

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EVELISE PEREIRA MÜLLER

EFEITOS DOS CHÁS VERDE E BRANCO EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE *Camellia sinensis* SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

CURITIBA

2008

EVELISE PEREIRA MÜLLER

EFEITOS DOS CHÁS VERDE E BRANCO EXTRAÍDOS DE FOLHAS DE *Camellia sinensis* SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10

Monografia apresentada ao Departamento de Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria Caliman Filadelfi

CURITIBA

2008

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Douglas Celso Müller, por
ter acreditado e apostado na minha capacidade.

Um de seus sonhos está realizado!

Obrigada por tudo!

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Ana Maria Caliman Filadelfi, pela orientação, apoio, incentivos, confiança e principalmente pela amizade.

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

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

As companheiras de estágio Caroline Sienna, Carolinne Scopel e Jéssica Rodrigues, pelo companheirismo e auxílio durante minha estadia no laboratório. Em especial, à mestre Caroline Sienna que me ensinou todos os procedimentos laboratoriais com muita calma e dedicação.

Aos meus pais, Douglas C. Müller e Angela M. P. Müller, pelo esforço e incentivo contínuos para que eu pudesse ter uma educação de qualidade. Obrigada por tudo!

Ao meu namorado, Igor Flessak Júnior, a toda minha família e amigos que tiveram paciência quando o assunto se tratava de células e chá.

RESUMO

A fitoterapia é valorizada por ser um processo histórico, visto que os povos do passado já utilizavam plantas para fins terapêuticos. Atualmente sabe-se que os complexos fitoterápicos podem desencadear uma menor frequência e intensidade de efeitos colaterais do que os induzidos por drogas empregadas pela medicina tradicional. É da planta *Camellia sinensis* que são derivados quatro tipos de chás, com diferenças em seus graus de processamento: o preto, o oolong, o verde e o branco. A exposição prolongada à radiação solar é um dos fatores chave para o surgimento de patologias pigmentares, como por exemplo, o melanoma. Este e outros tipos de tumor podem ter seu crescimento reduzido pelo chá verde e seus polifenóis. O chá branco tem uso mais recente, é referido popularmente como mais potente que o verde, contudo, há poucos estudos científicos sobre o mesmo. O objetivo deste estudo foi caracterizar e comparar o efeito dos chás verde e branco sobre a viabilidade e o conteúdo de melanina de células de melanoma murino B16F10. Ambos os chás tiveram o pó diluído em água, fervido, filtrado e esterelizado, originando as soluções-estoque, posteriormente diluídas até as concentrações finais, aplicadas nas células B16F10. Estas foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e em meio de RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e gentamicina 80mg/ml a 0,1%, pH 7,4. Para o ensaio de viabilidade celular, 4x10⁴ células foram semeadas em frascos de 25cm². Após 24h da semeadura foram adicionados os chás e após mais 24h de incubação, as células foram destacadas dos frascos, diluídas em *Trypan Blue* e contadas com o auxílio de um hemocítmetro. Já para o ensaio de conteúdo de melanina, as células destacadas foram tratadas com Triton-X 1%, centrifugação, etanol/éter (1:1), vortexação, evaporação, NaOH 0,2N e aquecimento a 60°C, para extração/solubilização da melanina. Uma curva-padrão de melanina sintética foi confeccionada para referência e as leituras, em duplicata, efetuadas em espectrofotômetro/ELISA a 490nm. A absorbância de cada amostra foi convertida graficamente em melanina/10⁶células. Os dados finais de viabilidade celular e conteúdo de melanina foram expressos em porcentagem. A análise estatística dos dados efetuou-se através de ANOVA (“one way”) e teste Student Newman-Keuls para comparação entre controle e experimentais ou por teste t de Student/teste Mann-Whitney para comparação da potência entre os chás. Os chás verde [0,2; 0,6 e 1,2mg/ml (p<0,05)] e branco [0,05; 0,1; 0,2; 0,6 e 1,2mg/ml (p<0,05)] reduziram significativamente a viabilidade das células B16F10. A resposta a concentrações menores de chá branco em relação ao verde sugere uma maior potência do primeiro em relação a este, embora somente as respostas às concentrações 0,02 e 0,05mg/ml tenham sido significativamente diferentes. Apenas o chá verde reduziu significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10 nas concentrações de 0,1, 0,6 e 1,2mg/ml (p<0,05; 0,001; 0,01). Os resultados em geral não foram dose-dependentes. Em conclusão, ambos os chás mostraram-se citotóxicos e o chá verde, hipomelanogênico, sobre as células B16F10. A maior potência do chá branco em relação ao verde, conforme sugerido pelo conhecimento popular, foi confirmada apenas quanto ao efeito sobre a viabilidade celular.

Palavras-chave: Fitoterapia. Melanoma. *Camellia sinensis*. Chá verde. Chá branco. Viabilidade celular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESQUEMA SIMPLIFICADO DA VIA DE MELANOGÊNESE.....	10
FIGURA 2 - ASPECTO PARCIAL DA ESPÉCIE <i>Camellia sinensis</i>	14
FIGURA 3 - PROCESSO DE OBTENÇÃO DOS CHÁS	15
FIGURA 4 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS POLIFENÓIS MAIS ENCONTRADOS NO CHÁ VERDE.....	16
GRÁFICO 1 - EFEITO DO CHÁ VERDE SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	26
GRÁFICO 2 - EFEITO DO CHÁ VERDE SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	27
GRÁFICO 3 - EFEITO DO CHÁ BRANCO SOBRE A VIABILIDADE DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	27
GRÁFICO 4 - EFEITO DO CHÁ BRANCO SOBRE O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS DE MELANOMA MURINO B16F10.....	28
TABELA 1 - COMPARAÇÃO DA POTÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE OS CHÁS VERDE E BRANCO	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	07
1.1 A FITOTERAPIA.....	07
1.2 MELANÓCITOS, MELANOGÊNESE E MELANOMA.....	09
1.2.1 Melanócitos e melanogênese.....	09
1.2.2 Desordens de pigmentação e melanoma.....	12
1.3 <i>Camellia sinensis</i>	14
1.4 CHÁ VERDE, POLIFENÓIS E MELANOMA.....	16
1.5 CHÁ BRANCO.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 OBJETIVO GERAL.....	21
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 OBTENÇÃO DOS CHÁS VERDE E BRANCO.....	22
3.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS.....	22
3.3 CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	23
3.3.1 Ensaio de viabilidade celular.....	23
3.3.2 Conteúdo de melanina.....	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4 RESULTADOS	26
4.1 EFEITOS DO CHÁ VERDE SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10	26
4.2 EFEITOS DO CHÁ BRANCO SOBRE A VIABILIDADE E CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10	27
4.3 COMPARAÇÃO DA POTÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE OS CHÁS VERDE E BRANCO.....	28
5 DISCUSSÃO.....	30
6 CONCLUSÕES.....	35
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36
8 DOCUMENTOS CONSULTADOS.....	42

INTRODUÇÃO

1.1 A FITOTERAPIA

Há muito tempo a humanidade vem utilizando os produtos naturais em busca de alívio e cura para doenças. A ingestão de ervas e folhas com finalidade terapêutica talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (BARTON & OLLIS, 1986). Somente mais tarde é que o homem veio a isolar e sintetizar os princípios ativos componentes dos vegetais (SALLÉ, 1996). Assim, a Fitoterapia, valorizada por seu longo processo histórico, costuma ser amplamente utilizada, pois as plantas são de fácil aquisição e encontram-se bem distribuídas no ambiente (BARTON & OLLIS, 1986).

As substâncias químicas componentes dos vegetais, juntamente com o princípio ativo, formam o chamado complexo fitoterápico, que, além das ações fármaco-fisiológicas terapêuticas, costuma apresentar uma menor frequência e intensidade de efeitos colaterais em comparação ao obtido quando se utiliza o princípio ativo isolado. Ou seja, os medicamentos sintéticos, além de normalmente mais caros, podem causar maiores efeitos colaterais, sendo assim mais agressivos ao organismo (MILLS & BONE, 2000). No entanto, quando as substâncias naturais ocorrem em concentrações diminutas nos vegetais, acabam originando fármacos de alto custo no mercado (DAVID *et al.*, 2004). Este é o caso de alguns alcalóides extraídos da vinca, *Catharanthus roseus*, que por ocorrerem em baixas concentrações tornam necessária a utilização de cerca de 250 kg de talos floridos da planta para a obtenção de uma dose de 500 mg dos fármacos (TYLER, 1999).

Por outro lado, a extração do princípio ativo pode, também, empobrecer a planta, pois há a separação do todo em partes, não ocorrendo, então, a ação conjunta dos compostos químicos (SALLÉ, 1996).

Os produtos naturais vêm sendo utilizados nos últimos anos como um importante recurso no tratamento de patologias humanas contemporâneas, por exemplo, o câncer, contra o qual podem servir como quimioterápicos. No entanto, para desenvolver compostos menos tóxicos e mais ativos do que os propiciados pela medicina tradicional, muitos estudos ainda são necessários para melhorar o

emprego dos compostos vegetais como um tratamento alternativo (DASSONNEVILLE *et al.*, 1999; SUFFREDINI *et al.*, 2006).

Embora a indústria fitoterapêutica esteja em franco crescimento (KATE & LAIRD, 1999) e mesmo com todo esse possível potencial curativo, segundo CORRÊA JUNIOR. *et al.* (2004), há pouco ou nenhum investimento em pesquisas para determinadas espécies vegetais, tendo em vista a imensa biodiversidade da flora em nosso país. Em alguns casos isto se justifica porque as substâncias de interesse são encontradas em concentrações muito baixas nas plantas, tornando difícil a sua obtenção em grandes quantidades e resultando em fármacos finais de altos valores comerciais (DAVID *et al.*, 2004)

Nos países considerados como “megadiversidades” estão presentes 50% das espécies vegetais do mundo. Tais países são: Brasil, Colômbia, México, Zaire, Madagascar, Indonésia e Austrália. Por isso, os trópicos são o maior foco de pesquisas científicas, em busca de novas drogas de origem vegetal (JOFFE & THOMAS, 1989).

Além disso, muitos brasileiros não têm acesso à rede pública de saúde e acabam recorrendo aos recursos naturais de que dispõem, contribuindo assim, para o fortalecimento da medicina popular local. Portanto, o Brasil deveria priorizar a caracterização farmacológica de novas drogas e a realização de pesquisas científicas que resgatassem o conhecimento popular/indígena no tratamento ou prevenção de doenças, para associá-lo à caracterização e conservação da biodiversidade da flora brasileira acima mencionada (JOFFE & THOMAS, 1989).

Em pesquisas etnofarmacológicas, ou seja, na seleção de plantas de conhecimento popular para fins terapêuticos, foi descoberto o dobro de drogas anti-tumorais do que nas espécies vegetais recolhidas ao acaso (SPJUT & PERDUE JUNIOR, 1976).

Dentre as descobertas farmacológicas de origem vegetal, talvez uma das mais expressivas tenha sido a dos alcalóides da vinca (*Catharanthus roseus*, Apocynaceae): vincristina e vimblastina. Ambos são utilizados no tratamento do câncer de pele e a, vincristina, também contra patologias não cancerosas (TYLER, 1999).

As células de melanoma murino B16F10 vêm sendo muito utilizadas como modelos para estudos fitoterápicos. Segundo WANG *et al.* (2003), substâncias de

origem vegetal como o taxol e a camptotecina inibiram a migração e a adesão das células de melanoma B16F10. ARAI *et al.* (2006) afirmam que, a vincristina pode mediar a expressão de um supressor de tumor, a proteína p53, a qual inibe a expressão de tubulinas também nesta linhagem celular.

O emprego de fitoterápicos em desordens de pigmentação humana talvez possa ser uma forma de tratamento menos invasiva ao organismo do que as utilizadas na terapêutica tradicional (KWAM & MIHN JUNIOR, 1983).

1.2 MELANÓCITOS, MELANOGÊNESE E MELANOMA

1.2.1 Melanócitos e melanogênese

A pele humana é a barreira mais eficaz contra efeitos negativos de ordem ambiental e agentes xenobióticos, protegendo, portanto, os órgãos internos do corpo, de agentes externos físicos e químicos, incluindo a radiação ultravioleta (UV) solar e os poluentes ambientais (KWAN & MIHM JUNIOR, 1983).

As principais camadas da pele incluem a epiderme, a derme e a hipoderme. Os mais importantes componentes celulares da epiderme são os queratinócitos, as células de Langerhans e os melanócitos (KWAN & MIHM JUNIOR, 1983). O câncer de pele está associado principalmente com a camada epidérmica e seus tipos celulares, a qual pode chegar a quinze subcamadas de células em humanos e três em ratos (SUCHITRA *et al.*, 2007).

Os melanócitos são células de forma dendrítica capazes de sintetizar melanina, a qual fica armazenada no interior de melanossomos (HADLEY, 1996; KWAN & MIHM JUNIOR, 1983). A melanina é um biopolímero heterogêneo de estrutura complexa (SANCHEZ-FERRER *et al.*, 1995), possui muitos tipos diferentes de monômeros conectados entre si por fortes ligações carbono-carbono (ITO *et al.*, 2000) e constitui-se no principal pigmento contido nas estruturas tegumentares dos vertebrados (RIDLEY, 1997).

Acredita-se que em humanos, a melanina tenha função genoprotetora e fotoprotetora em células expostas a radiações potencialmente mutagênicas (RIDLEY, 1997).

A melanogênese (Fig. 1) ocorre no interior dos melanócitos, a partir da tirosina e é desencadeada através da atividade da enzima tirosinase (BENETT, 1993). O retículo endoplasmático granular sintetiza a tirosina, esta então se acumula nos melanosomos, vesículas formadas pelo Complexo de Golgi (POPOWSKI, 1997). A síntese de melanina inicia-se pela hidroxilação da tirosina à 3,4-diidroxifenilalanina (DOPA), e desta, a dopaquinona. Estas duas etapas são catalisadas pela tirosinase. Formada a dopaquinona, há diversas reações complexas, catalisadas por outras enzimas, que envolvem ciclizações e polimerizações oxidativas que, por fim, resultam na eu- ou na feomelanina (THODY & SHUSTER, 1989).

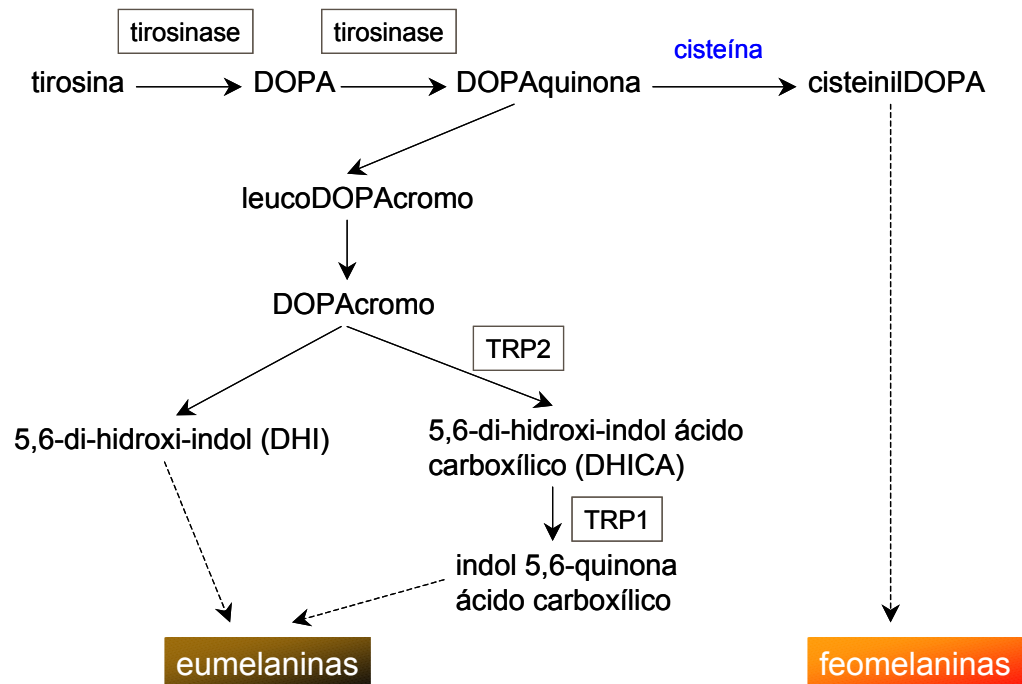


Figura 1 – Esquema simplificado da via de melanogênese. Setas tracejadas indicam etapas da síntese resumidas ou que não são completamente conhecidas (FONTE: modificado de WAKAMATSU & ITO, 2002).

A eumelanina, o tipo mais comum na pele humana, pode ser de cor preta ou marrom e constitui-se em um polímero regular formado por condensações oxidativas de indol-5,6-quinona. Já a feomelanina de cor amarela a marrom-avermelhada, possui alto conteúdo sulfidrílico e sua síntese praticamente não gera subprodutos tóxicos (HEARING, 2000; PROTA, 1993).

Os melanossomos tornam-se maduros pelo acúmulo de melanina, e por este acúmulo perdem sua atividade tirosinásica, sendo chamados, então, de grânulos de melanina. Uma vez formados, estes grânulos migram através de prolongamentos dos melanócitos e são transferidos para o interior dos queratinócitos, células epiteliais que circundam os melanócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974; THODY & SHUSTER, 1989). A unidade funcional de pigmentação é o conjunto de trinta e seis queratinócitos associados a um melanócito (HADLEY, 1996).

Nas diferentes raças humanas o número de melanócitos na pele é semelhante, porém estes diferem na quantidade e qualidade da melanina produzida. Quando a pele é exposta à luz solar, a produção de melanina é intensificada e pode ser reduzida quando não há atividade tirosinásica no melanócito (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974).

O hormônio estimulante de melanócitos – alfa (α -MSH) é um dos reguladores da produção de melanina, estimulando tanto a melanogênese quanto a proliferação de melanócitos (HADLEY, 1996). No homem, o α -MSH é produzido na pele, pelas células de Langerhans, queratinócitos e melanócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1974). O mecanismo de ação deste hormônio envolve ativação da via de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (THODY & SHUSTER, 1989).

Além disso, existem outros fatores que podem interferir na regulação da melanogênese e/ou na proliferação de melanócitos, como outros hormônios e fatores de crescimento, metabólitos de vitamina D, retinóides, radiação ultravioleta, ácidos graxos de cadeia longa, dentre outros (MACNEIL *et al.*, 1992).

1.2.2 Desordens de pigmentação e melanoma

Dentre as doenças de pele, as desordens de hiper- e hipopigmentação, podem resultar, respectivamente, do aumento ou redução da quantidade de melanina. As desordens de pigmentação humana podem estar relacionadas também à ausência de melanócitos, levando à hipopigmentação, como é o caso do vitiligo (SAMPAIO *et al.*, 1989) ou a lesões proliferativas dos mesmos, como ocorre no melanoma maligno, levando ou não à hiperpigmentação (KWAN & MIHM JUNIOR, 1983).

Os distúrbios de hipopigmentação são classificados em difusos ou localizados. Dentre os difusos estão o albinismo oculocutâneo (depressão da atividade da tirosinase) e o vitiligo generalizado (ausência de melanócitos na pele afetada). E dentre os localizados estão o vitiligo localizado, a leucodermia química (originadas por produtos químicos), o piebaldismo (um albinismo parcial), as micoses, o nevo acrómico, as hipomelanoses pós inflamatórias, dentre outros (LAWLEY & YANCEY, 1995).

São distúrbios comuns de hiperpigmentação: os nevos (manchas castanhas normalmente benignas e comuns ao longo da vida), o lentigo (manchas pequenas castanho-escuras ou pretas, comuns na infância e também benignas), as sardas (hiperpigmentação benigna da camada basal da pele podendo ser devida à exposição à luz ultravioleta), dentre outros (KWAM & MIHM JUNIOR, 1983). O melanoma pode não ser pigmentado. Por exemplo, indivíduos que possuem lentigo maligno e optam por retirar a área afetada, após a retirada, podem desenvolver o lentigo amelanótico melanoma maligno (ALMM), com a mesma progressão clínica do melanoma maligno, porém despigmentado (MCKENNA *et al.*, 2000).

A etiologia do melanoma ainda não é totalmente esclarecida. Estudos epidemiológicos mostram que a exposição ao sol é o fator ambiental mais importante envolvido no surgimento do melanoma cutâneo maligno (pigmentado) na população humana, embora o papel específico da radiação UV na gênese desse tumor ainda esteja em estudo (SUCHITRA *et al.*, 2007).

Porém, a pele é dotada de sistemas endógenos de defesa, que limitam danos potencialmente causados pela radiação solar UV, como por exemplo: o espalhamento da incidência de luz pelo estrato córneo, a absorção de luz pela melanina, métodos antioxidantes e a reparação enzimática de danos no DNA induzidos por UV. No entanto, estes meios fotoprotetivos não são tão eficazes quando há uma superexposição do organismo a essa radiação (SUCHITRA *et al.*, 2007).

Entretanto, fatores genéticos também estão envolvidos na gênese do melanoma (ANDRADE, 2003). A malignidade do melanoma é bastante alta, o que exige diagnóstico e tratamento precoces. E sua eliminação pode ser impossível se já estiver sofrendo o processo de metástase (ALBERTS *et al.*, 2006), ou seja, a invasão dos tecidos adjacentes que permite chegar aos vasos sanguíneos e formar tumores secundários em outros lugares do organismo (ITOH *et al.*, 2005).

As lesões de pigmentação cutânea que levam ao melanoma podem ser classificadas de acordo com o seu grau de progressão. A classe I, o nevo, raramente se desenvolve em um melanoma maligno (KWAM & MIHM JUNIOR, 1983). A classe II representa as lesões intermediárias confinadas à epiderme, os melanomas *in situ* ou microinvasões da derme, com disseminação lateral e chamadas de melanomas invasivos de fase RGP (*radial growth phase*). Já a classe III é composta dos melanomas tumorigênicos VGP (*vertical growth phase*), com invasão dérmica ou crescimento vertical levando à metástase (MEIER *et al.*, 1998). Faz parte desta classe a linhagem celular B16F10, em estudo (FIDLER, 1975).

O melanoma é um dos poucos tumores que teve sua incidência aumentada ao longo das últimas décadas, sendo os danos no DNA um dos iniciadores da sua formação. As estratégias empregadas unicamente para proteger contra a radiação UV tiveram um modesto impacto sobre o desenvolvimento deste tipo de câncer (LAO *et al.*, 2006). Apesar dos protetores solares serem indubitavelmente eficazes em impedir queimaduras devido à superexposição às radiações solares, sua eficácia em impedir o câncer de pele, especialmente o melanoma vem sendo questionada. Estudos laboratoriais e epidemiológicos indicam que os protetores solares, por exemplo, não possuem a capacidade de obstruir a iniciação ou a promoção da formação do melanoma desencadeada por danos do DNA. Este fato sugere que o espectro da ação para a indução de uma inflamação na pele devido à exposição

excessiva ao sol, é diferente do espectro da ação para a indução do melanoma (LEY & REEVE, 1997).

Esse tumor representa apenas cerca de 4% de todos os cânceres de pele (NIHAL *et al.*, 2005). Porém, devido à sua alta capacidade metastática, é o câncer de pele considerado mais fatal (ROOMI *et al.*, 2006). Muitos métodos terapêuticos são pouco eficazes no combate do melanoma. Portanto, novos métodos são necessários para a prevenção e tratamento desta doença (NIHAL *et al.*, 2005). Assim, a busca de tratamentos menos agressivos aos pacientes portadores de melanoma é intensa e a fitoterapia poderá ser uma importante alternativa para esse tipo de tumor altamente resistente à quimioterapia convencional (SOENGAS *et al.*, 2001).

1.3 *Camellia sinensis*

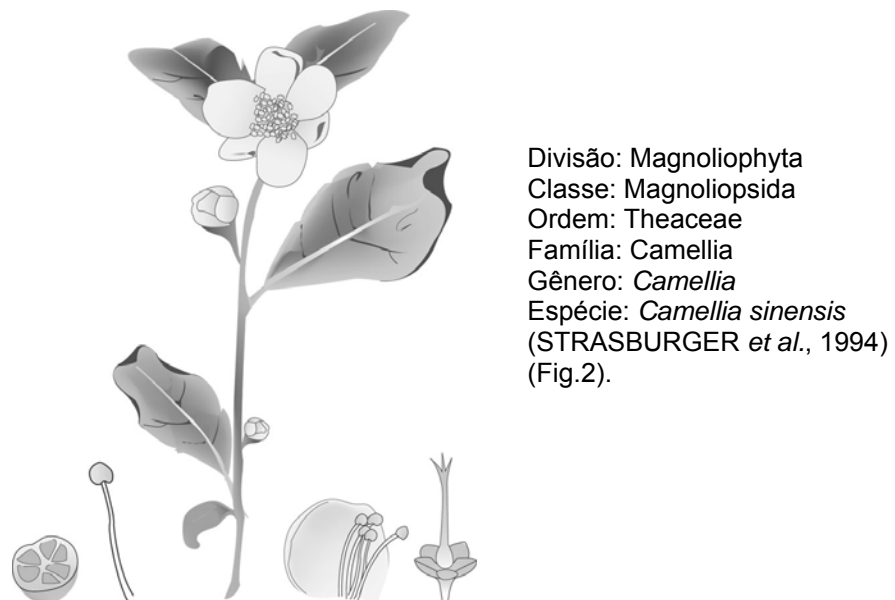


Figura 2 – Aspecto parcial da espécie *Camellia sinensis* (Fonte: RAVINDRANATH *et al.*, 2006).

O chá de folhas de *C. sinensis* (Fig. 2) é consumido socialmente e habitualmente pelo homem desde \pm 3000 a.C., pois além de saboroso poderia exibir

propriedades medicinais. Muitos curandeiros tradicionais acreditavam que beber chá seria um meio de prolongar a vida (CHOPRA & DAVID, 2000).

É através da planta *Camellia sinensis* que são obtidos os quatro tipos de chás a seguir: o branco, o verde, o oolong e o preto. Como mostra a Figura 3, a diferença entre os chás é basicamente o seu grau de processamento (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001), que causa mudanças nos ingredientes presentes nos mesmos (AOKI *et al.*, 2007). O chá branco, com folhas e flores mais jovens e menos processadas, apresenta-se mais claro e levemente adoçado, com um sabor suave comparado aos outros chás. Na obtenção do chá verde, após as folhas murçarem, as mesmas são cozidas, enroladas (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001), e por fim secam a sombra para serem submetidas a um aquecimento, visando inativar as enzimas que promovem a oxidação (PUGLIESI, 2008), bem como evitar a polimerização de suas catequinas, comumente chamadas de polifenóis (SUCHITRA *et al.*, 2007). O chá oolong possui um processamento intermediário, onde as folhas da *C. sinensis* sofrem lesões mecânicas, são brevemente oxidadas, e, ao final, então, secas. A fabricação do chá preto é muito semelhante à do chá oolong, porém as folhas sofrem uma grande oxidação e são literalmente queimadas (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001). O chá branco, por ser obtido do miolo e das folhas jovens, é o que mais conservaria as propriedades medicinais, e por isso, é atualmente sugerido como mais potente do que o verde em termos de efeitos terapêuticos. No entanto, este aspecto ainda está em discussão e estudo (PUGLIESI, 2008).

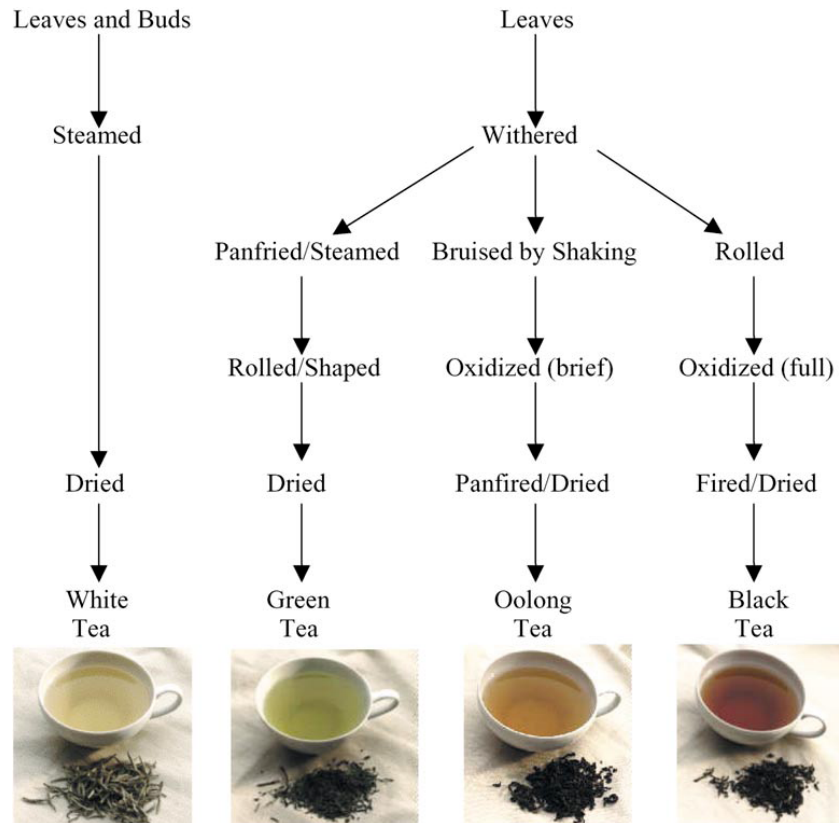


Figura 3 - Processo de obtenção dos chás, mostrando a progressiva oxidação que ocorre a cada etapa de conversão do chá branco para verde, para oolong e, finalmente, para preto (Fonte: SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

1.4 CHÁ VERDE, POLIFENÓIS E MELANOMA

Estudos epidemiológicos mostraram associações entre o consumo de chá verde e a diminuição do risco de câncer. Os polifenóis (Fig. 4), principalmente os flavanóis, fazem parte de até 30% do peso seco desse chá e podem exibir atividades anti-mutagênicas e anti-tumorais. A maior parte dos autores relata que a epigallocatequina-3-galato (EGCG) é o polifenol com maior atividade antioxidante e quimioprotetora, sendo também o mais abundante neste chá (STRATTON *et al.*, 2000). Sabe-se que o mecanismo base para o efeito anticancerígeno do EGCG é a inibição da telomerase das células tumorais (KANG *et al.*, 2007). Devido ao efeito anti-tumoral desta substância, seu potencial no tratamento de diversas doenças vêm sendo amplamente estudado (SUCHITRA *et al.*, 2007).

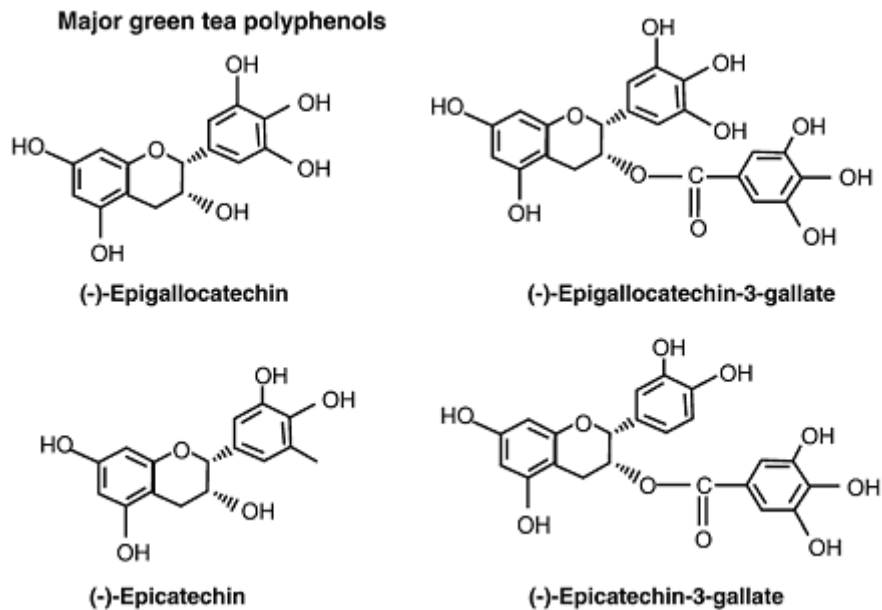


Figura 4 – Estruturas químicas dos polifenóis mais encontrados no chá verde. (FONTE: KATIYAR *et al.*, 2007).

A EGCG inibe o crescimento de linhagens celulares de glioblastoma, câncer de mama, cólon, pulmão, próstata, pâncreas, fígado, boca, e, inclusive, de melanoma (RAVINDRANATH *et al.*, 2006). Em contrapartida, poucos estudos compararam a eficácia relativa entre as catequinas presentes no chá, como a (-)-epicatequina (EC), epigallocatequina (EGC), (-)-epicatequina-3-galato (ECG) e (-)-epigallocatequina-3-galato (EGCG), por exemplo. Contudo, já foi sugerido que a atividade antitumoral de cada catequina depende do tipo de tumor em que é aplicada e nem sempre a EGCG foi o agente quimiopreventivo mais potente (RAVINDRANATH *et al.*, 2006).

Mudanças estruturais na matriz extracelular (ECM) são necessárias para a migração das células durante a remodelagem dos tecidos e os constituintes da ECM têm papel crítico na angiogênese e na metástase neoplásica. Analisando os efeitos de catequinas do chá verde sobre a adesão do melanoma murino B16, verificou-se que a EGCG reduziu a adesão celular à laminina, resultando em menor afinidade de ligação entre estas, efeito que pode justificar a ação anti-metastática do chá verde (HUNG *et al.*, 2005; ROOMI *et al.*, 2006; SUZUKI & ISEMURA, 2001).

Além disso, empregando-se duas linhagens celulares de melanoma humano (o melanoma amelanótico maligno A-375 e o melanoma Hs-294T) e melanócitos humanos normais, verificou-se que concentrações similares de EGCG reduziram a proliferação celular e induziram apoptose nas linhagens de melanoma, mas não afetaram os melanócitos normais. Este fato reforça a idéia de que a EGCG, isoladamente, ou em conjunto com as terapias atuais, poderia ser útil no tratamento do melanoma (NIHAL *et al.*, 2005). Por outro lado, apesar da ausência de efeitos sobre melanócitos, a EGCG inibiu a aderência, a proliferação e a migração de fibroblastos normais (HUNG *et al.*, 2005). Assim, a caracterização dos efeitos da EGCG sobre células normais ainda necessita de mais estudos.

Métodos atuais de prevenção do melanoma dependem, por exemplo, da aplicação de protetores solares usados nos seres humanos, ainda que haja controvérsias sobre sua efetividade neste aspecto (LEY & REEVE, 1997). Os polifenóis do chá verde atuam como um potente supressor dos efeitos tóxicos induzidos pela radiação UV, tais como: atividade carcinogênica, imunossupressora e envelhecimento precoce da pele. Assim, esses polifenóis teriam o potencial, quando usados conjuntamente com protetores solares tradicionais ou loções de cuidado com a pele, de proteger com maior eficácia a mesma contra os efeitos adversos da citada radiação (YUSUF *et al.*, 2007), reduzindo o risco do surgimento de melanoma e de outras desordens de pigmentação (SUCHITRA *et al.*, 2007; YUSUF *et al.*, 2007).

Utilizando diferentes modelos animais, muitos estudos têm demonstrado que o extrato do chá verde aplicado via oral inibe a formação tumoral induzida por carcinógenos químicos ou pela radiação UV tipo B (UVB). Os extratos também possuem atividade anti-inflamatória semelhante à anti-tumoral. Por outro lado, a aplicação tópica da EGCG na pele de ratos impede o estresse oxidativo e a supressão do sistema imunológico induzida por UVB (KATIYAR & ELMENTS, 2001).

A imunoterapia e a quimioterapia são geralmente eficazes contra pequenos tumores em modelos animais. Entretanto, estes tipos de tratamento são geralmente ineficazes contra tumores de grande dimensão. A vacinação de camundongos com DNA em combinação com EGCG inibe o crescimento tumoral em estágio avançado. A ação do EGCG ocorre via indução de apoptose das células tumorais e processa-se de maneira dose-dependente. A combinação da vacinação de DNA com EGCG também aumenta a resposta imunológica das células do tumor resultando em uma taxa mais elevada de cura do que a desencadeada pela imunoterapia ou pela

administração de EGCG isoladamente. A combinação dos dois tratamentos fornece, ainda, proteção anti-tumoral a longo prazo em camundongos já curados, sugerindo a relevância deste tratamento multimodal na terapêutica contra o câncer (KANG *et al.* 2007).

Em relação ao modo de administração de EGCG, a administração de ECGC livre em carcinomas celulares basais (BCCs), em melanomas e tumores de cólon de camundongos induziu menores resultados anti-tumorais do que quando a droga estava encapsulada em lipossomos, especialmente naqueles contendo ácido deoxicólico e etanol. A droga encapsulada mostrou maior penetração no tumor por estar mais protegida contra a degradação sistêmica. Isso sugere que a injeção intratumoral de lipossomos contendo EGCG pode aumentar o acesso da droga e conseqüentemente sua ação terapêutica (FANG *et al.*, 2006). Além disso, os efeitos fotoprotetivos e antioxidantes dos GTPs (mistura de componentes polifenólicos isolados do chá verde) ou do EGCG pelo tratamento tópico é maior que por administração oral, o que pode ser devido ao maior conteúdo destes polifenóis na aplicação tópica (KATIYAR *et al.*, 2007).

Em suma, estudos comprovam o potencial de fotoproteção do chá verde, seja administrado via oral, em forma de chá, ou topicamente sobre a pele. Além disso, o chá verde parece ser um fármaco seguro, não tóxico ao homem, contrariamente a outros agentes quimioterápicos que, além disso, podem ser caros e pouco efetivos no tratamento de tumores cutâneos. Entretanto mais estudos incluindo avaliações clínicas são necessários para validar a utilidade do chá, da ECGC e de outros polifenóis, sozinhos ou em combinação com terapias já existentes, para combater o melanoma e outras patologias cutâneas (SUCHITRA *et al.*, 2007).

1.5 CHÁ BRANCO

Nove dos maiores constituintes encontrados no chá verde também são detectados no chá branco, sendo o EGCG o polifenol mais abundante em ambos. Contudo, a cafeína, o ácido gálico, a teobromina, o EGC e o ECG estão presentes em maior concentração no chá branco (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

Também, foi demonstrado que, em relação ao chá verde, o branco tem uma maior atividade antimutagênica contra aminas heterocíclicas. Estas podem induzir a formação de tumores no cólon intestinal de cobaias, e costumam ser formadas durante o preparo de comidas que contem carboidratos, aminoácidos e creatinina, por exemplo, diversos tipos de carnes (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

Diferentemente do ocasionado pelo chá verde, a exposição prolongada ao chá branco e cafeína, na tentativa de reduzir o número de tumores intestinais em ratos, mostrou-se tóxica para os animais, embora o chá branco tenha exibido, a curto prazo, efeito anti-tumoral (WANG *et al.*, 2008).

Complexos nutritivos contendo extrato do chá branco podem auxiliar na reconstituição celular de cultura de pele humana, atrasando assim o seu envelhecimento (LACROIX *et al.*, 2007).

No entanto, há poucos estudos com o chá branco propriamente dito, pois a maioria dos artigos científicos disponíveis utiliza o chá verde ou o EGCG isolado. Assim não foram encontrados estudos científicos caracterizando a influência do chá branco sobre o melanoma. Além disso, também não há muitos estudos sobre os efeitos do chá verde especificamente em pele humana, o que não impede que muitas empresas farmacêuticas e de cosméticos estejam em busca de produtos contendo extratos de chá verde (KATIYAR *et al.*, 2001). Tais fatos sugerem a importância de se aprofundar a compreensão dos efeitos biológicos dos chás branco e verde (em células cutâneas), o que, no caso deste estudo, dar-se-á utilizando-se o modelo de melanoma murino B16F10 em cultura.

OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a influência dos chás verde e branco extraídos das folhas de *Camellia sinensis* sobre a função de células pigmentares tumorais murinas B16F10, e comparar a potência entre os chás tendo em vista as possíveis aplicações destes na terapêutica de patologias pigmentares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a influência do chá verde e do chá branco sobre a viabilidade de células B16F10 em cultura.
- Verificar a influência do chá verde e do chá branco sobre o conteúdo de melanina de células B16F10 em cultura.
- Comparar a potência entre os efeitos biológicos desencadeados pelos chás verde e branco.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS CHÁS VERDE E BRANCO

Os chás foram obtidos comercialmente, no ervanário “Chá e Arte”, localizado na Avenida Iguaçu, nº 1595, Curitiba, Paraná. Para validar a comparação entre os chás, ambos foram adquiridos em forma de pó e, através do laudo cedido pelo ervanário, foram constatadas as seguintes informações: os chás foram provenientes da China; o chá branco foi colhido em abril de 2007 e o chá verde, em março de 2007; o prazo de validade para os produtos é de aproximadamente três anos.

3.2 PREPARAÇÃO DOS CHÁS

Os chás verde e branco foram preparados da mesma maneira: para a obtenção das cinco menores concentrações a serem testadas, a cada 50ml de água miliq foi adicionado 1g de chá em pó; e, para a obtenção das duas maiores concentrações, a cada 50mL de água miliq, foram colocados 3g e 6g de chá em pó, respectivamente (WANG *et al.*, 2008).

O preparo ocorreu seguinte forma: a água foi aquecida durante 1 minuto e então foi adicionado o pó, ficando mais 1 minuto sob fervura. Após o preparo, o chá ficou sob infusão por 10 minutos e depois, foi passado em filtro de papel (Melitta, RS). Ao final o chá foi esterilizado através de filtros com poros de 0,22 µm (Spritzen-/Syringe-Filter, MGM, PR) e então diluído, em ambiente estéril, para adição à cultura de células B16F10.

Devido a sua rápida oxidação e possível perda de eficácia, os chás foram preparados pouco antes de cada aplicação na cultura celular e, descartados logo após sua utilização (WANG *et al.*, 2008).

As seguintes concentrações finais de ambos os chás, diluídas em meio de cultura, foram testadas nos experimentos: 0,002 mg/ml; 0,02 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,6mg/ml e 1,2 mg/ml.

3.3 CULTURA DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Células da linhagem B16F10 foram gentilmente doadas pela Profa Dra. Gláucia R. Martinez (Departamento de Bioquímica, UFPR) e foram mantidas a 37°C, com 5% de CO₂, em meio de cultura RPMI (contendo Hepes – 3,268 g/L; NaHCO₃ - 2 g/L; piruvato de sódio - 0,0125 g/L), acrescido de 10% de soro fetal bovino e gentamicina (Garamicina 80mg, Ind. Química e Farmacêutica Schering-Plough S/A, R J) a 0,1%, pH 7,4. O meio de cultura foi renovado a cada 48-72 h e as células sub-cultivadas, a partir de culturas próximas à confluência, pelo tratamento com solução de Tyrode/EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético; solução, em g/l: NaCl 8; KCl 0,2; MgCl₂.6H₂O 0,213; NaH₂PO₄ 0,05; EDTA 1,86; NaHCO₃ 1; pH 7,4) e transferência para novos frascos com meio de cultura.

3.3.1 Ensaio de viabilidade celular

Em cada frasco de 25 cm² foram semeadas 4 X 10⁴ células (quantidade padronizada após a realização de curvas de crescimento de 7 dias). Após 24h da semeadura foram adicionados os chás verde ou branco, nas concentrações supracitadas, e após 24h de incubação, o número de células de cada frasco foi aferido.

Para a determinação de viabilidade celular, as células foram destacadas dos frascos com solução de Tyrode/EDTA, lavadas com PBS (solução salina em tampão fosfato, em g/l: NaCl 8; KCl 0,2; MgCl₂.6H₂O 0,1; Na₂HPO₄ 0,92; CaCl₂.2H₂O 0,1; KH₂PO₄ 0,2; pH 7,4), tratadas com corante *Trypan Blue* 0,5% (Vetec, RJ) e,

finalmente, contadas com o auxílio de um hemocitômetro. O uso do corante *Trypan Blue* baseia-se na habilidade que a membrana plasmática de células viáveis (vivas) possui de excluir o corante. Portanto, as células coradas em azul devem estar mortas (MERCHANT *et al.*, 1964). Eram contadas as células vivas (não coradas) e mortas (coradas).

3.3.2 Conteúdo de melanina

Em cada frasco de 25 cm² foram semeadas 9×10^5 células. Foram adicionadas as soluções de chá verde e branco em diferentes concentrações, após 24h da semeadura, e após mais 24h de incubação, foi realizada a dosagem do conteúdo de melanina.

Em tubos de ensaio de 15 ml, foram adicionados Triton-X 1% em cada pellet celular. As amostras foram vortexadas e transferidas para tubos eppendorfs de 1,5 ml, ficando sob o gelo por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi removido e descartado. Em capela, foram adicionados 500 µl de etanol/éter (1:1) a cada pellet de melanina. As amostras foram vortexadas e deixadas em repouso por cerca de 10 minutos ou até que a proteína precipitada ficasse visível no solvente. Os tubos foram invertidos cuidadosamente algumas vezes e o sobrenadante solvente/proteína removido, de forma a restar somente o pellet de melanina puro. Os pellets secaram em capela até todo etanol/éter evaporar (cerca de meia hora). Em seguida, adicionados 100µl de NaOH 0,2N em cada pellet contendo $2,5 \times 10^6$ células. As amostras foram, então, aquecidas em banho-maria a 60°C até que a melanina estivesse completamente dissolvida. Foram preparadas, simultaneamente, as amostras de melanina sintética para uma curva-padrão e efetuada a leitura destas e das amostras experimentais, em duplicata, em espectrofotômetro/ELISA (Meridian, Diagnostic Inc. EL_x 800) a 490 nm.

Ao final, os dados obtidos como absorbância para cada amostra, foram convertidos e expressos graficamente (GraphPad Software Prisma) como o conteúdo de melanina (% do controle). Este foi determinado após divisão pelo número de células ($\times 10^6$), equivalentes ao total de um dado tratamento e transferidas

para tubos cônicos de 15 mL antes do início da dosagem de melanina; em seguida, foi calculada a porcentagem de resposta em relação ao controle branco.

3.4 ANÁLISE ESTÁTISTICA

Os dados de viabilidade celular e conteúdo de melanina obtidos a partir da aplicação de diferentes concentrações dos chás nas células de melanoma foram analisados através de análise de variância (ANOVA “one way”) seguida do teste de Student Newman-Keuls (SNK – ZAR, 1996), para determinação do nível de significância das diferenças. Neste caso, a comparação foi entre controle (ausência de tratamento com chá verde ou branco) e experimentais (presença de chá verde ou branco).

Para comparação da potência entre os chás, as respostas de viabilidade celular à mesma concentração de cada um deles também foram analisadas através do teste t de Student. Quando o teste para normalidade dos dados falhou, estes foram analisados através do teste de Mann-Whitney.

Em todos os casos, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p < 0,05$.

Os resultados foram expressos graficamente (GraphPad Software Prisma), a partir dos valores absolutos, como porcentagem média em relação ao controle \pm erro padrão da média (EPM).

RESULTADOS

4.1 EFEITOS DO CHÁ VERDE SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.

O chá verde (24h de incubação) nas concentrações de 0,2 (65,68 ± 7,38%; $p < 0,01$), 0,6 (67,27 ± 7,27%; $p < 0,05$) e 1,2 mg/ml (60,1 ± 9,77%; $p < 0,001$) reduziu significativamente a viabilidade das células de melanoma murino B16F10, quando comparadas ao controle (89,06 ± 0,95%), com $7,8 \pm 0,89 \times 10^5$ células. (GRÁF. 1, $n = 3-12$). Os resultados não foram dose-dependentes.

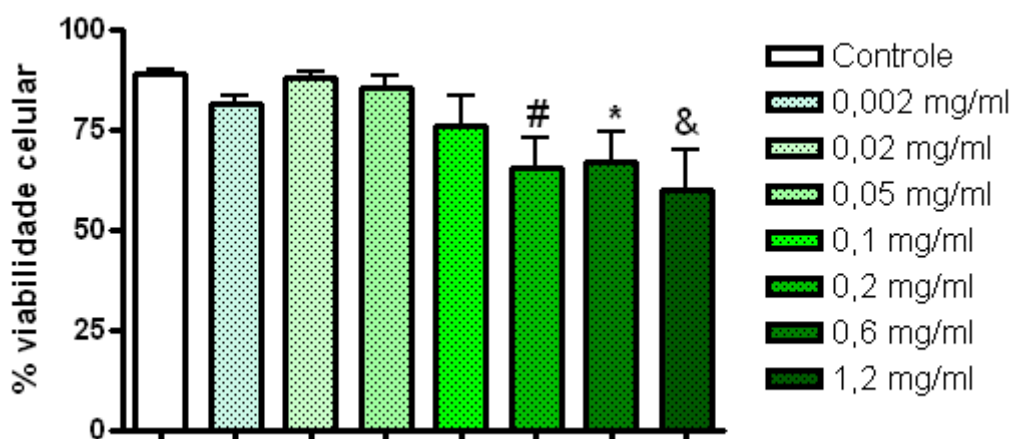


Gráfico 1 – Efeito do chá verde sobre a viabilidade das células de melanoma murino B16F10, após 24h de aplicação do chá. Símbolos = valores significativamente diferentes do controle para: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,01$; & = $p < 0,001$. Cada ponto é a média ± EPM, $n = 3$ (0,6 e 1,2 mg/ml), $n = 12$ (controle; 0,002; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml). (FONTE: o autor, 2008).

O chá verde (24h de incubação) nas concentrações de 0,1 (71,80 ± 8,68%; $p < 0,05$), 0,6 (54,32 ± 9,39%; $p < 0,001$) e 1,2 mg/ml (59,73 ± 12,77%; $p < 0,01$) reduziu significativamente o conteúdo de melanina de células de melanoma murino B16F10, quando comparadas ao controle (89,06 ± 0,95%), com $11,28 \pm 1,18$ mg de melanina/ 10^6 células. (GRÁF. 2, $n=3-12$). Os resultados não foram dose-dependentes.

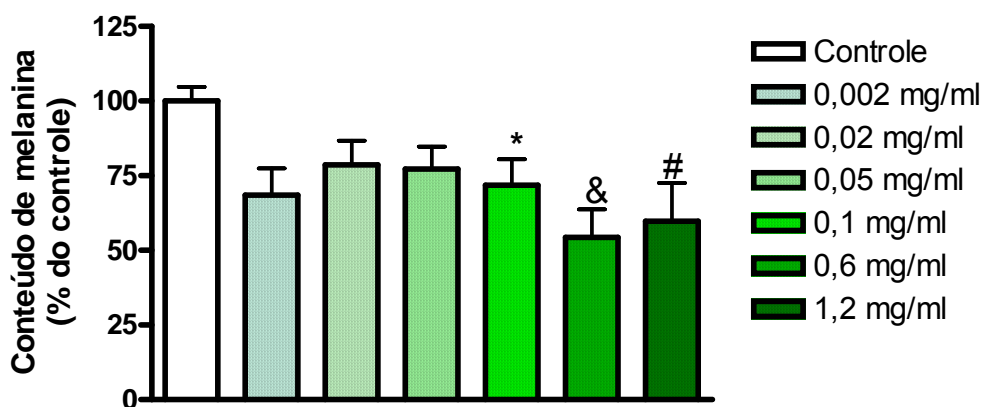


Gráfico 2 - Efeito do chá verde sobre o conteúdo de melanina das células de melanoma murino B16F10, após 24h de aplicação do chá. Símbolos = valores significativamente diferentes do controle para: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,01$; & = $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 3$ (0,6 e 1,2 mg/ml), $n = 12$ (controle; 0,002; 0,02; 0,05 e 0,1 mg/ml). (FONTE: o autor, 2008).

4.2 EFEITOS DO CHÁ BRANCO SOBRE A VIABILIDADE E O CONTEÚDO DE MELANINA DAS CÉLULAS B16F10.

O chá branco (24h de incubação) nas concentrações de 0,05 ($74,10 \pm 3,23\%$; $p < 0,05$); 0,1 ($75,72 \pm 3,30\%$; $p < 0,05$); 0,2 ($70,71 \pm 4,70\%$; $p < 0,01$); 0,6 ($69,57 \pm 3,56\%$; $p < 0,01$) e 1,2 mg/ml ($66,43 \pm 11,35\%$; $p < 0,001$) reduziu significativamente a viabilidade das células de melanoma murino B16F10, quando comparadas ao controle ($88,75 \pm 1,16\%$), com $1,00 \pm 1,25\% \times 10^6$ células. (GRÁF. 3, $n=3-12$). Os resultados não foram dose-dependentes.

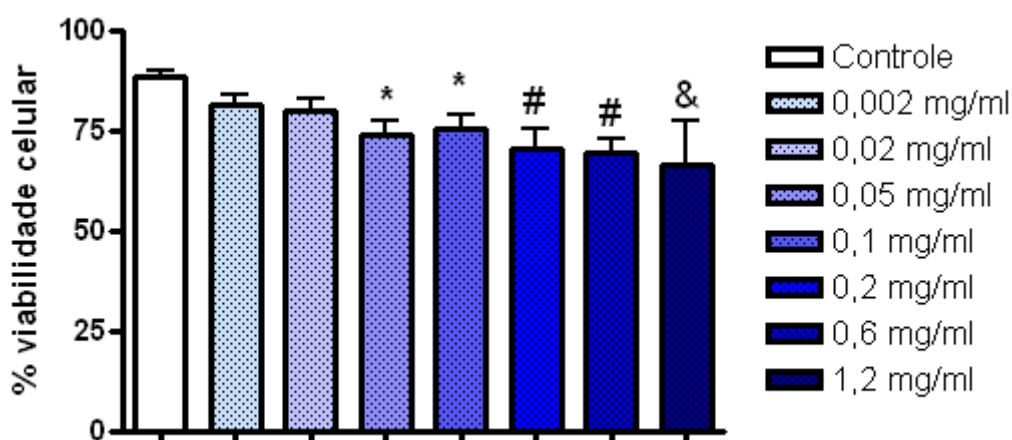


Gráfico 3 - Efeito do chá branco sobre a viabilidade das células de melanoma murino B16F10, após 24h de aplicação do chá. Símbolos = valores significativamente diferentes do controle para: * = $p < 0,05$; # = $p < 0,01$; & = $p < 0,001$. Cada ponto é a média \pm EPM, $n = 3$ (0,6 e 1,2 mg/ml), $n = 12$ (controle; 0,002; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml) (FONTE: o autor, 2008).

Contudo, em nenhuma das concentrações testadas, o chá branco, em 24h de incubação, alterou significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10 em relação ao controle ($14,87 \pm 2,32$ mg de melanina/ 10^6 células) (GRÁF. 4, n=3-12).

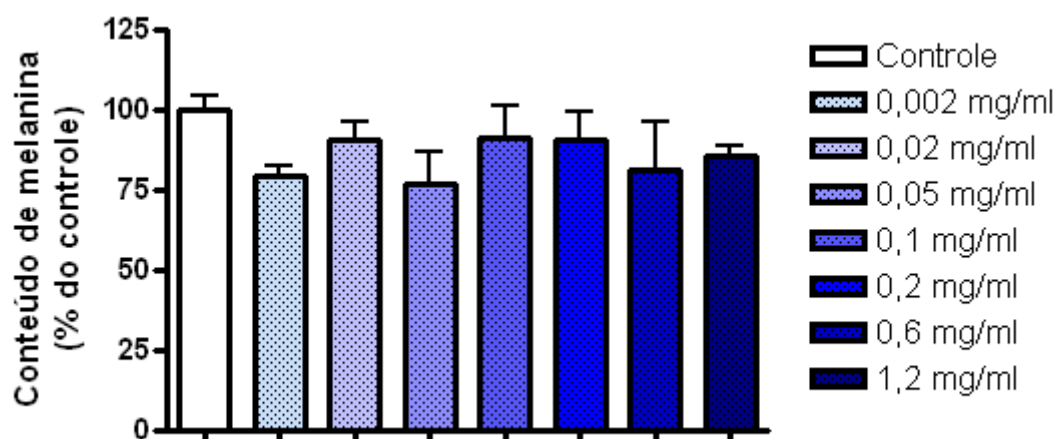


Gráfico 4 - Efeito do chá branco sobre o conteúdo de melanina das células de melanoma murino B16F10, após 24h de aplicação do chá. Cada ponto é a média \pm EPM, n = 3 (0,6 e 1,2 mg/ml), n = 12 (controle; 0,002; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml) (FONTE: o autor, 2008).

4.3 COMPARAÇÃO DA POTÊNCIA DE RESPOSTA ENTRE OS CHÁS VERDE E BRANCO

A comparação das respostas de viabilidade das células B16F10 aos chás verde e branco (TAB. 1) mostrou diferença significativa entre as concentrações 0,02 mg/ml ($p = 0,033$) e 0,05 mg/ml ($p = 0,007$), indicando a maior potência do chá branco (maior redução da viabilidade) em relação ao chá verde (menor redução da viabilidade) neste caso.

Não houve diferença significativa entre as respostas de viabilidade celular às demais concentrações dos chás.

As respostas de conteúdo de melanina não foram testadas neste aspecto devido ao fato do chá branco não o ter alterado significativamente.

CONCENTRAÇÃO (mg/ml)	N	CHÁ VERDE Média ± EPM (%)	CHÁ BRANCO Média ± EPM (%)	P
Controle	12	89,09 ± 0,95	88,75 ± 1,16	0,837
0,002	12	81,68 ± 1,68	81,78 ± 2,16	0,899
0,02	12	87,84 ± 1,95	80,11 ± 2,77	0,033*
0,05	12	85,72 ± 2,83	74,10 ± 3,23	0,007*
0,1	12	76,23 ± 7,14	75,72 ± 3,30	0,950
0,2	12	65,68 ± 7,38	70,71 ± 4,70	0,572
0,6	03	67,27 ± 7,27	69,57 ± 3,56	0,791
1,2	03	60,14 ± 9,78	66,43 ± 11,35	0,696

Tabela 1 – Comparação das respostas de viabilidade das células B16F10 entre o chá verde e o chá branco. * = valores significativos para $p < 0,05$, $n = 3$ (0,6 e 1,2 mg/ml), $n = 12$ (controle; 0,002; 0,02; 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml) (FONTE: o autor, 2008).

DISCUSSÃO

O melanoma é o câncer de pele considerado mais fatal, devido à sua alta capacidade metastática (ROOMI *et al.*, 2006), mesmo representando apenas cerca de 4% de todos os cânceres de pele (NIHAL *et al.*, 2005).

O tratamento contra o câncer é principalmente baseado em protocolos de quimioterapia, radioterapia e intervenção cirúrgica. Embora a eficácia da quimioterapia na maioria dos tipos de câncer tenha melhorado nos últimos anos, ainda ocorrem diversos efeitos tóxicos contra tecidos saudáveis. Portanto, o desenvolvimento de novas drogas continua sendo um desafio, dentre elas, as derivadas de plantas podem desencadear menos efeitos colaterais (KESSLER *et al.*, 2006), além de serem uma alternativa, já que o melanoma é um tipo de tumor altamente resistente à quimioterapia convencional (SOENGAS *et al.*, 2001).

Sabe-se que a associação entre o consumo de chá verde e a diminuição do risco de câncer é válida. O EGCG é o polifenol mais abundante neste chá, sendo também o que normalmente mais apresenta atividade antioxidante e quimioprotetora (STRATTON *et al.*, 2000), tendo a capacidade de inibir o crescimento de linhagens de vários tipos de tumor, inclusive o melanoma (RAVINDRANATH *et al.*, 2006). É também conhecido que o EGCG tem a capacidade de prevenir a imunossupressão induzida pela radiação ultravioleta (UV) solar (KATIYAR *et al.*, 2007), reduzir a proliferação celular e induzir apoptose nas linhagens de melanoma, mas sem afetar os melanócitos normais humanos (NIHAL *et al.*, 2005). Além disso, o chá verde é possivelmente um fármaco seguro não tóxico ao homem, contrariamente a agentes quimioterápicos caros, tóxicos e pouco efetivos no tratamento de tumores cutâneos (SUCHITRA *et al.*, 2007).

Tanto o chá verde como o chá branco são derivados da espécie *Camellia sinensis*, contudo, o chá branco sofre menos oxidação do que o verde no processo de fabricação (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001), sendo, portanto, o que mais conservaria suas propriedades medicinais (PUGLIESI, 2008). Um dos poucos estudos científicos com o chá branco mostrou que este tem uma maior atividade antimutagênica do que o verde, contra aminas heterocíclicas que induzem o crescimento de tumores no cólon do intestino de cobaias (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001).

O objetivo deste trabalho foi, portanto, investigar o efeito dos chás verde e branco a fim de comprovar, testar ou comparar a eficácia e/ou potencialidade dos chás sobre a viabilidade celular e o conteúdo de melanina das células de melanoma murino da linhagem B16F10.

Depois da água, o chá (*Camellia sinensis*) é a bebida mais comumente consumida no mundo por causa do seu aroma, sabor e benefícios para a saúde (KATIYAR *et al.*, 2001). E é por isso que, utilizamos neste estudo o chá feito da maneira popular convencional.

Tanto o chá verde (GRÁF. 1), como o chá branco (GRÁF. 3) foram capazes de reduzir significativamente a viabilidade de células B16F10 (ANOVA/SNK; $p < 0,05$), o que sugere um efeito citotóxico dos mesmos sobre essas células. Este resultado corrobora as informações obtidas em estudos anteriores, tendo em vista que o chá verde e o chá branco apresentam, em sua composição química, o polifenol EGCG (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001) e que este reduz a proliferação celular e induz apoptose nas linhagens de melanoma (NIHAL *et al.*, 2005; STRATTON *et al.*, 2000).

Porém nossos resultados também mostraram que o chá branco exibe esse efeito citotóxico a partir da concentração de 0,05 mg/ml (GRÁF. 3), enquanto o chá verde inicia seus efeitos significativos apenas a partir da concentração de 0,2 mg/ml (GRÁF. 1), sugerindo uma maior potência do primeiro chá em relação a este último.

Na comparação entre as respostas de viabilidade celular à mesma concentração de chá verde e branco, os resultados estatísticos indicaram diferenças significativas somente para as concentrações de 0,02 ($p = 0,033$) e 0,05 mg/ml ($p = 0,007$; teste t de Student/Mann Whithney). Este resultado no caso da concentração menor dos chás (0,02 mg/ml), já sugeriria a maior potência do chá branco em relação ao verde, apesar do efeito citotóxico deste, em relação às células controle, ainda não ter sido significativo nesta dose. Quanto à maior concentração (0,05 mg/ml), nesta, o chá branco já apresentou efeito significativo em relação às células controle, mas o chá verde ainda não, o que torna este resultado da significância da diferença entre as duas respostas bastante coerente com a maior potência do chá branco. Com relação às três maiores concentrações testadas de ambos os chás (0,2; 0,6 e 1,2 mg/ml), talvez a comparação entre as respostas não tenha revelado diferenças significativas entre as mesmas devido ao fato delas já estarem na faixa de indução de efeitos máximos. Inclusive, nesta faixa de doses, os efeitos de

redução de viabilidade celular do chá verde (GRÁF. 1) foram ligeiramente maiores do que os do chá branco (GRÁF. 3), embora, as diferenças não tenham sido significativas. A ausência de diferença significativa entre as respostas aos chás na concentração de 0,01 mg/ml foi um resultado inesperado, visto que nesta concentração o chá branco exibe efeito citotóxico significativo em relação ao controle, mas o chá verde não. Contudo, a proximidade desta dose com aquelas em que ambos os chás têm efeito citotóxico máximo talvez esteja relacionada à similaridade nas respostas que ela desencadeou.

A diminuição da viabilidade celular desencadeada pelos chás verde e branco, neste estudo, não se deu de maneira efetivamente dose-dependente, pois não houve diferenças significativas (ANOVA/SNK; $p < 0,05$) entre as respostas às concentrações que apresentaram efeito sobre a viabilidade das células em estudo.

Vale salientar que durante o processo de experimentação era notável uma vulnerabilidade das células, quando estas estavam abaixo do seu ritmo padrão de crescimento. Ou seja, quando as mesmas estavam em um período de crescimento exponencial, visualmente, as células se mostravam mais resistentes à ação antitumoral esperada dos chás em relação a quando as mesmas não haviam atingido ainda esta fase de crescimento mais acelerada. Assim, este fato também pode ter contribuído para alguns dos resultados aqui apresentados.

É descrito que em estudos *in vitro* o EGCG inibe significativamente a síntese de melanina em células de melanoma, de maneira dose-dependente (KIM, *et al.*, 2004). De fato, nossos resultados mostraram que o chá verde, nas concentrações de 0,1 ($p < 0,05$), 0,6 ($p < 0,001$) e 1,2 ($p < 0,01$) mg/ml, reduziu significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10 em cultura (GRÁF. 2), embora não de maneira dose-dependente. Este resultado é coerente com o fato do chá verde possuir o EGCG (STRATTON *et al.*, 2000). Contudo, o chá branco não alterou significativamente o conteúdo de melanina das células de melanoma murino (GRÁF.4) e, portanto, em relação a este efeito não é mais potente do que o chá verde, diferentemente, portanto, do que o conhecimento popular sugere quanto à maior potência de efeitos biológicos do chá branco (PUGLIESI, 2008). As respostas de conteúdo de melanina das células B16F10 a ambos os chás não foram comparadas quanto a diferenças de potência, devido ao fato de não apenas o chá verde o ter reduzido significativamente (GRÁF. 2 e 4).

Entretanto, não foram testados períodos de incubação maiores do que 24h e em alguns estudos (KANG *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2008; RAVINDRANATH *et al.*, 2006) o EGCG só começa a apresentar efeitos biológicos *in vitro* e *in vivo*, com no mínimo 24h de exposição ao mesmo. Além disso, nestes estudos, o EGCG foi administrado como um composto isolado, diferentemente dos resultados aqui expostos que se referem à ausência de efeito do chá branco sobre o conteúdo de melanina das células B16F10.

O decréscimo, hipopigmentação, ou a falta de melanina pode levar a uma falha na proteção contra agentes agressores externos, como por exemplo, a radiação UV (RIDLEY, 1997). Por outro lado, a produção de melanina deve ser finamente controlada e compartimentalizada, pois a mesma, em excesso, pode ser um produto tóxico para a célula que a contém (BRILLIANT *et al.*, 2001). Assim o fato do chá branco não afetar o conteúdo de melanina, mas ser citotóxico sobre o melanoma, pode ser um aspecto positivo ao considerar-se o emprego do mesmo como agente quimioterápico, pois ele talvez não interferisse com o conteúdo de melanina dos melanócitos normais. Contudo, mais estudos são necessários sobre a ação de ambos os chás em linhagens celulares não tumorigênicas para tentar comprovar se há ou não interferência sobre o conteúdo de melanina. Além disso, estudos de toxicidade também precisam ser ampliados, uma vez que o chá branco pode se mostrar tóxico ao organismo quando administrado por longo período (WANG *et al.*, 2008).

O conjunto de resultados apresentados neste trabalho comprovou a eficácia anti-tumoral da espécie *Camellia sinensis*, reafirmando o grande potencial deste vegetal sob investigação. Portanto, estes resultados podem vir a se constituir em uma base de dados científicos, referente a esta espécie vegetal, que pode ser incluída em investigações de agentes terapêuticos contra patologias pigmentares.

Tanto o chá branco quanto o chá verde exibiram efeitos citotóxicos sobre as células de melanoma B16F10. Embora o composto EGCG já tenha sido caracterizado como o polifenol em maior abundância no chá verde, os níveis dos compostos e de outras catequinas são menos conhecidos no caso do chá branco (SANTANA-RIOS *et al.*, 2001). Assim, mais estudos são necessários para a efetiva caracterização da composição química do chá branco, bem como do efeito biológico dos compostos isolados que forem obtidos a partir desta caracterização.

Finalmente, o entendimento dos mecanismos de ação pelos quais os chás desencadearam os efeitos citotóxicos aqui evidenciados e a realização de pré-clínicos e clínicos para validar a eficácia destes chás e de seus compostos, sozinhos ou em combinação com terapias já existentes pode colaborar para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos e/ou terapêuticos contra o melanoma e outras patologias pigmentares.

CONCLUSÕES

- A preparação de cultura de células de melanoma murino B16F10 revelou-se um ensaio sensível ao teste do efeito biológicos dos chás.
- Os chás exerceram efeito citotóxico, mas apenas o chá verde reduziu significativamente o conteúdo de melanina das células B16F10.
- Conforme sugerido pelos resultados de viabilidade celular, o chá branco pode, de fato, apresentar maior potência do que o verde.
- Mais estudos são necessários para esclarecer os mecanismos de ação e compostos isolados responsáveis pelas atividades biológicas aqui apresentadas e o potencial de *Camellia sinensis* como fonte de substâncias a serem empregadas contra patologias pigmentares.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

AOKI, Y.; TANIGAWA, T.; ABE, H.; FUJIWARA, Y.; Melanogenesis inhibition by an oolong tea extract in B16 mouse melanoma cells and UV-induced skin pigmentation in Brownish Guinea Pigs. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 71, p. 1879-1885, 2007.

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

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

BENNETT, D. C. Genetics, development and malignancy of melanocytes. **Int. Rev. Cytol.**, v. 146, p. 191-260, 1993.

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

CHOPRA, D. & DAVID, S. **The chopra centre Herbal Handbook**. USA: Three Rivers Press, 2000.

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

DASSONNEVILLE, L.; BONJEAN, K.; PAUW-GILLET, M. C.; COLSON, P.; HOUSIER, C. LECLERCQ, J. Q.; ANGENOT, L. & BAILLY, C. Stimulation of topoisomerase II-mediated DNA cleavage by three DNA-intercalating plant alkaloids:

cryptolepine, matadine, and serpentine. **Biochemistry**, v. 38, n. 24, p. 7719-7726, 1999.

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

FANG, J. Y.; LEE, W. R.; SHEN, S. C.; HUANG, Y. L. Effect of liposome encapsulation of tea catechins on their accumulation in basal cell carcinomas. **J Dermatol. Sci**, v. 42, p. 101-109, 2006.

FIDLER, I. J. Biological Behavior of Malignant Melanoma Cells Correlated to their Survival in vivo. **Cancer Research**, v. 35, p. 218-224, 1975.

FILADELFI, A. M. C. **Efeitos biológicos, receptores e mecanismos de ação de endotelinas em células de eritroforoma de teleósteos da linhagem GEM-81.** Tese apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção de título de doutor em Ciências. São Paulo, 2003.

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

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

HUNG, C. F.; HUANG, T. F.; CHIANG, H. S.; WU, W. B. Epigallocatechin-3-gallate, a polyphenolic compound from green tea, inhibits fibroblast adhesion and migration through multiple mechanisms. **J. Cell. Biochem.**, v. 96, n. 1, p. 183-197, 2005.

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

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

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, I. **Histologia Básica**. São Paulo: EDUSP, pp. 324, 1974.

KANG, T.H.; LEE, J.H.; SONG C.K.; HAN H.D.; SHIN B.C; PAI, S.I.; HUNG, C.F.; TRIMBLE, C.; LIM, J.S.; KIM, T.W.; WU, T.C. Epigallocatechin-3-gallate enhances CD8+ T cell-mediated antitumor immunity induced by DNA vaccination. **Cancer Res.**, v. 67, p. 802-811, 2007.

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

KATIYAR S. K. & ELMETS C. A. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review). **Int. J. Oncol.**, v. 18, p. 1307-1313, 2001.

KATIYAR S. K. & ELMETS C. A.; KATIYAR, S. K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. **Science Direct**, v. 18, p. 287-296, 2007.

KESSLER, J.H.; MULLAUER, F.B.; ROO, G.M. de; MEDEMA, J.P. Broad in vitro efficacy of plant-derived betulonic acid against cell lines derived from the most prevalent human cancer types. **Cancer Lett.**, v. 251, p. 132-145, 2006.

KIM, D.S.; PARK, S. H.; KWON, S. B.; LI, K.; YOUN, S. W.; PARK, K. C.; (-)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. **Arch Pharm Res**, v. 8, p. 1707-1712, 2004.

KWAN, T. H.; MIHM JÚNIOR M. C. A pele. In: ROBBINS, S.L.; COTRAN, R.S. **Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Interamericana Ltda., pp. 1177-1213, 1983.

LACROIX, S.; BOUEZ, C.; VIDAL, S.; CENIZO, V.;REYMERMIER, C.;JUSTIN, V.; VICANOVA, J.; DAMOUR, O. Supplementation with a complex of active nutrients improved dermal and epidermal characteristics in skin equivalents generated from fibroblasts from young or aged donors. **Biogerontology**, v. 8, p. 97-109, 2007.

LAO, C. D.; DEMIERRE, M. F.; SONDAK, V. K.; Targeting events in melanoma carcinogenesis for the prevention of melanoma. **Expert. Rev. Anticancer Ther.**, v. 6, p. 1559-68, 2006.

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

LEY, R. D.; REEVE, V. E. Chemoprevention of ultraviolet radiation-induced skin cancer. **Environ Health Perspect**, v. 105, p. 981-984, 1997.

MACNEIL, S; BUFFEY, J; HILL, S.E. et al. Intracellular signaling in the control of melanogenesis. **Pigment Cell Res.**, v. 2, p. 154-161, 1992.

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

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

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

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

NIHAL, M.; AHMAD, N.; MUKHTAR, H.; WOOD, G. S. Anti-proliferative and proapoptotic effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate on human melanoma: possible implications for the chemoprevention of melanoma. **Int. J. Cancer**, v. 114, p. 513-521, 2005.

POPOWSKI, P. **A pele da criança em homeopatia**. São Paulo: Organização Andrei Editora LTDA, 1997.

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

PUGLIESI, M. H. Hora do chá: branco X verde. **Bons fluidos**. São Paulo: Editora Abril, n. 106, p. 82-85, 2008.

RAVINDRANATH, M. H.; SARAVANAN, T. S.; MONTECLARO, C. C.; PRESSER, N.; YE, X.; SELVAN, S. R.; BROSMAN, S.; Epicatechins Purified from Green Tea (*Camellia sinensis*) Differentially Suppress Growth of Gender-Dependent Human Cancer Cell Lines, **Advance Access Publication**, v. 3, p. 237–247, 2006.

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

ROOMI, M. W.; IVANOV, V.; NETKE, S.; KALINOVSKY, T.; NIEDZWIECKI, A.; RATH, M. In vivo and in vitro antitumor effect of ascorbic acid, lysine, proline and green tea extract on human melanoma cell line. **Exp. Lung**, v. 32, p. 517-530, 2006.

SALLÉ, J. L. **O totum em fitoterapia**. São Paulo: Robe Editorial, 1996.

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

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

SANTANA-RIOS, G. ; ORNER, G.A.;AMANTANA, A.; PROVOST, C.; WU, S.; DASHWOOD, R. H. Potent antimutagenic activity of white tea in comparison with green tea in the *Salmonella* assay. **Mutat. Res.**, v. 495, p. 61–74, 2001.

SOENGAS, M.S.; CAPODIECI, P.; POLSKY, D. *et al.* Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. **Nature**, v. 409, p. 207-211, 2001.

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

STRASBURGER, E.; NOLL, F.; SCHENCK, H.; SCHIMPER, A. F. W.; **Tratado de Botânica**, 8 ed., Rio de Janeiro: Ediciones Omega, S.A., 1994.

STRATTON, S. P. & DORR, R. T. & ALBERTS, D. S. The state-of-the-art chemoprevention of skin cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1292-1297, 2000.

SUCHITRA, K.; CRAIG, A. E.; SANTOSH, K. K. Green tea and skin cancer: photoimmunology, angiogenesis and DNA repair. **J. Nutrit. Biochem.**, v. 18, p. 287–296, 2007.

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

SUZUKI, Y.; ISEMURA, M. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate on adhesion of murine melanoma cells to laminin. **Cancer Lett.**, v. 173, n. 1, p. 15-20, 2001.

THODY, A. J.; SHUSTER, S. Melanophores, melanocytes and melanin; endocrinology and pharmacology. In: GREAVES, M. W.; SHUSTER, S. **Pharmacology of the Skin**, vol.1, Berlin: Springer-Verlag, p. 257-269, 1989.

TYLER, V.E. Phytomedicines: Back to the future. **J. Nat. Prod**, v. 62, p. 1589-1592, 1999.

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

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

WANG, R.; DASHWOOD, W. M.; LOHR, C. V.; FISCHER, K. A.; PEREIRA, C. B.; LOUDERBACK, M.; NAKAGAMA, H.; BAILEY, G. S.; WILLIAMS, D. E.; DASHWOOD, R. H. Protective versus promotional effects of white tea and caffeine on PhIP-induced tumorigenesis and b-catenin expression in the rat. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 834–839, 2008.

YUSUF, N.; IRBY, C.; KATIYAR, S. K.; ELMETS, C. A.; Photoprotective effects of green tea polyphenols. **Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.**, v. 23, p. 48-56, 2007.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

MARQUES, A. **Amadeu Marques dicionário de Inglês/Português Português /Inglês**, São Paulo: Editora Ática, 2004.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Sistemas de Bibliotecas. **Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos**. Curitiba: Editora da UFPR, 2007.