

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA MARIA TELLES MATTA AVANCI

**EFEITOS DE EXTRATOS DO GÊNERO *Passiflora*  
SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE**

CURITIBA

2012

JULIANA MARIA TELLES MATTA AVANCI

**EFEITOS DE EXTRATOS DO GÊNERO *Passiflora*  
SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE**

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

Orientadora:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Almeriane Maria Weffort Santos

CURITIBA  
2012

## NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia Industrial (2006) e Bioquímica (2008) pela Universidade Federal do Paraná. Durante sua graduação foi bolsista de Iniciação Científica entre 2003 e 2004, no Laboratório de Bacteriologia sob orientação da Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cyntia Maria Telles Fadel Picheth, desenvolvendo o projeto intitulado “Caracterização de toxinas Shiga através de PCR-RFLP”, apresentado no 12º EVINCI (Evento de Iniciação Científica da UFPR, 2004). Entre setembro de 2008 a março de 2009, ocupou cargo de Farmacêutica Bioquímica no Laboratório de Biologia Molecular e Histocompatibilidade – BIOGEN. Em março de 2011 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, área de Análises Clínicas, nível Mestrado, onde desenvolveu o trabalho “Efeitos de Extratos do Gênero *Passiflora* sobre a Atividade de Tirosinase”, cujos resultados estão apresentados nesta dissertação.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Maria Angela Avanci e João Carlos Avanci, aos meus tios Tereza Christina Carnasciali e Carlos Humberto Carnasciali, aos meus padrinhos Célia Ribeiro e Robinson Ribeiro e ao meu noivo Derek Huergo Furlan.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que por intercessão da Virgem Maria, me deu forças para lutar e chegar até aqui.

À Professora Dra. Almeriane Maria Weffort Santos, minha orientadora, que muito me ensinou na pesquisa científica. Ao Professor Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos, que disponibilizou seu laboratório e conhecimentos necessários para que eu pudesse preparar meusa preparação dos extratos de maracujá usados neste trabalho. À Professora Dra. Márcia do Rocio Duarte, pelo auxílio na parte botânica do trabalho.

À Professora Dra. Tania Maria Bordin Bonfim e ao Professor Dr. Roberto Pontarolo, pela disponibilização de seus laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos. Às Professoras Dra. Gláucia Regina Martinez, Departamento de Bioquímica – UFPR, e Dra Célia Regina Cavicchiolo Franco, Departamento de Biologia Celular – UFPR, por cederem gentilmente cepas de células B16F10.

À Técnica de Laboratório Irene, que cuida dos materiais a serem utilizados pelos pós-graduandos, À Farmacêutica e Técnica de Laboratório Maria da Graça e à minha colega e amiga Kely Cristina dos Santos, por me auxiliarem com as técnicas de CLAE.

Aos meus pais Maria Angela Avanci e João Carlos Avanci, aos meus tios Tereza Christina Carnasciali e Carlos Humberto Carnasciali, aos meus padrinhos Célia Ribeiro e Robinson Ribeiro, que me deram conselhos e rezaram por mim.

A Regina Fadel e ao Antônio Fadel, por sempre torcerem por todos os netos e por permitirem que a *Passiflora alata* Curtis estivesse presente nesse trabalho, uma vez que essa espécie existe no quintal desses meus queridos avós.

Aos meus irmãos de sangue e de coração João, Ivan, Vlamir, Fernanda, Juliana e Amanda, que sempre me incentivaram a superar obstáculos. Ao meu primo Rafael e à sua esposa Noélia, que me ajudaram com o programa Photoshop, e também pelo grande incentivo e amizade para que eu não desistisse de prosseguir. À minha prima Priscila e ao seu esposo Flávio, sempre com palavras de carinho e de amizade. Ao meu primo Carlos e à sua namorada Mariana, que ensinam muito com a maneira como vivem a vida, sempre alegres e lutando por ela. À minha prima Fernanda Fadel, pelos conselhos e palavras divinas. À minha prima Ana Cláudia que enfrenta sem medo os desafios da vida. Ao meu noivo Derek, pelo amor, amizade, carinho e respeito.

Ao Programa de Pós-Graduação de Ciências Farmacêuticas da UFPR e à CAPES pelo apoio financeiro.

## EPÍGRAFE

"Só o que está morto não muda!  
Repito por pura alegria de viver:  
A salvação é pelo risco,  
sem o qual a vida não vale a pena."

*Clarice Lispector*

## SUMÁRIO

<b>NOTA BIOGRÁFICA</b> .....	3
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	4
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	5
<b>EPÍGRAFE</b> .....	6
<b>SUMÁRIO</b> .....	7
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	11
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	13
<b>LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS</b> .....	14
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	17
<b>MELANOGÊNESE</b> .....	18
Vias de sinalização da melanogênese.....	21
<b>ANORMALIDADES DA PELE: FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS..</b>	25
<b>TRATAMENTO</b> .....	28
Agentes despigmentantes.....	29
Agentes repigmentantes.....	31
<b>IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS MEDICINAIS</b> .....	32
Gênero <i>Passiflora</i> .....	33
Aspectos botânicos.....	34
Aspectos fitoquímicos.....	37
Polifenóis: atividades biológicas.....	39
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	44
4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	44
4.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	44
4.3 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	44
4.4 PREPARO DOS EXTRATOS FLUIDOS.....	45
4.5 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO NOS EXTRATOS FLUIDOS.....	45
4.6 ESTIMATIVA DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	45
4.7 ANÁLISE DE FLAVONOIDES.....	46
4.7.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	46
4.7.2 Teor de Flavonoides Totais .....	46
4.7.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	47
4.8 CULTIVO CELULAR E CITOTOXICIDADE.....	48

4.8.1 Soluções.....	48
4.8.2 Manutenção da Linhagem B16F10.....	50
4.8.3 Viabilidade Celular.....	50
4.8.4 Toxicidade Celular.....	50
4.8.5 Obtenção do Lisado Celular.....	50
4.8.6 Doseamento de Proteínas no Lisado Celular.....	51
4.8.7 Determinação da Atividade de Tirosinase obtida de <i>Agaricus bisporus</i> .....	51
4.8.8 Determinação da Atividade de Tirosinase Murina <i>in vitro</i> .....	51
4.8.9 Perfil de Ação dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> sobre a Tirosinase.....	52
4.8.10 Estudo do Mecanismo de Ação dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> .....	52
4.8.11 Efeitos da Associação dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> com Inibidores de Tirosinase.....	53
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS.....	53
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	54
5.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	54
5.2 DROGAS VEGETAIS E EXTRATOS.....	58
5.3 ESTIMATIVA DE POLIFENÓIS TOTAIS.....	58
5.4 ANÁLISE DE FLAVONOIDES.....	59
5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada.....	59
5.4.2 Teor de Flavonoides Totais.....	60
5.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	61
5.5 TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE <i>Passiflora</i> .....	64
5.6 EFEITOS DOS EXTRATOS DE <i>Passiflora</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE.....	69
<b>CONCLUSÕES</b> .....	82
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	83



## RESUMO

A melanina é o principal pigmento que protege a pele contra a radiação ultravioleta. Quando em excesso, a melanina produz eritema, sardas e hiperpigmentação. Entre as enzimas envolvidas na melanogênese, a tirosinase é a mais importante. O gênero *Passiflora* possui como substâncias majoritárias os flavonoides C-glicosilados, compostos polifenólicos. Os polifenóis representam o maior grupo de inibidores da tirosinase. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar os efeitos dos extratos preparados de folhas de *P. alata*, *P. edulis*, *P. actinia* e *P. incarnata* sobre a atividade de tirosinase purificada de *Agaricus bisporus* e, também, daquela obtida de células B16F10. Usando o ensaio do MTT como teste de citotoxicidade, estabeleceu-se que a maior concentração não tóxica dos extratos foi de 100 µg/mL, a qual foi utilizada para o estudo da atividade de tirosinase *in vitro*. Apenas os extratos de *P. alata* e de *P. edulis* apresentaram efeito inibitório significativo sobre a tirosinase de cogumelo ( $p < 0,01$ ) e a murina (*P. alata* =  $p < 0,01$  e *P. edulis* =  $p < 0,05$ ). Para se estudar o perfil inibitório desses extratos, os efeitos de concentrações crescentes de inibidores clássicos da enzima, como o ácido kójico (AK) e a hidroquinona (HQ), foram comparados aos exercidos pelos extratos de *P. alata* e *P. edulis* em sistemas usando a L-DOPA como substrato. Enquanto em baixas concentrações o AK aumentou a inibição da atividade tirosinásica, a HQ somente inibiu a atividade enzimática. Os extratos inibiram a enzima até alcançarem um platô. Para sugerir um mecanismo de ação para os extratos, esses e os inibidores clássicos da tirosinase, AK e HQ, foram incubados com L-tirosinase. Nesse experimento, observou-se reversão do efeito inibitório da HQ, bem como dos extratos, sobre a atividade de tirosinase. Também foi verificada a associação de cada extrato com AK ou HQ. O AK associado à HQ, ao extrato de *P. alata* ou ao de *P. edulis*, inibiu a atividade tirosinásica significativamente em relação ao controle e ao AK isoladamente ( $p < 0,001$ ). Assim, pode-se sugerir que houve efeito sinérgico quando o AK foi associado a essas substâncias. Nas associações com a HQ, foi obtido estímulo enzimático com ambos os extratos. Os resultados dessas associações foram estatisticamente significantes quando comparados ao controle e à HQ isoladamente ( $p < 0,001$ ). Através dos resultados obtidos pode-se sugerir que substâncias presentes nos extratos de *P. alata* e de *P. edulis* disponibilizaram maior concentração de HQ para que esta pudesse agir sobre a tirosinase.

**Unitermos:** tirosinase, anti-tirosinásicos, *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, hiperpigmentação.

## ABSTRACT

Melanin is the main pigment that protects the skin against ultraviolet radiation. When in excess, it can lead to redness, freckles, and hyperpigmentation. Among the enzymes involved in melanogenesis, tyrosinase is one of the most important. Polyphenols are the largest group of tyrosinase inhibitors, and the majority of the compounds of the *Passiflora* genus are C-glycosyl flavonoids, which are polyphenolic compounds. The aim of this work was to characterize the effects of the extracts prepared from the leaves of *P. alata*, *P. edulis*, *P. actinia*, and *P. incarnata* on tyrosinase activity purified from *Agaricus bisporus* and from B16F10 murine cells. Using the MTT assay, it was established that the highest nontoxic concentration of extracts for B16F10 cells was 100 µg/mL which has been used to evaluate the tyrosinase activity in vitro. Only *P. alata* and *P. edulis* extracts showed significant inhibitory activity against both fungal ( $p < 0,01$ ) and murine tyrosinases (*P. alata* =  $p < 0,01$  e *P. edulis* =  $p < 0,05$ ). In order to further explore the mechanisms underlying the inhibitory profile of these extracts, kojic acid (AK) and hydroquinone (HQ) were used as controls and their effects compared to those presented by *P. alata* and *P. edulis* extracts having L-DOPA as a substrate. It was found that, while AK increased inhibition of tyrosinase activity, HQ inhibited its action but only at low concentrations. The extracts inhibited tyrosinase activity until they reached a plateau. In order to establish the mechanism of action for extracts, these and the classical inhibitors AK and HQ were incubated along with L-tyrosine. As a result, reversion of the inhibitory tyrosinase activity with HQ and also with the extracts was observed. We also observed the association of each extract with AK and HQ. AK associated with HQ or with the extracts significantly inhibited the tyrosinase activity compared to control or AK alone ( $p < 0,001$ ). These results suggest a synergic effect when AK was associated with these substances. In associations with HQ, however, significant stimulation of the enzymatic activity was obtained with both extracts ( $p < 0,001$ ). The results herein presented suggest that substances present in each one of the extracts of *P. alata* and *P. edulis* have provided a greater concentration of HQ that could act on tyrosinase activity.

**Keywords:** tyrosinase, tyrosinase inhibitors, *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, hyperpigmentation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura cristalina de tirosinase de <i>Streptomyces castaneoglobisporus</i> .....	20
Figura 2	Biossíntese de Melanina.....	21
Figura 3	Gene p53 e a Melanogênese.....	23
Figura 4	Ativação da Tirosinase por PKC- $\beta$ .....	24
Figura 5	Folhas e Flor de <i>P. alata</i> Curtis.....	35
Figura 6	Folhas e Flor de <i>P. incarnata</i> L.....	35
Figura 7	Folhas e Flor de <i>P. edulis</i> Sims.....	36
Figura 8	Folhas e Flor de <i>P. acitinia</i> Hooker .....	36
Figura 9	<i>Passiflora alata</i> - Corte Transversal de Folha.....	55
Figura 10	<i>Passiflora edulis</i> - Corte Transversal de Folha.....	56
Figura 11	<i>Passiflora actinia</i> - Corte Transversal de Folha.....	58
Figura 12	Drogas vegetais e Extrato Seco obtidos das Folhas do Gênero <i>Passiflora</i> .....	58
Figura 13	Identificação de Flavonoides em Extratos das Folhas de Espécies de <i>Passiflora</i> por Cromatografia em Camada Delgada.....	60
Figura 14	Cromatograma da Isovitexina Padrão.....	62
Figura 15	Cromatograma do extrato de <i>P. alata</i> .....	62
Figura 16	Cromatograma do extrato de <i>P. edulis</i> .....	63
Figura 17	Cromatograma do extrato <i>P. actinia</i> .....	63
Figura 18	Cromatograma do extrato de <i>P. incarnata</i> .....	64
Figura 19	Células B16F10.....	65
Figura 20	Aspecto das Soluções dos Extratos das Folhas de <i>Passiflora</i> .....	66
Figura 21	Efeitos do DMSO sobre Células B16F10.....	67
Figura 22	Efeito dos Extratos de <i>Passiflora</i> sobre células B16F10.....	68
Figura 23	Efeitos dos Extratos de <i>Passiflora</i> sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo.....	70
Figura 24	Efeitos dos Extratos de <i>P. alata</i> sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo.....	71
Figura 25	Efeitos do Extrato de <i>P. edulis</i> sobre a Atividade de Tirosinase de de Cogumelo.....	72

Figura 26	Perfil de Ação do Ácido Kójico sobre a Atividade de Tirosinase de de Cogumelo (I).....	73
Figura 27	Perfil de Ação do Ácido Kójico sobre a Atividade de Tirosinase de de Cogumelo (II).....	73
Figura 28	Perfil de Ação da Hidroquinona sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (I).....	74
Figura 29	Perfil de Ação da Hidroquinona sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (II).....	75
Figura 30	Perfil de Ação do Extrato de <i>P. alata</i> sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo.....	75
Figura 31	Perfil de Ação do Extrato de <i>P. edulis</i> sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo.....	76
Figura 32	Perfil de Ação dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> na presença de tirosina sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo.....	76
Figura 33	Efeitos dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> sobre a Atividade de Tirosinase Murina.....	78
Figura 34	Efeitos dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> sobre a Atividade de Tirosinase Murina na presença de tirosina.....	78
Figura 35	Efeitos dos Extratos de <i>P. alata</i> e de <i>P. edulis</i> quando associados ao Ácido Kójico ou à Hidroquinona.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação Taxonômica do Maracujazeiro, segundo Engler e Cronquist.....	34
Tabela 2	Local de Coleta e Número de Registro do Material Botânico.....	44
Tabela 3	Sistema gradiente. A. Solução Aquosa de Ácido Acético 0,5%. B. Metanol. C. Acetonitrila.....	48
Tabela 4	Estimativa de Polifenóis Totais calculada como Equivalentes em Quercetina de cada Extrato.....	59
Tabela 5	Teor de Flavonoides Totais calculado como Equivalentes em Apigenina para cada Extrato.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

UV	Radiação Ultravioleta
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
TIR	Tirosinase
TRP	Proteína Relacionada à Tirosinase
L-tyr	L-Tirosina
DQ	Dopaquinona
L-DOPA	3,4-Dihidroxifenilalanina
DHI	5,6-Dihidroxiindol
IQ	Indol 5,6 Quinona
THI	Tirosina Hidroxilase Isoforma I
HBTA	5-Hidróxi-1,4-Benzotiazinilalanina
ICAQ	Ácido Indol-2-Carboxílico-5,6-Quinona
DHICA	5,6-Dihidroxiindol-2-Carboxílico
PAH	L-Fenilalanina Hidroxilase
MITF	Fator de Transcrição associado à Microftalmia
NFκB	Fator Nuclear kappa B
POMC	Proteína Pró-Opiomelanocortina
MSH	Hormônio Estimulante de Melanócito
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrópico
RMC	Receptor de Melanocortina
AMPc	3'5'-Adenosina Monofosfato Cíclico
PK	Proteína Quinase
CREB	Proteína Ligante de Elemento Responsivo ao AMPc
SCF	Fator de Célula-Tronco
RACK1	Receptor para Proteína Quinase C Ativada
RPMI	Roswell Park Memorial Institute – sigla de meio de cultivo
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 Difenil Tetrazólio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
NEU	Solução Metanólica de Difenilboriloxietilamina
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HQ	Hidroquinona
AK	Ácido Kójico

## 1 INTRODUÇÃO

A pele, constantemente exposta a fatores ambientais, é a primeira barreira de proteção do organismo contra a perda de água e as injúrias externas. Consiste de um epitélio escamoso externo, a epiderme, e de um tecido conjuntivo interno, a derme (Lippens et al., 2009).

A epiderme é constantemente renovada por atividade mitótica das células-tronco na camada basal, produzindo queratinócitos. Além destas células, a epiderme possui células de Langerhans, primeira barreira imunológica do organismo ao meio externo (Merad et al., 2008), e melanócitos, células que fornecem pigmentação à pele pela produção de melanina (Lippens et al., 2009).

A melanina é o principal pigmento que protege as células epiteliais da radiação ultravioleta (UV) (Murakami et al., 2009). Este pigmento é sintetizado nos melanossomos, organelas específicas presentes nos melanócitos. Entre as enzimas envolvidas na melanogênese, a tirosinase é a responsável pelos primeiros dois passos, sendo assim uma das mais importantes da cascata melanogênica (Chang, 2009).

Mesmo a melanina sendo um importante pigmento para a proteção contra a radiação UV, quando em excesso, pode produzir eritema, sardas e outras disfunções epiteliais (Matsui et al., 2010). Discromias são mais comuns em indivíduos negros. Hiperpigmentação Pós-Inflamatória (HPI) e Melasma são condições devastadoras para muitos pacientes, levando a um impacto negativo na qualidade de vida destes indivíduos (Grimes, 2009). A maioria dos agentes despigmentantes com efeito clareador de pele causam efeitos colaterais pronunciados. Os principais problemas relacionados a estes compostos são a toxicidade ao melanócito, a irritação e a sensibilidade que causam à pele, além do potencial carcinogênico (Draelos, 2007). Neste sentido, surge a importância da procura de novos agentes terapêuticos.

Flavonoides são considerados as substâncias ativas da família Passifloraceae (Pereira & Vilegas, 2000; Ulmer & MacDougal, 2004) e pertencem ao grupo dos polifenóis, que representam o maior grupo de inibidores da tirosinase (Chang, 2009). Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em estudar espécies do gênero *Passiflora*: *P. alata*, *P. edulis*, *P. actinia* e *P. incarnata*, sobre a atividade de tirosinase purificada obtida de *Agaricus bisporus* e sobre a atividade de tirosinase murina obtida através da linhagem celular de melanoma murino B16F10.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar os efeitos dos extratos fluidos preparados das folhas de *P. alata*, *P. edulis* e *P. actinia* e do extrato seco das folhas de *P. incarnata* sobre a atividade de tirosinase, uma vez que doenças de pele com desvios de pigmentação são muito comuns, principalmente em indivíduos de pele negra, causando impacto negativo na qualidade de vida dos pacientes, sendo importante o estudo pela busca de novos agentes terapêuticos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dos extratos preparados das folhas de espécies de *Passiflora* pretendeu-se:

- Determinar e comparar o teor de polifenóis e de flavonoides em cada extrato;
- Determinar e comparar qualitativamente o perfil cromatográfico desses extratos tendo a isovitexina como substância marcadora do gênero;
- Determinar a toxicidade dos extratos em células de melanoma murino B16F10;
- Estudar o efeito dos extratos sobre a atividade de tirosinase purificada obtida de *Agaricus bisporus* e da tirosinase obtida de células B16F10 como modelos *in vitro*.



### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A pele, constantemente exposta a fatores ambientais como temperatura e radiação ultravioleta (UV), é a primeira barreira de proteção do organismo contra a perda de água e as injúrias externas que podem ser de natureza física, química ou biológica (Lippens et al., 2009). Por apresentar concentração hidrogeniônica (pH) levemente ácida, entre 4,6 e 5,8, a pele possui propriedades bactericida e fungicida em sua superfície. Além disso, as secreções cutâneas apresentam importante capacidade tamponante, já que o pH da pele é frequentemente alterado em consequência da utilização de produtos tópicos inadequados, expondo a pele a uma série de agentes agressores, em especial microrganismos (Leonardi et al., 2002).

A pele consiste de um epitélio escamoso externo, a epiderme, e de um tecido conjuntivo interno, a derme (Lippens et al., 2009). A epiderme é constantemente renovada por atividade mitótica das células-tronco na camada basal, produzindo queratinócitos. Estes se separam da membrana basal e sofrem diferenciação, perdendo o núcleo para tornarem-se os corneócitos da última camada da epiderme, células achatadas e mortas, que se desprendem pelo processo de descamação (Lippens et al., 2009). Além dos queratinócitos (90%), a epiderme possui células de Langerhans (5%) e melanócitos (5%) (Nordlund, 1992). Enquanto estes fornecem pigmentação à pele pela produção de melanina (Lippens et al., 2009), as células de Langerhans protegem a epiderme contra antígenos estranhos, fornecendo a primeira barreira imunológica ao ambiente externo (Merad et al., 2008). Mesmo a epiderme sendo isenta de circulação sanguínea, suas células se comunicam. Por exemplo, os queratinócitos se comunicam entre si através de junções intercelulares; já as células de Langerhans e os melanócitos possuem dendritos, que são a forma de circulação que permite a comunicação entre as células epidérmicas (Nordlund, 1992).

A melanina é o principal pigmento que protege as células epiteliais da radiação UV (Murakami et al., 2009). Este pigmento é sintetizado nos melanossomos, organelas específicas presentes nos melanócitos. Entre as enzimas envolvidas na melanogênese, a tirosinase é a mais importante e participa da primeira etapa da biossíntese, oxidando a L-tirosina em dopaquinona (DQ). Essa reação é também a etapa limitante do processo, uma vez que o restante das reações sequenciais podem ocorrer espontaneamente em pH fisiológico (Chang, 2009).

Os melanosomas contendo melanina são transferidos para os queratinócitos vizinhos através de um processo que envolve a fagocitose das extremidades dos prolongamentos dos melanócitos pelos queratinócitos (Rosa & Natali, 2009), garantindo a distribuição uniforme dos pigmentos na epiderme e dando cor à pele e aos cabelos. Em humanos, a pigmentação da pele acima do nível basal é fisiologicamente estimulada pela radiação UV da luz solar, a qual aumenta o número de melanócitos, a produção de melanina e o número de melanócitos dendríticos requeridos para a transferência de melanina em direção aos queratinócitos (Busca & Ballotti, 2000), sendo um potente fator extrínseco da pigmentação da pele. Entretanto, repetidas exposições à luz solar podem provocar danos à pele, induzindo seu espessamento, formação de rugas, inflamação, queimaduras e até mesmo o câncer (Liu & Fisher, 2010).

A radiação UVB, que se caracteriza por um comprimento de onda menor que 320 nm, é absorvida pelos componentes celulares, como proteínas ou DNA, enquanto a radiação UVA, com comprimento de onda entre 320 e 400nm, penetra profundamente na pele, alcançando ambas as camadas, epiderme e derme (Marrot & Meunier, 2008).

A depleção da camada de ozônio leva ao aumento do alcance da radiação UVB na superfície terrestre, com várias consequências para a saúde humana, como a produção de vitamina D, de natureza benéfica, ou catarata e câncer de pele (Norval et al., 2011) onde a radiação UVB pode causar dano direto ao DNA, induzindo mutações nas células epidérmicas, e também, dano indireto, através do estresse oxidativo, onde espécies reativas de oxigênio (ERO) podem levar a ativação desregulada de fatores de transcrição que contribuem para a proliferação e/ou apoptose celular (Ichihashi et al., 2003).

## MELANOGÊNESE

Os melanócitos são derivados da crista neural. Durante o desenvolvimento, os melanoblastos migram para a pele onde proliferam e diferenciam-se em células produtoras de melanina. Esses melanócitos maduros, encontrados na camada basal da epiderme, formam longos processos dendríticos que se ramificam entre os queratinócitos vizinhos. Cada melanócito faz contato com cerca de 30-40 queratinócitos, formando a unidade melano-epidérmica. Esta unidade torna o melanócito capaz de transferir melanina para os queratinócitos, protegendo-os dos efeitos danosos da radiação UV (Tsatmali et al., 2002).

A síntese de melanina acontece em organelas especializadas denominadas melanossomos. Durante seu desenvolvimento, o melanossomo expressa as enzimas tirosinase e as Proteínas Relacionadas à Tirosinase 1 (TRP<sub>1</sub>) e 2 (TRP<sub>2</sub>) (Tsatmali et al., 2002).

A tirosinase encontrada no melanócito é uma glicoproteína ligada à membrana melanossomal (Hearing & Jimenez, 1987), que contém três porções: 1) um domínio de sítios ligantes de cobre, que está localizado dentro do melanossomo; 2) uma sequência de aminoácidos curta que atravessa a membrana melanossomal e, finalmente, 3) uma cauda com aproximadamente trinta aminoácidos que reside no citoplasma do melanócito (Park et al., 1999).

Tirosinases (EC 1.14.18.1) exibem atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenoilase) para *o*-difenois que são convertidos à *o*-quinonas. A tirosinase promove a conversão dos monofenóis em duas etapas consecutivas, que envolvem o oxigênio molecular. Na primeira etapa o monofenol é hidroxilado ao seu correspondente *o*-difenoil. Na segunda etapa, o *o*-difenoil é oxidado à sua correspondente *o*-quinona, enquanto que a enzima é oxidada de volta à sua forma nativa pelo oxigênio molecular (Rosatto et al., 2001).

Uma notável característica observada em tirosinases de diferentes fontes (escala filogenética desde bactérias até mamíferos) e ilustrada na Figura 1, é que o domínio central ligante de cobre é conservado, contendo resíduos de aminoácidos estritamente conservados, incluindo três histidinas (Chang, 2009).

Como mostra o esquema da Figura 2, a tirosinase inicia a cascata da melanogênese, como ilustrado a Figura 2, oxidando a L-tirosina em DQ. Essa reação é também a etapa limitante do processo, uma vez que o restante das reações sequenciais podem ocorrer espontaneamente em pH fisiológico. A DQ é convertida em 3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA) e dopacromo por auto-oxidação. Essa reação pode ser revertida pela tirosinase, que converte L-DOPA em DQ de novo (Chang, 2009).

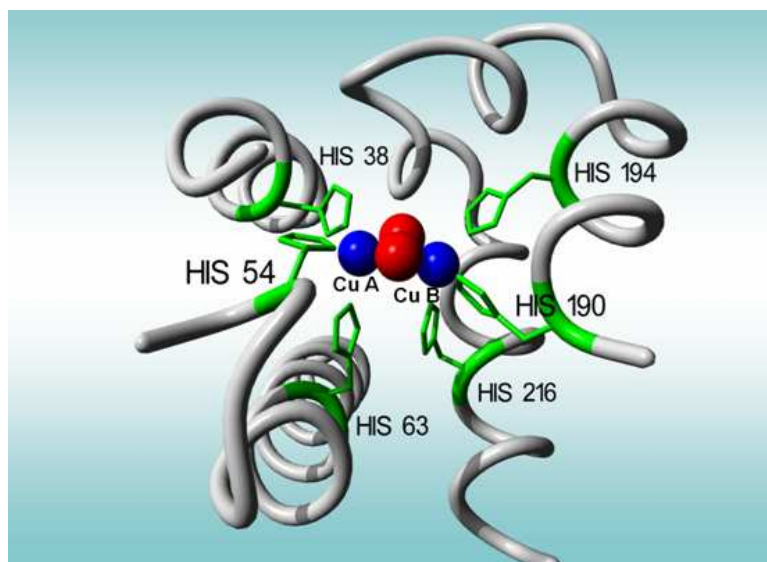


Figura 1. Estrutura cristalina de tirosinase de *Streptomyces castaneoglobisporus*.<sup>1</sup>

Pela auto-oxidação e ciclização espontânea, a dopacromo produz 5,6-dihidroxiindol (DHI) que, pela ação da tirosinase, é convertida em indol-5,6-quinona (IQ). Entretanto, na presença de TRP<sub>2</sub>, também denominada Dopacromo Tautomerase, é tautomerizada em ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA). TRP<sub>1</sub> ou DHICA oxidase promovem oxidação e polimerização de DHICA. Além disso, na presença de cisteína ou de glutatona, cisteinildopa ou glutatindopa podem ser formadas a partir da dopaquinona, produzindo feomelanina. Melaninas derivadas de DHICA são marrons enquanto as derivadas de DHI são pretas; ambas são eumelaninas e fornecem melhor fotoproteção que as feomelaninas vermelho-amareladas (Petit & Pierard, 2003).

Junto com a enzima tirosinase, as enzimas L-fenilalanina hidroxilase (PAH) e tirosina hidroxilase isoforma I (THI) são importantes na melanogênese. A atividade destas três enzimas são controladas pelo co-fator 6R-L-eritro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterina (6BH<sub>4</sub>) (Schallreuter et al., 2008).

<sup>1</sup> Fonte: <http://www.ac.uni-kiel.de/tuczek/research-new/oxygen-activation>

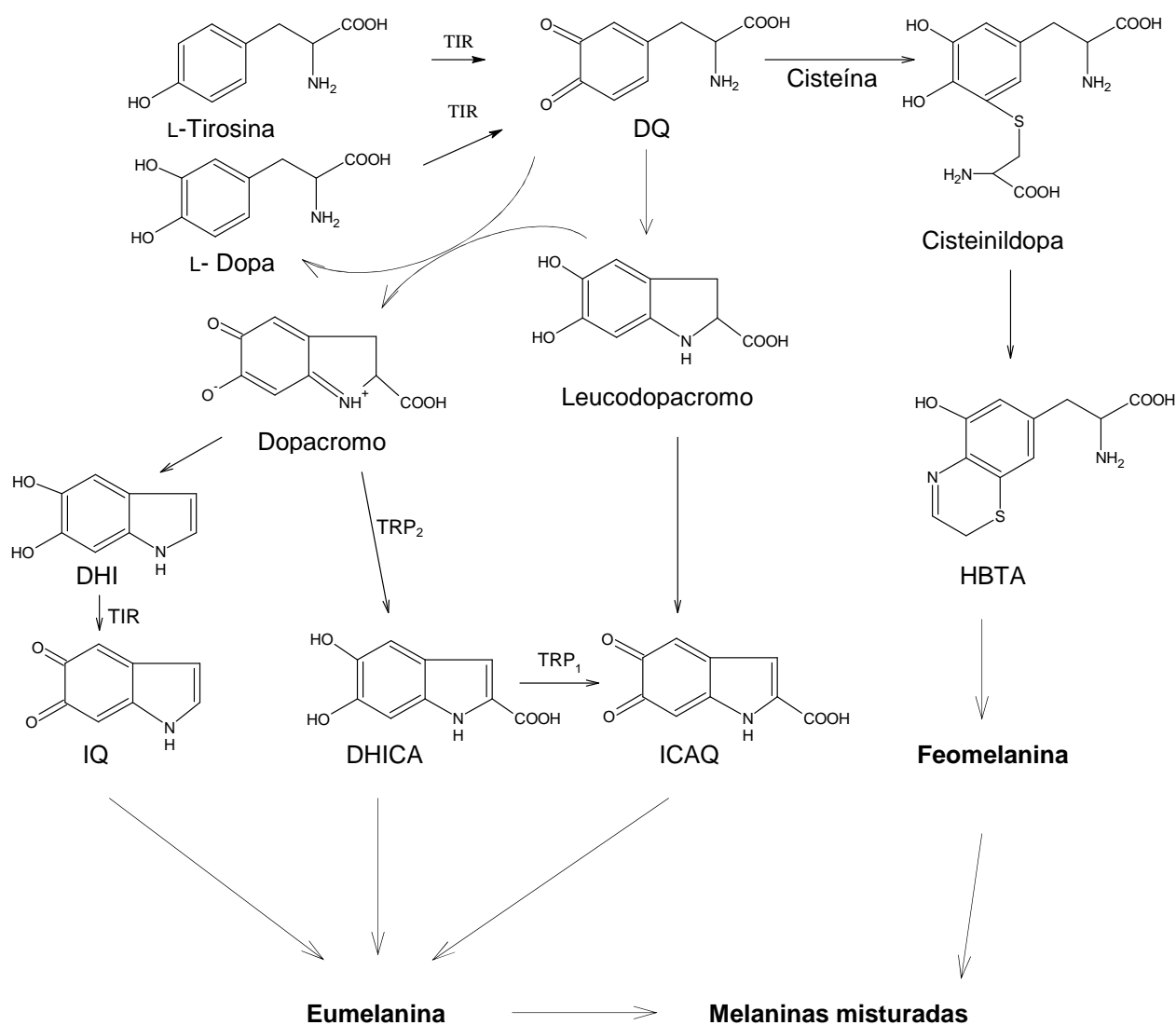


Figura 2. Biossíntese de Melanina. A L-tirosina é oxidada pela TIR em DQ, a qual se auto-oxida dando origem à L-DOPA e dopacromo. Por auto-oxidação, dopacromo é convertida em DHI; na presença de TRP<sub>2</sub>, dopacromo origina DHICA. DHI e DHICA produzem eumelaninas. Na presença de cisteína ou glutatona, DQ pode originar feomelanina. (adaptado de Chang, 2009).

NOTA: TIR: tirosinase; TRP<sub>1</sub> e TRP<sub>2</sub>: Proteínas Relacionadas à Tirosinase; L-DOPA: 3,4-dihidroxifenilalanina; DQ: dopaquinona; DHI: 5,6-dihidroindol; IQ: indol-5,6-quinona; DHICA: ácido 5,6-dihidroindol-2-carboxílico; ICAQ: ácido indol-2-carboxílico-5,6-quinona; HBTA: 5-hidroxi-1,4-benzotiazinilalanina.

### Vias de sinalização da melanogênese

Além da pigmentação constitutiva da pele, a hiperpigmentação representa uma profunda resposta da pele à exposição a radiação UV (Liu & Fisher, 2010). A exposição de melanócitos humanos ao UVB resulta em fosforilação de MAP quinase (Proteína Quinase Ativada por Mitógeno) p38, SAPK (Proteína Quinase Ativada por Estresse) (Tada et al., 2002) e RACK (Receptor para Proteína Quinase C Ativada) (Kandel & Hay, 1999). Essas proteínas, por sua vez, regulam os fatores de

transcrição p53, MITF (Fator de Transcrição Associado à Microftalmia) e NFκB (Fator Nuclear kappa B), importantes na resposta melanogênica (Abdel-Malek et al., 2010).

Em resposta a radiação UV, a expressão de p53 em queratinócitos é ativada, iniciando a melanogênese (Liu & Fisher, 2010). O gene p53, descrito em 1979, foi o primeiro gene supressor de tumor a ser identificado e está normalmente desligado. Somente é ativado quando as células estão sob estresse ou danificadas. A proteína p53 inibe a multiplicação de células através da inibição do ciclo celular, podendo induzir, em muitos casos, a apoptose, fenômeno relacionado à morte programada da célula. Assim, a proteína p53 representa um freio fisiológico no desenvolvimento de tumores (Vogelstein et al., 2000).

Além disso, a p53 tem importante papel na melanogênese (Figura 3) quando de sua expressão em queratinócitos via UV, induzindo expressão da Proteína Pró-Opiomelanocortina (POMC) nestas células, um precursor de vários peptídeos como o Hormônio Estimulante de Melanócito  $\alpha$  ( $\alpha$ -MSH), o Hormônio Adrecorticotrópico (ACTH) e a  $\beta$ -endorfina, quando proteoliticamente clivada (Figura 3). Ambos,  $\alpha$ -MSH e ACTH, são agonistas para o Receptor de Melanocortina (RMC)1 expresso em melanócitos (Liu & Fisher, 2010).

Após a ligação do  $\alpha$ -MSH ao receptor MC1, há ativação da Adenilato Ciclase com conseqüente elevação intracelular de 3',5'-Adenosina Monofosfato Cíclico (AMPc), que age como um segundo mensageiro ativando de Proteína Quinase A (PKA). Quando ativada, a PKA transloca-se para o núcleo, onde fosforila a Proteína Ligante de Elemento Responsivo ao AMPc (CREB). A CREB fosforilada interage com a Proteína Ligante de CREB (CBP) para ativar a expressão do MITF através do Elemento Responsivo ao AMPc (CRE) na região promotora do gene. MITF, o qual, por sua vez, ativa a transcrição de TRP1 e TRP2, levando à produção de melanina. MITF também é um regulador essencial de genes envolvidos no desenvolvimento, na proliferação e na sobrevivência dos melanócitos (Yang et al., 1997; Slominski et al., 2004; Tsatmali et al., 2002; Liu & Fisher, 2010). Existe um antagonista fisiológico, a Proteína Agouti (ASP), que compete com  $\alpha$ -MSH pela ligação ao receptor MC1 (Lu et al., 1994; Park et al., 2009).

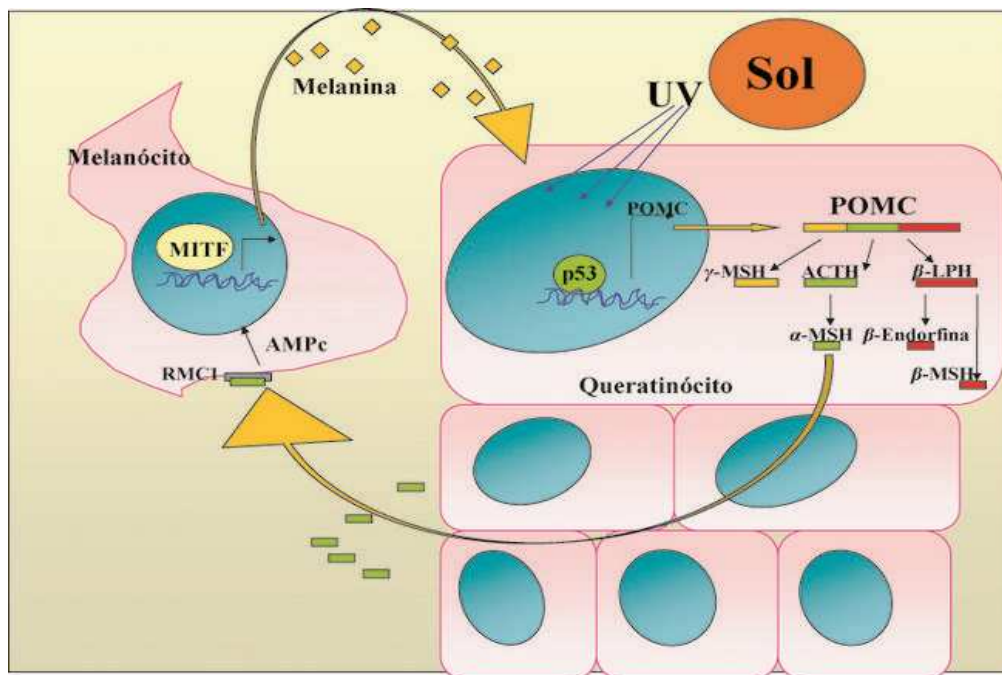


Figura 3. Gene p53 e Melanogênese. Os queratinócitos, quando expostos à radiação solar, expressam p53, o qual induz a expressão de POMC, proteína precursora de peptídeos, entre os quais,  $\alpha$ -MSH, agonista do RMC1 presente em melanócitos. RMC1 ativa adenilato ciclase, que eleva a concentração de AMPc, o que culmina na ativação de PKA. PKA leva à ativação da expressão do fator de transcrição MITF, que ativa a transcrição das enzimas envolvidas na melanogênese (adaptado de Liu & Fisher, 2010).

NOTA: UV: radiação ultravioleta; p53: fator de transcrição; POMC: proteína pró-opiomelanocortina;  $\gamma$ -MSH: hormônio gama-estimulante de melanócito; ACTH: hormônio adrenocoticotrópico;  $\alpha$ -MSH: hormônio alfa-estimulante de melanócito;  $\beta$ -LPH: beta-lipotrofina,  $\beta$ -endorfina: beta-endorfina,  $\beta$ -MSH: hormônio beta-estimulante de melanócito; RMC1: receptor de melanocortina 1; AMPc: 3',5'-adenosina monofosfato cíclico; MITF: fator de transcrição associado à microftalmia.

O MITF ainda é ativado pelo Fator de Células-Tronco (SCF), que é produzido por queratinócitos e liga-se em *c-kit*, um receptor de tirosina quinase encontrado nos melanócitos. A ligação de SCF ao *c-kit* leva à autofosforilação deste receptor e ativação de MAP quinases, que fosforilam, ativando MITF, levando à transcrição das enzimas melanogênicas (Park et al., 2009).

A cascata DAG/PKC- $\beta$  é outro caminho na ativação da melanogênese. Neurotransmissores causam alguns de seus efeitos através da liberação de 1,2 diacilglicerol (DAG) da membrana plasmática. DAG também é liberado da membrana pela radiação UV e é ativador fisiológico de PKC, que regula a pigmentação (Park et al., 2009). Como ilustrado na Figura 4, PKC- $\beta$  residente no citoplasma dos melanócitos, quando ativada por DAG, liga-se no receptor RACK1; o complexo formado fosforila os resíduos de serina no domínio citoplasmático da tirosinase humana (Park et al., 2009).

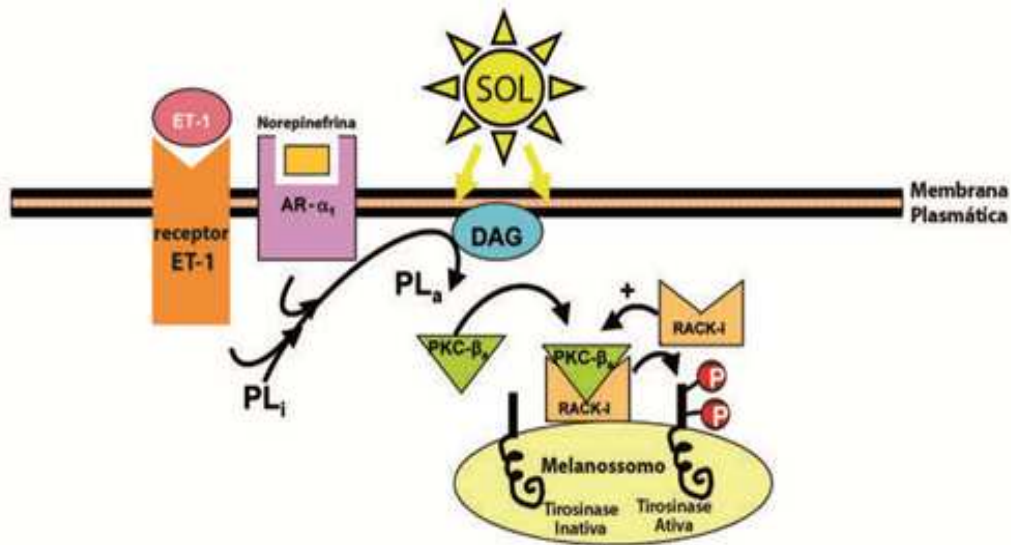


Figura 4. Ativação da Tirosinase por PKC- $\beta$ . Mediante ligação de norepinefrina derivada de melanócito ao receptor adrenérgico ou ligação de ET-1 ao receptor de ET-1, presentes no melanócito, ou ainda pela exposição à luz solar, ocorre liberação de DAG da membrana. DAG ativa PKC- $\beta$ , que se complexa com RACK1, com consequente fosforilação e ativação da tirosinase. ET-1 é produzida pelos queratinócitos mediante exposição à luz solar. (adaptado de Park et al., 2009).

NOTA: AR- $\alpha_1$ : adrenoreceptor- alfa1; PLi: fosfolipase inativa; PLa: fosfolipase ativa; IP<sub>3</sub>: inositol 1,4,5 trifosfato; DAG: 1,2 diacilglicerol; PKC- $\beta$ : proteína quinase beta; RACK1: receptor para proteína quinase C ativada 1; ET-1: endotelina-1.

Os melanócitos têm a capacidade de expressar adrenoreceptores  $\alpha_1$  após exposição a catecolaminas, o que induz a cascata DAG/PKC- $\beta$ , e adrenoreceptores  $\beta_2$ , que induzem a cascata AMPc/PKA (Schallreuter et al., 1996; Gillbro et al., 2004).

A exposição da pele a radiação UV aumenta a produção de citocinas inflamatórias, tais como a Interleucina-1 (IL-1) e o Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) os quais, por sua vez, ativam o fator de transcrição nuclear NF $\kappa$ B. Quando desativado, NF $\kappa$ B existe como um complexo no citoplasma consistindo de p50, p65 e da proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ . Após ativação por agentes inflamatórios, I $\kappa$ B $\alpha$  sofre fosforilação, ubiquitinação e degradação proteolítica; assim, ocorre a translocação do complexo p50-p60 para o núcleo. NF $\kappa$ B tem papel importante no sistema imunológico já que controla a expressão de citocinas inflamatórias e outros genes envolvidos na inflamação. Sua ativação é, porém, suprimida por  $\alpha$ -MSH (Kupper et al., 1987; Kock et al, 1990; Manna & Aggarwal, 1998; Siebenlist et al., 1994).



Outros mediadores inflamatórios são produzidos pelos queratinócitos em maior quantidade após exposição à radiação UV, como prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO). Os compostos lipídicos PGE<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>, derivados do ácido araquidônico, estimulam a formação de dendritos nos melanócitos (Scott et al., 2004; Park et al., 2009). O NO estimula a produção de melanina (Tsatmali et al., 2002). Os queratinócitos ainda produzem ET, peptídeos originalmente derivados de células endoteliais, e a exposição da pele a radiação UV ou a IL-1α/IL-1β aumenta sua produção. A ET-1 derivada de queratinócito é um fator de proliferação intrínseco para melanócitos humanos na melanogênese *in vivo* (Imokawa et al., 1992).

Assim, a melanogênese resulta de um complexo de interações entre influências ambientais e endógenas, tendo papel crítico na proteção da pele contra danos induzidos por radiações UV (Park et al., 2009).

Durante o processo de síntese de melanina a partir da L-tirosina, um grande número de agentes potencialmente citotóxicos são formados, incluindo o peróxido de hidrogênio. Essa deve ser a razão pela qual esse processo ocorre dentro de melanossomos, impedindo que ocorram reações com outros componentes citosólicos (Mani et al., 2001). Além dos agentes tóxicos produzidos, a produção de melanina é altamente controlada e compartimentalizada, mais provavelmente porque a mesma também é um produto tóxico (Brilliant, 2001).

## ANORMALIDADES DA PELE: FATORES GENÉTICOS E AMBIENTAIS

A exposição da pele à luz solar leva a danos diretos ao DNA e também indiretos, através da produção de ERO, estando envolvidos no câncer, no envelhecimento precoce e em várias desordens inflamatórias. Melaninas também podem agir como agentes fotossensibilizantes ao amplificar a produção de ERO e aumentar o dano ao DNA. As principais ERO incluem o radical hidroxila (HO•), o ânion superóxido (O<sub>2</sub>•-), os radicais peroxila (ROO•) e alcoxila (RO•), peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso (HOCl) e oxigênio singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) (Hill et al., 1997; Steenvoorden e van Henegouwen, 1997; Maresca et al., 2006; Barreiros et al., 2006).

Anormalidades da pele, como o envelhecimento precoce, por exemplo, são também facilitadas por fatores genéticos e ambientais. Mesmo a melanina sendo um importante pigmento para a proteção contra raios UV, quando em excesso, produz eritema, sardas e outras disfunções epiteliais (Matsui et al., 2010).

Discromias são mais comuns em indivíduos negros. Hiperpigmentação Pós-Inflamatória (HPI) e Melasma são condições devastadoras para muitos pacientes, levando a um impacto negativo na qualidade de vida destes indivíduos (Grimes, 2009).

A HPI é caracterizada por aumento na pigmentação, que é secundária ao processo inflamatório. O excesso de pigmento é depositado na epiderme e/ou derme. Em peles escuras, causas comuns de HPI incluem *acne vulgaris*, dermatite atópica, alérgica e/ou irritante de contato, psoríase e erupções cutâneas causadas por drogas. Após trauma cutâneo ou inflamação, os melanócitos podem reagir via produção de melanina normal, diminuída ou aumentada. Apesar da patogênese ainda ser desconhecida, a hiperpigmentação resulta da produção de citocinas, de mediadores inflamatórios e de ERO (Grimes, 2009).

Melasma é uma forma comum de hiperpigmentação não-inflamatória (Halder & Richards, 2004), caracterizada por manchas que variam de coloração entre o marrom claro a acinzentado, envolvendo a face, principalmente bochechas, queixo, nariz, testa e lábio superior; também podem aparecer lesões em áreas expostas ao sol, como costas, peito e braços (Grimes, 2009). Vários fatores estão envolvidos na etiologia da doença: influências genéticas, exposição à radiação UV, alterações hormonais e drogas fototóxicas (Miot et al., 2009).

Entre os cânceres de pele que se desenvolvem devido à exposição à radiação UV, reconhecida por ser um carcinógeno humano completo, o mais grave é o melanoma. O melanoma, neoplasia maligna originada a partir dos melanócitos, é a primeira causa de morte por doenças de pele, representando cerca de 1% de todos os tumores malignos (Carvalho et al., 2004).

Sua incidência apresenta uma tendência de crescimento mundial e, no Brasil, a taxa de mortalidade por essa doença também está crescendo. Altas frequências de queimaduras graves pelo banho de sol com o intuito de bronzear a pele mostram forte associação com o melanoma. Além disso, também existe o bronzeamento artificial, que também é uma tendência crescente e que seria mais segura que a radiação solar uma vez que as lâmpadas utilizadas emitem apenas UVA. Porém, estudos mostram que a radiação UVA é importante para a origem do melanoma, atuando sinergicamente com a radiação UVB (Souza et al., 2004).

Atualmente, acredita-se que a maioria dos casos dessa neoplasia seja multifatorial, resultando da interação de fatores de risco não só ambientais como também genéticos (Carvalho et al., 2004).

O diagnóstico do melanoma deve ser suspeitado quando a lesão melanocítica apresentar alteração de cor, tamanho ou forma. A presença de assimetria da lesão, bordos irregulares e mal definidos, alterações de cor e diâmetro maior que 6 mm constituem o diagnóstico do melanoma e são indicativos de biópsia para confirmação diagnóstica (Dimatos et al., 2009).

Especialistas, durante o 14º Congresso Mundial de Câncer de Pele, realizado em São Paulo em agosto de 2012, alertaram sobre o risco de pessoas que possuem histórico de melanoma na família. Essas pessoas possuem risco pelo menos 30 vezes maior de desenvolver a doença e necessitam de acompanhamento dermatológico contínuo para obter um diagnóstico precoce. Além disso, citaram sobre as mutações genéticas relacionadas à síndrome do melanoma familiar, dentre as quais a alteração no gene CDKN2A, que codifica uma proteína chamada P16, que tem como função bloquear a proliferação celular. Entretanto, através do financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), entre 50 famílias estudadas por meio de sequenciamento genético, apenas nove apresentaram a mutação no gene CDKN2A, indicando que esta não é a mutação mais importante e que existem outras mutações ainda não conhecidas. Este artigo está disponibilizado na internet, no sítio Agência de Notícias da FAPESP, endereço eletrônico <http://agencia.fapesp.br/16134#.UEXidXEXRNo.email>.

Além da hiperpigmentação cutânea e do câncer de pele, também existem doenças relacionadas à hipopigmentação da pele como o vitiligo, a pitíriase alba, a pitíriase versicolor e a hipomelanose gutata idiopática (Alchorne & Abreu, 2008).

O vitiligo, hipomelanose adquirida mais frequente, é caracterizado por manchas despigmentadas nítidas, aparecendo em qualquer região da pele, em especial nos orifícios dos olhos, narinas e boca, nos mamilos, umbigo e genitália (Bellet & Prose, 2005).

A patogênese do vitiligo ainda não foi totalmente elucidada; no entanto, várias teorias são propostas para explicar a perda de melanócitos da epiderme. A associação do vitiligo com condições autoimunes é bem estabelecida, como por exemplo, na tireoidite de Hashimoto, doença de Graves, doença de Addison e no *Diabetes mellitus*. Uma das explicações para a autoimunidade é a demonstração de autoanticorpos circulantes para melanócitos no soro de pacientes com vitiligo (Halder & Chappell, 2009).

Quanto ao estresse oxidativo, estudos sugerem que o acúmulo de radicais livres tóxicos levam a destruição dos melanócitos. A teoria neural propõe que certos mediadores químicos liberados das terminações nervosas podem diminuir a liberação de melanina. Finalmente, a teoria viral propõe que alguns vírus como citomegalovírus DNA, hepatite C e Epstein-Barr vírus estão relacionados com o vitiligo (Halder & Chappell, 2009).

A pitiríase versicolor é uma infecção fúngica superficial, caracterizada por mudanças de pigmentação da pele devido à colonização do estrato córneo pelo fungo lipofílico *Malassezia furfur*, encontrado na microbiota da pele, mas tornando-se patogênico em determinadas condições. Indivíduos acometidos pela infecção geralmente apresentam múltiplas lesões no tronco, com regiões intercaladas de pele normal. As lesões descamam e causa prurido, podendo ser hipo ou hiperpigmentadas o que explica a denominação “versicolor” (Oliveira et al., 2002).

A hipomelanose gutata idiopática afeta principalmente indivíduos negros. Caracteriza-se por máculas bem circunscritas, arredondadas ou estreladas, sendo poucas ou numerosas, aumentando em número e tamanho com a idade. Geralmente surgem em áreas expostas das extremidades, particularmente na face anterior dos membros inferiores. Histologicamente ocorre achatamento da junção dermoepidérmica, redução de grânulos de melanina na camada basal e de melanócitos (Fernandes & Pina, 2010).

A pitiríase alba é uma dermatose inflamatória benigna que toma importância quando vista pelo aspecto das alterações estéticas, acometendo geralmente a face. Apesar de bastante estudada, sua etiologia ainda não é completamente estabelecida. Os danos decorrentes da exposição excessiva à radiação ultravioleta podem acarretar relevante descamação da pele, sendo a hipocromia uma seqüela dessa descamação. A ação direta dos raios solares sobre os melanócitos, induzindo alterações em sua função, também pode levar às modificações de cor nas lesões de pitiríase alba (Weber et al., 2000).

## TRATAMENTO

A maioria dos agentes despigmentantes com efeito clareador de pele também causa efeitos colaterais pronunciados. Os principais problemas relacionados a estes compostos são a toxicidade ao melanócito, a irritação e a sensibilidade que causam à pele, além do potencial carcinogênico (Draelos, 2007).

### *Agentes Despigmentantes*

Agentes despigmentantes agem particularmente como inibidores reversíveis ou irreversíveis da atividade de tirosinase. Para um melhor esclarecimento, antes da apresentação dos tratamentos clareadores existentes, uma breve explicação de como age cada tipo de inibidor será descrita a seguir.

A inibição enzimática pode ser classificada em reversível e irreversível. O inibidor reversível pode ser do tipo competitivo, incompetitivo e não competitivo. O inibidor competitivo apresenta, na maioria das vezes, características estruturais e afinidades semelhantes às do substrato (S), competindo com esse pelo sítio de ligação da enzima (E) e impedindo a formação do produto (P). Porém, como a reação é reversível, aumentando-se a concentração de substrato, o equilíbrio é deslocado de maneira que a formação do complexo enzima-substrato (ES) é favorecida (Marques & Yamanaka, 2008).

O inibidor não competitivo liga-se em um sítio diferente do sítio de ligação do substrato. Pode ocorrer a formação de complexo tanto entre enzima e inibidor (EI) quanto entre este e o substrato (EIS). Nesse caso, a inibição não pode ser revertida pela adição de quantidades de substrato. Um inibidor incompetitivo só vai se ligar ao complexo enzima-substrato (ES) formado. A ligação entre o inibidor e o complexo é efetuada por um sítio de ligação diferente do sítio em que o substrato se encontra ligado à enzima, como no caso do inibidor não competitivo (Marques & Yamanaka, 2008).

No caso de um inibidor irreversível, esse se ligará no sítio ativo da enzima irreversivelmente, em geral, por formação de ligações covalentes, podendo destruir grupos funcionais importantes para a enzima. A inibição irreversível é progressiva e, após determinada concentração, atinge máxima inibição (Marques & Yamanaka, 2008).

A hidroquinona (HQ) é um composto hidroxifenólico conhecido como 1,4 dihidroxibenzeno (Draelos, 2007). Catecóis (fenóis) agem como substratos monooxigenase da tirosinase levando à eliminação redutiva do cobre (0) e inativação da enzima. Teoricamente, se esperaria que a HQ também levasse à inativação da enzima por mecanismo similar. Mas, em contraste com o catecol, a HQ não é nem substrato para a ação da tirosinase e nem inibidor suicida, mas é oxidada na presença de substratos da tirosinase. A HQ não é um substrato primário para a tirosinase e como evidência da ação monooxigenase na hidroquinona não foi

encontrada, conclui-se que a presença de grupos para-hidroxi previnem a ligação no sítio ativo da tirosinase. O mecanismo de oxidação secundária da HQ parece ocorrer pela mudança redox de um ou mais produtos ortoquinona (gerados pela oxidação catalisada pela tirosinase do substrato primário) para obtenção 1,4-benzoquinona e não de ortoquinona (Stratford et al., 2012).

A HQ interfere na produção de nova melanina, provocando mudanças estruturais nas membranas das organelas dos melanócitos, acelerando a degradação dos melanosomos, afetando o metabolismo celular das membranas lipoproteicas das organelas citoplasmáticas que, por sua vez, se rompem. Atua também diretamente sobre a tirosinase (Gardoni et al., 2004).

A HQ, utilizada em concentrações que variam entre 5 e 10 %, também pode ser irritante e instável. Reações adversas de seu uso incluem dermatite de contato alérgica e irritante e descoloração das unhas. Hiperpigmentação pós-inflamatória pode ocorrer a partir da dermatite de contato. Hipopigmentação pode ocorrer ao redor das áreas tratadas de pele normal (Halder & Richards, 2004).

A primeira prescrição alternativa à HQ é o mequinol, quimicamente conhecido como 4-hidroxianisol. O exato mecanismo de ação deste composto é desconhecido; entretanto, é um substrato para a tirosinase, agindo como um inibidor competitivo na formação de precursores de melanina. O mequinol não danifica o melanócito como a hidroquinona. Verificou-se que o uso prolongado dessa substância em alguns pacientes causa despigmentação (Draelos, 2007).

A arbutina (hidroquinona-O-β-D-glucopiranosídeo) é um dos principais constituintes da *Arctostaphylos uva-ursi* (uva-ursi), com capacidade de inibir a formação de melanina pela inibição das atividades da tirosinase e da DHICA polimerase. Sendo um composto atóxico para os melanócitos, é usado em várias preparações destinadas ao clareamento de pele no Japão. Preparações com altas concentrações de arbutina são mais eficazes que aquelas com baixas concentrações; porém, pode ocorrer o aparecimento de pigmento escuro como resultado de hiperpigmentação pós-inflamatória (Chakraborty et al., 1998; Chauhan et al., 2007; Draelos, 2007).

O ácido azeláico, ácido dicarboxílico obtido de culturas de *Pityrosporum ovale*, interfere na atividade da tirosinase e também na síntese de DNA; parece ter especificidade para melanócitos anormais. Embora apresente perfil de segurança, pode causar coceira de curta duração quando aplicado topicamente em alguns indivíduos (Grimes, 2009; Draelos, 2007).

O ácido kójico (AK), ou o 5-hidróxi-2-(hidroximetil)-4-pirona, é uma substância produzida por vários fungos e bactérias, como as espécies de *Aspergillus*, *Penicillium* e *Acetobacter*. Possui ação antimicrobiana e quelante de íons cobre, sendo esta última responsável pela inativação da tirosinase e, conseqüentemente, pela ação inibidora na formação de melanina (Calaça et al., 2011). Estudos demonstraram que o AK tem potencial para causar dermatite de contato e eritema (Nakagawa et al., 1995).

Mais especificamente, o AK demonstra efeito competitivo de inibição sobre a atividade monofenolase e, também, efeito misto de inibição da atividade difenolase de tirosinase de cogumelo. Sua capacidade quelante de íons cobre no sítio ativo da enzima pode explicar o efeito inibitório competitivo observado. Além disso, o AK parece ser um inibidor de ligação lenta da atividade de tirosinase difenolase. Isso significa que a forma ativa da tirosinase é requerida antes da ligação do inibidor poder ocorrer (Chang, 2009).

A tretinoína não age na tirosinase, mas pela inibição da dispersão dos pigmentos dos queratinócitos, induzindo a descamação e diminuindo o tempo de contato entre queratinócitos e melanócitos; assim, promove perda rápida da pigmentação. Usada em concentrações entre 0,01 e 0,1 %, tem sido associada à dermatite irritante (Grimes, 2009).

No caso do melanoma cutâneo, o diagnóstico precoce e tratamento cirúrgico continuam sendo as melhores formas de tratamento da doença, que pode se disseminar por via linfática muito precocemente na sua evolução, sendo os linfonodos regionais os sítios mais comuns de metástases. A excisão cirúrgica destes linfonodos é o único meio efetivo para alcançar controle da doença e cura, embora a presença de metástases piore a sobrevida dos pacientes (Dimatos et al., 2009).

### *Agente repigmentantes*

Em relação às hipomelanoses já anteriormente citadas, o tratamento é lento e difícil, sendo importante tratar a doença que deu origem ao distúrbio pigmentar. Camuflagem e fotoprotetores são úteis. Opções de tratamento para a hipopigmentação incluem corticóides e psoralenos associados à luz UVA (Alchorne & Abreu, 2008).

Imunomoduladores tópicos (tacrolimus e pimecrolimus) mostraram eficácia semelhante à dos corticóides tópicos, mas sem seus efeitos adversos, podendo ser

utilizados em áreas pequenas e/ou complicadas como as pálpebras; entretanto, um caso de hipertricose focal em criança tratada com tracolimus foi recentemente descrito (Bellet & Prose, 2005).

Psoraleno tópico ou oral combinado com irradiação UVA (PUVA) é efetivo. Os psoralenos são furocumarínicos tricíclicos derivados de plantas, como a *Ammi majus* e a *Psoralea coryfolia*. Quando ativados pela radiação UVA, provocam reações fototóxicas na epiderme. A repigmentação parece ocorrer a partir da estimulação de imunocitocinas e mediadores inflamatórios que agem como “sinais” para migração de melanócitos a partir dos folículos pilosos da pele sã. (Halder & Chappell, 2009; Cestari et al., 2007; Steiner et al., 2004).

A fotoquimioterapia PUVA causa muitos efeitos colaterais como náusea, vômitos, reações fototóxicas e risco teórico aumentado de câncer de pele. A PUVA tópica tem efeitos colaterais como eritema, vesículas e hiperpigmentação da pele normal adjacente (Bellet & Prose, 2005).

## IMPORTÂNCIA DO ESTUDO DAS PLANTAS MEDICINAIS

Desde a antiguidade, o homem aprendeu a aproveitar as propriedades das plantas sobre o organismo, as quais constituem, ao longo da história, as fontes mais importantes de substâncias medicamentosas para aliviar e curar doenças. Porém, os processos de industrialização e de mercantilização dos medicamentos foram responsáveis pelo esquecimento do conhecimento popular durante muito tempo. A memória e a cultura do povo foram sufocadas pela medicina oficial, patrocinada pela indústria hospitalar e de medicamentos de síntese. Mesmo assim, o conhecimento sobre os efeitos curativos das plantas tem sido transmitido sucessivamente entre gerações (Lima et al., 2006).

Em nosso país, o conhecimento sobre a medicina popular simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas regiões, sendo as plantas medicinais comercializadas em feiras livres e mercados populares, e encontradas em quintais residenciais. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais (Maciel et al., 2002).

Este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica que, juntas, enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável flora mundial (Maciel et al., 2002).



Neste contexto, a digoxina obtida de *Digitalis* spp., quinina e quinidina, de *Cinchona* spp., vincristina e vinblastina, de *Catharanthus roseus*, atropina, de *Atropa belladonna*, e morfina e codeína, de *Papaver somniferum*, são exemplos de algumas drogas importantes obtidas de plantas (Rates, 2001).

### Gênero *Passiflora*

A *Passiflora* talvez tenha sido a planta americana que causou maior admiração aos colonizadores espanhóis dos séculos XVI e XVII. A princípio conhecia-se esta planta com o nome de “granadilla”, porque seu fruto se parecia com o de *Punica granatum*; mais tarde recebeu a denominação popular de passiflora, passionária ou flor da paixão, que se deve à primeira espécie descoberta (atualmente *Passiflora incarnata* L.) pelo que representava para os seus conhecedores. As folhas recordavam a lança que transpassou o Salvador na cruz; as gavinhas, o açoite; a corona de filamentos, a coroa de espinhos; os três estiletos simulavam os três cravos e as cinco anteras representavam as chagas do crucificado (Cervi, 1997).

O gênero *Passiflora* compreende cerca de 500 espécies, o maior da família Passifloraceae (Movafegh et al., 2008). O Brasil é um dos principais centros de origem de espécies do gênero *Passiflora*, apresentando grande potencial para atender os mercados nacional e mundial de fruta seca, de suco concentrado, bem como explorar o uso dessas plantas como ornamentais e medicinais. Nem todas as espécies têm frutos comestíveis e só um pequeno número consegue ocupar espaços nos grandes mercados fruteiros nacionais e internacionais (Silva & Rua, 2007). O nome do fruto, “maracujá”, vem da designação indígena *Mara-Cuiá*, que significa “comida preparada em cuiá”, retratando como os índios parecem ter visto os frutos dessas plantas (Fumis & Sampaio, 2007).

Passifloras são usadas na medicina popular há muito tempo para o combate a doenças. Em toda a América Central, infusão de folhas de várias espécies de *Passiflora* é usada como diurética; a decocção da erva seca de *P. foetida* é também dotada de efeito diurético. Na Índia, a fruta verde de *P. foetida* é usada como emética. Raiz pulverizada de *P. quadrangulares* misturada com óleo é usada como pomada analgésica. As folhas de *P. edulis* também são pressionadas e aplicadas como gesso para o tratamento de inflamação e nos ataques de asma.

A mistura de folhas frescas de *P. laurifolia* é ingerida como vermífugo. Passifloras são, também, muito utilizadas medicinalmente pelos seus efeitos sedativos e indutores de sono, apesar de que apenas *P. incarnata* é processada em medicações e chás, na grande escala econômica (Ulmer & MacDougal, 2004).

#### Aspectos Botânicos

As plantas do gênero *Passiflora* são escandentes, herbáceas ou lenhosas, expandindo-se geralmente através de gavinhas axilares. O caule pode ser cilíndrico, angular, sub-angular e raramente quadrangular e estriado longitudinalmente. As folhas são muito variáveis quanto à forma (Cervi, 1997).

As flores são actinomorfas, andróginas e geralmente isoladas. O fruto é uma baga variável em forma, tamanho e cor. Em geral, o fruto destas espécies possui polpa ácida, mucilagínosa ou aquosa, em forma de arilo que recobre as sementes (Cervi, 1997).

Segundo Engler e Cronquist, o maracujazeiro possui a seguinte classificação botânica (Castro & Kluge, 1997):

	<b>Engler</b>	<b>Cronquist</b>
DIVISÃO	Angiospermae	Magnoliophyta
CLASSE	Dicotyledoneae	Magnoliatae
SUBCLASSE	Archichlamydae	Dillenidae
ORDEM	Parietales	Violales
SUBORDEM	Flacourtiineae	-----
FAMÍLIA	Passifloraceae	Passifloraceae

Tabela 1. Classificação axonômica do Maracujazeiro, segundo Engler e Cronquist.

*P. alata* Curtis, considerada nativa do Brasil, é conhecida popularmente como maracujá-guaçu, maracujá-doce, maracujá de refresco, maracujá de comer e maracujá-alado. Possui frutos de alto valor nutritivo, com tamanho e aparência de grande aceitação (Costa et al., 2009). Caracteriza-se por possuir folhas inteiras

(Figura 5-A) e flores com pétalas de coloração avermelhada e filamentos da coroa listados de branco, púrpura e violeta (Figura 5-B).



Figura 5. Folhas e Flor de *P. alata* Curtis. A. Folhas inteiras. B. Detalhes da flor, com pétalas avermelhadas e filamentos da coroa listados.

Nativa na região compreendida entre o sul dos Estados Unidos até a Argentina, a *P. incarnata* L. possui folhas simples, alternadas e profundamente trilobadas (Figura 6-A). As pétalas das flores são brancas na parte interna e rosadas na coroa (Figura 6-B). Os frutos são ovalados, de cor verde-clara com polpa branca. Alguns nomes populares da espécie são flor-da-paixão, maracujá-guaçu e maracujá-silvestre (Lorenzi & Matos, 2008).



Figura 6. Folhas e Flor de *P. incarnata* L. A. Folhas trilobadas. B. Flor com pétalas brancas na parte externa, e rosadas na coroa.<sup>2</sup>

<sup>2</sup> Fonte: <http://www.erowid.org>

A *P. edulis* Sims, amplamente cultivada no nordeste do Brasil, possui folhas alternadas e trilobadas (Figura 7-A) e as flores são típicas das plantas deste gênero (Figura 7-B). Alguns nomes populares da espécie são maracujá-de-suco, maracujá-azedo e maracujá-ácido (Lorenzi & Matos, 2008).

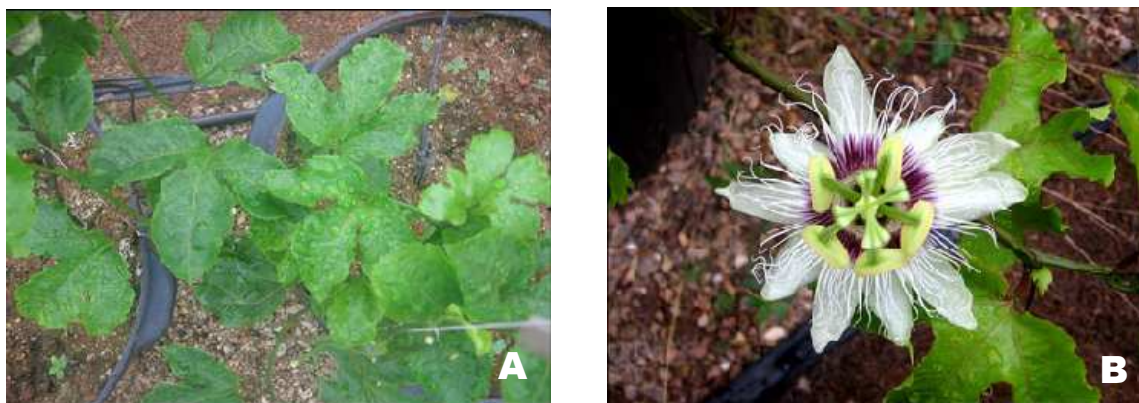


Figura 7. Folhas e Flor de *P. edulis* Sims A. Folhas trilobadas. B. Flor com pétalas brancas e filamentos da corona de cores branca e púrpura.<sup>3</sup>

*P. actinia* Hooker (Figura 8), distribuída no Brasil desde o Rio Grande do Sul até o Espírito Santo, possui folhas simples, alternas e estipuladas; as flores são hermafroditas e vistosas e os frutos, do tipo baga globoso (Kurtz et al., 2003).



Figura 8. Folhas e Flor de *P. actinia* Hooker. Folhas simples. Flor com pétalas brancas e filamentos coloridos.<sup>4</sup>

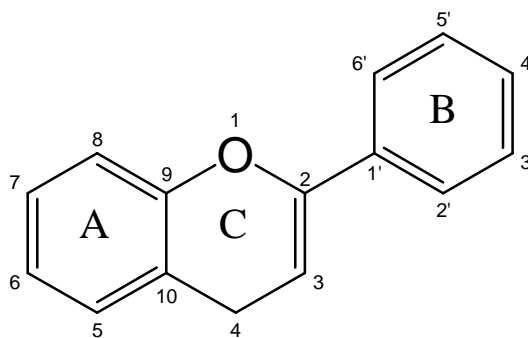
---

Fontes:<sup>3</sup> Embrapa, 2010; <sup>4</sup> <http://www.passiflora.it/actinia.htm>

### Aspectos Fitoquímicos

Antigamente acreditava-se que os principais constituintes químicos ativos do gênero *Passiflora* eram os alcaloides do tipo indólico, dos quais harmano, harmina, harmol, harmalina e harmanol foram isolados de *P. incarnata* nas décadas de 50 e 60. Estudos posteriores demonstraram que este grupo químico não poderia ser responsável pelo efeito sedativo que lhes fora atribuído devido à baixa concentração na planta. Assim, os flavonoides ganharam maior importância como substâncias ativas dos extratos da família Passifloraceae (Pereira & Vilegas, 2000; Ulmer & MacDougal, 2004).

Flavonoides são compostos polifenólicos complexos que apresentam estrutura comum caracterizada por dois anéis aromáticos, A e B, e um heterociclo oxigenado, anel C (I) (Yunes & Calixto, 2001).

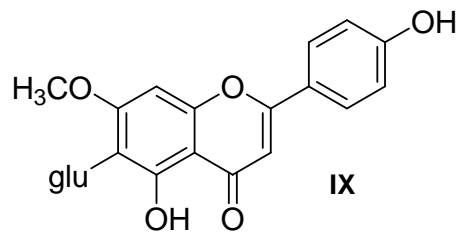
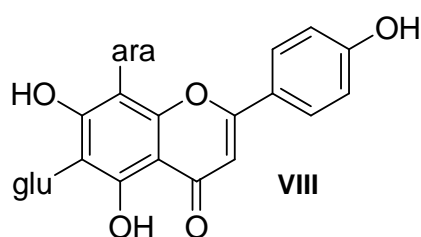
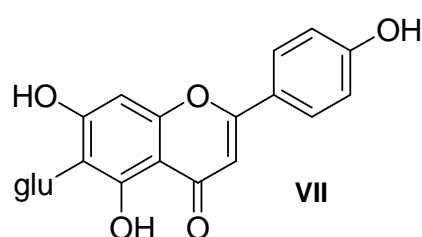
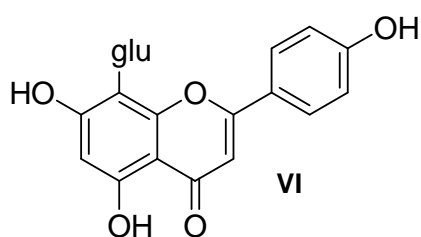
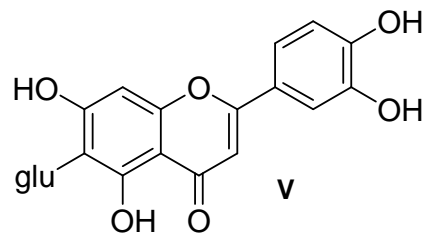
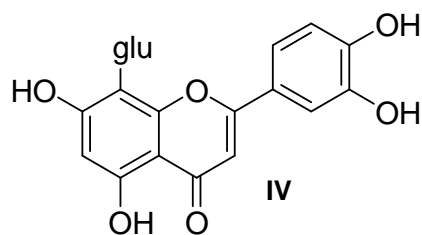
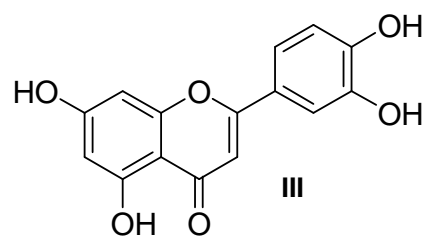
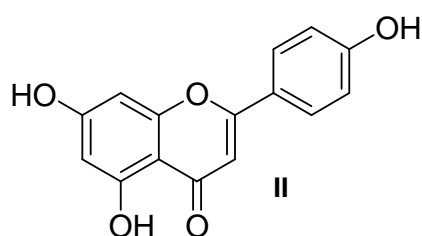


I

Um grande número de flavonoides ocorre conjugado com açúcares, sendo estes denominados de flavonoides glicosídicos. A forma conjugada pode ser formada pela ligação de um ou mais açúcares aos grupos hidroxilas por ligação hemiacetal (O-glicosídeo). Outra forma de conjugação de açúcares ao núcleo flavônico é por meio de ligação açúcar-genina entre carbonos C-1 (anomérico) do açúcar, e um ou dois carbonos do anel A do flavonoide (C-glicosídeo). Quando o metabólito encontra-se sem o açúcar, é chamado de aglicona ou genina, sendo também denominado de forma livre (Zuanazzi, 2000).

Os principais flavonoides encontrados no gênero *Passiflora* são os C-glicosídeos, derivados da apigenina (II): vitexina (VI), isovitexina (VII), shaftosídeo (VIII) e swertisina (IX), e da luteolina (III): orientina (IV) e isoorientina (V) (Geiger & Markham, 1986).

Segundo Dhawan e colegas (2004), a presença dos flavonoides apigenina, luteolina, quercetina, kaempterol, 6-β-D-alopiranosil-8-β-xilopiranosil-apigenina, vitexina, isovitexina, orientina, isorientina, schaftosídio, isoschaftosídio, isovitexina-2''-O-glucopiranosídeo, isorientina-2''O-glucopiranosídeo, 2-glucosilapigenina, isoscoparina-2''-O-glucosídeo, 2''-O-glucosil-6-C-glucosilapigenina, 6-β-D-glucopiranosil-8-β-D-ribopiranosil-apigenina e swertisina já foi relatada em *P. incarnata*.



O grupo de Ulubelen (1982) relatou, em folhas de *P. pittieri*, a presença dos flavonoides isovitexina e 2''-xilosilvitexina, luteolina 7-O-glucosídeo e uma mistura de vicensina-2, schaftosídeo e isochaftosídeo. Em *P. alata* foram encontrados, principalmente, 2''-xilosilvitexina e pequenas quantidades de vitexina, isovitexina e orientina. Somente saponarina foi obtida de *P. ambigua*. Oga e colaboradores (1984) confirmaram a presença de vitexina, isovitexina e isoorientina a partir de extrato seco das folhas de *P. alata*.

O flavonoide rutina (O-glicosídeo) foi detectado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em *P. alata* e em *P. edulis* (Moraes, 1995). De acordo com Pereira & Vilegas (2000), já foram encontrados em *P. edulis* os seguintes flavonoides: vitexina, orientina, isovitexina, luteolina 6-C-chinovosídeo e luteolina 6-C-fucosídeo.

A análise comparativa de CLAE das frações ativas de *P. actinia* Hooker sugeriu perfil cromatográfico muito semelhante ao de *P. incarnata*. Isovitexina foi encontrada nas frações aquosa e metanólica obtidas de *P. actinia*, principal flavonoide encontrado em *P. incarnata* (Lolli et al., 2007). Muller (2006) não encontrou vitexina, orientina, swertisina ou rutina na tintura Farmacopéica de *P. actinia*.

Diferindo de outras espécies de *Passiflora* que possuem como metabólitos principais os flavonoides, a *P. alata* apresenta saponinas como metabólitos secundários majoritários. Do extrato butanólico de folhas de *P. alata*, cinco saponinas foram isoladas e identificadas, sendo uma do tipo esteróide (3-O-β-D-glicopiranosil-estigmasterol) e quatro do tipo triterpênicas (ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→3)-β-D-glicopiranosil-oleanólico, ácido 3-O-β-D-glicopiranosil-(1→2)-β-D-glicopiranosil-oleanólico e quadrangulosídeo, também denominado 9,19-ciclolanost-24Z-en-3β,21,26-triidróxi-3,26-di-O-gentiobiose) (Reginatto et al., 2001).

#### *Polifenóis: atividades biológicas*

Os flavonoides identificados em plantas (Manach et al., 2004) são subdivididos em sete grandes grupos, incluindo flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonoides, chalconas e catequina. São os compostos fenólicos mais numerosos e mais bem estudados por estarem amplamente distribuídos em folhas, sementes, cascas e flores de plantas; mais de quatro mil diferentes flavonoides já foram caracterizados e identificados (Chang, 2009).

As diferentes classes de flavonoides são distintas entre si por anéis heterocíclicos de oxigênio, pelas diferentes posições do anel B e pelos grupos hidroxil, metil, isoprenóide e metóxi distribuídos em diferentes posições nos anéis (Chang, 2009).

Além de exercerem efeitos antioxidantes, sequestradores de ERO e protetores de DNA, os flavonoides também possuem ação antibacteriana, antiviral, anti-inflamatória, antialérgica, vasodilatadora e inibem *in vitro* a peroxidação lipídica, a agregação plaquetária, a permeabilidade e fragilidade capilar e a atividade de enzimas ciclo-oxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) (Yunes & Calixto, 2001).

Além dos flavonoides, outros polifenóis também são metabólitos secundários das plantas e geralmente estão envolvidas na sua defesa contra a radiação UV ou na agressão por patógenos. Esses compostos podem ser classificados em diferentes grupos de acordo com o número de anéis fenólicos que contêm e os elementos estruturais que ligam estes anéis uns aos outros. Portanto, distinções são feitas entre os flavonoides, os ácidos fenólicos, os estilbenos e as lignanas (Manach et al., 2004).

Polifenóis também representam o maior grupo de inibidores da tirosinase. Uma vez que vários polifenóis são aceitos como substratos para a tirosinase, dependendo da presença e da posição de elementos adicionais, agindo como inibidores, a estrutura dos flavonoides é também, em princípio, compatível com os papéis de substratos e inibidores (presumivelmente competitivos) da tirosinase. Além dos flavonoides, outros polifenóis como estilbenos e derivados cumarínicos também foram identificados como inibidores da tirosinase (Chang, 2009).

A interferência de polifenóis na melanogênese é bem conhecida, mas os resultados são contrastantes. Segundo Chang (2009), os polifenóis representam o maior grupo de inibidores da tirosinase com vários estudos demonstrando essa ação. Por exemplo, o piceatanol e o resveratrol, polifenóis de estruturas semelhantes encontrados naturalmente em uvas e vinhos tinto, demonstraram ação anti-melanogênica e inibidora da tirosinase, ambas explicadas por suas propriedades antioxidantes. Sabe-se que agentes antioxidantes podem atuar reduzindo a *o*-dopaquinona novamente à L-DOPA, evitando a formação de dopacromo e, assim, a de melanina (Yokozawa & Kim, 2007; Chang, 2009). O piceatanol também foi encontrado em níveis apreciáveis no extrato das sementes de *P. edulis*, e agiu inibindo significativamente a melanogênese em células de melanoma humano (Matsui et al., 2010).



Já Yang e colaboradores (2006), estudando a ação do derivado cumarínico scoparone (6,7'-dimetoxicumarina) na melanogênese, observaram que esse polifenol estimulou a melanogênese e a atividade de tirosinase pelo aumento da expressão da tirosinase e das TRPs em nível transcricional pela sinalização de PKA. Como descrito na introdução deste trabalho, quando ativada, a PKA se desloca para o núcleo onde fosforila a CREB, que culmina na expressão de MITF e este, por sua vez, ativa a transcrição das enzimas tirosinase e TRPs.

Em relação à melanogênese, de acordo com a literatura, pode-se observar que os flavonoides possuem diferentes papéis na produção de melanina. A quercetina, por exemplo, um dos flavonoides mais comuns encontrados em plantas e frutas, inclusive presente na *P. incarnata* (Dhawan et al., 2004), tem duplo efeito na melanogênese estudada em células B16F10: quando estimuladas com  $\alpha$ -MSH, a inibem, e na ausência do hormônio, a estimulam, induzindo a expressão do gene da tirosinase; além disso, em concentrações relativamente baixas, a quercetina estimula a atividade de tirosinase e sua expressão em células B16F10, porém em concentrações mais elevadas, a quercetina reduz os níveis de tirosinase e de TRP (Yang et al., 2011; Nagata et al., 2004). Assim como a quercetina, na presença do  $\alpha$ -MSH, a luteolina e a taxifolina têm efeitos inibitórios na melanogênese em células B16F10 (An et al., 2008).

Alguns flavonoides estimulam a produção de melanina, podendo-se citar a phloridzina e a naringenina. A phloridizina, flavonoide glicosídico encontrado em plantas da família Rosaceae, estimula pronunciadamente a produção de melanina em células de melanoma B16F10 através da inibição da atividade de PKC (Shoji et al., 1997). Como descrito na introdução desse trabalho, se PKC- $\beta$  estimula a melanogênese na cascata DAG/PKC- $\beta$ , sua inativação deveria bloquear e não estimular a melanogênese. Porém, PKC- $\beta$  também pode interagir com a glicogênio sintase quinase 3 $\beta$  (GSK-3 $\beta$ ), fosforilando essa enzima na serina 9 e promovendo sua inativação. GSK-3 $\beta$  inativada não pode agir na regulação da melanogênese pelo aumento da ligação de MITF no promotor de tirosinase, ocorrendo assim inibição da produção de melanina. Nesse caso, a inibição de PKC- $\beta$  estimula a melanogênese ao prevenir inativação de GSK-3 $\beta$  (Khaled et al., 2002; Vara et al., 2004).

A naringenina é um flavonoide cítrico de ocorrência natural que também estimula a melanogênese através do aumento da expressão de tirosinase, TRP1, TRP2 e MITF, importantes para o desencadeamento da melanogênese (Ohguchi et al., 2006).

Assim como os flavonoides, as saponinas, dependendo da estrutura, podem inibir ou estimular a melanogênese. Saponinas foram isoladas de botões de flores de *Camellia japonica*, espécie cultivada no Japão, China e Taiwan. Dentre as saponinas triterpênicas que inibiram drasticamente a melanogênese sem efeitos citotóxicos estão as sasanquasaponinas I e II, que possuem um grupo acila na posição 22 (Nakamura et al., 2012).

A glicirrizina, saponina triterpenoide, é um dos principais constituintes da fração hidrofílica do extrato bruto de alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.) e sua ação na melanogênese, estudada por Jung e colaboradores (2001), demonstrou aumento da expressão e conteúdo da tirosinase. Além disso, aumentou também a expressão de TRP2. Outro estudo com a glicirrizina mostrou que a mesma induz a melanogênese elevando os níveis intracelulares de AMPc (Lee et al., 2005).

Além de seus efeitos na melanogênese, a glicirrizina, em estudo realizado por Afnan e colaboradores (2012), demonstrou efeito antioxidante ao sequestrar a produção de ERO, por fibroblastos humanos, induzida por UVB e ao inibir a ativação de NFκB. Isso levou à inibição de níveis de metaloproteinase-1 (MMP-1) prevenindo a degradação da matriz extracelular (colágeno 1 e ácido hialurônico) e apoptose celular devido ao efeito inibitório da caspase-3 induzida por UVB e assim, prevenindo a liberação de citocromo C (proteína associada à membrana interna da mitocôndria) por fibroblastos humanos.

Metaloproteinases de matriz (MMPs) são enzimas produzidas e liberadas por várias células como leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais, em resposta a citocinas como IL-1, TNF-α e TGF-α (Navarro et al., 2006). Como já descrito anteriormente, NFκB, induzido pela radiação UVB, controla a expressão de citocinas inflamatórias. Assim explica-se que sua inibição preveniu a liberação de MMPs pelo fibroblasto em estudo. Em relação às caspases, são proteases que têm importante papel no processo apoptótico. A caspase 3, quando ativada, é responsável pela clivagem proteolítica de várias proteínas (Makpol et al., 2012). Uma vez que a caspase 3 foi inibida pela glicirrizina, impediu liberação de citocromo C e apoptose celular.

Em relação à fotoproteção, um recente artigo publicado no site Diário da Saúde (<http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=protetor-solar-fotoativo-natural-rutina&id=7973>), abordou sobre o desenvolvimento de um fotoprotetor por pesquisadores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. Esse fotoprotetor oferece mais proteção por ter em sua composição a rutina, flavonoide já conhecido

por sua propriedade antioxidante e que também previne os danos da radiação ultravioleta. Os resultados obtidos pelos pesquisadores indicaram que o flavonoide não penetra o estrato córneo da epiderme, permanecendo na superfície da pele. Isto levou os pesquisadores a usar a rutina como adjuvante dos sistemas de protetores solares, sendo então denominados de protetores solares fotoativos. Ainda, segundo um dos autores da pesquisa, a utilização de substâncias de origem natural em produtos cosméticos é a tendência mundial.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletados 2 Kg e 2,82 Kg de partes aéreas de *P. alata* e *P. edulis*, respectivamente, em abril de 2011, cujos detalhes estão na Tabela 2. A droga vegetal de *P. actinia* foi cedida pela doutoranda Kely Cristina dos Santos, cuja coleta das partes aéreas foi autorizada em julho de 2010, obtida na Fazenda Experimental do Canguiri, UFPR. O extrato seco das partes aéreas de *P. incarnata* L. foi gentilmente cedido pela empresa Herbarium, produzido por Finzelberg GmbH & Co, KG, Alemanha.

<b>Material Botânico</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Local de Registro</b>	<b>Nº Registro</b>
<i>P. alata</i> Curtis	25°25'0"S de latitude 49°14'45"W de longitude	Museu Botânico Municipal	368302
<i>P. edulis</i> Sims	25°25'8"S de latitude 49°14'0"W de longitude	Museu Botânico Municipal	369790
<i>P. actinia</i> Hooker	25°23'30"S de latitude 49°07'30" W de longitude	Herbário Depto. Botânica UFPR	UCPB 30.831

Tabela 2. Local de Coleta e Número de Registro do Material Botânico.

### 4.2 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

Para a identificação microscópica das espécies, cortes transversais das folhas foram realizados pelo Laboratório de Botânica Estrutural, Departamento de Botânica, UFPR. Para o preparo de lâminas permanentes, o material coletado foi fixado em álcool 70%, ácido acético e formaldeído, na proporção 90:5:5 (FAA 70) por 48 horas, desidratado em série etanólica crescente, emblocado em historesina (Leica Historesin®) e seccionado em micrótomo rotativo Olympus CUT 4055. Os cortes de 7 µm de espessura foram submetidos à coloração com azul de toluidina e, em seguida, fotografados no laboratório de Ficologia do Departamento de Botânica da UFPR.

### 4.3 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL

Para a obtenção da droga vegetal, partes aéreas de cada espécie coletada foram estabilizadas por secagem em estufa à 45 °C e pulverizadas em moinho de facas. A

seguir, o pó obtido foi submetido à tamisação (tamis número 20) com abertura de malha 850  $\mu\text{m}$ .

#### 4.4 PREPARO DOS EXTRATOS FLUIDOS

Os extratos fluidos foram preparados por percolação, utilizando-se etanol 70% (v/v) como líquido extrator. Após maceração de 100 g da droga vegetal por um período de três dias em percolador, 80 mL de percolato foi recolhido e armazenado em geladeira; o processo de percolação foi mantido até total esgotamento da droga. Este segundo volume de percolato foi evaporado para 20 mL e unido aos 80 mL iniciais, com obtenção final de 100 mL de extrato fluido.

#### 4.5 DETERMINAÇÃO DO PESO SECO NOS EXTRATOS FLUIDOS

Para determinação do peso seco, 1 mL de cada extrato foi adicionado em cápsula previamente seca e pesada. Os extratos foram evaporados em banho-maria e aquecidos em estufa a 100  $^{\circ}\text{C}$  por 3 horas, como preconizado pela Farmacopéia Brasileira 5<sup>a</sup> edição (2010). As cápsulas foram, então, colocadas em dessecador até atingir a temperatura ambiente e pesadas em balança analítica. O peso seco de cada extrato foi obtido através da diferença entre o peso da cápsula contendo a amostra seca e o seu peso inicial. Para cada extrato, três determinações independentes foram realizadas e o resultado final está apresentado como a média  $\pm$  desvio padrão (DP).

#### 4.6 ESTIMATIVA DE POLIFENÓIS TOTAIS

A estimativa de polifenóis totais foi avaliada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu descrito por Lima e colaboradores (2009). Para tanto, a 400  $\mu\text{L}$  de água destilada e 160  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (Biotec) foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato vegetal. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em vortex e adicionada de 4 mL de carbonato de sódio a 10,6%. Após 3 minutos, obteve-se a leitura em 715 nm em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu. A estimativa de polifenóis totais foi obtida por meio de curva analítica de calibração utilizando-se quercetina (Sigma) como referência. O branco correspondeu à mistura de 560  $\mu\text{L}$  de água destilada, 100  $\mu\text{L}$  de cada extrato vegetal e 4 mL de carbonato de sódio a 10,6%. Os extratos foram diluídos na proporção 1:4. De acordo com o procedimento, foi utilizado um volume de 100  $\mu\text{L}$  de cada um dos extratos, o que corresponde a

100 mg do extrato, uma vez que os extratos fluidos possuem a concentração de 1 g/mL. A partir disso, expressou-se o resultado em miligrama por grama de extrato.

#### 4.7 ANÁLISE DE FLAVONOIDES

##### 4.7.1 Cromatografia em Camada Delgada

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos extratos foi realizada utilizando-se placas cromatográficas de Sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck) como fase estacionária, e acetato de etila:ácido fórmico:água (7:1:1) como fase móvel. Os extratos foram diluídos 1:100 em metanol a 50% e, dessa diluição, 5 aplicações de 10 µL de cada extrato foram feitas na base da placa, sendo que, entre uma aplicação e outra, esperou-se a evaporação do solvente. Após eluição, a placa foi revelada com reagente de NEU (Lancaster Synthesis), o qual consiste em solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 1% e solução etanólica de polietilenoglicol 4000 a 5%, seguida de aquecimento a 100 °C e detecta substâncias fenólicas pela intensificação da fluorescência.

##### 4.7.2 Teor de Flavonoides Totais

O doseamento de flavonoides totais (TFT) foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Cada amostra (0,4 g para o extrato seco e volume de extrato fluido correspondente a 0,4 g de resíduo seco) extraída com 20 mL de etanol a 50% (v/v) sob refluxo por 30 minutos foi resfriada à temperatura ambiente e filtrada com algodão. O resíduo do algodão foi re-extraído seguindo o mesmo procedimento. Ambos os extratos hidroetanólicos foram reunidos em balão volumétrico de 50 mL e o volume ajustado com etanol a 50% para a obtenção da solução-mãe. Uma alíquota de 0,8 mL da solução-mãe foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume ajustado com etanol 50%. (solução-branco). Uma segunda alíquota de 0,8 mL da solução-mãe foi transferida para outro balão volumétrico de 10 mL; a este balão foi adicionada uma alíquota de 0,8 mL de solução de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2% em etanol a 50% e o volume ajustado com etanol 50% (solução-amostra). Após 30 minutos da adição da solução de AlCl<sub>3</sub>, obteve-se a leitura em 397 nm. O TFT foi calculado como equivalentes em apigenina, em percentual (p/p), de acordo com a fórmula a seguir:

$$\text{TFT} = \frac{A \times \text{FD} \times 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \times m \times (100 - \text{PD})}$$

onde:

A = absorvância

FD = fator de diluição (625)

$E_{1\text{cm}}^{1\%}$  = absortividade específica (365,3)

M = massa (g)

PD = perda por dessecação

Para o doseamento de flavonoides totais no extrato seco de *P. incarnata*, usou-se as informações contidas no laudo emitido pela empresa Herbarium, cujo conteúdo incluía 20% de extrato puro, 40% de excipientes, 37% de maltodextrina e 3% de sílica coloidal anidra. Assim, somente 0,08 g de extrato estão presentes em 0,4 g de extrato seco (1:5). Portanto, como resultado final, multiplicou-se a média obtida de TFT pelo fator de diluição 5.

#### 4.7.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

O perfil de cada extrato foi avaliado qualitativamente, baseando-se na metodologia proposta pela Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010). Para tanto, as amostras foram diluídas 1:100 em metanol e filtradas em membrana de celulose regenerada (Schleider & Schuell) com poros de abertura 0,45 µm. As amostras foram injetadas individualmente e também co-injetadas com o flavonoide isovitexina, marcador do gênero *Passiflora*. Para tanto, um volume de 200 µL de solução de isovitexina padrão a 50 µg/mL foi adicionado em 800 µL de extrato diluído 1:100, tendo essa solução concentração de 2 µg/mL de isovitexina padrão. Para as amostras individuais, 200 µL de metanol foram adicionados em 800 µL de extrato 1:100. Para análise isolada da isovitexina padrão, um volume de 200 µL da solução de isovitexina a 50 µg/mL foi adicionado de 800 µL de metanol. As análises por CLAE dos extratos foram realizadas em equipamento ProStar Gradiente Varian, bomba Porstar 230, detector de arranjo de fotodiodos 335, nas seguintes condições: coluna Kromasil® 100- 5 µm C-18 (diâmetro de 250 x 4,6 mm), loop de 30 µL, sistema gradiente com fase móvel composta por solução aquosa de ácido acético 0,5% (v/v),

metanol e acetonitrila (Muller 2006; Tabela 3), fluxo de 1 mL/min; detecção em 340 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata, sendo a temperatura da coluna de 35 °C, tempo de corrida de cada análise de 30 minutos.

<b>TEMPO (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>	<b>C (%)</b>
1	75	15	10
20	62	20	15
25	55	25	20
30	75	15	10

Tabela 3. Sistema Gradiente. A. Solução Aquosa de Ácido Acético 0,5%. B. Metanol. C. Acetonitrila.

#### 4.8 CULTIVO CELULAR E CITOTOXICIDADE

Para determinação da toxicidade celular dos extratos de *Passiflora*, assim como seus efeitos sobre a atividade de tirosinase murina, foram utilizadas células de melanoma murino B16F10, gentilmente cedidas pelas Professoras Dra. Gláucia Regina Martinez, Departamento de Bioquímica – UFPR, e Dra Célia Regina Cavicchiolo Franco, Departamento de Biologia Celular - UFPR. A análise microscópica das células foi realizada em microscópio óptico invertido BIOVAL, modelo XDS-1B.

##### 4.8.1 Soluções

###### *Soluções Estoque de Extratos de Passiflora*

Soluções a 4% (40 mg/mL) em dimetilsulfóxido (DMSO) foram preparadas para cada extrato. Em seguida, cada uma dessas soluções foi diluída em meio RPMI 1640 ou tampão adequado na proporção 1:4 e centrifugadas a 800 g por 10 minutos para eliminar material particulado residual; o sobrenadante foi esterilizado por meio de filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro e aliqotado para armazenamento a menos 25 °C até uso.



#### *Solução de MTT*

Solução de brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio (MTT) foi preparada em PBS a 5 mg/mL e esterilizada por meio de filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro; alíquotas foram armazenadas a menos 25 °C até uso.

#### *Solução de L-tirosina (L-tyr)*

Solução de L-tirosina a 0,05 M foi preparada em tampão adequado e esterilizada por meio de filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro; alíquotas foram armazenadas a menos 25 °C até uso.

#### *Solução de hidroquinona (HQ)*

Solução de HQ 0,02 M foi preparada em tampão adequado e esterilizada por meio de filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro; alíquotas foram armazenadas a menos 25 °C até uso.

#### *Solução de ácido kójico (AK)*

Solução de AK 0,02 M foi preparada em tampão adequado e esterilizada por meio de filtração em membrana de acetato de celulose com 0,22 µm de poro; alíquotas foram armazenadas a menos 25 °C até uso.

#### *Tampão de lise celular (TL)*

Solução de lise celular foi preparada com 0,1 M Tris-HCl (J.T. Baker) pH 7,2 adicionado de 1% de Igepal (Sigma), 0,01% de dodecil sulfato de sódio e de 1 comprimido de coquetel de inibidores de protease (*Cocktail Tablet*, Santa Cruz) em um volume de 25 mL de solução. O tampão foi armazenado em alíquotas a menos 25 °C até uso.

#### *Solução de Azul de Coomassie (reagente de Bradford)*

Solução do corante Azul de Coomassie G250 foi preparada na concentração de 0,5 mg/mL. Para tanto, 50 mg do corante foram dissolvidos em 25 mL de metanol, e a solução foi adicionada de 50 mL de ácido fosfórico 85% e de quantidade suficiente de água ultrapura para 100 mL. A solução foi filtrada em filtro Whatmann n° 1 para frasco âmbar e armazenada em geladeira. Antes do uso, foi diluída 1:5 com água ultrapura.

#### 4.8.2 Manutenção da Linhagem B16F10

As células B16F10 foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 300 mg/L de penicilina G, 50 mg/L de sulfato de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, a 37 °C em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> (TPP, Suíça) contendo 10 mL de meio completo. A cada 3-4 dias, as células foram subcultivadas ( $5 \times 10^4$  células/mL) após liberação das células com PBS-EDTA 0,02%.

#### 4.8.3 Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi avaliada em todos os procedimentos usando-se o teste de exclusão com Azul de Trypan (Freshney, 2000). A suspensão de células foi diluída em solução a 0,4% de Azul de Trypan em PBS e observada em microscópio Olympus CH30. Em todos os experimentos, as células utilizadas apresentaram viabilidade >90%.

#### 4.8.4 Toxicidade Celular

Para os experimentos de toxicidade dos extratos, células B16F10 em crescimento exponencial foram semeadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^5$  células/ placa) e mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Quando apresentando confluência de ~80%, foram expostas a 0,01 a 1000 µg/mL de cada extrato. A toxicidade foi determinada pelo ensaio colorimétrico do MTT (Mosmann, 1983). Após 24 horas de exposição, as células foram tratadas por 3 horas a 37 °C com solução de MTT (15 µL/poço). Em seguida, o sobrenadante foi removido e 150 µL/poço de DMSO adicionado; após agitação a temperatura ambiente por 15 minutos, obteve-se a absorvância espectrofotométrica em 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos em % de células vivas em relação ao grupo controle (células sem tratamento), para o qual o valor de 100 % foi atribuído.

#### 4.8.5 Obtenção do Lisado Celular

Células B16F10 foram cultivadas em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> de área de base (TPP, Suíça) e, quando apresentando ~80% de confluência, o sobrenadante das culturas foi removido e a camada de células lavada 2 vezes com PBS gelado; em seguida, as células foram removidas usando-se 5 mL de solução de PBS-EDTA 0,02% e centrifugadas para se obter o botão celular (*pellet*). Ao *pellet* foram adicionados 200 µL de TL gelado. Após 30 minutos a menos 80 °C, nova etapa de centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm/8 °C foi realizada; o sobrenadante, doravante chamado

lisado celular, foi utilizado para o doseamento de proteínas totais e atividade de tirosinase.

#### 4.8.6 Doseamento de Proteínas no Lisado Celular

Adaptação do método de Bradford (1976) para microplacas foi utilizado para o doseamento de proteínas totais no lisado celular. Para tanto, 10 µL de lisado celular diluído 1:10 em água ultrapura foram adicionados de 200 µL de solução de Reagente de Bradford diluído 1:5 em microplaca de 96 poços. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, a leitura foi realizada em 570 nm. Os resultados foram expressos em micrograma de proteínas totais por microlitro de lisado celular (µg/µL) usando-se equações da reta derivadas de curvas de calibração obtidas com solução padrão de soroalbumina bovina.

#### 4.8.7 Determinação da Atividade de Tirosinase Purificada de *Agaricus bisporus*

A determinação da atividade de tirosinase de cogumelo purificada de *Agaricus bisporus* (Sigma), tratada neste trabalho apenas como tirosinase purificada, foi baseada na metodologia de Luo e colaboradores (2009) e realizada em placas de 96 poços sobre gelo, em um volume reacional final de 200 µL. Para tanto, extratos de *Passiflora* foram adicionados de tampão fosfato de potássio 0,1M pH 6,8 contendo 5 mM de L-DOPA como substrato para ação da tirosinase e de volume correspondente a 5 Unidades Internacionais (UI) da enzima. O AK (400 µM) foi utilizado como modulador positivo de inibição da atividade de tirosinase. Após incubação de brancos, amostras e controles a 37 °C por 1 hora, a formação de dopacromo foi estimada em 450 nm contra brancos da L-DOPA e de todas as amostras sem a adição da enzima, a fim de corrigir interferências. Os resultados foram apresentados como % de atividade de tirosinase (AT) em relação ao controle (L-DOPA), segundo a fórmula:  $AT = (A - A_B) \times 100 / (C - C_B)$  onde: A= absorvância da amostra; A<sub>B</sub>= absorvância da amostra sem enzima; C = absorvância do controle L-DOPA (sem amostras); C<sub>B</sub>= absorvância do controle L-DOPA sem tirosinase purificada.

#### 4.8.8 Determinação da Atividade de Tirosinase Murina *in vitro*

A determinação da atividade de tirosinase murina foi baseada na metodologia de Sarkar e colaboradores (2006) e realizada em placas de 96 poços sobre gelo em um volume reacional final de 200 µL. Assim, extratos de *Passiflora* foram adicionados de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 contendo 2,5 mM de L-DOPA como substrato

para ação da tirosinase e de volume correspondente a 200 µg de proteína do lisado celular obtido de células B16F10 como fonte de tirosinase. O ácido kójico (400 µM) e a hidroquinona (5 µM) foram utilizados como moduladores positivos de inibição da atividade de tirosinase. Após incubação de brancos, amostras e controles a 37 °C por 1 h, a formação de dopacromo foi estimada em 450 nm contra brancos da L-DOPA e de todas as amostras na ausência de lisado celular, os quais foram realizados a fim de corrigir interferências. Os resultados foram apresentados como % de atividade de tirosinase (AT) em relação ao controle (L-DOPA), segundo a fórmula:  $AT = (A - A_B) \times 100 / (C - C_B)$  onde: A= absorvância da amostra; A<sub>B</sub>= absorvância da amostra sem lisado celular; C = absorvância do controle L-DOPA (sem amostras); C<sub>B</sub>= absorvância do controle L-DOPA sem lisado celular.

#### 4.8.9 Perfil de Ação dos Extratos de *P. alata* e de *P. edulis* sobre a Tirosinase

Sabendo-se que o AK e a HQ são inibidores clássicos da atividade de tirosinase por diferentes mecanismos, essas substâncias foram utilizadas como parâmetros para comparar o perfil de ação dos extratos de *P. alata* e de *P. edulis*. Baseando-se na metodologia de Kong e colaboradores (2008), concentrações de 100 a 800 µM de AK foram utilizadas para traçar o perfil de ação dessa substância sobre a atividade de tirosinase. Da mesma forma, concentrações de HQ também foram escolhidas baseando-se na metodologia de Neeley e colaboradores (2009). Nesses experimentos, o substrato L-DOPA foi fixado na concentração de 5 mM. Após obtenção da melhor concentração inibitória de cada inibidor, a mesma foi fixada, e concentrações crescentes de L-DOPA foram testadas para confirmar os mecanismos de ação destes inibidores, os quais foram comparados com os obtidos para os extratos de *Passiflora*, onde concentrações crescentes foram testadas, fixando-se L-DOPA na concentração de 5 mM e, subsequentemente, fixando-se a melhor concentração inibitória de cada extrato, variando-se apenas concentrações de L-DOPA, sobre a atividade de tirosinase.

#### 4.8.10 Estudo do Mecanismo de Ação dos Extratos de *P. alata* e de *P. edulis*

Para sugerir o mecanismo de ação para os extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, cada um desses extratos e cada inibidor clássico (AK e HQ) foi associado com L-tirosina (L-tyr) e adicionado de tampão e concentração de L-DOPA adequados de acordo com o tipo de tirosinase em questão. A determinação da atividade de tirosinase foi realizada em placas de 96 poços sobre gelo em um volume reacional final de 200

$\mu\text{L}$ . O controle experimental foi considerado a L-tyr (500  $\mu\text{M}$ ) isoladamente. Após incubação de brancos, amostras e controle a 37 °C por 1 h, a formação de dopacromo foi estimada em 450 nm contra brancos da L-DOPA, L-tyr e de todas as amostras, na ausência de enzima ou de lisado celular, os quais foram realizados a fim de corrigir interferências. Os resultados foram apresentados como % de atividade de tirosinase (AT) em relação ao controle (L-tyr), segundo a fórmula:  $AT = (A - A_B) \times 100 / (C - C_B)$  onde: A= absorvância da amostra;  $A_B$ = absorvância da amostra sem tirosinase purificada/lisado celular; C = absorvância do controle L-tyr (sem amostras);  $C_B$ = absorvância do controle L-tyr sem tirosinase purificada/lisado celular.

#### 4.8.11 Efeito da Associação dos Extratos de *P. alata* e de *P. edulis* com Inibidores da Tirosinase

Com o intuito de verificar possível efeito dos extratos perante inibidores, usou-se HQ a 2,5  $\mu\text{M}$ , AK a 200  $\mu\text{M}$  e os extratos de *P. alata* e de *P. edulis* a 50  $\mu\text{g/mL}$ . Assim, cada um dos extratos de *Passiflora* foram associados com AK ou HQ e adicionados de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,4 contendo 2,5 mM de L-DOPA como substrato para ação da tirosinase e de volume correspondente a 200  $\mu\text{g}$  de proteína do lisado celular obtido de células B16F10. A L-DOPA foi utilizada como controle. Após incubação de brancos, amostras e controle a 37 °C por 1 h, a formação de dopacromo foi estimada em 450 nm contra brancos da L-DOPA e de todas as amostras, na ausência de lisado celular, os quais foram realizados a fim de corrigir interferências. Os resultados foram apresentados como % de atividade de tirosinase (AT) em relação ao controle (L-DOPA), segundo a fórmula:  $AT = (A - A_B) \times 100 / (C - C_B)$  onde: A= absorvância da amostra;  $A_B$ = absorvância da amostra sem lisado celular; C = absorvância do controle L-DOPA (sem amostras);  $C_B$ = absorvância do controle L-DOPA sem lisado celular.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  desvio padrão (DP) das repetições dos experimentos. Para análise estatística dos resultados, utilizou-se Análise de Variância (ANOVA), com execução do teste de Newman-Keuls através do Programa *GraphPad-Prism* 5.0. Valores de fragilidade menores que 5% ( $p < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significativos.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

*P. alata* Dryander, *P. quadrangularis* L., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. já foram bem caracterizadas macroscopicamente e microscopicamente por Freitas (1985). Na Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010) estão descritas as espécies *P. alata* Curtis e *P. edulis* Sims. A morfo-anatomia de *P. actinia* Hooker foi estudada por Kurtz e colaboradores (2003).

Através da análise microscópica das lâminas permanentes realizadas com folhas das espécies *P. alata*, *P. edulis* e *P. actinia*, foi possível observar características comuns a todas as espécies e, também, alguma particularidade que possibilita diferenciar uma espécie da outra, o que é importante para o controle de qualidade.

Todos os cortes histológicos realizados com as folhas *in natura* das espécies estudadas apresentaram epiderme uniseriada e mesófilo dorsiventral, sendo este constituído por uma camada de parênquima paliçádico e cerca de seis camadas de parênquima lacunoso. As folhas são hipoestomáticas, ou seja, os estômatos, na maioria anomocíticos, se encontram junto à face abaxial e em mesmo nível de inserção da epiderme. Cristais de oxalato de cálcio do tipo drusa foram observados, principalmente no parênquima lacunoso e também próximo aos feixes vasculares.

A *P. alata* (Figura 9) apresenta, na região da nervura principal, face adaxial pouco convexa e face abaxial com convexidade bastante angulosa. Tanto abaixo da epiderme da face adaxial como abaixo da epiderme da face abaxial, observou-se a presença de colênquima maciço com espessamento celulósico nos cantos, onde o parênquima clorofiliano se interrompe e encontra a nervura. O sistema vascular é formado por três feixes ovalados do tipo colateral que se dispõem em arranjo circular. A zona cambial é facilmente visualizada, separando o xilema do floema, este último voltado para a periferia.

Em contraste com a espécie anterior, as folhas de *P. edulis* (Figura 10) apresentam, na região da nervura principal, face adaxial com protuberância e face abaxial convexa. A epiderme na região da protuberância apresenta tricomas tectores unicelulares de parede lisa, que não podem ser visualizados em secção transversal. Sob ambas as epidermes, região de colênquima interrompe o parênquima clorofiliano. O sistema vascular é formado por cinco feixes ovalados do tipo colateral,

mais ou menos dispostos em arranjo circular. A zona cambial é facilmente visualizada e assemelha-se a espécie anterior.

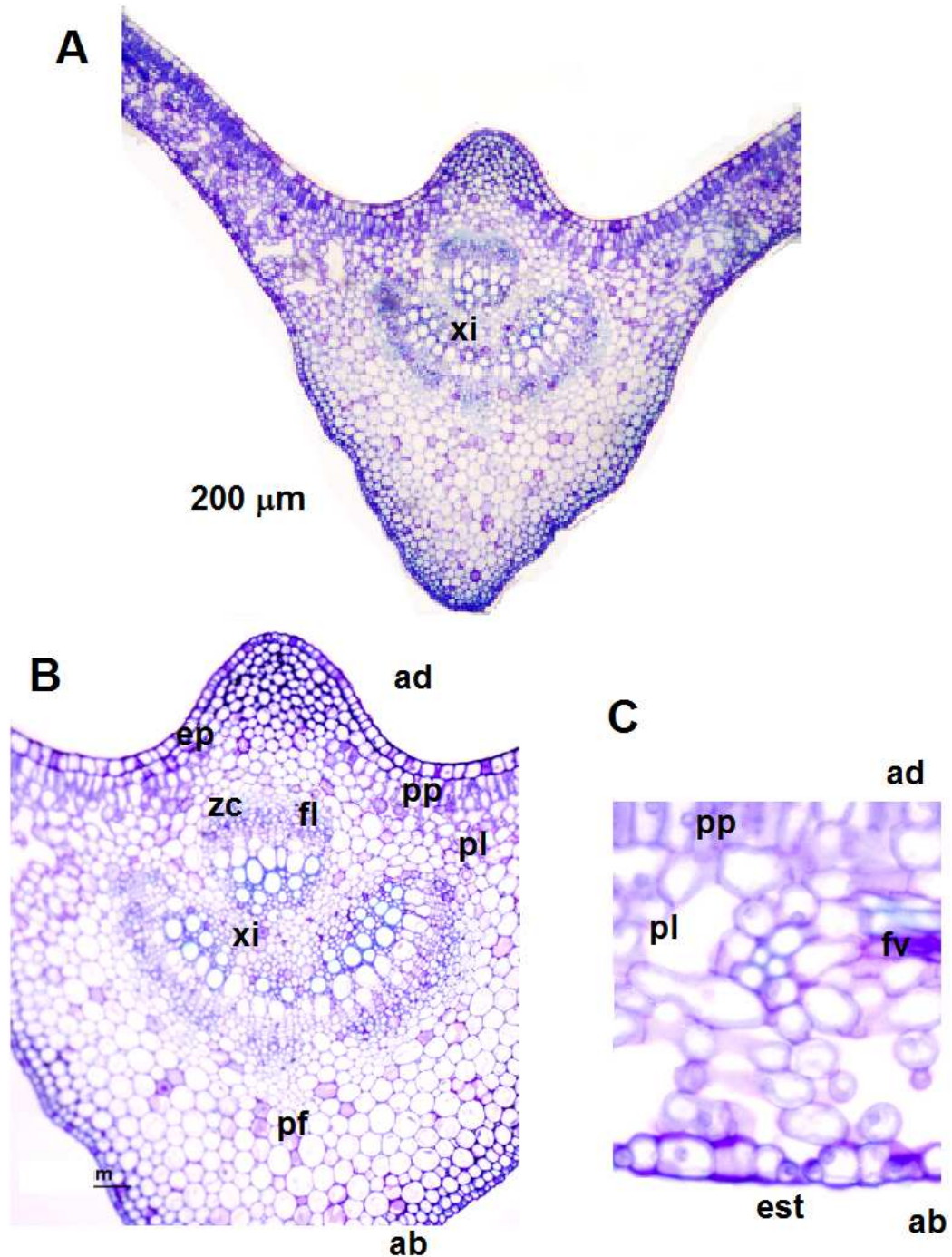


Figura 9. *Passiflora alata* – corte transversal da folha. A. Aspecto geral. B. Nervura principal em secção transversal. C. Face abaxial com estômato e feixe vascular secundário. Siglas: feixe vascular secundário. Siglas: ep - epiderme; ad - face adaxial; ab - face abaxial; pf: parênquima fundamental; pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; co - colênquima; xi - xilema; fl - floema; fv - feixe vascular; zc - zona cambial; est - estômato.



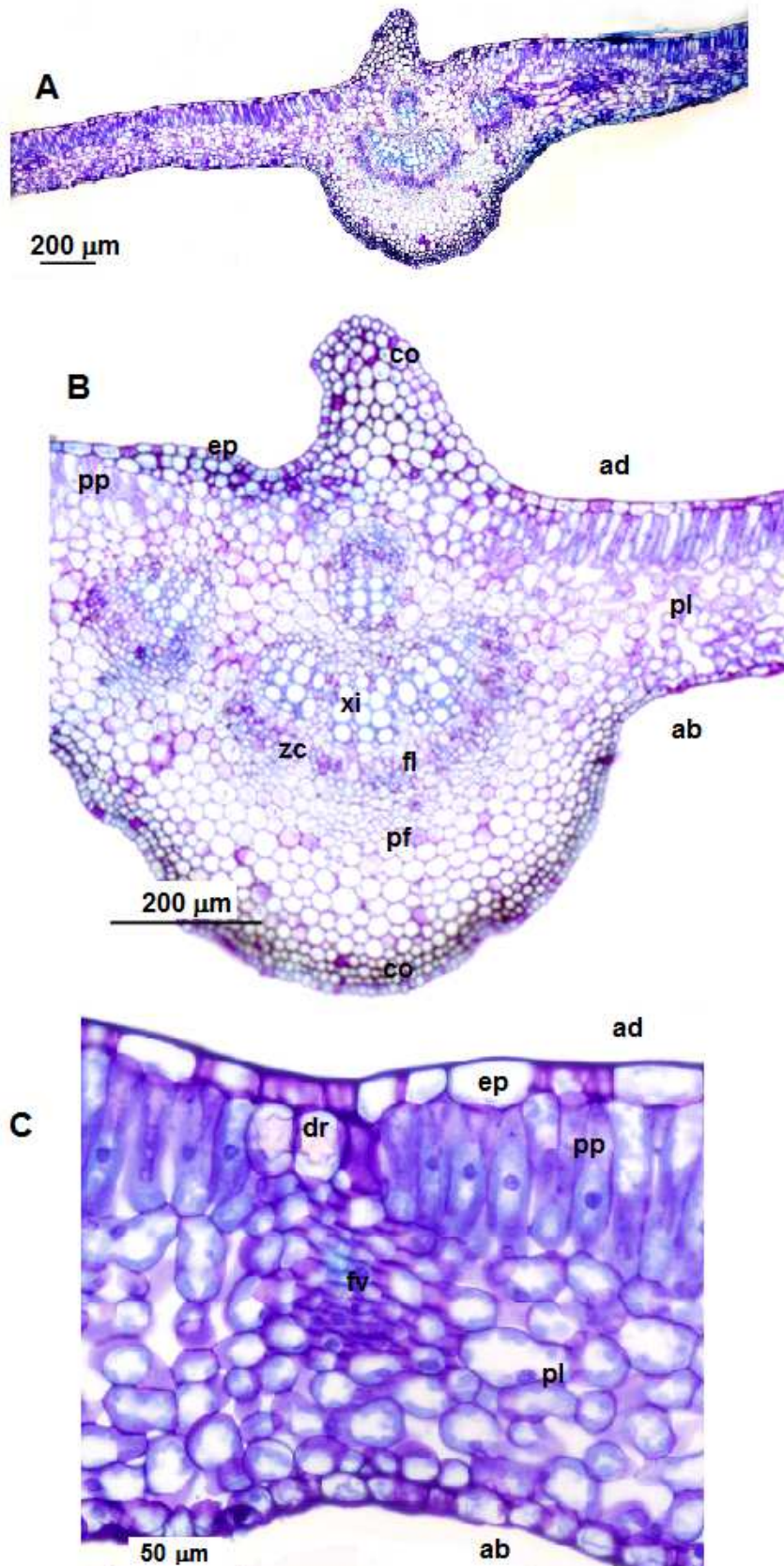


Figura 10. *Passiflora edulis* - corte transversal da folha. A. Aspecto geral. B. Nervura principal em secção transversal. C. Parênquima paliçádico com drusas. Siglas: ep - epiderme; ad - face adaxial; ab - face abaxial; pf - parênquima fundamental ;pp - parênquima paliçádico; pl - parênquima lacunoso; co - colênquima; xi - xilema; fl - floema; fv - feixe vascular; zc - zona cambial; dr - drusa.



A *P. actinia* apresenta, na região da nervura principal, formato biconvexo com maior proeminência junto à face abaxial (Figura 11), como descrito por Kurtz e colaboradores (2003). Sob ambas as epidermes, região de colênquima interrompe o parênquima clorofiliano. O sistema vascular é formado por feixes ovalados do tipo colateral que se dispõem segundo um anel. O floema está voltado para a periferia, podendo ser distinguidos os elementos floemáticos e a zona cambial.

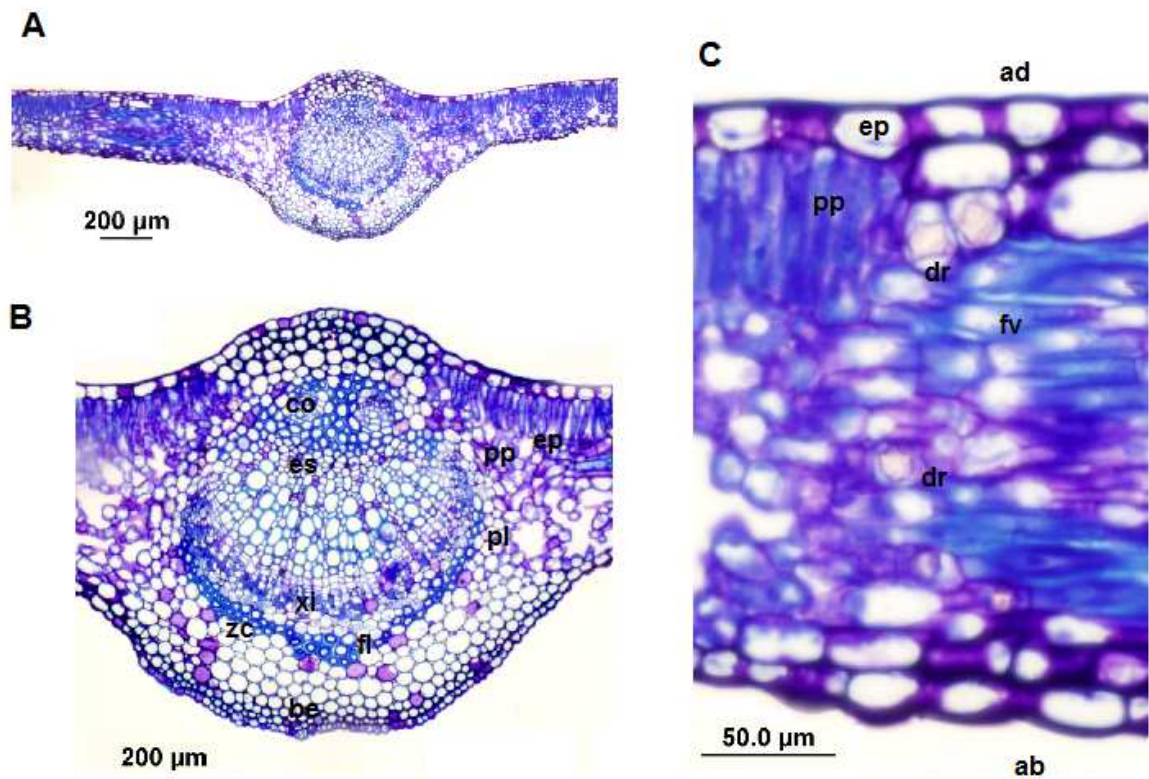


Figura 11. *Passiflora actinia* – corte transversal da folha. A. Aspecto geral. B. Nervura principal em secção transversal. C. Parênquima lacunoso com drusas; feixe vascular secundário. (ep: epiderme; ad: face adaxial; ab: face abaxial; pf: parênquima fundamental; pp: parênquima paliçádico; pl: parênquima lacunoso; co: colênquima; xi: xilema; fl: floema; fv: feixe vascular; zc: zona cambial; es: esclerênquima; be: bainha esclerenquimática; dr: drusa).

A morfo-anatomia dessas folhas se distingue daquela apresentada pela *P. incarnata*, pois segundo Freitas (1985), através da secção transversal da folha, o parênquima paliçádico possui uma camada de células de comprimento que alcança quase a metade do mesófilo. Ainda, o parênquima lacunoso é composto de quatro a seis camadas celulares.

Tanto a epiderme inferior quanto a superior apresentam pêlos tectores pluricelulares. Abaixo das duas epidermes está o colênquima, cujas células contêm espessamento nos ângulos. Os feixes vasculares estão dispostos em círculos. Drusas estão distribuídas por toda a região parenquimática.

## 5.2 DROGAS VEGETAIS E EXTRATOS

Dos dois quilogramas iniciais de partes aéreas de *P. alata* obteve-se, após estabilização por secagem em estufa à 45 °C e pulverização em moinho de facas, 20,75% de material seco. Da mesma forma, dos 2,82 Kg iniciais de partes aéreas de *P. edulis* obteve-se 18,35% de material seco. A droga vegetal de *P. actinia* foi cedida pela doutoranda Kely Cristina dos Santos e o extrato seco das partes aéreas de *P. incarnata* foi comercialmente adquirido da empresa Herbarium. O aspecto de todo esse material está ilustrado na Figura 12. A partir de cada uma das drogas vegetais, extratos fluidos foram obtidos por percolação. A partir dos extratos fluidos, foram obtidos os resíduos secos, com 204,4 mg/mL para o extrato de *P. alata*; 234,2 mg/mL para o de *P. edulis*, e 192,7 g/mL para o de *P. actinia*.

Figura 12. Drogas Vegetais e Extratos Secos obtidos das Folhas de Passiflora. *P. alata* (A), *P. edulis* (B) e *P. actinia* (C) em comparação com o extrato seco comercial de *P. incarnata* (D).



*alata* (A), *P. edulis* (B) e *P. actinia* (C) em comparação com o extrato seco comercial de *P. incarnata* (D).

## 5.3 ESTIMATIVA DE POLIFENÓIS TOTAIS

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura formada pelos ácidos fosfotungstíco e fosfomolibdídico, na qual o molibdênio se encontra no estado de oxidação VI (coloração amarela); entretanto, na presença de agentes redutores, como compostos fenólicos, por exemplo, forma-se o complexo molibdênio-tungstênio (cromóforo azul), no qual a média do estado de oxidação dos metais está

entre V e VI e que absorve fortemente em 760 nm (Oliveira et al., 2009; Funari & Ferro, 2006).

Assim, a estimativa de polifenóis foi calculada como equivalentes em quercetina sendo que, para cada experimento, foi realizada uma curva de calibração. Os resultados obtidos para cada extrato estão apresentados na Tabela 4.

<b>ESPÉCIES</b>	<b>EPT*</b>
<b><i>P. alata</i></b>	8,7±0,5 mg/g
<b><i>P. edulis</i></b>	9,6±0,6 mg/g
<b><i>P. actínia</i></b>	8,1±0,4 mg/g
<b><i>P. incarnata</i></b>	19,5±0,5 mg/g

Tabela 4. Estimativa de Polifenóis Totais\* calculada como Equivalentes em Quercetina de cada Extrato.

A estimativa de polifenóis totais calculada como equivalentes em quercetina para os extratos de *P. alata*, *P. edulis* e *P. actínia* foi muito próxima. Já o extrato de *P. incarnata* apresentou uma estimativa muito maior de polifenóis totais em relação aos outros extratos. De acordo com o laudo emitido pela empresa, o extrato seco de *P. incarnata* contém como principal excipiente o carboidrato maltodextrina e, de acordo com Zaia e colaboradores (1998), açúcares reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu, assim como o ácido úrico, guanina, xantina, melanina, 4-metilumbeliferona, mercaptanas, cisteína, além do tampão Tris-HCl presente na reação. Dessa forma, é possível que o resultado elevado de polifenóis totais encontrado para esse extrato não seja de fato referente a este grupo de substâncias e, sim, produto da reação de vários interferentes presentes.

## 5.4 ANÁLISE DE FLAVONOIDES

### 5.4.1 Cromatografia em Camada Delgada

A Figura 13 ilustra a placa de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) onde os extratos de *Passiflora* foram aplicados visando à identificação de flavonoides. A isovitexina (Figura 13, linha 1), usada como marcador padrão da espécie de acordo com a Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), foi nitidamente evidenciada pela

presença de intensa mancha amarela após revelação com o reagente de NEU. Da mesma forma, manchas amarelas e alaranjadas indicaram a presença de flavonoides em todas as espécies analisadas.

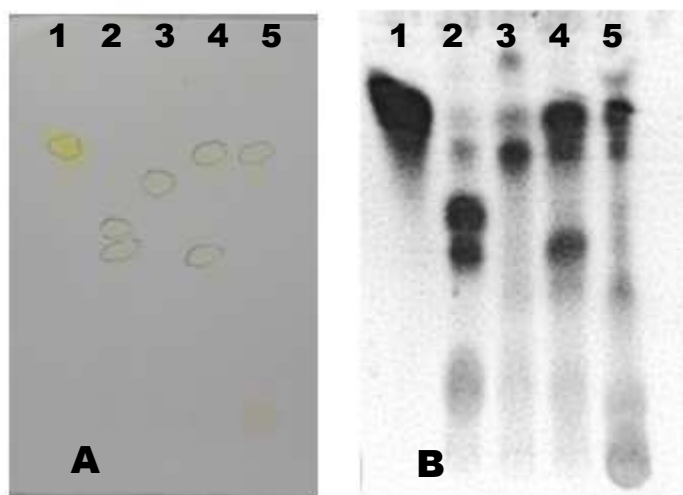


Figura 13. Identificação de Flavonoides em Extratos das Folhas de Espécies de *Passiflora* por cromatografia em camada delgada. (A) após revelação com reagente de NEU e (B) sob luz ultravioleta. Linhas: 1. Isovitexina. 2. *P. alata*; 3. *P. edulis*. 4. *P. actinia*. 5. *P. incarnata*; as manchas escuras representam os flavonoides.

#### 5.4.2 Teor de Flavonoides Totais

Os flavonoides contêm um sistema aromático altamente conjugado, exibindo absorção característica ou espectros de fluorescência. A quelação com vários metais causa mudanças espectrais que podem ser correlacionadas com a estrutura do flavonoide. O espectro de absorção dos flavonoides no UV/Visível na presença de  $Al^{3+}$  é usado para distinguir flavonoides que contêm grupo hidroxila livre na posição 3 ou 5 do anel. A presença de hidroxilas em ambas as posições 3' e 4' do anel B (grupo 3',4'-*o*-difenólico) também é um sítio de complexação com o íon  $Al^{3+}$ . (Deng & Berkel, 1998; Cornard & Merlin, 2001).

Os resultados de teores de flavonoides totais (TFT), calculado como equivalentes em apigenina, obtidos em relação a 0,4 g de resíduo seco de cada extrato fluido e em relação a 0,4 g de extrato seco estão apresentados na Tabela 5.

ESPÉCIES	Resíduo	TFT*
<i>P. alata</i>	0,2044 g/mL	3,5±0,2%
<i>P. edulis</i>	0,2342 g/mL	4,1±0,2%
<i>P. actínia</i>	0,1927 g/mL	3,8±0,1%
<i>P. incarnata</i>	-----	6,2±0,3%

Tabela 5. Teor de Flavonoides Totais\* em espécies de *Passiflora*, calculado como Equivalentes em Apigenina para cada Extrato.

Assim como observado para o teor de polifenóis totais, o teor de flavonoides calculado como equivalentes em apigenina para os extratos de *P. alata*, *P. edulis* e *P. actínia* foram muito próximos, em contraste com o extrato de *P. incarnata*, o qual apresentou um teor de 6,2±0,3%, bem mais elevado do que os outros extratos.

#### 5.4.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os extratos foram, em seguida, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLE) com a finalidade de observar se as espécies estudadas apresentavam a isovitexina, a substância marcadora da espécie, cujo cromatograma padrão está apresentado na Figura 14, eluída da coluna após 15,42 segundos.

Em seguida, os resultados dos perfis cromatográficos de todos os extratos obtidos individualmente e após co-injeção com isovitexina estão apresentados nas Figuras 15 a 18.

A justa sobreposição dos cromatogramas mostra que todas as espécies de *Passiflora* estudadas possuem, mesmo que em diferentes proporções, o marcador isovitexina. Além disso, o perfil cromatográfico obtido para cada extrato foi diferente não só na composição, como também na quantidade de flavonoides, mostrando diferenças entre as espécies. Em relação à porcentagem de isovitexina encontrada para cada extrato, os resultados foram os seguintes: 1,9 em % de isovitexina para o extrato de *P. alata*; 8,5 em % de isovitexina para o extrato de *P. edulis*; 18,7 em % de isovitexina para o extrato de *P. actínia* e, finalmente, 11,5 em % de isovitexina para o extrato de *P. incarnata*.

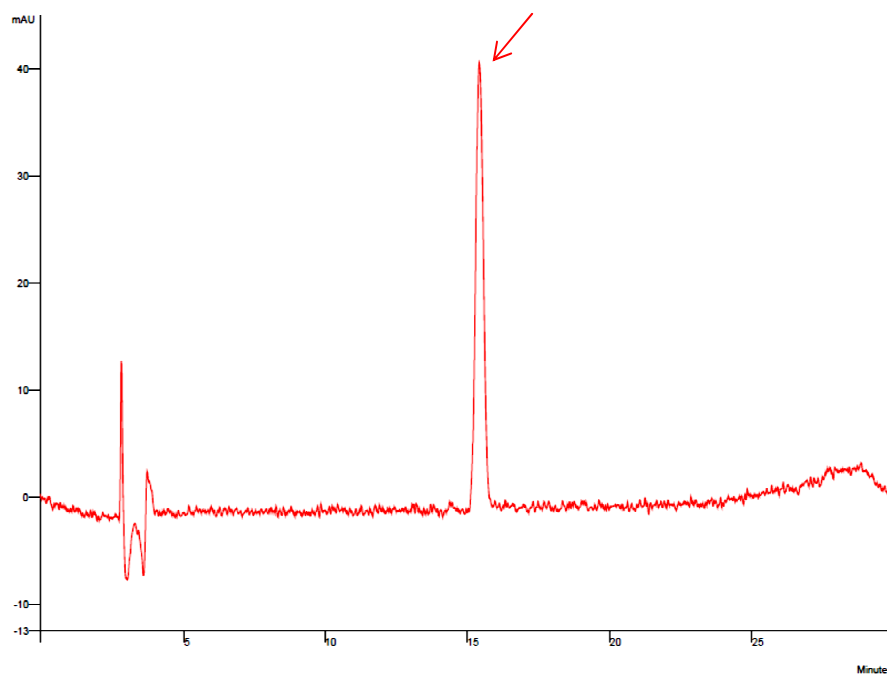


Figura 14. Cromatograma da Isovitexina padrão. Isovitexina comercial foi usada como padrão para certificação de espécies de *Passiflora*, cujo tempo de retenção (tR) foi de 15,42 segundos (seta).

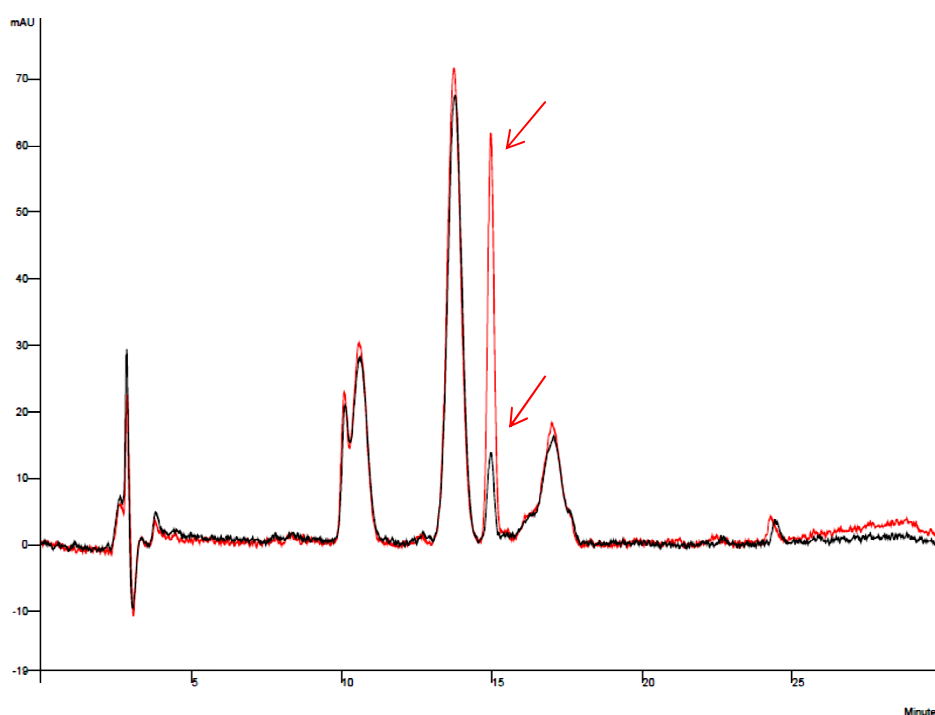


Figura 15. Cromatograma do extrato de *P. alata* (linha preta) e após co-injeção com Isovitexina (linha vermelha). As setas indicam os picos com os respectivos tempos de retenção (tR) de 14,96 e 14,97 observados para a isovitexina.

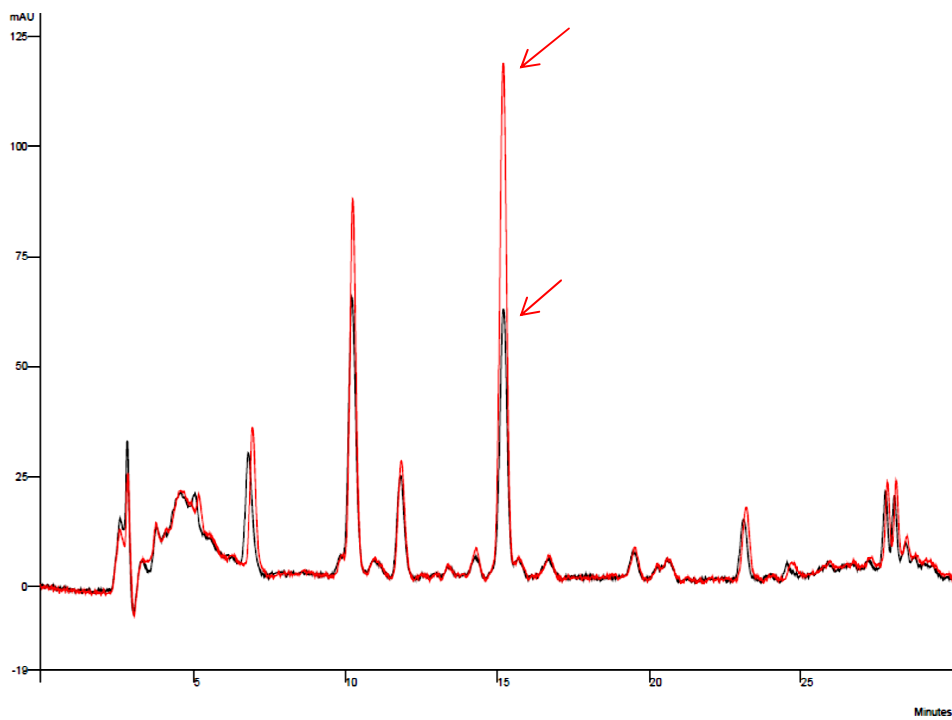


Figura 16. Cromatograma do extrato de *P. edulis* (linha preta) e após co-injeção com Isovitecina (linha vermelha). As setas indicam os picos com o tempo de retenção (tR) de 15,20 segundos observados em ambos para a isovitecina.

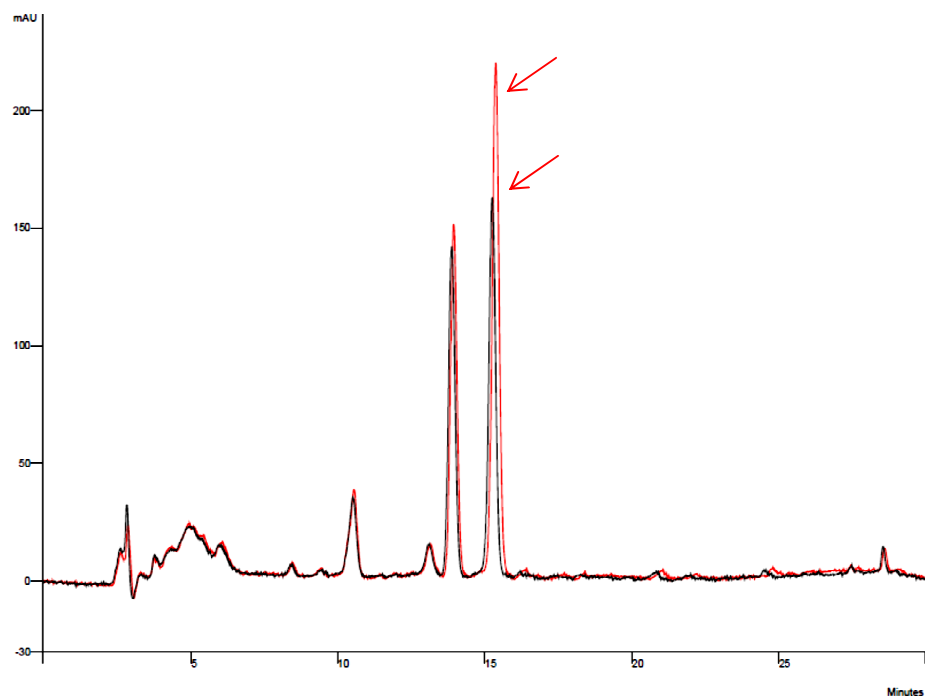


Figura 17. Cromatograma do extrato de *P. actinia* (linha preta) e após co-injeção com Isovitecina (linha vermelha). As setas indicam os picos com os respectivos tempos de retenção (tR) de 15,38 e 15,26 observados para a isovitecina.

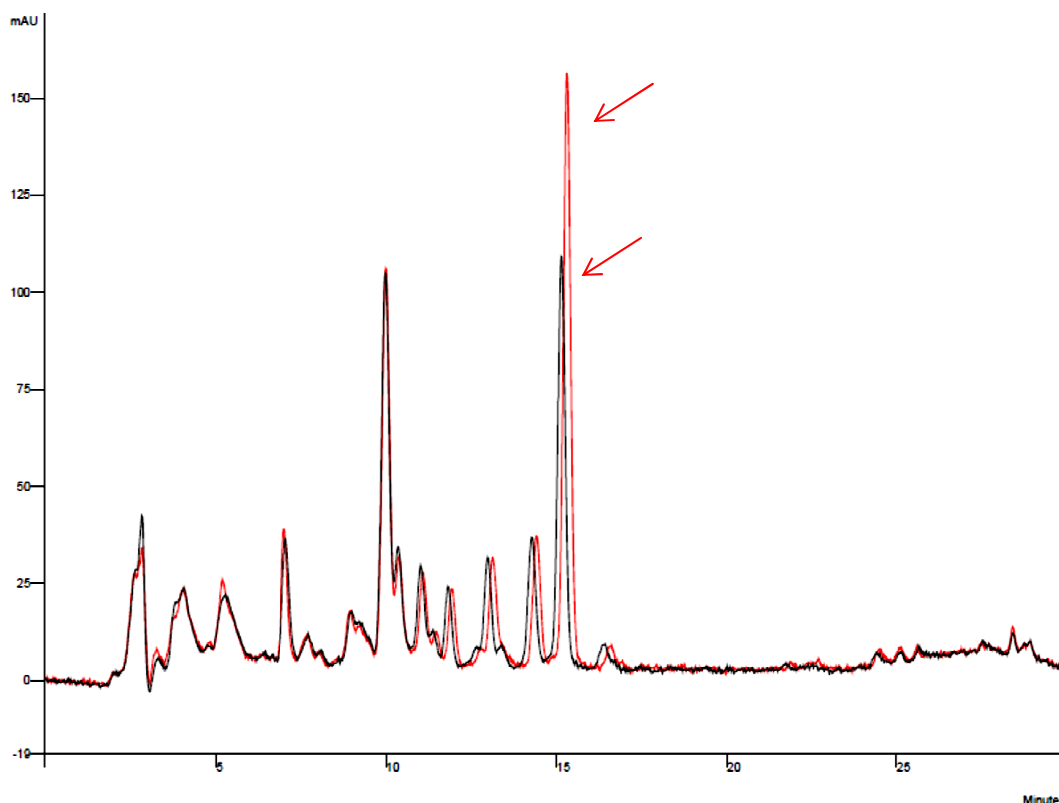


Figura 18. Cromatograma do extrato de *P. incarnata* (linha preta) e após co-injeção com Isovitexina (linha vermelha). As setas indicam os picos com os respectivos tempos de retenção (tR) de 15,30 e 15,15 observados para a isovitexina.

Com esses resultados foi possível certificarmos-nos de que, pela presença da isovitexina, o material botânico usado para preparar os extratos era de fato de espécies de *Passiflora*. Ainda, que a quantidade relativa de isovitexina obtida nos cromatogramas de cada extrato está de acordo com a intensidade de fluorescência das manchas obtidas na CCD.

### 5.5 TOXICIDADE DOS EXTRATOS DE *Passiflora*

A linhagem de melanoma murino B16F10 constitui-se por células aderentes, com formato fibroblastóide que se desenvolvem facilmente *in vitro*, aderindo-se à base do frasco de cultura após curto período de incubação; na Figura 19, seu aspecto fenotípico pode ser observado. Sendo altamente tumorigênica *in vivo*, cresce espontaneamente em camundongos, com grande habilidade de formar metástases (Nakamura et al., 2002; Zhao et al., 2001). Entretanto, tem sido amplamente utilizada para ensaios preliminares *in vitro* de melanogênese por espontaneamente produzirem melanina. Assim, utilizando-se dessa linhagem celular, os extratos fluidos de *Passiflora* foram submetidos ao ensaio do MTT.



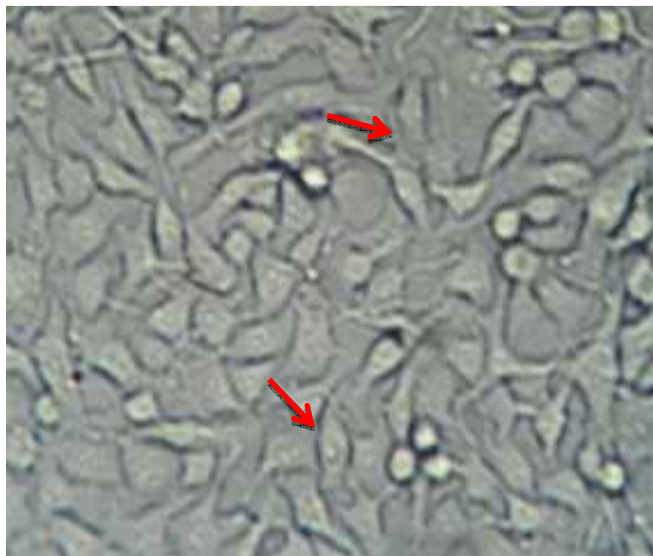


Figura 19. Células B16F10. Aspecto fenotípico de células B16F10 após 24 horas de adesão a base do frasco de cultura, quando adquirem aspecto esférico ou fusiforme, como indicado pelas setas.

Os ensaios com o MTT são usados para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células que, se viáveis, reduzem o composto, de coloração amarela, para o produto formazan, de coloração púrpura (Maciel et al., 2002; Mosmann, 1983). Dessa forma, a quantidade de produto formado relaciona-se diretamente com o número de células vivas e metabolicamente ativas. Assim, para os ensaios de toxicidade com o MTT, células B16F10 foram expostas a várias concentrações de cada extrato por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub>.

É preciso ressaltar que, anteriormente aos experimentos, diluições em DMSO foram realizadas com a finalidade de maximizar a incorporação desses em meio aquoso, uma vez que as metodologias experimentais escolhidas para avaliar as atividades biológicas dos extratos de plantas envolviam sistemas aquosos incompatíveis com a sua natureza. Soluções a 4% dos extratos de *Passiflora* em DMSO foram, então, preparadas e, subsequentemente, diluídas apropriadamente em meio de cultivo RPMI sem soro.

O extrato seco de *P. incarnata* foi solúvel em água; porém, optou-se por dissolvê-lo também em DMSO, o que favoreceria não só a semelhança entre as

diferentes amostras, como também a interpretação dos resultados. O aspecto resultante de cada solução após solubilização em DMSO pode ser visualizado na Figura 20.

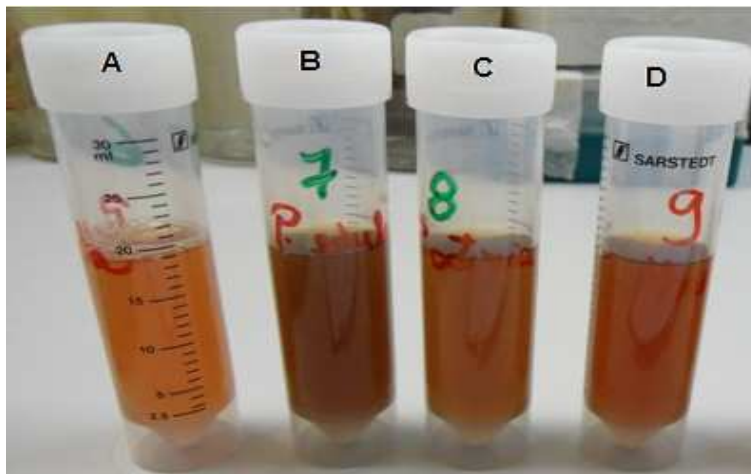


Figura 20. Aspecto das Soluções dos Extratos das Folhas de *Passiflora*. A. *P. alata*. B. *P. edulis*. C. *P. actinia*. D. *P. incarnata*.

Interessante notar que, após a solubilização dos extratos em meio de cultura, houve a formação de um anel de espuma na superfície da solução somente com a *P. alata* (Figura 20-A). Neste sentido, lembramos que, dentre as estudadas, esta espécie é a única que apresenta saponinas como metabólitos secundários majoritários (Reginatto et al., 2001).

Antes dos ensaios de toxicidade propriamente ditos, ensaios semelhantes com concentrações crescentes do solvente foram realizados para certificação de que o DMSO não causaria alguma interferência. Os resultados estão apresentados na Figura 21, onde se observa que, de fato, este solvente foi capaz de interferir significativamente a viabilidade celular somente a 300 mM, com  $54,0 \pm 0,3\%$  ( $p < 0,001$ ) de células viáveis recuperadas em relação ao controle. Esses resultados demonstraram que nesta concentração, a mesma que corresponde à concentração presente de DMSO quando 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extrato são ensaiados, o DMSO é tóxico para as células, tornando a concentração de 30 mM limitante para os ensaios subsequentes.

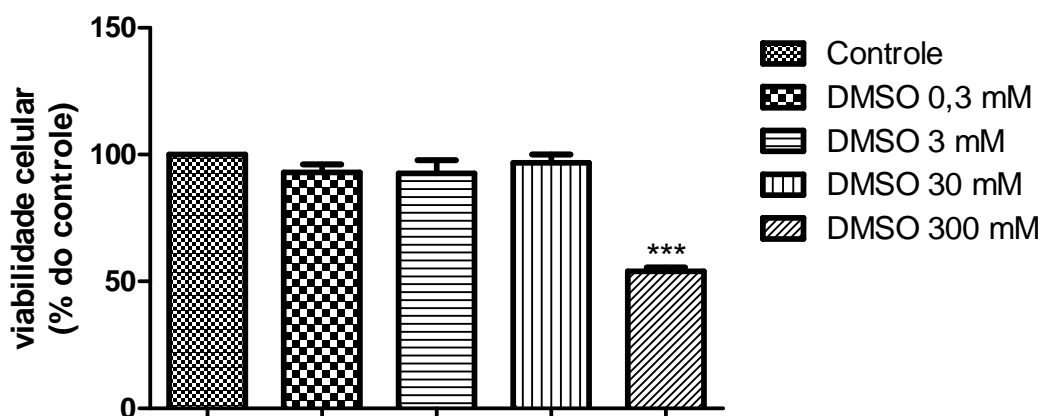
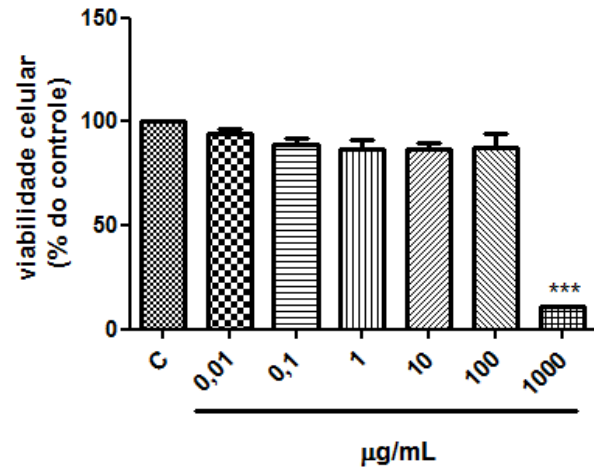


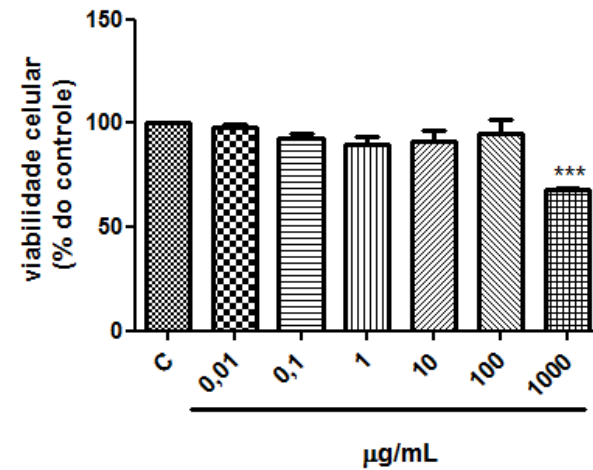
Figura 21. Efeitos do DMSO sobre Células B16F10. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de DMSO por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub> e tiveram a viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT. Cada barra representa a porcentagem média  $\pm$  DP de células metabolicamente ativas, em relação ao controle (C) normalizado em 100%, obtida de 6 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle (células sem a presença de DMSO).

Em seguida, os efeitos de concentrações crescentes dos extratos de *P. alata*, *P. edulis*, *P. actinia* e *P. incarnata* sobre a viabilidade de células B16F10 foram avaliados e os resultados estão apresentados na Figura 22.

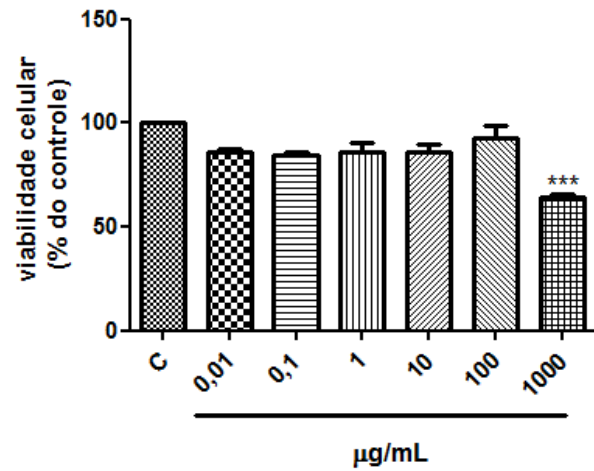
Observa-se que a 1000  $\mu\text{g/mL}$ , todos se mostraram tóxicos para as células, interferindo de forma significativa na viabilidade celular ( $p < 0,001$ ) e corroborando com os resultados anteriormente observados quando 300 mM de DMSO estavam presentes. Entretanto, dos extratos avaliados, o de *P. alata* foi o de efeito tóxico mais intenso, com apenas  $10,6 \pm 3,1\%$  de células recuperadas em relação ao grupo controle; para *P. edulis*, *P. actinia* e *P. incarnata*, esses valores foram muito próximos, com  $68,0 \pm 1,6$ ;  $64,6 \pm 1,4$  e  $67,5 \pm 1,2\%$ , respectivamente ( $p < 0,001$ ) de células viáveis.



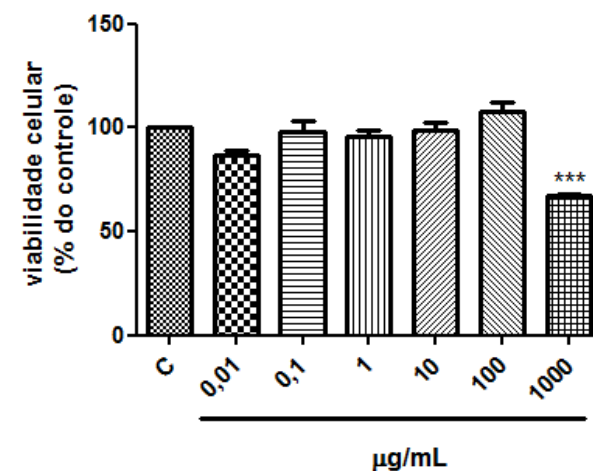
**A**



**B**



**C**



**D**

Figura 22. Efeitos dos Extratos de *Passiflora* sobre Células B16F10. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas dos extratos de *P. alata* (A), *P. edulis* (B), *P. actinia* (C) e *P. incarnata* (D) por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub> e tiveram a viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT. Cada barra representa a porcentagem média  $\pm$  DP de células metabolicamente ativas, em relação ao controle (C) normalizado em 100%, obtida de 6 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle (células não tratadas).

Importante ressaltar que em todos os experimentos em que as células foram submetidas aos extratos, antes da adição do MTT, as mesmas foram analisadas morfológicamente em microscópio óptico invertido.

Novamente é interessante observar que o efeito demonstrado pelo extrato de *P. alata* difere daquele obtido para as outras espécies; é possível que, por possuir saponinas em seu arsenal de metabólitos, o efeito de intensa redução de viabilidade celular a 1000 µg/mL possa ser resultante da ação dessas substâncias. De qualquer maneira, os ensaios de toxicidade com MTT realizados permitiram visualizar que os extratos a serem testados não interferem no metabolismo regular das células B16F10 e, assim, permitiram estabelecer extremos de concentrações a serem usadas nos ensaios subsequentes de avaliação de atividade de tirosinase.

## 5.6 EFEITOS DOS EXTRATOS DE *Passiflora* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE

A melanina é um dos pigmentos naturais mais disseminados, podendo ser encontrada em quase todos os organismos vivos, incluindo plantas superiores, fungos e bactérias. Apesar da aparente diversidade na natureza de substratos primários, estrutura química e propriedades dos pigmentos resultantes, há uma característica comum da melanogênese de plantas e de animais, que é a enzima tirosinase, a qual catalisa as principais etapas do processo (Prota, 1980).

A tirosinase é uma proteína codificada pelo *locus* TYR que está no cromossomo 11 em seres humanos, mas possui estrutura proteica altamente conservada entre as diferentes espécies e, também, homologia para outras proteínas a ela relacionadas, como a TRP-1 e a TRP-2. É sintetizada no retículo endoplasmático como uma proteína precursora de cadeia nascente, sendo processada no complexo de Golgi, onde é glicosilada. A glicosilação é importante para fazer a associação da molécula no melanossomo como também para a sua atividade (Slominski et al., 2004).

### *Tirosinase purificada obtida de Agaricus bisporus*

Após estudar a influência dos extratos de *Passiflora* quanto à toxicidade em linhagem B16F10, os mesmos foram testados com relação aos efeitos sobre a atividade de tirosinase. Para tanto, os extratos fluidos e AK (inibidor da tirosinase) foram adicionados de L-DOPA e de tirosinase purificada. A L-DOPA, quando convertida a dopacromo pela enzima, absorve luz UV em 450 nm. Os resultados

estão apresentados relativos à atividade de tirosinase do controle, onde não houve adição de AK, HQ ou de extratos, e para o qual se atribuiu o valor de 100%.

Com o intuito de verificar qual seria a concentração ideal em termos de atividade, expressa em Unidades Internacionais (UI), de tirosinase purificada a ser utilizada nos experimentos, estabeleceu-se a potência da enzima e a partir dela, fez-se uma triagem com cada um dos extratos de *Passiflora* na concentração de 100 µg/mL, fixando-se também a quantidade de L-DOPA (5 mM) usado como substrato de ação enzimática. Como inibidor da atividade de tirosinase, nesta série de experimentos, utilizou-se o AK a 400 µM.

Os efeitos obtidos estão na Figura 23, onde o AK inibiu significativamente, como esperado, a atividade de tirosinase em  $31,0 \pm 7,3\%$  ( $p < 0,001$ ). Em relação aos extratos, somente os de *P. alata* e de *P. edulis* inibiram significativamente a enzima em  $11,0 \pm 2,6\%$  e  $10,0 \pm 2,9\%$ , respectivamente.

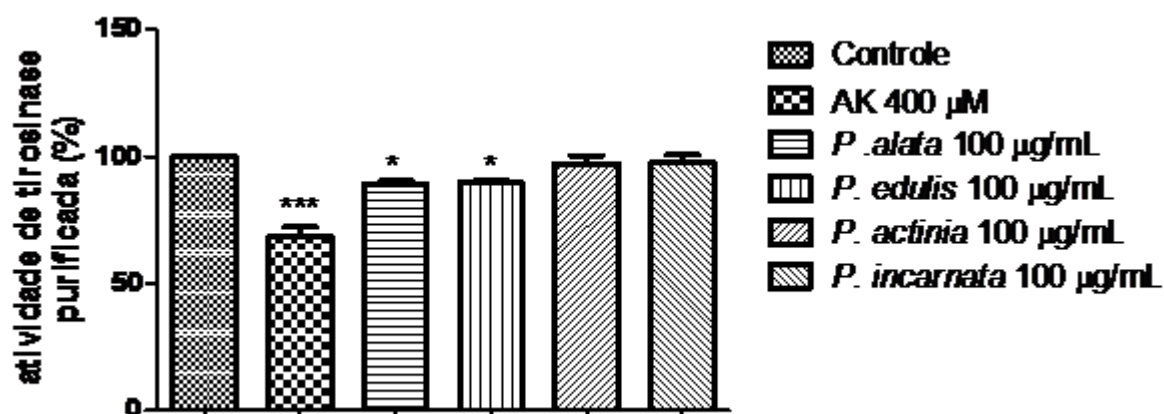


Figura 23. Efeitos dos Extratos de *Passiflora* sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. Solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI) e 5 mM de L-DOPA (controle) foi exposta ao ácido kójico (AK) ou aos extratos indicados de *Passiflora* a 100 µg/mL, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 4 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

A partir dessa série experimental, somente diferentes concentrações dos extratos de *P. alata* e de *P. edulis* que agiram sobre a atividade de tirosinase foram utilizadas. Em seguida, foram analisados os efeitos da HQ em ensaio semelhante e os resultados estão ilustrados na Figura 24.

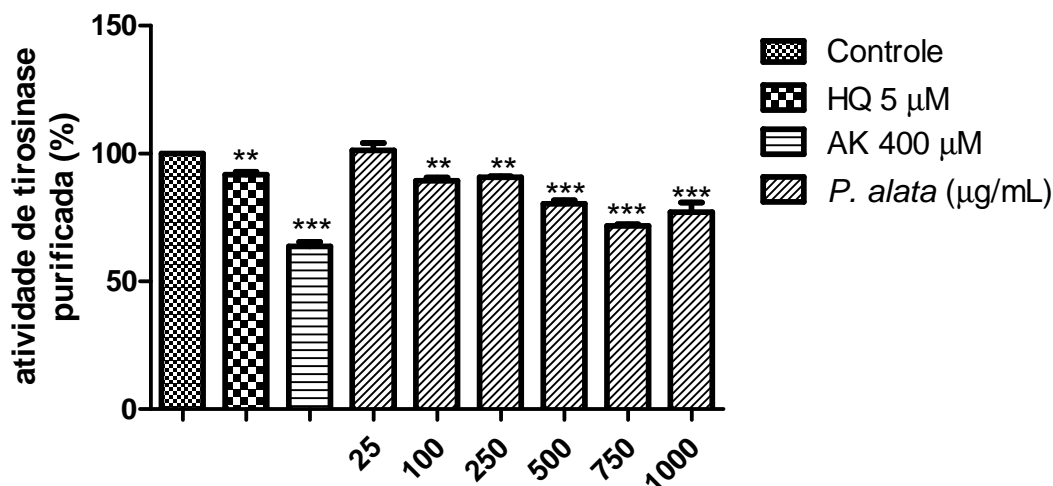


Figura 24. Efeitos do Extrato de *P. alata* sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. Solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI) e 5 mM de L-DOPA (controle) foi exposta à hidroquinona (HQ), ao ácido kójico (AK) ou ao extrato de *P. alata* nas concentrações indicadas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 4 experimentos independentes. \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Neste experimento, observou-se que, enquanto a HQ significativamente inibiu em  $8,0 \pm 2,1\%$  a atividade da enzima ( $p < 0,01$ ), o AK o fez de forma bem mais intensa, com  $36,0 \pm 3,0\%$  ( $p < 0,001$ ). Já o extrato de *P. alata*, em diferentes concentrações, inibiu a atividade tirosinásica a partir de 100 µg/mL, com inibição de  $11,0 \pm 2,1\%$ . Para as concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL a inibição foi de  $9,0 \pm 0,6$ ,  $20,0 \pm 2,3$ ,  $28,0 \pm 1,0$  e  $23,0 \pm 6,6\%$ , respectivamente. Com esses resultados, pôde-se verificar que um platô de inibição de atividade enzimática foi estabelecido a partir de 500 µg/mL.

Este mesmo experimento foi realizado com o extrato de *P. edulis*, e os resultados estão na Figura 25.

Nesse experimento, a HQ inibiu significativamente a atividade de tirosinase em  $12,0 \pm 5,6\%$  ( $p < 0,05$ ) e o AK em  $40,0 \pm 3,0\%$  ( $p < 0,001$ ). Já o perfil do extrato de *P. edulis* foi semelhante ao apresentado pelo de *P. alata*, onde, a partir de 100 µg/mL observou-se  $11,0 \pm 2,0\%$  ( $p < 0,05$ ) de inibição enzimática. Nas concentrações de 250, 500, 750 e 1000 µg/mL, a inibição observada foi de  $17,0 \pm 6,6$  ( $p < 0,01$ ),  $23,0 \pm 5,0$  ( $p < 0,001$ ),  $24,0 \pm 10,2$  ( $p < 0,001$ ) e  $27 \pm 4,6\%$  ( $p < 0,001$ ), respectivamente. A partir desses resultados, pôde-se verificar também que o aumento da concentração do extrato alcança um platô em torno de 500 µg/mL.

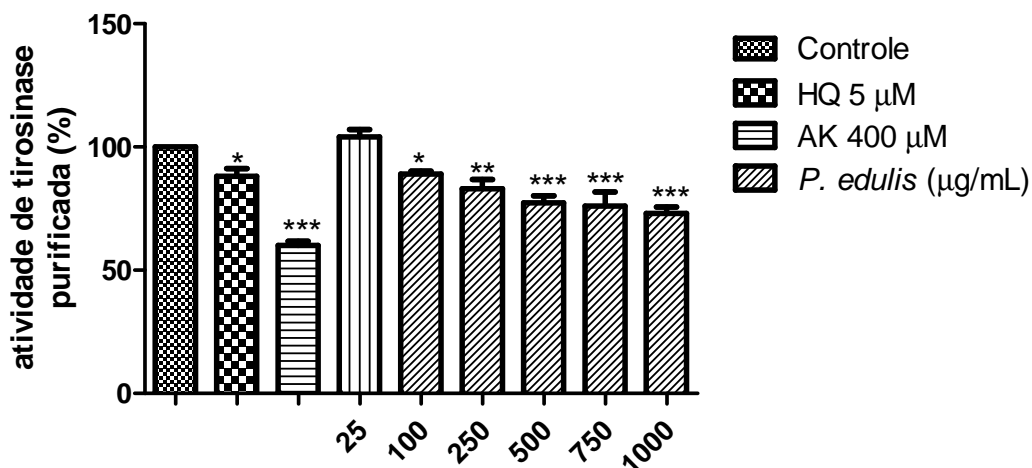


Figura 25. Efeitos do Extrato de *P. edulis* sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. Solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI) e 5 mM de L-DOPA (controle) foi exposta à hidroquinona (HQ), ao ácido kójico (AK) ou ao extrato de *P. edulis* nas concentrações indicadas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 4 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Uma vez que a concentração de 100 µg/mL demonstrou ser a maior concentração não tóxica de cada extrato para as células e que com a mesma obteve-se efeito inibitório significativo sobre a ação da tirosinase, optou-se por utilizar essa concentração nos experimentos subsequentes.

Conhecendo-se os mecanismos de ação do AK e da HQ, sugeriu-se um mecanismo de ação para *P. alata* e *P. edulis* através de experimentos com esses dois inibidores clássicos da tirosinase. Primeiramente, utilizou-se concentração fixa de L-DOPA e de tirosinase e variaram-se as concentrações de cada um dos inibidores. Após esse experimento, a concentração de cada inibidor foi fixada, variando-se a concentração do substrato.

Para o AK, nas concentrações entre 100 a 800 µM, quando fixadas as concentrações de enzima e de substrato, percebeu-se que, quanto maior a concentração, maior foi o efeito inibitório. A partir de então, escolheu-se a concentração de AK de 400 µM a ser fixada. Variando-se a concentração de L-DOPA (1,25; 5 e 8,75 mM), o AK a 400 µM alterou seu perfil inibitório, que aumentou de acordo com o aumento da concentração. Esses resultados podem ser visualizados nas Figuras 26 e 27, lembrando que esses experimentos foram realizados em duplicata, justificando assim a ausência do desvio padrão nos gráficos.



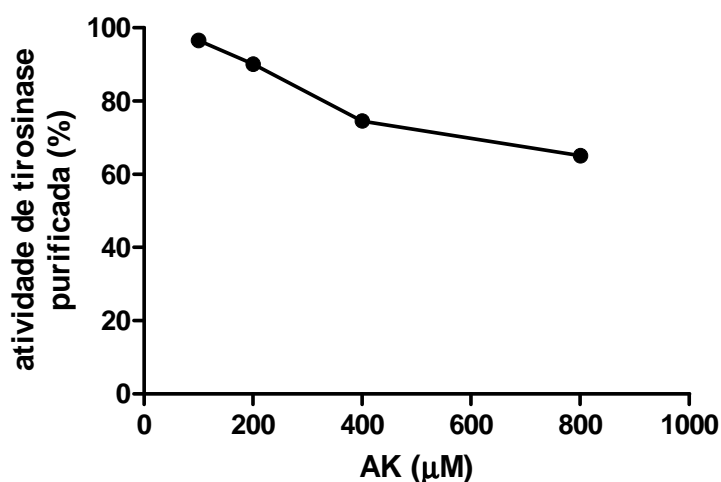


Figura 26. Perfil de Ação do Ácido Kójico sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (I). As concentrações indicadas de Ácido Kójico (AK) foram adicionadas a uma solução contendo tirosinase de cogumelo (5UI) e 5 mM de L-DOPA seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Experimento realizado em duplicatas independentes.

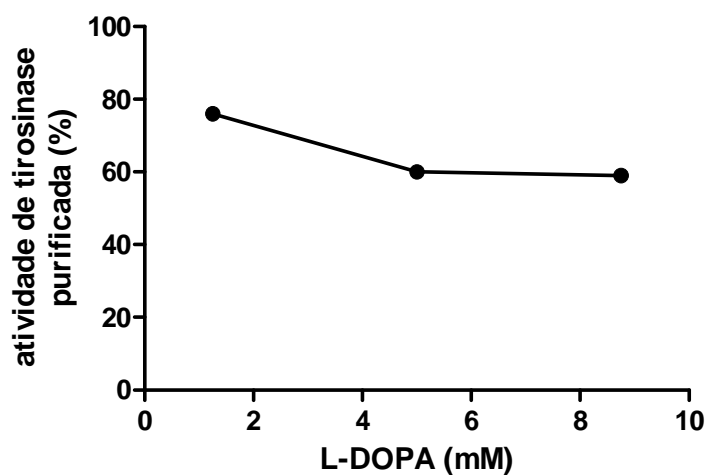


Figura 27. Perfil de Ação do Ácido Kójico sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (II). As concentrações indicadas de L-DOPA, foram adicionadas a uma solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI) e ácido kójico (400 μM) seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada ponto representa a atividade enzimática em relação ao controle (n=2).

Em ensaios semelhantes com a HQ, variando-se sua concentração entre 10 e 50  $\mu\text{M}$  e fixando-se as concentrações de enzima e de substrato, observou-se que, quanto maior sua concentração menor foi o efeito inibitório (Figura 28).

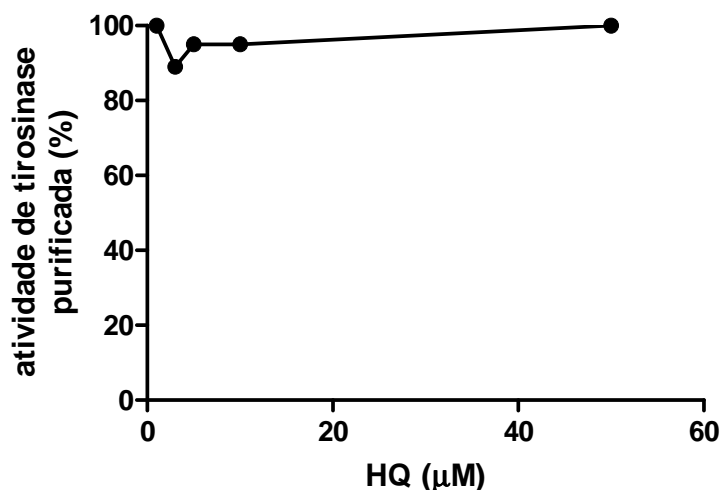


Figura 28. Perfil de Ação da Hidroquinona sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (I). As concentrações indicadas de hidroquinona (HQ) foram adicionadas a uma solução de tirosinase de cogumelo (5 UI) contendo 5 mM de L-DOPA seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada ponto representa a porcentagem de atividade enzimática relativa ao controle (n=2).

Nesse experimento confirmou-se que as concentrações inibitórias de HQ que deveriam ser utilizadas no sistema reacional estão entre 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , lembrando que esse experimento foi realizado em duplicata, justificando, portanto, a ausência do desvio padrão no gráfico.

No experimento em que concentrações crescentes de HQ foram utilizadas, fixando-se a de L-DOPA, inicialmente realizou-se um estudo piloto com concentrações entre 50 e 400  $\mu\text{M}$  de HQ. Neste estudo verificou-se que não houve inibição da atividade tirosinásica e, sim, estímulo da atividade da enzima, ou seja, os resultados ultrapassaram o valor de 100% (estudo experimental não demonstrado).

Assim, para atingir a concentração ideal de inibição, as concentrações foram sendo diminuídas. Como já demonstrado, o aumento da concentração de HQ (10 a 50  $\mu\text{M}$ ) não levou à inibição da atividade enzimática; porém, entre 2,5  $\mu\text{M}$  e 5  $\mu\text{M}$ , este efeito foi observado; conseqüentemente, a concentração de 5  $\mu\text{M}$  de HQ foi, então, escolhida para a realização do ensaio, cujos resultados estão demonstrados

na Figura 29, onde observa-se que, com o aumento da concentração de L-DOPA, não houve efeito inibitório da HQ.

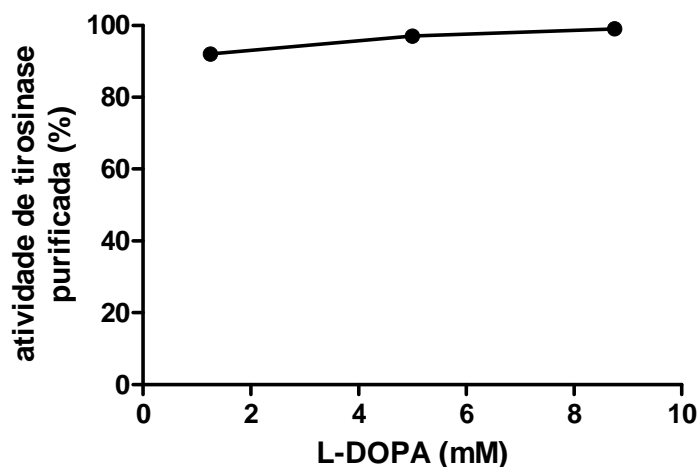


Figura 29. Perfil de Ação da Hidroquinona sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo (II). As concentrações indicadas de L-DOPA foram adicionadas a solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI) e 5mM de hidroquinona seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada ponto representa a atividade enzimática em relação ao controle (n=2).

Em relação aos extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, fixando-se concentração em 100 µg/mL, observou-se que, com o aumento da concentração de substrato (L-DOPA), não houve efeito, como pode ser observado nas Figuras 30 e 31, respectivamente.

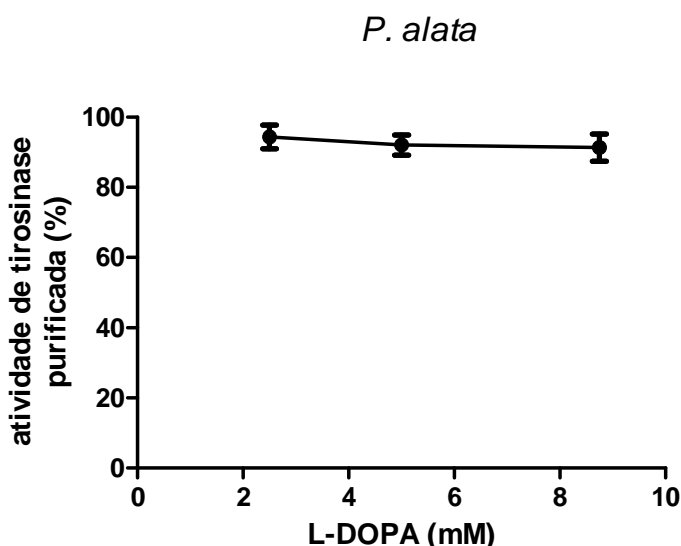


Figura 30. Perfil de Ação do Extrato de *Passiflora alata* sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. As concentrações indicadas de L-DOPA foram adicionadas a solução contendo 100 µg/mL de Extrato de *P. alata* e tirosinase de cogumelo (5UI) seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada ponto representa a atividade enzimática em percentagem (n=3).

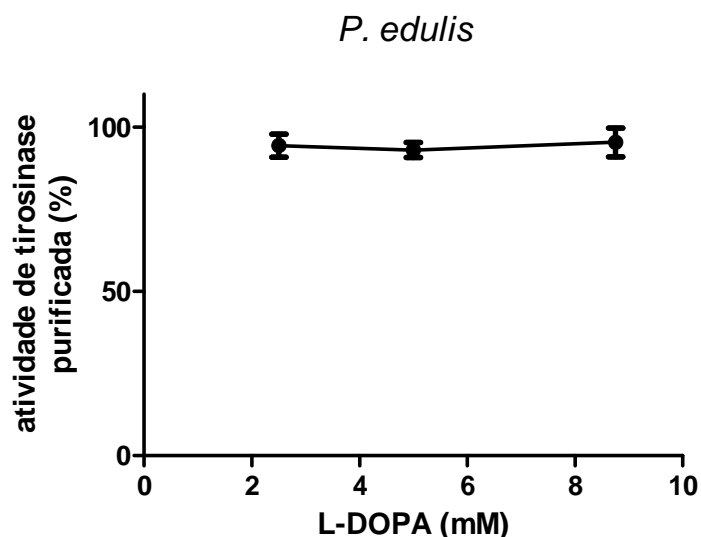


Figura 31. Perfil de Ação do Extrato de *Passiflora edulis* sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. As concentrações indicadas de L-DOPA foram adicionadas a solução contendo 100 µg/mL de Extrato de *P. edulis* e tirosinase de cogumelo (5 UI) seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada ponto representa a atividade enzimática em relação ao controle (n=3).

Para maior entendimento do mecanismo de ação dos extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, estes, assim como os inibidores HQ e AK, foram incubados juntamente com 500 µM de L-tirosina na presença de L-DOPA. Nesse caso, a incubação da enzima com o aminoácido foi considerada como controle experimental para o qual se atribuiu o valor de 100% de atividade. O resultado pode ser avaliado na Figura 32.

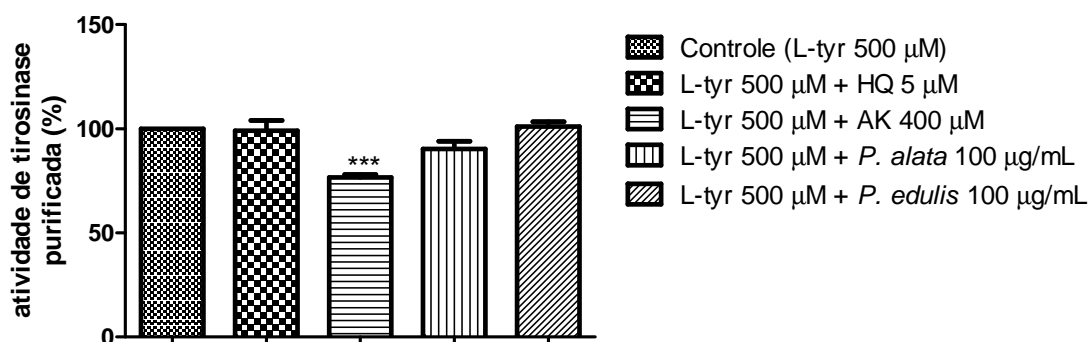


Figura 32. Perfil de Ação dos Extratos de *P. alata* e *P. edulis* na Presença de Tirosina sobre a Atividade de Tirosinase de Cogumelo. As concentrações indicadas de hidroquinona (HQ), ácido kójico (AK) ou dos extratos de *P. alata* e *P. edulis* foram adicionadas a uma solução contendo tirosinase de cogumelo (5 UI), L-tirosina (L-tyr) e L-DOPA (5 mM) seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 4 experimentos independentes. \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

Esses resultados demonstraram que, em relação ao controle, o AK, mesmo incubado na presença de L-tirosina, inibiu significativamente a ação da tirosinase em  $23,0 \pm 6,0\%$  ( $p < 0,001$ ), corroborando com seu efeito irreversível; em contraste, a HQ, teve seu efeito revertido e semelhante ao observado para com os extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, sugerindo para ambos um mecanismo de ação semelhante ao descrito para a hidroquinona.

#### *Tirosinase murina obtida de células B16F10*

Com a finalidade de se observar se os efeitos obtidos com a tirosinase de cogumelo se manteriam quando uma enzima proveniente de outra fonte fosse utilizada, propusemos os mesmos ensaios usando tirosinase murina, a qual foi obtida do lisado de células B16F10 cultivadas de rotina em nosso laboratório. Assim, a cada extrato, AK ou HQ, na presença de L-DOPA diluída em tampão adequado, foi adicionado lisado celular (LC) contendo tirosinase murina. Preliminarmente, concentrações de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$  de proteínas totais (PT) do LC foram, então, utilizadas, variando-se a concentração de L-DOPA (2,5 mM e 5 mM); as melhores absorvâncias obtidas resultaram da combinação de 200  $\mu\text{g/mL}$  de PT de LC e 2,5 mM de L-DOPA. Os resultados dos extratos sobre a atividade de tirosinase murina podem ser observados na Figura 33, onde a HQ e o AK inibiram significativamente a atividade enzimática em  $14,0 \pm 5,6\%$  e  $31,0 \pm 9,1\%$ , respectivamente, assim como os extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, cujos valores de inibição foram de  $21,0 \pm 5,5\%$  e  $16,0 \pm 4,6\%$ , respectivamente.

Em seguida, como realizado com a tirosinase purificada de cogumelo, os experimentos de incubação de cada um dos inibidores clássicos (HQ e AK) e de cada extrato (*P. alata* e *P. edulis*) com 500  $\mu\text{M}$  de L-tirosina sobre a atividade de tirosinase murina foram realizados para verificar se a ação inibitória desses extratos sobre a atividade de tirosinase murina também seria modulada quando na presença de L-tyr. Nesse caso, foi considerado como controle experimental o ensaio com L-tirosina, para o qual foi atribuído o valor de 100%. O resultado pode ser avaliado na Figura 34.

Nesse experimento pode-se observar que, na presença de L-tirosina, em relação ao controle, o AK manteve seu perfil clássico, inibindo a atividade de tirosinase em  $34,0 \pm 7,5\%$  como esperado; já a HQ teve o efeito inibitório revertido. Em relação aos extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, os mesmos também tiveram seus

efeitos de inibição de atividade de tirosinase revertidos, repetindo o perfil de ação demonstrado com a tirosinase de *Agaricus bisporus*.

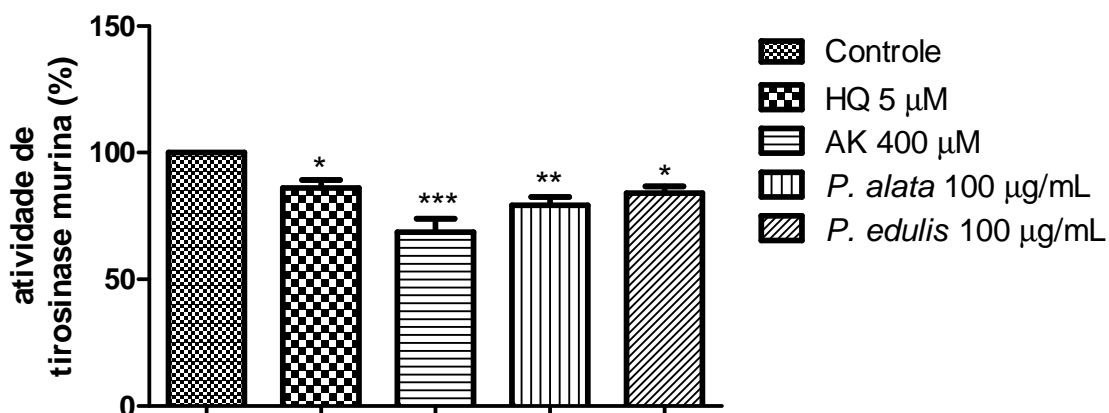


Figura 33. Efeitos dos Extratos de *P. alata* e de *P. edulis* sobre a Atividade de Tirosinase Murina. Solução de lisado celular contendo 200 µg/mL de proteínas totais e 2,5 mM de L-DOPA (controle) foi exposta à HQ (hidroquinona), ao ácido kójico (AK) ou aos extratos de *P. alata* e *P. edulis* nas concentrações indicadas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formado em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 4 experimentos independentes. \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

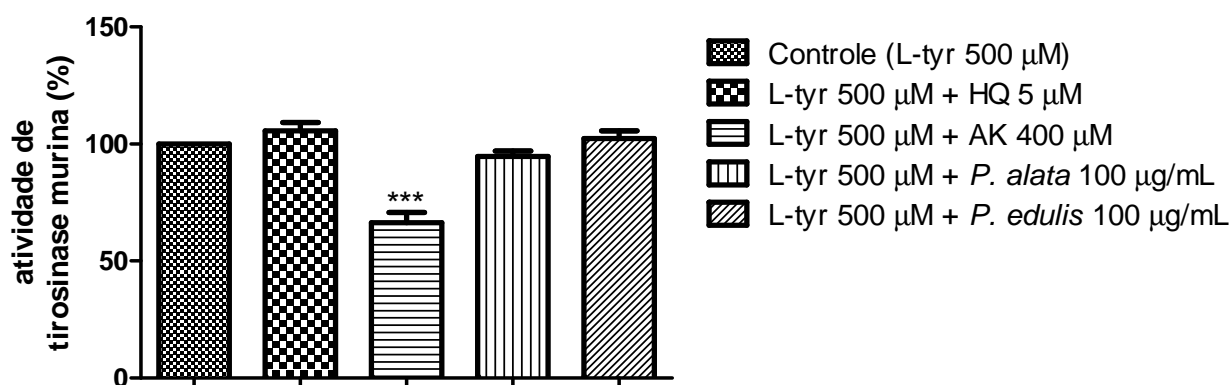


Figura 34. Efeitos dos Extratos de *P. alata* e de *P. edulis* sobre a Atividade de Tirosinase Murina na Presença de Tirosina. Solução contendo lisado celular obtido da linhagem B16F10 (200 µg/mL de proteínas totais) e 2,5 mM de L-DOPA foi adicionada de L-tirosina (L-tyr 500 µM) isoladamente (controle) ou incubada juntamente com hidroquinona (HQ) ou ácido kójico (AK) ou com cada um dos extratos nas concentrações indicadas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, de 4 experimentos independentes. \*\*\*p<0,001 em relação ao controle.

### *Efeito da Associação dos Extratos com os Inibidores Clássicos da Tirosinase*

De acordo com Oga e colaboradores (2002), quando duas drogas possuem mecanismos de ação semelhantes, seus efeitos são aditivos, como ocorre com o ácido acetilsalicílico e a dipirona, onde ambos inibem a ciclooxigenase atuando como analgésicos antitérmicos. Quando duas drogas possuem efeitos semelhantes, porém atuando por diferentes mecanismos, têm-se a somação; é o caso do ácido acetilsalicílico, que atua como analgésico por mecanismo periférico, e da codeína, que atua por ação central. Ainda existe o conceito de potencialização por sinergismo, onde o efeito resultante da associação de duas drogas é maior do que a soma ou adição de cada um, como é o caso da associação de um tranquilizante com a bebida alcoólica, que resulta em depressão do sistema nervoso central.

Agentes clareadores de pele são amplamente utilizados em preparações de uso dermatológico com a finalidade de tratar hiperpigmentações. A associação de dois ou mais despigmentantes poderá promover sinergismo, em que os efeitos combinados poderão ser maiores do que a soma dos efeitos individuais.

As preparações dermatológicas clareadoras de pele contendo associação de HQ e AK são muito comuns (Nicoletti et al., 2009) e possuem o sinergismo como efeito farmacológico; desse modo, nessas formulações as concentrações de HQ e de AK são minimizadas, reduzindo-se assim os efeitos colaterais, como por exemplo, a formulação de AK e HQ ambos a 2% (Deprez, 2009).

Com a finalidade de verificar o efeito associativo dos extratos com os inibidores clássicos da atividade de tirosinase, foi testada metade das concentrações utilizadas de cada uma destas substâncias, ou seja, HQ = 2,5  $\mu$ M; AK = 200  $\mu$ M; extratos de *P. alata* e de *P. edulis* = 50  $\mu$ g/mL. Esse experimento foi realizado somente com a tirosinase murina, uma vez que é a enzima mais semelhante à tirosinase humana do que aquela obtida de *Agaricus bisporus*. O controle experimental foi considerado o lisado celular (200  $\mu$ g/mL de proteínas totais) contendo somente 2,5 mM de L-DOPA. A Figura 35 mostra os resultados obtidos.

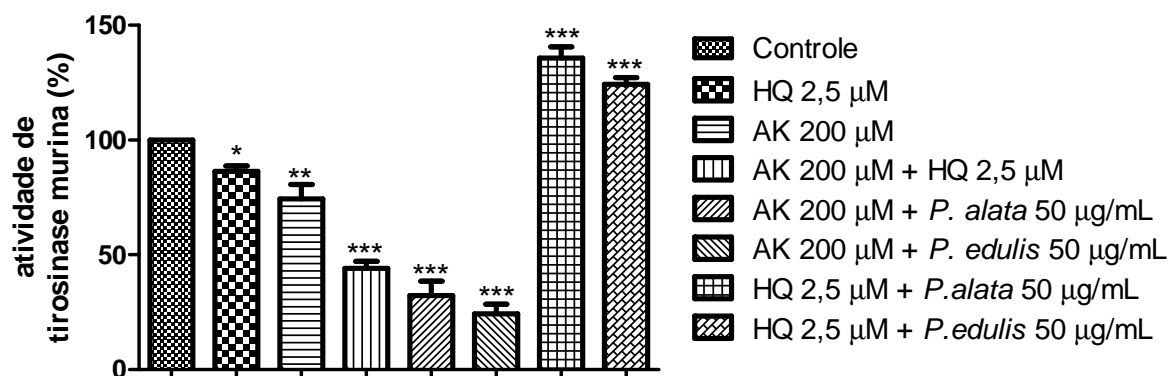


Figura 35. Efeitos dos Extratos de *P. alata* e *P. eduliss* quando associado ao Ácido Kójico (AK) ou à Hidroquinona (HQ). Solução de lisado celular (200 μg/mL de proteínas totais) contendo 2,5 mM de L-DOPA foi exposto às substâncias nas concentrações acima indicadas, seguida de incubação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, quantificou-se a formação de dopacromo em 450 nm. Cada barra representa a porcentagem média±DP de dopacromo formada em relação ao controle, normalizado em 100%, obtida de 3 experimentos independentes. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$  em relação ao controle.

Ou seja, em relação ao controle, tanto a HQ como o AK inibiram a atividade de tirosinase em  $14,0 \pm 4,0$  e  $26,0 \pm 11,0\%$ , respectivamente, repetindo as ações já descritas. Quando em associação, isto é, o AK associado à HQ, ao extrato de *P. alata* (50 μg/mL) ou ao de *P. edulis* (50 μg/mL), inibiram a atividade tirosinásica, respectivamente, em  $56,0 \pm 5,6$ ,  $68,0 \pm 10,7$  e  $76,0 \pm 7,1\%$ . O resultado da associação de cada extrato com o AK demonstrou ação enzimática inibitória significativamente maior ( $p < 0,001$ ) do que aquela obtida com a associação entre a HQ e o AK. Assim, pode-se sugerir que quando o AK está associado a HQ ou aos extratos de *P. alata* ou de *P. edulis* há efeito sinérgico.

Em franco contraste, no caso da associação desses mesmos extratos com a HQ, obteve-se estímulo enzimático significativo de  $36,0 \pm 8,5\%$  para o extrato de *P. alata*, e de  $24 \pm 4,9\%$  para o extrato de *P. edulis* ( $p < 0,001$ ). Assim, os resultados indicam que há efeito aditivo quando a HQ está associada ao extrato de *P. alata* ou ao de *P. edulis*. Esta reversão de efeito pode ser decorrente da presença de uma ou mais substâncias presentes nessas misturas que, de certa forma, disponibilizaram uma maior quantidade de HQ para que esta pudesse agir sobre a tirosinase, uma vez que, em nenhum ensaio realizado anteriormente, os extratos mostraram-se aptos a estimular a atividade de tirosinase.



Interessante ressaltar que os extratos de *P. actinia* e de *P. incarnata* não demonstraram algum tipo de efeito sobre a atividade de tirosinase, e isto pode ser resultante do fato de não possuírem as substâncias que atuam sobre a enzima, ou por possuírem essas substâncias em baixas concentrações em decorrência, por exemplo, da época em que se procedeu a coleta do material ou mesmo das condições do solo. Ainda, esses extratos foram os únicos a apresentarem elevada quantidade de isovitexina quando comparados aos de *P. alata* e de *P. edulis*, indicando não ser esta substância a responsável pelo efeito inibitório da atividade tirosinásica. O extrato de *P. incarnata* também registrou o maior teor de flavonoides totais em relação aos outros extratos e, mesmo assim, não demonstrou ação sobre a enzima.

Assim como os flavonoides, as saponinas, presentes no extrato de *P. alata*, dependendo da estrutura, podem inibir a melanogênese. Como já descrito na introdução deste trabalho, saponinas foram isoladas de botões de flores de *Camellia japonica*, espécie cultivada no Japão, China e Taiwan. Dentre as saponinas triterpênicas que inibiram drasticamente a melanogênese sem efeitos citotóxicos estão as sasanquasaponinas I e II, que possuem um grupo acila na posição 22 (Nakamura et al., 2012).

Assim, uma ou mais substâncias presentes nos extratos de *P. alata* e de *P. edulis* contribuíram para a inibição da atividade de tirosinase, provavelmente por possuírem estrutura(s) química(s) semelhante(s) à da hidroquinona (HQ).

## CONCLUSÕES

Neste trabalho, os efeitos dos extratos fluidos preparados das folhas de *P. alata*, *P. edulis* e *P. actinia* e do extrato seco das folhas de *P. incarnata* sobre a atividade de tirosinase foram avaliados com a finalidade de se observar seu potencial terapêutico para o tratamento de doenças de pele com desvios de pigmentação.

O teor de polifenóis totais, assim como o de compostos fenólicos desses extratos, à exceção do de *P. incarnata* que não pode ser analisado, foi muito semelhante e, de acordo com os resultados da CCD, todos mostraram ser ricos em flavonoides e, em particular, em isovitexina, molécula marcadora da espécie.

O ensaio do MTT foi útil em demonstrar que até 100 µg/mL, esses extratos não alteram a fisiologia de células B16F10 quando submetidas a um esquema rotineiro de manutenção.

Nos ensaios com tirosinase de cogumelo e murina, efeitos inibitórios significativos sobre a atividade foram observados somente para os extratos de *P. alata* e de *P. edulis*, cujo perfil foi semelhante ao apresentado pela hidroquinona, indicando um mecanismo de ação similar.

Como o interesse em se obter substâncias naturais que atuem em situações relacionadas a hiperpigmentação da pele é crescente, estudos que levem ao isolamento e identificação de uma ou mais substâncias responsáveis pelos efeitos aqui descritos devem ser estimulados, particularmente por se tratar de espécies que crescem de forma exuberante em terras tropicais.

## REFERÊNCIAS

- Abdel-Malek ZA, Kadekaro AL, Swope VB 2010. Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure. *Pigment Cell Melanoma Res* 23: 171-186.
- Afnan Q, Adil MD, Nissar-Ul A, Rafiq AR, Amir HF, Kaiser P, Gupta VK, Vishwakarma R, Tasduq SA 2012. Glycyrrhizic acid (GA), a triterpenoid saponin glycoside alleviates ultraviolet-B irradiation-induced photoaging in human dermal fibroblasts. *Phytomedicine* 19: 658-64.
- Agência de notícias da Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo - FAPESP (<http://agencia.fapesp.br/16134#.UEXidXEXRNo.email>).
- Alchorne MMA, Abreu MAMMA 2008. Dermatologia na pele negra. *An Bras Dermatol* 83: 7-20.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP 2006. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova* 29: 113-123.
- Bellet JS, Prose NS 2005. Vitiligo em crianças: uma revisão de classificação, hipóteses sobre patogênese e tratamento. *An Bras Dermatol* 80: 631-636.
- Bradford MM 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Brilliant MH 2001. The mouse p (pink-eyed dilution) and human P genes, oculocutaneous albinism type 2 (OCA2), and melanosomal pH. *Pigment Cell Res* 14: 86-93.
- Busca R, Ballotti R 2000. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res* 13: 60-69.
- Calança GN, Stets S, Nagata N 2011. Determinação simultânea de ácido kójico e hidroquinona por espectrofotometria visível e calibração multivariada. *Quim Nova* 34: 630-635.
- Carvalho CA, Giugliani R, Ashton-Prolla P, Cunha ME, Bakos L 2004. Melanoma hereditário: prevalência de fatores de risco em um grupo de pacientes no Sul do Brasil. *An Bras Dermatol* 79: 53-60.
- Castro PRC, Kluge RA 1997. *Ecofisiologia de fruteiras tropicais*. São Paulo: Nobel S.A, p.32.
- Cervi AC 1997. *Passifloraceæ do Brasil. Estudo do gênero Passiflora L., subgênero Passiflora*. Madrid: Fontqueria.
- Cestari TF, Pessato S, Correa GP 2007. Fototerapia – aplicações clínicas. *An Bras Dermatol* 82:7-21.
- Chakraborty AK, Funasaka Y, Komoto M, Ichihashi M 1998. Effect of arbutin on melanogenic proteins in human melanocytes. *Pigment Cell Res* 11:206-212.
- Chang TS 2009. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 10:2440-2475.
- Chauhan B, Yu C, Krantis A, Scott I, Arnason JT, Marles RJ, Foster BC 2007. *In vitro* activity of uva-ursi against cytochrome P450 isoenzymes and P-glycoprotein. *Can J Physiol Pharmacol* 85:1099-1107.
- Cornard JP, Merlin JC 2001. Structural and spectroscopic investigation of 5-hydroxyflavone and its complex with aluminium. *J Mo Struct* 569: 129-138.
- Costa RS, Mõro FV, Oliveira JC 2009. Influência do momento de coleta sobre a viabilidade de grão de pólen em maracujá-doce (*Passiflora alata* Curtis). *Rev Bras Frutic* 31: 956-961.

- Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE 2007. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell* 128:853-864.
- Deng H, Van Berkel GJ 1998. Electrospray Mass Spectrometry and UV/Visible Spectrophotometry Studies of Aluminum(III).Flavonoid Complexes. *J Mass Spectrom* 33:1080-1087.
- Deprez P 2009. *Peeling químico superficial, médio e profundo*. Rio Comprido: Revinter, p.338-339.
- Dhawan K, Dhawan S, Sharma A 2004. *Passiflora*: a review update. *J Ethnopharmacol* 94:1-23.
- Diário da Saúde 2012. Desenvolvimento de Fotoprotetor com o flavonóide rutina. <http://www.diariodasaude.com.br/news.php?article=protetor-solar-fotoativo-natural-rutina&id=7973> Acesso em Agosto 2012.
- Dimatos DC, Duarte FO, Machado RS, Vieira VJ, Vaconcellos ZAA, Neves RD 2009. Melanoma cutâneo no Brasil. *ACM Arq Catarin Med* 38: 14-19.
- Draelos ZD 2007. Skin lightening preparations and the hydroquinone controversy. *Dermatol Ther* 20:308-313.
- Embrapa 2010. *Passiflora edulis* Sims. <http://www.cpac.embrapa.br/publico/usuarios/uploads/imagensbag/> Acesso em Novembro 2011.
- Fernandes NC, Pina JC 2010. Leucodermia punctata após tratamento com Puvasol tópico. *An Bras Dermatol* 85: 571-572.
- Freitas PCD 1985. *Estudo farmacognóstico comparativo de espécies brasileiras do gênero Passiflora L.* São Paulo, 83p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo.
- Fumis TF, Sampaio AC 2007. Aspectos econômicos: mercado nacional e internacional. In Leonel S, Sampaio AC (orgs.) *Maracujá-doce: Aspectos técnicos e econômicos*. São Paulo: UNESP, p.25-29.
- Funari CS, Ferro VO 2006. Análise de Própolis. *Ciênc Tecnol Aliment* 26: 171-178.
- Gardoni BLK, Sato MEO, Pontarolo R, Noronha L, Reichert A, Serafini SZ 2004. Avaliação Clínica e Morfológica da Ação da Hidroquinona e do Ácido Fítico como Agentes Despigmmentantes. *Acta Farm. Bonaerense* 23: 297-303.
- Geiger H, Markham KR 1986. The C-glycosylflavone pattern of *Passiflora incarnata* L. *Z Naturforsch C* 41: 949-950.
- Gillbro JM, Marles LK, Hibberts NA, Schallreuter KU 2004. Autocrine catecholamine biosynthesis and the beta-adrenoceptor signal promote pigmentation in human epidermal melanocytes. *J Invest Dermatol* 123:346-353.
- Grimes PE 2009. Management of hyperpigmentation in darker racial ethnic groups. *Semin Cutan Med Surg* 28:77-85.
- Halder RM, Chappell JL 2009. Vitiligo update. *Semin Cutan Med Surg* 28: 86-92.
- Halder RM, Richards GM 2004. Topical agents used in the management of hyperpigmentation. *Skin Therapy Lett* 9:1-3.
- Hearing VJ, Jimenez M 1987. Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int J Biochem* 19:1141-1147.
- Hill HZ, Li W, Xin P, Mitchell DL 1997. Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res* 10: 158-161.
- Ichihashi M, Ueda M, Budiyanto A, Bito T, Oka M, Fukunaga M, Tsuru K, Horikawa T 2003. UV-induced skin damage. *Toxicology* 189:21-39.

- Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M 1992. Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *J Biol Chem* 267:24675-24680.
- Jung GD, Yang JY, Song ES, Park JW 2001. Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Exp Mol Med* 33: 131-135.
- Kandel ES, Hay N 1999. The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res* 253:210-229.
- Khaled M, Larribere L, Bille K, Aberdam E, Ortonne JP, Ballotti R, Bertolotto C 2002. Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$  Is Activated by cAMP and Plays an Active Role in the Regulation of Melanogenesis. *J Biol Chem* 277: 33690-33697.
- Kock A, Schwarz T, Kirnbauer R, Urbanski A, Perry P, Ansel JC, Luger TA 1990. Human keratinocytes are a source for tumor necrosis factor alpha: evidence for synthesis and release upon stimulation with endotoxin or ultraviolet light. *J Exp Med* 172:1609-1614.
- Kong YH, Jo YO, Cho CW, Son D, Park S, Rho J, Choi SY 2008. Inhibitory effects of cinnamic acid on melanin biosynthesis in skin. *Biol Pharm Bull* 31:946-8.
- Kupper TS, Chua AO, Flood P, McGuire J, Gubler U 1987. Interleukin 1 gene expression in cultured human keratinocytes is augmented by ultraviolet irradiation. *J Clin Invest* 80:430-436.
- Kurtz SMTF, Santos CAM, Duarte MR, Sato MEO 2003. Morfo-anatomia de folhas de maracujá: *Passiflora actinia* Hooker, Passifloraceae. *Acta Farm Bonaerense* 22: 105-112.
- Lee J, Jung E, Park J, Jung K, Park E, Kim J, Hong S, Park J, Park S, Lee S, Park D 2005. Glycyrrhizin induces melanogenesis by elevating a cAMP level in b16 melanoma cells. *J Invest Dermatol* 124: 405-11.
- Leonardi GR, Gaspar LR, Campos PMBGM 2002. Estudo da variação do pH da pele humana exposta à formulação cosmética acrescida ou não das vitaminas A, E ou de ceramida, por metodologia não invasiva. *An bras Dermatol* 77: 563-569.
- Lima ES, Oliveira NSM, Carvalho MJ 2009. Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos das folhas de Maracujá-do-Mato (*Passiflora nitida* H.B.K.). 61ª Reunião Anual da SBPC. Manaus, Brasil.
- Lima JLS, Furtado DA, Pereira JPG, Baracuchy JGV, Xavier HS 2006. *Plantas Mediciniais de uso comum no Nordeste do Brasil*. Campina Grande: Ludigraf.
- Lippens S, Hoste E, Vandenabeele P, Agostinis P, Declercq W 2009. Cell death in the skin. *Apoptosis* 14:549-569.
- Liu JJ, Fisher DE 2010. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:741-745.
- Lolli LF, Sato CM, Romanini CV, Villas-Boas LB, Santos CAM, Oliveira RMW 2007. Possible involvement of GABAA-benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 111:308-314
- Lorenzi H, Matos FJA 2008. *Plantas Mediciniais no Brasil Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarium de estudos da flora Ltda.
- Lu D, Willard D, Patel IR, Kadwell S, Overton L, Kost T, Luther M, Chen W, Woychik RP, Wilkison WO, Cone RD. 1994. Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* 371:799-802.
- Luo LH, Kim HJ, Nguyen DH, Lee HB, Lee NH, Kim EK 2009. Depigmentation of Melanocytes by (2Z,8Z)-Matricaria Acid Methyl Ester Isolated from *Erigeron breviscapus*. *Biol Pharm Bull* 32: 1091-1094.

- Maciel MAM, Pinto AC, Veiga Jr. VF, Grynberg NF, Echevarria A 2002. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim Nova* 25: 429-438.
- Makpol S, Abdul Rahim N, Hui CK, Ngah WZ 2012. Inhibition of mitochondrial cytochrome c release and suppression of caspases by gamma-tocotrienol prevent apoptosis and delay aging in stress-induced premature senescence of skin fibroblasts. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 1-13.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L 2004. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr* 79:727-747.
- Manna SK, Aggarwal BB 1998. Alpha-melanocyte-stimulating hormone inhibits the nuclear transcription factor NF-kappa B activation induced by various inflammatory agents. *J Immunol* 161:2873-2880.
- Mani I, Sharma V, Tamboli I, Raman G 2001. Interaction of melanin with proteins - the importance of an acidic intramelanosomal pH. *Pigment Cell Res* 14:170-179.
- Maresca V, Flori E, Briganti S, Camera E, Cario-Andre M, Taieb A, Picardo M 2006. UVA-induced modification of catalase charge properties in the epidermis is correlated with the skin phototype. *J Invest Dermatol* 126:182-190.
- Marques PRBO e Yamanaka H 2008. Biossensores basaeados no processo de inibição enzimática. *Quim. Nova* 31: 1791-1799.
- Marrot L, Meunier JR 2008. Skin DNA photodamage and its biological consequences. *J Am Acad Dermatol* 58:S139-148.
- Matsui Y, Sugiyama K, Kamei M, Takahashi T, Suzuki T, Katagata Y, Ito T 2010. Extract of Passion Fruit (*Passiflora edulis*) Seed Containing High Amounts of Piceatannol Inhibits Melanogenesis and Promotes Collagen Synthesis. *J Agric Food Chem* 58:11112–11118.
- Merad M, Ginhoux F, Collin M 2008. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol* 8: 935-947.
- Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA 2009. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol* 84: 623-635.
- Moraes MLL 1995. *Extração e análise de flavonóides em espécies brasileiras de Passiflora L.* São Carlos, 94p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63.
- Movafegh A, Alizadeh R, Hajimohamadi F, Esfehiani F, Nejatfar M 2008. Preoperative oral *Passiflora incarnata* reduces anxiety in ambulatory surgery patients: a double-blind, placebo-controlled study. *Anesth Analg* 106:1728-1732.
- Muller SD 2006. *Determinação de alcalóides e flavonóides através de CLAE e UV de extratos de Passiflora alata Curtis, Passifloraceae-Maracujá-Doce.* Itajaí, 32p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Vale do Itajaí.
- Murakami M, Matsuzaki F, Funaba M 2009. Regulation of melanin synthesis by the TGF-beta family in B16 melanoma cells. *Mol Biol Rep* 36:1247-1250.
- Nagata H, Takekoshi S, Takeyama R, Homma T, Yoshiyuki Osamura R 2004. Quercetin enhances melanogenesis by increasing the activity and synthesis of tyrosinase in human melanoma cells and in normal human melanocytes. *Pigment Cell Res* 17:66-73
- Nakamura, K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y, Kagota S, Shinozuka K, Kunitomo M 2002. Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci* 70: 791-798.

- Nakamura S, Fujimoto K, Nakashima S, Matsumoto T, Miura T, Uno K, Matsuda H, Yoshikawa M 2012. Medicinal Flowers. XXXVI.<sup>1)</sup> Acylated Oleanane-Type Triterpene Saponins with Inhibitory Effects on Melanogenesis from the Flower Buds of Chinese *Camellia japonica*. *Chem Pharm Bull* 60: 752–758.
- Navarro VP, Nelson-Filho P, Silva LAB, Freitas AC 2006. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. *Rev Odontol UNESP* 35: 233-238.
- Neeley E, Fritch G, Fuller A, Wolfe J, Wright J, Flurkey W 2009. Variations in IC(50) Values with purity of mushroom tyrosinase. *Int J Mol Sci* 10: 3811-3823.
- Nicoletti MA, Costa EP, Cosme KZ 2009. Alteração de coloração de formulações contendo hidroquinona em presença de estabilizante, como parâmetro indicativo de instabilidade em emulsões. *Rev Saúde* 3: 16-22.
- Nordlund JJ 1992. The pigmentary system and inflammation. *Pigment Cell Res* 5:362-365.
- Norval M, Lucas RM, Cullen AP, Gruijl FR, Longstreth J, Takizawa Y, van der Leun JC 2011. The human health effects of ozone depletion and interactions with climate change. *Photochem Photobiol Sci* 10:199-225.
- Oga S, Basile AC, Carvalho MF 2002. *Guia Zanini-Oga de Interações Medicamentosas*. São Paulo: Atheneu, p.5.
- Oga S, Freitas PC, Silva ACG, Hanada S 1984. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Med* 50:303-306.
- Ohguchi K, Akao Y, Nozawa Y 2006. Stimulation of Melanogenesis by the citrus flavonoid naringenin in mouse B16 melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 70: 1499-1501.
- Oliveira AC, Valentim IB, Goulart MOF, Silva CA, Bechara EJJ, Trevisan MTS 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim Nova* 32: 689-702.
- Oliveira JR, Mazocco VT, Steiner D 2002. Pitiríase Versicolor. *An Bras Dermatol* 77: 611-618.
- Park HY, Kosmadaki M, Yaar M, Gilchrist BA 2009. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cell Mol Life Sci* 66:1493-1506.
- Park HY, Perez JM, Laursen R, Hara M, Gilchrist BA 1999. Protein kinase C-beta activates tyrosinase by phosphorylating serine residues in its cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 274:16470-16478.
- Pereira CAM, Vilegas JHY 2000. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander, *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Rev Bras PI Med* 3: 1-12.
- Petit L, Pierard GE 2003. Skin-lightening products revisited. *Int J Cosmet Sci* 25:169-181.
- Prota G 1980. Recent Advances in the Chemistry of Melanogenesis in Mammals. *J Invest Dermatol* 75: 122-127.
- Rates SM 2001. Plants as source of drugs. *Toxicon* 39:603-613.
- Reginatto FH, Kauffmann C, Schripsema J, Guillaume D, Gosmann G, Schenkel EP 2001. Steroidal and triterpenoidal glucosides from *P. alata*. *J Braz Chem Soc* 12:32-36.
- Rosa EC, Natali MRM 2009. Vitiligo: um problema que não pode passar em branco. *SaudPesq* 2: 119-126.
- Rosatto SS, Freire RS, Durán N, Kubota LT 2001. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Quim Nova* 24: 77-86.

- Sarkar C, Singh SK, Mandal SK, Saha B, Bera R, Ratha J, Datta PK, Bhadra R 2006. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. *Mol Cell Biochem* 285:133-142.
- Schallreuter KU, Korner C, Pittelkow MR, Swanson NN, Gardner ML 1996. The induction of the alpha-1-adrenoceptor signal transduction system on human melanocytes. *Exp Dermatol* 5:20-23.
- Schallreuter KU, Kothari S, Chavan B, Spencer JD 2008. Regulation of melanogenesis - controversies and new concepts. *Exp Dermatol* 17:395-404.
- Scott G, Leopardi S, Printup S, Malhi N, Seiberg M, Lapoint R 2004. Proteinase-activated receptor-2 stimulates prostaglandin production in keratinocytes: analysis of prostaglandin receptors on human melanocytes and effects of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub>α on melanocyte dendricity. *J Invest Dermatol* 122:1214-1224.
- Shoji T, Kobori M, Shinmoto H, Tanabe M, Tsushida T 1997. Progressive effects of phloridzin on melanogenesis in B16 mouse melanoma cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 61: 1963-1967.
- Siebenlist U, Franzoso G, Brown K 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa β. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
- Silva CS, Rua PS 2007. Aspectos econômicos: mercado nacional e internacional. In Leonel S, Sampaio AC (orgs.) *Maracujá-doce: Aspectos técnicos e econômicos*. São Paulo: UNESP, p.7.
- Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J 2004. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84:1155-1228.
- Souza SRP, Fischer FM, Souza JMP 2004. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: revisão da literatura. *Rev Saúde Públ* 38: 588-598.
- Steenvoorden DP, van Henegouwen GM 1997. The use of endogenous antioxidants to improve photoprotection. *J Photochem Photobiol B* 41:1-10.
- Steiner D, Bedin V, Moraes MB, Villas RT, Steiner T 2004. Vitiligo. *An Bras Dermatol* 79: 335-351.
- Stratford MR, Ramsden CA, Riley PA 2012. The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. *Bioorg Med Chem* 20: 4364-4370.
- Tsatmali M, Ancans J, Thody AJ 2002. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides. *J Histochem Cytochem* 50:125-133.
- Ulmer T, MacDougal JM 2004. *Passiflora: passionflowers of the world*. Oregon: Timber Press.
- Ulubelen A, Oksuz S, Mabry TJ, Dellamonica G, Chopin J 1982. C-glycosylflavonoids from *Passiflora pittieri*, *P.alata*, *P.ambigua* and *Adenia Mannii*. *J Nat Prod* 45:783.
- Vara JAF, Casado E, Castro J, Cejas P, Belda-Iniesta C, González-Barón M 2004. PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer Treat Rev* 30: 193-204.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ 2000. Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310.
- Weber MB, Ávila LGS, Cestari TF 2000. Pitiríase alba: aspectos epidemiológicos, clínicos e terapêuticos. *An Bras Dermatol* 75: 359-367.
- Yang JY, Koo JH, Song YG, Kwon KB, Lee JH, Sohn HS, Park BH, Jhee EC, Park JW (2006). Stimulation of melanogenesis by scoparone in B16 melanoma cells. *Acta Pharmacol Sin* 11:1467-1473.
- Yang Y, Dickinson C, Haskell-Luevano C, Gantz I 1997. Molecular basis for the interaction of [Nle<sup>4</sup>,D-Phe<sup>7</sup>]melanocyte stimulating hormone with the human melanocortin-1 receptor. *J Biol Chem* 272:23000-23010.
- Yang YM, Son YO, Lee SA, Jeon YM, Lee JC 2011. Quercetin inhibits α-MSH-stimulated melanogenesis in B16F10 melanoma cells. *Phytother Res* 25: 1166-1173.



- Yokozawa T, Kim YJ 2007. Piceatannol inhibits melanogenesis by its antioxidative actions. *Biol Pharm Bull* 30: 2007-2011.
- Yunes RA, Calixto JB 2001. *Plantas Medicinais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó: Argos.
- Zaia DAM, Zaia CTBV, Lichtig J 1998. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. *Quim Nova* 21: 787-793.
- Zhao W, Liu H, Xu S, Entschladen F, Niggemann B, Zanker KS, Han R 2001. Migration and metalloproteinases determine the invasive potential of mouse melanoma cells, but not melanin and telomerase. *Cancer Lett* 162: 49- 55.
- Zuanazzi 2000. Flavonóides. In JAS Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e UFSC, p.489-515.