto, da mesma fração. Para isto realizou-se a cromatografia em camada delgada. Neste método uma pequena amostra de cada fração foi solubilizada em metanol e aplicada em uma placa cromatográfica de sílica (fase estacionária) da seguinte forma: em ambos os extremos da placa foram depositadas amostras da FRA, a fração da qual se partiu, e as demais, frações de 1 a 11, foram aplicadas entre estes pontos da esquerda para direita.

A placa foi colocada em cuba (Vidrolabor, São Paulo) preenchida com a fase móvel constituída por tolueno:acetato de etila:dietilamina (70:20:10). Após a corrida cromatográfica, a mesma foi observada sob a luz ultravioleta (UV) de ondas curtas, e em seguida revelada usando-se ácido fosfomolibdico a 5% como revelador.

Na cromatografia em camada delgada a fase estacionária é constituída por uma fina camada de sorvente (sílica) que reveste um material de suporte, rígido e inerte, de modo que o processo de separação ocorre em uma superfície plana, essencialmente bidimensional. A cromatografia em camada delgada baseia-se nas diferenças das propriedades das fases móvel e estacionária, possibilitando que os componentes da amostra desloquem-se através do material cromatográfico com velocidades desiguais, gerando a separação. Desta forma cada componente separado da amostra desloca-se formando uma mancha, sendo que cada uma possui um coeficiente de adsorção (R_f). O R_f é o quociente da distância que o composto se deslocou desde a origem em relação à distância da frente do solvente (fase móvel) à origem. Assim, substâncias que possuem o mesmo R_f (situando-se lado a lado na placa) provavelmente têm a mesma composição química, ou seja, são a mesma substância (VOGEL *et al.*, 1992).

3.4.2 Purificação do composto obtido a partir das frações (3) e (4)

Após análise da placa cromatográfica, verificou-se que as frações (3) e (4) apresentavam a mesma constituição (FIGURA 7), e seu material cristalizou alguns dias depois do fracionamento. Isto caracteriza o isolamento de um composto (SILVA *et al.*, 2006), portanto estas frações foram solubilizadas em clorofórmio e purificadas em uma

coluna de sílica montada em uma pipeta Pasteur. O conteúdo coletado da coluna secou à temperatura ambiente, obtendo-se um composto isolado denominado Rs-1 (*Rauwolfia sellowii*–1, FIGURA 5).

A partir de Rs-1, na concentração de 0,5 µg/mL, foram feitas diluições em dimetilsulfóxido (DMSO) obtendo-se concentrações intermediárias que, ao final, eram diluídas em meio de cultura, resultando nas seguintes concentrações: 5 ; 2,5; 0,5 ; 0,25 e 0,05 ng/mL. Nos experimentos de atividade biológica, foram efetuados controles com DMSO na concentração final de 1% (a mais alta entrar em contato com as células).

3.4.3 Preparo da fração metanólica

Após análise da placa cromatográfica, verificou-se que também as frações de 5 a 9 possuíam basicamente a mesma constituição, pois as manchas formadas na placa eram paralelas (FIGURA 7). Desta forma, estas foram solubilizadas em metanol e colocadas em um balão de fundo redondo para serem evaporadas em rotaevaporador, sendo que o término da secagem foi realizado em banho-maria na temperatura de 50° C. Após a secagem esta fração foi denominada metanólica (FMeOH, FIGURA 5).

A partir da FMeOH, na concentração de 0,5 g/mL, foram feitas diluições em solução (1:1) de ácido clorídrico 1% e metanol obtendo-se concentrações intermediárias que, ao final, eram diluídas em meio de cultura, resultando nas seguintes concentrações 5; 3; 2,5; 1,0; e 0,5 mg/mL; 50 e 100 µg/mL; 2,5 e 5 ng/mL. Nos experimentos de atividade biológica, foram efetuados controles com solução de ácido clorídrico 0,005%/metanol 0,5% (as concentrações mais altas a entrarem em contato com as células).

3.4.4 Preparo da fração aquosa

Após análise da placa cromatográfica, verificou-se também que as frações 10 e 11 possuíam basicamente a mesma constituição (FIGURA 7). No processo de secagem da fração 11, a mesma acabou sendo carbonizada, portanto teve que ser desprezada e não pôde ser utilizada nos demais testes. No entanto, isso não acarretou maiores

problemas, pois a fração 10 foi testada e é representativa da 11. A fração 10 foi denominada fração aquosa (FAQ, FIGURA 5).

A partir da FAQ, na concentração de 10 mg/mL, foram feitas diluições em água miliq obtendo-se concentrações intermediárias que, ao final, eram diluídas em meio de cultura, resultando nas seguintes concentrações: 100; 50; 10; 5 e 1 µg/mL.

3.5 CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

As células B16F10 (gentilmente cedidas pelos Profs. Dr. Silvio M. Zanata e Dra. Gláucia R. Martinez) foram mantidas a 37°C e 5% de CO₂, em meio de cultura RPMI (acrescido de HEPES – 3,268 g/L; NaHCO₃ - 2 g/L; piruvato de sódio - 0,0125 g/L), suplementado com 10% de soro fetal bovino e gamicina 80 mg/mL a 0,1%, pH 7,4. O meio de cultura foi renovado a cada 48-72 h e as células sub-cultivadas, a partir de culturas próximas à confluência, pelo tratamento com solução de Tyrode/EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético; solução, em g/L: NaCl 8; KCl 0,2; MgCl₂.6H₂O 0,213; NaH₂PO₄ 0,05; EDTA 1,86; NaHCO₃ 1; pH 7,4) e transferência para novos frascos com meio de cultura.

3.6 VIABILIDADE CELULAR

Foram semeadas 4 x 10⁴ células (quantidade padronizada após a realização de curvas de crescimento de 7 dias) em cada frasco de 25 cm² (TPP). Após 24 h da semeadura foram adicionados os extratos, e após 24 h de incubação, o número de células foi contado.

Para a determinação da viabilidade celular foi utilizado o método de contagem em hemocítmetro. Para isso o meio de cultura foi retirado e colocado em tubos de 15 mL, as células foram destacadas dos frascos com solução de Tyrode/EDTA, lavadas com PBS (solução salina em tampão fosfato, em g/L: NaCl 8; KCl 0,2; MgCl₂.6H₂O 0,1; NaH₂PO₄ 0,92; CaCl₂.2H₂O 0,1; KH₂PO₄ 0,2; pH 7,4), e colocadas juntamente com o

meio nos respectivos tubos. Os tubos foram centrifugados, o sobrenadante retirado e as células foram ressuspensas em PBS, tratadas com corante *Trypan Blue* (0,5%), para determinação de viabilidade/citotoxicidade e, finalmente, contadas com o auxílio de um hemocitômetro. O uso do corante *Trypan Blue*, baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis (vivas) possui de excluir o corante. Portanto, as células coradas em azul devem estar mortas (MERCHANT *et al.*, 1964).

Após 48 h de cultivo, antes da realização do ensaio de proliferação e viabilidade celular, foi feita a fotomicrografia das células em cultivo, utilizando-se microscópio invertido Leica DM IL (Leica, Wetzlar - Alemanha) acoplado a um sistema de registro fotográfico com aumentos de 200 e 400 x.

3.7 CONTEÚDO DE MELANINA

Foram semeadas 9×10^5 células em cada frasco de 25 cm². Após 24 h da semeadura foram adicionados os extratos, em triplicatas, e após mais 24 h de incubação, foi realizada a dosagem do conteúdo de melanina. Foram efetuados controles positivos da resposta celular de produção de melanina com o hormônio α -MSH, na concentração de 10^{-8} M, e com forskolina 10 μ g/mL. O efeito desse hormônio na estimulação da melanogênese é descrito em literatura (HADLEY, 1988). A forskolina é um agente exógeno que aumenta as concentrações intracelulares de AMP_c, substância intermediária na via de ação do α -MSH (NEWTON *et al.*, 2007).

Em tubos de ensaio de 15 mL, foram adicionados Triton-X 1% em cada pellet celular contendo $2,5 \times 10^6$ células. Os pellets foram fotografados com câmera Sony DSC-W55 (Sony, Manaus). As amostras foram homogeneizadas em vortex e transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 mL, ficando sob gelo por 10 minutos. Em seguida, as amostras resultantes foram centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf modelo 5819R, São Paulo). O sobrenadante foi removido e descartado. Em capela, foram adicionados 500 μ L de etanol/éter (1:1) para cada pellet de melanina. As amostras foram, então, homogeneizadas em vortex e deixadas em repouso por cerca de 10 minutos à temperatura ambiente, ou até que a proteína precipitada ficasse visível no solvente. Os tubos foram invertidos cuidadosamente algumas vezes e o sobrenadante

solvente/proteína removido, de forma a restar somente o pellet de melanina. Os pellets ficaram secando em capela até todo etanol/éter evaporar (cerca de meia hora). Em seguida, foram adicionados 100µL de NaOH 0,2N em cada pellet. As amostras resultantes foram, então, aquecidas em banho-maria a 60°C até que a melanina estivesse completamente dissolvida. Foram preparadas, simultaneamente, amostras de melanina sintética para uma curva-padrão nas concentrações de 1, 17, 25, 50, 67, 100 e 1000µg/mL. A leitura destas e das amostras experimentais, em duplicata, foi efetuada em espectrofotômetro/ELISA a 490 nm (Meridian, Diagnostic Inc. EL_x 800, Cincinnati – Estados Unidos).

Dessa forma, os dados obtidos como absorvância para cada amostra, foram convertidos e expressos graficamente (GraphPad Software Prisma) como o conteúdo de melanina (% do controle). Este foi determinado após divisão pelo número de células ($\times 10^6$), equivalentes ao total de um dado tratamento e transferidas para tubos cônicos de 15 mL antes do início da dosagem de melanina; em seguida, foi calculada a porcentagem de resposta em relação ao controle branco.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos a partir de diferentes concentrações dos extrato/frações/composto vegetal aplicadas nas células de melanoma foram comparados através de análise de variância (ANOVA uma via) seguida pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK – ZAR, 1996), para determinação do nível de significância das diferenças. As diferenças entre controle (ausência de tratamento com substâncias vegetais – com ou sem eluente) e experimentais (presença de substâncias vegetais) foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$. Os resultados foram expressos graficamente (GraphPad Software Prisma), a partir dos valores absolutos, como porcentagem média em relação ao controle \pm erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS DO PREPARO DO EXTRATO E DAS FRAÇÕES

Após extração por maceração, percolação e concentração em rotaevaporador, o extrato bruto foi fracionado. A tabela 2 apresenta os resultados de rendimento na confecção do extrato e da FRA.

TABELA 2 – RENDIMENTO DO EXTRATO DE CASCA DE *R. sellowii* E DA FRA

	ECRs	FRA
Peso inicial (g)	1000	100,67
Peso final (g)	180,24	20,55
Rendimento (%)	18,0	20,4

LEGENDA: ECRs – extrato de casca de *R. sellowii*; FRA – fração rica em alcalóides
(FONTE: O autor, 2007).

A partir da FRA, submetida a uma coluna a vácuo, foram obtidas onze frações, cujo peso está discriminado abaixo.

TABELA 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DA FRA

FRAÇÃO	PESO (g)
Hexano	0,1757
Diclorometano	0,1323
Diclorometano/clorofórmio	0,1643
Clorofórmio	0,1271
Acetato de etila	1,4462
Metanol 5%/acetato de etila	1,2852
Metanol 10%/acetato de etila	1,63
Metanol/acetato de etila (1:1)	2,004
Metanol	0,4913
Aquosa	1,2
Água acidulada	1,81

(FONTE: O autor, 2007).

A seguir foi realizada uma cromatografia em camada delgada com estas onze frações e a FRA, que é a fração original. A placa abaixo (FIGURA 7) mostra os resultados da corrida cromatográfica.

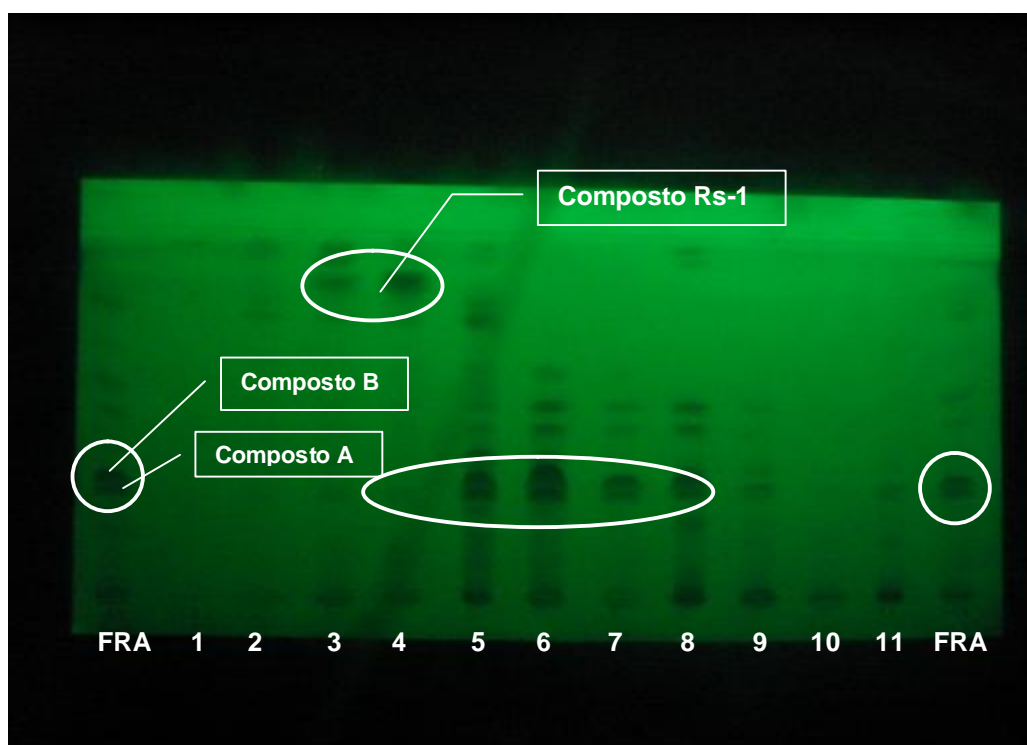


FIGURA 7 – Placa cromatográfica observada sob luz UV de ondas curtas.

LEGENDA: FRA – fração rica em alcalóides; (1) hexano, (2) diclorometano, (3) diclorometano/clorofórmio (1:1), (4) clorofórmio, (5) acetato de etila, (6) metanol 5% e acetato de etila, (7) metanol 10% e acetato de etila, (8) metanol/acetato de etila (1:1), (9) metanol, (10) aquosa e (11) água acidulada (HCl a 1%) (FONTE: O autor, 2007).

As frações (1) e (2) quando observadas sob a luz UV de ondas curtas, não apresentaram compostos separados na placa cromatográfica (FIGURA 7).

Conforme já descrito no item Material e Métodos, devido ao paralelismo dos compostos de cada um desses três grupos na corrida cromatográfica, as frações (3) e (4), (5) a (9), e (10) e (11) geraram, respectivamente, o composto Rs-1, e as frações metanólica e aquosa.

4.1.1 Cálculo dos coeficientes de adsorção (R_f)

Visualizando a placa cromatográfica (FIGURA 7), podemos observar que os dois compostos circutados presentes na FRA, também se encontram presentes nas frações de (5) a (9). Chamou-se o primeiro composto a partir do ponto de aplicação de composto A, e o composto a seguir, de B. O R_f para esse compostos foi calculado e apresentado abaixo:

$$R_{f\ A} = 1,6/5,5 = 0,29$$

$$R_{f\ B} = 1,8/5,5 = 0,33$$

As frações (3) e (4) também apresentam o mesmo composto Rs-1, circutado na placa cromatográfica (FIGURA 7). O cálculo de seu R_f encontra-se abaixo:

$$R_{f\ Rs-1} = 4,3/5,5 = 0,78$$

4.2 EFEITOS DO ECRs SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10

O ECRs (24 h de incubação) nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade das células B16F10 (GRÁFICO 1, n= 9). As respostas foram significativamente diferentes da resposta basal (controle) e do ácido clorídrico 0,01N (controle-eluente), as médias \pm EPM dos controles e destas concentrações foram, respectivamente: $80,8 \pm 4,1$; $89,4 \pm 2,8$; $66,0 \pm 2,0$; $53,3 \pm 5,0$; $25,0 \pm 9,6$ conforme pode ser verificado abaixo.

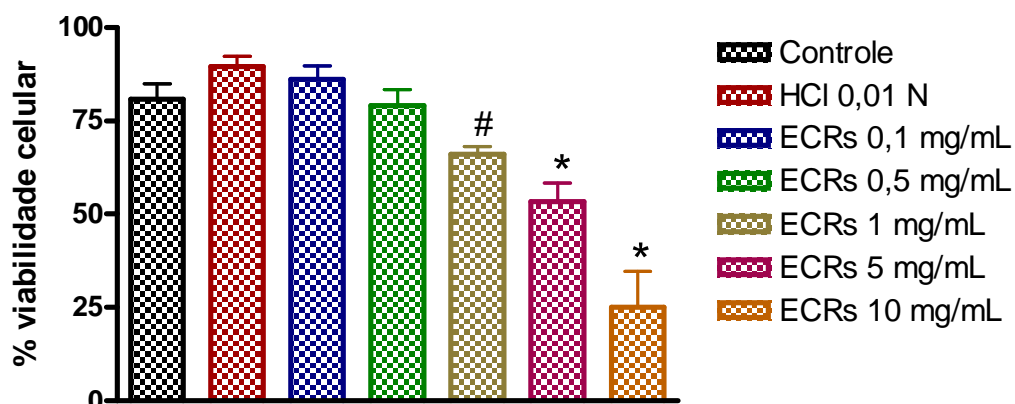


GRÁFICO 1 - Efeito de ECRs sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato. * = valor significativamente diferente dos respectivos controles e do ácido clorídrico 0,01N para $p < 0,001$; # valor significativamente diferente do controle para $p < 0,05$ e do ácido clorídrico 0,01N para $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 9$.

O ECRs (24 h de incubação), em nenhuma das concentrações testadas, afetou significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10, conforme pode ser observado na figura abaixo (GRÁFICO 2, $n = 12$).

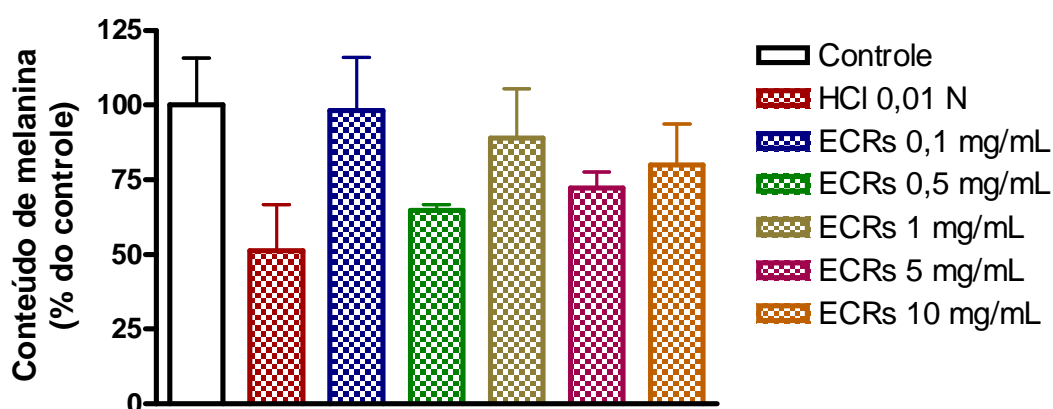


GRÁFICO 2 - Efeito de ECRs sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato ($n = 12$).

4.3 EFEITOS DA FRA DE *R. sellowii* SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10

A FRA de *R. sellowii* (24 h de incubação) nas concentrações de 1, 5 e 10 mg/mL reduziu significativamente a viabilidade das células B16F10 (GRÁFICO 3, n = 12). As respostas foram significativamente diferentes ($p < 0,001$) da resposta basal (controle) e do ácido clorídrico 0,01% (controle-eluente), as médias \pm EPM dos controles e destas concentrações foram, respectivamente: $89,2 \pm 2,1$; $84,3 \pm 3,6$; $14,4 \pm 6,1$; $15,6 \pm 6,8$; $15,7 \pm 7,3$ conforme pode ser verificado abaixo.

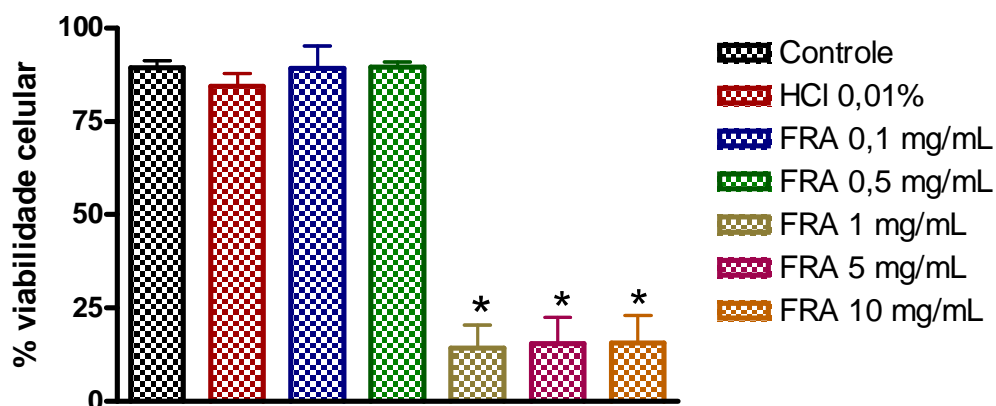


GRÁFICO 3 - Efeito da FRA de *R. sellowii* sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação dos extratos. * = valor significativamente diferente dos respectivos controles e do ácido clorídrico 0,01% para $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, n = 12.

A FRA na concentração de 10 mg/mL aumentou significativamente o conteúdo de melanina (GRÁFICO 4, n = 6; $455,8 \pm 158,0$) das células B16F10. A resposta foi significativamente diferente ($p < 0,05$) da resposta basal (controle; $100,0 \pm 57,8$) e do ácido clorídrico 0,01% (controle-eluente; $81,8 \pm 70,7$), conforme pode ser verificado na figura abaixo. Na concentração de 10 mg/mL, a maioria das células que participaram da dosagem estavam mortas, e foram estas que tiveram seu conteúdo de melanina

aumentado. A concentração de 5 mg/mL da FRA também aumentou ($358,8 \pm 68,1$), embora não significativamente, o conteúdo de melanina (GRÁFICO 4).

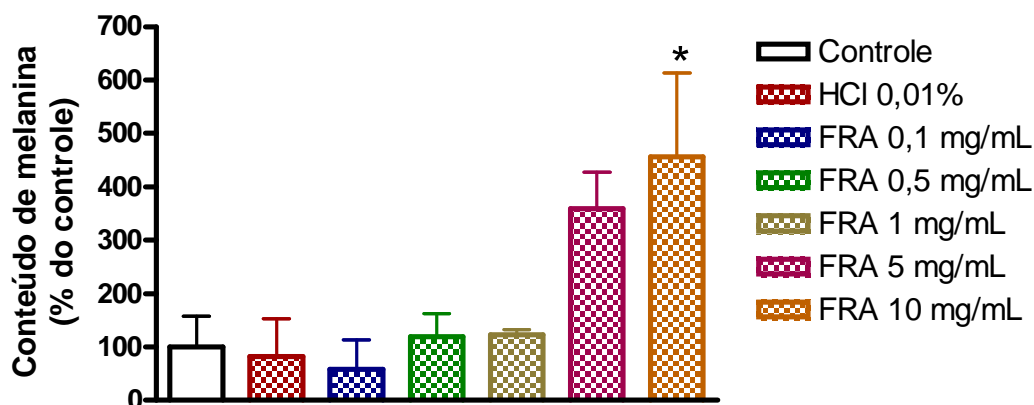


GRÁFICO 4 - Efeito da FRA de *R. sellowii* sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato. * = valor significativamente diferente do controle e do ácido clorídrico 0,01% para $p < 0,05$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 6$.

4.4 EFEITOS DA FRAÇÃO METANÓLICA DE *R. sellowii* (FMeOH) SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10

A FMeOH de *R. sellowii* (24h de incubação) reduziu significativamente a viabilidade das células B16F10, na maioria das concentrações testadas (GRÁFICO 5, $n = 6$). As respostas foram significativamente diferentes da resposta basal (controle; $81,2 \pm 3,8$) e do ácido clorídrico 0,005%/metanol 0,5% (controle-eluente; $78,0 \pm 4,0$) e todas as células foram mortas pela FMeOH nas concentrações de 0,5, 1 e 3 mg/mL ($0,0 \pm 0,0$), conforme pode ser verificado abaixo. Nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (respectivamente, $69,5 \pm 5,2$; $32,0 \pm 9,7$) a viabilidade das células também foi significativamente reduzida (GRÁFICO 6).



GRÁFICO 5 - Efeito da FMeOH de *R. sellowii* sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação dos extratos. * = valor significativamente diferente dos respectivos controles e do ácido clorídrico/metanol para $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 6$.

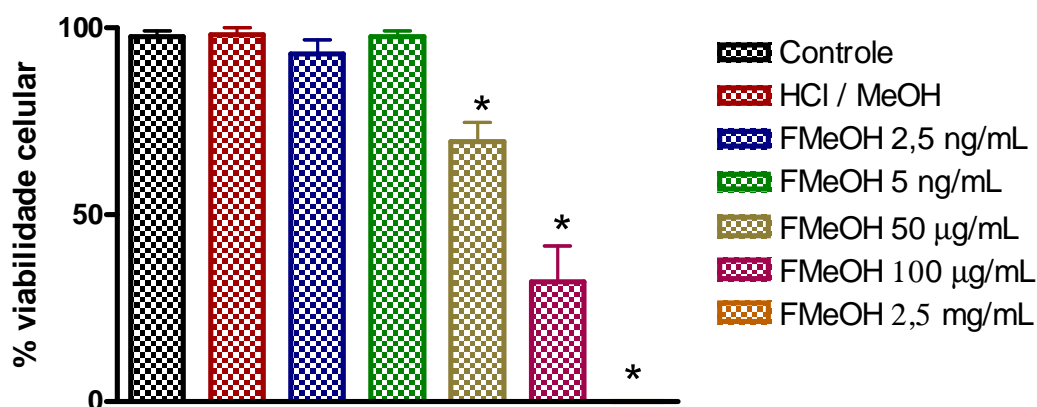


GRÁFICO 6 - Efeito da FMeOH de *R. sellowii* sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação dos extratos. * = valor significativamente diferente dos respectivos controles e do ácido clorídrico/metanol para $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 6$.

A FMeOH nas concentrações de 0,5; 2,5; 3 e 5 mg/mL aumentou significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10 (GRÁFICO 7, n = 9; 200,6±1,6; 170,3±38,3; 138,1±33,1; 239,8±26,6). A resposta foi significativamente diferente (p < 0,05 a 0,001) da resposta basal (controle; 100,0±8,7) e do ácido clorídrico 0,005%/metanol 0,5% (controle-eluente; 65,9±10,7), conforme pode ser verificado na figura a seguir.

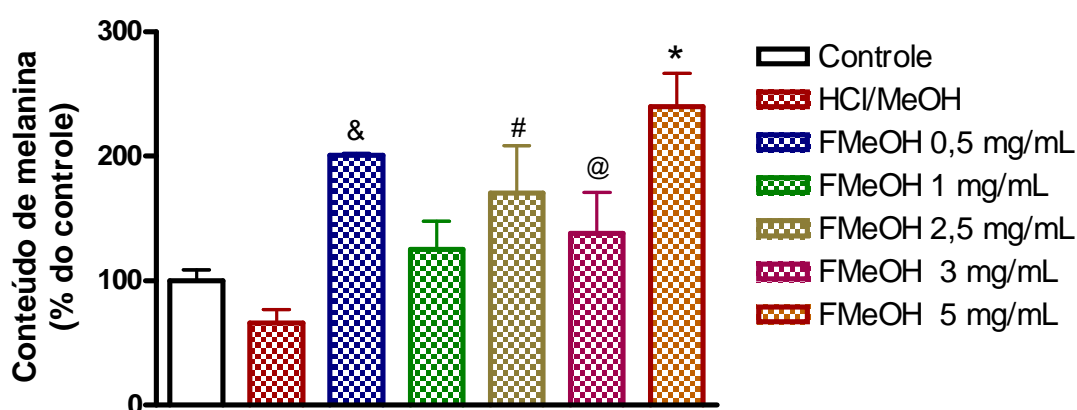


GRÁFICO 7 - Efeito da FMeOH de *R. sellowii* sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato. Símbolos indicam valores significativamente diferentes do controle e do controle-eluente, respectivamente, para: * ambos p < 0,001; # p < 0,05 e p < 0,01; & p < 0,01 e p < 0,001. A letra @ indica diferença significativa apenas do controle-eluente para p < 0,05. Cada ponto é a média ± EPM, n = 9.

4.5 EFEITOS DO COMPOSTO ISOLADO DE *R. sellowii* (Rs-1) SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10

O Rs-1 (24h de incubação) em nenhuma das concentrações testadas afetou significativamente a viabilidade celular (GRÁFICO 8, n = 6) e o conteúdo de melanina (GRÁFICO 9, n = 6-9) das células B16F10, conforme pode ser verificado abaixo.

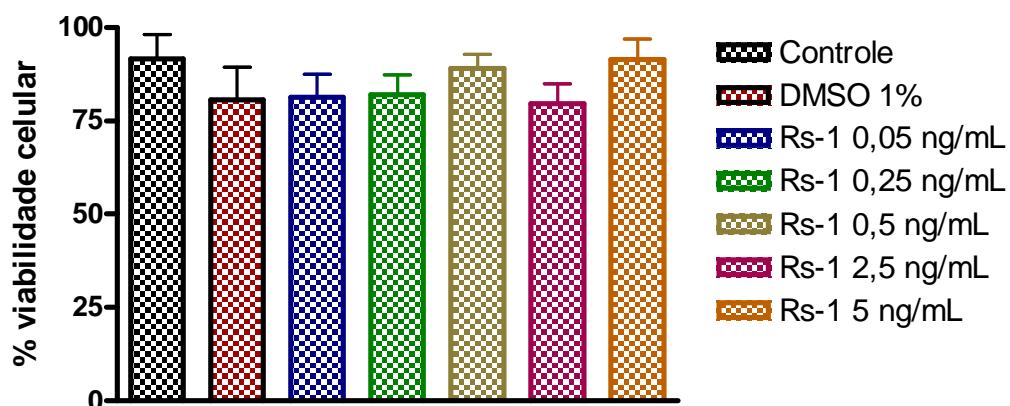


GRÁFICO 8 - Efeito da Rs-1 sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato. Cada ponto é a média \pm EPM, n = 6.

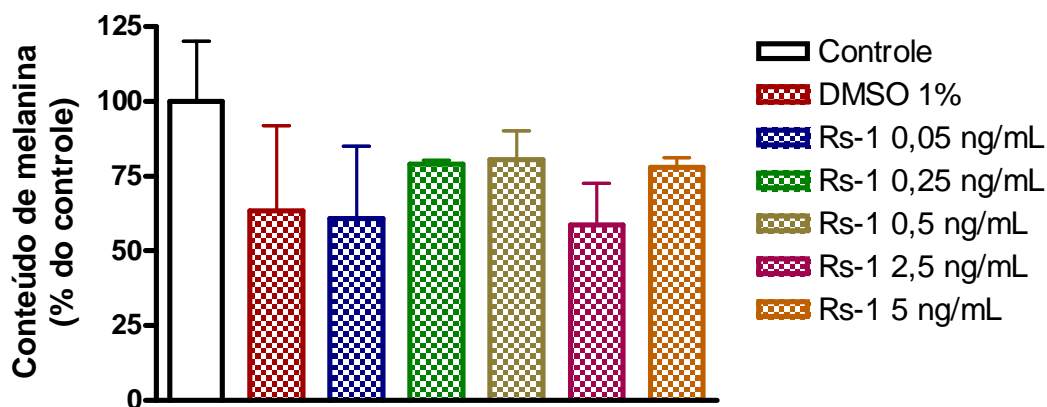


GRÁFICO 9 - Efeito da Rs-1 sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato. Cada ponto é a média \pm EPM, n = 6-9.

4.6 EFEITOS DA FRAÇÃO AQUOSA DE *R. sellowii* (FAQ) SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10

A FAQ (24h de incubação) em nenhuma das concentrações testadas afetou significativamente a viabilidade celular (GRÁFICO 10, n = 6) e o conteúdo de melanina (GRÁFICO 11, n=6-9) das células B16F10, conforme pode ser verificado abaixo.

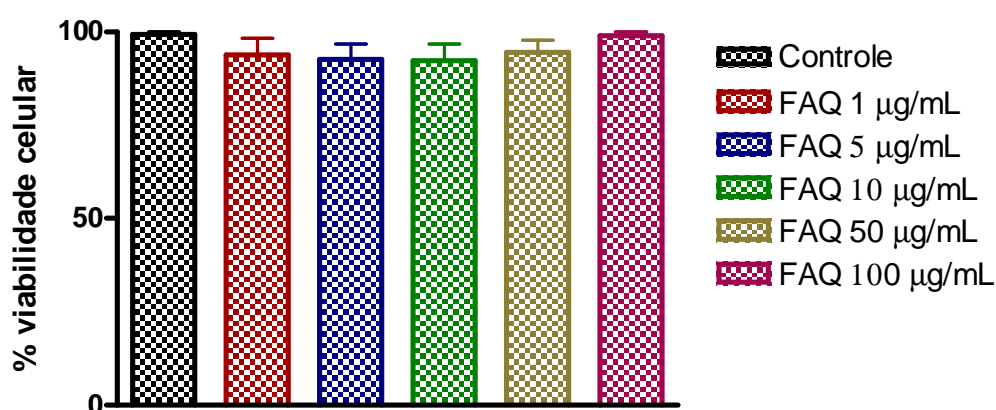


GRÁFICO 10 - Efeito da FAQ sobre a viabilidade de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato (n = 6). Cada ponto é a média \pm EPM, n = 6.

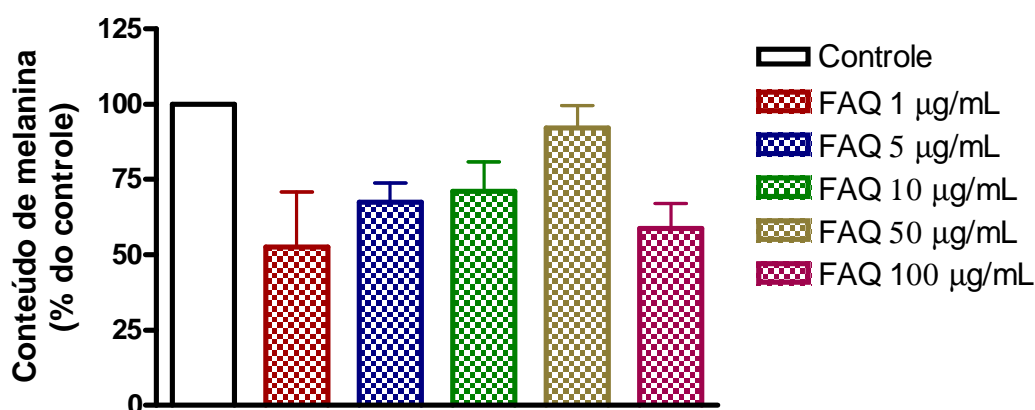


GRÁFICO 11 - Efeito da FAQ sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação do extrato (n = 6-9). Cada ponto é a média \pm EPM, n = 6-9.

4.7 RESULTADOS COMPLEMENTARES DOS DADOS JÁ APRESENTADOS

4.7.1 Efeito do hormônio α -MSH e da forskolina sobre o conteúdo de melanina das células B16F10

O hormônio α -MSH ($340,5 \pm 11,7$) e a forskolina ($354,6 \pm 21,1$) foram utilizados como controles positivos para testar a responsividade da preparação. Ambos aumentaram significativamente ($p < 0,01$ a $0,001$) o conteúdo de melanina das células tratadas, quando comparadas ao controle branco ($100,0 \pm 11,2$; GRÁFICO 12, $n=6$). Isso demonstra que as células eram capazes de aumentar o conteúdo de melanina quando eficazmente estimuladas. O ECRs, a FRA e a FMeOH 3 e 5 mg/mL ($123,5 \pm 14,2$; $170,9 \pm 20,2$; $142,9 \pm 4,7$; $193,1 \pm 5,2$) também aumentaram significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10.

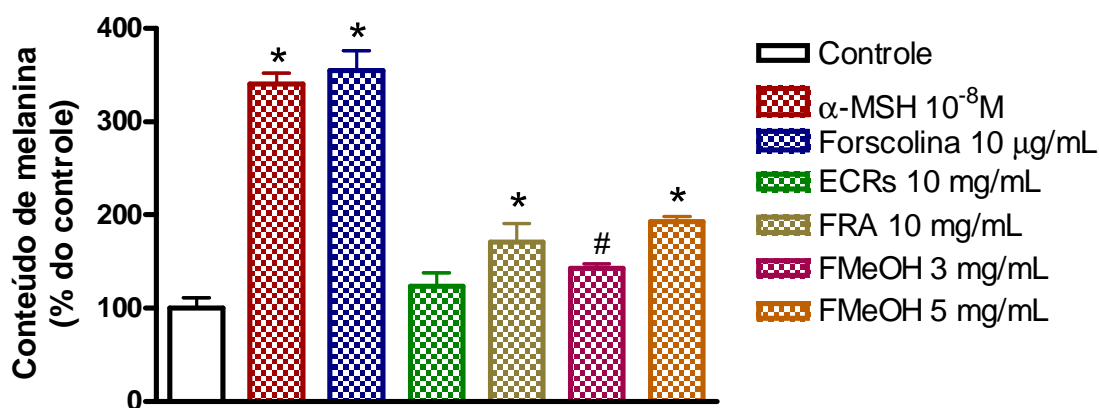


GRÁFICO 12 - Efeito do hormônio α -MSH, forskolina, ECRs, FRA e FMeOH sobre o conteúdo de melanina de células de melanoma B16F10, após 24 h da aplicação dos tratamentos. * = valor significativamente diferente do controle para $p < 0,001$. # = valor significativamente diferente do controle para $p < 0,01$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 6$.

4.7.2 Análise morfológica das células em cultivo

Fotomicrografias das células em cultivo após o tratamento com o ECRs e a fração metanólica (FMeOH) estão apresentadas nas figuras abaixo. Pode-se observar que o tratamento com o ECRs na concentração de 10 mg/mL (FIGURA 9) reduziu a proliferação celular e alterou a morfologia das células aderidas remanescentes, quando comparadas às células controle (FIGURA 8).

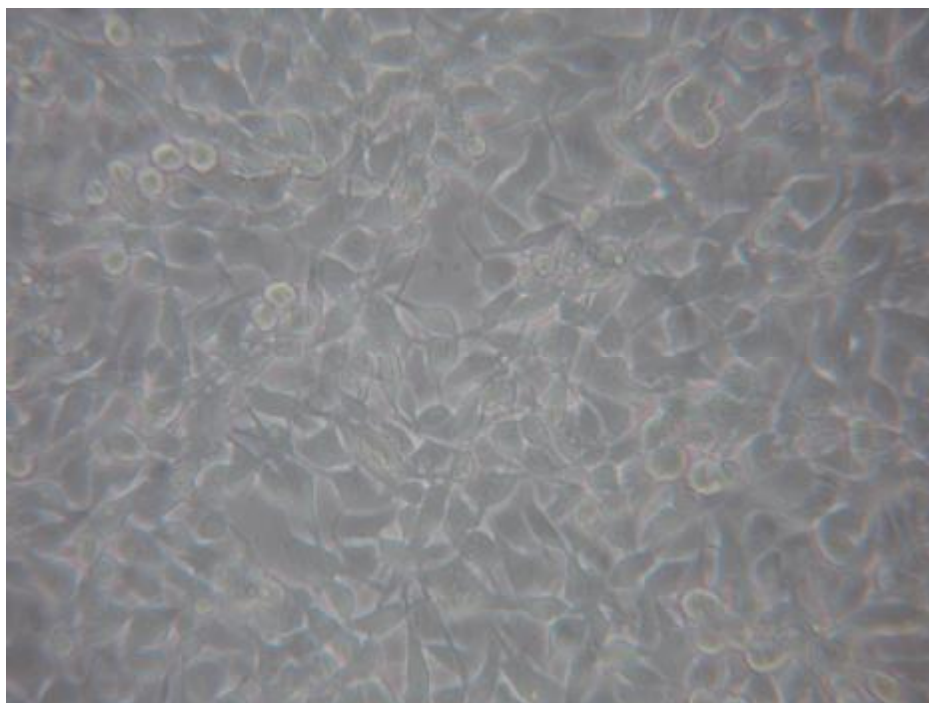


FIGURA 8 – Fotomicrografia das células controle em cultivo, não submetidas a tratamento. Aumento de 200x. (FONTE: O autor, 2008).

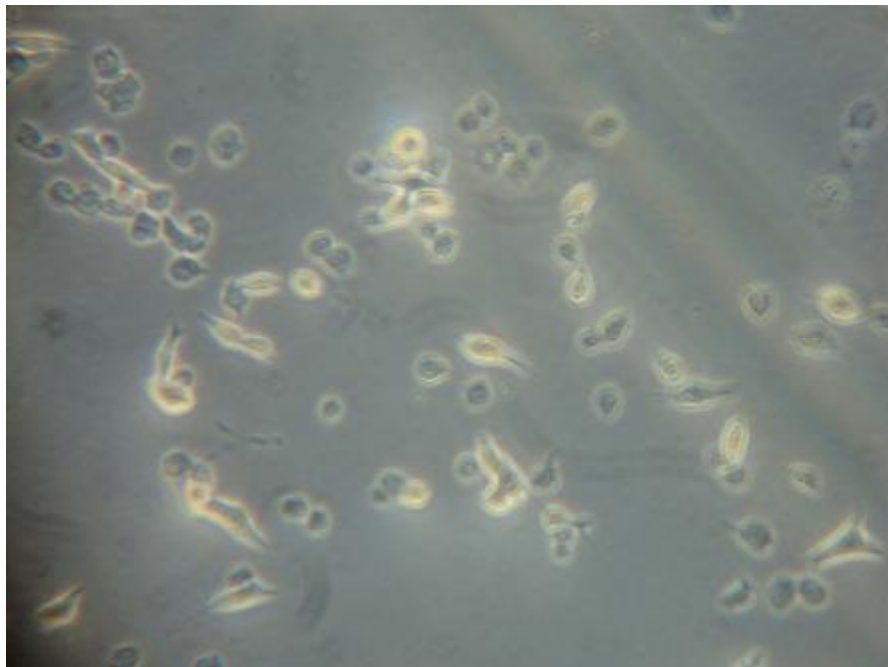


FIGURA 09 – Fotomicrografia das células submetidas a tratamento, por 24 h, com ECRs, na concentração de 10 mg/mL. Aumento de 200x. (FONTE: O autor, 2008).

O tratamento da FMeOH reduziu a proliferação celular em todas as concentrações testadas. Após 24 h de tratamento, as células mortas encontravam-se soltas (FIGURA 10 – concentração de 5 mg/mL) e as células aderidas remanescentes exibiram morfologia alterada (FIGURA 11 – concentração de 2,5 mg/mL), quando comparadas às células controle (FIGURA 8).

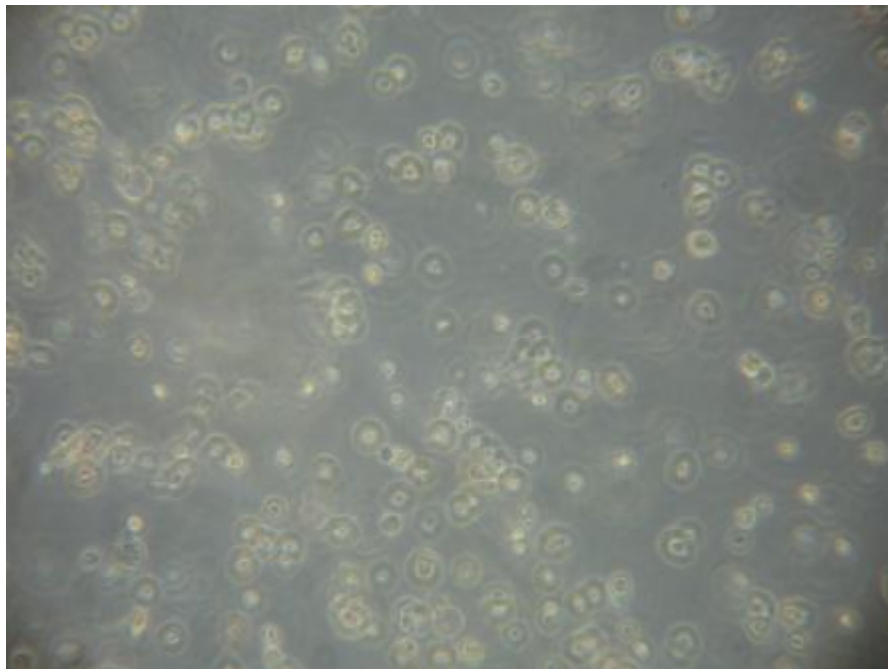


FIGURA 10 – Fotomicrografia das células submetidas a tratamento, por 24 h, com FMeOH, na concentração de 5 mg/mL. Aumento de 200x. (FONTE: O autor, 2008).

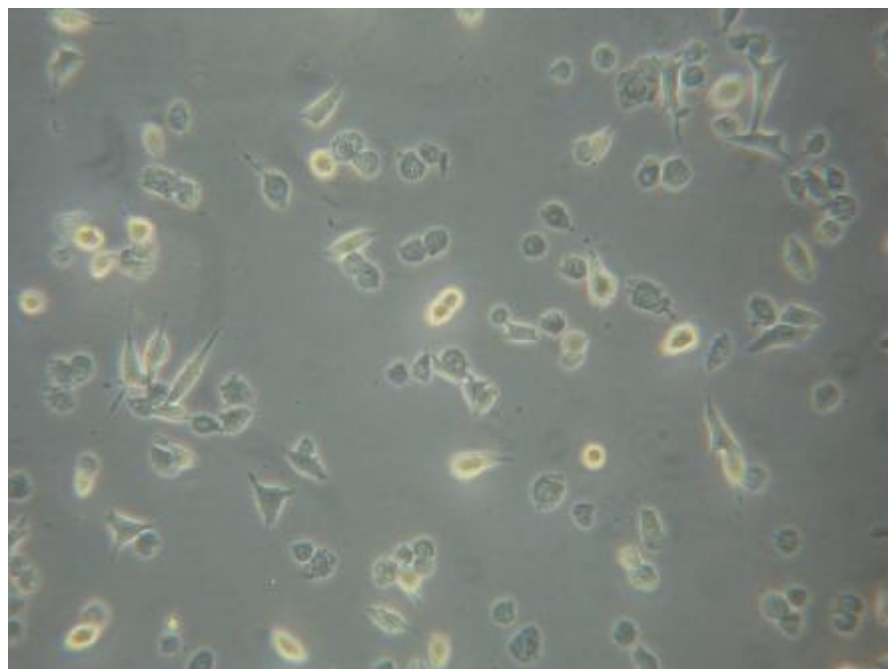


FIGURA 11 – Fotomicrografia das células submetidas a tratamento, por 24 h, com FMeOH na concentração de 2,5 mg/mL. Aumento de 200x. (FONTE: O autor, 2008).

4.7.3 Análise dos *pellets* celulares obtidos após os tratamentos

Conforme já citado, após o tratamento com a FRA e a FMeOH, as células de melanoma B16F10 tiveram o seu conteúdo de melanina significativamente aumentado. Isso pode também ser visualizado nas imagens abaixo obtidas dos *pellets* após o tratamento (FIGURA 12).

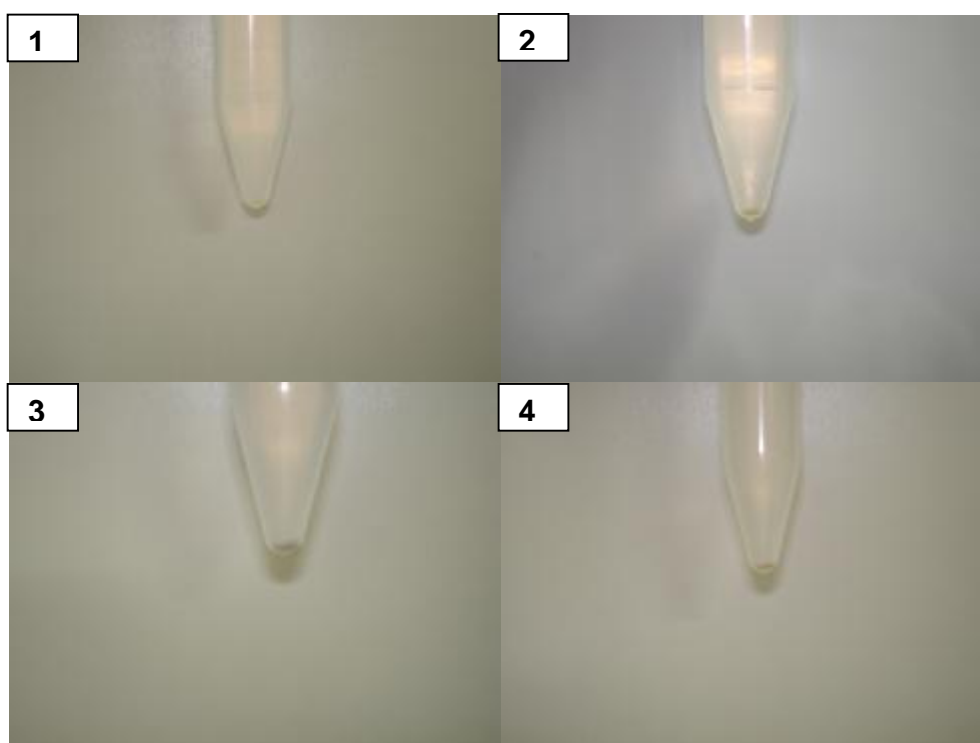


FIGURA 12 – Pellets celulares obtidos após o tratamento com as frações de *R. sellowii*.
LEGENDA: (1) controle basal, não tratado; (2) FRA 10 mg/mL; (3) FMeOH 5 mg/mL; (4) FMeOH 3 mg/mL.
FONTE: O autor (2008)

5. DISCUSSÃO

O tratamento para o câncer é baseado em protocolos de quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica. Embora a eficácia da quimioterapia na maioria dos tipos de câncer tenha melhorado nos últimos anos, ainda ocorrem diversos efeitos tóxicos contra tecidos saudáveis. Portanto, o desenvolvimento de novas drogas continua sendo um desafio, dentre elas, as derivadas de plantas podem desencadear menos efeitos colaterais (KESSLER *et al.*, 2006).

Aproximadamente 30% dos pacientes com melanoma desenvolvem a doença metastática, e a sobrevida dos pacientes é curta quando as metástases são detectadas em múltiplos sítios viscerais. A quimioterapia sistêmica é paliativa, sendo as drogas citotóxicas as mais utilizadas.

Os alcalóides das raízes de *Nuphar pumilum*, por exemplo, mostraram efeito citotóxico em linhagens de leucemia humana (U937), melanoma murino (B16F10) e fibroblasto humano (HT1080), através da indução de apoptose nas células, possivelmente ativando as caspases-8 e -3 (MATSUDA *et al.*, 2006).

Cinco novos alcalóides indólicos, isolados das raízes de *Rauwolfia serpentina* também apresentaram atividade citotóxica contra células da linhagem de leucemia humana pró-mielocítica (HL-60). Os alcalóides inibiram as topoisomerasas I e II, tendo sido o efeito tão potente quanto o do composto de referência camptotecina (ITOH *et al.*, 2005).

Neste trabalho, investigou-se o efeito do extrato de casca de *R. sellowii* e de suas frações sobre a proliferação de células de melanoma murino B16F10. Para isso, iniciou-se com a confecção do extrato. Segundo a literatura, o rendimento na obtenção de extratos brutos é geralmente pequeno, variando em torno de 3 a 10% (LINO & GARROTE, 2005; CAMPOS *et al.*, 2005). Esses baixos rendimentos costumam dificultar o teste de substâncias vegetais, pois tornam necessário usar grandes quantidades de material vegetal para o preparo dos extratos e subsequente fracionamento. Contudo os rendimentos do ECRs e da FRA, respectivamente, 18% e 20,4% (TABELA 2), apresentaram-se ligeiramente acima destes padrões usuais e demonstraram uma extração efetiva, a qual resultou em uma fração rica em alcalóides

(FRA) confirmada pela reação de Dragendorff positiva. Dentre os reativos gerais para pesquisa de alcalóides indólicos, este é o mais sensível (MANSKE & HOMES, 1952).

No fracionamento em coluna à vácuo, o primeiro solvente a ser eluído foi o hexano. Este é altamente apolar e se faz necessário para a deslipidificação da amostra a ser fracionada (CAMPOS *et al.*, 2005). Na fração hexânica não foi encontrado nenhum alcalóide de interesse e esta fração foi obtida em quantidade muito reduzida, portanto, a mesma não foi testada.

As frações diclorometano (3) e diclorometano/clorofórmio (4) apresentaram a mesma corrida cromatográfica em camada delgada (FIGURA 7), exibindo, cada uma, um composto majoritário similar ao da outra. Estas frações, após a evaporação, cristalizaram em seus respectivos balões. No fracionamento de alcalóides da *Prosopis juliflora*, uma das frações (F32) cristalizou e análises cromatográficas demonstram que esta poderia ser uma substância pura. A F32 foi a fração mais efetiva em induzir citotoxicidade e reatividade em células da glia em cultura (SILVA *et al.*, 2006). O processo de cristalização indicaria, portanto, a presença de um composto com alto grau de pureza, ou seja, uma substância isolada. Portanto as frações (3) e (4) foram unidas e passaram por outros processos de purificação por coluna cromatográfica, na tentativa de isolamento do composto antes dos testes em células B16F10. Após a purificação, o composto denominado Rs-1 foi testado. Contudo este não apresentou resultados significativos sobre a proliferação celular e o conteúdo de melanina das células B16F10 (GRÁFICOS 8 e 9). Observando-se a FIGURA 7, pôde-se verificar nas corridas cromatográficas que os compostos majoritários das frações (3) e (4), apresentaram R_f igual e maior ($R_{f\text{ Rs-1}} = 0,78$) do que o dos compostos separados na FRA e nas frações de 5 a 9 ($R_{f\text{ A}} = 0,29$ e $R_{f\text{ B}} = 0,33$). Isso demonstra que a constituição química do alcalóide de Rs-1 parece ser diferenciada em relação aos alcalóides A e B das demais frações, sugerindo ser esta a razão para a ausência de efeitos, ainda que o composto estivesse isolado.

As frações (5) a (9) apresentaram uma corrida cromatográfica muito semelhante (FIGURA 7), possuindo dois compostos majoritários polares similares em cada uma, os quais foram eluídos com diversas proporções de acetato de etila e metanol. Além disso, como também exibiram aspecto físico semelhante em seus balões, estas frações foram

reunidas, sendo que, a resultante, chamada de fração metanólica (FMeOH), foi testada nos ensaios biológicos.

A FAQ, em nenhuma das concentrações testadas, afetou a proliferação celular e o conteúdo de melanina das células B16F10 (GRÁFICOS 10 e 11). Observando-se a sua corrida cromatográfica (coluna 10 na FIGURA 7) nota-se que os alcalóides presentes nesta fração também têm composição química diferenciada dos alcalóides presentes nas frações de (5) a (9), cuja resultante, a FMeOH, evidenciou-se como a fração mais ativa.

Assim, o ECRs (GRÁFICO 1), a FRA (GRÁFICO 3) e a FMeOH (GRÁFICOS 5 e 6) reduziram significativamente a proliferação e a viabilidade das células B16F10. A FMeOH foi a que apresentou o maior efeito citotóxico sobre as células na maioria das concentrações testadas (GRÁFICOS 5 e 6). A partir da concentração de 2,5 mg/mL, em 24 h de tratamento, a fração foi citotóxica para 100% das células a ela submetidas. Além disso, as células aderidas remanescentes apresentavam morfologia alterada, demonstrando a citotoxicidade da fração (FIGURA 11).

Observando-se a placa cromatográfica (FIGURA 7), nota-se que os dois alcalóides majoritários presentes na FRA seriam os mesmos que se apresentaram nas frações de (5) a (9). Ou seja, estes compostos estariam sob um maior grau de isolamento na FMeOH. Os consistentes efeitos citotóxicos da FMeOH poderiam, então, ser justificados por este isolamento, induzido pelo fracionamento, dos alcalóides responsáveis pelos mesmos, pois isto favoreceria sua atividade. O efeito citotóxico, portanto, sofreria aumento seguindo o fracionamento, ou seja, o menor efeito visto com o ECRs; o efeito intermediário com a FRA e o maior, com a FMeOH. Desta forma, podemos sugerir que esses alcalóides é que seriam os responsáveis pelo efeito de citotoxicidade obtido, embora mais estudos sejam necessários para confirmar esta hipótese e para elucidar o mecanismo de ação dessas substâncias.

A atividade de alcalóides diversos sobre células pigmentares tem sido freqüentemente investigada. Por exemplo, o extrato de *Rauwolfia radix*, que induziu aumento da citotoxicidade de células T ativadas contra células do tumor Molt-4 e T98G em cultura, foi capaz de aumentar a secreção das citocinas interferon-gama (IFN- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (JIN *et al.*, 2002).

O alcalóide oxoisoaporfina, isolado das raízes de *Menispermum dauricum*, também apresentou atividade citotóxica sobre quatro linhagens de células transformadas (YU *et al.*, 2001), incluindo melanomas. Além disso, os alcalóides cumarina e acridona, isolados das raízes de *Boenninghausenia japonica* NAKAI, inibiram o crescimento de células de adenocarcinoma gástrico humano (MK-1), carcinoma uterino humano (HeLa) e melanoma murino (B16F10) (CHAYA *et al.*, 2004).

Finalmente, o alcalóide matrine um composto isolado da *Sophora flavescens*, espécie muito utilizada na medicina tradicional chinesa, induziu inibição significativa dose e tempo-dependente da proliferação, adesão e invasão de células de melanoma maligno humano A375 em cultura, podendo, portanto, inibir a metástase celular *in vitro* (LIU *et al.*, 2008).

Resultados anteriores mostraram que o extrato hidroalcoólico fluido de casca de *R. sellowii* inibia significativamente a proliferação das células de melanoma murino B16F10 sem afetar sua viabilidade exercendo, portanto, um efeito citostático, mas não citotóxico (SIENNA *et al.*, 2006). Já o ECRs (GRÁFICO 1), a FRA (GRÁFICO 3) e a FMeOH (GRÁFICOS 5 e 6) aqui testados reduziram a viabilidade das células exercendo, portanto, efeito citotóxico. Essa diferença de efeitos pode ser devida ao procedimento de extração efetuado para obtenção dos dois extratos (fluido e bruto), o qual levaria à presença de compostos diferentes em cada um deles. Confirmando os resultados aqui expostos, testes de atividade antiproliferativa em cultura de células tumorais, incluindo a linhagem de melanoma UACC62, mostraram resultados preliminares indicativos de atividade citotóxica do extrato etanólico alcaloídico obtido das cascas de *R. weddeliana*. Essa espécie de *Rauwolfia* também é rica em alcalóides indólicos, alguns dos quais, inclusive, já isolados (KATO *et al.*, 2000).

A berberina, outro alcalóide extraído das raízes das espécies de *Berberis*, *Coptis* e *Hydrastis*, induziu arrastamento do ciclo celular e apoptose em diversas linhagens malignas de câncer. Portanto este alcalóide tem sido considerado um potencial agente terapêutico anti-tumoral (PEREIRA *et al.*, 2007). Em linhagens de melanoma murino K1735-M2 e humano WM793 a berberina exibiu um efeito multi-fásico, tendo sido, as perturbações no ciclo celular, dependentes da concentração utilizada do alcalóide. As baixas concentrações acumulam-se nas mitocôndrias e resultam em arrastamento do

ciclo para G1, enquanto as concentrações maiores tendem a acumular-se no núcleo e no citoplasma e levam a G2. Portanto as diferentes concentrações de berberina levam a respostas celulares distintas em função do padrão de distribuição intracelular deste alcalóide, o qual poderia funcionar como um agente citostático ou citotóxico (SERAFIM *et al.*, 2008).

A síntese de melanina ocorre no interior dos melanossomos, organelas derivadas dos endossomos e inicia-se com a enzima tirosinase que é essencial para o processo. A enzima sintetiza dopaquinona a partir da tirosina, sendo considerada o passo limitante para o processo de melanogênese (LEE *et al.*, 2005). Para que a biossíntese ocorra, algumas condições são necessárias, incluindo a presença de tirosinase na membrana do melanossomo, de substrato, o aminoácido tirosina, de condições enzimáticas favoráveis à atividade da tirosinase e de um pH ácido no melanossomo (BRILLIANT, 2001).

A concentração de 10 mg/mL da FRA, e as concentrações de 0,5; 2,5; 3 e 5 mg/mL da FMeOH aumentaram significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10, resultado, este, significativamente diferente do controle-basal e do controle-eluente (GRÁFICOS 4 e 7). Após o tratamento com a FRA e FMeOH, o *pellet* das células apresentou-se visualmente mais escuro em relação ao das células controle, confirmando o aumento do conteúdo de melanina (FIGURA 12). Contudo o aumento da síntese de melanina, induzido pelas frações não foi tão pronunciado quanto o desencadeado pelo hormônio α -MSH e pelo ativador de adenil ciclase, forskolina (GRÁFICO 12). Essas substâncias foram utilizadas como controles-positivos para os experimentos de conteúdo de melanina, visto que a melanogênese é estimulada pelo aumento das concentrações intracelulares de monofosfato cíclico de adenosina (AMP_c), o que pode ser desencadeado pelo hormônio α -MSH, ou por um agente exógeno como a forskolina (NEWTON *et al.*, 2007).

Diversos efetores podem estar envolvidos no aumento da síntese de melanina induzido pelas frações, tais como agentes que aumentam os níveis de AMP_c (α -MSH, forskolina, isobutilmetilxantina - IBMX) e compostos vegetais. Existem duas importantes vias de sinalização envolvidas na indução da melanogênese: a via mediada por proteína quinase C (PKC) e a via mediada por AMP_c . A participação da PKC na indução

da melanogênese ainda não foi totalmente elucidada; já o AMP_c tem um papel chave na regulação do processo, aumentando não só a atividade da tirosinase pré-existente, como também, a quantidade de mRNA da enzima. Através da ativação da proteína quinase dependente de AMP_c (PKA) e da proteína de ligação ao CRE (CREB; CRE: elemento responsivo a AMP_c), o AMP_c promove o aumento da transcrição do MITF, fator crucial para o desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos e para a transcrição da proteína tirosinase (LEE *et al.*, 2007). Sendo a tirosinase a enzima passo limitante para o processo de melanogênese, tanto um aumento na sua expressão como na sua atividade poderiam levar a um aumento do conteúdo de melanina. Assim havendo elevação dos níveis de MITF, aumentaria a transcrição de tirosinase e, conseqüentemente, seu efeito sobre a síntese de melanina. A forskolina é capaz de aumentar os níveis de MITF, enquanto que o resveratrol, um agente despigmentante encontrado no vinho tinto, mantém esses níveis inalterados (NEWTON *et al.*, 2007).

Não foram encontrados estudos descrevendo o efeito de alcalóides sobre a melanogênese, mas existem diversos compostos vegetais com efeitos sobre este processo descritos em literatura. O extrato dos grãos de *Vigna angularis*, por exemplo, induziu aumento na melanogênese de células B16 em cultura e na pigmentação da pelagem de camundongos C3H. Esse extrato ativa exatamente a adenilil ciclase e as vias de proteínas quinases, resultando em um aumento da melanogênese (ITOH & FURUICHI, 2005).

A quercetina, um flavonóide encontrado em diversas espécies vegetais, estimula a melanogênese em células de melanoma humano e em melanócitos normais, a partir do aumento da atividade e da síntese da tirosinase (NAGATA *et al.*, 2004).

O ácido rosmarínico é um composto natural encontrado nas espécies do gênero *Labitae*. Este também foi capaz de induzir a melanogênese a partir da ativação da via de sinalização da PKA e aumento da expressão de tirosinase (LEE *et al.*, 2007).

Por último, a glicirrizina, presente em grandes quantidades nas raízes de *Glycyrrhiza glabra* induziu a melanogênese através do aumento dos níveis intracelulares de AMP_c exatamente em células de melanoma murino B16F10 (LEE *et al.*, 2005).

Alguns flavonóides, como kurarinol, kuraridinol e a trifolirrizina, extraídos das raízes de *Sophora flavescens* podem inibir a síntese de tirosinase e, conseqüentemente, a melanogênese. Este efeito de inibição da melanogênese foi mediado pela redução dos níveis de AMP_c (HYUN *et al.*, 2008). A *S. flavescens* é uma espécie que também possui alcalóides, os quais inibem a proliferação de células de melanoma maligno humano, conforme já descrito.

O ECRs não induziu efeitos significativos no conteúdo de melanina (GRÁFICO 2). É provável que neste, os alcalóides responsáveis pelo aumento da melanogênese induzido pelas frações FRA e FMeOH não tenham atingido a concentração necessária para desencadear o efeito. O ECRs é um extrato bruto, portanto contém todas as substâncias extraídas da casca de *R. sellowii*, não apenas os alcalóides; além de outros contaminantes como gorduras e outros compostos sem atividade biológica (SOUZA *et al.*, 2000).

A melanina é um heteropolímero irregular que consiste de unidades monoméricas derivadas da oxidação enzimática do aminoácido tirosina. O processo de síntese de melanina ocorre em organelas ácidas especializadas, os melanossomos. Conforme já descrito, a presença de um pH ácido no melanossomo é uma condição necessária para que a biossíntese de melanina ocorra. No entanto ainda não foi elucidado o fato do processo de polimerização da melanina *in vitro* (*cell free system*) requerer um pH alcalino, enquanto que *in vivo* o meio ácido predominar no melanossomo e ser essencial para a máxima interação entre proteínas e melanina. Esta discrepância poderia ser explicada pela hipótese de que a enzima tirosinase seria ativa em pH ácido, mas outras proteínas melanossomais que teriam um papel importante no processo de síntese da melanina estariam relacionadas à exigência do pH alcalino. Sabe-se, inclusive, que *in vivo* o polímero de melanina estaria ligado a proteínas como condição essencial para a sua formação. *In vivo*, o pH melanossomal estaria entre 3 e 5, assim a formação do polímero somente seria possível quando as proteínas estruturais melanossomais fornecessem nichos alcalinos com suas cadeias laterais de aminoácidos (MANI *et al.*, 2001).

O ECRs, a FRA e a FMeOH; foram solubilizados com soluções de ácido clorídrico, mas como pôde ser visto nos gráficos 2, 4 e 7, não houve efeito significativo

do eluente no conteúdo de melanina das células B16F10. O pH ácido do eluente não inibiu a melanogênese, e poderia colaborar para o processo, porém, como o melanosomo possui mecanismos para a regulação do pH, a presença do ácido clorídrico não afetou significativamente o conteúdo de melanina. A proteína *pink* ou proteína *p*, por exemplo, é uma proteína de membrana melanosomal, a qual é responsável pela compensação do balanço eletrogênico de prótons garantindo a acidificação necessária para a síntese de melanina (BRILLIANT, 2001).

Por outro lado, alguns autores sugerem que a produção de melanina deve ser finamente controlada e compartimentalizada, pois a mesma pode ser um produto tóxico para a célula que a contém (BRILLIANT *et al.*, 2001). Segundo Hill (1997), a melanina seria como uma “faca de dois gumes”, pois pode agir como fotoprotetora ou fotosensibilizadora. O pigmento teria um pequeno efeito de sensibilização do DNA, o qual desregularia o meio intracelular (HILL *et al.*, 1997). Por esta razão, os melanócitos possuem complexos mecanismos bioquímicos intracelulares para compartimentalização, detoxificação ou reparo do DNA quando há algum comprometimento celular (TOLLESON, 2005). Durante o processo de síntese de melanina a partir da tirosina, um grande número de agentes potencialmente citotóxicos são formados, incluindo quinonas e peróxido de hidrogênio. Esta pode ser a razão para o processo ocorrer no interior das organelas (melanosomos), pois assim estes monômeros citotóxicos não reagiriam com outros componentes citosólicos (MANI *et al.*, 2001).

No entanto a melanina é normalmente referida como fotoprotetora da pele humana, sendo a principal defesa do organismo contra a foto-carcinogênese. Ela age inibindo a formação de produtos do DNA que são induzidos pela luz UV, portanto, o aumento da melanogênese faz parte das respostas cutâneas protetivas. Algumas evidências mostram que o dano no DNA e/ou o reparo do mesmo é um sinal para pigmentação em resposta à UV (ELLER *et al.*, 1996). Os alcalóides criptolepina, matadina e serpentina, isolados de raízes das espécies africanas *Cryptolepis sanguinolenta*, *Strychnos gossweileri* e *Rauwolfia serpentina*, respectivamente, apresentaram atividade citotóxica sobre as células de melanoma murino B16F10. Estes ligaram-se firmemente ao DNA, estabilizaram o complexo covalente topoisomerase II-

DNA e estimularam o corte do DNA por esta enzima. Tal estudo sugeriu que o DNA e a topoisomerase II são dois alvos intracelulares potenciais para o mecanismo de ação dos citados alcalóides sobre as células testadas (DASSONNEVILLE *et al.*, 1999). Sendo assim, os alcalóides da *R. sellowii* poderiam apresentar esta mesma atividade e os fragmentos gerados de DNA seriam capazes de induzir a melanogênese e desencadear o resultado observado. Desta forma, a citotoxicidade das frações FRA e FMeOH poderia ser exacerbada com o aumento da melanogênese. Contudo estudos mais aprofundados são necessários para realmente elucidar os mecanismos envolvidos nesse aumento.

Para a continuidade desses estudos, por exemplo, os efeitos do ECRs e suas frações devem ser futuramente investigados em melanócitos normais. Nas células de melanoma murino B16F10, a FRA e a FMeOH induziram a um efeito citotóxico e aumento do conteúdo de melanina. Se as frações não induzirem um efeito hipermelanogênico nos melanócitos normais, as mesmas apresentariam grande potencial para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos.

O flavonol quercetina induz efeitos semelhantes aos apresentados pelas frações de *R. sellowii* estimulando a melanogênese em células de melanoma, através do aumento da atividade tirosinásica e da diminuição de fatores de inibição da melanogênese (NAGATA *et al.*, 2004). Este mesmo composto inibiu significativamente a proliferação de células B16-BL16, em incubação de 48 h, e a metástase destas células, através da parada do ciclo celular, com indução de apoptose e diminuição da expressão da proteína Bcl-2 (ZHANG *et al.*, 2000). Em estudo subsequente, observou-se que os mecanismos moleculares da indução de apoptose nestas células pela quercetina incluem perda do potencial de membrana mitocondrial, aumento da atividade da caspase-3, inibição da expressão de Bcl-2 e PKC-alfa e indução da translocação de PKC-delta (ZHANG *et al.*, 2005). No entanto, a quercetina também induz aumento de melanogênese em melanócitos humanos normais (NAGATA *et al.*, 2004) o que pode dificultar o seu emprego como agente quimioterápico.

O conjunto de resultados apresentados neste estudo revelaram efeitos interessantes e ainda desconhecidos de *Rauwolfia sellowii*, reafirmando o grande potencial deste vegetal sob investigação. Assim, tais resultados podem vir a se

constituir em uma base de dados científicos referente a esta espécie vegetal, que pode ser incluída em investigações de futuros agentes terapêuticos contra patologias pigmentares. O entendimento dos mecanismos pelos quais as frações desencadearam os efeitos citotóxico e hipermelanogênico, bem como o isolamento final dos compostos responsáveis pelos mesmos, pode colaborar para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos e/ou terapêuticos para o melanoma e outras patologias pigmentares.

6. CONCLUSÕES

- a preparação de cultura de células de melanoma murino B16F10 revelou-se um ensaio sensível ao teste do efeito de substâncias vegetais sobre viabilidade e conteúdo de melanina.
- o ECRs exerceu efeito citotóxico, mas não alterou o conteúdo de melanina das células B16F10.
- a FRA e a FMeOH, no entanto, apresentaram-se como citotóxicas e hipermelanogênicas sobre as células B16F10.
- os alcalóides das frações FRA e FMeOH de *R. sellowii* podem ser as substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos aqui observados.
- mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação e compostos isolados responsáveis pelas atividades biológicas aqui apresentadas e o potencial de *Rauwolfia sellowii* como fonte de substâncias a serem empregadas contra patologias pigmentares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4 ed. São Paulo: Artmed, 2006.

ANDRADE, L. N. S. Efeitos citotóxicos de ácidos graxos em células de melanoma. **Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências. Área de concentração Fisiologia Humana. Departamento de Fisiologia e biofísica**. São Paulo, 2003.

ARAI, K.; MATSUMOTO, Y.; NAGASHIMA, Y.; YAGASAKI, K. Regulation of class II beta-tubulin expression by tumor suppressor p53 protein in mouse melanoma cells in response to Vinca alkaloid. **Mol. Cancer Res.**, v. 4, p. 247-255, 2006.

BAGNARA, J.T. Cytology and cytophysiology of non-melanophore pigment cells. **Int. Rev. Cytol.**, v. 29, p. 173-205, 1966.

BALICK, M. J. - Ethnobotany and the identification of therapeutic agents from the rainforest. In: **CIBA Foundation Symposium on Bioactive Compounds from Plants**. Bangkok: CIBA, pp. 22-39, 1990.

BARTON, D. & OLLIS, W.D. **Advances in Medicinal Phytochemistry**. John Libbey, London, pp. 195, 1986.

BATISTA, C. V. F.; SCHRIPSEMA, J.; VERPOORTE, R.; RECH, S. B.; HENRIQUES, A. T. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. **Phytochem.**, v. 41, n. 3, p. 969-973, 1996.

BATISTA, C. V. F.; RECH, S. B.; SANTOS, A. L. dos; VILLETTI, D. S.; SELBACH, F.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T. Produção de demetoxibernulosina e picrinina por culturas *in vitro* de *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg. **Cad. de Farmácia.**, v.13, n.2. p.163-164, 1997.

BRILLIANT, M.H. The mouse *p* (*pinked-eyed dilution*) and human *p* genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanossomal pH. **Pigment Cell Res.**, v.14, p. 86-93, 2001.

CAMPOS, A.R.; LIMA, R.C.P.; UCHOA, D.E.A.; SILVEIRA, E.R.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Pro-erectile effects of an alkaloidal rich fraction from *Aspidosperma ulei* root bark in mice. **J. of Ethnopharm.** v.104, p.240-244, 2006.

“Casca de *Rauwolfia sellowii*”, on line, disponível: [http:// www.netec.or.th](http://www.netec.or.th). Brasil. Acesso em 06/03/2007.

CHO, Y. H.; KIM, J. H.; PARK, S. M.; LEE, B. C.; PYO, H. B.; PARK, H. D. New cosmetic agents for skin whitening from *Angelica dahurica*. **J. Cosm Science**, v. 57, n. 1, p. 11-21, 2006.

CHOI, H., AHN, S., LEE, B.G., CHANG, I., HWANG, J.S. Inhibition of skin pigmentation by an extract of *Lepidium apetalum* and its possible implication in IL-6 mediated signaling. **Pigment Cell Res.**, v.18, p.439-446, 2005.

CORRÊA Jr., C.; GRAÇA, L. R. & SCHEFFER, M. C. **Complexo agroindustrial das plantas medicinais, aromáticas e condimentares no Estado do Paraná – Dignóstico e perspectivas**. Sociedade Paranaense de Plantas Mediciniais, EMATER-Paraná e EMBRAPA FLORESTAS, Curitiba, pp. 271, 2004.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos Fitoterápicos uma perspectiva de negócio para indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v.16, n.9-10, p.71-76, 2004.

DASSONNEVILLE, L.; BONJEAN, K.; PAUW-GILLET, M.C.; COLSON, P.; HOUSSIER, C. LECLERCQ, J.Q.; ANGENOT, L. & BAILLY, C. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by three DNA-intercalating plant alkaloids: cryptolepine, matadine, and serpentine. **Biochem.**, v. 38, n. 24, p. 7719-7726, 1999.

ELLER, M.S.; OSTROM, K.; GILCHREST, B.A. Dna damage enhances melanogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.93, p.1087-1092, 1996.

FILADELFI, A.M.C. Efeitos biológicos, receptores e mecanismos de ação de endotelinas em células de eritroforoma de teleosteos da linhagem GEM-81. **Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências**. São Paulo, 2003.
FERREIRA, S. H., org. – **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

"Gênero *Rauwolfia*", on line, disponível: [http:// www.nature.jardim.free.fr](http://www.nature.jardim.free.fr). Brasil. Acesso em 27/09/2006.

GORDON, P.R. e GILCHREST, B.A. Human melanogenesis is stimulated by diacylglycerol. **J. Invest. Dermatology**, v.93, p. 700-702, 1989.

GROSSMAN, E.; MESSERLI, F.H.; GOLDBOURT, U. Antihypertensive therapy and the risk of malignancies. **Eur Heart J.**, v. 22, p. 1343-1352, 2001.

HADLEY, M.E. **Endocrinology**. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 343,1988.

HADLEY, M.E. **Endocrinology**. 4 ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, p. 549, 1996.

HACHIYA, A.; KOBAYASHI, A.; OHUCHI, A.; KITAHARA, T. e TAKEMA, Y. The inhibitory effect of an extract of *Sanguisorba officinalis* L. on ultraviolet B-induced pigmentation via the suppression of endothelin-converting enzyme-1-alpha. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 24, n. 6, p. 688-692, 2001.

HEARING, V.J. The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment. **Pigment Cell Res.**, v.13, n. 8, p. 23-34, 2000.

HEGNAUER, R. Biosynthesis of alkaloids in plants. **Pharm Weekbl.** v. 85, p. 937-950, 1950.

HILL, H.Z.; LI, W.; XIN, P.; MITCHELL, D.L.; Melanin: a two edged sword? **Pigment Cell Res.** v.10, n. 3, p. 158-161, 1997.

HYUN, S.K.; LEE, W.; JEONG, D.M.; KIM, Y.; CHOI, J.S. Inhibitory effects of kurarinol, kuraridinol, and trifolirhizin from *Sophora flavescens* on tyrosinase and melanin synthesis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, n. 1, p. 154-158, 2008.

IMOKAWA, G.; YADA, Y. e MIYAGISHI, M. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 267, n. 34, p. 24675-24680, 1992.

IMOKAWA, G.; KOBAYASI, T. e MIYAGISHI, M. Intracellular signaling mechanisms leading to synergistic effects of endothelin-1 and stem cell factor on proliferation of cultured human melanocytes. **J. Biol. Chem.**, v.275, n.43, p. 33321-33328, 2000.

ISOLDI, M.C.; PEREIRA, E.A.; VISCONTI, M.A. & CASTRUCCI, A.M.L. The role of calcium, calcium-activated K⁺ channels, and tyrosine/kinase in psoralen-evoked responses in human melanoma cells. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.37, p. 559-568, 2004.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H. Spectrophotometric Assay of Eumelanin in Tissue Samples. **Analytical biochem.** v. 215, p.273-277, 1993.

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, A.; KUMASHIRO, T.; YAMAGUCHI, M.; NAGAKURA, N.; MIZUSHINA, Y.; NISHI, T.; TANAHASHI, T. Indole Alkaloids and Other Constituents of *Rauwolfia serpentina*. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 848-852, 2005.

ITOH, T.; UMEKAWA, H.; FURUICHI, Y. Potencial Ability of Hot Water Adzuki (*Vigna angularis*) Extracts to Inhibit the Adesion, Invasion, and Metastasis of Murine B16 Melanoma Cells. **Biosc Biotechnol Biochem.**, v. 69, p. 448-454, 2005.

JACKSON, I. J.; BUDD, P.; HORN, J. M. JOHNSON, R.; RAYMOND, S.; STEEL, K.ackson, I.J. Genetics and molecular biology of mouse pigmentation. **Pigment Cell Res.**,v. 7, p. 73-80, 1994.

JIMBOW, K.; HUA, C.; GOMEZ, P.F.; HIROSAKI, K.; SHINODA, K.; SALOPER, T.G.; MATSUSAKA, H.; JIN, H.; YAMASHITA, T. Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in eu- and pheomelanosome biogenesis. **Pigment Cell Res.**, v. 13, n. 8, p. 110-177, 2000.

JIMENEZ, M.; TSUKAMOTO, K.; HEARING, V. J. Tyrosinases from two different loci are expressed by normal and by transformed melanocytes. **J. Biol. Chem.** v. 266, n.2, p. 1147-1156, 1991.

JIN, G. B.; HONG, T.; INOUE, S.; URANO, T.; CHO, S.; OTSU, K.; KITAHARA, M.; OUCHI, Y.; CYONG, J. C. Augmentation of immune cell activity against tumor cells by *Rauwolfia radix*. **J. Ethnopharmacol.**, v.81, n. 3, p. 365-372, 2002.

JOFFE, S. & THOMAS, R. - Phytochemicals: a renewable global resource. **AgBiotech News Info**, v.1: 697-700, 1989.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, I. **Histologia Básica**. São Paulo: EDUSP, p. 175, 1974.

KADONO, S.; MANAKA, I.; KAWASHIMA, M.; KOBAYASHI, T. e IMOKAWA, G. The role of the epidermal endothelin cascade in the hyperpigmentation mechanism of lentigo senilis. **J. Invest. Dermatol.**, v.116, n. 4, p.571-577, 2001.

KATE, K. T. & LAIRD, S. A. - Natural products and the pharmaceutical industry. In: KATE, K.T. & LAIRD, S.A., orgs. - The commercial use of biodiversity: access to genetic resources and benefit-sharing. Kew, **Royal Bot. Gardens**, p. 34-77, 1999.

KATO, L.; BRAGA, R.M.; KOCH, I.; KOHN, L.K.; ANTÔNIO, M.A.; CARVALHO, J.E. Alcalóides indólicos de Apocynaceae: Estudo de espécies brasileiras de *Rauwolfia*. **Rev. Eletron. de Farm.**, p.109-111, 2000.

KESSLER, J.H.; MULLAUER, F.B.; ROO, G.M. de; MEDEMA, J.P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulinic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. **Cancer Lett.**, p.1-14, 2006.

KIM, D.S.H.L.; PEZZUTO, J.M. & PISHA, E. Synthesis of betulinic acid derivatives with activity against human melanoma. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 8, p. 1707-1712, 1998.

KIM, K., KIM, J.A., EOM, S., LEE, S.H., MIN, K.R., KIM, Y. Inhibitory effect of piperlongumine on melanin production in melanoma B16 cell line by downregulation of tyrosinase expression. **Pigment Cell Res.**, v.19, p.90-98, 2005.

KINGHORN, A. D., SEO, E.-K. Plants as sources of drugs. In: FULLER, G., MCKEON, T. A., BILLS, D. D. Agricultural materials as renewable resources: Nonfood and industrial applications. Washington: **Am. Chem. Society**, 1996, p. 179-193.

KOBAYASHI, A.; HACHIYA, A.; OHUCHI, A.; KITAHARA, T. e TAKEMA, Y. Inhibitory mechanism of an extract of *Althaea officinalis* L. on endothelin-1-induced melanocyte activation. **Biol. Pharm. Bull.**, v.25, n. 2, p. 229-234, 2002.

KOGAWA, K.; MURAMATSU, H. Enhanced inhibition of experimental metastasis by the combination chemotherapy of Cu-Zn SOD and adriamycin. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 17, p. 239-244, 1999.

KWAN, T.H. & MIHM Jr., M.C. A Pele. In: ROBBINS, S.L. & COTRAN, R.S. eds. **Patologia Estrutural e Funcional**. Ed. Interamericana Ltda., Rio de Janeiro, Cap. 29, p. 1177-1213, 1983.

LAHAV, R.; HEFFNER, G. e PATTERSON, P.H. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.96, p.11496-11500, 1999.

LAWLEY, T. J.; YANCEY, K. B.; Alterações na pele – hipopigmentação. In: HARRISON, T. R. **Medicina Interna**, v. 1, 13 ed. Colonia Atlampa: Nueva Editorial Interamericana, p. 285-329, 1995.

LEAL, P. F.; BRAGA, M. E. M.; SATO, D. N.; CARVALHO, J. E.; MARQUES, M. O. M.; MEIRELES, M. A. A. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, n. 9. p. 2520-2525, 2003.

LEE, J.; JUNG, E.; PARK, J.; JUNG, K.; PARK, E.; KIM, J.; HONG, S.; PARK, J.; PARK, S.; LEE, S.; PARK, D. Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in B16 melanoma cells. **J Invest Dermatol**, v. 124, p. 405-411, 2005.

LEE, J.; KIM, Y.S; PARK, D. Rosmarinic acid induces melanogenesis through protein kinase A activation signaling. **Biochem. Pharmacol.**, v. 74, p. 960-968, 2007.

LIN, Z.; HOULT J.R.; BENNETT D.C.; RAMAN A. Stimulation of mouse melanocyte proliferation by *Piper nigrum* fruit extract and its main alkaloid, piperine. **Planta Med.** v. 65, n. 7. p. 600-603, 1999.

LINO, R.C.; GARROTE, C.F.D. Isolamento dos alcalóides indólicos presentes na casca do caule de *Aspidosperma subicanum* Mart., para obtenção de padrões com finalidade

de desenvolvimento de metodologia para doseamento com marcadores de matéria-prima vegetal. **Rev. eletrôn de Farmácia.** v. 2, p. 107-109, 2005.

LIU, X.; FANG, H.; YANG, Z.; WANG, X.; RUAN, L.; FANG, D.; DING, Y.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; JIANG, X.; CHEN, H. Matrine inhibits invasiveness and metastasis of human malignant melanoma cell line A375 *in vitro*. **Int. J. Dermatology:** v. 47, p.448-458, 2008.

MANI, I.; SHARMA, V.; TAMBOLI, I.; RAMAN, G. Interaction of melanin with proteins – the importance of acidic intramelanosomal pH. **Pigment Cell Res.,** v. 14, p. 170-179, 2001.

MANSKE, R.H.F.; HOMES, H.L. **The alkaloids: chemistry and physiology.** v.2. New York: Academic Press Inc. Publishers, 1952.

MARMOL, V. D.; BEERMANN, F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. **FEBS Lett.,** v. 381, p. 165-168, 1996.

MATSUDA, H.; YOSHIDA, K.; MIYAGAWA, K.; NEMOTO, Y.; ASAO, Y.; YOSHIKAWA, M. Nuphar alkaloids with immediately apoptosis-inducing activity from *Nuphar pumilum* and their structural requirements for the activity. **Bioorg & Med Chem Lett.,** n.16, p. 1567-1573, 2006.

MCKENNA, D. B.; COOPER, E. J.; KAVANAGH, G. M.; DAVIE, R. M.; MCLAREN, K. M.; TIDMAN, M. J. Amelanotic malignant melanoma following cryosurgery for atypical lentigo maligna. **Clin Exp Dermatol.,** v. 25, p. 600-604, 2000.

MCNEILL, G.W.; BARRIE, F.R.; BURDET, H.M.; DEMOULIN, V.; T.S.F.; NICHOLSON, D.H.; SILVA, P.C.; SKOG, J.E.; THEHANE, P.; TURLAND, N.J.; HAWKSWORTH, D.L. **International Code of Botanical Nomenclature (Saint Louis Code).** Königstein: Koeltz Scientific, p. 45, 2000.

MEIER, F.; SATYAMOORTHY, K.; NESBIT, M.; HSU, M.; SCHITTEK, B.; HERLYN, M. Molecular Events in Melanoma Development and Progression. **Biosc.,** v.3, p. 1005-1010, 1998.

MENEZES, P.R.; SCHWARTZ, E. A.; SANTOS, C.A.M. *In vitro* antioxidant activity of species collected in Paraná, Brazil. **Fitot.,** v.75, p. 398-400, 2003.

MERCHANT, D.; KAHN, R; MURPHY, W. Handbook of cell and organ culture. Burgess Publisinghg, Broken Arrow, p. 60, 1964.

MICHEL, T.; SANTOS, C.A.M.; FILADELFI, A.M.C. Efeitos de extratos hidroalcoólicos de casca de *Rauwolfia sellowii* Mull. Arg. sobre a função de células pigmentares de anfíbios. Painel apresentado na **XX Reunião Anual da FESBE, livro de resumos**, pag. 91, 2005.

MILLS, S. & BONE, K. **Principles and practice of phytotherapy**. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 643, 2000.

MISHIMA, Y. A post melanosomal era: control of melanogenesis and melanoma growth. **Pigment Cell Res.**, v. 2, p. 3-16, 1992.

NAGATA, H.; TAKEKOSHI, S.; TAKEYAMA, R.; HOMMA, T.; OSAMURA, R.Y. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. **Pigment Cell Res.**, v. 17, p. 66-73, 2004.

NEWTON, R.A.; COOK, A.L.; ROBERTS, D.W.; LEONARD, J.H.; STURM, R.A. Post-transcriptional regulation of melanin biosynthetic enzymes by cAMP and resveratrol in human melanocytes. **J Invest Dermatol.**, v. 127, p. 2216-2227, 2007.

OHGUCHI, K.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y. Stimulation of Melanogenesis by the Citrus Flavonoid Narigenin in Mouse B16 Melanoma Cells. **Biosc Biotechnol Biochem.**, v. 70, n. 6, p. 1499- 1501, 2006.

OLIVEIRA, B.H.; SANTOS,C.A.M.O.; ESPINDOLA,A.P.D.M. Determination of the triterpenoid, betulínico acid, in *Dolocarpus schottianus* by HPLC. **Phytochem Anal.**, v.13, n.2, p. 95-98, 2002.

OZEKI, H.; ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemical characterization of melanins in sheep wool and human hair. **Pigment Cell Res.**,v. 9, p. 51-57 1996.

PEREIRA, G.C.; BRANCO, A.F.; MATOS, J.A.C.; PEREIRA, S.L.; PARKE, D.; PERKINS, E.L.; SERAFIM, T.L.; SARDÃO, V.A.; SANTOS, M.S.; MORENO, A.J.M.; HOLY, J.; OLIVEIRA, P.J. Mitochondrially targeted effects of berberine [natural yellow 18, 5,6-dihydro-9,10-dimethoxybenzo(g)- 1,3-benzodioxolo(5,6-a)quinolizinium] on

K1735-M2 mouse melanoma cells: comparison with direct effects on isolated mitochondrial fractions. **J. Pharmacol. Exp. Therapeut.**, v.323, n.2, p. 636-649, 2007.

PISHA, E.; CHAI, H.; LEE, I.S.; CHAGGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; BEECHER, C.W.; FONG, H.H.; KINGHORN, A.D. & BROWN, D.M. Discovery of betulinic acid as a selective inhibitor of human melanoma that functions by induction of apoptosis. **Nat. Med.**, v. 1, n. 10, p. 1046-1051, 1995.

PRESIBELLA, M.M. O efeito de extratos de plantas medicinais na quimiotaxia leucocitária *in vitro*. **Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal do Paraná para obtenção de título de mestre em Ciências Farmacêuticas. Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde.** Curitiba, 2003.

PROTA, G. Regulatory mechanisms of melanogenesis beyond the tyrosinase concept. **J. Invest. Dermatol.**, v. 100, p. 156S-161S, 1993.

RILEY, P.A. Melanin. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 11, p. 1235-1239, 1997.

RIZZINI, C.T.; MORS, W.B. **Botânica Econômica Brasileira**. 2^a ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda., p. 57, 1995.

SAMPAIO, S.A.P.; CASTRO, R.M. & RIUTTI, E.A. **Dermatologia Básica**. Artes Médicas, São Paulo, 3^a. ed., p. 214-216, 1989.

SANTOS, C. A. M. Structure elucidation and synthetic transformations of monoterpenoid glycosides. **Tese de doutorado apresentada a Universidade de Manchester para obtenção de título de doutor em Química. Departamento de Química.** Manchester, 1991.

SÁNCHEZ-FERRER, A.; RODRIGUEZ-LÓPEZ, J. N.; GARCÍA-CANÓVAS, F.; GARCIA-CARMONA, F. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1247, p. 1-11, 1995.

SERAFIM, T.L.; OLIVEIRA, P.J.; SARDAO, V.A.; PERKINS, E.; PARKE, D.; HOLY, J. Different concentrations of berberine result in distinct cellular localization patterns and cell cycle effects in a melanoma cell line. **Cancer Chemother Pharmacol.**, v. 61, p. 1007-1018, 2008.

SIENNA, C.; SANTOS, C.A.M.; FILADELFI, A.M.C. Efeitos dos extratos hidroalcoólicos de folhas de *Anchieta pyrifolia* Mart. (EHAFAp) e de casca de *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg. (EHACRs) sobre a proliferação de células de melanoma murino B16F10. Painel apresentado na **XXI Reunião Anual da FESBE, livro de resumos**, p. 67, 2006.

SILVA, A.M.M.; SILVA, A.R.; PINHEIRO, A.M.; FREITAS, S.R.V.B.; SILVA, V.D.A.; SOUZA, C.S.; HUGHES, J.B.; EL-BÁCHA, R.S.; COSTA, M.F.D.; VELOZO, E.S.; TARDY, M.; COSTA, S.L. Alkaloids from *Prosopis juliflora* leaves induce glial activation, cytotoxicity and stimulate NO production. **Toxic.**, p. 1-14, 2007.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C.; **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, p. 68, 1979.

SOUZA, A.C.M; SOUZA, L.K.H.; SILVA, M.R.R.; OLIVEIRA, C.M.A.; KATO, L.; SILVA, C.C.; TANAKA, J.C.A.; OLIVEIRA, A.J.B. Propriedades antifúngicas dos alcalóides de *Aspidosperma ramiflorum*. **Painel apresentado na XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, livro de resumos**, p. 60, 2000.

SPJUT, R. W. & PERDUE JR, R. E. - Plant folklore: a tool for predicting sources of antitumor activity? **Canc Treat Reports**, v.60, p. 979-985, 1976.

STANFORD, J. L.; MARTIN, E. J.; BRINTON, L. A.; HOOVER, R. N. Rauwolfia use and breast cancer: a case-control study. **J Natl Cancer Inst.**, v. 76, n. 5, p. 817-822, 1986.

SUFFREDINI, I. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Cytotoxic molecules from natural sources: tapping the Brazilian biodiversity. **Anticanc Ag Med Chem.**, v. 6, p. 367-375, 2006.

TADA, A.; SUZUKI, I.; IM, S.; DAVIS, M.B.; CORNELIUS, J.; BABCOCK, G.; NORDLUND, J.J. e ABDEL-MALEK, Z.A. Endothelin-1 is a paracrine growth factor that modulates melanogenesis of human melanocytes and participates in their responses to ultraviolet radiation. **Cell Growth Diff.**, v. 9, p. 575-584, 1998.

TOLLESON, W.H. Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. **J. Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.** v. 23, n. 2, p. 105-161, 2005.

TYLER, V.E. Phytomedicines: Back to the future. **J. Nat. Prod**, v.62, p. 1589-12592, 1999.

VOGEL, A.I.; JEFFERY,G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C. **Análise Química Quantitativa**. 5 ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., p. 187, 1992.

WAKAMATSU, K. & ITO, S. Advanced Chemical Methods in Melanin Determination. **Pigment Cell Res.** v.15, p.174-183, 2002.

WANG, F.; CAO, Y.; LIU, H. Y.; XU, S. F.; HAN. R. Anti-invasion and anti-angiogenesis effect of taxol and camptothecin on melanoma cells. **J. Asian Nat. Prod. Res**, v. 5, p. 121-129, 2003.

YOSHIZAKI, N.; MOGI, Y. Supressive effect of recombinant human Cu,Zn-superoxide dismutase on lung metastasis of murine tumor cells. **Int. J. Cancer**, v. 57, p. 287-292, 1994.

ZAR, J.H. **Bioestatistical Analysis**. Prentice-Hall Inc., New Jersey, 3^a. ed., pp. 662, 1996.

ZHANG, X.; XU, Q.; SAIKI, I. Quercetin inhibits the invasion and mobility of murine melanoma B16-BL16 cells through inducing apoptosis via decreasing Bcl-2 expression. **Clin. Exp. Metastasis**. v. 18, n. 5. p. 415-421, 2000.

ZHANG, X. M.; CHEN J.; XIA Y. G.; XU, Q. Apoptosis of murine melanoma B16-BL16 cells induced by quercetin targeting mitochondria, inhibiting expression of PKC-alpha and translocating PKC-delta. **Canc. Chemother. Pharmacol.** v. 55, n. 3. p. 251-262, 2005.

ZHANG, W.; TSAN, R.; NAM, D.; LU, W.; FIDLER, I. J. Loss of adhesion in the circulation converts amelanotic metastic melanoma cells to melanotic by inhibition of AKT. **Neopl.**, v.8, n.7, p. 543-550, 2006.