

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MONIQUE ALVES FRAZON

**EFEITO DO EXTRATO DE CASCAS DE *Rauvolfia sellowii* Müll Arg.
E DE *Himatanthus lancifolius* (Müll) Arg. E DOS ALCALOIDES
ULEÍNA E IOIMBINA NA MELANOGÊNESE**

CURITIBA

2013

MONIQUE ALVES FRAZON

**EFEITO DO EXTRATO DE CASCAS DE *Rauvolfia sellowii* Müll Arg.
EDE *Himatanthus lancifolius* (Müll) Arg. E DOS ALCALOIDES
ULEÍNA E IOIMBINA NA MELANOGÊNESE**

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

Orientadora: Prof^a Almeriane M. Weffort-Santos

CURITIBA

2013

Frazon, Monique Alves

Efeito do extrato de cascas de *Rauvolfia sellowii* Müll Arg. e de *Himatanthus lancifolius* (Müll) Arg. e dos alcaloides uleína e ioimbina na melanogênese / Monique Alves Frazon – Curitiba, 2013.

102 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Almeriane Maria Weffort-Santos
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

Inclui bibliografia

1. Melanogênese. 2. Tirosinase. 3. Uteína. 4. Ioimbina.
5. *Himatanthus lancifolius*. 6. *Rauvolfia sellowii*. I. Weffort-Santos,
Almeriane Maria. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

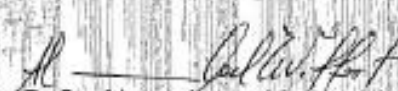
CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO


MONIQUE ALVES FRAZON

Título: **EFEITO DO EXTRATO DE CASCAS DE RAUVOLFIA SELLOWII MÜLL ARG. E DE HIMANTHUS LANCIFOLIUS (MÜLL) ARG. E DOS ALCALÓIDES ULEÍNA E IOIMBINA NA MELANOGÊNESE**


Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Análises Clínicas.



Prof^a. Dr^a. Almeriane Maria Weffort-Santos
Orientadora



Prof^a. Dr^a. Katia Sabrina Paludo
Universidade Estadual de Ponta Grossa



Prof^a. Dr^a. Daniela Almeida Cabrini
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 18 de fevereiro de 2013.

DEDICATÓRIA

À minha Família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar o caminho nessa jornada.

A meus pais, João e Marlene, pela educação, incentivo, carinho e compreensão em todos os momentos para que esse sonho se tornasse realidade.

A meu amor, Márcio, pelo apoio e amor incondicional, me incentivando e me dando forças para perseverar, mesmo nos dias mais difíceis.

Aos meus irmãos, Naná e Mu, pela motivação.

A Professora Almeriane Maria Weffort-Santos, pelo conhecimento, paciência e atenção, indispensáveis para que esse trabalho fosse concretizado, sempre me contagiando pelo seu amor à pesquisa.

Ao Professor Cid Aimbiré de Moraes Santos, pelos ensinamentos, pela amizade e pelos extratos de plantas medicinais.

Aos amigos do laboratório de Hematologia e Farmacognosia, Dani, Thais, Claudia, Kely e Ju, pela amizade, conselhos e por tornar os dias de trabalho muito mais animados.

Aos amigos sempre queridos e presentes, Thais, Mariana, Patrícia.

A Irene e Maria da Graça, por toda a ajuda nesse período.

A CAPES, Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela bolsa de mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade de realizar o mestrado.

A todos que, de alguma maneira, me incentivaram e me deram forças para realizar este trabalho.

EPÍGRAFE

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se
e ver a vida passar; é melhor tentar, ainda
que em vão, que sentar-se fazendo nada
até o final. Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em
conformidade viver...”*

Martin Luther King

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iii
AGRADECIMENTOS.....	iv
EPÍGRAFE.....	v
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
1.1 PELE.....	15
1.2 MELANOGÊNESE.....	16
1.3 MELANINA E RADIAÇÃO.....	22
1.4 VIAS DE SINALIZAÇÃO DA MELANOGÊNESE.....	22
1.5 DISCROMIAS.....	25
1.6 PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE NA MELANOGÊNESE.....	29
2 OBJETIVO.....	33
2.1 OBJETIVO GERAL.....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	34
3.2 PREPARO DO EXTRATOS.....	34
3.3 SOLUÇÕES.....	35
3.4 ENSAIOS.....	39
3.4.1 Linhagem celular e manutenção.....	39
3.4.2 Viabilidade celular.....	39
3.4.3 Toxicidade celular.....	39
3.4.4 Preparo do lisado celular como fonte de tirosinase.....	40
3.4.5 Preparo do lisado celular de células tratadas.....	40
3.4.6 Doseamento de proteína totais no lisado celular.....	41
3.4.7 Mensuração da atividade de tirosinase de cogumelo.....	41
3.4.8 Mensuração da atividade de tirosinase extraída de células B16F10.....	42

3.4.9 Mensuração da atividade de tirosinase celular tratada.....	43
3.4.10 Determinação do conteúdo de melanina.....	43
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	44
4.1 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE.....	44
4.1.1 Ensaio do MTT.....	45
4.1.2 Ensaio com corante Vermelho Neutro.....	49
4.1.3 Ensaio com Cristal Violeta.....	52
4.1.4 Linhagem celular B16F10.....	55
4.1.5 Efeito do Dimetilsulfóxido sobre a viabilidade da linhagem B16F10.....	56
4.1.6 Efeitos do cloreto de amônio e da L-tirosina sobre a viabilidade da linhagem B16F10.....	58
4.1.7 Efeitos dos extratos de <i>H. lancifolius</i> e <i>R. sellowii</i> e dos alcaloides uleína e ioimbina sobre a viabilidade da linhagem B16F10.....	59
4.1.7.1 <i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll) Arg.....	60
4.1.7.2 Uleína.....	61
4.1.7.3 <i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.....	63
4.1.7.4 Ioimbina.....	64
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	66
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10.....	73
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE E FORMAÇÃO DE MELANINA EM CÉLULAS B16F10.....	79
4.4.1 Influência dos extratos e alcaloides na atividade de tirosinase basal de células B16F10.....	80
4.4.2 Influência dos extratos e alcaloides na atividade de tirosinase de células B16F10 “sob estímulo”.....	81
4.4.3 Quantificação de melanina.....	84
4.4.3.1 Doseamento de proteínas.....	84
4.4.3.2. Influência dos extratos e alcaloides no conteúdo de melanina basal.....	86
4.4.3.3. Influência no conteúdo de melanina sob estímulo.....	87
5 CONCLUSÃO.....	93
6 REFERÊNCIAS.....	94

LISTA DE TABELAS

TABELA 1– ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS.....	34
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1–	CAMADAS DA EPIDERME.....	15
FIGURA 2–	VIA DE SÍNTESE DE EUMELANINA E FEOMELANINA.....	19
FIGURA 3–	INTERAÇÃO ENTRE ULEÍNA E IOIMBINA E O REAGENTE DO MTT.....	46
FIGURA 4–	INTERAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS DE PLANTAS E REAGENTES DO MTT.....	48
FIGURA 5–	INTERAÇÃO DA ULEÍNA E DA IOIMBINA COM O REAGENTE DO VERMELHO NEUTRO.....	50
FIGURA 6–	INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS COM O REAGENTE DO VERMELHO NEUTRO.....	51
FIGURA 7–	INTERAÇÃO DA ULEÍNA COM O CRISTAL VIOLETA.....	52
FIGURA 8–	INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS COM O CRISTAL VIOLETA.....	54
FIGURA 9–	ASPECTOS FENOTÍPICOS DA LINHAGEM CELULAR B16F10.....	55
FIGURA 10–	EFEITOS DO DMSO SOBRE O COMPORTAMENTO DA LINHAGEM CELULAR B16F10.....	57
FIGURA 11–	EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E L-TIROSINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	59
FIGURA 12–	EFEITO DO EXTRATO DE <i>H. lancifolius</i> SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	60
FIGURA 13–	EFEITO DO ALCALÓIDE ULEÍNA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	62
FIGURA 14–	EFEITO DO EXTRATO DE <i>R. sellowii</i> SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	63
FIGURA 15–	EFEITO DO ALCALÓIDE IOIMBINA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.....	65
FIGURA 16–	INFLUÊNCIA DA ULEÍNA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	67
FIGURA 17–	INFLUÊNCIA DA IOIMBINA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	68
FIGURA 18–	EFEITO DO EXTRATO DE <i>H. lancifolius</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	69
FIGURA 19–	EFEITO DO EXTRATO DE <i>R. sellowii</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO.....	70
FIGURA 20–	EFEITOS DA ULEÍNA E DA IOIMBINA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO NA PRESENÇA DE L-TIROSINA.....	71
FIGURA 21–	INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS BF6F10.....	75
FIGURA 22–	INFLUÊNCIA DA IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS BF6F10.....	76
FIGURA 23–	INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE <i>H. lancifolius</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10.....	77

FIGURA 24 – INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE ULEÍNA E IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAIDA DE CÉLULAS B16F10.....	78
FIGURA 25 – INFLUÊNCIA DA ULEÍNA, IOIMBINA E DOS EXTRATOS DE <i>H. lancifolius</i> E <i>R. sellowii</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR BASAL.....	80
FIGURA 26 – INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl	82
FIGURA 27 – INFLUÊNCIA DA IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	82
FIGURA 28 – INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE <i>H. lancifolius</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	83
FIGURA 29 – INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE <i>R. sellowii</i> NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	84
FIGURA 30 – CURVA PADRÃO DE SOROALBUMINA BOVINA TÍPICA DE UM EXPERIMENTO.....	85
FIGURA 31 – CURVA PADRÃO DE MELANINA DE <i>Sepia officinalis</i> TÍPICA DE UM EXPERIMENTO.....	85
FIGURA 32 – INFLUÊNCIA DA ULEÍNA, IOIMBINA E DOS EXTRATOS DE <i>H. lancifolius</i> E <i>R. sellowii</i> NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10.....	86
FIGURA 33 – INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	87
FIGURA 34 – INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE <i>H. lancifolius</i> NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	88
FIGURA 35 – INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE <i>R. sellowii</i> NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	89
FIGURA 36 – INFLUÊNCIA DO ALCALÓIDE IOIMBINA NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH ₄ Cl.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AK	Ácido Kójico
AMPC	Adenosina Monofosfato cíclica
APS	Proteína sinalizadora Agouti (<i>Agouti Signaling Protein</i>)
ATP	Trifosfato de adenosina (<i>Adenosine Triphosphate</i>)
BT	7-(2-amino-2-carboxietil)-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina
BTCA	Ácido 7-(2-amino-2-carboxietil)-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3 carboxílico
CL ₅₀	Concentração tóxica para 50% das células
CL ₇₀	Concentração tóxica para 70% das células
CREB	Elemento responsivo ao AMPC (<i>cAMP Responsive Element Binding</i>)
CV	Cristal violeta
DCT	Dopacromo tautomerase
DHI	5,6-dihidroxiindol
DHICA	Ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ERK	Quinase responsiva a estímulos extracelulares (<i>Extracellular-signal-Regulated Kinase</i>)
GSK3 β	Glicogênio Sintase Quinase 3 β (<i>Glycogen Synthase Kinase 3β</i>)
HL	<i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.)
HQ	Hidroquinona
IO	Ioimbina
L-DOPA	3,4-Dihidroxifenilalanina
L-TIR	Tirosina
JNK/SAPK	Jun amino-terminal quinase/Proteína quinase ativada por estresse (<i>Jun amino-terminal kinases/Stress-activated protein kinases</i>)
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno (<i>Mitogen-activated protein kinases</i>)
MCR-1	Receptor de melanocortina 1 (<i>Melanocortin 1 Receptor</i>)
MITF	Fator de transcrição associado à microftalmia (<i>Microphthalmia-Associated Transcription Factor</i>)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-tetrazólio
MSH α	Hormônio estimulador do melanócitos alfa (<i>Melanocyte-Stimulating Hormone alfa</i>)
NR	Vermelho neutro (<i>Neutral Red</i>)
PBS	Salina tamponada com fosfatos (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)

PKA	Proteína quinase A (<i>Protein Kinase A</i>)
p38 MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno p38 (<i>p38 MAPK-Activated Protein Kinase</i>)
RACK1	Receptor para quinase C ativada 1 (<i>Receptor for Activated C Kinase 1</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RS	<i>Rauvolfia sellowii</i>
TIR	Tirosinase
TRP-1	Proteína relacionada à tirosinase 1 (<i>Tyrosinase Related Protein 1</i>)
TRP-2	Proteína relacionada à tirosinase 2 (<i>Tyrosinase Related Protein 2</i>)
UL	Uleína
UV	Ultravioleta

RESUMO

Melanogênese é um processo complexo que ocorre dentro dos melanossomos, organelas especializadas dos melanócitos da epiderme, culminando na síntese de melanina. O primeiro passo da cascata melanogênica envolve a hidroxilação do aminoácido L-tirosina a L-DOPA, e posterior oxidação deste à dopaquinona, ambas as etapas catalisadas pela tirosinase, a enzima-chave no processo, encontrada amplamente em animais, plantas e fungos. Doenças da pele, como as hiperpigmentações e as hipopigmentações, podem ocorrer devido a alterações na produção de melanina. Espécies vegetais são fontes ricas de substâncias naturais com ação sobre a produção de melanina. O objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial dos extratos preparados das cascas de *H. lancifolius* e de *R. sellowii* e dos alcaloides indólicos uleína e ioimbina na melanogênese. Para tanto, os efeitos de concentrações não tóxicas dessas substâncias, estabelecidas por meio de ensaios de toxicidade sobre células de melanoma murino B16F10 usando os testes do MTT e do Vermelho Neutro, foram avaliados diretamente sobre a atividade das tirosinases de cogumelo e da extraída do lisado celular de células B16F10, assim como em cultura *in vitro* utilizando células B16F10 como modelo experimental, onde se avaliou não só a atividade de tirosinase, mas também a produção de melanina. Os resultados mostraram que os alcaloides indólicos uleína e ioimbina, assim como o extrato de *H. lancifolius*, inibiram significativamente a atividade das diferentes tirosinases e a produção de melanina, demonstrando, pela primeira vez, potencial como agentes antimelanogênicos. O extrato de *R. sellowii*, por sua vez, estimulou de forma significativa a produção de melanina em contraste com pouca interferência na atividade enzimática, sugerindo comprometimento nas vias de sinalização posteriores à ação da tirosinase.

Palavras-chave: melanogênese, tirosinase, uleína, ioimbina, *Himatanthus lancifolius*, *Rauvolfia sellowii*.

ABSTRACT

*Melanogenesis is a complex process that occurs within melanosomes, specialized organelles of melanocytes resident in the epidermis, culminating in the synthesis of melanin. The first two steps of the melanogenic cascade involve the hydroxylation of L-tyrosine to L-DOPA, and subsequently, the oxidation of L-DOPA to dopaquinone, in which both are catalyzed by the action of tyrosinase, the rate limiting enzyme for controlling melanin production, largely found in animals, plants, and fungi. Skin disorders, such as hyperchromias and hypochromias, may be due to changes in melanin production. Several plants, rich sources of natural substances, have been known to act on the production of melanin. The aim of this work was to evaluate the potential of the extracts prepared from the barks of *H. lancifolius* and *R. sellowii* along with the indole alkaloids uleine and yohimbine on melanogenesis. To this end, the effects of non-toxic concentrations of these substances, established by means of the toxicity tests on murine melanoma B16F10 cells using the MTT and Neutral Red methods, were assessed directly on the activities of mushroom tyrosinase and of the enzyme extracted from B16F10 cell lysates, as well as in in vitro culture of B16F10 cells as an experimental model, where not only the activity of tyrosinase has been evaluated but also the melanin content. The results described here showed for the first time that the indole alkaloids uleine and yohimbine as well as the extract of *H. lancifolius* significantly inhibited the activity of the different tyrosinases as well as the melanin production, demonstrating their potential as antimelanogenic agents. The extract of *R. sellowii*, in turn, significantly stimulated melanin production in contrast with little interference in the enzyme activity, suggesting it can alter melanogenesis by acting through pathways down below the tyrosinase steps.*

Keywords: *melanogenesis, tyrosinase, Himatanthus lancifolius, uleine, yohimbine, Rauwolfia sellowii.*

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. PELE

A pele, maior órgão do corpo, está localizado na interface entre os ambientes interno e externo, formando a principal barreira do organismo contra agentes danosos. Tem ação protetora contra patógenos, alérgenos, traumas físicos, substâncias químicas, radiação ultravioleta, assim como regula a homeostase de eletrólitos e a perda transepidermal de água. Outras funções incluem a termorregulação, percepção sensorial e síntese da vitamina D (NICHOLS e KATIYAR, 2010; WOLK e WITTE, 2010).

Esse complexo órgão é formado por duas camadas principais: a epiderme, camada mais externa, e a derme, porção mais interna. O tecido subcutâneo fica localizado logo abaixo da pele, sendo constituído de tecido adiposo (COSTIN e HEARING, 2007).

A epiderme é desprovida de suprimento nervoso e sanguíneo, medindo de 5-100 µm de espessura, que pode chegar até 600 µm nas regiões palmares e plantares (TOBIN, 2006). Este epitélio é composto de quatro camadas não uniformes: estrato córneo (parte mais externa), estrato lúcido, na palma das mãos e planta dos pés; estratos granuloso, espinhoso e basal, este último situado sobre a membrana basal (Figura 1).

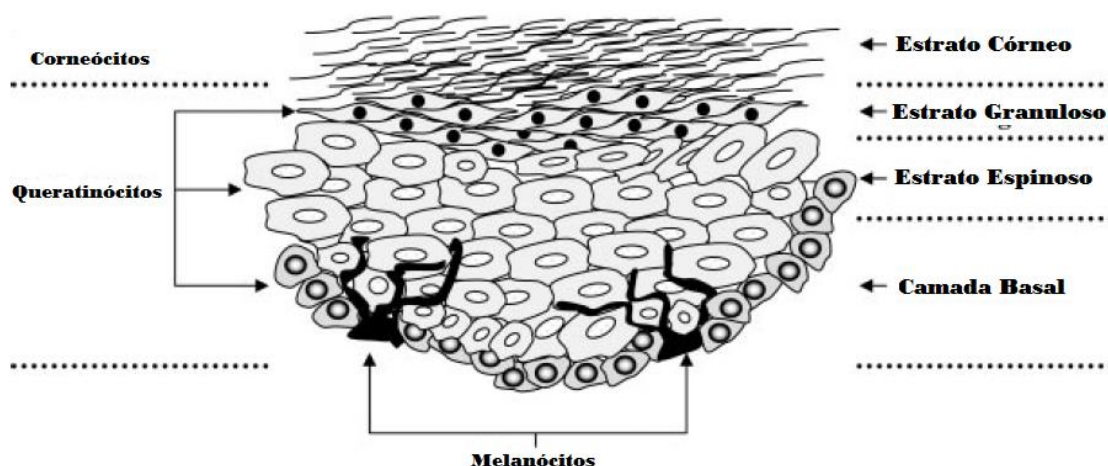


FIGURA 1- CAMADA DA EPIDERME (Adaptado de COSTIN e HEARING, 2007).

A epiderme é composta de vários tipos celulares, sendo que melanócitos e queratinócitos são os predominantes, o primeiro corresponde a cerca de 10% e o último quase 90% da epiderme(COSTIN e HEARING, 2007).Outros tipos celulares presentes incluem células de Langerhans e mastócitos, que têm papel importante na resposta imune, e células de Merkel, células neuroendócrinas responsáveis pela transmissão da sensação do toque (PROKSCH e BRANDER, 2008).

Conforme as células da camada basal proliferam por meio de mitoses, as células subsequentes são empurradas em direção à superfície da pele. Quanto mais externo, mais diferenciados são os queratinócitos, sendo que no estrato granuloso, começam a produzir grânulos, os quais aumentam em tamanho e quantidade no estrato córneo até que a célula atinge plena maturidade, desempenha suas funções, senesce e morre. Como resultado, obtêm-se células cornificadas e que são, agora, denominadas corneócitos, as quais, apesar de não serem células viáveis, são bioquimicamente ativas (ELIAS, 2005).

A derme é composta de tecido conectivo, contendo moléculas de adesão variadas, como colágeno, elastina, proteoglicanas, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, e os fibroblastos. Na derme estão localizados todo o aparato secretório, vascular, linfático e nervoso da pele. Além disso, células do sistema imunológico, como mastócitos e macrófagos, estão aí presentes(THURSTAN e GIBBS, 2012).

1.2. MELANOGÊNESE

Ao processo de produção de biopolímeros pigmentados, da qual a melanina é o maior representante e que fornece cor para cabelo e pele e, ainda, protege contra os danos gerados pela radiação ultravioleta, denomina-se melanogênese (KONDO e HEARING, 2011). Além da pele e cabelos, a melanina também pode ser encontrada nas células epiteliais pigmentares da retina e em algumas partes do sistema nervoso central(LIU e FISHER, 2010).

A melanina é um componente de importância fundamental no sistema de pigmentação humano. Sua biossíntese é um complexo processo que ocorre exclusivamente dentro de uma pequena população de células, incluindo melanócitos e células pigmentadas da retina. Estas células, mais especificamente seus precursores, os melanoblastos, derivam da crista neural, sendo formados no segundo mês de gestação. Após formação, migram para sítios alvo, como a epiderme, a derme, o trato

uveal dos olhos, os folículos capilares, as leptomeninges e para a parte interna do ouvido, e se diferenciam em melanócitos (SCHIAFFINO, 2010).

Na derme, conforme a gestação avança, os melanócitos diminuem em quantidade e desaparecem antes do nascimento, enquanto que os melanócitos epidérmicos se acomodam sob a junção dermo-epidérmica(COSTIN e HEARING, 2007).

Dentro dos melanócitos, mais especificamente nos melanossomos, os pigmentos são sintetizados, maturados e armazenados(COSTIN e HEARING, 2007; SCHIAFFINO, 2010).Os melanossomos são organelas ligadas à membrana e especializadas na síntese de melanina, os quais apresentam características semelhantes aos lisossomos, como o pH luminal ácido, por exemplo (LIU, FISHER 2010; SCHIAFFINO, 2010).

Após a acomodação do melanócito nos tecidos alvo, ocorre a maturação dos melanossomos e posterior síntese da melanina. Esse processo é composto por quatro estágios, classificados de acordo com sua ultraestrutura morfológica e a quantidade de melanina formada (COSTIN e HEARING, 2007).No primeiro estágio (I), os melanossomos se apresentam como vacúolos esféricos, com ausência de atividade de tirosinase e, conseqüentemente, sem melanina. Posteriormente, vesículas contendo tirosinase migram do complexo de Golgi para os melanossomos e, agora, os melanossomos contêm tirosinase e pouca melanina. Neste estágio (II), os melanossomos se alongam e fibrilas começam a aparecer. Em seguida, ocorre um aumento na síntese de melanina e o pigmento formado se deposita nas fibrilas internas (III). Finalmente, o melanócito está repleto de melanina e apresenta melanossomos elípticos, sendo esta a última fase (IV) de maturação dos melanócitos (MARKS e SEABRA, 2001).

Na pele, os melanócitos estão situados na camada basal da epiderme, de modo disperso, porém regular, onde interagem com os queratinócitos na epiderme, e com os fibroblastos na derme, através de contato célula a célula e fatores de secreção (KONDO e HEARING, 2011). Estima-se que cada melanócito esteja em contato, por meio de seus dendritos, com aproximadamente quarenta queratinócitos e essa relação queratinócito/melanócito é chamada unidade melano-epidérmica (COSTIN e HEARING, 2007).

Na pele, os melanócitos produzem dois tipos de melanina quimicamente diferentes: a eumelanina, pigmento de coloração que varia de marrom a preto, altamente polimerizada e insolúvel na maioria dos solventes, e a feomelanina, de tons

amarelo-avermelhados e menos polimerizada, solúvel em bases. *In vivo* existe uma combinação dessas duas melaninas (COSTIN e HEARING, 2007; KONDO e HEARING, 2011). Ainda, nos neurônios dopaminérgicos, ocorre a síntese de neuromelanina, importante na proteção do cérebro contra certos metais, como mercúrio e chumbo, e cátions redox como cobre e cromo (FEDOROW *et al*, 2005).

O processo de formação da melanina tem início com uma série de reações oxidativas com o aminoácido L-tirosina, na presença ou ausência de grupos sulfidríla da cisteína ou glutatona (Figura 2) (SCHIAFFINO, 2010). A L-tirosina é um aminoácido aromático não essencial, que, além de servir como precursor da melanina está presente no processo de formação de catecolaminas e hormônios tireoidianos (SLOMINSKI *et al*, 2011). Este aminoácido é hidroxilado a L-DOPA por ação da tirosinase, uma importante e indispensável enzima no processo (SIMON *et al*, 2009; SLOMINSKI *et al*, 2011). Em seguida, a L-DOPA, uma molécula altamente reativa, é oxidada pela tirosinase a dopaquinona, intermediário que exerce papel central na cascata melanogênica, não somente para a formação da eumelanina como também na feomelanogênese (COSTIN e HEARING, 2007).

Portanto, a enzima tirosinase apresenta uma ação de monofenolase ao catalisar a hidroxilação da primeira etapa, e de difenolase, por catalisar a oxidação da segunda etapa (MAPUNYA *et al*, 2012). A confirmação da regulação positiva que a L-tirosina apresenta sobre a melanogênese foi primeiramente relatada em células de melanoma B16F10. Nesta linhagem, a L-tirosina e L-fenilalanina, além de estimularem a melanogênese, aumentam a formação de dendritos e melhoram a capacidade de deslocamento das células (SLOMINSKI *et al*, 2011).

Na via eumelanogênica, após a formação de dopaquinona, ocorre sua ciclização espontânea por adição intramolecular do grupo amino, formando a ciclodopa (leucodopacromo), a qual é um intermediário instável que, por sua vez, sofre rápida oxidação, dando origem ao dopacromo e L-DOPA (SIMON *et al*, 2009).

O dopacromo é um pigmento de coloração vermelho-alaranjada que pode formar o 5,6-dihidroxiindol (DHI) e o ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA), na ausência ou presença da dopacromo tautomerase (DCT), também chamada Proteína Relacionada a Tirosinase 2 (TRP-2) (JIMENEZ-CERVANTES *et al*, 2001; SIMON *et al*, 2009).

Na presença da DCT, a L-dopacromo sofre tautomerização e se transforma quase que exclusivamente em DHICA. Já na ausência dessa enzima e em pH neutro, ocorre decomposição espontânea da L-dopacromo por descarboxilação, formando DHI

e DHICA na proporção 70:1. Posteriormente, na presença de oxigênio, DHI sofre oxidação, fazendo troca redox com dopaquinona, gerando L-DOPA. No caso da DHICA, em humanos, primeiramente ocorre a oxidação desta em quinona, por ação da tirosinase. Em ratos, outra enzima é requerida neste processo, a Proteína Relacionada a Tirosinase 1 (TRP-1 ou DHICA oxidase) (JIMENEZ-CERVANTES *et al.*, 2001; SIMON *et al.*, 2009). Logo, a eumelanina consiste de polímeros heterogêneos formados por unidades de DHI e DHICA em diferentes graus oxidativos (MENEZES *et al.*, 2004; SIMON *et al.*, 2009; KONDO e HEARING, 2011).

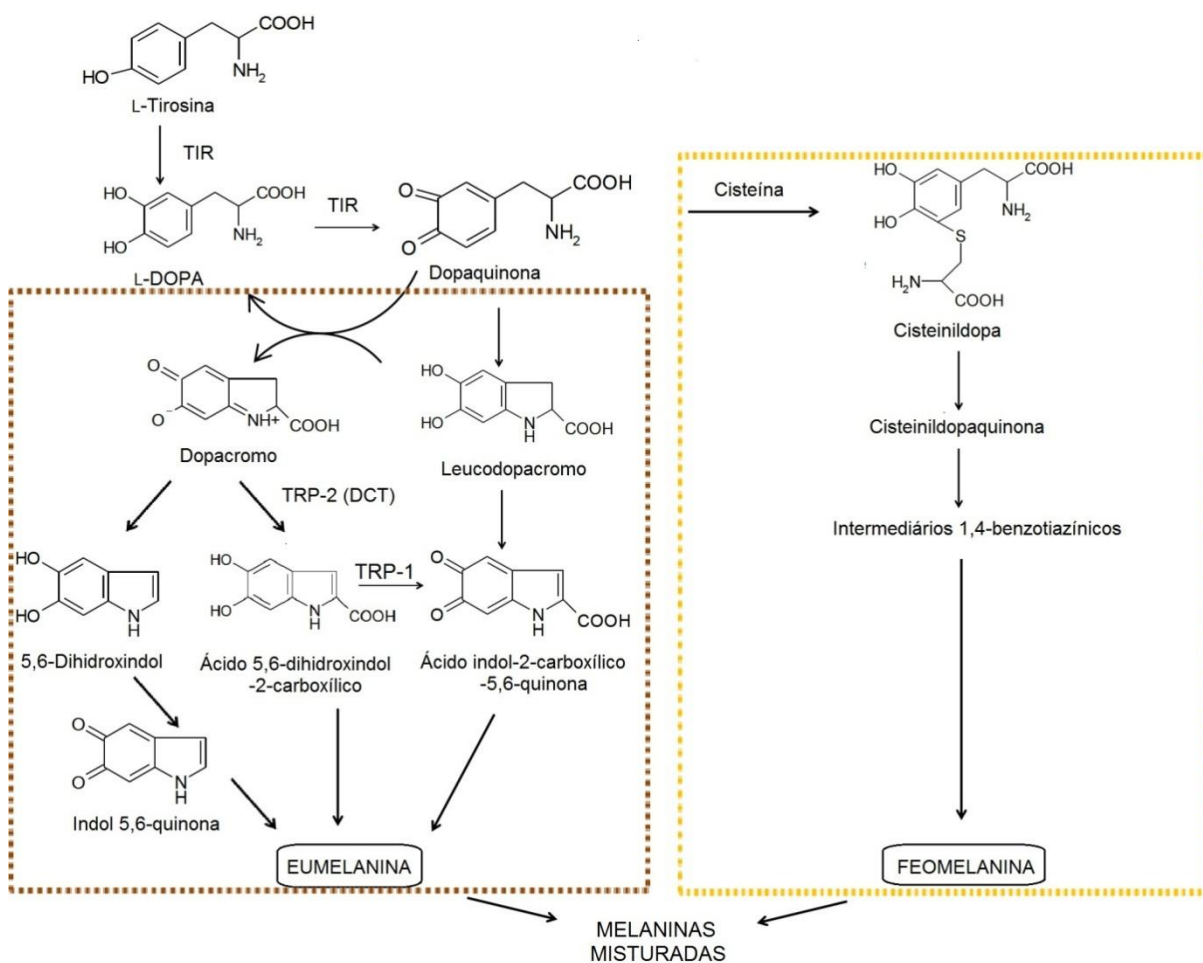


FIGURA 2- VIA DE SÍNTESE DE EUMELANINA E FEOMELANINA. (Adaptado de CHANG, 2009).

Na via de formação de feomelanina, após a formação da dopaquinona, o primeiro passo desta cascata envolve a conjugação de dopaquinona com cisteína, principalmente, ou glutathione, levando a formação de isômeros de cisteinildopa, principalmente 5-S-cisteinildopa (74%) e 2-S-cisteinildopa(14%) (MENEZES *et al.*,

2004; COSTIN e HEARING, 2007). Em um próximo passo, ocorre oxirredução destes isômeros, na presença de dopaquinona, dando origem a L-dopa e cisteinildopaquinona. Este último, por sua vez, sofre ciclização através de desidratação para formar a orto-quinonimina, que por rearranjo com ou sem descarboxilação, gera intermediários 1,4-benzotiazínicos, 7-(2-amino-2-carboxietil)-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina (BT) e o ácido 7-(2-amino-2-carboxietil)-5-hidroxi-2H-1,4-benzotiazina-3 carboxílico (BTCA), na proporção de 85:15. Tanto BT como BTCA são unidades formadoras do pigmento feomelanina, formado após polimerização (SIMON *et al*, 2009; KONDO e HEARING, 2011). Estruturalmente, a feomelanina consiste de porções de benzotiazina, com contribuições do benzotiazol e isoquinolina (SIMON *et al*, 2009).

Dentro do melanócito, *in vivo*, ocorre a produção de ambos os tipos de melanina, em diferentes proporções, de acordo com a atividade da tirosinase e a disponibilidade de cisteína e tirosina nos melanossomos. Dependendo do tipo de melanina produzida, os melanossomos adquirem formato esférico, nos feomelanossomos, ou elipsoide, nos eumelanossomos (SIMON *et al*, 2009; KONDO e HEARING, 2011).

Alterações pequenas no ambiente celular podem afetar os melanossomos, e conseqüentemente, a pigmentação (COSTIN e HEARING, 2007). O pH, por exemplo, exerce significativa ação no processo de formação de melanina. Com neutralização do pH do melanossomo, em modelos de melanoma e melanócito humanos, ocorre aumento na síntese de eumelanina em detrimento da outra via. Já em pH ácido, há diminuição da atividade da tirosinase e, ainda, lenta ciclização da dopaquinona, com rápida ciclização de cisteinildopaquinona, favorecendo a feomelanogênese (SIMON *et al*, 2009).

Ambos os tipos de melanina exibem diferentes propriedades, apresentando respostas distintas frente à radiação ultravioleta (UV). A eumelanina tem ação fotoprotetora, além de agir como antioxidante e neutralizadora de radicais livres; já a feomelanina apresenta-se pró-oxidante, produzindo espécies reativas de oxigênio e radicais livres (SIMON *et al*, 2009). Ademais, o conteúdo de glutathiona reduzida tem influência direta na produção das melaninas, sendo que alta concentração desta enzima antioxidante favorece a formação de eumelanina.

Após a produção de melanina, os melanossomos maduros se movem para próximo da membrana plasmática e são transportados aos queratinócitos circunjacentes por meio dos dendritos dos melanócitos, através dos microtúbulos, que agem como trilhos para essa transferência e, ainda, pela ação de filamentos de actina (ALALUF *et al*, 2002; COSTIN e HEARING, 2007; KONDO e HEARING, 2007). Uma

vez transferidos, estes se movem para a região perinuclear dos queratinócitos, onde exercem seu papel de proteção ao DNA (LIU e FICHER, 2010).

Entre os diferentes tipos de pele, e também entre diferentes partes do corpo, o número de melanócitos é mais ou menos constante, e o que torna presente as diferenças nos fenótipos são o tamanho e o grau de maturidade dos melanossomos, além da disposição destes nos queratinócitos, gerando distinções na quantidade de melanina produzida (AHN e RHO, 2011; MAPUNYA *et al*, 2012).

Indivíduos de pele mais escura apresentam mais melanossomos em estágio IV de maturação, maiores, e sintetizam tirosinase de maneira mais rápida do que indivíduos de pele mais clara (THONG *et al.*, 2003). Ainda, a eficiência no processo de transferência do pigmento aos queratinócitos também é um fator de interferência no resultado da cor final, podendo ser mais ou menos regularmente distribuídos ao redor do núcleo, para proteção da célula da radiação UV (SCHIAFFINO, 2010). Com relação à proporção eumelanina/feomelanina entre as diferentes cores de pele, mesmo nos indivíduos de pele mais clara, menos de 10% dos melanossomos estão ocupados com a melanina de coloração amarelo a avermelhado, corroborando que o tamanho, dentre outros fatores, são mais decisivos na coloração final da pele.

Uma enzima-chave no processo da síntese da melanina é a tirosinase (EC 1.14.18.1). Essa monofenol oxigenase pode ser encontrada em animais, plantas e fungos (HEARING, 2011). Trata-se de uma glicoproteína transmembrana, de cadeia simples, dependente de cobre, multifuncional, que catalisa os primeiros passos da cascata melanogênica, compreendendo a hidroxilação da L-tirosina e a oxidação de *o*-difenois em *o*-quinonas (AHN e RHO, 2011; JIMENEZ-CERVANTES *et al.*, 2001).

Sabe-se que os primeiros relatos sobre a ação catalítica da tirosinase foram obtidos a partir de extratos de cogumelos, sendo que estes são utilizados até hoje como fonte dessa relevante enzima (HEARING, 2011).

A tirosinase compartilha algumas similaridades estruturais com outras enzimas envolvidas no processo melanogênico, como a dopacromo tautomerase e a TRP-1 (COSTIN e HEARING, 2007).

Além de estar envolvida no processo melanogênico, em frutas e legumes esta enzima catalisa a oxidação de compostos fenólicos as suas quinonas correspondentes, importante no controle de qualidade destes produtos. Ademais, é responsável pelo escurecimento enzimático dessas frutas, apresentando importância econômica (MAPUNYA *et al*, 2012).

1.3. MELANINA E RADIAÇÃO

Em alguns animais inferiores, a pigmentação é de extrema importância para a sobrevivência no processo de camuflagem e, também, na regulação térmica. Nos seres humanos, esse pigmento é importante não somente por razões cosméticas, mas principalmente para a defesa contra danos causados pela radiação UV (HEARING, 2011).

A radiação UV faz parte do espectro eletromagnético da luz solar entre 200 e 400nm, e pode ser dividida em três categorias, segundo seu comprimento de onda: UVC, com comprimento de ondas curto, entre 200 e 280 nm; UVB, comprimento de ondas médio, entre 280 e 320nm; e UVA, com comprimento de ondas longo, entre 320 e 400nm (HUSSEIN, 2005; SVOBODOVA *et al*, 2006). Na estratosfera, toda a radiação UVC é absorvida por meio do oxigênio atmosférico, para produzir ozônio. O UVB também é parcialmente absorvido nesta etapa, porém, devido à diminuição da camada de ozônio, cada vez mais radiação UVB atinge a superfície do planeta (LIU e FISHER, 2010).

Sabe-se que a pigmentação basal é geneticamente determinada e o grau de pigmentação de cada indivíduo é um fator relevante quando consideramos o câncer de pele induzidos pela radiação UV, sendo que os indivíduos de pele clara têm propensão de trinta a quarenta vezes maior de desenvolver este tipo de câncer do que aqueles de pele mais escura (HILL e LI, 1997; HEARING, 2011). Isso pode ser explicado pelo papel de filtro que a melanina exerce, protegendo o DNA celular, e ainda, uma remoção mais eficiente das células já danificadas (LIU e FISHER, 2010; SCHIAFFINO, 2010).

Alguns agentes, incluindo a radiação UV, podem causar injúria nas células epidérmicas, gerando hiperpigmentação pós-inflamatória, causada tanto pelo estímulo sobre os melanócitos, quanto pelo estresse oxidativo gerado (AHM e RHO, 2011).

1.4. VIAS DE SINALIZAÇÃO DA MELANOGÊNESE

O processo de síntese de melanina está sujeito a uma série de controles regulatórios intrínsecos e extrínsecos, oriundos do ambiente, como a radiação UV, ou, ainda, de células vizinhas (BELLEI *et al.*, 2008). Fatores como o hormônio estimulador de melanócitos alfa (MSH α), agentes que aumentam níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPC), como forskolina, glicirrizina são alguns exemplo de substância que estimulam a síntese de melanina, e proteína sinalizadora agouti (APS) como principal

representante regulador negativo da melanogênese (JIMENEZ-CERVANTES *et al.*, 2001; PARK *et al.*, 2010).

Uma das cascatas sinalizadoras que participa da síntese de melanina é a da proteína quinase A (PKA) dependente de AMPc (PARK *et al.*, 2011). A ativação desta via é feita por melanocortinas secretadas a partir da propiomelanocortina, um precursor hormonal e expresso no queratinócito (SCHIAFFINO, 2010). O MSH α gerado a partir deste precursor é um peptídeo bioativo de treze aminoácidos. Este hormônio liga-se a seu receptor MCR-1, mais especificamente ao receptor acoplado a proteína Gs, ativando a adenililciclase. O MCR-1 é um receptor transmembrana, composto por 317 aminoácidos e expresso, principalmente, em melanócitos, porém pode também ser encontrado em outros tipos celulares, como células do sistema imune (SCHIAFFINO, 2010; PARK *et al.*, 2011). Com a ligação do MSH α ao MCR-1, ocorre aumento dos níveis intracelulares de AMPc, o qual, por sua vez, promove a ativação da PKA, a qual fosforila o elemento responsivo ao AMPc (CREB) na região da serina 133, região esta promotora do gene do fator transcrição associado à microftalmia (MITF) (SCHIAFFINO, 2010; PARK *et al.*, 2011).

Essa fosforilação induz a expressão do MITF, que ativa a expressão das enzimas envolvidas na melanogênese como a tirosinase, a TRP-1 e a TRP-2 (Dopacromo tautomerase). Assim, o processo melanogênico é estimulado. O MITF é um dos reguladores transcricionais da atividade de tirosinase mais importantes e críticos no processo, estando envolvido não somente na pigmentação, mas também na sobrevivência e diferenciação dos melanócitos (SCHIAFFINO, 2010; PARK *et al.*, 2011; LIU e FISHER, 2010).

O MCR-1 também exerce ação-chave no processo e apresenta atividade basal mantida pela própria atividade constitutiva, ou por secreção parácrina ou autócrina de agonistas. Sob ativação do MCR-1, os melanócitos produzem e transferem melanina para os queratinócitos (SCHIAFFINO, 2010).

A radiação UV é o principal estímulo externo desse receptor, levando a intensa ativação do MCR-1 nos melanócitos. Ainda, sob radiação UV, ocorre nos queratinócitos aumento da expressão de p53, que induz a transcrição da propiomelanocortina e do MSH α . Este, por sua vez, se liga no MCR-1, iniciando a cascata que levará a formação da melanina (LIU e FISHER, 2010). Com isso, há um aumento na síntese de eumelanina, protegendo o tecido do estresse oxidativo e da radiação UV, além de aumentar a atividade de reparação no DNA, prevenindo a geração de melanoma. Em contraste, a diminuição da atividade do MCR-1 leva a formação de feomelanina, que é

menos efetiva em proteger a pele contra raios UV, além de ser fotossensibilizante, o que culmina no aumento de espécies reativas de oxigênio, que podem lesionar o DNA (SCHIAFFINO, 2010).

Em contrapartida, a Proteína Sinalizadora Agouti (APS) pode suprimir a atividade do MCR-1. Esta proteína é formada de 131 aminoácidos, de sinalização parácrina, produzida na derme e na base de folículos capilares. Age como antagonista endógeno do MCR-1 e faz sua ação competindo com melanocortinas, inibindo seus efeitos, além de promover a estabilização da conformação da forma inativa do MCR-1 (SCHIAFFINO, 2010).

As proteínas Wnt também estão envolvidas com a indução de proliferação, migração e diferenciação dos melanócitos (BELLEI *et al.*, 2010). A cascata Wnt é iniciada através da ligação dessa proteína ao seu receptor, inibindo a glicogênio sintase quinase 3 β (GSK3- β). Essa inibição leva ao acúmulo de β -catenina no citoplasma, que se transloca para o núcleo. Com o aumento de β -catenina no núcleo, ocorre a indução da expressão do receptor para quinase C ativada1 (RACK1), induzindo melanogênese e aumentando a sobrevivência e proliferação de células. A ativação de GSK3- β leva à fosforilação da β -catenina, o que marca sua destruição pelo proteossoma. Portanto o GSK3- β age como regulador negativo da via de sinalização Wnt (BELLEI *et al.*, 2008). A via de sinalização Wnt/GSK3- β / β -catenina é essencial para a síntese de melanina em células de melanoma e melanócitos. Substâncias como os ésteres de forbol e fatores de crescimento inibem GSK3- β , aumentando síntese de melanina (BELLEI *et al.*, 2008).

A proteína quinase ativada por mitógeno p38 (p38 MAPK) também está relacionada com o aumento da síntese de melanina. A via p38 MAPK ativada está envolvida com melanogênese induzida por MSH α , aumento da expressão MITF e ativação da transcrição da tirosinase (PARK *et al.*, 2010). A família das MAPK, envolvidas em uma gama de atividades celulares, participam da regulação da síntese de melanina. A p38 MAPK está envolvida na ativação da melanogênese por aumentar a expressão de proteínas importantes no processo. A ativação dessa via estimula expressão do MITF e, conseqüentemente, da tirosinase. Em contrapartida, outros dois membros dessa família das MAPK, a quinase responsiva a estímulos extracelulares (ERK)1/2 e c-JUN N-terminal ou proteína quinase ativada por estresse (JNK/SAPK), agem inibindo a via melanogênica. Portanto, a ativação da p38 MAPK e a inibição da ERK e/ou da JNK/SAPK estimulam a expressão do MITF, que por sua vez estimula a

expressão de enzimas melanogênicas, culminando no estímulo da síntese de melanina (PARK *et al.*, 2010).

1.5. DISCROMIAS

Existem diversas desordens do sistema pigmentário que levam a problemas que vão da hipopigmentação à hiperpigmentação. Independente da natureza da discromia, a uniformização da cor da pele é um anseio universal (ORTONNE e BISSET, 2008).

O processo de hiperpigmentação da pele ocorre principalmente devido à hiperatividade da enzima tirosinase, enquanto sua hipoatividade leva a hipopigmentação. Um excesso de produção da enzima está associado com a idade do indivíduo, enquanto que a baixa atividade da tirosinase pode estar presente em qualquer faixa etária, pois depende de fatores hereditários (MAPUNYA *et al.*, 2012).

Dentre as hiperpigmentações mais comuns, podem-se citar a hiperpigmentação pós-inflamatória, o lentigo solar, o melasma e as efélides. Embora a melanina apresente um importante papel na proteção da pele contra a radiação UV solar, a produção e acúmulo deste polímero em excesso levam a alterações pigmentares. Sendo assim, a exposição em demasia a esta radiação tem um papel de destaque nesse processo (KIM *et al.*, 2012).

Na hiperpigmentação pós-inflamatória, a qual é desencadeada por injúrias à pele, exposição à luz UV solar, lesões acneicas, picadas de inseto e ação de substâncias químicas irritantes são as principais causas (LLOYD e KAMMER, 2011). Neste tipo de hiperpigmentação, pode ocorrer aumento da pigmentação epidérmica e dérmica. No lentigo solar, também conhecido como mancha de idade, a exposição solar crônica é apontada como agente desencadeador, gerando uma alteração crônica inflamatória no total. Neste caso, alterações genéticas na área hiperpigmentada também parecem estar presentes (ORTONNE e BISSET, 2008).

No melasma, a exposição à radiação solar é principal fator no desenvolvimento desta desordem pigmentar. Este tipo de hiperpigmentação que ocorre na forma de lesões simétricas, principalmente na face, parece estar ligado também a um componente hormonal, a progesterona. Sendo assim, o melasma é frequentemente associado com gravidez e utilização de anticoncepcionais (CURTO *et al.*, 1999; ORTONNE e BISSET, 2008).

Com o envelhecimento da população mundial e a exposição cada vez maior à radiação solar, é cada vez mais importante o tratamento das desordens pigmentares (MACRINI *et al.*, 2009).

Muitas vias e proteínas estão envolvidas na cascata melanogênica, e, por conseguinte, vários potenciais alvos para reduzir a pigmentação podem ser evidenciados (ORTONNE e BISSET, 2008).

Existe uma grande variedade de extratos vegetais e substâncias naturais utilizadas para o tratamento das hiperpigmentações. A pobre penetração destas substâncias na pele e o efeito citotóxico e mutagênico de compostos, como aqueles derivados da hidroquinona, por exemplo, levam a procura de novos agentes para o tratamento da hiperpigmentação (MAPUNYA *et al.*, 2012).

A aplicação de agentes que tem ação de inibir a enzima tirosinase é uma alternativa cada vez mais utilizada em produtos cosméticos e, atualmente, é um dos caminhos mais efetivos para a ação despigmentante. Contudo, a ação inibitória sobre a atividade enzimática não é a única opção. A redução da pigmentação pode ser alcançada por diferentes mecanismos. Antes da síntese de melanina, agentes podem agir sobre a regulação da transcrição desta enzima, inibição da glicosilação da tirosinase, inibição da estimulação do melanócitos e, ainda, como antagonistas do hormônio estimulador de melanócitos. Durante a síntese de melanina, ação inibitória sobre a enzima tirosinase e ação quelante são as principais abordagens. Após a produção da tirosinase, agentes antioxidantes podem ser utilizados. Posterior à produção de melanina, é possível inibir a transferência desta dos melanossomos dos melanócitos aos queratinócitos ou, ainda, aumentar o *turnover* epidérmico, porém, este último, com efetividade limitada (ORTONNE e BISSET, 2008).

O agente despigmentante ideal deve possuir uma série de atributos que incluem ação potente, rápida, com pouco ou nenhum efeito colateral, além de possuir ação duradoura, agindo em uma ou mais etapas do processo melanogênico (BRIGANTI *et al.*, 2003).

A hidroquinona (1,4-dihidroxibenzeno) tem sido utilizada clinicamente desde a década de 60 e, embora sua utilização tenha sido banida na União Europeia e sua aprovação prévia tenha sido revogada em 2006 nos Estados Unidos, é ainda considerado o padrão ouro dentre os tratamentos tradicionais tópicos para a hiperpigmentação e tem sido amplamente utilizada como agente despigmentante, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (ZHU e GAO, 2008). Este composto fenólico de origem natural exerce sua ação ligando-se a grupos histidina no sítio ativo da tirosinase e inibindo a

síntese de DNA e RNA do melanócito. Porém, sua utilização traz uma série de riscos, uma vez que seus efeitos tóxicos nas células produtoras de melanina são permanentes, devido à indução da geração de espécies reativas de oxigênio e consequente injúria na membrana plasmática melanocítica. Esta toxicidade não está limitada apenas aos melanócitos (GILLBRO e OLSSON, 2011).

Além da citotoxicidade, efeitos adversos, como irritação e dermatite de contato, são comuns e relativamente fáceis de tratar. Contudo, uma reação mais grave, chamada ocronose exógena, de difícil tratamento, já foi descrita na literatura (CHARLÍN *et al.*, 2007). Este tipo de efeito, relacionado com o uso prolongado e com altas doses deste despigmentante, está mais presente em indivíduos de pele mais escura. Caracteriza-se por um escurecimento progressivo da área onde a hidroquinona foi utilizada, com degeneração de fibras elásticas e colágenas (PARVEZ *et al.*, 2006).

Um derivado natural da hidroquinona, o arbutin, também foi descrito com atividade antimelanogênica, mas com efeito melanotóxico menor. Esta substância apresenta estrutura semelhante ao substrato tirosina, gerando uma inibição competitiva da tirosinase, especificamente com ação sobre a atividade monofenolase da enzima. Entretanto, na presença de L-DOPA como cofator, é oxidado como um substrato monofenol. Portanto, para exercer sua ação despigmentante, este cofator não deve estar disponível (PARVEZ *et al.*, 2006). Sabe-se que sua forma alfa (alfa-arbutin), exerce ação mais efetiva e é mais estável do que o próprio arbutin, sendo utilizado como substituto deste (ZHU e GAO, 2008).

Com um mecanismo de ação diferente dos anteriores, o ácido azelaico, um ácido dicarboxílico saturado isolado de culturas de *Pityrosporum ovale*, age ligando-se a grupos amino ou carboxil e, assim, ao bloquear o acesso da tirosina ao seu sítio ativo, age como inibidor competitivo (BRIGANTI *et al.*, 2003). Contudo, apresenta ação antiproliferativa e citotóxica (GILLBRO e OLSSON, 2011).

Outra substância de origem natural, o ácido kójico ou 5-hidroxi-2-hidroximetil-4H-piran-4-ona, tem sido amplamente utilizado como agente despigmentante, no ocidente e no oriente. Este inibidor da tirosinase é derivado, principalmente, de espécies de fungos como *Aspergillus* e *Penicillium* e exerce sua função quelando íons cobre no sítio ativo da enzima tirosinase. Além disso, possui ação antioxidante, retardando ou prevenindo as reações de oxidação envolvidas na cascata melanogênica. Ainda, possui a ação de neutralizar radicais livres. É o segundo tratamento de escolha, ficando atrás da hidroquinona (PARVEZ *et al.*, 2006). Porém, reações de dermatite de contato e sensibilização já foram descritas (GILLBRO e OLSSON, 2011).

Diversas substâncias fenólicas já foram descritas com atividade antimelanogênica. Na pigmentação, esta classe de substâncias exerce seus efeitos devido à ação antioxidante e quelante de metais no sítio ativo da enzima, porém também podem apresentar ação inibidora sobre a enzima tirosinase. Dentre aqueles com ação despigmentante frequentemente utilizados encontram-se a aloesina, com ação inibitória sobre a tirosinase e DOPA oxidase, derivados hidroxiestibenos, como o resveratrol, que apresenta ação inibitória sobre a tirosinase e também na expressão do fator de transcrição associado à microftalmia e, ainda, substância oriundas do extrato de licorice, como a glabridina, também com ação inibitória sobre a enzima tirosinase (GILLBRO e OLSSON, 2011).

Agindo por uma via diferente, a niacinamida, forma biologicamente ativa da vitamina B3, age inibindo a transferência da melanina dos melanócitos aos queratinócitos, inibindo até 68% da transferência, porém não exerce ação sobre a tirosinase de cogumelo ou na melanogênese em monocultura com melanócitos (HAKOZAKI *et al*, 2002; ZHU e GAO, 2008).

O ácido ascórbico também é uma alternativa bastante utilizada, principalmente associada a outros despigmentante, uma vez que age em diferentes etapas do processo. Exerce sua ação sobre o sítio ativo da enzima, interagindo com íons cobre e, ainda, age reduzindo a dopaquinona e evitando a oxidação da DHICA (KIM *et al.*, 2012). Porém, devido a pobre penetração desta substância na pele, alta instabilidade, sendo rapidamente oxidado e hidrolisado, em solução aquosa, buscou-se a utilização de derivados desta substância. O fosfato de ascorbil magnésio, um éster da vitamina C, apresenta caráter mais lipofílico, melhorando a penetração na pele, além de possuir estabilidade em água e ambientes alcalinos (BRIGANTI *et al.*, 2003).

As discromias associadas com a diminuição ou total falta de pigmentação da pele, denominadas hipocromias, apresentam um caráter genético congênito muito mais importante e proeminente do que as hiperpigmentações, tornando o tratamento mais difícil e complexo. Mais de cem genes estão envolvidos no processo melanogênico. Estas mutações que levam as hipomelanoses podem afetar o desenvolvimento e migração dos melanócitos, como ocorre no Piebaldismo e na síndrome de Tietz, também podem atingir a síntese de melanina, como é o caso do Albinismo ou, ainda, serem decorrentes de desordens na formação do melanossomo e transferência aos queratinócitos, cujos principais exemplos são as síndromes de Hermansky-Pudlak e de Chediak-Higashi (DESSINIOTI *et al.*, 2009).

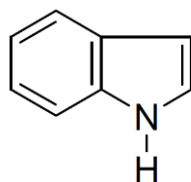
Dentre estas, pacientes com Albinismo tipo 1B, que apresentam atividade de tirosinase baixa, porém presente, podem se beneficiar do tratamento com agentes que estimulem esta enzima. No caso de pacientes com o tipo 1A, com total ausência de tirosinase, este caminho não é possível (DESSINIOTI *et al.*, 2009).

O vitiligo, principal representante de desordens de hipopigmentação, que acomete 1 a 4% da população mundial, é uma desordem complexa que gera manchas hipomelanóticas e perda de melanócitos das áreas afetadas, em especial face e mãos (SPRITZ, 2012).

Embora sua causa seja desconhecida, fatores ambientais, como doenças autoimunes, como o lúpus eritematoso sistêmico e anemia perniciosa, parecem ser estar intimamente associados com essa doença, além dos fatores genéticos (BOWCOCK e VINA, 2012). O stress oxidativo também parece ter um papel importante no vitiligo. Foi demonstrado que a catalase, enzima que degrada o peróxido de hidrogênio, parece estar reduzida nestas áreas despigmentadas. Ademais, peroxidação lipídica e danos na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial são característica presentes nos melanócitos remanescentes no vitiligo (BOISSY *et al.*, 2012).

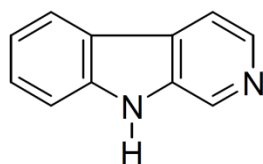
1.6. PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE NA MELANOGÊNESE

A família Apocynaceae apresenta mais de 3.700 espécies, distribuídas em mais de 250 gêneros em áreas tropicais e subtropicais em todo o mundo, sendo que, no Brasil, são conhecidas mais de 400 espécies. Há nessa família, uma das mais importantes fontes de substâncias com ação medicinal, destacando-se quimicamente a presença de alcaloides indólicos (I), para os quais já foram descritas tanto ação estimulatória como inibitória da melanogênese, podendo ser utilizados para o tratamento de desordens pigmentares (PEREIRA *et al.*, 2007).



Park e colaboradores (2010), por exemplo, demonstraram a ação indutora da melanogênese dos alcaloides harmalina e harmalol, ambos apresentando o núcleo β -

carbolina (II), por estimulação da atividade da tirosinase e consequente síntese de melanina em células B16F10, sendo esta ação dependente da concentração e do tempo de exposição. Além disso, foi verificado que esta ação, pelo menos em parte, ocorreu através da ativação da via p38 MAPK.



II

Os alcaloides indólicos isolados de *Alstonia pneumatophora*, Apocynaceae, apresentaram atividade inibitória sobre a melanogênese em modelo celular de melanoma murino. As apneuminas, em especial apneumina G, demonstraram essa ação inibindo a expressão da enzima tirosinase, porém sem ação sobre a tirosinase obtida de cogumelo e, também, pela ação antioxidante exibida por essas substâncias, culminando na diminuição do conteúdo de melanina formado (KOYAMA *et al.*, 2010).

Luo e colaboradores (2010) evidenciaram ação inibitória na via melanogênica do alcalóide dehidroevodiamina, isolado de *Evodia rutaecarpa*, Rutaceae, o qual diminuiu a síntese de melanina sem promover citotoxicidade; reduziu, também, a atividade da tirosinase de cogumelo, porém sem ação sobre a tirosinase celular, sugerindo ação de inibição direta da enzima ao invés da supressão da sua expressão.

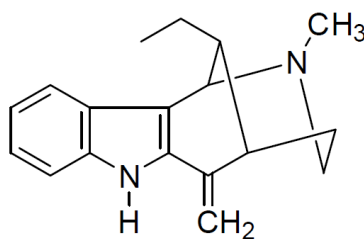
Himatanthus lancifolius (Müll.) Arg. Woodson, conhecida popularmente como agoniada, sucuba ou arupapé, é uma espécie descrita na Farmacopéia Brasileira 1ª edição com o basinômio *Plumeria lancifolia* Müller Argoviensis. Arbusto de médio porte, latescente, é encontrado exclusivamente na América do Sul e, no Brasil, nas regiões nordeste e sudeste (BARATTO *et al.*, 2010). As cascas do caule são usadas como extrato fluido ou, ainda, na forma de tintura para tratar dores menstruais, relaxando a musculatura lisa e aliviando o quadro, de onde deriva o nome “agoniada”. Ademais é empregada para o tratamento de asma, sífilis, doenças de pele e, também, como antipirético e purgativo (LIMA *et al.*, 2010; SOUZA *et al.*, 2007).

Morfo-anatomicamente, esta espécie apresenta folhas oval-alongadas, lanceoladas e peninervadas, e flores de corola de cinco pétalas, de forma semelhante à das folhas. As cascas caulianas exibem pedaços de forma irregular, com 4-10 cm de comprimento, diâmetro de 1-1,5 cm e espessura de 1-6 mm. Externamente, essas cascas exibem coloração escura, com manchas pardas ou mais claras no sentido

longitudinal, e a porção interna tem coloração bem mais escura, quase preta, sendo que ambas as faces são quase lisas (FRANCA *et al.*, 2000; LOPES, 2008).

As cascas caulianas dessa espécie apresentam taninos, açúcares, mas principalmente alcaloides e, em especial, a classe dos alcaloides indólicos, sendo que alguns já foram anteriormente isolados, como a uleína, epiuleína e demetoxiaspidospermina e iombina (FRANCA *et al.*, 2000; LOPES, 2008).

A uleína (III) é um alcaloide indólico derivado do triptofano, cuja ponte amino-etil está fragmentada, faltando ambos os carbonos da ponte (KIM e ERICKSON, 1971; BORRIS *et al.*, 1983). Foi isolado pela primeira vez a partir do extrato metanólico das cascas do caule de *H. lancifolius*. Posteriormente, em 1959 e, depois, em 1967, teve sua estrutura e estereoquímica definidas; na década seguinte, obteve-se a confirmação dessa estrutura por síntese estereocontrolada (BORRIS *et al.*, 1983).



III

Esse alcaloide pode ser encontrado também em outros membros da família Apocynaceae, em particular no gênero *Aspidosperma*, como *Aspidosperma australe*, *A. dasycarpon*, *A. eburneum*, *A. excelsum*, *A. formosanum*, *A. gilbertii*, *A. gomezianum*, *A. multiflorum*, *A. nigricans*, *A. olivaceum*, *A. parvifolium*, *A. pyricollum*, *A. subincanum*, *A. tomentosum*, *A. ulei* (PEREIRA, 1956).

Estudos com a fração rica em alcaloides das cascas do caule de *H. lancifolius*, cujo componente principal é a uleína, demonstraram ação contra bactérias Gram negativas e positivas (SOUZA e STINGHEN, 2004). Rattmann e colaboradores (2005) evidenciaram o potencial antiespasmódico dessa fração sobre a responsividade dos músculos liso vascular e não vascular, podendo envolver alterações na mobilização intracelular de íons cálcio, corroborado sua utilização em distúrbios menstruais. O grupo de Baggio, em ensaios com roedores, demonstrou atividade gastroprotetora desta fração, com proteção de lesões gástricas induzidas por etanol, além da diminuição da hipersecreção de ácido gástrico induzido por ligadura de piloro. Essa

redução da secreção gástrica parece ter sido induzida por bloqueio da atividade H⁺, K⁺-ATPase (BAGGIO *et al.*, 2005). A inibição da migração de granulócitos induzidos por caseína e sua adesão a fibronectina e vitronectina também já foram descritas, sugerindo potencial utilização dessa fração em condições inflamatórias (NARDIN *et al.*, 2008). Mais recentemente, atividade citostática foi demonstrada em linhagens leucêmicas, sendo inerte para células de medula óssea normal (LIMA *et al.*, 2010). Nardin e colaboradores (2010) relataram a atividade inibitória na proliferação de linfócitos humanos estimulados por fitohemaglutinina.

Seidl e colaboradores (2010) evidenciaram a ação inibitória não só do extrato fluido de *H. lancifolius*, mas também da uleína sobre a enzima acetilcolinesterase, descrevendo ação importante e que está sendo investigada para o tratamento da doença de Alzheimer. A uleína já demonstrou estimular a via de produção do óxido nítrico em células RAEC e B16F10 (SOUZA *et al.*, 2007).

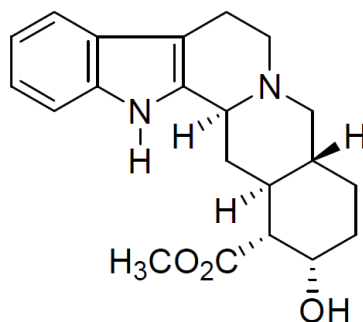
Outra planta da família Apocynaceae é a *Rauwolfia sellowii* Müll. Arg. Popularmente conhecida como pau-pra-tudo e jasmin-grado, esta árvore de aproximadamente 15 metros e que pode ser encontrada em florestas no sul e sudeste do Brasil tem sido objeto de interesse por ser fonte rica em alcaloides indólicos, sendo que muitos deles já foram isolados, como a ajmalina, a ajmalinina, a serpentina, a ajmalidina, a tetrafilicina, a aricina, ajmalicina, a reserpina e a pitetrahidroalstonina, a raucaffrinolina, a perakina e a sellowiina (PAKRASHI *et al.*, 1955; HOCHSTEIN, 1955). Estes três últimos foram isolados de uma amostra coletada em Curitiba, Paraná (BATISTA *et al.*, 1996). Vomilenina, 12-demethoxytabernulosina, picrinina e 19 α ,20 α -epoxi-akuammicina também foram isolados de uma amostra coletada no Rio Grande do Sul (BATISTA *et al.*, 1996).

Suas cascas são utilizadas como hipoglicemiantes, hipocolesterolêmicas e anti-hipertensivas (BATISTA *et al.*, 1996) na medicina caseira. Porém, em modelo *in vitro* de quimiotaxia de leucócitos induzidos por caseína, o extrato aquoso de *R. sellowii* a 1000 μ g/mL inibiu, embora de maneira discreta, a migração de polimorfonucleares, sugerindo um modesto efeito anti-inflamatório (PRESIBELLA *et al.*, 2003).

A ioimbina (IV) é um alcaloide indólico encontrado naturalmente nas cascas da árvore africana *Pausinystalia yohimbe*, onde é tradicionalmente usada como afrodisíaco, para tratar disfunções sexuais; também já foi relatada em *Rauwolfia serpentina* (DESHMUKH *et al.*, 2012).

Descrita como estimulante além dos efeitos afrodisíacos, a ioimbina tem sido utilizada na forma de extrato ou como medicamento isolado para o tratamento da disfunção sexual (FULLER *et al.*,2000).

Efeito inibidor reversível e dependente do tempo e da dose sobre a atividade da tirosinase foi descrita para a ioimbina usando melanócitos humanos e células de melanoma de rato (FULLER *et al.*,2000).



IV

Considerando a diversidade do potencial farmacológico de *H. lancifolius* e em especial da fração rica em alcaloides, da qual a uleína é o principal constituinte, assim como da *R. sellowii*, investigou-se neste trabalho a ação dos extratos preparados de suas cascas sobre a atividade da tirosinase e também sobre a produção de melanina. Em paralelo, também foram avaliados os alcaloides uleína e ioimbina, a fim de observar a contribuição destes alcaloides indólicos na melanogênese.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade dos extratos das cascas de *Raulvolfia sellowii* Müll Arg. e de *Himatanthus lancifolius* (Müll) Arg. e dos alcaloides uleína e ioimbina na melanogênese, utilizando a enzima tirosinase de cogumelo e a linhagem celular de melanoma murino B16F10 como modelos experimentais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Observar o efeito dos extratos de *H. lancifolius*, *R. sellowii*, da uleína e ioimbina sobre as tirosinases de cogumelo e extraída de célula B16F10;

- Estabelecer o perfil citotóxico dos extratos das cascas de *H. lancifolius*, *R. sellowii*, uleína e ioimbina em células de melanoma murino (B16F10);
- Observar o efeito desses extratos e dos alcaloides sobre a atividade de tirosinase e sobre a produção de melanina em sistema de cultivo celular usando a linhagem B16F10.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. MATERIAL BOTÂNICO

Extratos preparados das espécies descritas na Tabela 1 foram utilizados nos ensaios biológicos. O alcaloide uleína, extraído e purificado a partir do extrato de *H. lancifolius*, também foi utilizado neste estudo. A ioimbina foi obtida comercialmente (Sigma®).

TABELA 1. ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS UTILIZADAS.

Nome Científico	Nome Popular	Parte Utilizada
<i>Rauvolfia sellowii</i> Müll. Arg.	Pau-pra-tudo	Cascas da raiz
<i>Himatanthus lancifolius</i> (Müll. Arg.) Woodson	Agoniada	Cascas do caule
<i>Bauhinia microstachya</i> (Raddi) Macbride	Escada-de-macaco	Folhas
<i>Casearia sylvestris</i> Sw	Guaçatonga	Folhas
<i>Philodendron sellowianum</i> Kunth	Cipó-imbé	Raiz
<i>Phoradendron falcifrons</i> (Pohl) Eichl.	Salsa-moura	Folha
<i>Jacaranda micrantha</i> Cham.	Caroba	Casca
<i>Arundo donax</i> L.	Cana-do-brejo	Raiz
<i>Discorea glandulosa</i> Klotzsch ex Kunth	Salsaparrilha	Folhas

3.2. PREPARO DOS EXTRATOS

Todos os extratos das plantas utilizadas neste trabalho foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Farmacognosia, da UFPR. Os solventes utilizados para as extrações foram de grau analítico. Para o preparo do extrato de *H. lancifolius*, as cascas foram secas em estufa a 50 °C moídas passaram por processo de desengorduramento em Soxhlet com éter de petróleo e, em seguida, foram submetidas à maceração com solução metanol 56%. Em seguida, o conteúdo obtido passou por processo de filtração e concentração em rotaevaporador, a 40 °C, até aproximadamente 1/5 do volume inicial. Para o preparo do extrato de *R. sellowii*, cascas foram submetidas à extração por percolação com solução de etanol a 56 % até esgotamento total. Os extratos reunidos foram evaporados e concentrados até secura. Para os demais extratos as

espécimes coletadas foram secas a 35 °C para partes aéreas e 45 °C caule e raiz, moídas e submetidos a extração por três dias por percolação com etanol 70%. Todos os extratos das plantas medicinais utilizadas foram liofilizados e, após a preparação de soluções estoque a 1 % em meio RPMI 1640 contendo 25% de DMSO, foram mantidos à temperatura de menos 25 °C até o momento do uso.

3.3. SOLUÇÕES

Os reagentes e sais utilizados neste trabalho foram de procedência Merck, Sigma, J. T. Baker ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura obtida pelo sistema MiliQ (Milipore Corporation). As soluções foram preparadas e esterilizadas por calor úmido, ou seja, autoclavação (121 °C, 1 atm, 15 minutos) ou por filtração em filtros de acetato de celulose, com poros de 0,22µm de diâmetro, e acondicionadas em temperaturas adequadas para sua conservação (temperatura ambiente, 4-8 °C ou menos 25 °C) e ao abrigo da luz. Os ensaios que requerem esterilidade foram realizados em condições de assepsia/esterilidade em câmara de fluxo laminar vertical TROX, modelo FLVQ TAM 12.

- Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) modificada por Dulbecco

A solução de PBS foi preparada dissolvendo-se cloreto de potássio (KCl) 0,2g/L, fosfato de potássio diácido (KH_2PO_4) 0,2g/L, cloreto de sódio (NaCl) 8,0g/L e fosfato ácido dissódico (Na_2HPO_4) 1,15g/L em água. O pH foi ajustado para 7,2-7,4 com NaOH 1N, e procedeu-se a esterilização em autoclave, seguida de armazenamento em geladeira.

- Solução de EDTA 0,02% (p/v) em PBS

A solução foi preparada adicionando-se 0,02 g de EDTA (etilenodiamino tetracetato dissódico) em 100 mL de PBS. A solução foi esterilizada em autoclave e armazenada em geladeira.

- Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v)

A solução de Azul de Trypan foi preparada dissolvendo-se 0,4 g do pó em 100 mL de PBS. Após, procedeu-se a filtração em papel de filtro (Inlab - porosidade 2 µm) e armazenamento em frasco âmbar a temperatura ambiente.

- Meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*)

O meio de cultivo RPMI 1640 (Himedia, Índia) foi preparado dissolvendo-se o pó em água, conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com bicarbonato de sódio 2 g/L, 300 mg/L de penicilina, 50 mg/L de sulfato de estreptomicina. O pH do meio foi ajustado para 7,2-7,4 com NaOH 1N. Quando em uso, foi mantido em geladeira por, no máximo, 14 dias.

- Meio RPMI 1640 suplementado

Para manutenção da linhagem B16F10, o meio RPMI 1640 foi suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas).

- Solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il-tetrazólio)]

A solução de MTT foi preparada diluindo-se MTT em PBS, na concentração de 5 mg/mL, esterilizada por filtração em membrana de acetato de celulose com diâmetro de poro de 0,22 µm, alíquotada e congelada a menos 25 °C até uso.

- Solução de Vermelho Neutro (VN)

Solução estoque de hidrocloreto de 3-amino-m-dimetilamino-2-metil-fenil-fenazina (VN) a 4 mg/mL em PBS foi preparada e armazenada ao abrigo da luz, em temperatura ambiente. Para utilização nos experimentos, a solução estoque foi diluída 1:100 em PBS e mantida a 37 °C por doze horas antes de ser adicionada ao ensaio. Imediatamente antes do uso, a solução foi centrifugada a 400 g por 10 minutos para remoção de possíveis cristais.

- Solução de Cristal Violeta (CV)

Solução estoque de cloreto de hexametilpararosanilina (cristal violeta) a 1% (p/v) em água foi preparada e armazenada ao abrigo da luz, à temperatura ambiente. Para utilização nos experimentos, a solução estoque foi diluída 1:5 em água contendo 2% etanol.

- Tampão de lise celular

A solução de tampão de lise celular foi preparado diluindo-se em água ultrapura Tris HCl 0,1 M e corrigindo-se o pH para 7,2. Após, foram adicionados 1% de octilfenoxipoliétoxietanol; 0,01% de dodecilsulfato de sódio (SDS) e coquetel de inibidores de proteases (Roche®). Essa solução foi esterilizada por filtração em filtro de

acetato de celulose de poro de 0,22 μM de diâmetro, alíquotada e congelada a menos 25 °C até uso.

- Solução corante de Azul Brilhante de Coomassie

O reagente de Bradford ou corante Azul Brilhante de Coomassie G250 foi preparado dissolvendo-se 0,1 g do corante em 50 mL de metanol, 100 mL de ácido fosfórico 85% e de quantidade suficiente de água para volume final de um litro, obtendo uma concentração do corante de 100 mg/L. A solução foi armazenada a 4 °C em frasco âmbar. Imediatamente antes do uso, a solução foi filtrada em papel filtro Whatmann nº1.

- Solução dos extratos das plantas em estudo (p/v)

Duzentos miligramas dos extratos das espécies listadas na Tabela 1 foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) e mantidos em banho ultrassônico por 20 minutos. Após, foi realizado diluição 1:4 em meio RPMI 1640, dando origem às soluções estoques a 1% em RPMI contendo 25% de DMSO, que foram alíquotadas e armazenadas a menos 25 °C até o momento do uso.

- Solução de uleína e ioimbina para cultivo celular

A solução estoque foi preparada diluindo-se 20 mg de uleína ou ioimbina em pó em 1 mL de meio RPMI 1640. A partir dessa solução foram preparadas as concentrações de trabalho (0,004-400 μM) em RPMI 1640. O conteúdo foi alíquotado e congelado a menos 25 °C até o momento da utilização.

- Solução de uleína e ioimbina para ensaios com tirosinase de cogumelo e tirosinase oriunda de célula B16F10

A solução estoque foi preparada diluindo-se 20 mg de uleína ou ioimbina em pó em 1 mL de tampão fosfato 0,1 M pH 6,8. A partir dessa solução foram preparadas as concentrações de trabalho (4-400 μM) tampão fosfato 0,1 M pH 6,8. Em seguida, o conteúdo foi alíquotado e congelado a menos 25 °C até o momento da utilização.

- Solução da enzima tirosinase purificada de cogumelo

Aos 14,58 mg do pó liofilizado da enzima tirosinase de cogumelo comercial foram adicionados 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5, gerando uma solução

mãe com 7290 UI/mL. A partir desta solução, foi preparada a solução de trabalho a 145,8 UI/mL diluindo-se a solução mãe em tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5.

- Tampão Fosfato de Potássio

Tampão fosfato de potássio 50 mM pH 6,5 foi preparado a partir da mistura de 38,1 mL de fosfato dipotássico (K_2HPO_4) 1 M e 61,9 mL de fosfato monopotássico (KH_2PO_4) 1 M. Posteriormente, foi realizada diluição em água ultrapura, obtendo-se a solução 50 mM.

- Solução de L-Dopa

Solução estoque de L-Dopa a 0,2% foi preparada no fluxo laminar em tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 6,8. A solução foi sonicada por 10 minutos, alíquotada e mantida a menos 25 °C até uso, ao abrigo da luz.

- Solução de L-tirosina 50 mM

Solução estoque de L-tirosina foi preparada em fluxo laminar a 0,05 M em meio RPMI 1640. Em seguida, foi sonicada, alíquotada e armazenada ao abrigo da luz a menos 25 °C até o momento do uso.

- Solução de Ácido Kójico 20 mM para cultivo celular

Solução estoque de ácido kójico foi preparada a 0,02 M em meio RPMI 1640. Após, a solução foi filtrada em filtro de acetato de celulose com 0,22 μ M de diâmetro de poro, alíquotada e congelada a menos 25 °C, ao abrigo da luz.

- Solução de Ácido Kójico 20 mM para ensaios com tirosinase de cogumelo e tirosinase oriunda de células B16F10

Solução estoque de ácido kójico foi preparado a 0,02 M em tampão fosfato 0,1 M, pH 6,8. Posteriormente, a solução foi filtrada em filtro de acetato de celulose com 0,22 μ M de diâmetro de poro, alíquotada e congelada a menos 25 °C, ao abrigo da luz.

- Solução de Hidroquinona 20 mM

Solução estoque de hidroquinona foi preparada a 0,02M em tampão fosfato 0,1 M pH 6,8. Em seguida, a solução foi filtrada em filtro de acetato de celulose com 0,22 μ M de diâmetro de poro, alíquotada e congelada a menos 25 °C, ao abrigo da luz.

3.4. ENSAIOS

3.4.1. Linhagem celular e manutenção

A linhagem celular aderente B16F10 foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino a 37 °C, em garrafas de 25 cm² contendo 10 mL/frasco. A cada 3-4 dias, a linhagem foi subcultivada na concentração de 6x10⁴ células/mL após desprendimento da monocamada aderente com solução EDTA 0,02%.

3.4.2. Viabilidade Celular

A viabilidade celular foi verificada em todas as etapas dos processos metodológicos. Para tanto, foi utilizado o teste de exclusão com Azul de Trypan (MERCHANT *et al.*, 1964), diluindo-se convenientemente as células em solução de Azul de Trypan a 0,4%. A viabilidade foi verificada em microscópio de luz (Olympus CH30). Este ensaio é baseado na premissa de que células vivas, com membrana íntegra, excluem o corante, enquanto que as mortas, com membrana danificada, não o fazem. Assim, células íntegras, brilhantes, de formato redondo, citoplasma claro e incolor foram consideradas viáveis, enquanto que aquelas apresentando citoplasma corado em azul e, muitas vezes, com perda de definição do contorno foram consideradas mortas. Em todos os experimentos, as células utilizadas sempre apresentaram viabilidade superior a 90%.

3.4.3. Toxicidade celular

Para os ensaios de toxicidade celular, as células da linhagem celular B16F10 foram semeadas em placas de 96 poços (5x10³ células/poço) e mantidas a 37 °C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, quando apresentando confluência de ~80%, foram expostas a concentrações crescentes (0,1 - 1000 µg/mL) de cada extrato, uleína (0,04-400µM) ou ioimbina (0,04-400µM) em meio RPMI 1640 contendo 1% de soro bovino fetal, sendo, então, re-incubadas por mais por 24 horas nas mesmas condições. O efeito tóxico dos extratos foi mensurado pelos métodos do MTT, VN ou CV como descrito a seguir. Para o ensaio do MTT, foram adicionados 15 µL/poço da solução de MTT e a placa foi re-incubada a 37 °C, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ por 3 horas. Em seguida, o sobrenadante foi removido e adicionados 150 µL/poço de DMSO. A placa permaneceu sob agitação por 15 minutos, ao abrigo da luz. Em seguida foi realizada a leitura espectrofotométrica em 570 nm. Para o ensaio do VN, o sobrenadante foi removido e as células tratadas, por 3

horas, com a solução de trabalho de VN (100 µL/poço), a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% CO₂. Após esse período, as células foram rapidamente lavadas com PBS e tratadas, por 10 minutos e em temperatura ambiente, com 100 µL/poço de solução 0,5% (v/v) de formalina e 1% (p/v) de CaCl₂. Em seguida, as células foram tratadas por 30 minutos com 100 µL/poço de solução etanólica 50% (v/v) contendo 1% (v/v) de ácido acético, sob contínua agitação, em temperatura ambiente. A absorvância foi mensurada em 540 nm. Para o ensaio do CV, o sobrenadante foi retirado e as células foram incubadas com solução do corante a 0,2% em etanol 2% (100 µL/poço) por 2 a 5 minutos. Em seguida, os poços foram lavados exaustivamente (5-10 vezes) com PBS e o corante dissolvido com 200 µL/poço de solução de citrato de sódio 0,05 M em etanol 50% por 10 minutos. A leitura foi feita em 570 nm. Para cada um desses ensaios, foram realizados, no mínimo, três experimentos independentes, cada um em triplicata. Os resultados estão expressos em porcentagem de células vivas em relação ao controle (população não exposta aos extratos), para o qual se atribuiu o valor de 100%, ou como proporção do controle, para o qual se atribuiu o valor 1. O cálculo da concentração letal que é tóxica para 50 e 70% das células (CL₅₀ E CL₇₀) foi realizada por regressão linear, utilizado o Programa *Graph Prism 5.0*.

3.4.4. Preparo do lisado celular como fonte de tirosinase

Células B16F10 foram cultivadas em frascos de 25 ou 75 cm². Quando apresentavam 80-90% de confluência, o sobrenadante separado e adicionou-se, à camada aderente, solução de PBS com 0,02% de EDTA, e mantido por 12 minutos na temperatura de 37 °C. Em seguida, o conteúdo foi cuidadosamente recolhido, reunido ao sobrenadante e centrifugado a 400 g por 5 minutos. Após, o sobrenadante foi descartado e o botão celular transferido para microtubo, e lavado com PBS. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado e foram adicionados 200 µL de tampão de lise celular. Por fim, esse lisado passou por processo de congelamento a menos 25 °C por 15 minutos, sonicado por 10 minutos em banho de gelo e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4-8 °C. O sobrenadante obtido foi recolhido e utilizado como fonte de enzima tirosinase.

3.4.5. Preparo do lisado celular de células tratadas

Para a mensuração da atividade de tirosinase celular, células da linhagem B16F10 em quantidade para atingirem ~80% de confluência foram semeadas em meio RPMI contendo 10% de soro fetal bovino em garrafas de 25 ou 75 cm² e mantidas a 37 °C,

em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, foram expostas a concentrações não tóxicas de uleína (4 e 40 µM), ioimbina (4 e 40 µM), RS (50 µg/mL), HL (0,1 e 1 µg/mL) ou ácido kójico (0,05 M) e re-incubadas por mais 24 horas, em meio RPMI 1640 contendo 1% de soro bovino fetal. Em alguns experimentos cloreto de amônio a 10 mM e L-tirosina a 0,05 M foram adicionados. Após este período, o sobrenadante foi separado e, à camada aderente, foi adicionado solução de PBS com 0,02% de EDTA. Após 12 minutos a 37 °C, o conteúdo foi recolhido cuidadosamente, reunido com o sobrenadante e centrifugado a 400 g por 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o botão celular transferido para microtubo, e lavado com PBS. Após, esse conteúdo foi centrifugado a 13.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e, então, foram adicionados 200 µL de tampão de lise celular. Ainda, esse lisado foi congelado a menos 25 °C por 15 minutos, sonificado por 10 minutos em banho de gelo e centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4-8 °C. O sobrenadante resultante foi recolhido e usado em ensaios de determinação de proteínas totais e atividade de tirosinase. Ao botão celular, foram adicionados 200 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1 N e usado na determinação de melanina.

3.4.6. Doseamento de proteína totais no lisado celular

O doseamento de proteínas totais no lisado celular foi realizado em placas de 96 poços, utilizando o método de Bradford (1976). Para preparo da solução de trabalho, o reagente de Bradford foi diluído a 1:5 em água; 200 µL dessa solução foram adicionados em cada poço. Em seguida, 10 µL/poço de amostra de lisado celular foram adicionados e a mistura cuidadosamente homogeneizada. A placa foi incubada em estufa a 37 °C por 30 minutos, seguida de leitura espectrofotométrica em 570 nm. Simultaneamente, em cada doseamento, curvas usando soroalbumina bovina (BSA) como padrão foram obtidas. Os resultados estão expressos em µg de proteínas totais por microlitro de lisado celular (µg/µL).

3.4.7. Mensuração da atividade de tirosinase de cogumelo

A atividade de tirosinase foi mensurada pela taxa de oxidação da L-DOPA. A mensuração da atividade de tirosinase de cogumelo foi realizada em microtubos, utilizando a L-DOPA, sozinha ou em associação com L-tirosina como substrato. Quantidade de tirosinase de cogumelo referente a 1 UI foi adicionada de determinadas concentrações dos extratos de HL (0,1; 1 e 10 µg/mL), RS (50 e 100 µg/mL), uleína (4, 40 e 400 µM) ou ioimbina (4, 40 e 400 µM). Em seguida, foi adicionado L-DOPA pH 6,8

na concentração final de 0,1% sozinho ou na presença de L-tirosina 500 µM . Por fim, foi adicionado tampão fosfato 0,1M pH 6,8, para completar o volume para 200 µL. Esta mistura foi mantida a 37 °C por 1 hora em banho térmico seco, ao abrigo da luz. Após este tempo, alíquotas de 100 µL foram transferidos para placa de 96 poços e a formação de DOPAcromo foi mensurada em 450 nm. Como controle de inibição foi utilizado ácido kójico a 400 µM e hidroquinona a 5 mM; como controle de estímulo, foi utilizado L-tirosina a 0,05 M. Cada amostra extrato/substância foi acompanhada de um branco que continha todos os componentes, com exceção da tirosinase de cogumelo. Os resultados estão apresentados como % de atividade de tirosinase em relação ao controle sem tratamento (com L-DOPA apenas), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Atividade de Tirosinase} : \frac{(A_x - A_y) \times 100}{C_x - C_y}$$

Onde: Ax refere-se à absorvância da substância/extrato em teste; Ay é a absorvância da substância/extrato em teste sem tirosinase, Cx é a absorvância do controle L-DOPA sem adição de substância/extrato e Cy é a absorvância do controle L-DOPA sem tirosinase.

3.4.8. Mensuração da atividade de tirosinase extraída de células B16F10

O ensaio de mensuração da atividade de tirosinase com a enzima obtida de células B16F10 não tratadas foi realizado em microtubos. Quantidade do lisado celular de células de melanoma murino não tratadas, preparadas conforme descrito no item 3.4.4., referente a 10 µg de proteína foram adicionadas. Em seguida, concentrações de uleína (4 e 40 µM), ioimbina (4 e 40 µM) ou dos extratos de HL (0,1 e 1 µg/mL), e de RS (50 e 100 µg/mL) foram adicionados. Após, foi adicionado L-DOPA pH 7,4 a 0,1% (m/v) de concentração final e tampão fosfato de potássio 0,1 M pH 7,4 até completar o volume para 200 µL. Esta solução foi mantida a 37 °C por 1 hora em banho térmico seco, ao abrigo da luz. Após esse período, 100 µL de cada uma das soluções foram transferidos para placas de 96 poços e a formação de DOPAcromo foi estimada com leitura espectrofotométrica em 450 nm. Cada extrato, alcaloides e substâncias em teste foram acompanhados de um branco que continha todos os componentes, com exceção do lisado celular contendo a enzima tirosinase, para corrigir qualquer tipo de interferência. Como controle de inibição foi utilizado ácido kójico a 400 µM, e como controle de estímulo foi utilizado a L-tirosina a 500µM. Os resultados estão

apresentados como % de atividade de tirosinase em relação ao controle sem tratamento (com L-DOPA apenas), de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ Atividade de Tirosinase} : \frac{(Aa - Ab) \times 100}{Ca - Cb}$$

Onde: Aa refere-se à absorvância da substância/extrato em teste; Ab é a absorvância da substância/extrato em teste sem lisado celular (sem tirosinase), Ca é a absorvância do controle L-DOPA sem adição de substância/extrato e Cb é a absorvância do controle L-DOPA sem lisado celular (sem tirosinase).

3.4.9. Mensuração da atividade de tirosinase em células B16F10 tratadas

Volume do sobrenadante de cada lisado celular obtido de células B16F10 previamente expostas, por 24 h aos extratos e alcaloides, referente a 100 µg de proteína, foram incubados com L-DOPA a 0,1% (m/v) de concentração final e completado o volume para 200 µL com tampão fosfato 0,1 M pH 7,4. Em seguida, foram mantidos em banho térmico seco a 37 °C por 1 hora ao abrigo de luz. Após, 100 µL de cada solução foram transferidos para placas de 96 poços e o resultado foi mensurado espectrofotometricamente em 450 nm. O ácido kójico foi utilizado como controle de inibição. Os resultados estão expressos como porcentagem de inibição em relação ao controle sem tratamento de extratos/substâncias, ao qual se atribuiu o valor de 100%.

3.4.10. Determinação do conteúdo de melanina

Para determinação do conteúdo de melanina, ao *pellet* celular obtido conforme descrito no item 3.4.5, foram adicionados 200 µL de hidróxido de sódio 1M, e o conteúdo aquecido a 60 °C por 1 hora em bloco térmico, ao abrigo da luz. Após, 100 µL de cada conteúdo foram transferidos para placas de 96 poços e foi realizada leitura espectrofotométrica em 450 nm, usando NaOH 1M como branco. A concentração de melanina foi calculada com auxílio da curva padrão de melanina de *Sepia officinalis*. Os resultados estão expressos em microgramas de melanina por mililitro de lisado celular (µg melanina/mL de lisado celular) e foram normalizados pelo conteúdo de proteína desses lisados, obtendo-se valores de microgramas de melanina por micrograma de proteína (µg melanina/ µg proteína). Os valores de melanina corrigidos por proteína das amostras estão expressos em porcentagem, sendo que ao controle de cada experimento foi atribuído o valor de 100%.

3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como a média±desvio padrão (DP) das várias repetições de, no mínimo, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. Para a análise estatística dos resultados, foi utilizada a análise de variância (ANOVA), em conjunto com o teste de Tukey utilizando os programas Excel, versão 2010, ou GraphPad-Prism 5, versão 2007. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4. RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1. Ensaio de Citotoxicidade

Um dos primeiros passos na análise do potencial biológico de medicamentos fitoterápicos e cosméticos envolve a preparação de extratos e observação de seu comportamento quando exposto a ensaios de toxicidade. Os ensaios do MTT, Vermelho Neutro (VN) e cristal violeta (CV), juntamente com o teste de exclusão de Azul de Trypan (TB), são usados rotineiramente como medida de viabilidade celular e proliferação nesses estudos.

Como o ensaio com VN baseia-se na acumulação do corante em lisossomos íntegros de células, o foco do MTT é a absorção e redução do sal solúvel de tetrazólio para um *formazan* insolúvel por desidrogenases de células vivas; e o ensaio de CV depende da exposição do DNA, portanto, marca células mortas, é possível, por meio de curvas dose-resposta usando princípios metodológicos distintos, estabelecer concentrações que não interfiram com a viabilidade celular, evitando interpretações equivocadas dos resultados.

Neste sentido, o que nos chamou a atenção já no início desta série de ensaios com os extratos, em especial nas dosagens 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *B. microstachya*, ao se observar as placas cultivadas com células logo após incubação com o MTT, foi a intensa coloração púrpura do meio, aspecto incomum antes da adição do DMSO. Em um exame mais minucioso do conteúdo dos poços ao microscópio invertido, foi observada grande quantidade de cristais de *formazan* sobre uma população de células cujo aspecto morfológico mostrava-se alterado, muito diferente daquele caracterizado como “saudável”. A 1000 $\mu\text{g/mL}$, o comprometimento da viabilidade celular era nítido, mostrando que a coloração púrpura formada não condizia com a quantidade de células metabolicamente ativas, sugerindo que o extrato poderia

estar interagindo com o reagente ou com os produtos de reação, levando a resultados falso-positivos de indução de proliferação celular.

4.1.1. Ensaio do MTT

Dentre os diferentes métodos desenvolvidos para mensurar a proliferação ou a toxicidade celular, o ensaio do MTT é um dos mais amplamente utilizados (WANG *et al.*, 2010; SHOEMAKER *et al.*, 2004).

O MTT é um sal tetrazólico amarelo que, sob a ação de desidrogenases de células metabolicamente ativas, é reduzido a formazan, com a formação de cristais de coloração roxa insolúveis em água (MOSSMAN, 1983). Estes cristais podem ser solubilizados com solventes orgânicos como o DMSO, por exemplo, e a intensidade de cor púrpura, medida espectrofotometricamente em 570 nm, mostra relação direta entre a quantidade de células vivas e metabolicamente ativas na cultura.

Para o ensaio preliminar de toxicidade, foram utilizados os extratos de nove plantas (Tabela 1), em concentrações que variaram entre 0,1 e 1000 µg/mL e a uleína (0,004 e 400 µM), isolada a partir das cascas de *H. lancifolius*, e ioimbina, nas mesmas concentrações.

Levando em consideração a presença exacerbada de coloração púrpura de formazan nas dosagens maiores de alguns extratos, nos quais microscopicamente observou-se que as células apresentavam aspecto de “não vivas”, para esclarecer se existe a interação do reagente de citotoxicidade com os extratos e alcaloides, o mesmo protocolo usado para os ensaios de citotoxicidade com o MTT foi realizado com todos os extratos e uleína, porém sem a presença de células.

Como mostrado nas Figuras 3 e 4, em contraste com o observado para os extratos de guaçatonga, agoniada (Figura 4) e para a uleína e ioimbina (Figura 3), redução significativa do MTT a formazan em ambiente sem células foi observada particularmente nas concentrações de 100 e 1000 µg/mL para o extrato de escada-de-macaco, com valores de $10,39 \pm 1,82$ e $31,03 \pm 1,53$ ($p < 0,001$), respectivamente, vezes maiores do que a observada para o meio sem adição de extrato (controle), para o qual se atribuiu o valor 1,0.

Esses resultados confirmaram a interferência desses extratos com o reagente do MTT, tornando seu uso impróprio em ensaios de citotoxicidade. O controle, nesse caso, referiu-se ao ensaio sem adição de extratos ou alcaloides.

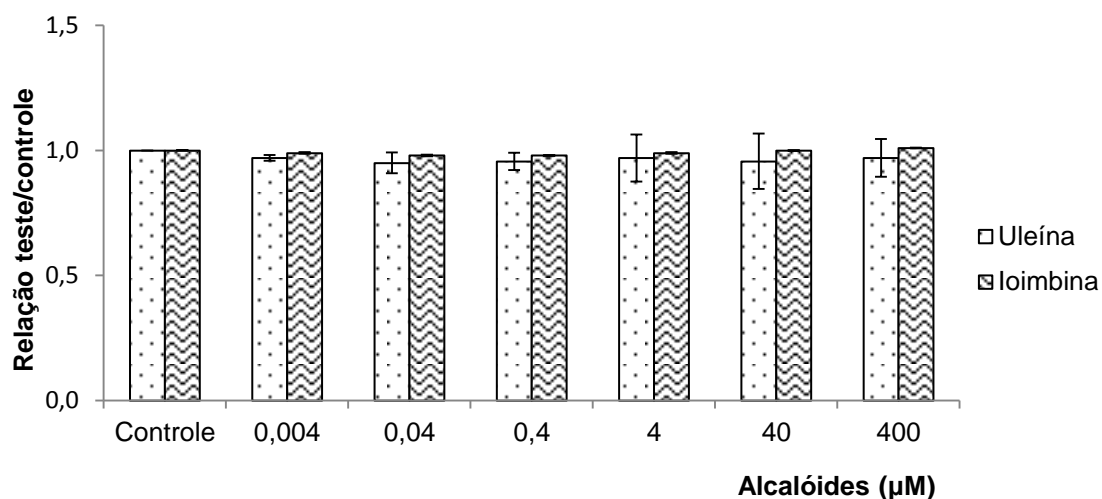


FIGURA 3- INTERAÇÃO ENTRE ULEÍNA E IOIMBINA E O REAGENTE DO MTT. Concentrações indicadas dos alcalóides foram adicionadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida, 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, o ensaio do MTT foi realizado, com adição de 15 µL/poço do reagente e re-incubação por 3 horas. Posteriormente, o sobrenadante foi cuidadosamente removido e 150 µL/poço de DMSO foram adicionados. Após homogeneização, procedeu-se leitura em 570 nm. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância do alcalóide e a do controle, para o qual se atribuiu o valor "1,0", obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

O aumento na produção de formazan por extratos de plantas medicinais em situações experimentais semelhantes já foi observado por outros autores (BRUGGISSER *et al.*, 2002; SHOEMAKER *et al.*, 2004).

Natarajan e colaboradores (2000), por exemplo, relataram a redução do MTT na ausência de células para diferentes antioxidantes. Peng e colaboradores (2005) foram mais específicos neste contexto, descrevendo esta ocorrência para a quercetina e a luteolina, dois flavonoides com reconhecida ação antioxidante.

Portanto, a utilização do ensaio do MTT para avaliar a citotoxicidade ou mesmo a atividade proliferativa de extratos e/ou substâncias sobre determinadas linhagens celulares que contém substâncias com grupos fenólicos como os flavonoides, por exemplo, pode sofrer interferência e mascarar os resultados.

Para superar essas interferências, sugere-se a lavagem das placas rias vezes antes da adição do MTT (PENG *et al.*, 2005). Entretanto, esse procedimento em nosso laboratório pareceu agressivo às células, aumentando a perda destas durante o processo e, conseqüentemente, gerando resultados não reprodutivos.

Segundo Menezes e colaboradores (2004), os extratos de escada-de-macaco e de pau-pra-tudo apresentam intensa atividade antioxidante quando comparado com o de guaçatonga, mensurada tanto pelo método de complexação com fosfomolibdênio quanto pela reação com o DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Portanto, a utilização de sais tetrazólicos como o MTT para se estudar a influência de produtos naturais em ensaios de proliferação ou de citotoxicidade requer precauções.

Como já recomendado por outros (BRUGGISSER *et al.*, 2002), é necessário realizar uma triagem prévia dos extratos e/ou substâncias nesses sistemas na ausência de células como aqui demonstrado antes de interpretar quaisquer resultados em experimentos que envolvam cultivo celular, assim, evitando possíveis interpretações errôneas dos resultados de citotoxicidade, que podem comprometer os resultados dos ensaios subsequentes *in vitro*.

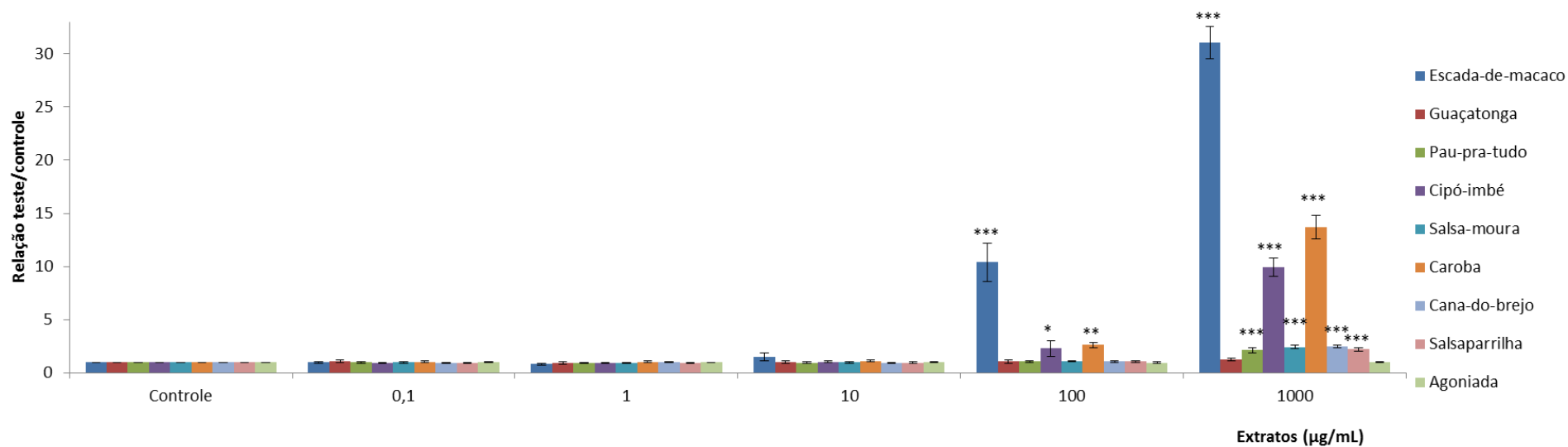


FIGURA 4- INTERAÇÃO ENTRE OS EXTRATOS DE PLANTAS E OS REAGENTES DO MTT. Concentrações indicadas dos extratos foram adicionadas em placa de 96 poços, as quais foram mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida, 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, o ensaio do MTT foi realizado e procedeu-se leitura em 570 nm. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância do extrato e a do controle, para o qual se atribuiu o valor “1,0”, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

4.1.2. Ensaio com o corante Vermelho Neutro

O ensaio de captação do vermelho neutro é, juntamente com o MTT, amplamente utilizado para verificação de efeitos de citotoxicidade e/ou proliferação *in vitro*. É baseado na habilidade das células viáveis em incorporar e se ligar ao corante, o qual, sendo fracamente catiônico, penetra pela membrana citoplasmática por difusão passiva não iônica e se concentra nos lisossomos, onde se liga na matriz. Em uma segunda etapa, o corante é extraído dos lisossomos geralmente utilizando-se solução etanólica acidificada (REPETTO *et al.*, 2008). A retenção do corante pelo lisossomo depende da capacidade da célula em manter o gradiente de pH, pela produção do ATP.

Em pH fisiológico, o corante apresenta carga próxima a zero, permitindo a entrada do corante pela membrana da célula. Dentro do lisossomo, há um gradiente de prótons que mantém o pH interno menor que o do citoplasma. Logo, o corante torna-se carregado e fica retido dentro dos lisossomos. Quando a célula morre ou o gradiente do pH é reduzido (quando a célula está danificada, por exemplo), o corante não consegue ficar retido nos lisossomos. Assim, o conteúdo de VN que fica retido nos lisossomos é proporcional ao número de células viáveis. A integridade do lisossomo, em conjunto com a ligação do corante VN, é um indicador altamente sensível de viabilidade celular (REPETTO *et al.*, 2008).

Devido à interferência do MTT observada com alguns dos extratos, triagem semelhante foi realizada com o VN a fim de se excluir a possibilidade de resultados falsos. Como para o MTT, procederam-se, também, ensaios na ausência de células com o método do VN. Os resultados estão ilustrados nas Figuras 5 e 6.

Surpreendentemente, em contraste ao observado para com os extratos de guaçatonga, pau-para-tudo, salsa-moura, cana-do-brejo, agoniada, uleína e ioimbina, interação significativa do extrato de escada-de-macaco com o corante VN ocorreu, inclusive recapitulando o efeito observado para o MTT a 100 e 1000 µg/mL, só que desta vez com valores de cerca de vinte vezes maior (21,47±1,81 e 21,70±2,97, respectivamente) em relação ao controle.

Essa interação significativa ocorreu também com o extrato de cipó-imbé, sendo três vezes superior ao controle a 100 µg/mL (3,02±0,17; p<0,001), e aproximadamente sete vezes a 1000 µg/mL (7,12±0,060; p<001). Ademais, com os extratos de caroba e salsaparrilha, diferença significativa com relação ao controle

também foi encontrada a 100 µg/mL para a caroba ($1,66 \pm 0,15$; $p < 0,001$) e a 1000 µg/mL, com valores de $2,56 \pm 0,23$ ($p < 0,001$) e $1,11 \pm 0,10$ ($p < 0,05$) respectivamente.

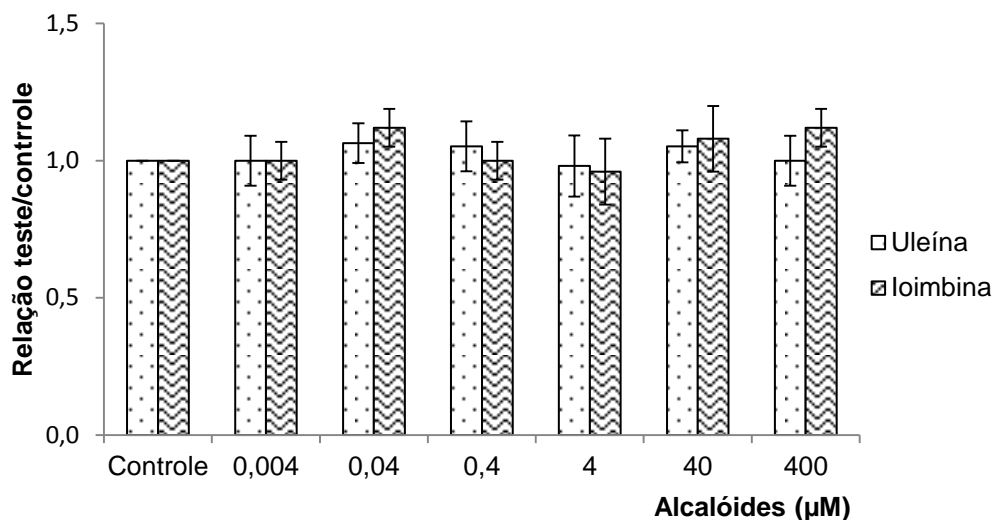


FIGURA 5- INTERAÇÃO DA ULEÍNA E DA IOIMBINA COM O REAGENTE DO VERMELHO NEUTRO. Concentrações indicadas de uleína ou ioimbina foram adicionadas em placas de 96 poços e mantidas a 37°C, em atmosfera úmida e 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, o ensaio do Vermelho Neutro foi realizado. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância do alcaloide e a do controle, para o qual se atribuiu o valor “1,0”, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

Como visto para o ensaio do MTT, esses resultados confirmaram a interferência desses extratos com o reagente do VN, tornando seu uso também impróprio em alguns ensaios de citotoxicidade. Em ensaios com células, subestimação da toxicidade quando se utiliza este teste também já foi relatada (OHKUMA e POOLE, 1981), porém esta é a primeira vez que interações de extratos de plantas com o VN na ausência de células são descritas. Assim, determinar os valores de pH da solução de VN quando juntamente com os extratos nas mesmas condições utilizadas nos ensaios, poderia esclarecer se este fator físico-químico pode ser o agente causador dessa interação.

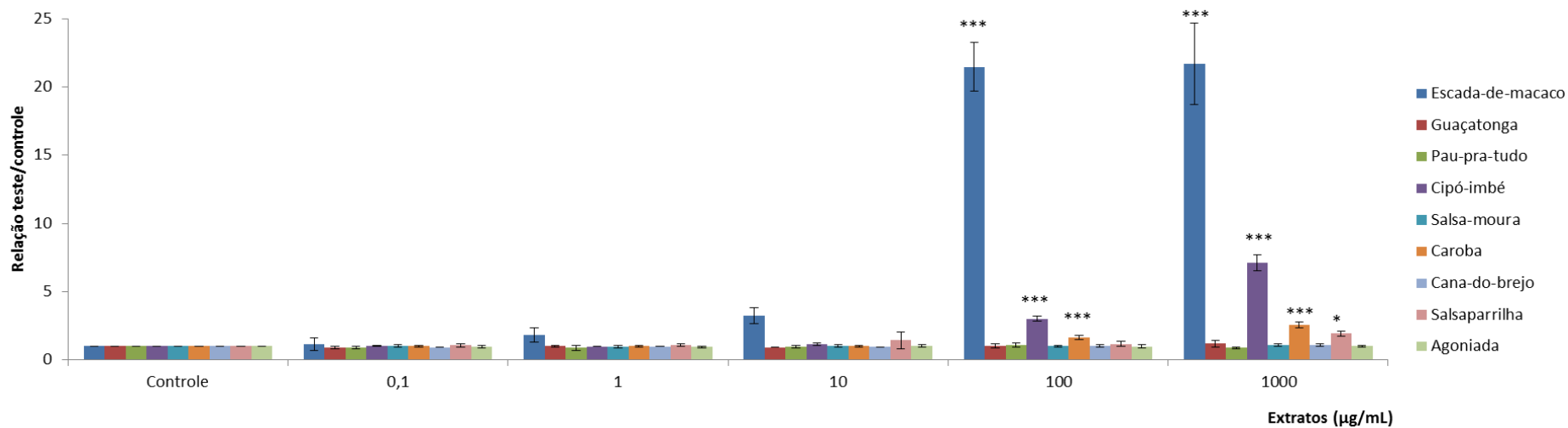


FIGURA 6- INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS COM O REAGENTE DO VERMELHO NEUTRO. Concentrações indicadas dos extratos selecionados foram adicionadas em poços de placas de 96 poços e as mesmas mantidas a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% CO₂ por 24 horas. Após, o ensaio do Vermelho Neutro foi realizado. Em seguida, o sobrenadante foi removido, os poços foram lavados e foi adicionada solução de formalina 0,5% com CaCl₂ 1%. Após, foi adicionada solução etanólica acidificada. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância dos extratos e a do controle, para o qual se atribuiu o valor “1,0”, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ***p<0,001; *p<0,05.

4.1.3. Ensaio com Cristal Violeta

O Cristal Violeta é um corante que tem a propriedade de se ligar ao DNA das células e o conteúdo ligado pode ser medido espectrofotometricamente em 570 nm. Portanto, pode também ser usado em ensaios de toxicidade. Porém, ele é pouco utilizado atualmente devido a problemas de reprodutibilidade. Em decorrência da interação dos extratos de escada-de-macaco e pau-pra-tudo com os reagentes do MTT e do VN, avaliou-se a possibilidade de se utilizar o CV em ensaios semelhantes aos protocolos realizados para o MTT e o VN como teste de toxicidade. Os resultados estão mostrados nas Figuras 7 e 8.

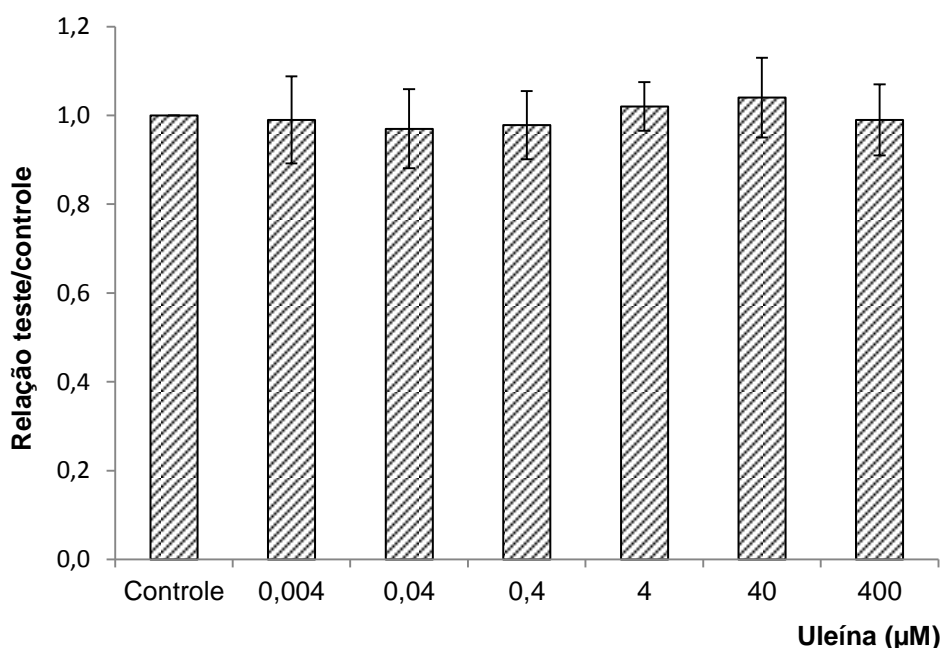


FIGURA 7- INTERAÇÃO DA ULEÍNA COM O CRISTAL VIOLETA. Concentrações indicadas de uleína foram adicionadas em placa de 96 poços e mantidas a 37°C, em atmosfera úmida, 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, reagente de Cristal Violeta foi adicionado por 3-5 minutos. Após sucessivas lavagens com PBS, foi adicionado solução etanólica citratada. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância do alcaloide e a do controle, para o qual se atribuiu o valor “1,0”, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

A interação dos extratos de guaçatonga, agoniada e uleína com os reagentes foi irrelevante, em contraste com o observado para com os extratos de escada-de-macaco, cipó-imbé e caroba, os quais mostraram interação significativa com os reagentes a 100 e 1000 µg/mL (2,27±0,09 e 3,52±0,37; 1,28±0,15 e 2,51±0,08;

1,22±0,007 e 1,99±0,19, respectivamente). Somente na concentração mais elevada dos extratos de pau-pra-tudo, salsa-moura, cana do brejo ($p < 0,05$) e salsaparrilha ($p < 0,001$) em relação ao controle, com valores entre 1,32±0,11 e 1,41±0,19, observou-se interação significativa com o reagente.

Como já referido, interferências de extratos vegetais com ensaios baseados em MTT, dando resultados falsos independentemente de qualquer mecanismo celular, já foram relatados. Extratos de ervas variam em cor, de acordo com sua composição, que são característicos para cada planta. Tendo vários compostos nestas misturas, é possível que alguns deles possam interagir com os produtos químicos dos sistemas utilizados para avaliar o seu potencial de toxicidade. Nossos resultados corroboram este conceito, mas também revelaram a interferência com outros ensaios, como com o do VN e do CV.

De qualquer forma, a compilação desses ensaios de toxicidade permitiu estabelecer as concentrações dos extratos de *H. lancifolius*, *R. sellowii* e dos alcalóides uleína e ioimbina que norteariam os experimentos subsequentes. Assim, para o extrato de *H. lancifolius*, as concentrações a serem utilizadas, conforme indicado pelos testes de MTT, VN e CV, serão de 0,1 a 1000 µg/mL, pois nestas concentrações não ocorreram interações significativas em nenhum dos métodos avaliados. Para o extrato de *R. sellowii*, como indicados pelos ensaios do MTT e CV, apenas as concentrações iguais ou abaixo de 100 µg/mL serão utilizadas, uma vez que a 1000 µg/mL interação com o corante do MTT e do CV foi evidenciada. Para a uleína e ioimbina, como demonstrado pelos ensaios na ausência de células, toda as doses avaliadas podem ser testadas nos ensaios de citotoxicidade subsequentes, uma vez que para estes alcalóides nenhuma interação significativa com os reagentes envolvidos no métodos de citotoxicidade foi encontrada. Para os ensaios de citotoxicidade usuais, ou seja, na presença de células, os métodos do MTT e do VN serão utilizados. Estes dois métodos foram escolhidos por melhor representarem as mitocôndrias e os lisossomo, respectivamente, duas estruturas importantes envolvidas no metabolismo celular.

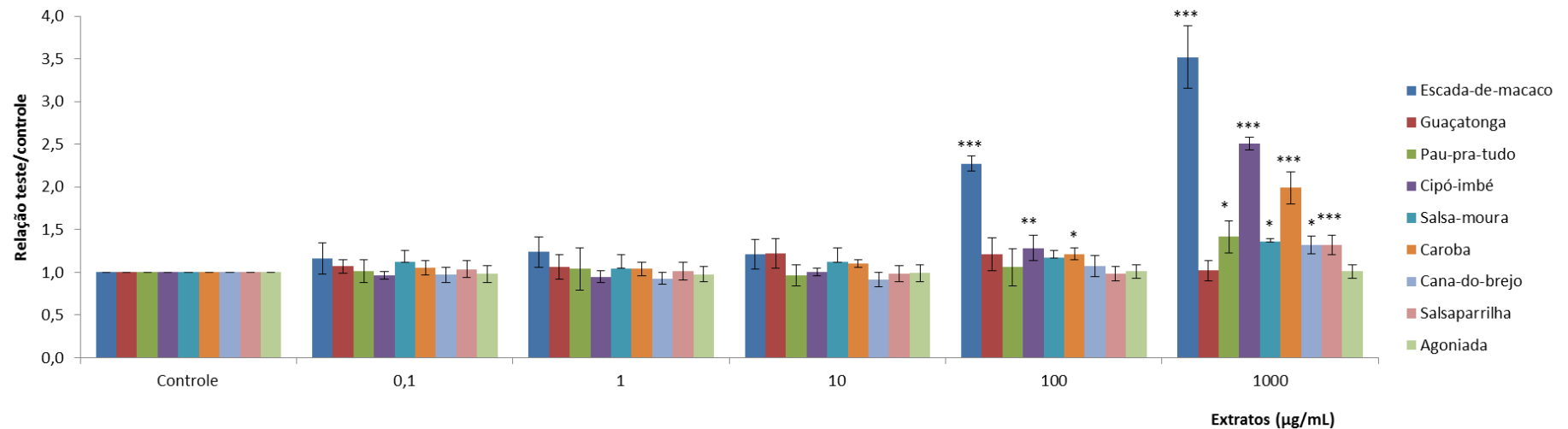


FIGURA 8- INTERAÇÃO DOS EXTRATOS DE PLANTAS COM OCOM CRISTAL VIOLETA. Concentrações indicadas dos extratos foram adicionadas em placas de 96 poços, as quais foram mantidas a 37°C, em atmosfera úmida, 5% CO₂ por 24 horas. Em seguida, o reagente de Cristal Violeta foi adicionado por 3-5 minutos. Após sucessivas lavagens com PBS, foi adicionado solução etanólica citratada. Cada barra representa a média±DP resultante da relação entre a absorvância do extrato e a do controle, para o qual se atribuiu o valor “1,0”, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05.

4.1.4. Linhagem celular B16F10

As células da linhagem B16F10, oriundas do pequeno roedor *Mus musculus*, têm a capacidade de produzir melanina quando estimuladas adequadamente pela adição de agentes específicos, como o aminoácido L-tirosina ou o hormônio estimulador do melanócito (α -MSH); outros indutores incluem a adenosina monofosfato cíclica (AMPC), a prostaglandina E1 e a acetato-13-forbol 12-O-tetradecanoila-éster (BELLEI *et al.*, 2008). Quando saudáveis, apresentam geralmente aspecto fusiforme, refringentes, envoltas em citoplasma abundante e bem definido, assemelhando-se a células epiteliais (Figura 9A), mas durante a produção de melanina, aumentam de volume, adquirindo formato mais alongado, achatado e emitem ramificações semelhantes a dendritos, de formato irregular (Figura 9B).

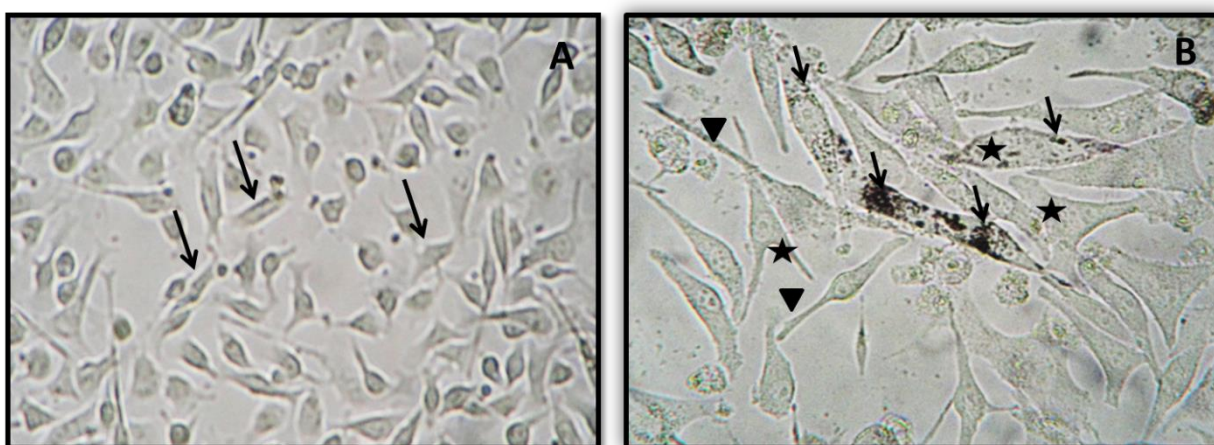


FIGURA 9-ASPECTOS FENOTÍPICOS DA LINHAGEM CELULAR B16F10. (A) Células B16F10, quando cultivadas e mantidas em Meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, apresentam-se com aspecto fusiforme (setas finas). Aumento de 10x. (B) Quando estimuladas pela presença de L-tirosina (500 μ M), um indutor da melanogênese, por exemplo, adquirem fenótipo mais alongado e achatado (estrelas), com dendritos (triângulos), e o acúmulo de melanina se torna evidente (triângulo). Aumento de 25x.

Essas características fazem dessa linhagem um modelo experimental apropriado e amplamente utilizado para se estudar aspectos relacionados à melanogênese. Neste contexto, a medida da atividade de tirosinase e dos níveis de melanina formado por essas células foram utilizados como parâmetros adicionais na avaliação melanogênica dos alcalóides uleína e ioimbina, e dos extratos de HL e RS. Entretanto, essas substâncias tiveram que ser incorporadas ao sistema de cultura

usando o DMSO como solvente. Ainda, L-tirosina (500 μ M) e cloreto de amônio (10 mM) foram adicionados em alguns experimentos para potencializar a atividade melanogênica dessas células. Para eliminar qualquer interferência desses reagentes nos ensaios, seus efeitos sobre a linhagem B16F10 foram previamente avaliados com relação à toxicidade, cujos resultados estão relatados a seguir.

4.1.5. Efeito do Dimetilsulfóxido sobre a viabilidade da linhagem B16F10

O Dimetilsulfóxido (DMSO) é uma molécula anfipática, apresentando domínios altamente polares e dois grupos metil apolares; é, portanto, um reagente útil e amplamente utilizado para diluir ou incorporar substâncias ou extratos de características não aquosas em meios de cultura utilizados em ensaios biológicos cuja composição de água excede 95% (p/v) da formulação do meio (SANTOS *et al.*, 2003). Neste trabalho, o DMSO foi utilizado para a diluição dos extratos em estudo nos meios apropriados para os ensaios. Outros solventes como metanol e etanol foram testados como solventes, porém apenas o DMSO foi capaz de diluir adequadamente os extratos. Assim, células B16F10 foram expostas por 24 horas a concentrações de DMSO presentes nesses ensaios, a fim de se observar a presença de efeitos sobre a viabilidade das células usando os ensaios do MTT e do VN. Os resultados, apresentados na Figura 10, estão expressos em porcentagem de células viáveis em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor de 100%.

A linhagem B16F10 mostrou-se significativamente sensível a ação do DMSO somente a 2,5%, onde, no ensaio do MTT (Figura 10A1), o total de células recuperadas em relação ao controle foi de apenas $50,64 \pm 4,42\%$ ($p < 0,001$), e CL_{70} de 1,51%; já com o ensaio do VN (Figura 10B1), esse percentual foi de $68,99 \pm 3,82\%$ ($p < 0,001$) e CL_{70} de 2,40%.

Na presença de L-tirosina (500 μ M) (Figura 10 B1 e B2), o perfil de toxicidade persistiu, mas com morte de somente $20,52 \pm 2,21$ ($p < 0,05$; $CL_{70} = 3,48\%$) e $11,72 \pm 5,18\%$ ($p < 0,01$; $CL_{70} = 6,86\%$) das células, respectivamente, nos ensaios do MTT e VN. Embora o grau do desfecho fisiológico tenha sido diferente, essa série de ensaios produziu dados comparáveis, ou seja, embora o percentual de sobrevivência celular tenha sido distinto, os resultados se mantiveram dentro da proporcionalidade já observada e descrita por Borenfreund e Puerner (1984).

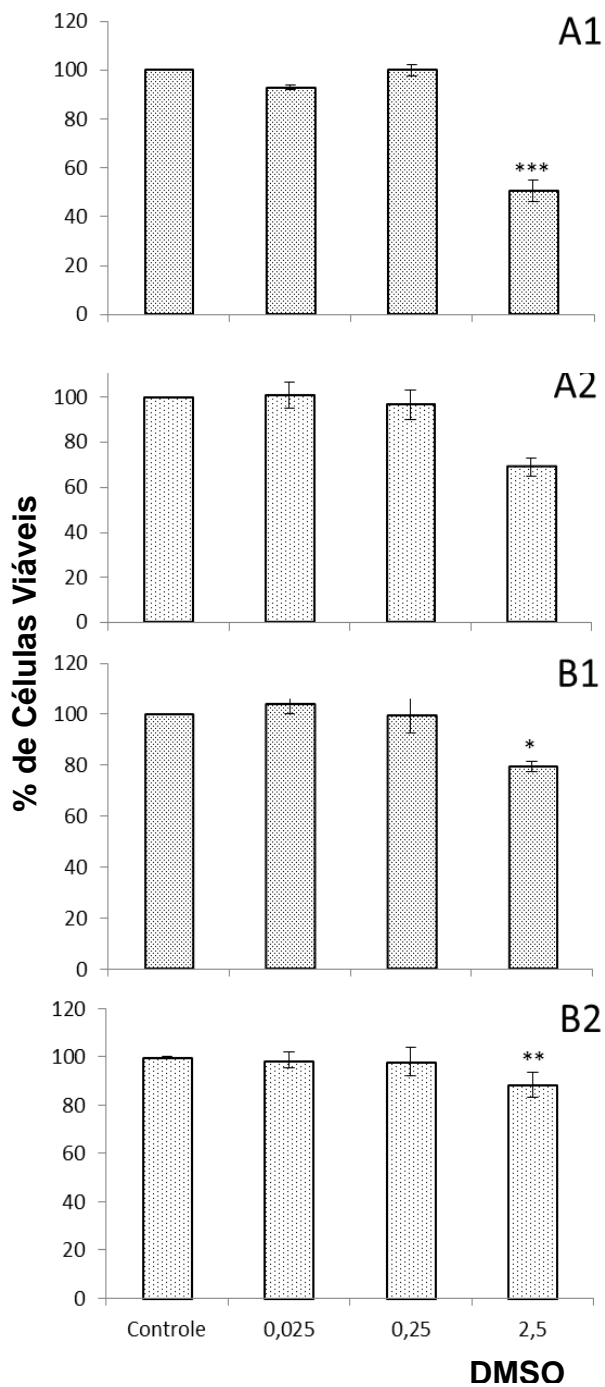


FIGURA 10- EFEITOS DO DMSO SOBRE O COMPORTAMENTO DA LINHAGEM CELULAR B16F10. Células B16F10 foram expostas às concentrações indicadas de DMSO na ausência (A) e na presença (B) de L-tirosina (500 μ M) por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelo ensaio do MTT (1) e VN (2). Cada barra representa a média \pm DP de células recuperadas, expressa em porcentagem, de três a cinco experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ***p < 0,001; **p < 0,01; *p < 0,05 em relação ao controle.

Como a concentração de 2,5% de DMSO correspondia à quantidade desse solvente presente quando se avaliaria os extratos a 1000 µg/mL, ela se tornou limitante nos ensaios de determinação de melanina e de atividade de tirosinase celular, e portanto não foi utilizada nos ensaios posteriores. Para as outras concentrações de DMSO avaliadas, 0,25% e 0,025%, que correspondiam as concentrações de extratos de 100 e 10 µg/mL, respectivamente, não ocorreu alteração significativa da viabilidade celular e, portanto, não há fator limitante para utilização destas concentrações, com relação a concentração de DMSO.

4.1.6. Efeitos do cloreto de amônio e da L-tirosina sobre a viabilidade da linhagem B16F10

Sistemas de cultivo *in vitro* com melanócito murino e células de melanoma humano demonstraram que a adição de cloreto de amônio (NH₄Cl) gera um efeito positivo na melanogênese, aumentando o conteúdo de melanina (KONGSHOPJ *et al.*, 2007). Este dado pode ser explicado pelo fato de que o NH₄Cl age como um agente com capacidade de neutralizar a acidez do melanossomo. Com isso, o pH melanossomal fica mais próximo de 7,4, sendo ótimo para a atividade da tirosinase. Ainda, como a tirosina é considerada um substrato positivo da via melanogênica por ser um dos substratos para a tirosinase, há um favorecimento da melanogênese (SLOMINSKI *et al.*, 2011).

A tirosinase é o foco do estudo porque sua ação regula diretamente o conteúdo de melanina produzido, enquanto as outras enzimas envolvidas no processo melanogênico (TRP-1 e TRP-2) só modificam o tipo de melanina produzida (ANDO *et al.*, 2007).

Ademais, com o pH>6,0 proporcionado pelo NH₄Cl, a captação da L-tirosina pelos melanossomos é intensificada (LUO *et al.*, 2010). Portanto, a combinação desses dois agentes foi utilizada neste trabalho como reguladora positiva da melanogênese. Porém, para tal uso, fez-se necessário primeiro verificar se as doses indicadas na literatura, de 10 mM para o cloreto de amônio e de 500 µM para a tirosina, individualmente ou associadas, não seriam tóxicas para as células B16F10, comprometendo os resultados.

Como resumidamente apresentado na Figura 20, a adição individual ou em associação de NH_4Cl ou de L-tirosina não exerceu efeito tóxico ao sistema quando comparados ao controle, para o qual se atribuiu o valor de 100%. Assim, nos ensaios em que se desejou potencializar a ação da tirosinase, cloreto de amônio 10 mM e tirosina 500 μM foram adicionados ao sistema.

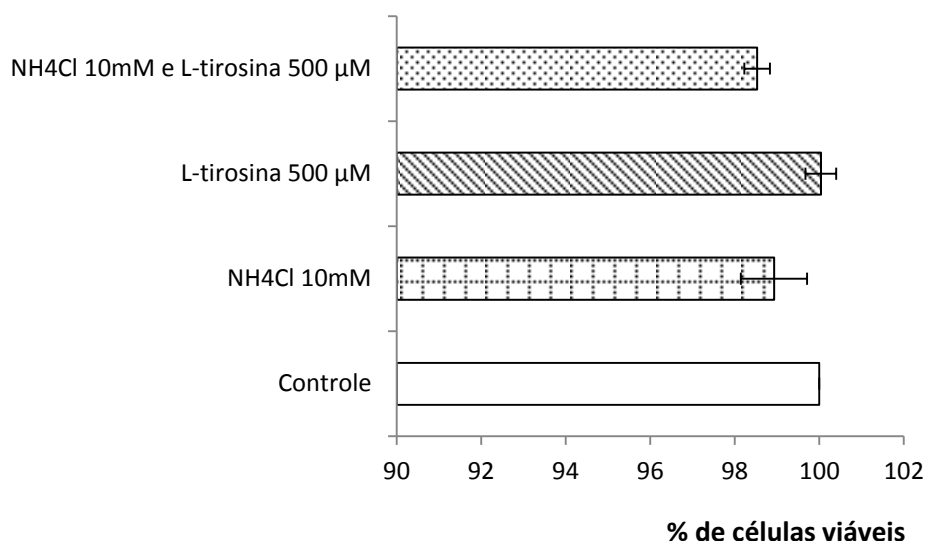


FIGURA 11- EFEITO DA ADIÇÃO DE CLORETO DE AMÔNIO E L-TIROSINA SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO. Células B16F10 foram expostas a L-tirosina (500 μM) e NH_4Cl (10 mM), isolados ou em combinação, por 24 horas, a 37 °C e 5% CO_2 . Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelo ensaio do MTT. Cada barra representa a média \pm DP, expressa em porcentagem de células viáveis recuperadas em relação ao controle, para o qual atribuiu-se o valor de 100%, obtida de três a seis experimentos independentes, realizados em triplicata.

4.1.7. Efeitos dos extratos de *H. lancifolius* e *R. sellowii* e dos alcaloides uleína e ioimbina sobre a viabilidade da linhagem B16F10

Da mesma forma como se procedeu com o cloreto de amônio e a L-tirosina, antes de se estudar a ação dos extratos de *H. lancifolius* e *R. sellowii* e dos alcaloides na melanogênese de células B16F10, essas foram expostas a concentrações crescentes (0,1 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de cada um dos extratos e dos alcalóides (0,004 a 400 μM) e os efeitos sobre a viabilidade avaliados após 24 horas, usando-se os ensaios do MTT e do VN. Os resultados estão apresentados sob a forma de curvas concentração-reposta.

4.1.7.1. *Himatanthus lancifolius* (Müll) Arg.

O extrato de *H.lancifolius* mensurado pelo MTT mostrou-se menos citotóxico às células quando comparado aos resultados obtidos pelo VN (Figura 12A). Pelo MTT, este extrato mostrou-se significativamente tóxico em concentrações iguais ou superiores a 1 µg/mL, sendo a CL₅₀ de 408,38±4,22 µg/mL. Comparativamente, quando mensurado pelo VN, este extrato evidenciou-se significativamente tóxico em concentração igual ou superior a 50 µg/mL, com CL₅₀ de 300,60±7,35 µg/mL.

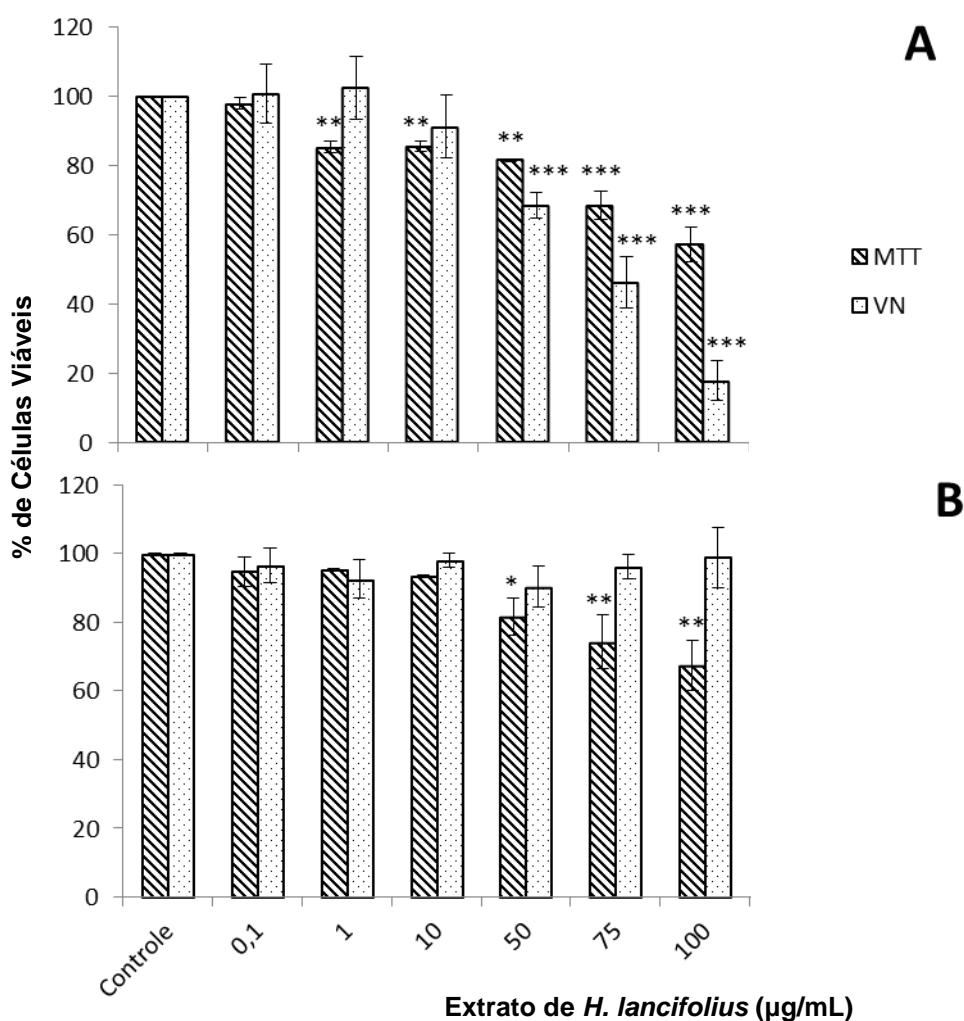


FIGURA 12- EFEITO DO EXTRATO DE *H.lancifolius* SOBRE A VIABILIDADE DE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO. Células B16F10 foram expostas às concentrações indicadas do extrato de *H. lancifolius*, na ausência(A) e na presença (B) de NH₄Cl e L-tirosina, por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelos ensaios do MTT e do Vermelho Neutro (VN). Cada barra representa a média±DP de células viáveis recuperadas, expressa em percentagem em relação ao controle, para o qual atribui-se o valor de 100%, obtida de três a seis experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ***p<0,001; **p<0,01 em relação ao controle.

Na presença de NH_4Cl e L-tirosina (Figura 12B), observou-se que, em contraste com a ausência de toxicidade observada pelo VN, pelo MTT, os percentuais de células viáveis recuperadas para 50, 75 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foram de $81,47 \pm 5,45\%$ ($p < 0,05$); $74,22 \pm 7,84\%$ ($p < 0,01$) e $67,40 \pm 7,25\%$ ($p < 0,01$), respectivamente, sendo a CL_{50} do extrato de agoniada de $442,9 \pm 6,89 \mu\text{g}/\text{mL}$. No ensaio do VN, a CL_{50} foi de $482,08 \pm 9,34 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Dessa forma, a concentração máxima do extrato de *H.lancifolius* estabelecida para ser utilizada nos ensaios de atividade melanogênica subsequentes foi a de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se mensurado pelo método do MTT, e de até 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pelo VN. Quando na presença de NH_4Cl e L-tirosina, as concentrações a serem usadas foram de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para mensuração pelo ensaio do MTT, e de até 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, pelo VN.

4.1.7.2. Uleína

Para a uleína, pelo método do MTT, obteve-se queda significativa e dependente da dose no número de células viáveis, com recuperação de $81,51 \pm 7,80\%$ ($p < 0,05$) na dose de 40 μM e de apenas $10,68 \pm 3,38\%$ a 400 μM , conforme ilustrado na Figura 13A. Quando mensurado pelo VN, nas mesmas condições, a 4 μM de uleína, toxicidade significativa ($p < 0,05$) pode ser evidenciada, sendo que a 40 e 400 μM , esse efeito foi mais pronunciado, com somente $21,74 \pm 3,79$ ($p < 0,001$) e $1,27 \pm 0,76\%$ ($p < 0,001$) de células recuperadas, respectivamente, quando comparados ao controle. A CL_{50} , nessas condições (MTT), foi de $205,55 \pm 10,21 \mu\text{M}$.

De modo semelhante ao observado para com o extrato de agoniada, na presença de NH_4Cl e L-tirosina (Figura 13B), tanto pelo método do MTT quanto do VN, a percentagem de células recuperadas após exposição a uleína foi superior e muito próxima dos valores encontrados para o controle até a concentração de 40 μM ; uma CL_{50} de $280,57 \pm 8,41 \mu\text{M}$ (pelo método do MTT) foi estimada.

Tendo em vista esses desfechos, as concentrações estabelecidas de uleína para ensaios posteriores foram: 4 μM quando mensurado pelo MTT, e de 0,4 μM , pelo VN. Quando as células B16F10 forem estimuladas a produzir

melanina pela presença de NH_4Cl e L-tirosina, a concentração a ser utilizada será de até $40 \mu\text{M}$ do alcaloide.

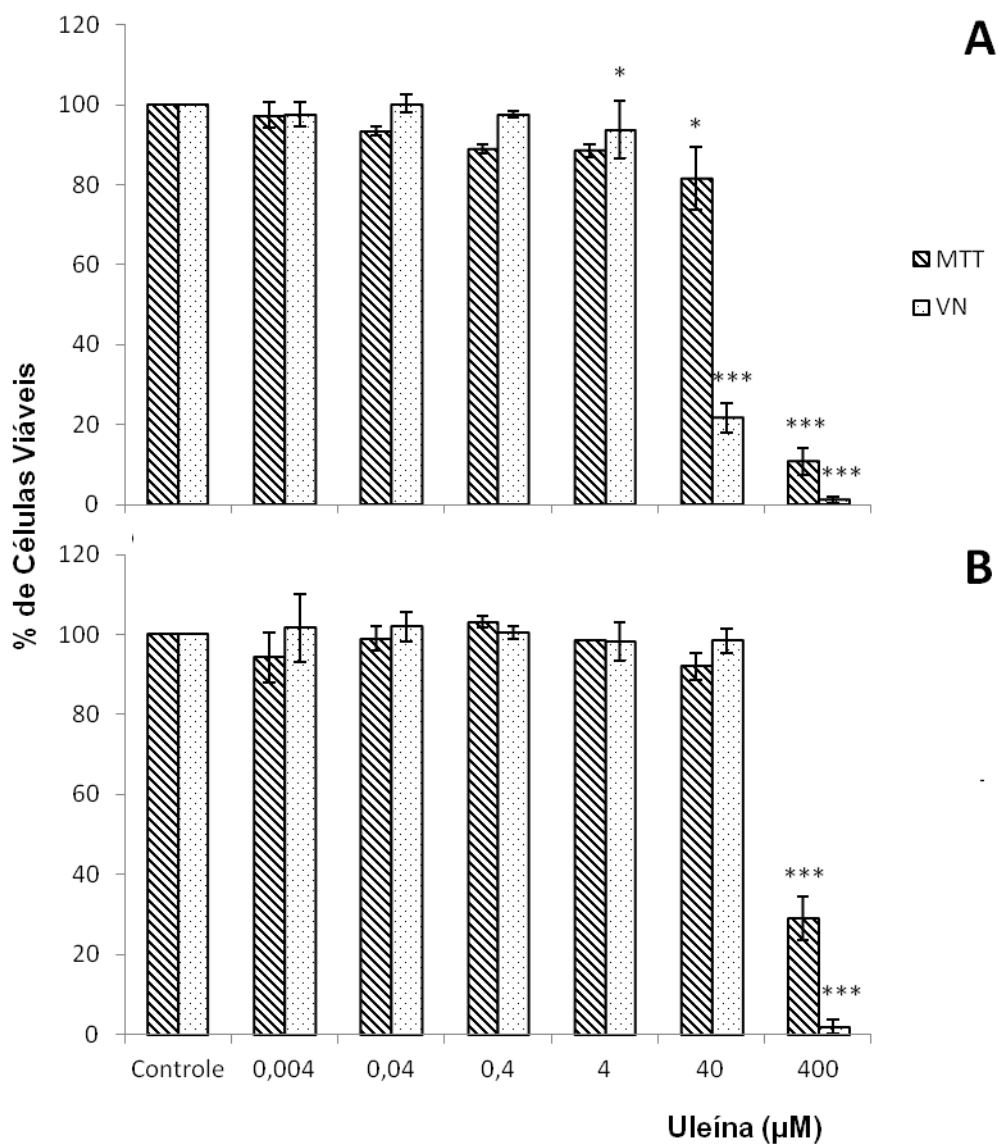


FIGURA 13- EFEITO DO ALCALÓIDE ULEÍNA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO.(A)Células B16F10 foram expostas por 24 horas, a 37°C e 5% de CO_2 , às concentrações indicadas de uleína. Em alguns experimentos (B) NH_4Cl (10 mM) e L-tirosina (500 μM) foram adicionados. Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelo ensaio do MTT ou do Vermelho Neutro. Cada barra representa a média \pm DP de células viáveis recuperadas, expressa em porcentagem em relação ao controle, para o qual atribui-se o valor de 100%, obtida de três a seis experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

4.1.7.3. *Rauvolfia sellowii* Müll. Arg.

Como resultado da presença do extrato de *R. sellowii*, toxicidade significativa pelo MTT foi observada a 10, 50, 75 e 100 µg/mL, com $83,58 \pm 2,54$; $84,17 \pm 7,31$; $83,91 \pm 3,82$ e $83,44 \pm 2,99\%$ ($p < 0,05$ para todos) de células recuperadas (Figura 14A), respectivamente. Na presença de NH_4Cl e L-tirosina (Figura 14B), pouco ou nenhum efeito tóxico relevante foi observado.

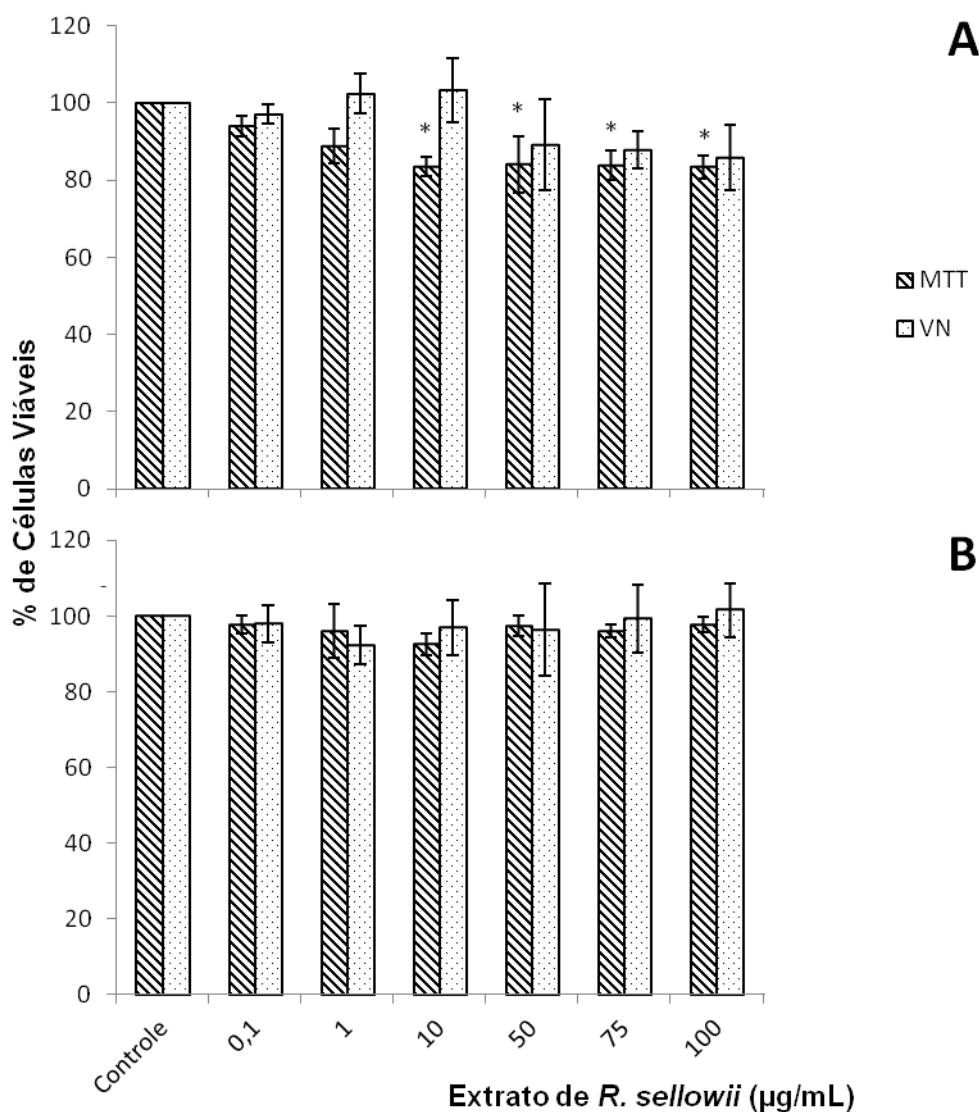


FIGURA 14- EFEITO DO EXTRATO DE *R. sellowii* SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO. (A) Células B16F10 foram expostas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO_2 , às concentrações indicadas do extrato de *R. sellowii*. (B) NH_4Cl (10 mM) e L-tirosina (500 µM) foram adicionados. Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelo ensaio do MTT ou do Vermelho Neutro. Cada barra representa a média±DP de células viáveis recuperadas, expressa em percentagem em relação ao controle, para o qual atribui-se o valor de 100%, obtida de três a seis experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$ em relação ao controle.

Esses resultados permitiram estabelecer que, para a linhagem em estudo, a dose não tóxica do extrato de RS a ser empregada seria de 1 µg/ml conforme ensaio do MTT, e 100 µg/ml no VN. Quando esse extrato for utilizado em ensaios contendo NH₄Cl e L-tirosina, a dose pode ser de até 100 µg/ml (ambos os métodos).

4.1.7.4. Ioimbina

Para o alcaloide ioimbina, a citotoxicidade mensurada pelo MTT foi maior do que a medida pelo VN. No ensaio pelo MTT (Figura 15A), a 4, 40 e 400 µM, houve redução significativa de células metabolicamente ativas, com valores, respectivamente, de 75,97±3,65; 79,57±7,26 e 78,25±7,85% (p<0,01 para os todos) de células viáveis. Pelo método do VN, o perfil de toxicidade se repetiu, com 92,00±3,35 (p<0,05), 88,25±2,03 (p<0,01) e 90,97±0,95% (p<0,05) de viabilidade a 4, 40 e 400 µM.

Já nos ensaios na presença de cloreto de amônio e L-tirosina (Figura 15B), apenas pelo método do MTT e na maior concentração avaliada, 400 µM, foi possível evidenciar toxicidade significativa, com 88,26±3,28% (p<0,05) de células viáveis.

Assim sendo, para os ensaios posteriores de quantificação de melanina e de atividade de tirosinase celular, as doses de ioimbina a serem utilizadas seriam de 0,4 e 40 µM na presença de estímulo melanogênico.

Interessante nesta série de experimentos foi que, comparativamente em todos os ensaios desta seção, maior toxicidade esteve presente sempre que nos ensaios não havia cloreto de amônio e L-tirosina, ou seja, na presença de estímulo favorável à produção de melanina, as células pareciam mais resistentes à toxicidade. Ou, seja, um número superior de células recuperadas quando NH₄Cl e L-tirosina estavam presentes foi observado, sugerindo um “efeito protetor” proporcionado por esses agentes.

Neste contexto, Cunha (2012) descreve que, ao mesmo tempo em que a presença de 400 µM de L-tirosina e 10 mM de cloreto amônio promove estímulo a melanogênese em células B16F10, observa-se inibição da proliferação celular, com um aumento de células no estado quiescente. Há,

também, evidências de que melanócitos, após exposição à radiação UV, estimulam a produção de melanina, evitando a apoptose.

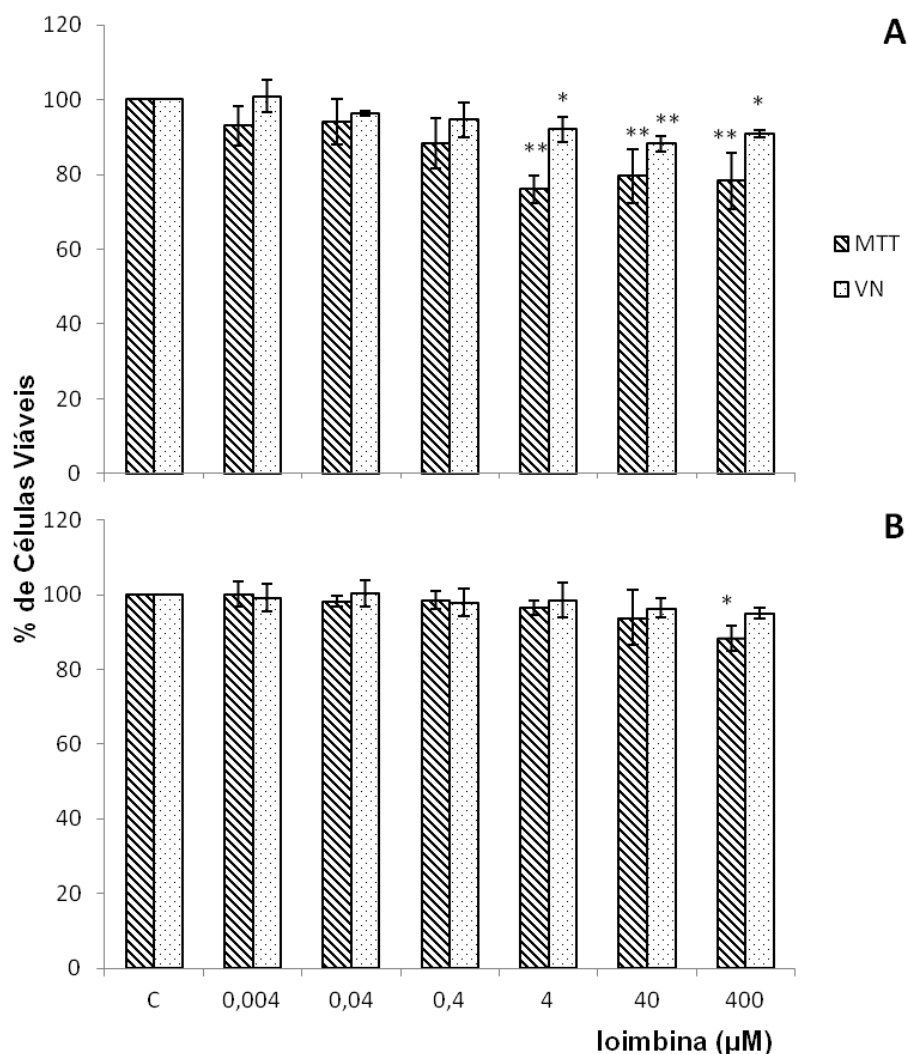


FIGURA 15- EFEITO DO ALCALÓIDE IOIMBINA SOBRE CÉLULAS DE MELANOMA MURINO. (A) Células B16F10 foram expostas por 24 horas, a 37 °C e 5% de CO₂, às concentrações indicadas de loimbina. (B) Em alguns experimentos, NH₄Cl (10 mM) e L-tirosina (500 µM) foram adicionados. Em seguida, a viabilidade foi mensurada pelo ensaio do MTT ou do Vermelho Neutro. Cada barra representa a média±DP de células viáveis recuperadas, expressa em percentagem em relação ao controle, para o qual atribui-se o valor de 100%, obtida de três a seis experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. **p<0,01; *p<0,05 em relação ao controle.

De forma similar, células de melanoma são capazes de desencadear mecanismo de resistência para atrasar sua morte através do estímulo à melanogênese (PINON *et al.*, 2012).

Nossos resultados corroboram com esses relatos, onde estímulo da atividade melanogênica favoreceu a sobrevivência dessas células. Assim, é possível que a estabilidade do pH resultante da presença de NH_4Cl e L-tirosina seja não só conferida aos melanossomos (estabilidade intracelular), como também ao meio de cultura (estabilidade externa), proporcionando ao sistema um ambiente mais favorável à manutenção celular, o qual normalmente tende a acidificar rapidamente em decorrência do metabolismo celular.

4.2. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO

A tirosinase é uma enzima pertencente à família das oxidases comumente encontrada em microorganismos, plantas e animais (SONG *et al.*, 2009; Khan, 2007). Como revisado na introdução deste trabalho e esquematizado na Figura 2, esta enzima, que apresenta dois sítios ativos contendo cobre, oxigênio e resíduos de histidina, é de extrema importância para o processo melanogênico, visto que catalisa a hidroxilação da L-tirosina em L-DOPA e, também, a oxidação de L-DOPA em dopaquinona, ambas reações sendo etapas limitantes na síntese de melanina (SONG *et al.*, 2009; XIE *et al.*, 2003).

A mensuração da atividade de tirosinase se torna, portanto, um método inicial útil para avaliar o efeito de substâncias e, no caso deste projeto, de extratos no processo melanogênico, pois sua inibição leva à diminuição do conteúdo de melanina formado e, conseqüentemente, permite selecionar agentes com potencial para o tratamento de desordens associadas com a produção de melanina (GERMANAS *et al.*, 2007).

A tirosinase extraída de cogumelos, uma proteína com 120 kDa, tem sido amplamente utilizada nos últimos 20 anos em estudos sobre a atividade melanogênica devido não só a facilidade de purificação e conseqüente disponibilidade comercial, como também por envolver uma metodologia menos laboriosa quando comparada àquela utilizando células ou métodos *in vivo* (CHANG, 2009).

Neste contexto, para a avaliação inicial da ação dos extratos e substâncias utilizadas neste trabalho no processo melanogênico, foi utilizada a tirosinase extraída do cogumelo *Agaricus bisporus*. Os alcaloides uleína e ioimbina, assim como os extratos de HL e RS, foram ensaiados nas concentrações entre 4 e 400 μM ,

0,1 e 10 µg/mL e, finalmente, a 50 e 100 µg/mL, respectivamente. Ainda, o ácido kójico (AK; 400 µM) e a hidroquinona (HQ; 5 µM) foram incluídos como controles positivos de sua inibição, pois, como já citado, aquele exerce ação antimelanogênica agindo como quelante de íons cobre, tendo ação no sítio ativo da enzima, e como antioxidante, prevenindo e/ou retardando as etapas que envolvem oxidação. Já a HQ age como substrato alternativo para a enzima (AHN e RHO, 2011). A L-tirosina (500 µM) foi usada como potencializadora da atividade. Em todos os ensaios foi utilizada a L-DOPA como substrato, evidenciando a ação difenolase da tirosinase (ABDEL-HALIM *et al.*, 2008).

Conforme mostra a Figura 16, a L-tirosina, de acordo com o esperado, estimulou significativamente a atividade de tirosinase de cogumelo em $13,86 \pm 4,74\%$ ($p < 0,001$), enquanto o AK e a HQ reduziram-na significativamente em $20,76 \pm 2,67\%$ ($p < 0,001$) e $10,06 \pm 0,57\%$ ($p < 0,01$), respectivamente.

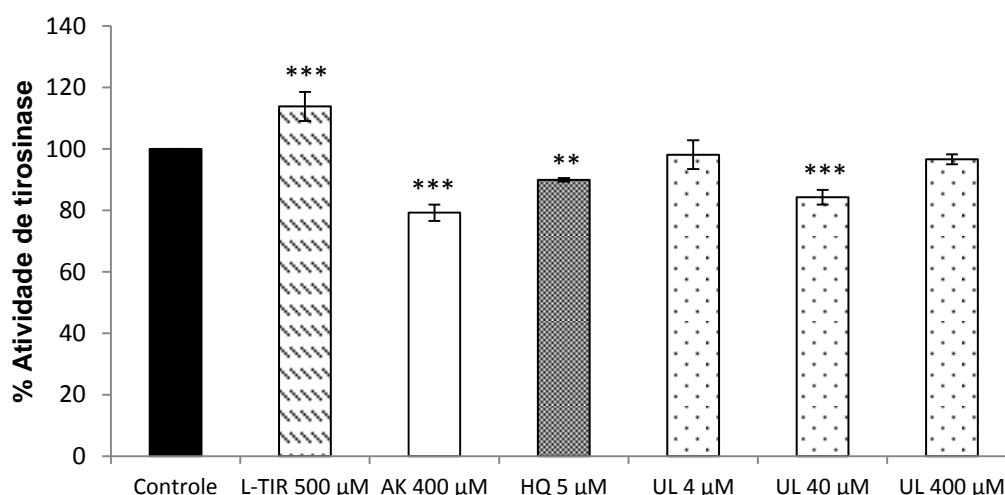


FIGURA 16- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO. Os efeitos das concentrações indicadas de uleína (UL), L-tirosina (L-TIR), ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ) sobre a atividade de tirosinase de cogumelo foram avaliados tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média±DP da atividade de tirosinase em relação ao controle, expressa em porcentagem, obtida de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Importante destacar que diversos autores se utilizam do AK como controle positivo de inibição, porém, as respostas observadas são heterogêneas, variando amplamente de autor para autor. Mapunya e colaboradores (2012), por exemplo, utilizando AK a 351,84 µM, tirosinase a 333 U/mL e um período incubação de

apenas 5 minutos, encontrou inibição ao redor de ~63% da tirosinase de cogumelo em sistema semelhante, onde L-DOPA foi utilizada como substrato. Já no trabalho do grupo de Okunji (2007), com AK a 1 mM, o percentual de inibição encontrado foi de ~96%. Arung e colaboradores (2009), utilizando 703 μM , ou seja, uma concentração 1000 vezes menor, verificou inibição de >96% da atividade de enzima de cogumelo. Essas diferenças com relação aos resultados para a ação inibitória do AK deve-se, grandemente, não só ao método utilizado, mas principalmente nas diferenças na concentração dos reagentes adicionados. Ademais, a ordem de adição destes componentes e das substâncias de interesse pode gerar resultados discrepantes, tornando comparações entre os resultados complexas e, muitas vezes, discrepantes.

Para os alcaloides uleína (Figura 16) e ioimbina (Figura 17), ação inibitória significativa foi evidenciada, porém com perfis distintos de atividade. Para a uleína a 40 μM , observou-se $15,71 \pm 2,44\%$ ($p < 0,001$) de inibição da atividade enzimática. Já para a ioimbina, quanto maior a concentração, maior foi a inibição observada, ou seja, a 40 μM , a ioimbina inibiu em $8,05 \pm 1,79\%$ ($p < 0,05$) a atividade de tirosinase enquanto a 400 μM , a inibição observada foi de $22,32 \pm 1,58\%$ ($p < 0,001$).

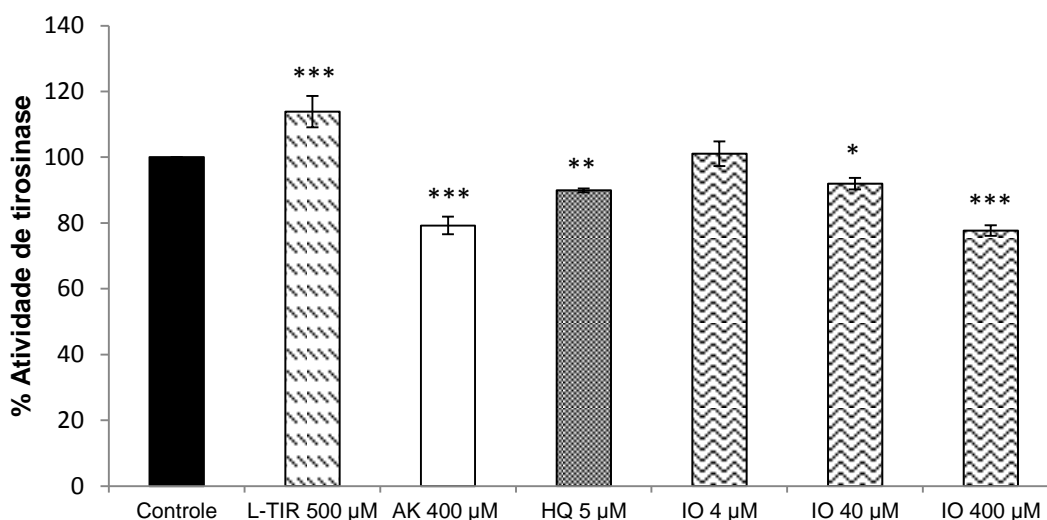


FIGURA 17- INFLUÊNCIA DA IOIMBINA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO. Os efeitos das concentrações indicadas de ioimbina (IO), tirosina (L-TIR), ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ) sobre a atividade de tirosinase de cogumelo foram avaliados tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média \pm DP da atividade de tirosinase em relação ao controle, expressa em porcentagem, obtida de pelo menos três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

O espectro de ação do extrato de HL (Figura 18) foi semelhante ao observado para com a uleína, com inibição significativa da atividade da enzima em $9,10 \pm 2,04\%$ a $1 \mu\text{g/mL}$. Para o extrato de RS (Figura 19), se observou atividade muito discreta, com valores próximos ao controle, pelo menos nas concentrações não tóxicas estudadas.

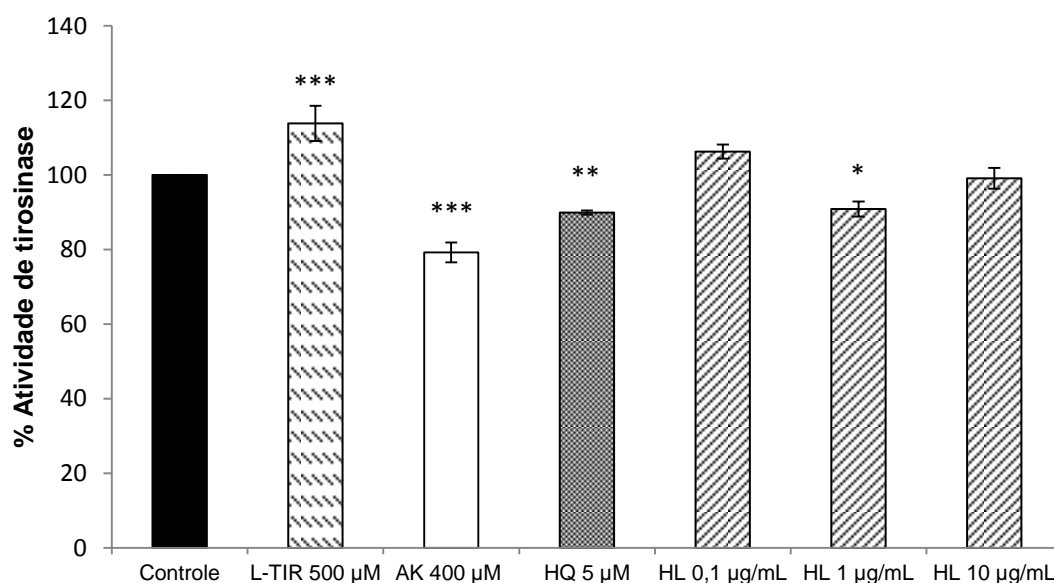


FIGURA 18-EFEITO DO EXTRATO DE *H. lancifolius* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO. Os efeitos das concentrações indicadas do extrato de *H. lancifolius* (HL), tirosina (L-TIR), ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ) sobre a atividade de tirosinase de cogumelo foram avaliados tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média \pm DP da atividade de tirosinase, expressa em porcentagem, em relação ao controle de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

As concentrações de alcalóides que revelaram melhor perfil inibitório ($40 \mu\text{M}$ para uleína, e $400 \mu\text{M}$ para ioimbina) foram submetidas a uma nova série de experimentos, porém desta vez na presença de L-tirosina ($500 \mu\text{M}$), um agente estimulador da atividade de tirosinase, onde a L-DOPA age como doador de hidrogênio, reduzindo a fase *lag* durante a hidroxilação da tirosinase (POMERANZ e WARNER, 1967), na tentativa de se verificar a ação desses agentes sobre a atividade de tirosinase tanto como monofenolase quanto difenolase, simultaneamente; os resultados estão apresentados na Figura 20.

O AK, independente da presença de L-tirosina, manteve seu efeito inibitório significativo, mantendo a inibição enzimática a $20,76 \pm 2,67\%$ e $18,77 \pm 2,02\%$ ($p < 0,001$ para ambos) em relação aos respectivos controles, confirmando sua

atividade quelante de íons cobre, a qual parece não sofrer interferência quando se altera o sistema. Entretanto, o perfil encontrado para a HQ foi outro.

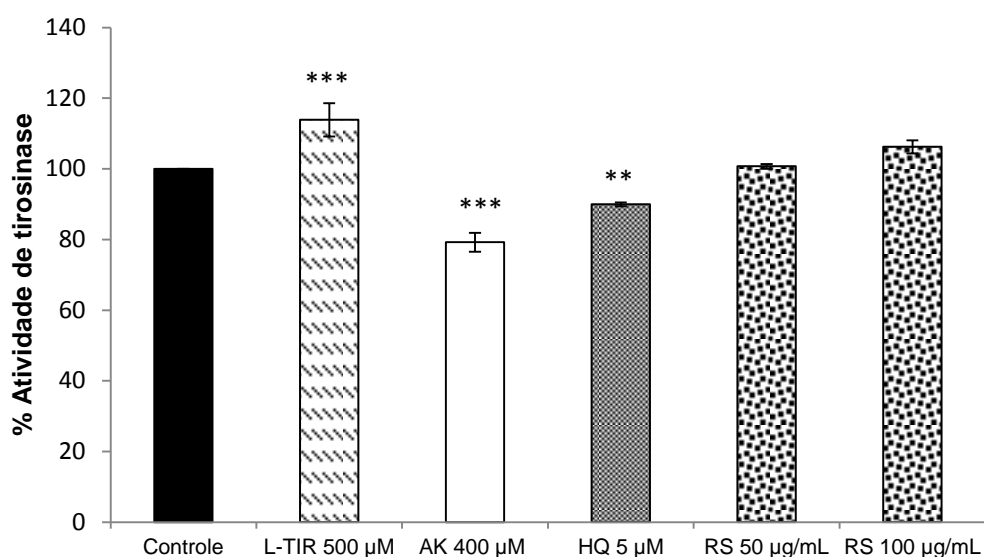


FIGURA 19- EFEITO DO EXTRATO DE *R. sellowii* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO. Os efeitos das concentrações indicadas do extrato de *R. sellowii* (RS), tirosina (L-TIR), ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ) sobre a atividade de tirosinase de cogumelo foram avaliados tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média±DP da atividade de tirosinase, expressa em porcentagem, em relação ao controle de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Na ausência de L-tirosina, observou-se inibição da atividade da enzima em $10,06 \pm 0,57\%$ ($p < 0,01$) como anteriormente citado. Ao se adicionar L-tirosina no sistema, o perfil de inibição enzimática esperado não ocorreu. Ao contrário, observou-se inversão da ação, apresentando-se agora de caráter estimulatório, impulsionando a atividade da enzima significativamente, com $92,45 \pm 1,98\%$ ($p < 0,001$) de atividade superior à observada para o controle estimulado, para o qual atribuiu-se o valor de 100%.

Para a uleína a $40 \mu\text{M}$ ($109,84 \pm 4,25\%$, $p < 0,01$) e ioimbina a $400 \mu\text{M}$ ($99,74 \pm 2,46\%$), de forma semelhante a HQ porém menos intensa, também se observou reversão da ação na presença de L-tirosina, mas com efeito significativo somente para a uleína. Sabe-se que a HQ exerce ação antimelanogênica agindo como um substrato alternativo para a tirosinase. Neste sentido, previne a oxidação do substrato natural, a L-tirosina. A HQ é um substrato mais pobre que a tirosina,

mas na presença de L-DOPA, é oxidada pela tirosinase em uma taxa comparável à observada para a tirosina (PALUMBO *et al.*, 1991; GERMANAS *et al.*, 2007).

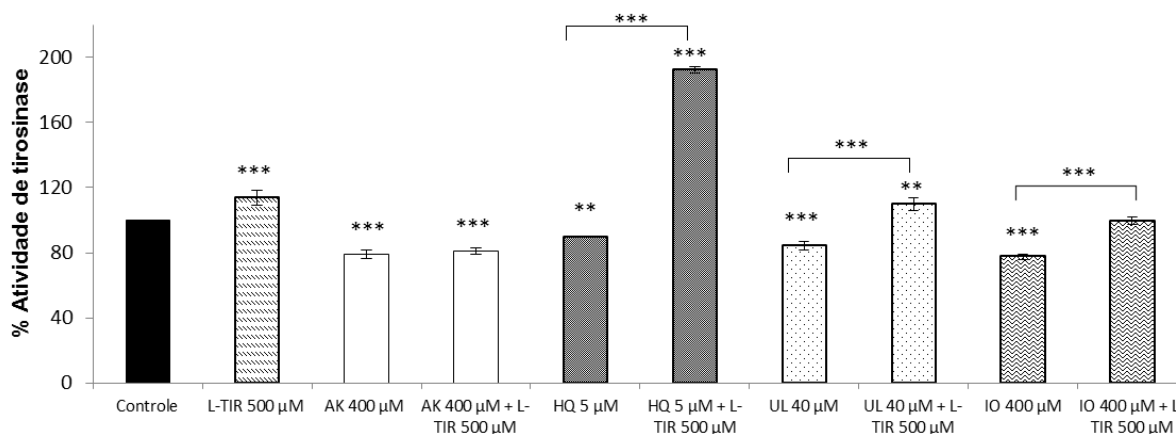


FIGURA 20- EFEITOS DA ULEÍNA E DA IOIMBINA SOBRE A ATIVIDADE DE TIROSINASE DE COGUMELO NA PRESENÇA DE L-TIROSINA. O efeito das concentrações indicadas de uleína (UL), ioimbina (IO), ácido kójico (AK) e hidroquinona (HQ) sobre a atividade de tirosinase de cogumelo na presença de L-tirosina (L-TIR) foi avaliado tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média ± DP da atividade de tirosinase expressa em porcentagem, em relação ao controle de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Assim, estes resultados sugerem que a uleína e a ioimbina apresentam ação inibitória sobre a atividade difenolase da enzima, inibindo a conversão de L-DOPA a dopaquinona. Na presença simultânea de L-tirosina e L-DOPA, provavelmente pelo fato de que essas substâncias têm fraca ação sobre a atividade monofenolase da enzima, a conversão da L-tirosina em L-DOPA seria a via de preferência. Consequentemente, devido ao excesso de L-DOPA no meio, a quantidade dos alcalóides não teria sido suficiente para inibir sua conversão em DOPAquinona, precursor da síntese da melanina (MAPUNYA *et al.*, 2012).

Uma outra explicação para a reversão da ação inibitória da HQ na presença de L-tirosina pode ser baseada no próprio mecanismo de ação deste depigmentante. A HQ é um inibidor reversível competitivo da tirosinase e, como tal, se liga reversivelmente ao mesmo sítio de ligação que o substrato natural, a L-tirosina. Sendo assim, o efeito de inibição pode ser revertido aumentando-se a concentração do substrato preferencial, no caso, L-tirosina. É possível que, nas condições estabelecidas para este estudo, a concentração de L-tirosina tenha sido muito alta

em relação a de HQ; assim, com pouca hidroquinona para competir pelo sítio ativo da enzima, a cessação da ação inibitória tornou-se evidente.

Uma vertente de pesquisadores relata que, *in vitro*, a HQ não age como um substrato primário para a tirosinase. Neste caminho, ao invés de inibir, a HQ teria uma ação estimulatória sobre a atividade de tirosinase. Este fato pode ser explicado pela formação indireta de produtos que são capazes de agir como substratos secundários. Esta ação explicaria, também, a reversão de efeito observada quando a HQ estava na presença simultânea de L-tirosina e L-DOPA (STRATFORD et al., 2012).

Como os alcalóides uleína e ioimbina apresentaram perfil de inibição da ação de tirosinase de cogumelo semelhante ao da HQ, esses resultados sugerem um mecanismo de inibição similar, ou seja, competitivo reversível. Poucos estudos até o momento relatam a atividade inibitória de alcalóides usando tirosinase de cogumelo. Dentre esses, pode-se citar os alcalóides norditerpênicos isolados do extrato preparado das partes aéreas de *Aconitum laeve* Royle, família Ranunculaceae. Dos cinco alcalóides avaliados, somente a lappacotinina e a puberanina apresentaram ação inibitória sobre a tirosinase de cogumelo (SHAHEEN et al., 2005).

As espécies HL e RS pertencem a família Apocynaceae e somente o extrato de HL demonstrou ação inibitória, significativa sobre a tirosinase de cogumelo. Na literatura, verifica-se que, na família Apocynaceae, de maneira similar ao encontrado neste estudo, resultados distintos são descritos quando se avalia a atividade de tirosinase de cogumelo. No estudo de Souza e colegas (2012), por exemplo, ao trabalhar com plantas do Cerrado, extratos hexânico e/ou etanólico das espécies pertencentes à família Apocynaceae também apresentaram ação inibitória sobre a enzima de cogumelo, em contraste com o estudo do grupo de Macrini (2009), onde os extratos aquosos e orgânicos (mistura 1:1 de diclorometano:etanol) das partes aéreas e folhas, respectivamente, das espécies *Malouetia tamaquarina* (Aubl.) A. DC. e *Couma utilis* (Mart.) Mill. Arg., ambas também representantes da família Apocynaceae, não demonstraram efeito. Já o extrato metanólico das cascas das raízes aéreas de *Willughbeia coriacea* apresentaram atividade de inibição da tirosinase utilizando L-Dopa como substrato (ARUNG et al., 2009).

Pouco se conhece sobre a ação anti-tirosinase para o gênero *Himatanthus*. No único trabalho publicado sobre este gênero, observa-se que o extrato propilenoglicol/água (%, 50/50) a 10% das raízes de *H. succuba* apresentou ação

inibitória de ~28% sobre a atividade de tirosinase de cogumelo (BAURIN *et al.*, 2002), ação esta muito superior aos valores de $9,10 \pm 2,04\%$ aqui relatados para o extrato preparado das cascas de HL a $1 \mu\text{g/mL}$. Entretanto, levando em consideração que os métodos utilizados foram diferentes, é difícil fazer comparação dos resultados, uma vez que as concentrações dos reagentes, tempos de reação, tipos de reagentes utilizados e ordem de adição na reação são diferentes. Chang (2009) sugere que esta comparação seja realizada através de uma relação teste/controle de inibição, chamada atividade inibitória relativa, considerando como melhor a relação mais próxima ao valor de 1, ou seja, com o extrato ou substância em teste tão efetivo quanto o controle. No artigo de Baurin e colaboradores, 2002, o inibidor utilizado foi folha de *Morus alba*, Moraceae, que inibiu 97% da atividade da tirosinase de cogumelo, portanto, a relação $28/97$ gera 0,288 de resultado. Com HL, a relação teste/controle ($9,10/20,76$) é 0,438, mais próximo de 1, portanto seria considerado mais efetivo. Porém, como já citado anteriormente, outros fatores devem ser avaliados quando resultados são comparados como procedimento e concentração dos reagentes utilizados. Nos ensaios de atividade de tirosinase posteriores, como controle de inibição foi utilizado somente o ácido kójico, devido a sua maior estabilidade quando em solução, em contraste com a solução de hidroquinona, altamente instável devido a oxidação na presença de luz.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10

Apesar da grande utilização da tirosinase de fungo em ensaios preliminares na busca de novos agentes com ação sobre a melanogênese, esta enzima apresenta algumas limitações (ANDO *et al.*, 2007). Uma delas relaciona-se com o fato de que a enzima de cogumelo está presente no citossol das células e apresenta-se na forma de um tetrâmero, em contraste com a tirosinase humana, a qual é uma enzima monomérica ligada à membrana e que sofre reações de glicosilação durante sua maturação (CHANG, 2009).

Entretanto, a observação da atividade da tirosinase de cogumelo é importante, pois em certos casos pode sugerir se um ou mais mecanismos de ação estão envolvidos. Por exemplo, Luo e colegas (2010) verificaram que o alcaloide indólico dehidroevodiamina, isolado do fruto de *Evodia rutaecarpa*, inibe a tirosinase

de cogumelo em cerca de 22% e a produção de melanina em 70% quando a 33,2 μM na linhagem de melanoma murino; porém não tem ação sobre a tirosinase celular, sugerindo que a diminuição do conteúdo de melanina é decorrente da ação inibitória diretamente sobre a atividade da enzima, ao invés de envolver mecanismos da maquinaria celular, como a supressão de um ou outro expressão relativo à tirosinase, por exemplo.

Mesmo sabendo que tirosinases de diferentes organismos apresentam certa homologia na sequência de aminoácidos, neste trabalho, os experimentos com tirosinase de cogumelo indicaram que tanto os alcalóides uleína e ioimbina como o extrato de HL têm capacidade de interferir na ação melanogênica e, como já sugerido por outros autores (SUGIMOTO *et al.*, 2003), pode haver correlação de eficácia de substâncias avaliadas com a tirosinase humana e, assim, observar se os resultados preliminares deste trabalho poderiam servir como base para estudos então mais específicos.

Neste contexto, mais dois métodos para a avaliação da atividade de tirosinase foram empregados: um utilizando o lisado obtido de células de melanoma murino B16F10 apenas como fonte de tirosinase e, em paralelo, um outro ensaio avaliando o efeito das substâncias e extratos em um sistema de cultivo dessas mesmas células, observando-se a contribuição de toda a maquinaria celular sobre os efeitos. Neste último ensaio em particular, não só a atividade de tirosinase, mas também o conteúdo de melanina total resultante foram avaliados.

Assim, primeiramente, células B16F10 foram cultivadas em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro bovino fetal a fim de se obter quantidade suficiente de lisado celular rico em tirosinase. Vale ressaltar que, nesta etapa, as células cultivadas não entraram em contato com as substâncias em estudo. Uleína e ioimbina a 4 e 40 μM foram utilizados neste método, assim como 0,1 e 1 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de HLe 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de RS. Como controle, foi novamente utilizada L-tirosina (500 μM) como regulador de estímulo da atividade de tirosinase. A hidroquinona não foi utilizada nestes ensaios pois apresentou-se como uma solução altamente instável, oxidando rapidamente na presença de pouca quantidade de luz, além disso, sua utilização *in vivo* esta sendo questionada devido a elevada citotoxicidade, já relatada neste trabalho. Sendo assim, apenas o ácido kójico (400 μM) foi utilizado como modulador de inibição. Os resultados estão demonstrados nas Figuras 21, 22 e 23.

Conforme esperado (Figura 21), a L-tirosina estimulou a atividade de tirosinase murina em $8,87 \pm 2,14$ ($p < 0,001$), valor próximo ao obtido com os ensaios usando enzima de cogumelo ($13,86 \pm 4,74\%$). O AK, por sua vez, apresentou perfil de inibição bem mais acentuado do que o observado para com a tirosinase de cogumelo, com $75,72 \pm 4,77\%$ de inibição.

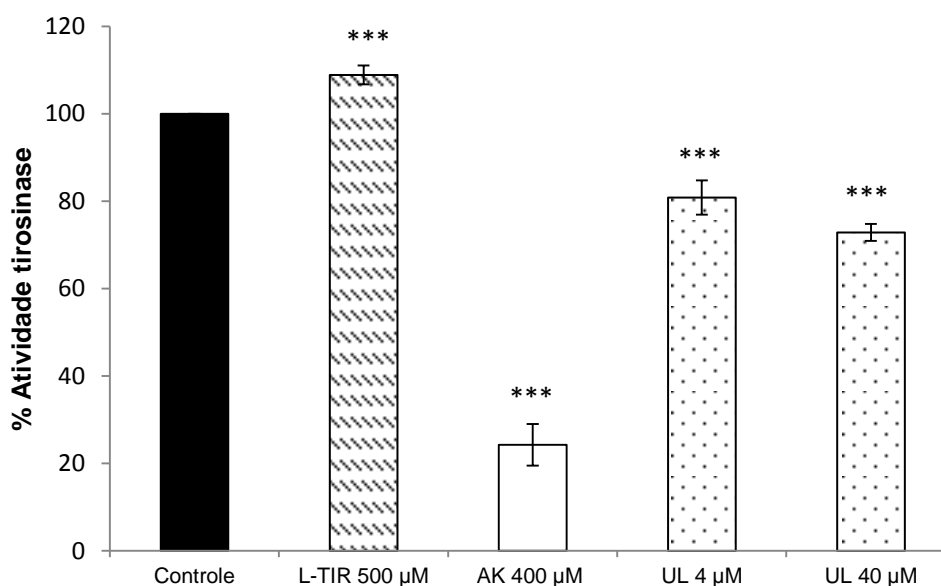


FIGURA 21- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10. O efeito das concentrações indicadas de uleína (UL), L-tirosina (L-TIR) e ácido kójico (AK) foi avaliado sobre a atividade de tirosinase extraída de células B16F10 tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média ± DP da atividade de tirosinase expressa em porcentagem, em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor 100% obtido de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Para a uleína, inibição significativa e dependente da dose foi observada em relação ao controle (Figura 21), com $19,17 \pm 3,92$ e $27,16 \pm 1,96\%$ ($p < 0,001$ para ambos), respectivamente, a 4 e 40 µM. Para a ioimbina (Figura 22), inibição significativa de $16,67 \pm 4,49\%$ ($p < 0,001$) também foi observada, mas somente a 40 µM; em ambas as situações, o efeito inibitório foi maior do que aquele observado para com a tirosinase de cogumelo.

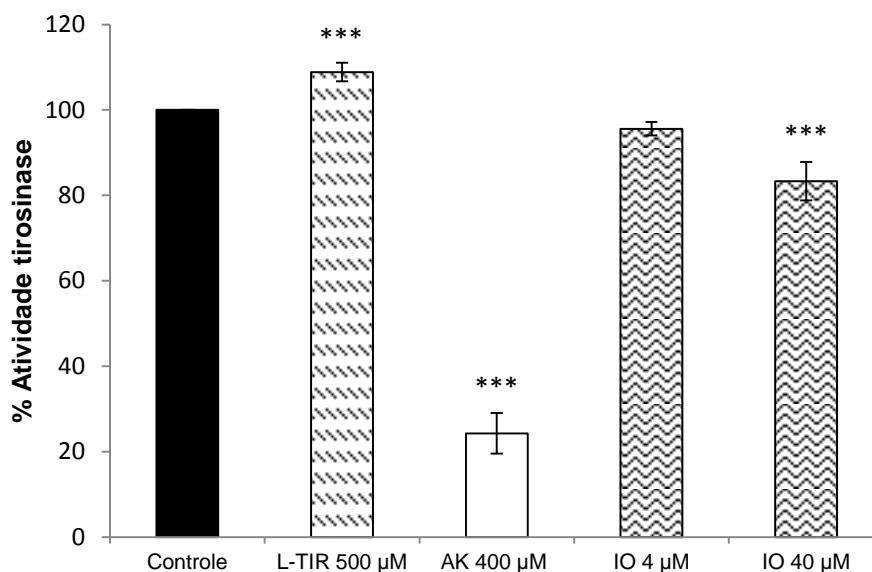


FIGURA 22- INFLUÊNCIA DA IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10. O efeito das concentrações indicadas de ioimbina (IO), L-tirosina (L-TIR) e ácido kójico (AK) foi avaliado sobre a atividade de tirosinase extraída de células B16F10 tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média±DP da atividade de tirosinase expressa em percentagem, em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor 100% obtido de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Com o extrato de HL (Figura 23), nas duas concentrações testadas, foi possível evidenciar ação significativa sobre a ação da tirosinase murina, com somente $90,23 \pm 3,06$ ($p < 0,05$) e $82,35 \pm 2,94\%$ ($p < 0,001$), respectivamente, de atividade.

Poucos estudos semelhantes foram relatados utilizando células de melanoma murino apenas como fonte de enzima, já que a maioria dos estudos utiliza tirosinase oriunda de fungo ou ainda realiza ensaios tratando células B16F10 vivas com as substâncias em teste. Vale ressaltar que ao utilizar células de melanoma murino apenas como fonte de tirosinase, apenas o lisado celular entra em contato com as substância em teste, e não entrando em contato com as células vivas. Dos encontrados, destacam-se dois do mesmo grupo, onde foram encontrados resultados inibitórios para o AK (OHGUCHI *et al.*, 2003; OHGUCHI, 2003).

De maneira semelhante ao que ocorreu com o AK com este tipo de tirosinase, o perfil de inibição de todas substâncias e extratos testados foi mais acentuado, excetuando-se o extrato de RS, para o qual pouca ou nenhuma ação foi evidenciada (dados não mostrados). Neste ensaio, entretanto, inibição significativa foi possível

de ser observada para a uleína já a 4 μM e para o extrato de HL a 0,1 $\mu\text{g/mL}$, mostrando maior especificidade da enzima.

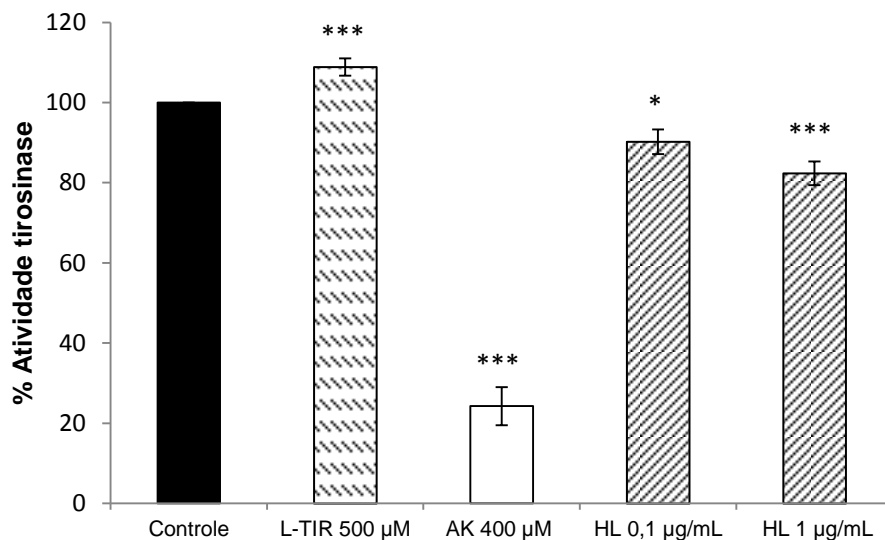


FIGURA 23- INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *H.lancifolius* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10. O efeito das concentrações indicadas do extrato de *H.lancifolius* (HL), L-tirosina (L-TIR) e ácido kójico (AK) foi avaliado sobre a atividade de tirosinase extraída de células B16F10 tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média \pm DP da atividade de tirosinase expressa em porcentagem, em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor 100% obtido de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$; * $p < 0,05$.

De forma similar ao ocorrido neste trabalho, onde KIM e colegas (2002) também utilizaram ambas as tirosinases de cogumelo e a extraída de células B16F10 para avaliar a ação de oito substâncias, perfil de inibição maior sobre a atividade da enzima provinda do lisado celular em detrimento da de cogumelo também foi observado. Em contraste, Tandon (1998) demonstrou ação estimulatória da atividade de tirosinase dependente da dose para o agente antimelanoma N-propionil-4-S-cisteaminilfenol. É provável que o perfil inibitório mais acentuado pode estar relacionado às características de cada tirosinase, o que seria uma resposta favorável, visto que as substâncias e os extratos em estudo mostraram ação inibitória mais pronunciada sobre a enzima com maior similaridade a humana.

Tendo em vista os resultados relevantes com a uleína e a ioimbina, um novo ensaio foi realizado, onde essas substâncias foram simultaneamente adicionadas ao

sistema e, na presença de L-DOPA, a ação da tirosinase oriunda de células B16F10 foi observada. Este ensaio foi realizado na tentativa de verificar se a adição conjunta destes dois alcalóides poderia evidenciar uma ação sinérgica, aditiva ou até mesmo antagonica. Os resultados estão apresentados na Figura 24.

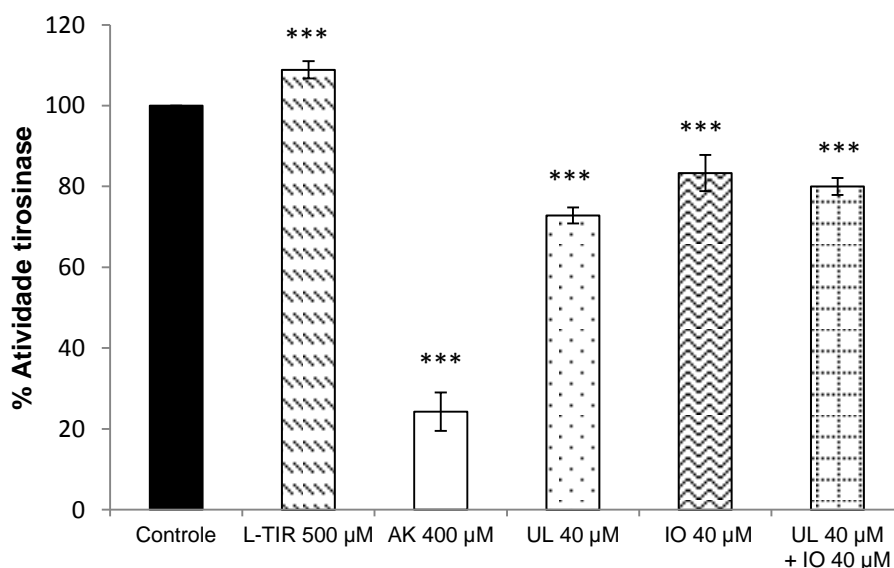


FIGURA 24- INFLUÊNCIA DA ADIÇÃO SIMULTÂNEA DE ULEÍNA E IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE EXTRAÍDA DE CÉLULAS B16F10. O efeito das concentrações indicadas de uleína (UL), ioimbina (IO), isoladas ou em combinação, L-tirosina (L-TIR) e ácido kójico (AK) foi avaliado sobre a atividade de tirosinase extraída de células B16F10 tendo L-DOPA como substrato. Cada barra representa a média±DP da atividade de tirosinase expressa em percentagem, em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor 100% obtido de, pelo menos, três experimentos independentes. *** $p < 0,001$.

Como anteriormente citado, quando isoladas e comparadas ao controle, tanto a uleína como a ioimbina a 40 µM reduziram, respectivamente, a atividade da tirosinase de origem murina para $72,84 \pm 1,96\%$ e $83,33 \pm 4,49\%$. Quando associadas, os valores de inibição registrados foram de $80,02 \pm 2,09\%$, portanto, sem alteração dos resultados individuais obtidos com os alcalóides, sugerindo que estes alcalóides, na presença de L-DOPA, provavelmente apresentam ação competitiva sobre a enzima. Talvez, com doses menores de cada alcalóide poderia ter sido possível evidenciar possível ação sinérgica ou aditiva de inibição sobre a atividade de tirosinase.

4.4.DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE E FORMAÇÃO DE MELANINA EM CÉLULAS B16F10

Como nos referimos anteriormente, a linhagem de melanoma murino B16F10 constitui-se de células de aspecto fibroblastóide que se desenvolvem com relativa facilidade *in vitro*. Entretanto, é altamente tumorigênica *in vivo*, crescendo espontaneamente em camundongos, com grande habilidade de formar metástases (NAKAMURA *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2001); assim, são usadas para o estudo das várias etapas envolvidas na progressão tumoral e da melanogênese (NGUYEN *et al.*, 2007; OHIRA *et al.*, 1994).

A influência de substâncias e de extratos nas etapas oxidativas catalisadas pela tirosinase pode estar relacionada a mecanismos de ação relativos diretamente à atividade enzimática, como os até aqui realizados, ou àqueles que envolvem vias de maior complexidade, como a interferência em genes que regulam a expressão de moléculas envolvidas na melanogênese, por exemplo. Ainda, é possível que as substâncias de interesse possam atuar em uma ou mais das diversas etapas do processo, como na indução da síntese de AMPc, no estímulo ao PKA, entre outros (LEE, JUNG *et al.*, 2007).

A interferência na síntese de tirosinase pode ser avaliada quando células melanogênicas, como as da linhagem B16F10, são tratadas com as substâncias ou extratos de interesse por um período controlado de tempo e, em seguida, são lisadas, tendo o conteúdo de tirosinase avaliado no lisado celular pela formação de dopacromo na presença de um substrato para a melanogênese, como, por exemplo, a L-DOPA.

O fato é que os resultados dos efeitos dos extratos de *H. lancifolius* e de *R. sellowii* e dos alcaloides uleína e ioimbina sobre as atividades da tirosinase de cogumelo e da extraída de células B16F10 nos levaram a explorar seus efeitos na melanogênese promovida por células B16F10, avaliando não somente o efeito das substâncias e extratos sobre a ação da tirosinase e nos níveis de melanina, mas também verificando a contribuição da maquinaria celular neste processo. Neste sentido, os testes de toxicidade realizados permitiram, então, estabelecer limites extremos de doses a serem usados nesses ensaios.

Ainda, concentrações dos extratos de *H. lancifolius* e de *R. sellowii* e dos alcaloides uleína e ioimbina que não alteraram a viabilidade celular foram avaliadas com relação às suas ações na síntese de melanina e na atividade de tirosinase em dois momentos: no primeiro, denominado “estado basal”, eles somente foram adicionados às culturas suplementadas com 1% soro fetal bovino, onde sabe-se que as células são mantidas vivas, mas com a taxa de metabolismo reduzido; em um segundo momento, cloreto de amônio e L-tirosina foram simultaneamente adicionados a essas condições, no sentido de favorecer o processo melanogênico, o qual passou, então, a ser denominado “sob estímulo”.

4.4.1. Influência dos extratos e alcaloides na atividade de tirosinase basal de células B16F10

Como apresentado na Figura 25 e corroborando os ensaios de atividade de tirosinase de cogumelo e de tirosina oriunda de células B16F10 sem tratamento, os alcaloides uleína e ioimbina, além do extrato de HL, exerceram ação inibitória sobre a atividade basal de tirosinase quando células B16F10 foram a eles expostas por 24 horas.

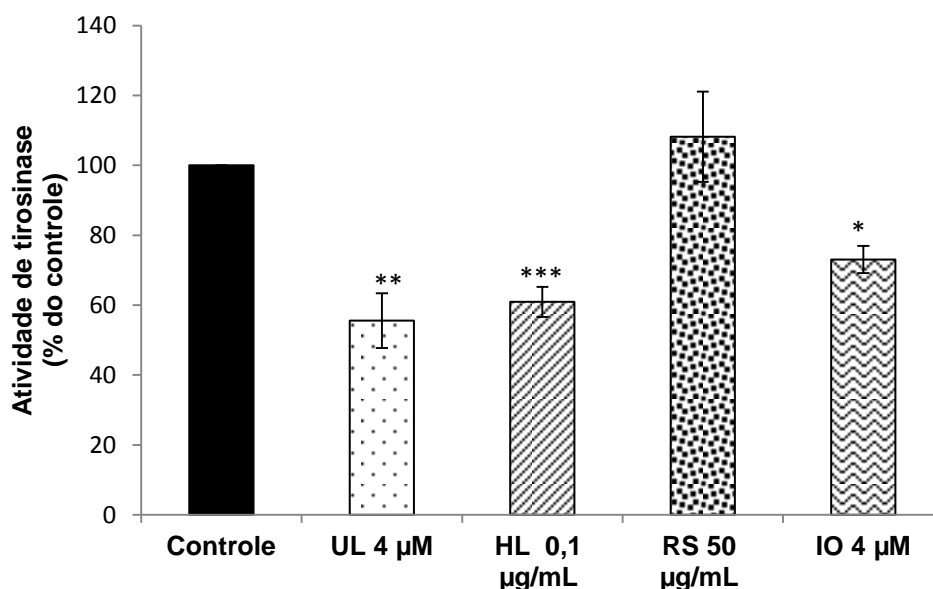


FIGURA 25- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA, IOIMBINA E DOS EXTRATOS DE *H.lancifolius* E *R. sellowii* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR BASAL. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de uleína (UL), ioimbina, (IO) e dos extratos de *H. lancifolius* (HL) e *R. sellowii* (RS) por 24 horas, a 37 °C e a atividade de tirosinase basal determinada no lisado celular. Cada barra representa a média±DP de atividade de tirosinase em percentagem do controle, mensurada em dopacromo, para a qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes. ***p<0,001; **p<0,01; *p<0,05 em relação ao controle.

A uleína a 4 μM reduziu significativamente a ação dessa enzima em relação ao controle, com valores de $55,56 \pm 7,86\%$ ($p < 0,01$). Para a ioimbina, nesta mesma concentração, observou-se também inibição da ação em mais de 26% em relação ao controle, ou seja, a atividade da enzima foi reduzida a $73,03 \pm 3,88\%$ ($p < 0,05$).

O efeito inibitório sobre atividade da tirosinase da ioimbina, na ausência de estímulo ou na presença de AMPc e forskolina já foi descrito anteriormente por Fuller e colaboradores (2000) utilizando melanócito humanos de alta e baixa pigmentação, e células de melanoma de rato Cloudman S-91 como modelo experimental, corroborando com os resultados de inibição para a ioimbina aqui obtidos. Neste artigo, foi demonstrado que a ioimbina inibe de maneira concentração e tempo-dependente a atividade de tirosinase em melanócitos humanos, com um mínimo de inibição quando adicionado $1\mu\text{M}$ deste alcalóide e com máximo de inibição utilizando $100\mu\text{M}$ de ioimbina (FULLER et al, 2000). Não foi possível comparar os resultados, com relação aos dados numéricos de inibição, uma vez que o método utilizado por Fuller e colaboradores diverge grandemente do utilizado neste trabalho.

Já o extrato de HL a $0,1\ \mu\text{g/mL}$ inibiu em quase 40% a tirosinase celular quando comparado ao controle, reduzindo significativamente os valores de atividade de tirosinase a $60,93 \pm 4,33\%$ ($p < 0,001$). Finalmente, para o extrato de RS a $50\ \mu\text{g/mL}$, se observou efeito estimulante discreto, com valores de apenas $108,16 \pm 12,93\%$ quando comparado ao controle, para o qual se atribuiu o valor de 100%.

4.4.2. Influência dos extratos e alcaloides na atividade de tirosinase de células B16F10 “sob estímulo”

Em condições onde a ação enzimática foi estimulada pela presença de L-tirosina, para a uleína, nas duas concentrações avaliadas (Figura 26), observou-se inibição significativa, com valores de $77,06 \pm 18,06$ e $71,74 \pm 8,70\%$ ($p < 0,001$ para ambos), respectivamente, a 4 e $40\ \mu\text{M}$.

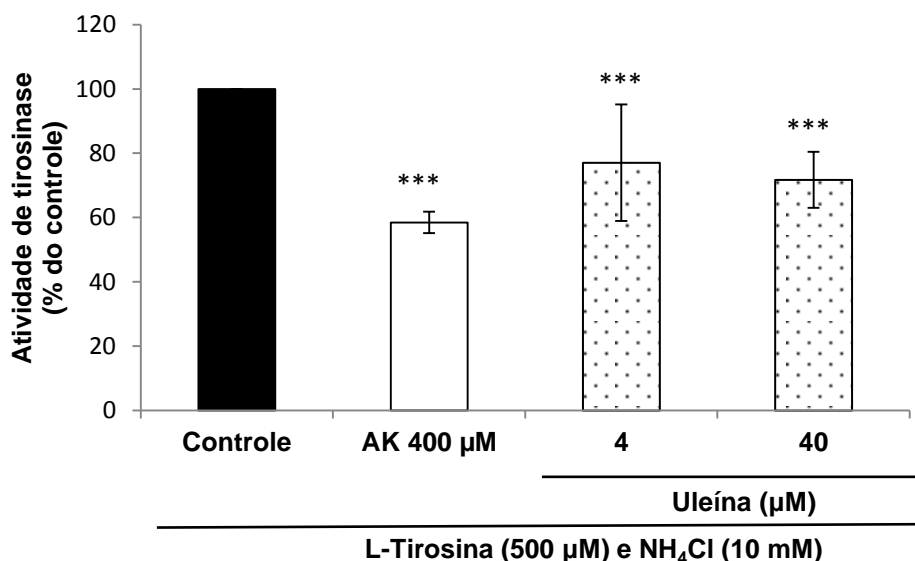


FIGURA 26- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de uleína(UL) ou ácido kójico (AK), na presença de L-tirosina (500 µM) e cloreto de amônio (10 mM) por 24 horas, a 37 °C e a atividade de tirosinase determinada no lisado celular. Cada barra representa a média±DP de atividade de tirosinase expressa em percentagem em relação ao controle, mensurada em dopacromo, para a qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes. ***p<0,001 em relação ao controle.

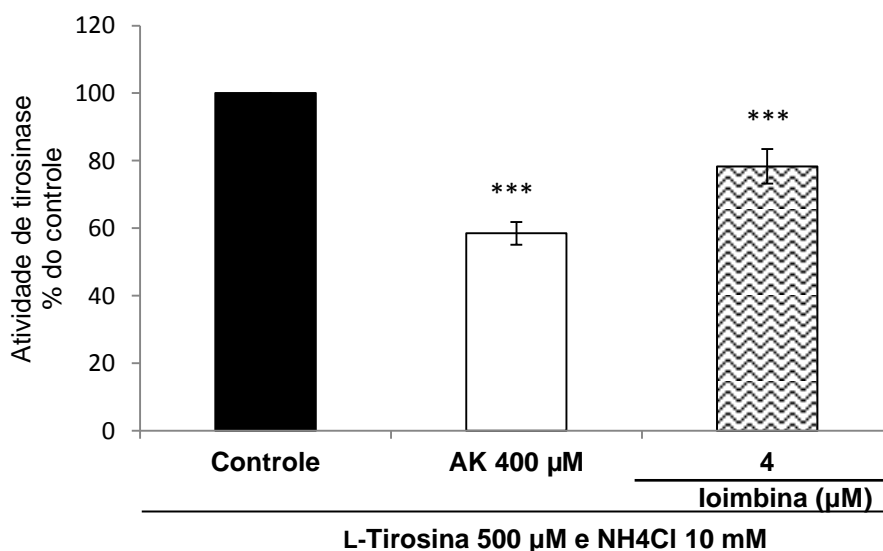


FIGURA 27- INFLUÊNCIA DA IOIMBINA NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de ioimbina (IO) ou ácido kójico (AK), na presença de L-tirosina (500 µM) e cloreto de amônio (10 mM) por 24 horas, a 37 °C e a atividade de tirosinase determinada no lisado celular. Cada barra representa a média±DP de atividade de tirosinase expressa em percentagem em relação ao controle, mensurada em dopacromo, para a qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes. ***p<0,001 em relação ao controle.

Já para o alcaloide ioimbina (Figura 27), sob estímulo, a 4 μ M ocorreu inibição significativa ($p < 0,001$), com valores de atividade de tirosinase 78,32 \pm 5,02%.

Para o extrato de HL (Figura 28), valores foram significativos apenas para a concentração de 1 μ g/mL, onde a atividade de tirosinase foi reduzida a 65,22 \pm 4,35% ($p < 0,001$).

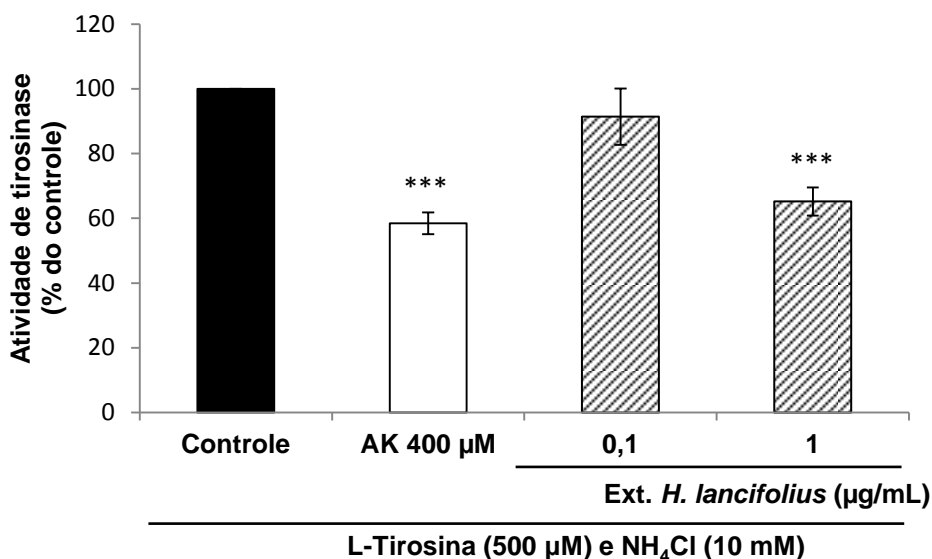


FIGURA 28- INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *H. lancifolius* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR, NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *H. lancifolius* ou ácido kójico (AK), na presença de L-tirosina (500 μ M) e cloreto de amônio (10 mM) por 24 horas, a 37 °C e a atividade de tirosinase determinada no lisado celular. Cada barra representa a média \pm DP de atividade de tirosinase expressa em porcentagem em relação ao controle, mensurada em dopacromo, para a qual se atribuiu o valor "100%", obtida de três a seis experimentos independentes. *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

Por sua vez, os resultados para com o extrato de RS mostraram-se interessantes (Figura 29), onde se observou pela primeira vez, na dose de 50 μ g/mL, estímulo significativo da melanogênese, com níveis de atividade enzimática de 117,19 \pm 6,45% ($p < 0,01$).

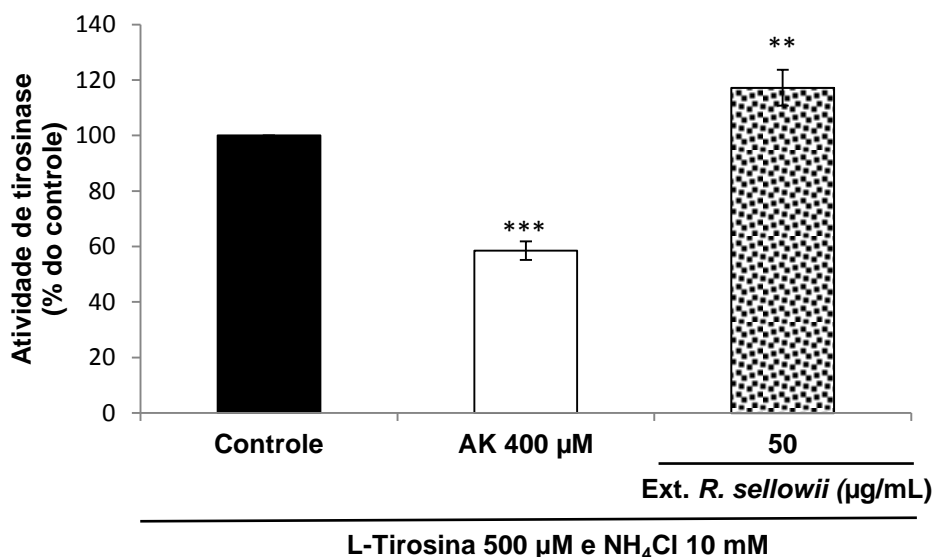


FIGURA 29- INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *R. sellowii* NA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *R. sellowii* ou ácido kójico (AK), na presença de L-tirosina (500 µM) e cloreto de amônio (10 mM) por 24 horas, a 37 °C e a atividade de tirosinase determinada no lisado celular. Cada barra representa a média±DP de atividade de tirosinase expressa em percentagem em relação ao controle, mensurada em dopacromo, para a qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes. ***p<0,001; **p<0,01 em relação ao controle.

4.4.3. Quantificação de melanina

4.4.3.1. Doseamento de proteínas

Devido aos efeitos causados pela uleína, ioimbina e extratos de HL e RS sobre a atividade de diferentes tirosinases, em particular nesta última série de experimentos, e como a produção de melanina geralmente depende dessa ação, investigou-se seus efeitos também sobre o conteúdo de melanina. Para tanto, utilizou-se o sedimento do homogenato celular obtido de células B16F10 após exposição controlada aos agentes em estudo.

Assim, após centrifugação do homogenato, obteve-se o lisado celular do sobrenadante, o qual foi utilizado não só para a determinação de atividade de tirosinase, desta feita observando-se o efeito da maquinaria celular, mas também no doseamento de proteínas totais pelo método de Bradford (1976). A concentração de proteínas totais foi obtida com auxílio de curvas dose-resposta usando soroalbumina bovina como padrão (Figura 30).

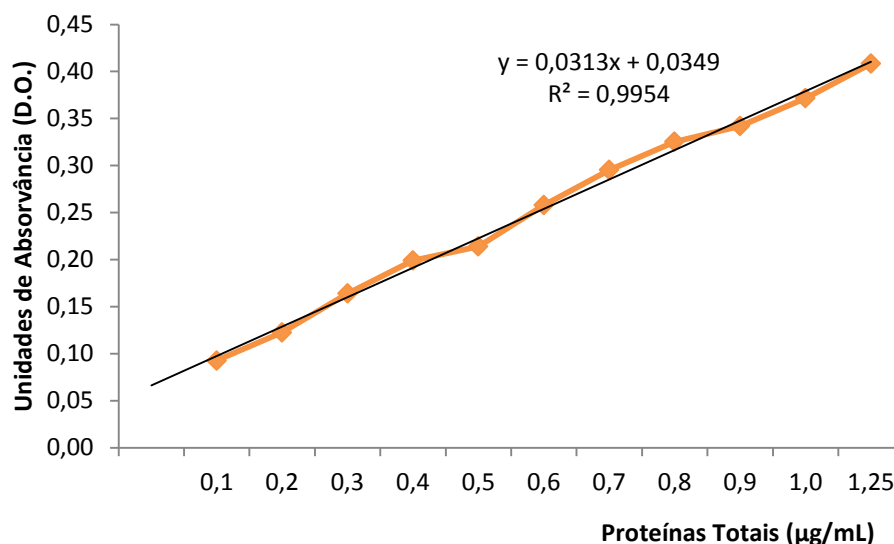


FIGURA 30- CURVA PADRÃO DE SOROALBUMINA BOVINA TÍPICA DE UM EXPERIMENTO.

Já do *pellet* do homogenato, determinou-se o conteúdo de melanina, ajustado em função do conteúdo proteico, e que foi expresso como percentagem do controle, para o qual se atribuiu o valor de 100%. O conteúdo de melanina no *pellet* celular também foi calculado com auxílio de curvas dose-resposta como a exemplificada na Figura 31, usando melanina de *Sepia officinalis* como padrão.

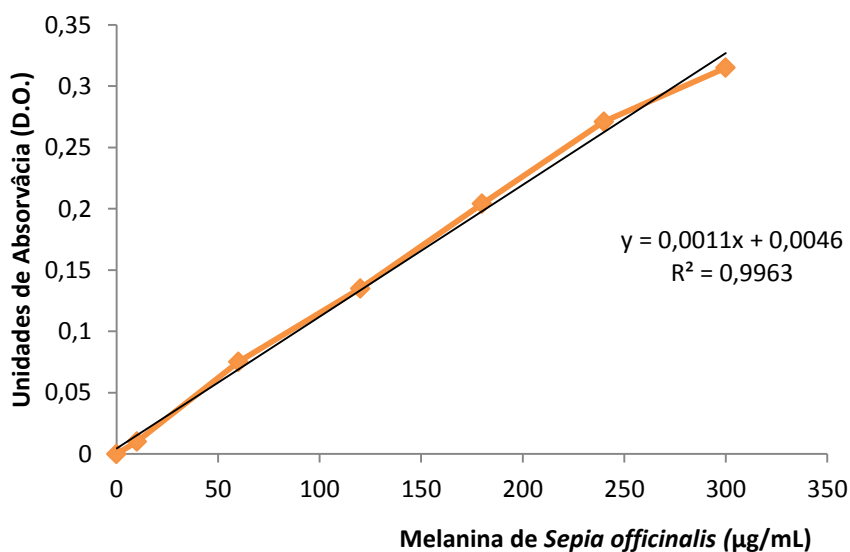


FIGURA 31- CURVA PADRÃO DE MELANINA DE *Sepia officinalis* TÍPICA DE UM EXPERIMENTO.

4.4.3.2. Influência dos extratos e alcaloides no conteúdo de melanina basal

Para ambos uleína e ioimbina, assim como para o extrato de *H. lancifolius*, redução significativa do conteúdo de melanina basal foi observada, com valores de $62,66 \pm 7,34$ ($p < 0,01$), $64,86 \pm 11,97$ ($p < 0,01$) e $71,58 \pm 7,08\%$ ($p < 0,01$), respectivamente, quando comparados ao controle (Figura 32). Esses resultados já eram esperados em função da inibição significativa observada nos ensaios de avaliação da atividade das diferentes tirosinases, sendo, portanto, coerentes.

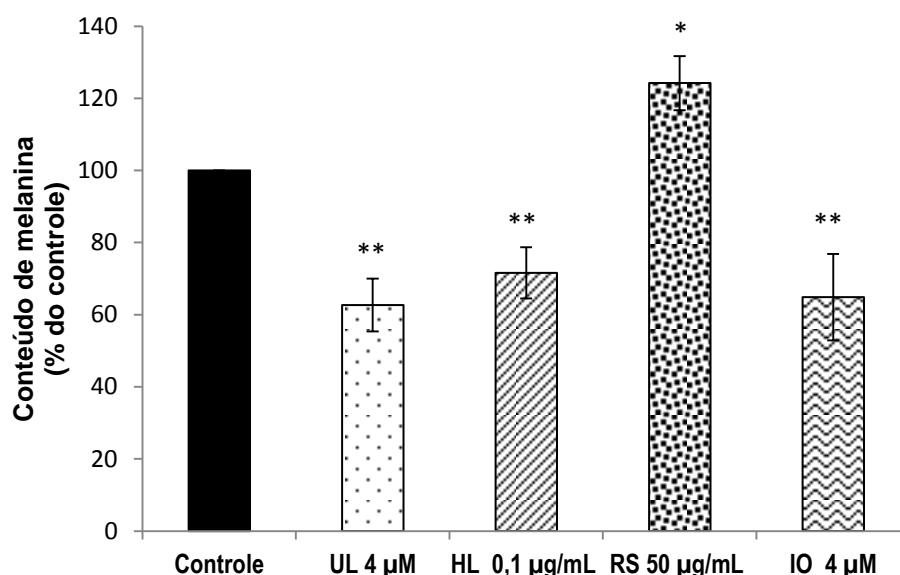


FIGURA 32- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA, IOIMBINA E DOS EXTRATOS DE *H.lancifolius* E *R. sellowii* NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de uleína(UL), ioimbina (IO) e dos extratos de *H. lancifolius* (HL) e *R. sellowii* (RS) por 24 horas. Cada barra representa a média±DP de melanina produzida,doseada no lisado celular, expressa em porcentagem em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

Em contraste, o extrato de *R. sellowii* mostrou ação estimulante significativa da produção de melanina basal, aumentando para $124,23 \pm 7,49\%$ ($p < 0,05$) seu conteúdo quando comparado ao controle. Neste contexto, vale ressaltar que, para este extrato, nenhum efeito relevante sobre a atividade da tirosinase de cogumelo ou daquela obtida de células B16F10 nas condições empregadas havia, até então, sido observado, o que demonstra particularmente a importância de se realizar ensaios

com enzimas de diferentes procedências quando se investiga agentes com ação sob o processo melanogênico em testes preliminares como os propostos neste trabalho.

4.4.3.3. Influência no conteúdo de melanina sob estímulo

Nesta última série de ensaios, cujos resultados estão apresentados nas Figuras 33 a 36, L-Tirosina (500 μM) foi adicionada ao meio de cultura, agindo como substrato extra para a ação da tirosinase durante o processo melanogênico e, também, cloreto de amônio (10 mM), favorecendo as condições do sistema por estabilização do pH melanossomal. Como resultados, o ácido kójico (400 μM), nas condições experimentais empregadas, como esperado para um regulador negativo, inibiu significativamente a produção de melanina em $39,52 \pm 6,26\%$ ($p < 0,01$). Para a uleína (Figura 33), independente da concentração, o perfil de inibição significativo se repetiu, com o conteúdo de melanina reduzido para $60,20 \pm 20,71$ e $67,29 \pm 5,50\%$ ($p < 0,01$ para ambos), respectivamente, a 4 e 40 μM .

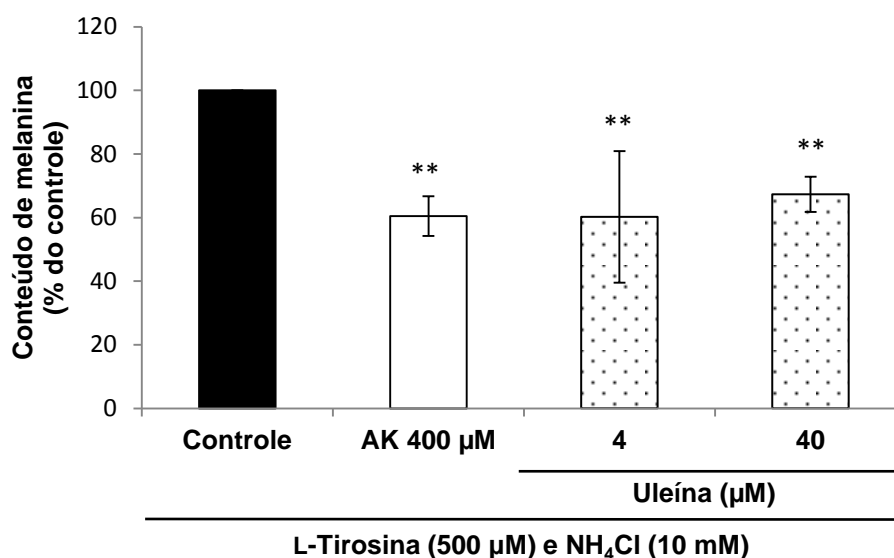


FIGURA 33- INFLUÊNCIA DA ULEÍNA NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH_4Cl . Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas de uleína ou ácido kójico (AK) por 24 horas, na presença de L-tirosina e NH_4Cl . Cada barra representa a média \pm DP de melanina presente no lisado celular em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor "100%", obtida de três a seis experimentos independentes. *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$ em relação ao controle.

De forma semelhante e corroborando com os perfis obtidos anteriormente com relação à atividade de diferentes tirosinases, também se observou redução significativa na produção dos níveis de melanina pelo extrato de *H.lancifolius* (Figura 40), tanto a 0,1 µg/mL quanto a 1 µg/mL (Figura 34), com valores de 83,97±5,40 (p<0,01) e de 48,37±4,85% (p<0,001), respectivamente, sugerindo um comportamento dependente da dose.

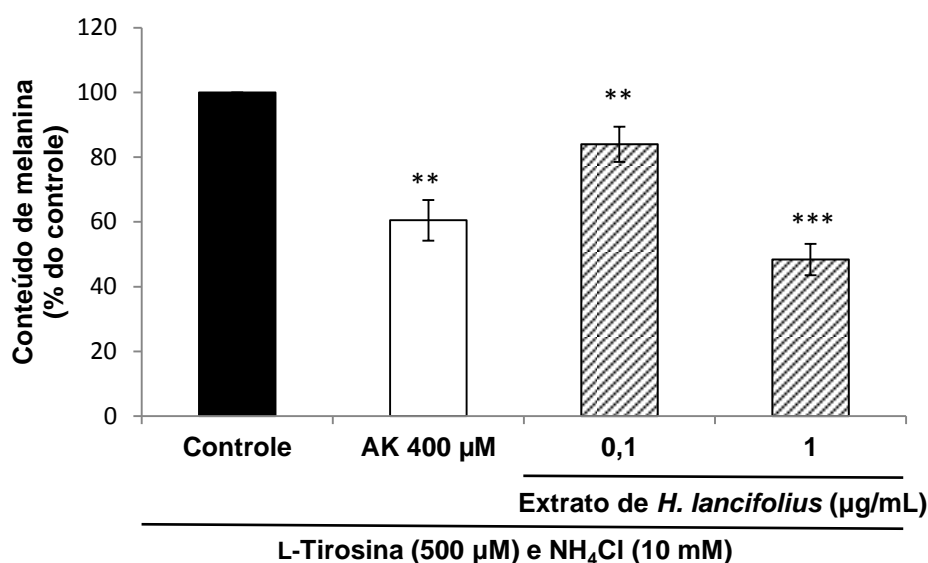


FIGURA 34- INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *H. lancifolius* NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *H. lancifolius* ou ácido kójico (AK) por 24 horas, na presença de L-tirosina e NH₄Cl. Cada barra representa a média±DP de melanina presente no lisado celular em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes.***p<0,001; **p<0,01 em relação ao controle.

Já para o extrato de *R. sellowii* a 50 µg/mL, o conteúdo de melanina foi muito próximo ao observado para o controle, com 103,85±5,56% (Figura 35). Ainda, o alcaloide ioimbina a 4 µM, na presença de estímulo melanogênico, mostrou ação similar ao que foi observado nos ensaios de melanina basal, com redução de 31,12±2,72% (p<0,01) em relação ao controle (Figura 36).

Nesta última série de experimentos, tanto a uleína como o extrato de *H. lancifolius* e a ioimbina, esta de forma menos intensa, mostraram-se dotados da

capacidade de reduzir o conteúdo de melanina em células B16F10, resultados que corroboram com aqueles obtidos nos ensaios de atividade de tirosinase, os quais mostraram que, independentemente da origem da enzima, todos interferem na sua ação, reduzindo-a significativamente.

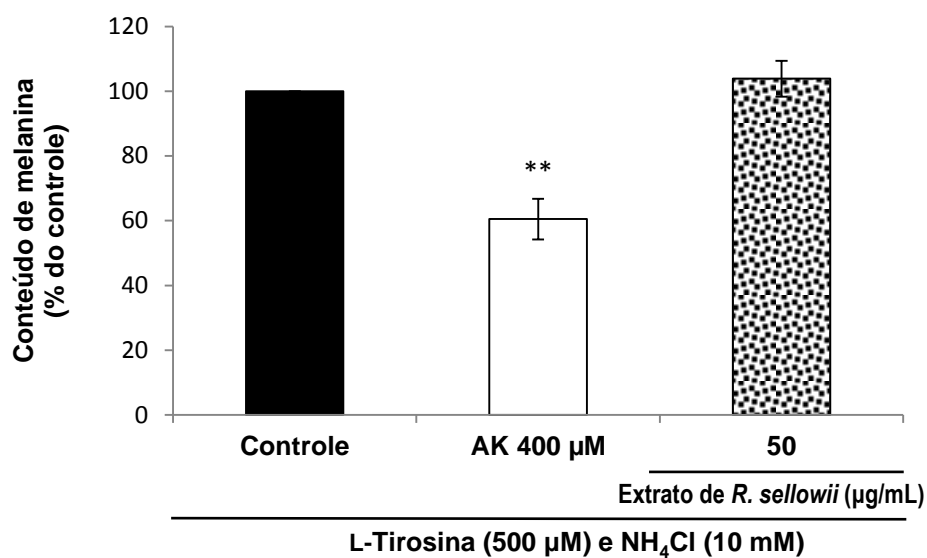


FIGURA 35- INFLUÊNCIA DO EXTRATO DE *R. sellowii* NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *R. sellowii* ou ácido kójico(AK) por 24 horas, na presença de L-tirosina e NH₄Cl. Cada barra representa a média±DP de melanina presente no lisado celular em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor "100%", obtida de três a seis experimentos independentes.**p<0,01 em relação ao controle.

Uma vez que a produção de melanina pode ser o resultado de uma ação de defesa do organismo, é relevante lembrar, neste momento, que esses efeitos foram também observados em um sistema celular usando-se concentrações não tóxicas desses agentes. Assim, a redução dos níveis de melanina observada foi decorrente da ação desses agentes sobre a tirosinase, uma vez que sua formação é diretamente influenciada pelo comportamento enzimático.

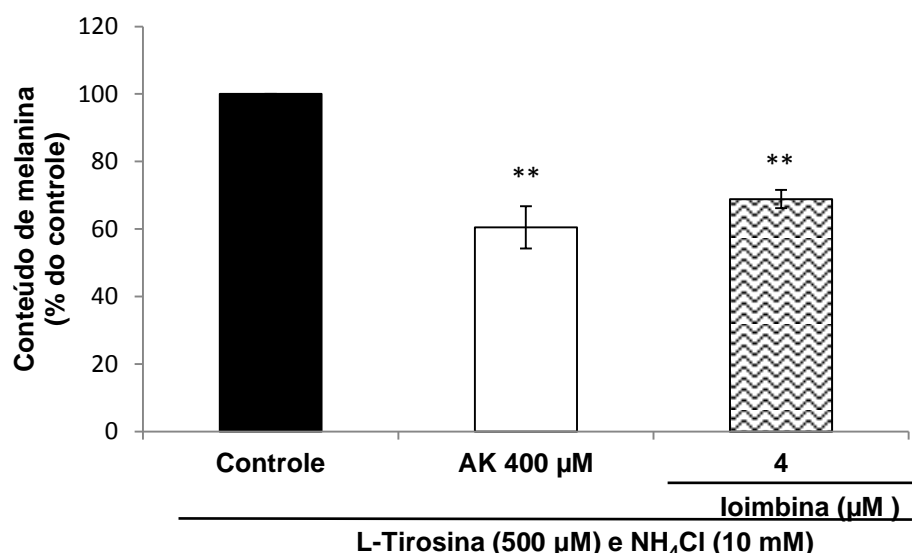


FIGURA 36- INFLUÊNCIA DO ALCALÓIDE IOIMBINA NO CONTEÚDO DE MELANINA PRODUZIDO POR CÉLULAS B16F10 NA PRESENÇA DE L-TIROSINA E NH₄Cl. Células B16F10 foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de ioimbina ou ácido kójico(AK) por 24 horas, na presença de L-tirosina e NH₄Cl. Cada barra representa a média±DP de melanina presente no lisado celular em relação ao controle, para o qual se atribuiu o valor “100%”, obtida de três a seis experimentos independentes.**p<0,01 em relação ao controle.

Como revisado na introdução deste trabalho, em organismos vivos ou em sistemas *in vitro* apropriados, como linhagens de melanoma humano ou a própria B16F10 usada neste trabalho, por exemplo, a tirosina e a L-DOPA, além de serem substratos convencionais para a ação da tirosinase, estimulam a melanização das células. Já foi demonstrado, também, que ambos estimulam a tirosinase em nível transcricional (SLOMINSKI E COSTANTINO, 1991a). Ainda, dependendo da dose e do tempo de exposição, a L-DOPA pode tanto estimular como inibir a expressão de RNAm da tirosinase (SLOMINSKI E COSTANTINO, 1991b). Por outro lado, sabe-se que a inibição da melanogênese pode ser resultante da antioxição da tirosinase ou inibição de sua atividade.

Neste amplo e variado espectro de ações, em contraste com a uleína, significativa ação antioxidante para o extrato de *H. lancifolius* já foi relatada (MENEZES *et al.*, 2004). É possível, portanto, que um dos mecanismos de ação deste extrato esteja relacionado com a ação de substâncias com potencial antioxidante em sua composição que impeçam a hidroxilação da L-tirosina a DOPA, e a oxidação desta a DOPAquinona pela tirosinase, dois dos primeiros passos na cascata melanogênica, comprometendo a formação de melanina.

Outro mecanismo de ação pode estar associado aos níveis de expressão da enzima. Se assim for, o uso do lisado celular obtido após o tratamento de células B16F10 com os alcaloides e o extrato de *H. lancifolius* sem técnicas de *Western blot* usando anticorpos monoclonais anti-tirosinase poderia esclarecer esta hipótese. Neste sentido, redução da atividade de tirosinase de cogumelo das alpneuminas E e G, dois alcaloides indólicos isolados recentemente de *Alstonia pneumatophora* (Apocynaceae), foi descrita, sugerindo uma atividade anti-melanogênica (KOYAMA *et al.*, 2010); além disso, a alpneumina G inibiu a expressão da tirosinase em células B16F10.

Para o extrato de *R. sellowii*, entretanto, os resultados desses dois parâmetros não se apresentaram com a mesma coerência. Ou seja, à exceção de quando os dados foram resultantes da exposição de células B16F10 simultaneamente à L-tirosina (Figura 35), em todos os ensaios de tirosinase, independente da origem, a presença do extrato sempre levou, embora de forma discreta, a uma estimulação de sua atividade (Figuras 12 e 34). Convém registrar que o extrato de *R. sellowii* também é dotado de potencial antioxidante, o qual, aliás, é bem mais potente quando comparado ao observado para o de *H. lancifolius* nas mesmas condições experimentais (MENEZES *et al.*, 2004). Assim sendo, embora na presença de L-tirosina, a atividade da tirosinase seja estimulada, devido a essa forte ação antioxidante, as etapas oxidativas da cascata melanogênica estão inibidas, e como resultado final o conteúdo de melanina, na presença de L-tirosina e NH_4Cl , não ocorre alteração no conteúdo de melanina produzido.

Com relação à produção de melanina, esta se mostrou alterada somente nos ensaios onde células B16F10 foram expostas isoladamente ao extrato (basal) (Figura 32), onde seus níveis se mostraram significativamente aumentados (SLOMINSKI E COSTANTINO, 1991a; SLOMINSKI E COSTANTINO, 1991b). Na condição basal, devido ao metabolismo celular, ocorre a oxidação do meio de cultura. Sendo assim, a reação de oxidação é favorecida, portanto pode ser devido ao pH do meio, mesmo sem alteração significativa da tirosinase basal, ocorreu aumento da produção de melanina. Já na condição com estímulo melanogênico, devido a presença do cloreto de amônio, o pH do meio permanece mais básico, não favorecendo a oxidação. Com isso, aliado a elevada ação antioxidante do extrato de pau-pra-tudo, apesar da modulação positiva encontrada na tirosinase, não ocorreu alteração significativa na produção de melanina.

Com esses resultados, algumas sugestões também podem ser construídas. A primeira é a de que, na ausência de um substrato apropriado para revelar a ação da tirosinase (como é o caso da L-tirosina ou da L-DOPA), a via de produção de melanina não seja por ação exclusivamente sobre a tirosinase. Ou seja, é possível que o extrato da *R. sellowii* esteja atuando em uma etapa mais tardia do processo, como, por exemplo, em níveis transcricional e/ou translacional. Como descrito na introdução deste trabalho, quando a via PKA de sinalização é ativada, esta 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 TRPs, estimulando assim a produção de melanina.

Da mesma forma, pode-se sugerir uma ação sobre as enzimas da família das MAPK, como a p38 MAPK, por exemplo, a qual está envolvida na ativação da melanogênese por aumentar também a expressão de MITF. Ainda, poderia ter ação sobre ERK e JNK/SAPK, outros dois membros dessa família, cuja ativação da primeira e inibição das outras duas estimulariam a expressão do MITF, culminando no estímulo da síntese de melanina (PARK *et al.*, 2010). Os resultados, portanto, favorecem estudos mais aprofundados, os quais certamente esclareceriam os mecanismos envolvidos.

5. CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade dos extratos preparados das cascas de *R. sellowii* e de *H. lancifolius* e dos alcaloides uleína e ioimbina na melanogênese, utilizando a atividade de tirosinase de diferentes fontes e os níveis de melanina de células B16F10 como parâmetros experimentais.

Os resultados apresentados mostraram que o extrato de *H. lancifolius* atua de forma a inibir a atividade de tirosinase de cogumelo, extraída de células B16F10 e de células B16F10 vivas, na presença e na ausência de estímulo melanogênico dado pela presença de L-tirosina; ainda, reduz a produção de melanina, um potencial de ação sobre a melanogênese até o momento desconhecido. Esta ação parece estar ligada à ação da uleína, uma vez que o perfil de inibição deste alcaloide foi semelhante ao observado para o extrato de agoniada. A ioimbina também exerceu ação inibitória sobre a melanogênese, podendo também contribuir para a ação inibitória desse extrato. Para esclarecer esta questão, a quantificação dos alcaloides uleína e ioimbina no extrato de *H. lancifolius* deve ser realizada.

O extrato de *R. sellowii*, por sua vez, interfere também na atividade melanogênica por estimular a produção de melanina basal sem, no entanto, influenciar a ação da tirosinase, nas mesmas condições. Considerando os resultados na presença de L-tirosina, em que o extrato de pau-pra-tudo não foi capaz de estimular a produção de melanina, porém atuou de forma a estimular a atividade de tirosinase, é provável que esses efeitos sejam resultantes de toxicidade do extrato sobre as células B16F10.

A fim de se esclarecer os mecanismos de ação envolvidos nestes resultados por ora divergentes, estudos mais refinados como, por exemplo, em nível molecular, devem ser realizados.

6. REFERÊNCIAS

- ABDEL-HALIM, O.B., MARZOUK, A.M., MOTHANA, R., AWADH, N. A new tyrosinase inhibitor from *Crinum yemense* as potential treatment for hyperpigmentation. **Pharmazie**. v.63, n.5, p.405-407. 2008.
- AHN, S.S., RHO, H.S. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. **Bioorg Med Chem Lett**. v.21, n.23, p.7466-7469. 2011.
- ALALUF, S., ATKINS, D., BARRETT, K., BLOUNT, M., CARTER, N., HEATH, A. Ethnic variation in melanin content and composition in photoexposed and photoprotected human skin. **Pigm Cell Res**. v.15, n.2, p.112-118. 2002.
- ANDO, H., KONDOH, H., MASAMITSU, I., HEARING, V. Approaches to identify inhibitors of melanin biosynthesis via the quality control of tyrosinase. **J Invest Dermatol**. v.127, n.4, p.751-761. 2007.
- ARUNG, E.T., KUSUMA, I. W., CHRISTY, E. O., SHIMIZU, K., KONDO, R. Evaluation of medicinal plants from central Kalimantan for antimelanogenesis. **J Nat Med**. v.63, n.4, p.473-480. 2009.
- BAGGIO, C.H., OTOFUJI, G.M., DE SOUZA, W.M., SANTOS, C.A.M., TORRES, L.M., RIECK, L., MARQUES, M.C.A., MESIA-VELA, S. Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius*. **Plant Med**. v.71, p 733-739. 2005.
- BARATTO, L.C., HOHLEMWERGE, S.V.A., GUEDES, M.L.S., DUARTE, M.R., SANTOS, C.A.M. *Himatanthus lancifolius* (Müll. Arg.) Woodson, Apocynaceae: estudo farmacobotânico de uma planta medicinal da Farmacopéia Brasileira 1ª edição. **Braz J Pharmac**. v.20, n.5, p. 651-658. 2010.
- BATISTA, C.V.F., RECH, S.B., HEVNIQUES, A.T., SCHRIPSEMA, J., VERPOORTE, R. Indole alkaloids from *Rauwolfia sellowii*. **Phytochemistry**.v.41, n.3, p. 969-973. 1996.
- BAURIN, N., ARNOULT, E., SCIOR, T., DO, Q.T., BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **J Ethnopharmacol** .v.82, p.2-3, n.155-158. 2002.
- BELLEI, B., FLORI, E., IZZO, E., MARESCA, V., PICARDO, M. GSK3 β inhibition promotes melanogenesis in mouse B16 melanoma cells and normal human melanocytes. **Cell Sign**. v.20, n.10, p.1750-1761. 2008.
- BELLEI, B., PITISCI, A., IZZO, E., PICARDO, M. Inhibition of melanogenesis by the pyridinyl imidazole class of compounds: possible involvement of Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Plos One**. v.7, n.3. 2010.
- BOISSY, R.E., DELL'ANA, M.L., PICARDO, M. On the pathophysiology of vitiligo: possible treatment options. **Indian J Dermatol Vener Leprol**. v. 78, n.1, p.24-29. 2012.

- BORENFREUND E., PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol Lett**, v.24, n.2-3, p.119-24. 1984.
- BORRIS, R.P., LANKIN, D.C., CORDELL, G.A. Studies on the uleine alkaloids.1.C-13 nmr-studies on uleine, 20-epiuleine and (4S)-uleine-n₆-oxide. **J Nat Products**.v.46, n.2, p. 200-205. 1983.
- BORRIS, R.P., LANKIN, D.C., CORDELL, G.A. Studies on the uleine alkaloids.2. some chemical-transformations of uleine. **J Nat Product**. v. 46, n.2, p.206-210. 1983.
- BOWCOCK, A.M., VINA, M.F. Targeting skin: Vitiligo and autoimmunity. **J Invest Dermatol**. v.132, p.13-15. 2012.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**. V.72, p.248-254. 1976.
- BRIGANTI, S., CAMERA, E., PICARDO, M. Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. **Pigm Cell Res**. v.16, n.2, p.101-110. 2003.
- BRUGISSER, R., von DAENIKEN, K., JUNDT, G., SCHAFFNER, W., TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. **Planta Med.**, v. 68, n.5, p.445-448.2002.
- CHANG, T. S. An uptade review of tyrosinae inhibitors. **Int J Mol Sci**. v.10, n.1, p.2440-2475. 2009.
- CHARLÍN, R., BARCAUI, C.B., KAC, B.K., SOARES, D.B., FONSECA, R.R., ABULAFIA, L.A. Hydroquinone-induces exogenous ochronosis: a report of four cases and usefulness of dermoscopy. **Int J Dermatol**. v.47, n.1, p. 19-23. 2007.
- CHIBA, K., KAWAKAMI, K., TOHYAMA, K. Simultaneous evaluation of cell viability by neutral red, MTT and crystal violet staining assays of the same cells. **Toxicol In Vitro**. v.12, n.3, p.251-258. 1998.
- COSTIN, G.E., HEARING, V.J. Human skin pigmentattion: melanocytes modulates skin color in reponse to stress. **Faseb J**. v.21, n.4, p.976-94. 2007.
- CURTO, E.V., KWONG, C., HERMERSDÖFER, H., GLATT, H., SANTIS, C., VIRADOR, V., HEARING, V.J., DOOLEY, T.P. Inhibitors of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl esters of gentisic acid with other putative inhibitors. **Biochem Pharmacol**. v.57, n.6, p.663-672. 1999.
- CUNHA, E.S., KOWAHARA, R., KADOWAKI, M.K., AMSTALDEN, H.G., NOLETO, G.R., CADENA, S.M., WINNISCHOFER, S.M., MARTINEZ, G.R. Melanogenesis stimulation in B16-F10 melanoma cells induces cell cycle alterations, increased ROS level and differential expression of proteins as released by proteomic analysis. **Exp. Cell Res**. v.318, n.15, p.1913-1925. 2012.

DESHMUKH, S.R., ASHRIT, D.S., PATIL, B.A. Extraction and evaluation of indole alkaloids from *Rauwolfia serpentina* for their antimicrobial and antiproliferative activities. **Int J Phar Pharm Sci.** v.4, n.5, p. 329-334. 2012.

DESSINIOTI, C., STRATIGOS, A.J. A review of genetic disorders of hypopigmentation: lessons learned from the biology of melanocytes. **Exp. Dermatol.** v.18, n.9, p.741-749.2009.

ELIAS, P.M. Stratum corneum defensive functions: an integrated view. **J Invest Dermatol.** v.125, n.2, p.183-200. 2005.

FEDOROW, H., TRIBLS, F., HALLIDAY, G., GERLACH, M., RIEDERER, P., DOUBLE, K.L. Neuromelanin in human dopamine neurons: comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. **Prog Neurobiol.** v.75, n.2, p.109-124. 2005.

FRANÇA, O.O., BROWN, R.T., SANTOS, C.A.M. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia.** n.71, p. 208-210. 2000.

FULLER, B.B., DRAKE M.A., SPAULDING, D.T., CHAUDHRY, F. Down regulation of tyrosinase activity in human melanocyte cell culture by yohimbine. **J Invest Dermatol.** v.114, n.2, p.268-276. 2000.

GERMANAS, J.P., WANG, S., MINER, A., HAO, W., READY, J.M. Discovery of small-molecule inhibitors of tyrosinase. **Bioorg Med Chem Lett.** v.17, n.24, p.6871-6885. 2007.

GILLBRO, J.M., OLSSON, M.J. The melanogenesis and mechanisms of skin-lightening agents – existing new approaches. **Int J Cos Sci.** v.33, p.210-221. 2011.

HAKOZAKI, T., MINWALL, L., ZHUANG, J., CHHOA, M., MATSUBARA, A., MIYAMOTO, K., GREATENS, A., HILLEBRAND, G.G., BISSET, D.L., BOISSY, R.E. The effect of niacinamide on reducing cutaneous pigmentation and suppression of melanosome transfer. **Braz J Dermatol.** v.147, n.1, p.20-31. 2002.

HEARING, V.J. Milestones in melanocyte/melanogenesis. **J Invest Dermatol.** v.131 n.1. 2011.

HILL, H.Z., LI, W. Melanin: a two edged sword?. **Pigm Cell Res.** v.10, n.3, p.158-161. 1997.

HOCHSTEIN, F.A. Alkaloids of *Rauwolfia sellowii*. **J Amer Chem Society.** v.77, n.21, p.5744-5850. 1955.

HUSSEIN, M.R. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. **F Cutan Pathol,** v.32, p.191-205-2005.

JIMENEZ-CERVANTES, C., MARTINEZ-ESPARTZA, M., PÉREZ, C., DAUM, N., SOLANO, F., GARCÍA-BORRÓN, J.C. Inhibition of melanogenesis in response to

oxidative stress: transient down regulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. **J Cell Sci.** v.114, n.12, p.2335-2344. 2001.

KHAN, M.T.H. Molecular design of tyrosinase inhibitors: a critical review of promising novel inhibitors from synthetic origins. **Pure Applied Chem.** v.79, n.12. 2007.

KIM, H., CHOI, H.R. Topical hypopigmentating agents for pigmentary disorders and their mechanism of action. **Ann Dermatol.** v.24, n.1, p.1-6. 2012.

KIM, I. K., ERICKSON, K.L. Models for uleine-alkaloid biogenesis. **Tetrahedron.** v.27, p.3979-3991. 1971.

KONDO, I., HEARING, V.J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. **Expert Rev Dermatol.** v.6, n.1, p.97-108. 2011.

KONGSHOPJ, B., MIKKELSEN, N.D., KOBAYASI, T., LERCHE, C.M., WULF, H.C. Ammonium chloride and L-tyrosine enhance melanogenesis in vitro but not in vivo even in combination with ultraviolet radiation. **Photodermatol Photoimmunol Photomed.** v.23, n.5, p. 197-202. 2007.

KOYAMA, K., HIRASAWA, Y., HOSOYA, T., HOE, T.C., CHAN, K.L., MORITA, H. Alpnemines A-H, new anti-melanogenic indole alkaloids from *Alstonia pneumatophora*. **Bioorg Med Chem.** V.19, n.12, p.4415-4421.2010.

LIM, K. H., ETOH, T., HAYASHI, M., KOMIYAMA, K., KAM, T.S. Conolutinine, a hexacyclic indole alkaloid with a novel ring system incorporating a diazaspino center and fused oxadiazepine-tetrahydrofuran rings. **Tetrahedron.** v.50, p.752-754. 2009.

LIMA, M. P., HILST, L. F., MATTANA, F.V.R., SANTOS, C.A.M., WEFFORT-SANTOS, A.M. Alkaloid-rich fraction of *Himantanthus lancifolius* contains anti-tumor agents against leukemic cells. **Braz J Pharm Sci.** v.46, n.2, p. 273-280.2010.

LIU, J.J., FISHER, D.E. Lighting a path to pigmentation; mechanisms of MITF induction by UV. **Pigment Cell Melanoma Res.** v.23, n.6, p.741-745. 2010.

LLOYD, H. W., KAMMER, J.N. Treatment of hyperpigmentation. **Cutaneous Med Surg.** v. 30, p.171-175.2011.

LOPES, J.L. Uleína e ioimbina de *Himantanthus lancifolius* (Muell.-Arg.) Woodson, Apocynaceae. Curitiba.79p. Dissertação de mestrado – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná. 2008.

LUO, L.H., SEO, J.W., NGUYEN, D.H., KIM, E.K, KANG, S.A., KIM, C.H. Melanogenesis inhibitory effect of dehydroevodiamine isolated from fruits of *Evodia rutaecarpa*. **J Chem Eng.** v.27, n.3., p.915-918. 2010.

MACRINI, D.J., SUFFREDINI, I.B. Extracts from Amazonian plants have inhibitory activity against tyrosinase: an in vitro evaluation. **Braz J Pharm Sci.** v, 45, n.4, p. 715-721. 2009.

MAPUNYA, M.B., NIKOLOVA, R.V., LALL, N. Melanogenesis and antityrosinase activity of selected South African plants. **Evid Based Comp Alternat Med**. 2012.

MARKS, M.S., SEABRA, M.C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nat Rev Mol Cell Biol**. v.2, n.10, p.738-748.2001.

MENEZES, P.R., SCHWARTZ, E.A., SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Parana. **Fitoterapia**.v.74, p. 398-400. 2004.

MERCHANT, D.J., KAHN, D., MURPHY, W.H. Cell culture techniques: Handbook of cell and organ culture. 1964. 2 ed.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunolog Method**, v.65, p.55-63. 1983.

NARDIN, J.M., DE SOUZA, W.M., LOPES, J.F., SANTOS, C.A.M., WEFFORT-SANTO, A.M. Effects of *Himatanthus lancifolius* on human leukocyte chemotaxis and their adhesion to integrins. **Plant Med**. v.64, n. 10, p.1253-1258. 2008.

NARDIN, J.M., LIMA, M.P., MACHADO, J.C., HILST, L.F., SANTO, C.A.M, WEFFORT-SANTOS, A.M. The uleine-rich fraction of *Himatanthus lancifolius* blocks proliferative responses of human lymphoid cells. **Plant Med**. v. 76, n.7, p. 697-700. 2010.

NATARAJAN, M., MOHAN, S., MARTINEZ, B.R., MELTZ, M.L., HERMAN, T.S. Antioxidant compounds interfere with the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide cytotoxicity assay. **Cancer Detect Prev**, v.24, n.5, p.405-444. 2000.

NICHOLS, J.A., KATIYAR, S.K. Skin photoprotection by natural polyphenols: Anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms. **Arch. Dermatol. Res**. v.302, n.2, p.71-83.2010.

OHKUMA, S., POOLE, B. Cytoplasmic vacuolation of mouse peritoneal macrophages and the uptake into lysosomes of weakly basic substances. **J Cell Biol**, v.90, n.3, p.656-664. 1981.

OHGUCHI, K. Inhibitory effect of resveratrol derivatives from dipterocarpaceae plants on tyrosinase activity. **Biosci**.v.67, n.7, p.1587-1590. 2003.

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

OLIVIER, P., TESTARD, P., MARZIN, D., ABBOTT, D. Effect of high polyol concentrations on the neutral red absorption assay and tetrazolium-MTT test of rat hepatocytes in primary culture. **Toxicol In Vitro**, v.9, n.2, p.133-138. 1995.

ORTONNE, J.P., BISSET, D.L. Latest insights into skin hyperpigmentation. **J. Invest. Dermatol. Proc.** v.13, n.1, p.10-14. 2008.

PAKRASHI, S.C., DJERASSI, C., WASICKY, R., NEUSS, N. Alkaloid studies. IX. Rauwolfia alkaloids. IV. Isolation of reserpine and other alkaloids from *Rauwolfia sellowii* Muell. Argov. **J Amer Chem Society.**v.77, n.24, p.6687-6690.1955.

PALUMBO, A., D'ISCHIA, M., MISURACA, D., PROTA, G. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. **Biochem Biophys Acta.** v.1073, n.1, p.83-90. 1991.

PARK, S.Y., KIM, Y.H., PARK, G., LEE, S.J. Beta-carboline alkaloids harmaline and harmalol induces melanogenesis through p38 mitogen-activates protein kinase in B16F10 mouse melanoma cells. **BMB Rep.** v.43, n.12, p. 824-829. 2010.

PARK, S.V., JIN, M.L., KIM, Y.H., KIM, Y., LEE, S.J. Aromatic-turmerone inhibits alpha-MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways. **Arch Dermatol Res.** v.303, n.10, p.737-744. 2011.

PARVEZ, S. KANG, M. Survey and mechanism of skin depigmentating and lightening agents. **Phytother Res.** v.20, n.11, p.921-934. 2006.

PENG, L., WANG B., REN, P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. **Colloids Surf. B. Biointerf,** v.45, n.2, p.108-111. 2005.

PEREIRA, M.M., JÁCOME, R.L.R.P, ALCÂNTARA, A.F.C., ALVES, R.B., RASLAN, D.S. Alcalóides indólico isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (apocynaceae). **Quim Nova.** v.30, n.4, p.970-983. 2007.

PEREIRA, N.A. Composição alcaloídica da *Rauwolfia sellowii* MÜLL. ARG. **Rev Bras Farmacog.** v.37, p. 419-422. 1956.

PINON, A., LIMANI, Y., MICALLEF, L., COOK-MOUREAU, J., LIAGRE, B., DELAGE, C., DUVAL, R.E., SIMON, A. A novel form of melanoma apoptosis resistance: melanogenesis up-regulation in apoptotic B16-F10 cells delays ursolic acid-triggered cell death. **Exp Cell Res.** v.317, n.12, p.1669-1676. 2012.

POMERANTZ, S.H., WARNER, M.C. 3,4-dihydroxi-L-phenylalanine as the tyrosinase cofactor. Occurrence in melanoma and binding constant. **J Biol Chem.** v.242, n.22, p.5308-5314.1967.

PRESIBELLA, M. M., SANTOS, C. A. M., WEFFORT-SANTOS, A.M. Influência de extratos hidroetanólicos de plantas medicinais sobre a quimiotaxia de leucócito humanos. **Rev Bras Farmacog.** v.13, p. 75-82.2003.

PROKSCH, E., BRANDER, J. M. Skin: an indispensable barrier. **Exp. Dermatol.** v.17, n.14, p.1063-1072. 2008.

QIAO, Z., KOIZUMI, Y., ZHANG, M., NATSUI, M., FLORES, M.J., GAO, L., YUSA, K., KOYOTA, S., SUGIYAMA, T. Anti-melanogenesis effect of *Glechoma hederaceae* L. extract on B16 murine melanoma cells. **Biosci Biotechnol Biochem.** v.76, n.10, p.1877-1883, 2010.

RATTMANN, Y.D., TERLUK, M.R., SOUZA, W.M., SANTOS, C.A.M, BIAVATTI, M.W., TORRE, L.B., MESIA-VELA, S., RIECK, L., DA SILVA-SANTOS, J.E., MARQUES, M.C. Effects of alkaloids of *Himathantus lancifolius* (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness. **J Ethnopharmacol.** v.100, p. 268-275. 2005.

REPETTO G., PESO A.D., ZURITA, J.L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**, v.3, n.7, p.1125-1131. 2008.

SANTOS N.C., FIGUEIRA-COELHO J., MARTINS-SILVA, J., SALDANHA, C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochem Pharmacol**, v.65, n.7, p.1035-1041. 2003.

SEIDL, C., CORREIA, B.L., STINGHEN, A.E., SANTOS, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibitory activity of uleine from *Himatanthus lancifolius*. **Z Naturforsch C.** v.75, n.-8, p.440-444. 2010.

SCHIAFFINO, M.V. Signaling pathways in melanosome biogenesis and pathology. **Int J Bio Chem Cell Bio.** v.42, n.7, p.1094-1104.2010.

SHAHEEN, F., AHMAD, M., KHAN, M.T., JALIL, S., EJAZ, A., SULTANKHODJAEV, M.N., ARFAN, M., CHOUDHARY, M.I., ATTA-RAHMAN, H.E.J. Alkaloids of Aconitum leave and their antiinflammatory antioxidant and tyrosinase inhibition activities. **Phytochem.** v.66, n.8, p.935-940. 2005.

SHOEMAKER, M. COHEN, I. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. **J Ethnopharmacol.**v.93, n. 2-3, p. 381-384. 2004.

SIMON, J.D., PELES, D., WAKAMATSU, K., ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. **Pigment Cell Melanoma.** v.22, n.5, p.563-579. 2009.

SLOMINSKI, A., COSTANTINO, R. L-Tyrosine Induces Tyrosinase Expression via a Posttranscriptional Mechanism. **Experientia.**v.47, n.7, p. 721-724. 1991a.

SLOMINSKI, A., COSTANTINO, R. Molecular Mechanism of Tyrosinase Regulation by L-Dopa in Hamster Melanoma Cells. **Life Scie.**v.48, n.21, p. 2075-2079. 1991b.

SLOMINSKI, A., ZMIJEWSKI, M.A., PAWELEK, J. L-tyrosine and L-dihydroxyphenylalanine as hormone-like regulators of melanocyte function. **Pigment Cell Melanoma Res.** v.25, n.1, p.14-27. 2011.

SONG, T.Y., CHEN, C.H., YANG, N.C., FU, C.S., CHANG, Y.T., CHEN, C.L. The correlation of in vitro mushroom tyrosinase activity with cellular tyrosinase activity and

melanin formation in melanoma cell A2058. **J. Food Drug Anal.** v.17, n.3, p.156-162.2009.

SOUZA, W. M., BREHMER, F., NAKAO, L.S., STINGHEN, A.E.M., SANTOS, C.A.M. Ação da uleína sobre a produção de óxido nítrico em células RAEC e B16F10. **Braz J Pharmac.** v.17, n.2, p. 191-196. 2007.

SOUZA, P.M., ELIAS, S.T. Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **Plos One.**v.7, n.11. 2012.

SOUZA, W.M., STINGHEN, A.E. Antimicrobial activity of alkaloidal fraction from barks of *Himatanthus lancifolius*. **Fitoterapia.**v.75, p. 750-753. 2004.

SPRITZ, R.A. Six decades of vitiligo genetics: Genomewide studies provide insights into autoimmune pathogenesis. **J Invest Dermatol.** v.132, n.2, p.268-273. 2012.

STRATFORD, M.R., RAMSDEN, C.A., RILEY, P.A. The influence of hydroquinone on tyrosinase kinetics. **Bioorg Med Chem.** v.20, n.14, p.1364. 2012.

SUGIMOTO, K., NISHIMURA, T., NOMURA, K., UGIMOTO, K., KIRIKI, T. Syntheses of arbutin- α -glycosides and a composition of their inhibitory effects with those of α -arbutin and arbutin on human tyrosinase. **Chem Pharm Bull.** v.51, n.7, p.798-801. 2003.

SVOBODOVA, A., WALTEROVA, D., VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub,** v.150, n.1, p.25-38-2006.

TANDON, M., THOMAS, P.D., SHOKRAVI, M., SINGH, S., SAMRA, S., CHANG, D., JIMBOW, K. Synthesis and antitumor effects of the melanogenesis-based antimelanoma agent N-propionyl-4-5-cyteaminyphenol. **Biochem Pharmacol.** v.55, n.12, p.2023-2029. 1998.

THONG, H.Y., JEE, S.H. The patterns of melanosome distribution in keratinocytes of human skin as one determining factor of skin colour. **Braz J Dermatol.** v.149, n.3, p.498-505. 2003.

THURSTAN, S.A., GIBBS, N.K. Chemical consequences of cutaneous photoaging. **Chem Cent J.** v.6, n.1, p.34. 2012.

TOBIN, D.J. Biochemistry of human skin—our brain on the outside. **Chem Soc Rev.** v.35, n.1, p.52-67. 2006.

van GELDER, C.W., FLURKEY, W.H., WICHERS, H.J. Sequences and structural features of plant and fungal tyrosinases. **Phytochemistry.**v.45, n.7, p.1309-1323. 1997.

WANG, P., HENNING, S.M., HEBER, D. Limitation of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of gree tea polyphenols. **PLos One.**v.5, n.4. 2010.

WOLK, K., WITTE, K., SABAT, R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology. **J Interferon Cytokine Res.** v.30, n.8, p. 617-628. 2010.

XIE, L.P., CHEN, Q.X., HUANG, H., WANG, H.Z., ZHANG, R.Q. Inhibitory effects of some flavonoids on the activity of mushroom tyrosinase. **Biochem.** v.68, n.4, p.487-491. 2003.