

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-FCF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS-PPGCF**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITO  
SOBRE A MELANOGÊNESE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
*Passiflora nitida* Kunth**

**NÍVEA SUELY MELO DE OLIVEIRA**

**MANAUS  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS-FCF  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS-PPGCF**

**NÍVEA SUELY MELO DE OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITO  
SOBRE A MELANOGÊNESE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE  
*Passiflora nitida* Kunth**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas na área de eficácia e segurança de bioprodutos.

**Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima**

**Co-orientadora: Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos**

**MANAUS**

**2011**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Oliveira, Nívea Suely Melo de

O48A

Avaliação da atividade antioxidante e efeito sobre a melanogênese de extratos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth / Nívea Suely Melo de Oliveira. - Manaus: UFAM, 2011.

84 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

Co-orientadora: Profª Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos

1. *Passiflora nitida* 2. Melanogênese 3. Plantas medicinais I. Lima, Emerson Silva II. Vasconcellos, Marne Carvalho de III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 634.776(043.3)

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E EFEITO SOBRE A MELANOGÊNESE DE EXTRATOS DAS FOLHAS  
DE *Passiflora nitida* (H.B.K).”**

NÍVEA SUELY MELO DE OLIVEIRA

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Eficácia e Segurança de Bioprodutos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

---

Professor Emerson Silva Lima, Doutor

Coordenador do PPGCF

Apresentada perante a banca examinadora composta pelos professores:

---

Doutor Emerson Silva Lima (UFAM) - Presidente e orientador

---

Doutora Marne Carvalho de Vasconcellos (UFAM) - Co-orientadora

---

Doutor Valdir Florêncio da Veiga Junior (UFAM) –Membro interno

---

Doutora Raquel Carvalho Montenegro (UFPA) – Membro externo

Manaus, 25 de fevereiro de 2011

Aos meus pais João Nobre de Oliveira e Norma  
Suely Santana de Melo em gratidão por sempre  
investirem no meu crescimento.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que efetua em nós tanto o querer quanto o realizar, pois sem Ele nada poderia ser feito;

Aos meus pais João Nobre de Oliveira e Norma Suely Santana de Melo que, com muito amor, nunca pouparam esforços para me oferecer a melhor educação, ensino e a provisão. Aos meus irmãos Roney Firmino de Oliveira, Elaine Cristine Melo de Oliveira, Lilian Mary Melo de Oliveira e Mirelle Melo de Oliveira pela amizade e pelo companheirismo. Ao meu noivo Caio Lopes Marelo por compreender minha ausência e pela ajuda.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Emerson Silva Lima e Profa. Dra Marne Carvalho de Vasconcellos pela dedicação exemplar, pela oportunidade e confiança depositadas, pelo respeito e pela amizade desenvolvida.

Aos demais professores da faculdade de ciências farmacêuticas da UFAM: Maria de Menezes Pereira, Tatiane Pereira de Souza, Paulo Roberto Castro da Costa, Pierre Alexandre dos Santos, Ellem Paes, Debora Teixeira Ohana, Ermelinda não somente pelo auxílio teórico, pelo acesso aos seus laboratórios e materiais e pelo relacionamento harmonioso.

Aos colegas da primeira turma do Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, dos laboratórios de bioatividade, de tecnologia de medicamentos: Francivaldo de Oliveira, Latife Barakat; Hana Choji, Vitor Renato, Lilian Bastos, Arleilson de Souza, Roseane Gomes da Silva, Ana Carolina Lima Ralph, Iara Filardi, Gleyce dos Santos Barbosa, Zanair Vasconcellos, Camila Fabbri, Aline de Oliveira Barros que trocaram experiências em sala de aula e em bancada em um clima agradável de cooperação.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Imarita Socorro, de Menezes, Maria Dorotéia Couto, José Maria, Jurandir Lima de Araújo, Francisco Geraldo Rocha de Oliveira, Luciana, Giane e Daniel Carneiro pelo apoio.

Aos colaboradores, Dr Francisco Célio da EMBRAPA pelo cultivo e coleta de matéria prima vegetal. À Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler do Laboratório de Patologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (USP) e sua equipe (Camila Marinho, Carla Abdo Brohem, Manoela e Rafael) por abrirem as portas do seu laboratório, pela imensa disposição em oferecer o treinamento em cultura de células e por disponibilizar as células NIH3T3 e Melan-a. Ao prof. Dr. Roger Chamas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por disponibilizar a célula B16F10. À Dra. Rachel Montenegro por ajudar a implementar metodologias em culturas de células no laboratório de atividade biológica da UFAM.

E a todos que colaboraram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho.

## RESUMO

Distúrbios de pigmentação tais como melasmas, sardas, manchas e efélides têm motivado a procura por produtos naturais com potencial clareador de pele. Tendo em vista que a principal enzima reguladora da produção de melanina, a tirosinase, pode ser inibida por polifenóis e antioxidantes, os extratos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth, que já foram relatados como ricos em polifenóis e ter efeito antioxidante, podem funcionar como inibidores da melanogênese. Esse estudo visou conhecer o teor de fenóis totais, a atividade antioxidante o efeito sobre a tirosinase, a citotoxicidade e o efeito sobre o teor de melanina de extratos das folhas de *P. nitida*. Foram avaliados os extratos aquoso por infusão (EAI), aquoso por maceração (EAM), hidroetanólico (EHE) e etanólico (EE). O EAM apresentou maior atividade antioxidante pelo método do DPPH e pelo método de inibição da lipoperoxidação e da tirosinase. As porcentagens de fenóis totais encontradas nos extratos foram EAM =  $5,63 \pm 0,06$  %; EAI =  $5,10 \pm 0,04$  %; EHE =  $3,97 \pm 0,08$  %; EE =  $3,35 \pm 0,17$  %. As concentrações inibitórias medianas (CI<sub>50</sub>) do DPPH pelos extratos foram EAM =  $38,99 \pm 1,56$  µg/mL, EHE =  $44,16 \pm 1,69$  µg/mL, EAI =  $45,26 \pm 0,96$  µg/mL; EE =  $48,44 \pm 0,66$  µg/mL e a CI<sub>50</sub> do ácido gálico foi AG =  $0,80 \pm 0,03$  µg/mL. A inibição da lipoperoxidação aos 120 minutos de reação foram BHT =  $67,55 \pm 1,66$  %, EAI =  $56,29 \pm 2,63$  %, EAM =  $60,98 \pm 2,07$  %, EHE =  $45,04 \pm 3,22$  %, EE =  $23,22 \pm 3,83$  %. Os extratos também inibiram a enzima tirosinase cujas CI<sub>50</sub> do ácido kojico, do EAI, EAM, EHE e EE respectivamente foram:  $1 \pm 0,001$ ;  $475 \pm 28$  ;  $440 \pm 27$ ;  $879 \pm 32$ ;  $901 \pm 29$  µg/mL. A citotoxicidade do EAM sobre o fibroblasto NIH 3T3, o melanoma B16F10 e o melanócito Melan-a foi tempo dependente. Sendo menor para o fibroblasto e o melanócito. O EAM não apresentou atividade antioxidante em NIH 3T3. O EAM nas concentrações de 10 e 25 µg/mL em B16F10 induziu o aumento do teor de melanina para  $196 \pm 15$  % e  $217 \pm 20$  % respectivamente e em Melan-a nas concentrações de 6,25; 12,50 e 25 µg/mL reduziu o teor de melanina para  $90 \pm 8$ ;  $84,8 \pm 0,6$  e  $54 \pm 4$  % respectivamente. Assim, pode-se dizer que o EAM foi capaz de diminuir o teor de melanina em melanócito, com maior citotoxicidade para melanoma do que para fibroblasto e melanócito.

**PALAVRAS-CHAVES:** *Passiflora nitida*, antioxidante, tirosinase, citotoxicidade, melanogênese

## ABSTRACT

Pigmentary disorders such as melasma, freckles, and ephelides have motivated the search for natural products with potential for skin whitening. Given that the main regulatory enzyme of melanin production, tyrosinase can be inhibited by polyphenols and antioxidants, extracts from leaves of *Passiflora nitida* Kunth, which have been reported as rich in polyphenols and have antioxidant effects, can act as inhibitors of melanogenesis. This study aimed to know the total phenols, the antioxidant effect on tyrosinase, the cytotoxicity and the effect on melanin content of extracts from leaves of *P. nitida*. Were assessed extracts aqueous by infusion (EAI), aqueous by maceration (EAM), hydroethanolic (EHE) and ethanolic (EE). The EAM showed higher antioxidant activity by DPPH method and by the inhibition of lipid peroxidation and tyrosinase. The percentages of phenolic compounds found in the extracts were EAM =  $5.63 \pm 0.06\%$ ; EAI =  $5.10 \pm 0.04\%$ , EHE =  $3.97 \pm 0.08\%$ , EE =  $3.35 \pm 0, 17\%$ . The median inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of DPPH by the extracts were EAM =  $38.99 \pm 1.56$  mg / mL, EHE =  $44.16 \pm 1.69$  mg / mL, EAI =  $45.26 \pm 0.96$  mg / mL, EE =  $48.44 \pm 0.66$  mg / mL and the  $IC_{50}$  of gallic acid was AG =  $0.80 \pm 0.03$  mg / mL. The inhibition of lipid peroxidation reaction at 120 minutes were BHT =  $67.55 \pm 1.66\%$ , EAI =  $56.29 \pm 2.63\%$ , EAM =  $60.98 \pm 2.07\%$ , EHE =  $45.04 \pm 3 22\%$ , EE =  $23.22 \pm 3.83\%$ . The extracts also inhibited the tyrosinase which  $IC_{50}$  of kojic acid, the EAI, EAM, EHE and EE respectively were:  $0.001 \pm 1, 475 \pm 28, 440 \pm 27, 879 \pm 32, 901 \pm 29$  mg / mL. The cytotoxicity of EAM on NIH 3T3 fibroblasts, melanoma B16F10 and Melan-a melanocyte was time dependent. Was lower for fibroblasts and melanocytes than melanoma. The EAM showed no antioxidant activity in NIH 3T3. EAM at concentrations of 10 and 25 mg / ml in B16F10 induced increase of melanin content to  $196 \pm 15\%$  and  $217 \pm 20\%$  respectively and in Melan-a concentrations of 6.25, 12.50 and 25 mg / ml reduced the melanin content to  $90 \pm 8, 84.8 \pm 0.6$  and  $54 \pm 4\%$  respectively. Thus, one can say that EAM was able to reduce the level of melanin in melanocytes, with greater cytotoxicity for melanoma than for fibroblasts and melanocytes.

KEY-WORDS: *Passiflora nitida*, antioxidant, tyrosinase, cytotoxicity, melanogenesis.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Camadas de células da epiderme	13
<b>Figura 2</b>	Estrutura da eumelanina e da feomelanina	15
<b>Figura 3</b>	Estrutura cristalográfica da tirosinase de <i>Streptomyces</i> .	20
<b>Figura 4</b>	Ciclo catalítico de hidroxilação de monofenol e antioxidante de o-difenol a o-quinona pela tirosinase	21
<b>Figura 5</b>	Biossíntese da melanina	23
<b>Figura 6</b>	Desordens pigmentares	28
<b>Figura 7</b>	Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração	33
<b>Figura 8</b>	Passiflora nitida	37
<b>Figura 9</b>	Delineamento experimental	40
<b>Figura 10</b>	Cinética de oxidação da emulsão de $\beta$ -caroteno na presença de BHT, EAI, EAM, EHE e EE a 40 $\mu$ g/mL.	51
<b>Figura 11</b>	Curva de inibição de radicais DPPH.	52
<b>Figura 12</b>	Curvas de inibição da tirosinase. <b>A-</b> Extrato aquoso obtido por infusão (EAI). <b>B-</b> Extrato aquoso obtido por maceração (EAM). <b>C-</b> Extrato hidroetanólico (EHE). <b>D-</b> Extrato etanólico (EE). <b>E-</b> Ácido kojico (AK)	54
<b>Figura 13</b>	Porcentagem de Viabilidade de fibroblasto murino NIH 3T3, do melanócito murino Melan-A e do melanoma murino B16F10 tratados com EAM no período de 48h.	55
<b>Figura 14</b>	Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoreceína no fibroblasto murino tratado com A. Quercetina e B. EAM.	57
<b>Figura 15</b>	Teor de melanina e viabilidade celular de celular B16F10 e Melan-a tratadas com EAM e acido kojico (AK).	58

## LISTA DE ABREVIATURAS SIGLAS E SIMBOLOS

6-BH4	6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobioperina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
BHT	Hidroxitolueno de butila
BHTA	5-hidroxi-1,4-benzotiazinil-alanin
DCT	Dopacroma tautomerase
DHI	5,6-di-hidroxi-indol
DHICA	di-hidroxi-indol-2-acido carboxílico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EAI	Extrato aquoso obtido por infusão
EAM	Extrato aquoso obtido por maceração
Edeoxi,	Desoxitirosinase
EE	Extrato etanólico obtido por maceração
EHE	Extrato hidroetanólico obtido por maceração
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Emet	Mettirosinase
Eoxi,	Oxitirosinase
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ICAQ	Indol-2-carboxílico acid-5,6-quinona
IQ	Benzotiazinil-alanina indol- 5,6-quinona
mgEAG/g	Miligramma equivalente de ácido gálico por grama de extrato
mgEQ/g	Miligramma equivalente de quercetina por grama do extrato
MITF	Fator de transcrição associado a microftalmia
PGE-2	Prostaglandina E2
POMC	Proopiomelanocortina
RL	Radicais livres
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucléico mensageiro
TRP 1	Proteina relacionada a tirosinase 1
UV	Ultravioleta
UVA	Ultravioleta A
UVB	Ultravioleta B
UVC	Ultravioleta C
α-MSH	Hormônio estimulante de melanócito

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2.</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1	Pele.....	12
2.1.1	Melanina.....	14
2.2	Melanogênese.....	18
2.2.1	Tirosinase e a síntese de melanina.....	19
2.2.2	Regulação da melanogênese.....	24
2.3	Hiperpigmentação.....	27
2.3.1	Inibidores da tirosinase.....	30
2.3.2	Antioxidantes como clareadores de pele.....	31
2.4	Produtos vegetais.....	32
2.4.1	Compostos fenólicos vegetais.....	33
2.4.2	Gênero <i>Passiflora</i> .....	35
2.4.2.1	<i>Passiflora nitida</i> Kunth.....	36
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
<b>3.1</b>	Objetivo geral.....	39
<b>3.2</b>	Objetivos específicos.....	39
<b>4.</b>	<b>MÉTODOLOGIA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	Estratégia experimental.....	40
4.2	Modelo de estudo.....	41
4.3	Obtenção dos extratos.....	41
4.4	Teor de Fenóis totais, e Atividade Antioxidante.....	42
4.4.1	Dosagem de Fenóis Totais.....	42
4.4.2	Teste do Diphenilpicrilhidrazina.....	43
4.4.3	Lipoperoxidação.....	44
4.5	Teste de Inibição da Tirosinase.....	45
4.6	Ensaio em células.....	46
4.6.1	Células.....	46
4.6.2	Meios de cultivo.....	46
4.6.3	Procedimentos em cultura de células.....	47
4.6.4	Citotoxicidade por Alamar blue.....	47
4.6.5	Atividade antioxidante em células.....	49
4.6.6	Efeito sobre a produção de melanina.....	49
4.7	Análise estatística.....	49
5.	Resultados.....	51
5.1	Atividade antioxidante.....	51
5.2	Inibição da tirosinase.....	53
5.3	Efeito sobre a viabilidade celular.....	55
5.4	Atividade antioxidante celular.....	56
5.5	Efeito sobre o teor de melanina.....	56
6.	Discussão.....	59
7.	Conclusões.....	52

REFERÊNCIAS  
APÊNDICES

## 1. INTRODUÇÃO

A pele é o órgão mais extenso do organismo compreendendo até 15% do peso corporal. Doenças da pele nem sempre são graves do ponto de vista de morbimortalidade, no entanto, compreendem fatores de impacto psicossocial para o acometido. Inseridos nesse contexto, estão os problemas benignos de hiperpigmentação como melasmas, lentigos, efélides e hiperpigmentações decorrentes de processos inflamatórios ou uso de medicamentos (BAUMANN, 2004; GARCÍA, 2010; PANDYA e GUEVARA, 2000; KANG e ORTONNE, 2009).

Na clínica já existem alguns protocolos de tratamento para esses problemas baseados em agentes químicos como hidroquinona, benzoquinona, incluindo tretinoína, ácido retinóico, ácido kójico, proteção solar e laser. No entanto, muitos desses tratamentos nem sempre diminuem as manchas em sua totalidade, muitas vezes provocam irritação cutânea desencadeando hiperpigmentação secundária ao tratamento, o que também é desconfortável para o paciente. Por isso, sua aplicação se restringe ao tratamento de máculas pré-existentes e não à prevenção dessas manchas (GAUTHIER, 2004; ROSE, 2009).

Por outro lado, observa-se que a indústria cosmética e os pesquisadores da área têm cada vez mais atentado para a busca de novas alternativas principalmente baseadas em produtos naturais para os cuidados preventivos contra problemas da pele. Em se tratando de despigmentantes não é diferente. Diversos clareadores de pele desenvolvidos no mundo incluem nas suas formulações extratos padronizados de plantas ou substâncias deles extraídas, como, por exemplo, a aloesina extraída da *Aloe vera* com grande potencial inibidor da

tirosinase, enzima primordial para formação da melanogênese (CHANG, 2009; ARUNG et al., 2009; KIM e UYAMA, 2005).

Em se tratando de produtos naturais, é indiscutível que a Amazônia detém a maior biodiversidade do planeta, o que não pode ser ignorado por pesquisadores principalmente da região. São inúmeras as espécies vegetais presentes nessa região e pouco estudadas, mas ricas em flavonóides, cumarinas e outros compostos que podem também ter potencial tanto da prevenção como do tratamento das desordens pigmentares da pele (CHANG, 2009; SOUSA et al., 2008).

Os grupos de pesquisa de produtos naturais e análises clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UFAM têm buscado agregar valor a espécies da região através da comprovação de atividades biológicas ainda não estudadas dessas plantas. E foi partindo dessa premissa que os resultados de um trabalho anterior desenvolvido pelo grupo, encorajaram a equipe a investigar os efeitos da *Passiflora nitida* sobre a melanogênese. Isso por que foi verificado que essa planta apresenta excelente atividade antioxidante, além de apresentar flavonóides e cumarinas, classes de substâncias já citadas na literatura como potenciais inibidores da tirosinase, enzima limitante das reações de produção de melanina (LIMA et al. 2009; CARVALHO et al., 2010; CHANG, 2009).

Por isso, esse trabalho visa avaliar os efeitos dos extratos das folhas de *Passiflora nitida* sobre a melanogênese, e verificar se esses extratos são capazes de inibir a tirosinase e diminuir a formação de melanina em células de melanoma murino B16F10 e em melanócitos Melan-A, ambas células hiperpigmentadas.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 Pele**

A pele é um epitélio de revestimento estratificado escamoso e pavimentoso constituída de tecidos de origem ectodérmica e mesodérmica distribuídos em três camadas: a epiderme, a derme e a hipoderme. Sendo a camada mais externa do corpo, a pele constitui uma barreira contra agressões externas, impede a perda de água e proteínas para o exterior, age como órgão sensorial e para excreção de eletrólitos. Além disso, participa do sistema imune, da produção de vitamina D3 e regulação da temperatura (BAUMANN, 2004; RAWLINGS et al., 2008).

A epiderme, de origem ectodérmica, está em constante renovação devido à atividade mitótica contínua dos queratinócitos. As populações celulares da epiderme são queratinocíticas, composta pelos queratinócitos em diversos níveis e não-queratinocíticas que incluem melanócitos, células de Langerhans e células de merkel. A derme, localizada abaixo da epiderme, tem origem mesodérmica e é formada por fibras colágenas, elásticas e substância amorfa produzida pelos fibroblastos. Nela se encontram os vasos, nervos, músculos eretores do pêlo e os anexos cutâneos. Dentre todos os tipos celulares citados, este trabalho dará ênfase aos melanócitos (QUINN, 2004; RAWLINGS et al.,2008).

A população queratinocítica está organizada em camadas de acordo com a sua maturidade e características morfológicas. As quatro camadas de células queratinocíticas em ordem de maturidade são as camadas: basal, espinhosa, granulosa e córnea (Figura 1). A camada basal constitui a porção proliferativa com células de núcleos grandes, vesiculosos e pouco citoplasma. A camada espinhosa tem de cinco a dez camadas de células poliédricas

maiores que as células da camada basal devido à expansão do citoplasma e recebeu esse nome devido aos desmossomos, estruturas responsáveis pela coesão entre as células que dão aspecto espinhoso à camada. A camada granulosa tem de uma a três fileiras de células grandes losangulares ricas em grânulos de querato-hialina. Finalmente a camada córnea, a mais externa, tem espessura variável, com escamas de queratina e células anucleadas maiores e planares, as organelas e núcleo são dissolvidos pelas enzimas lisossomais, as camadas superficiais não tem desmossomos e por esse motivo se descamam (BAUMANN, et al., 2004; RAWLINGS et al., 2008).

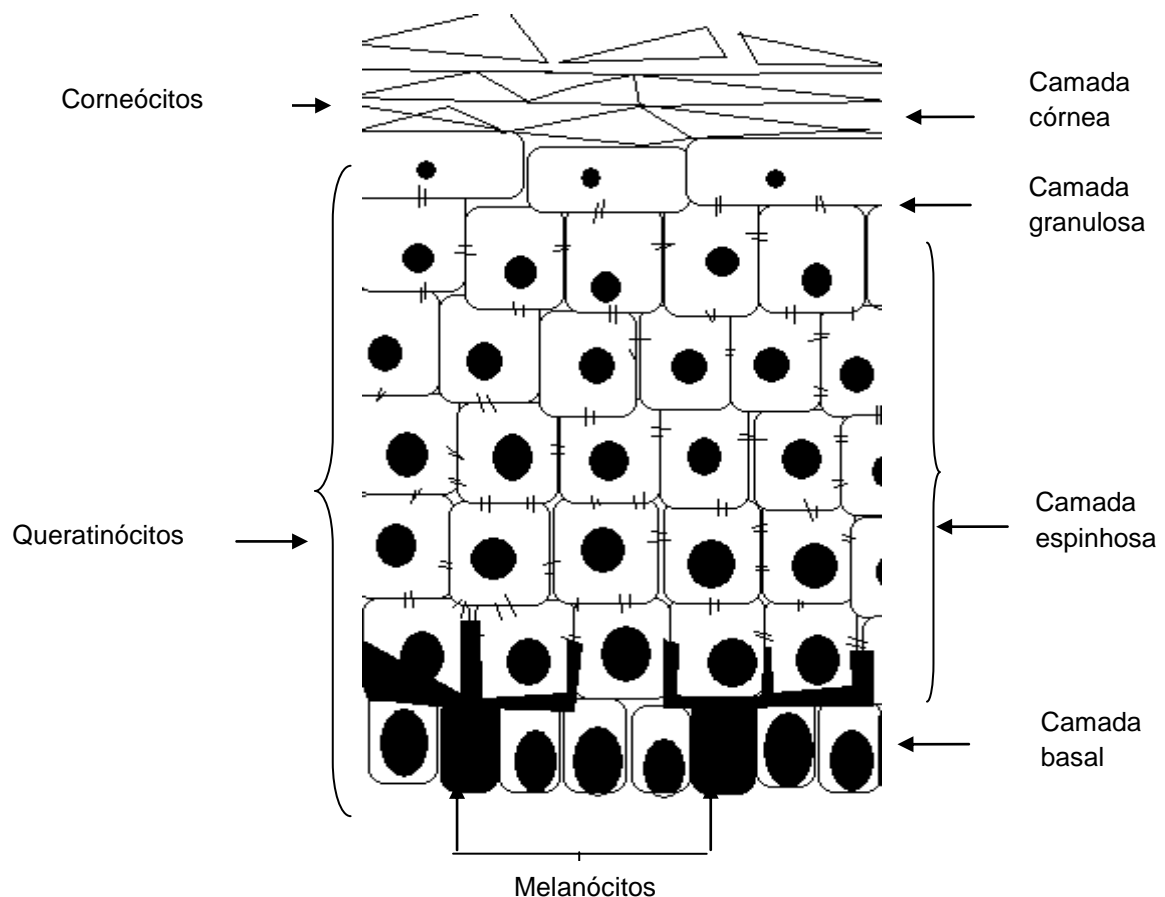


Figura 1: Camadas de células da epiderme (FONTE: Autor).

Dentre as células não queratinocíticas as mais importantes para a síntese de melanina são os melanócitos. Estes são células dendríticas sem desmossomos, derivados da crista

neural, situados na camada basal do epitélio. Estão na proporção de um melanócito para cada dez queratinócitos. Nos melanócitos existem vesículas chamadas melanosomos, onde ocorre a melanogênese, produção de melanina. Quando maduros, os melanosomos são transferidas para os queratinócitos pelos processos dendríticos dos melanócitos. Cada melanócito transfere melanina para 36 queratinócitos (SOUSA e VARGAS, 2004; RAWLLINGS et al., 2009).

### **2.1.1 Melanina**

A cor da pele em animais mamíferos é dependente da quantidade, da qualidade e da distribuição da melanina. As melaninas são biopolímeros heterogêneos que podem ser classificadas em dois principais tipos: eumelanina (marrom a negra) e feomelanina (amarela a vermelha). Esses pigmentos, além de determinarem a cor da pele, são fatores importantes para manter a homeostasia do órgão (ITO et al., 2008).

Na figura 2 estão representadas as fórmulas estruturais básicas da eumelanina e da feomelanina. A eumelanina é um biopolímero heterogêneo formado principalmente por diferentes estados oxidativos de 5,6-di-hidroxi-indol (DHI), di-hidroxi-indol-2-acido carboxílico (DHICA) e unidades pirrólicas derivadas da clivagem oxidativa dos mesmos. A feomelanina é formada por benzotiazinas, benzotiazóis e benzoquinolonas. Todas as unidades básicas das melaninas provêm da tirosina, cujas reações iniciais e limitantes são catalisadas pela tirosinase serão abordadas em outro tópico (SIMON, et al., 2009).



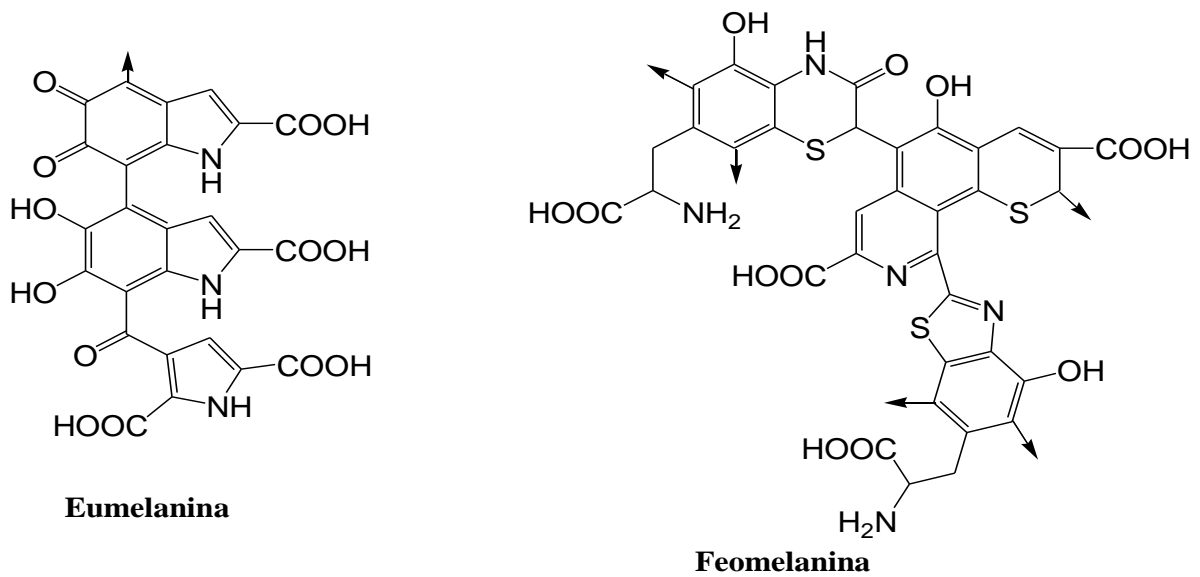


Figura 2: Estrutura da eumelanina e da feomelanina segundo Simon et al. (2009).

A função mais conhecida da melanina é proteger o DNA da ação danosa da Radiação Ultravioleta (UV). Para isso, a melanina se dispõe em forma de capuz sobre o núcleo dos queratinócitos basais. Além disso, elas também estão envolvidas em processos de oxidação e redução podendo agir como antioxidantes ou pró-oxidantes (PARK et al., 2009).

O sol emite um espectro de ondas eletromagnéticas das quais a radiação UV é a mais agressiva aos componentes celulares. A irradiação UV abrange a faixa de comprimentos de onda de 100 a 400 nm e é classificada em três tipos, que são: UVA 320 a 400 nm, UVB: 280 a 420 e UVC: 100 a 320 nm. A porção UVC (100-280 nm) e uma parte dos raios UVB são absorvidos pela atmosfera, sendo que, da radiação que chega a superfície terrestre 5–10% compreendem a radiação UVB (280-320nm) e 90 a 95% compreendem a radiação UVA (320-400nm). A radiação UVA é a menos energética, no entanto, devido o seu longo comprimento de onda, penetram mais profundamente na pele (BAUMANN, 2004; AGAR e YOUNG, 2005).

Tanto a radiação UVA quanto a radiação UVB são lesivas a pele, porém, os mecanismos de ação são diferentes. A radiação UVA causa danos celulares decorrentes da produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio, enquanto a radiação UVB causa dano direto ao DNA. Assim, tanto a radiação UVA quanto a UVB estão envolvidas na patogênese de doenças relacionadas à fotossensibilidade da pele como erupções cutâneas polimórficas, queimaduras, imunossupressão, envelhecimento e fotocarcinogênese (AGAR e YOUNG, 2005; SIMON et al, 2009)

Ao penetrar na célula, os raios UVA são absorvidos pelo oxigênio molecular e por substâncias cromóforas fotossensíveis produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs) e radicais livres (RL) como o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e o radical hidroxila (OH). Esses produtos são responsáveis diretos por danos causados ao DNA e pela destruição de membranas e estruturas celulares através da oxidação de proteínas e de ácidos graxos gerando radicais lipídicos (HERRLING et al 2008).

A radiação UVB, por sua vez, causa dano ao DNA por excitação direta dessa molécula. A porção de bases heterocíclicas do ácido nucléico absorve essa radiação fragmentando-o em dímeros de ciclobutano-pirimidina e pirimidina pirimidona (GENG et al., 2008; HERRLING et al 2008).

A presença da melanina na pele é fundamental para prevenir danos ao DNA. Como visto na figura 2, as melaninas são dotadas de duplas alternadas, um fator importante para a absorção da energia da radiação UV. O ótimo de absorção energética pela melanina se encontra na porção máxima do espectro eletromagnético, região UV e diminui gradativamente nos comprimentos de onda da porção visível. A proteção ao DNA se deve ao fato de que a

energia absorvida pela melanina é convertida em energia calorífica menos tóxica para as células (SOUSA et al., 2004; SCHALLREUTER et al., 2007).

Por outro lado, a melanina tanto pode ser um fator de proteção celular contra a geração de espécies reativas de oxigênio, quanto pode ser um elemento pró-oxidante. Estudos mostram que tanto a eumelanina quanto a feomelanina têm propriedades antioxidantes ou varredoras de radicais livres, protegendo contra dano ao DNA induzido por UV e tumorigênese. Porém, tanto os intermediários da melanina quanto ela própria, em especial da feomelanina, dependendo do seu peso molecular e estado de polimerização, podem potencializar o dano ao DNA através da geração de espécies reativas de oxigênio induzida por radiação UV (ITO et al., 2008; COSTIN e HEARING, 2007).

Além disso, já foi demonstrado que a feomelanina, quando complexada com  $Fe^{3+}$  induz a lipoperoxidação das membranas e mesmo na ausência da radiação UV induz a produção de espécies reativas de oxigênio. Assim sendo, as propriedades antioxidantes da melanina estão relacionadas ao tipo de melanina, à maior relação entre eumelanina e feomelanina, devido a maior capacidade antioxidante do pigmento mais escuro (AGAR e YOUNG, 2005).

Assim, a pele negra tem maior nível de proteção contra a radiação UV do que a pele clara. Estudos sugerem que o aumento da incidência de melanoma induzido por radiação UV em peles claras não se deva apenas a menor habilidade da feomelanina em proteger a pele contra radiação UV, mas devido às propriedades mutagênicas da feomelanina e seus intermediários como resultado da capacidade pró-oxidante (ROZANOWSKA et al., 1999; HERRLING et al., 2008).

## 2.2 Melanogênese

A síntese de melanina, melanogênese, ocorre nos melanossomos contidos nos melanócitos. Esse processo pode ser visto como uma resposta a estímulos endógenos e exógenos, principalmente a radiação UV. A regulação da melanogênese envolve fatores parácrinos e autócrinos que controlam a transcrição de proteínas melanogênicas, biogênese de melanossomos, incorporação das proteínas melanogênicas aos melanossomos e a transferência desses aos queratinócitos (PARK et al 2009).

A organela fundamental para esse processo é o melanossomo que pode ser de dois tipos: eumelanossomos ou feomelanossomos. Os eumelanossomos se originam do complexo de golgi e tem quatro estágios de maturação (I-IV). No estágio I a vesícula é esférica, há grande quantidade de tirosinase ativa e a presença da proteína melanossomal (Pmel 17). Esta proteína é responsável pela maturação ao estágio II, no qual o melanossomo é mais elíptico, tem tirosinase ativa, pouca melanina e torna-se mais fibroso. No estágio III, a melanina começa a se depositar nas fibras e no estágio IV as vesículas são elípticas ou elipsóides totalmente opacas e eletrodensas devido ao denso depósito de melanina e a tirosinase está pouco ativa. Os feomelanossomos permanecem esféricos e granulares nos quatro estágios. No quarto estágio, os melanossomos são transferidos dos melanócitos para os queratinócitos, onde são observados núcleos recobertos de melanina (PARK, 2009; SCHALLREUTER, 2007; SCHALLREUTER, et al, 2007; SIMON et al., 2009).

Nos melanossomos, pelo menos três enzimas são necessárias para a produção de melanina: a tirosinase, as proteínas relacionadas à tirosinase (TRPs) e a dopacroma tautomerase (DCT). A TRP 1 é a glicoproteína mais abundante do melanócito e participa de reações subseqüentes à tirosinase controlando a síntese de melanina, no entanto, ela ocorre

apenas nos eumelanossomos. A dopacroma tautomerase é uma enzima que atua nas etapas subsequentes a ação da tirosinase convertendo a melanina em seus diferentes tipos. Das três enzimas a mais importante é a tirosinase, elemento fundamental para a melanogênese devido às reações que catalisa e ao fato de a maioria dos processos reguladores da melanogênese conhecidos envolverem controle da expressão ou da atividade dessa enzima (SIMON et al., 2009; YAMAGUCHI et al., 2009).

### **2.2.1 Tirosinase e a síntese de melanina**

A tirosinase tem esse nome, pois seu principal substrato é a tirosina. Trata-se de uma metaloenzima que ocorre em diversos organismos, com grandes semelhanças estruturais. O sítio ativo da enzima apresenta dois átomos de cobre e cada um deles se encontra ligado a três resíduos de histidina (Figura 3). A tirosinase pode se apresentar em três diferentes estados (oxi-, met- ou deoxi-tirosinase). A forma oxigenada apresenta dois átomos de cobre tetragonais ligados fortemente na posição equatorial e fracamente na posição axial ao N do resíduo de histidina. O oxigênio exógeno se liga como peróxido aos átomos de cobre. A forma met-tirosinase apresenta dois cobres ligados entre si e a um hidróxido exógeno. A deoxitirosinase apresenta dois cobres ligados entre si sem ligação com hidroxila (AGAR e YOUNG, 2005; CHANG, 2009; SIMON et al., 2009; SCHALLREUTER, 2007; SCHALLREUTER et al., 2007).

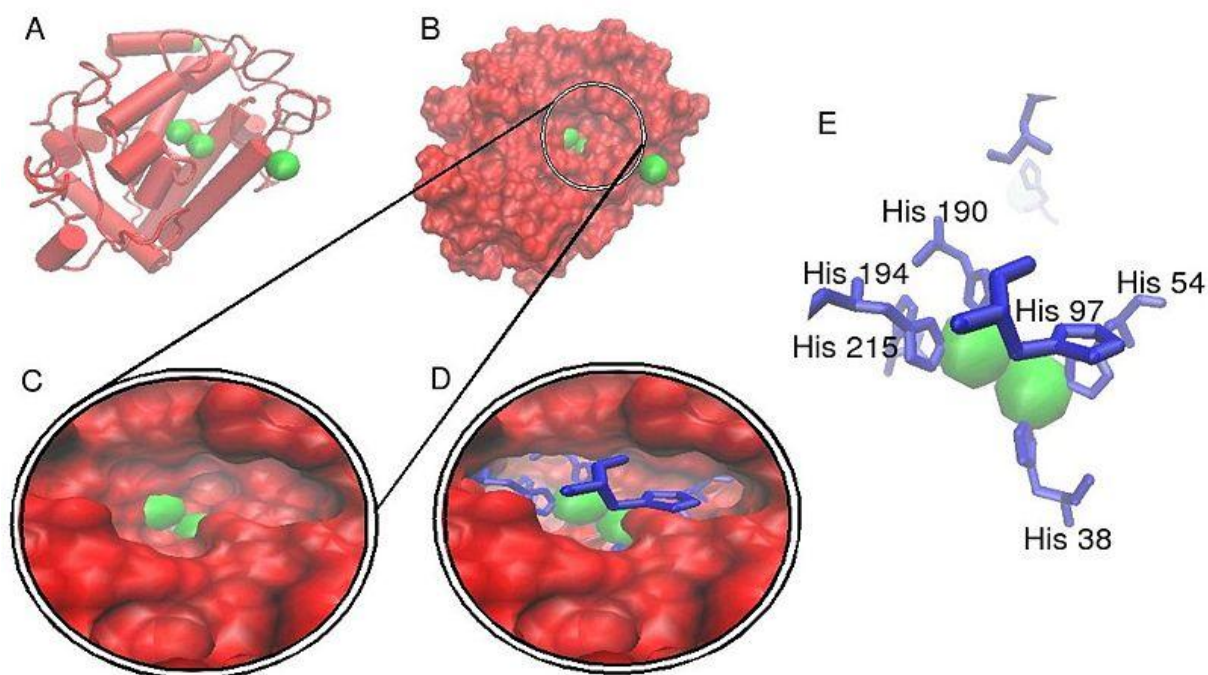


Figura 3: Estrutura cristalográfica da tirosinase de *Streptomyces*. Em todos os modelos os átomos de cobre estão representados em verde e a superfície da tirosinase está representada em vermelho. Nos modelos D e E, os aminoácidos histidina estão representados em linhas azuis. No modelo E pode ser visto que cada átomo de cobre do sítio ativo está complexado com três resíduos de histidina. Nos modelos C e D pode ser visto que o sítio ativo está no interior de uma reentrância da superfície da enzima. MATOBA et al.(2006) modificado por Murphy (2007), disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO\\_figure.jpeg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO_figure.jpeg), acesso em: 23 abr. 2010.

Dependendo do estado em que se encontra, a tirosinase é capaz de catalisar a hidroxilação de monofenóis, por isso é chamada de monofenolase ou catalisar a oxidação de o-difenóis, por isso chamada difenolase (Figura 4). No ciclo catalítico monofenolase, o monofenol só pode reagir com a oxitirosinase e ser oxidado a o-quinona liberando a deoxitirosinase, que por adição de  $O_2$  regenera a oxitirosinase. Quando o substrato é um difenol, pode sofrer a ação tanto da oxitirosinase, quanto da metitrosinase podendo entrar tanto no ciclo monofenolase quanto no difenolase. Quando o difenol sofre a ação da oxitirosinase, é liberada a o-quinona e se forma a metitrosinase. Esta pode converter outro

difenol em o-quinona formando a deoxitirosinase capaz de regenerar a oxi-tirosinase. Uma vez que apenas a deoxitirosinase pode regenerar a oxi-tirosinase, e ela está presente apenas no ciclo monofenolase, este ciclo se torna importante para a restauração da tirosinase ativa por período indeterminado no interior da célula (CHANG et al 2009; FENOLL, et al., 2001; FENOLL, et al. 2004; LOPÉZ et al., 2001; YAMAGUCHI, et al, 2009).

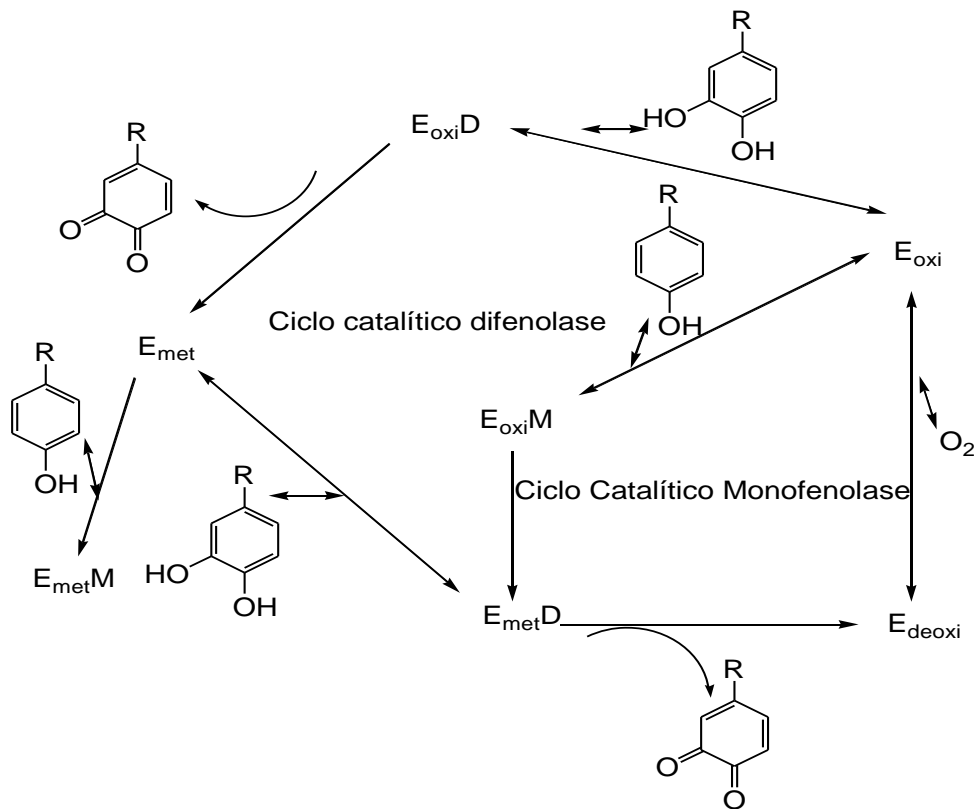


Figura 4: Ciclo catalítico de hidroxilação de monofenol e antioxidante de o-difenol a o-quinona pela tirosinase. Eoxi, Emet e Edeoxi, são as três formas da enzima tirosinase respectivamente: oxi-tirosinase, met-tirosinase e deoxitirosinase. Onde E= enzima, M=monofenol e D= difenol. Conforme Chang (2009).

Na melanogênese a tirosinase é capaz de catalisar reações que dão início a síntese de melanina (Figura 4). Pela atividade monofenolase ela catalisa a o-hidroxilação da tirosina, um monofenol, a  $\beta$ -3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA) e oxidação a DOPA, um o-difenol a,

dopaquinona, uma o-quinona. A partir da produção da dopaquinona, uma série de reações enzimáticas e não-enzimáticas ocorrem para produzir compostos dihidroxiindólicos (DHI). A síntese das melaninas finaliza com a polimerização desses compostos (CHANG, 2009; SCHAULLREUTER, 2007; SCHAULLRETER et al. 2007; SILVEIRA, 2007).

A dopaquinona é uma molécula altamente reativa. Na ausência do sulfidrilas ela incorpora o grupamento amino produzindo a ciclodopa ou leucodopacroma. Por uma reação de oxidação e redução entre a dopaquinona e a ciclodopa é formada dopa novamente. A leucodopacroma sofre também uma oxidação formando a dopacroma, um intermediário laranja. A dopacroma sofre descarboxilação gerando o di-hidroxi-indol (DHI) e em menor proporção gera ácido carboxílico di-hidroxi-indólico (DHICA). Esses dois compostos indólicos são oxidados e por polimerização dessas subunidades formam a eumelanina (SARANGARAJAN e APTE, 2006; SCHAULLREUTER, 2007).

Por outro lado, na produção de feomelanina a dopaquinona recebe a cisteína com seu grupo sulfurado. Assim, os intermediários da feomelanina são cisteinildopas que por oxidações seguintes formam também as benzotiazinas, outro intermediário da feomelanina. A polimerização de misturas desses intermediários dá origem as feomelaninas (CHANG, 2009; SCHAULLREUTER, 2007; PARK, 2009).



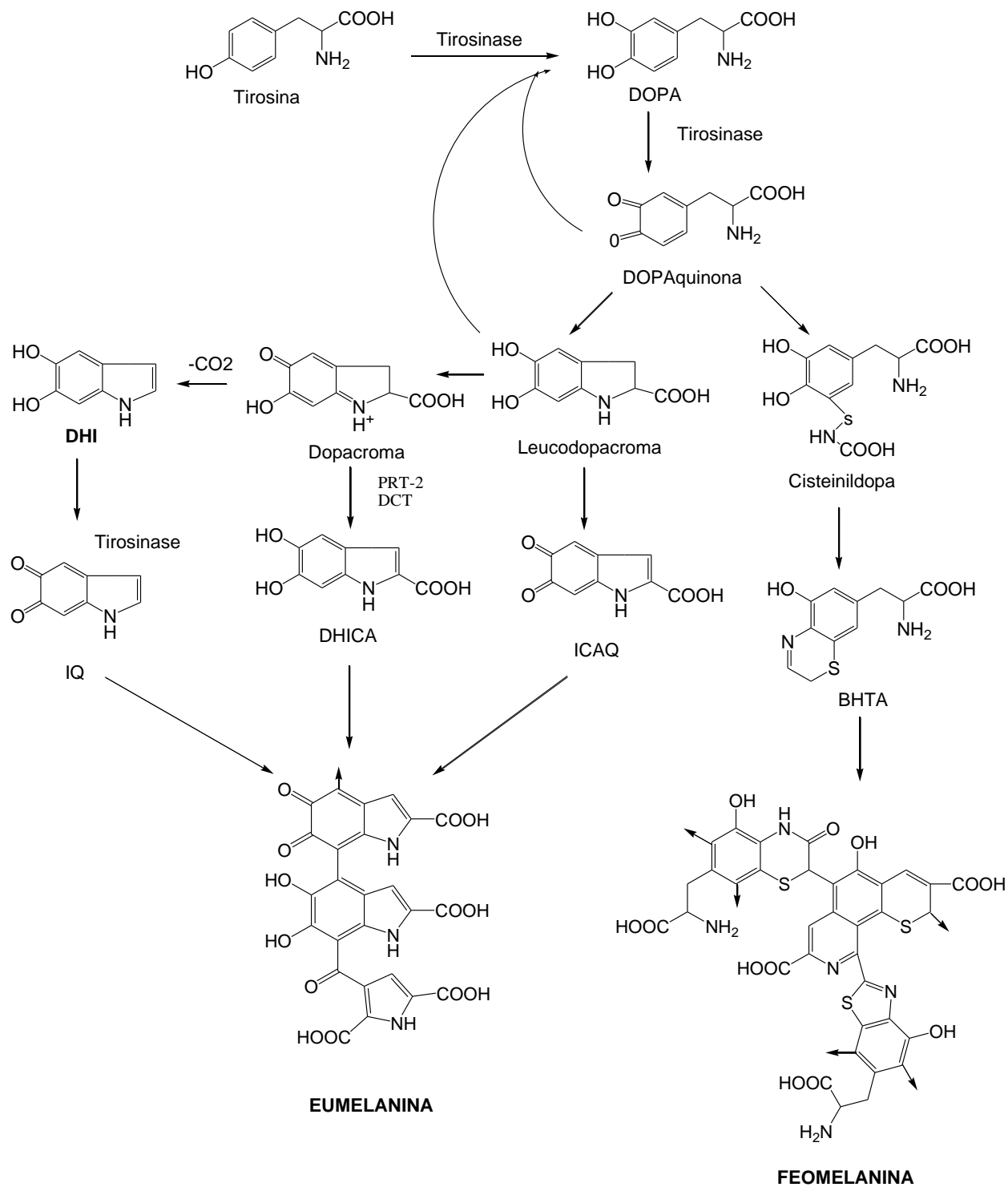


Figura 5: Biossíntese da melanina. TRP: proteínas relacionadas a tirosinase, dopa: 3,4-dihidroxifenilalanina; DHICA: 5,6-di-hidroxi-indol-2-ácido carboxílico; DHI: 5,6-dihidroxiindol; ICAQ: indol-2-carboxílico acid-5,6-quinona; IQ, indol-5,6-quinona; HBTA, 5-hidroxi-1,4-benzotiazinil-alanina. Baseado em Chang et al., 2009.

### 2.2.2 Regulação da melanogênese

Um dos principais estímulos a melanogênese é a radiação UV. Alguns autores inclusive mencionam a melanogênese como um mecanismo de resistência a radiação ultravioleta. Os raios UV ativam as proteínas supressoras de tumor p53. Descobriu-se recentemente, que quando a p53 está ativada, os níveis de RNAm de tirosinase aumentam, bem como a própria enzima e a melanogênese. Além disso, a p53 ativa o gene da proopiomelanocortina (POMC) que quando produzida pelos queratinócitos atuam como estimulantes da melanogênese (CUI et al., 2007; SCHAULLREUTER, 2007; SCHAULLREUTER et al., 2007).

Os queratinócitos participam do controle da melanogênese produzindo e secretando fatores como o hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH), prostaglandinas E2, hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), endotelina 1 (ET-1) e o óxido nítrico (NO). Nos queratinócitos a proopiomelanocortina (POMC) é o principal precursor do hormônio estimulante de melanócitos ( $\alpha$ -MSH), do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e da endotelina 1 (ET-1), todos importantes estimuladores da melanogênese, da proliferação e da diferenciação dos melanócitos. A expressão de POMC nos queratinócitos é induzida pela radiação UV, interleucinas e citocinas secretadas durante inflamações cutâneas (PASSERON et al., 2005; SIMON et al., 2009; YAMAGUCHI e HEARING, 2009).

A quantidade de melanina da pele é controlada principalmente pelo hormônio estimulante de melanócitos ( $\alpha$ -MSH) que além de estimular a melanogênese, induz a proliferação de melanócitos. O  $\alpha$ -MSH estimula a eumelanogênese em maior grau que a feomelanogênese, por isso a exposição da pele aos raios solares desenvolve a coloração bronzeada na pele. No embrião, o hormônio é produzido na “pars intermédia” da hipófise, no

adulto que não tem “pars intermédia” o hormônio passa a ser produzido na pele (ação parácrina e autócrina) principalmente por queratinócitos, células de langherhans e melanócitos (COSTING e HEARING, 2007; SCHAULLREUTER, 2007).

O hormônio estimulante de melanócito ( $\alpha$ -MSH) e o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) atuam nos melanócitos através de receptores de melanocortina (MC1R). A ligação do  $\alpha$ -MSH e do ACTH ao MC1R ativam a adenilato ciclase através de uma proteína G acoplada ao receptor aumentando os níveis de monofosfato de adenosina cíclicos (AMPC) . O aumento de AMPC estimula as proteínas quinases (PKCs) que os fosforilam e os ligam as promotores genéticos M. O AMPC liga os promotores M ao fator de transcrição associado a microftalmia (MITF) formando o MITF-M. O MITF-M regula a transcrição de tirosinase, TRPs e de PKC- $\beta$ . A atividade do MITF-M e sua estabilidade dependem do seu estado de fosforilação. Mutações com perda de função do MC1R culminam com a diminuição da produção de melanina e maior exposição do DNA a danos causados por radiação UV, podendo ocasionar câncer de pele. Outras substâncias como a isobutilmetilxantina, a forskolina e a glicirrizina também podem estimular a melanogênese via AMPC (PARK, et al, 2007; SCHALLREUTER ET AL, 2007).

O comportamento dos melanomas, no entanto, é diferente. Segundo Solano et al. (2006) o estresse oxidativo em melanomas é um dos principais fatores responsáveis pela hiperpigmentação, pois propicia maior oxidação da dopa e conseqüentemente a formação de melanina. Espécies reativas de oxigênio, em especial o superóxido, são necessárias para iniciar a polimerização e a propagação da cadeia de reações da melanogênese. Em melanomas, no entanto, a resposta é bastante peculiar. O estresse oxidativo em células B16, com aumento de superóxidos fazem com que o MITF a iniba a expressão da tirosinase, o que

diminuiria a produção de melanina em um melanócito normal. Em melanoma, no entanto, outras proteínas presentes no Reticulo endoplasmático dessas células também são capazes de catalisar polimerização mantendo a produção da melanina, ainda que de menor peso molecular (SARAGAJAN e APTE, 2006).

Outro mecanismo de ação do  $\alpha$ -MSH é ligar-se ao 6(R)-L-eritro-5,6,7,8-tetrahidrobioperina (6-BH4), convertendo-o em uma enzima melanogênica. O 6BH4 passa, então, a funcionar como um co-fator para a fenilalanina hidroxilase e tirosina hidroxilase. Um isômero do 6BH4, o 7BH4, também inibidor da tirosinase, foi encontrado nos melanócitos e curiosamente estudos recentes demonstram que este é inibido pelo  $\beta$ -MSH, isômero do  $\alpha$ -MSH (SIMON et al., 2009)

Alguns mediadores inflamatórios também podem afetar a pigmentação da pele. Isso ocorre porque os melanócitos humanos possuem receptores para prostaglandinas (PGs) e leucotrienos, mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico. A exposição da pele ao sol e a ocorrência de algumas dermatoses aumentam tanto os níveis locais desses mediadores quanto dos seus receptores nos melanócitos. A ligação desses mediadores inflamatórios aos receptores nos melanócitos, além de aumentar a proliferação celular, induz a ativação da tirosinase estimulando a melanogênese (COSTIN e HEARING, 2007; SCHAULLREUTER, 2007; ITO e WAKAMATZU, 2008).

Por sua vez, a endotelina 1 (ET1) potencializa a ação do  $\alpha$ -MSH sobre os melanócitos, pois é capaz de aumentar os níveis de MC1R e a afinidade deste receptor pelo  $\alpha$ -MSH. Além disso, a ET-1 também regula a melanogênese ativando a tirosinase e aumentando os níveis de TRP-1 (SIMON et al, 2009; SCHAULLREUTER et al, 2007; SCHAULLREUTER et al. 2007).

Óxido nítrico é um radical livre com efeito regulatório pleiotrópico sobre outras células. Ele pode ser produzido pelos melanócitos e pelos queratinócitos e incrementar a melanogênese através de ativação de segundos mensageiros que ativam a tirosinase. Assim ele tem um efeito tanto autócrino quanto parácrino e a sua produção por essas células também é estimulada pela radiação UV (SCHAULLREUTER, 2007).

### **2.3 Hiperpigmentação**

Apesar dos benefícios da melanina para a homeostase da pele, esse biopolímero pode estar relacionado a alguns distúrbios pigmentares. As desordens de pigmentação podem ser do tipo hiperpigmentares ou hipopigmentares. Neste trabalho serão abordados problemas de hiperpigmentação como melasma, lentigos e efélides (BAUMANN, 2004).

Uma das desordens de hiperpigmentação mais freqüentes são os melasmas. Por serem muito freqüentes durante a gravidez, também são conhecidos como manchas gravídicas. São mais freqüentes em mulheres, porém, há casos raros em homens. Essas manchas têm caráter benigno, porém são esteticamente desagradáveis e difíceis de tratar. A etiologia ainda não está clara, mas parece haver relação com estrógeno e progesterona, predisposição genética, deficiência nutricional e uso de alguns medicamentos. Geralmente ocorre na face, nos lábios superiores, testa e bochechas em diferentes tonalidades. Histologicamente apresentam aumento do número de melanócitos, bem como da melanina e concentração desta nos queratinócitos adjacentes (KANG e ORTONNI, 2009; GARCÍA, 2010).

O tratamento clínico para melasma visa retardar a proliferação de melanócitos, inibir formação de melanossomos e promover a degradação destes. Para isso recomenda-se o uso de filtro solar, bem como agentes clareantes que inibem a tirosinase tais como, hidroquinona ou ácido kójico podendo incluir agentes queratinolíticos como tretinoína, ácido glicólico (BAUMANN, 2004; GARCÍA, 2010; PANDYA e GUEVARA, 2000).



Figura 6: Desordens pigmentares. A: melasma; B: lentigo solar; C: lentigo simples; D: efélide. (FONTE: Autor).

Os lentigos, conhecidos como manchas solares podem aparecer em qualquer tipo de pele. Geralmente são encontrados em pacientes com mais de 50 anos, por isso também são conhecidos como manchas senis. Como os nomes sugerem, essas manchas decorrem da exposição solar em regiões expostas da pele como face e braços e em maior frequência em pessoas de idade mais avançada. A coloração desses nevus tem pouca variação, porém, quando as lesões são grandes ou apresentam variação na coloração, podem representar lesões malignas como melanoma *in situ* ou invasor. Histologicamente, os lentigos são caracterizados pela presença de cristas interpapilares da epiderme alongadas com células basais hiperpigmentadas e entremeadas com melanócitos. Os lentigos simples são máculas escuras que surgem na infância. Não estão relacionadas à exposição solar e também não tem caráter maligno. Histologicamente revelam a proliferação dos melanócitos (BEYLOT, 2009; SCHMIDT, 2008)

As sardas ou efélides ocorrem com maior frequência em peles expostas ao sol. Essas lesões escurecem com a exposição ao sol e na abstinência clareiam. Os efélides surgem na infância ou adolescência e são mais comuns em pessoas de pele clara e cabelos loiros ou ruivos. Histologicamente apresentam aumento da melanização sem aumentar o número de melanócitos. Para os lentigos e efélides, o tratamento consiste em proteção solar para prevenir a formação de manchas e eliminar as pintas já existentes através de laser além de despigmentantes e proteção solar (GRIMES, 2009; SPENCERI, 2003)

A hiperpigmentação pós-inflamatória decorre da produção aumentada da melanina em resposta a uma agressão a pele. Como visto anteriormente, mediadores inflamatórios como as prostaglandinas podem exacerbar a produção de melanina. Histologicamente são observados melanófagos na derme em torno dos vasos sanguíneos e nas papilas dérmicas.

Essas manchas tendem a desaparecer naturalmente desde que o processo inflamatório inicial seja resolvido. Tratamento com agentes químicos podem levar a exacerbação da irritação, porém, o uso de dexametasona e outros anti-inflamatórios podem contribuir para a diminuição do processo (BAUMANN, 2004; GRIMES, 2009)

### **2.3.1 Inibição da tirosinase**

Tendo em vista que para prevenir e tratar problemas de hiperpigmentação é preciso diminuir a produção de melanina, o principal alvo dessas terapias é a tirosinase. Os clareadores já usados na clínica estética e dermatológica atuam como inibidores dessa enzima e pesquisas recentes que buscam novos clareadores de pele, também priorizam essa ação (SILVEIRA, 2007).

Os inibidores da tirosinase podem ser do tipo: competitivo, não-competitivo, acompetitivos e competitivo/acompetitivo. O inibidor competitivo compete com o verdadeiro substrato pelo sitio de ligação de maneira mutuamente exclusiva e deve ser um agente quelante de cobre. O inibidor acompetitivo se liga apenas ao complexo enzima substrato. O inibidor competitivo-acometitivo pode se ligar tanto a enzima livre quanto ao complexo enzima substrato, no entanto com constante de equilíbrio diferente e o inibidor não competitivo se liga a enzima e ao complexo enzima substrato na mesma constante de equilíbrio. O ácido kójico é o inibidor padrão da tirosinase. Ele tanto inibe a atividade monofenolase quando a difenolase da tirosinase por quelar o cobre presente no sitio ativo da enzima (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005).

O inibidor da tirosinase mais estudado é o ácido kójico. Essa substância atua como inibidor competitivo nas atividades monofenolase e difenolase da tirosinase. a inibição da



enzima pelo ácido kójico ocorre através da quelação do cobre do sítio ativo da enzima. essa substância tem sido usada em clareadores de pele e também em alimentos para inibir o escurecimento de ambos (CHANG, 2009).

### **2.3.2 Antioxidantes como clareadores de pele**

Antioxidantes são substâncias que em baixas concentrações eliminam os radicais livres e previnem os danos causados por eles. Os radicais livres têm sido há algum tempo relacionados a etiopatogenia de doenças graves como o câncer e o envelhecimento, por isso, ativos antioxidantes tem sido alvo de interesse para o tratamento e prevenção dessas lesões. Aos antioxidantes têm sido atribuídas algumas vantagens para o tratamento de problemas cutâneos, tais como fotoproteção, prevenção do envelhecimento e também como clareadores de pele (RATNAN et al, 2006; BAUMANN, 2004).

Uma vez que radicais livres e espécies reativas de oxigênio como o óxido nítrico, o peróxido e o superóxidos atuam como estimuladores da melanogênese por diversos mecanismos, substâncias antioxidantes que removam essas moléculas podem também inibir a síntese de melanina (CHANG, 2009; SCHAULLREUTER, 2007).

Além disso, os antioxidantes também podem ter ação limitante da melanogênese. A maioria dos trabalhos que trata de inibição da tirosinase relaciona essa ação a uma atividade antioxidante. No entanto, esses antioxidantes, podem não necessariamente estar inibindo a enzima, eles podem estar reduzindo novamente o produto da reação catalisada pela tirosinase ao seu precursor. Essa ação, no entanto, também é válida para a inibição da melanogênese, uma vez que também vai dificultar a formação de melanina. Um exemplo disso é o ácido

ascórbico que reduz novamente a dopaquinona a dopa impedindo a formação de dopacroma e melanina (CHANG, 2009).

Assim sendo, os antioxidantes são substâncias importantes para a terapia antimelanogênica por prevenirem mecanismos induzidos por espécies reativas de oxigênio, quanto por modificarem os precursores da melanina.

## **2.4 Produtos vegetais**

Os produtos naturais são usados desde os tempos imemoráveis. Antes do surgimento da indústria farmacêutica, eles podem ter sido uma das primeiras alternativas de tratamento para doenças. Hoje eles chamam a atenção devido a diversidade de constituintes químicos e as atividades biológicas (GUERRA e NODARI, 1999).

O ácido kójico e a hidroquinona são importantes clareadores de pele por serem inibidores da tirosinase, no entanto, o uso desses compostos sintéticos freqüentemente resulta em irritações na pele. Então, na busca por compostos naturais, várias substâncias já foram identificadas como potentes inibidores da tirosinase e da melanogênese. O uso tradicional de plantas contra doenças da pele é comum em diversas culturas e vários estudos tem comprovado a atividade antioxidante e anti-tirosinase desses produtos naturais (MOMTAZ, et al., 2008).

### 2.4.1 Compostos fenólicos vegetais

Compostos fenólicos são substâncias que possuem um ou mais anéis aromáticos contendo substituintes hidroxilados ou derivados deles. Esses compostos são numerosos e variados presentes em quase todas as classes de metabólitos secundários de vegetais. Podem ser fenóis simples, quando contêm apenas um anel aromático ou fenóis complexos. Uma das classes mais estudadas de compostos fenólicos são os flavonóides (SANTOS, et al. 1998).

Os flavonóides estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários de plantas. Sua estrutura química é bastante variada, no entanto, a unidade fundamental deles consiste em uma estrutura tricíclica, em que as unidades recebem os nomes A, B e C (Figura 7). Os flavonóides são divididos em sete grupos: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, isoflavonóides, chalconas e catequinas (CHAN et al., 2008).

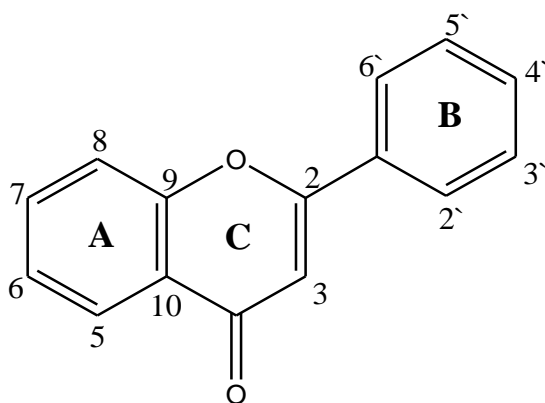


Figura 7: Núcleo fundamental dos flavonóides e sua numeração. Segundo Zuanazzi e Montanha (1999).

Várias funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas. As funções mais importantes são: proteção contra a incidência dos raios UV e visível (VIS), proteção contra

insetos, fungos, vírus e bactérias, atração de animais para a polinização, antioxidantes e inibidores de enzimas (CHAN et al, 2008).

Nesse sentido, alguns flavonóides que foram isolados de plantas atuam como inibidores da tirosinase. Eles representam a classe de substâncias polifenólicas mais estudada e com maior número de inibidores da tirosinase identificados. Tendo em vista que as condições de trabalho variam em cada estudo, a comparação da força desses inibidores da tirosinase, só é possível mediante a análise de inibição da enzima por um padrão, no caso, o ácido kójico. Quando o estudo apresenta a inibição da substância nova e do ácido kójico, é possível determinar a força de inibição da enzima pela substância através do cálculo da razão entre a inibição pela substância e a inibição pelo ácido kójico. Alguns desses flavonóides inibidores da tirosinase, o tipo de inibição e a força desses inibidores em relação ao ácido kójico estão apresentadas de forma resumida na tabela 1 (CHANG, 2009; KIM e UYAMA, 2005).

Tabela 1: Flavonóides inibidores da tirosinase. Segundo Chang, 2009.

<b>Substância</b>		<b>Tipo de inibição</b>	<b>Atividade em relação ao ácido kójico</b>
FLAVONÓIS	quercetina	Competitiva	4x menos ativa
ISOFLAVONOIDES	Glabridina	Competitiva	15 x mais ativa
	gliasperina C	CompetitivA	30 x mais ativa
ISOFLAVONAS	6,7,4'-trihidroxiisoflavona	Compete pelo sítio da L-tirosina	6 x mais ativa
	7,8,4'-trihydroxyisoflavone	Inibidores irreversíveis	
	5,7,8,4'-tetrahydroxyisoflavone		
	Haginin A (2',3'-dimethoxy-7,4'-dihydroxyisoflav-3-ene,	Não-competitivo contra a forma monofenolase	10 x mais ativa
	calycosin (4'-methoxy-7,4'-dihydroxyisoflavone	Não-competitivo contra monofenolase	

Os flavonóides possuem estrutura bastante semelhante a de substratos da tirosinase e de fato, a atividade anti-tirosinase dos flavonóis se deve a 3-hidroxi-4-ceto, pois essa estrutura é capaz de se ligar ao sitio ativo da enzima e quelar o cobre. As hidroxilas dos anéis A: (C6, C7 e C8) e do anel B (C2', C3' e C4') dos flavonóides são responsáveis por essa interação com os cobre (KIM et al., 2002).

Além de inibir a tirosinase o potencial antioxidante desses compostos contribuem para uma ação complementar na inibição da melanogênese como já descrito acima para as substancias antioxidantes. Outro mecanismo pelo qual essas substâncias podem inibir a melanogênese é através da inibição da prostaglandina E2 (PGE2), um dos indutores da melanogênese. Portanto, produtos vegetais que ricos em flavonóides podem ser importantes fontes de inibidores da melanogênese.

#### **2.4.2 Gênero *Passiflora***

O gênero passiflora compreende cerca de 500 espécies de plantas da família Passifloraceae, que se distribuem em zonas quentes, temperadas e tropicais da América. Com menor freqüência, também são encontradas nas regiões tropicais da África, Ásia e Austrália. O nome passiflora deve-se a flor, conhecida por flor da paixão de Cristo (DHAWAN et al., 2004).

As plantas do gênero são arbustos ou ervas trepadeiras com gavinhas auxiliares. As folhas são alternadas nos galhos e dependendo da espécie podem ser simples, inteiras, lobuladas ou palmares, sendo que essas podem ser imparimpinadas. As estípulas germinam da base do pecíolo, raramente ausente. As flores são bissexuais ou sexuais regulares. O

receptáculo é grande, profundo e oco como um copo e suporta numerosos filamentos ou apêndices anulares entre a corola e os estames que podem ser coloridos e formar coronas diversas. O cálice tem de três a cinco sépalas imbricatas e a corola tem de três a cinco pétalas (DHAWAN et al., 2007; BERNACCI, 2009).

Folhas, frutos, casca, caule e raízes de plantas desse gênero são utilizadas para diversos fins tais como ansiolítico, sedação e antioxidantes. Essas atividades têm sido atribuídas aos componentes fitoquímicos predominantes do gênero que são alcalóides, compostos cianogênicos, fenóis e polifenóis como flavonóides glicosilados, flavonóis. Alguns trabalhos também relatam atividade analgésica (RUDNICKI et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

Recentemente frutos de algumas espécies do gênero, tais como a *Passiflora foetida* tem sido relatadas como além de antioxidantes, inibidoras da tirosinase diminuindo a produção de melanina com baixa citotoxicidade em células de melanoma murino B16F10 que são altamente melanizadas (ARUNG et al., 2009).

#### **2.4.2.1 *Passiflora nitida* (Kunth)**

A *Passiflora nítida* (Kunth) é uma espécie nativa da região amazônica, distribuída por todo o norte da América do Sul em beiras de rios e estradas. A espécie é amplamente distribuída no território brasileiro já tendo sido encontrada nos Estados do Amazonas, Pará, Piauí, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Bahia, Minas Gerais e Distrito Federal. A planta é conhecida pelo fruto chamado de maracujá-do-mato, maracujá-de-cheiro, maracujá-de-rato e maracujá-suspiro (COHEN et al, 2008).



Figura 8: *Passiflora nitida*. 8.A: folhas; 8.B: fruto. (FONTE: Autor. Local: EMBRAPA, AM-010, KM 29).

Segundo Junqueira et al (2007), a planta apresenta muita similaridade botânica com o maracujazeiro doce *Passiflora alata* Curtis. Suas folhas apresentam superfícies cartáceas e coriáceas, opacas e envernizadas e as margens são levemente denteadas. Apresentam nervuras secundárias com glândulas terminais proeminentes e nervuras terciárias, percurrentes, retas e obliquas (HOPKINS; SOUZA, 1999).

Há poucos estudos a respeito das propriedades farmacológicas e dos constituintes fitoquímicos da *Passiflora nítida*. Mesmo assim, essa planta há algum tempo já é descrita como antimicrobiana contra *Escherichia coli* (BENDINI et al., 2006) e recentemente, um grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas demonstrou atividade sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária.

Todas essas atividades descritas para a planta foram atribuídas principalmente a presença de flavonóides e cumarinas nos extratos das folhas (CARVALHO et al., 2010).

Tendo em vista que pouco se sabe a respeito dos potenciais fitoterápicos das folhas da espécie *Passiflora nitida*, apesar de já ter apresentado atividade antioxidante e presença de cumarinas e flavonóides, se faz necessário investigar se os extratos dessa planta pode ter efeito inibidor da tirosinase, se interferem na produção da melanina, bem como avaliar se esses extratos tem capacidade inibidora da lipoperoxidação.

Com a descrição na literatura de que polifenóis como flavonóides e cumarinas são potenciais inibidores da tirosinase e o preenchimento desses requisitos pelos extratos das folhas da *Passiflora nítida*, acredita-se que o extrato de folha dessa planta possa ser ação inibitória sobre a melanogênese por inibição competitiva da tirosinase podendo ser uma alternativa terapêutica para problemas de hiperpigmentação da pele através da inibição da enzima limitante da melanogênese, tirosinase. Além disso, como aos extratos da planta já foi atribuída a atividade antioxidante, acredita-se que esses extratos possam inibir também desordens decorrentes da ação de espécies reativas de oxigênio como a lipoperoxidação.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar a atividade antioxidante e efeito de extratos das folhas da planta *Passiflora nitida* (Kunth) sobre a melanogênese.

#### 3.2 Específicos

- Averiguar o teor de fenóis totais e a atividade antioxidante dos extratos das folhas de *Passiflora nitida*.
- Estudar o efeito dos extratos das folhas de *Passiflora nitida* sobre a tirosinase.
- Conhecer a citotoxicidade do EAM sobre fibroblastos NIH 3T3, melanócitos (Melan-A) e melanoma (B16F10).
- Conhecer o efeito do EAM sobre a produção de melanina em melanócitos (melan-A) e em células de melanoma murino B16F10.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Estratégia Experimental



Figura 9: Delineamento experimental.

## 4.2 Modelo de estudo

Trata-se de um estudo experimental que investigou o teor de fenóis totais, bem como o potencial antioxidante e inibidor da tirosinase de extratos de *Passiflora nitida*: extrato aquoso aquoso por infusão (EAI), extrato aquoso por maceração (EAM), extrato hidroetanólico (EHE) e extrato etanólico (EE). O EAM foi usado para avaliar o efeito antioxidante em fibroblastos (NIH 3T3) e a influencia sobre o teor de melanina em melanócitos (Melan-A) e células de melanoma murino B16F10. As concentrações usadas nos testes celulares foram determinadas pelo teste de citotoxicidade utilizando Resazurina.

## 4.3 Obtenção dos extratos

As folhas de *Passiflora nitida* foram coletadas da plantação da Embrapa, estrada AM 010, Km 29, estrada Manaus-Itacoatiara. A coleta foi realizada pelos mateiros da Embrapa no período de frutificação sob orientação do Dr. Francisco Célio Maia Chaves, engenheiro agrônomo e pesquisador.

As folhas foram limpas, passaram por uma pré-secagem na Embrapa antes do transporte para a Faculdade de Ciências Farmacêuticas onde foram secas em estufa. Após a secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas.

Foram preparados extrato aquoso pelo método de infusão (EAI), extrato aquoso pelo método de maceração a temperatura ambiente (EAM), extrato hidroetanólico pelo método de maceração a temperatura ambiente (EHE) e extrato etanólico pelo método de maceração a temperatura ambiente (EE). Para cada um dos extratos foram pesados 50 gramas da matéria-

prima vegetal (MPV) para 1000 mL do solvente. Cada um dos extratos foi filtrado e em seguida seco em *spray-dryer* a 120°C. O etanol será evaporado antes de passar pelo *spray dryer* (SIMÕES ET AL, 2004).

#### **4.4 Teor de Fenóis totais e Atividade Antioxidante**

##### **4.4.1 Dosagem de fenóis totais**

A determinação de fenóis totais presentes nas amostras de extrato da folha de *Passiflora nítida* foi realizada por meio de espectrofotometria utilizando o método de Folin-Ciocalteu segundo Singleton e Rossi (1965) com modificações. Primeiramente foram preparadas soluções de 1mg/mL dos extratos e soluções de 0; 31,25; 62,5; 125; 250 e 500 µg/mL de ácido gálico. Em placas de 96 poços foram adicionados 50 µL de Folin-Ciocalteu (Sigma) a 10 µL de extrato/ácido gálico/ água. Para eliminar a leitura referente à cor dos extratos e do ácido gálico foram adicionados 10 µL do extrato ou do ácido gálico a 50 µL de água. A placa foi incubada a 37° C por 8 minutos e realizada a primeira leitura no leitor de Eliza DTX 800 (Beckman Coulter) a 715 nm. Após essa leitura, foram adicionados 240 µL de carbonato de sódio a 0,4%. A placa foi incubada por três minutos e realizou-se a segunda leitura. O teor de polifenóis em mgEAG/mg do extrato foi calculado a partir da fórmula gerada pela curva de ácido gálico e convertida para ser expressa em termos de porcentagem por meio da fórmula abaixo:

$$\%FT = \frac{(\text{mgEAG/mgextrato}) \times 100}{1\text{mg extrato}}$$

1mg extrato

#### 4.4.2 Teste do Diphenylpicrylhidrazyl (DPPH)

Para avaliar o potencial antioxidante dos extratos EAI, EAM, EHE e EE das folhas de *Passiflora nitida*, foi avaliada a reação entre diferentes concentrações do extrato e a solução alcoólica de DPPH (Molyneux, 2004). Foram pesados 2 mg de DPPH (Diphenilpicryl-hidrazina) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto. Foram também preparadas as soluções teste dos extratos EAI, EAM, EHE e EE de folhas de *Passiflora nitida* em diferentes concentrações (0; 7,8; 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e 1000µg/mL). Para conhecer a absorvância dos brancos específicos (A1), em uma placa de 96 poços foram adicionados 0,250 mL das diluições dos extratos em triplicata e as absorvâncias foram mensuradas a 492 nm no leitor de Elisa DTX Beckman Coulter. Após a primeira leitura, adicionou-se 0,100 mL da solução de DPPH e a placa permaneceu incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, decorridos os quais, realizou-se a segunda leitura (A2) e foi mensurada a redução do radical livre DPPH a 492 nm. As concentrações finais decorrentes da diluição com DPPH foram: 0, 5,58; 11,16; 22,32; 44,64; 89,29; 178,57; 357,14 e 714,38µg/mL.

Como controle negativo utilizou-se 0,250 mL de etanol mais 0,100 mL de solução de DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do DPPH, calculado segundo a equação abaixo (onde A1= absorvância 1 e A2 = absorvância 2). (Kim et al., 2002).

$$\% \text{ inibição} = 100 - (A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra}) \times 100 / (A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle})$$

A determinação da concentração de eficiência mediana do DPPH (CE<sub>50</sub>) ou seja, a concentração do extrato que causa 50% da cor do DPPH, foi obtida por regressão linear simples dos pontos plotados graficamente no programa Origin 6.0. Para a plotagem dos

pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas em triplicatas realizadas para cada uma das concentrações dos extratos. Os resultados obtidos dos extratos foram comparados com uma curva de atividade de diferentes concentrações de ácido gálico, um controle positivo de atividade antioxidante.

#### **4.4.3 Lipoperoxidação**

Foi avaliada a inibição da lipoperoxidação pelos extratos (EAI, EAM, EHE e EE) das folhas de *Passiflora nitida* (Kunth) segundo método descrito por Almeida et al.(2006). Para determinar a atividade antioxidante preparou-se uma emulsão utilizando um sistema  $\beta$ -caroteno com ácido linoléico. A emulsão foi preparada misturando 50 $\mu$ L de ácido linoléico, 200 $\mu$ L de tween 80, 150  $\mu$ L de solução de  $\beta$ -caroteno a 2mg/mL em 500 $\mu$ L de clorofórmio. O clorofórmio foi evaporado sob nitrogênio. Após a evaporação do clorofórmio, foram adicionados 25mL de água previamente saturada com oxigênio durante 30 minutos em agitação vigorosa. Para proceder ao ensaio foram depositados em placas de 96 poços de fundo chato e em triplicata 240 $\mu$ L da emulsão, 10 $\mu$ L dos extratos EAI, EAM, EHE e EE a 1 mg/mL. O padrão de inibição da lipoperoxidação foi o hidroxitolueno de butila (BHT) na mesma concentração. A concentração final dos extratos e do padrão nos poços foi 0,04 mg/mL. Tão logo os extratos e o BHT foram adicionados à emulsão nas microplacas, realizou-se a primeira leitura no leitor de microplaca DTX 800 (Beckman Coulter) a 340nm. Logo em seguida a placa foi incubada a 50°C e novas leituras no mesmo comprimento de onda foram efetuadas em intervalos de 15 minutos durante 120 minutos. A inibição da peroxidação foi expressa em porcentagem calculada segundo a fórmula abaixo, onde A2= absorbância 2, A1= absorbância 1.

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra}) \times 100}{(A2 \text{ controle} - A1 \text{ controle})}$$

#### 4.5 Teste de inibição da tirosinase

Foi avaliada a inibição da tirosinase pelos extratos segundo método descrito por Chan et al., 2008. Foram preparadas diferentes soluções teste dos extratos EAI, EAM, EHE e EE de folhas da *Passiflora nitida* em 20% de DMSO (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10mg/mL). Para retirar as absorbâncias dos extratos, 25 µL de cada solução teste dos extratos foram pipetados em triplicata a uma placa de 96 poços de fundo redondo aos quais foram previamente adicionados 75 µL de solução de tirosinase. As absorbâncias 1 (A1) foram determinadas em 475nm . A placa foi incubada por 5 minutos a 37° C e em seguida adicionou-se 100 µL do reagente de cor DOPA (dihidroxifenilalanine). Incubou-se a placa por 15 minutos a 37° C e determinou-se as absorbâncias finais (A2) no mesmo comprimento de onda. As concentrações finais dos extratos considerando o fator de diluição com a enzima foram (2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,156 mg/mL). Como controle positivo foi analisado o ácido kójico preparado da mesma forma que as amostras teste. A CI<sub>50</sub> deve foi obtida por regressão linear simples a partir de gráficos plotados utilizando o programa Origin 6.0. Os pontos plotados correspondem as porcentagens de inibição de cada triplicata analisada. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado a seguir, onde A2= absorbância 2 e A1= absorbância 1) (Hearind, 1987).

$$\% \text{ inibição} = \frac{100 - (A2 \text{ amostra} - A1 \text{ amostra}) \times 100}{(A2 \text{ controle} - A2 \text{ controle})}$$

## **4.6 Ensaios em células**

### **4.6.1 Células**

Foram utilizados fibroblastos murino NIH 3T3 e melanócito murino Melan-A doadas pela Profa. Dra. Silvyta Stuch Maria-Engler da Universidade de São Paulo e células de melanoma murino B16F10 gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Roger Chamas da Universidade de São Paulo.

### **4.6.2 Meios de cultivo**

As células NIH 3T3 foram cultivadas em Meio Dulbecco Modificado ou Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) com 10% de soro fetal bovino. A melan-A foi cultivada em RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 200nM de phorbol-miristate acetate (PMA). A B16F10 foi cultivada em RPMI 1640 acrescido de 10% de SFB. Todos os meios foram a crescidos de 0,12% de NaHCO<sub>3</sub>, 0,001% de estreptomicina e 0,00025% de ampicilina. Todas as células foram incubadas a 37° C e atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>. (ALBUQUERQUE, 2008).



#### **4.6.3 Procedimentos em cultura de células**

As células foram cultivadas em garrafas e mantidas em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub> e manipuladas em fluxo laminar conforme procedimentos estéreis. Antes da manipulação fez-se anti-sepsia com álcool 70GL do fluxo e de todos os materiais nele inseridos.

Quando necessário, as células foram congeladas. O meio de congelamento das células foram preparados com 10% de DMSO, 20% de soro e os demais componentes anteriormente citados. Para o congelamento, as células foram descoladas com tripsina e ressuspendidas nos meios de cultura respectivos, centrifugadas por 5 minutos a 1000 RPM, após isso, o sobrenadante será desprezado e o precipitado foi ressuspendido em meio de congelamento e distribuído em tubos criogênicos. As células foram congeladas por 1 hora a -20 °C, 24h a -70°C e definitivamente no nitrogênio líquido.

Para o descongelamento, os tubos criogênicos foram aquecidos a temperatura de 37 °C. Tão logo tenham descongeladas, foram ressuspendidas em meio de cultivo sem DMSO em tubo cônico, as células foram centrifugadas a 1000rpm por 5 minutos. O sobrenadante com o crioconservante foi desprezado e o precipitado ressuspendido em meio de cultivo.

#### **4.6.4 Citotoxicidade por Alamar blue**

Antes de realizar os ensaios de atividade antioxidante celular em NIH 3T3 e dosagem de melanina em Melan-A e B16F10 verificou-se a citotoxicidade do extrato EAM da

*Passiflora nitida* nas células para determinar concentrações do extrato não tóxicas a serem testadas nos ensaios subseqüentes.

A citotoxicidade do extrato em B16F10 foi verificada pelo método de alamar blue segundo Nakayama et al. (1997). Para avaliar a citotoxicidade do extrato de *Passiflora nitida* por este método cada uma das seguintes células: NIH 3T3, Melan-A e B16F10 foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço em placas de 96 poços.

Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações de EAM de *P. nitida*. As células normais, foram tratadas em quadruplicata para cada período de tratamento (24, 48 e 72h). As concentrações testadas em NIH3T3 e Melan-A foram 0; 6,25; 12,5; 25; 50; 75 e 100 $\mu$ g/mL e em B16F10 foram 0; 10; 25; 50; 75; 100 e 150 $\mu$ g/mL. Como controle positivo de morte, foi avaliada a citotoxicidade da Doxorubicina (0 a 25  $\mu$ g/mL).

Passado o tempo de tratamento pretendido (24, 48 e 72 horas) foram adicionados 10 $\mu$ L de resazurina (0,2%) na respectiva triplicata de tratamento. Como branco da reação foram lidos os poços com célula e extrato sem resazurina. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado para cada tipo celular (2h para melan-a e 3 h para NIH 3T3 e B16F10) foi realizada a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo, onde  $\Delta Ft =$  (fluorescência da célula + meio + extrato + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + extrato) e  $\Delta Fc =$  (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO)

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\Delta Ft \times 100}{\Delta Fc}$$

$$\Delta Fc$$

#### 4.6.5 Atividade antioxidante em células

A atividade antioxidante em células foi avaliada no fibroblasto NIH 3T3 segundo o método descrito por WOLF e LIU (2007). Foram semeadas  $6 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços. As cavidades externas da placa não foram utilizadas por aumentarem a variação dos resultados. Após 24 horas de incubação em estufa de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , o meio foi removido, os poços foram lavados com tampão fosfato e as células foram tratadas em triplicata com  $100\mu\text{L}$  de uma solução de meio contendo 10% de SFB,  $25\mu\text{mol}$  de diclorofluoresceína e diferentes concentrações do EAM (0; 3,125; 6,25; 12,5; 25 e  $50\mu\text{g/mL}$ ) ou da quercetina (0; 2,5; 5 e  $10\mu\text{g/mL}$ ). Após uma hora de tratamento o meio foi removido e as células foram novamente lavadas com tampão fosfato, o tampão foi removido e foram adicionados  $100\mu\text{L}$  de 2,2-azobis-2-metil-propanimidamida, dihidroclorico (AAPH) e iniciaram-se imediatamente leituras no leitor de microplacas com excitação  $485\text{nm}$  e emissão  $535\text{nm}$  a cada 10 minutos até 60 minutos. Os poços controle contiveram células tratadas com diclorofluoresceína e o AAPH e os poços brancos contiveram células tratadas com diclorofluoresceína sem o AAPH. De todas as concentrações de amostras foi subtraído o valor de fluorescência do branco no respectivo tempo. O potencial antioxidante foi expresso em unidades de fluorescência. A concentração inibitória mediana ( $\text{CI}_{50}$ ) foi calculada para o tempo de 60 minutos conforme a fórmula abaixo, onde  $\Delta F = \text{fluorescência aos 60 minutos} - \Delta \text{fluorescência aos 0 minutos}$ )

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\Delta F_{\text{amostra}} / \Delta F_{\text{controle}}) \times 100$$

#### **4.6.6 Efeito sobre a produção de melanina**

Determinou-se o teor de melanina usando o método descrito por Sienna (2008). Foram cultivadas  $1 \times 10^6$  células por poço em placa de 6 poços. Após 24 horas de incubação, a Melan-A foi tratada com 100  $\mu\text{mol}$  de isobutilmetilxantina (IBMX) e diferentes concentrações do EAM (6,25; 12,5 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e a B16F10 foi tratada com IBMX 100  $\mu\text{mol}$  e diferentes concentrações do extrato (10 e 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Após 48 horas de tratamento as células foram coletadas, lavadas duas vezes com PBS, lisadas com Triton-X 1%, a melanina foi precipitada com Etanol: éter (1:1) secas e dissolvidas em 200  $\mu\text{L}$  de NaOH (1N). As amostras foram aquecidas a 80 °C por 15 minutos para dissolução da melanina e depois esfriadas a temperatura ambiente para determinar a absorbância (A) a 405 nm. A concentração de melanina celular foi determinada pela fórmula gerada através da curva padrão de melanina sintética (20;10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3; 0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados do teor de fenóis totais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média. A determinação da  $\text{CI}_{50}$  dos testes antioxidantes do extrato pelo método do DPPH e da LPO, do efeito do extrato sobre a atividade da tirosinase, da citotoxicidade sobre NIH 3T3 e B16F10, efeito sobre o teor de melanina em B16F10 e sobre a atividade da tirosinase em B16F10 foi realizada pelo método de regressão linear simples, usando o programa Origin® (versão 8.0; micronal software, northampton, Massachussetts, EUA). Os valores médios foram expressos com desvio padrão. A análise de significância foi realizada utilizando Teste-T, Anova-one-way. Foram considerados significantes resultados de  $P < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Atividade antioxidante

A figura 10 representa a lipoperoxidação de uma emulsão de ácido linoléico com betacaroteno e a inibição da lipoperoxidação dessa emulsão na presença de 40 µg/mL de BHT e dos extratos EAI, EAM, EHE, EE de *P.nitida* no intervalo de tempo de 0 a 120 minutos.

A figura 11 ilustra as curvas de inibição de radicais DPPH pelo ácido gálico e pelos extratos de *P. nitida*: EAI, EAM, EHE e EE obtidas no teste de atividade varredora de radicais DPPH. Na tabela 2 estão inseridas as respectivas concentrações inibitórias medianas médias (CI<sub>50</sub>).

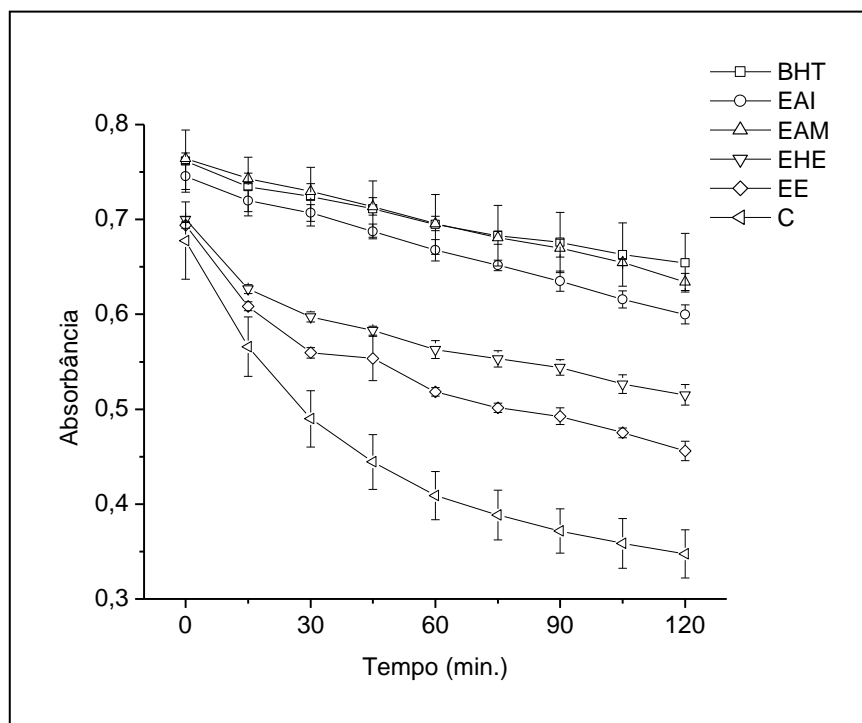


Figura 10: Cinética de oxidação da emulsão de β-caroteno na presença de BHT, EAI, EAM, EHE e EE a 40µg/mL. BHT=hidroxitolueno de butila; EAI= extrato aquoso por infusão; EAM=extrato aquoso por maceração; EHE= extrato hidroetanólico; EE=extrato etanólico (n=3).

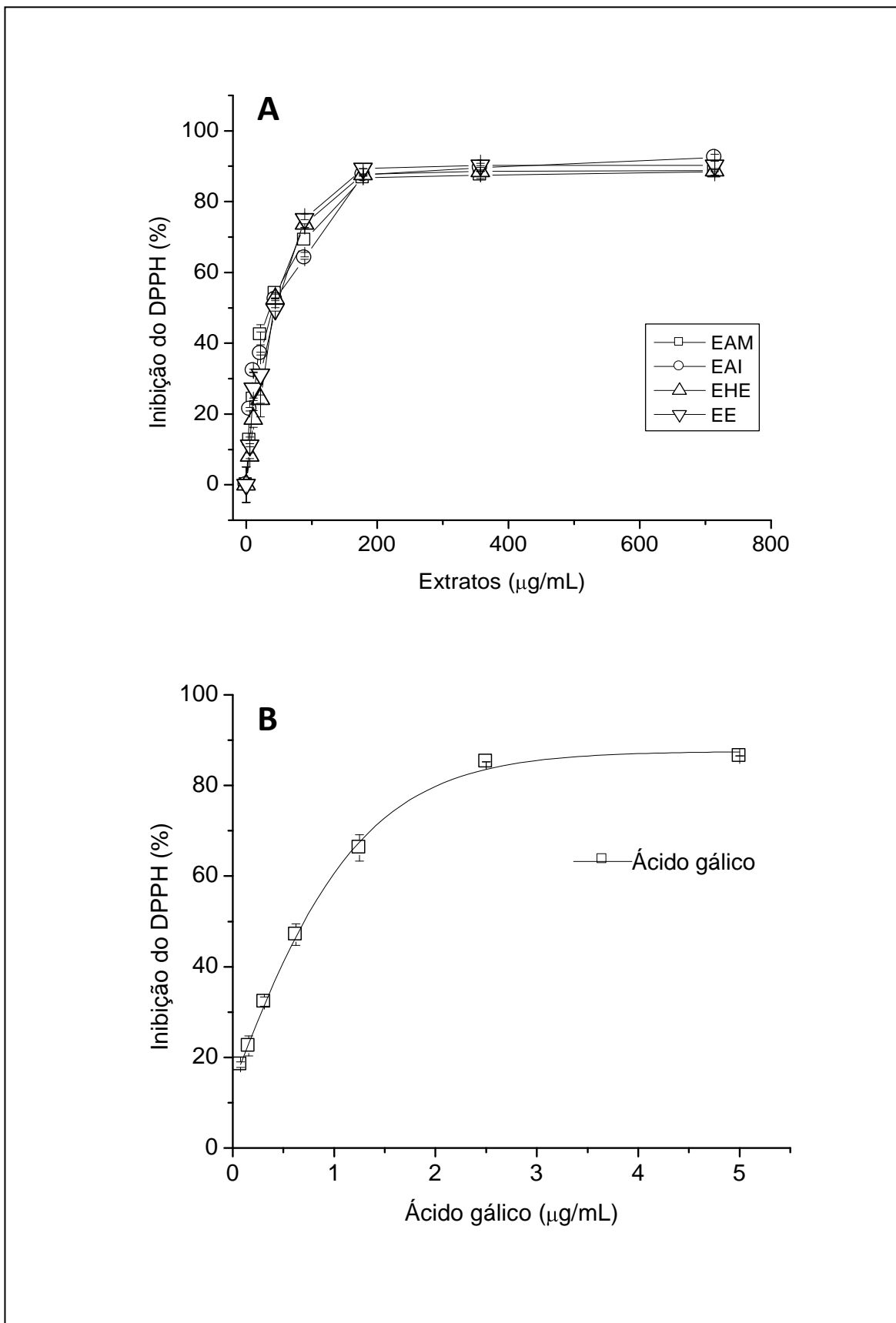


Figura 11: Curva de inibição de radicais DPPH. A. Extrato aquoso por maceração (EAM); Extrato aquoso por infusão EAI; Extrato hidroetanólico (EHE); Extrato etanólico (EE) B. ácido gálico. Todas as concentrações foram testadas em triplicata.

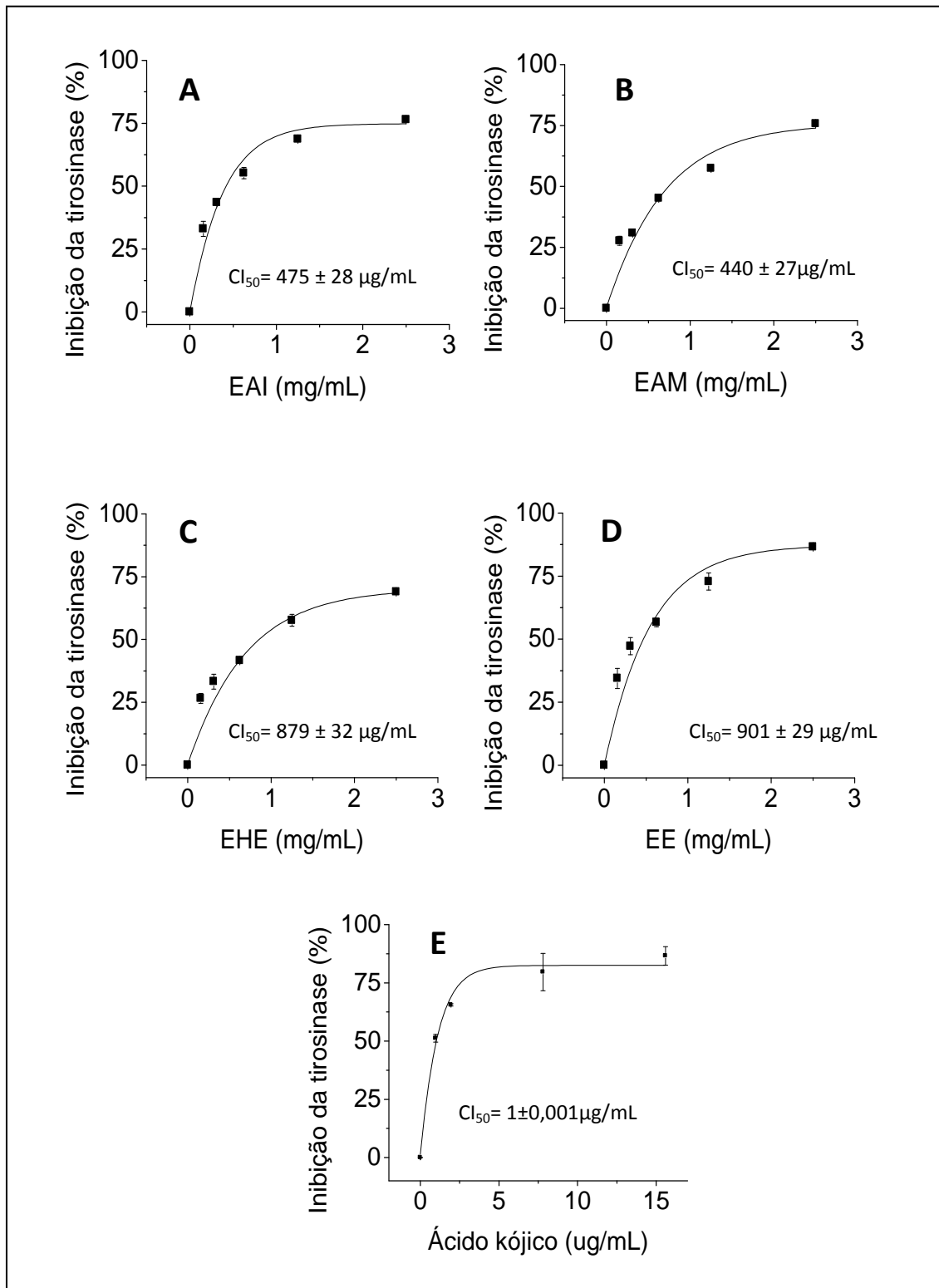
O valores de  $CI_{50}$  do DPPH e da LPO e os teores de fenóis totais dos extratos das folhas de *Passiflora nitida* avaliados neste estudo: extrato aquoso obtido por infusão (EAI), extrato aquoso obtido por maceração (EAM), extrato hidroetanólico (EHE) e extrato etanólico estão apresentados na tabela 2. Esses valores foram obtidos a partir da fórmula:  $y = 2,857x + 0,004$  gerada pela curva de calibração do ácido gálico, onde y foi substituído pela absorvância do extrato de *P. nitida* conforme descrito em materiais e métodos.

Tabela 2: Teores de fenóis totais (FT) concentrações inibitórias medianas do DPPH e inibição da lipoperoxidação após 120 minutos pelos extratos de *P. nitida*. EAI: Extrato aquoso obtido por infusão, EAM: extrato aquoso obtido por maceração, EHE: extrato hidroetanólico, EE: extrato etanólico ( $p < 0,05$ ). No teste da LPO os extratos e o BHT foram testados na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

	<b>FT (%)</b>	<b>DPPH</b>	<b>LPO</b>
		<b><math>CI_{50}</math> (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>	<b>inibição (%)</b>
<b>EAI</b>	5,10 $\pm$ 0,04	45,26 $\pm$ 0,96	56,29 $\pm$ 2,63
<b>EAM</b>	5,63 $\pm$ 0,06	38,99 $\pm$ 1,56	60,98 $\pm$ 2,07
<b>EHE</b>	3,97 $\pm$ 0,08	44,16 $\pm$ 1,69	45,04 $\pm$ 3,22
<b>EE</b>	3,35 $\pm$ 0,17	48,44 $\pm$ 0,66	23,22 $\pm$ 3,83
<b>AG</b>	-	0,80 $\pm$ 0,03	-
<b>BHT</b>	-	-	67,55 $\pm$ 1,66

## 5.2 Inibição da tirosinase

Na figura 12 estão plotadas as curvas de inibição da tirosinase pelo ácido kójico (AK) e os extratos de *P. nitida*: extrato aquoso por infusão (EAI); extrato aquoso por maceração (EAM); extrato hidroetanólico (EHE) e extrato etanólico (EE) e as respectivas concentrações que inibem 50% da atividade da difenolase ( $CI_{50}$ ) da tirosinase.

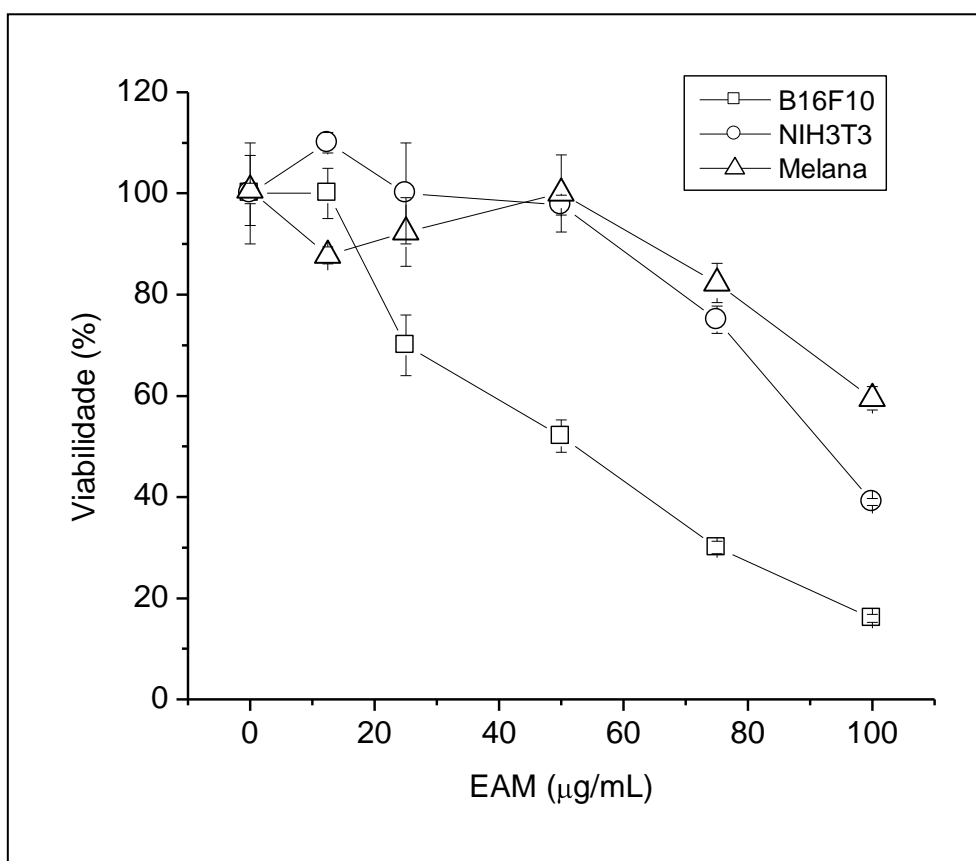


**Figura 12:** Curvas de inibição da tirosinase. **A-** Extrato aquoso obtido por infusão (EAI). **B-** Extrato aquoso obtido por maceração (EAM). **C-** Extrato hidroetanólico (EHE). **D-** Extrato etanólico (EE). **E-** Ácido kójico (AK). Todas as concentrações foram testadas em triplicata.



### 5.3 Efeito sobre a viabilidade celular

Na figura 13 estão representadas as viabilidades (%) de fibroblastos (NIH 3T3), melanócitos (Melan-a) e melanoma (B16F10) no período de 48h de tratamento que correspondem ao período de dosagem de melanina. As  $CI_{50}$  do EAM e da doxorrubicina, controle positivo de morte celular, estão apresentadas na tabela 6 para os períodos de 24, 48 e 72h. Todos os resultados estão representados como média  $\pm$  desvio padrão do ensaio realizado em triplicata.



**Figura 13: A.** Porcentagem de Viabilidade de fibroblasto murino NIH 3T3, do melanócito murino Melan-A e do melanoma murino B16F10 tratados com EAM no período de 48h. Todas as concentrações foram testadas em triplicata.

**Tabela 3:** Concentrações inibitórias 50% do crescimento de fibroblastos (NIH3T3), melanoma (B16F10) e melanócito (Melan-a) tratados com EAM e com o controle positivo doxorrubicina.

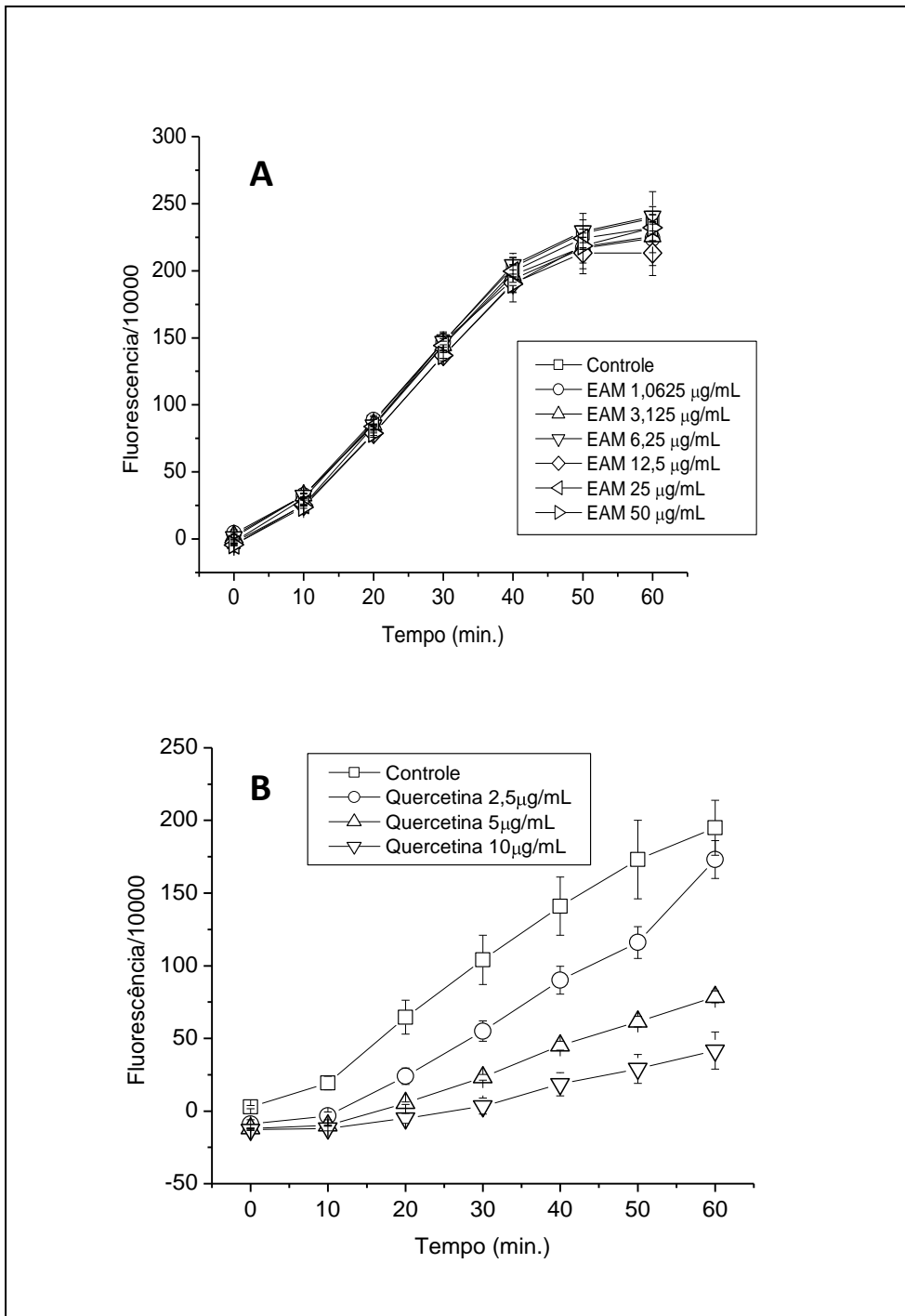
	EAM			Doxorrubicina		
	CI <sub>50</sub> média ± dp (µg/mL)			CI <sub>50</sub> média ± dp (µg/mL)		
Tempo (h)	24	48	72	24	48	72
NIH 3T3	>100	92,48 ± 2,6	73,4 ± 1,95	18,1	<0,01	<0,01
B16F10	109,67 ± 8,2	53,72 ± 3,67	42,5 ± 1,2	> 25	<0,01	<0,01
MELAN-A	>100	>100	81,7 ± 3,7	> 25	5,2 ± 0,5	<0,39

#### 5.4 Atividade antioxidante celular

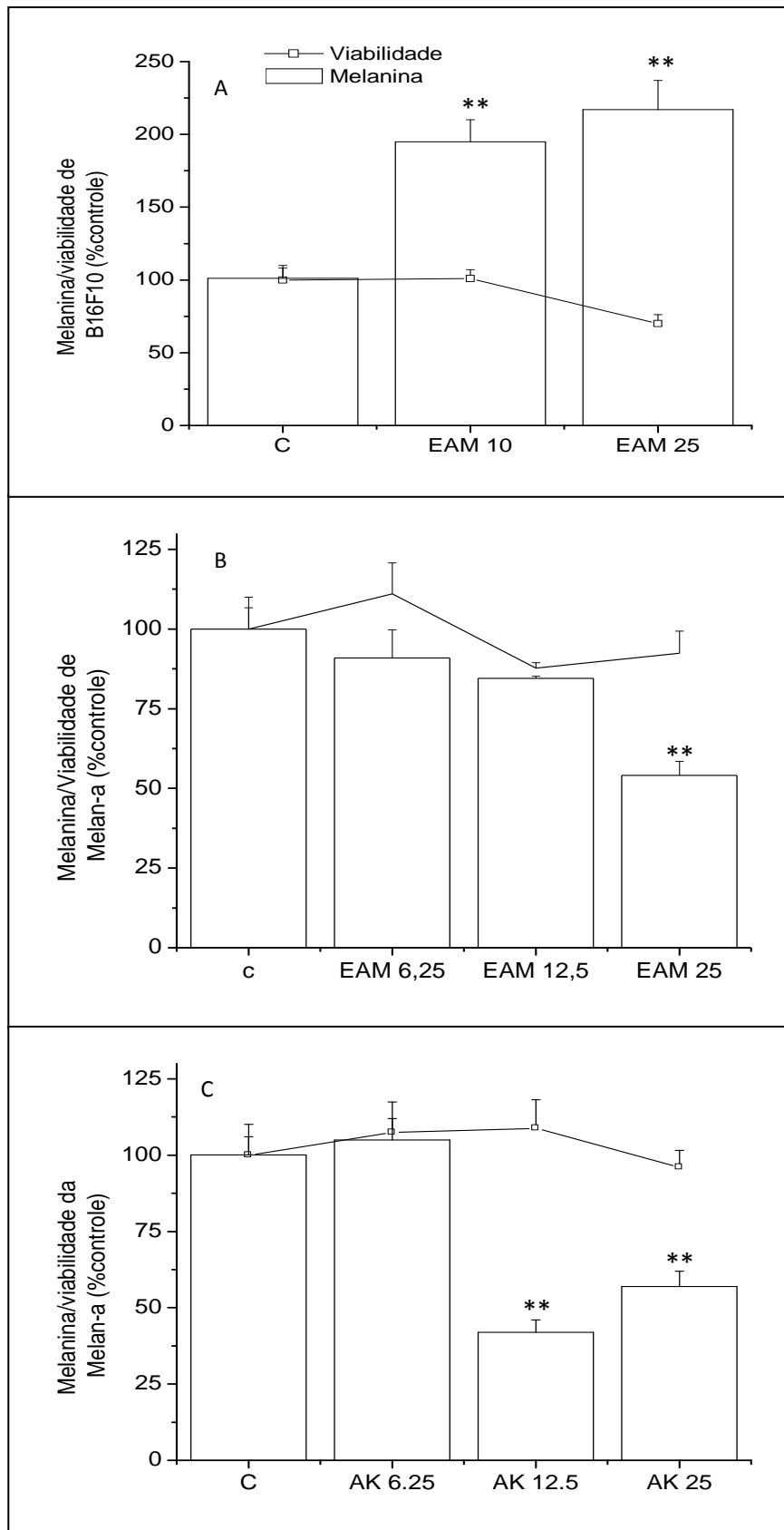
A figura 14 apresenta o crescimento da fluorescência que indica a oxidação das células NIH 3T3 tratadas com diclorofluoresceína na presença de quercetina e na presença do EAM em diferentes concentrações no ensaio de atividade antioxidante celular e estão representadas as curvas dose-resposta do teste de atividade antioxidante da quercetina e do EAM em fibroblastos murino NIH 3T3 em período de 1 hora de tratamento.

#### 5.5 Efeito sobre o teor de melanina

Para avaliar o efeito do EAM sobre o teor de melanina em B16F10 e em Melan-A, essas células foram tratadas com 100µmol/L de Isobutilmetilxantina simultaneamente com diferentes concentrações do extrato. A porcentagem de melanina produzida por essas células juntamente com as respectivas viabilidades estão apresentadas na figura 15 como porcentagem média ± desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.



**Figura 14:** Fluorescência indicativa de oxidação da diclorofluoresceína a fluoresceína no fibroblasto murino tratado com A. EAM e B. Quercetina. As fluorescências representam média  $\pm$  dp (n=3).



**Figura 15:** Teor de melanina e viabilidade celular de celular B16F10 e Melan-a tratadas com EAM e ácido kójico (AK). A. Teor de melanina e viabilidade da B16F10 tratada com diferentes concentrações de EAM. B. Teor de melanina e viabilidade de Melan-a tratada com diferentes concentrações de EAM. C. Teor de melanina de Melan-a tratada com diferentes concentrações de ácido kójico. Usou-se isobutilmetilxantina (IBMX) para estimular as células a produzirem melanina. (\*\*- $p < 0,001$ ;  $n=3$ ).

## 6. DISCUSSÃO

Este trabalho realizou estudo da atividade antioxidante e do efeito sobre a melanogênese de extratos das folhas de *Passiflora nitida*. Dentre os resultados encontrados, destacam-se a inibição da tirosinase *in vitro* e o efeito do EAM sobre a produção de melanina em melanócitos (melan-a) e melanomas (B16F10).

Apesar do interesse da indústria cosmética em espécies do gênero *Passiflora*, somente a atividade despigmentante da *P. foetida* já foi estudada em Kalimantan, na Indonésia. Sendo assim, esse é um estudo inédito para a espécie *P. nitida*.

Com o intuito de selecionar o extrato mais ativo para os testes celulares, inicialmente o extrato aquoso por maceração (EAM), extrato aquoso por infusão (EAI), extrato hidroetanólico (EHE) e extrato etanólico (EE) das folhas de *P. nitida*, foram avaliados quanto ao teor de fenóis totais, à atividade antioxidante e à inibição da tirosinase.

Para conhecer o teor de fenóis totais dos extratos foi realizado o método de Folin Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965) com leves modificações. Conforme a tabela 5, os extratos aquosos foram os que apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos, sendo que o EAM apresentou o maior teor de FT e o EE foi o que apresentou menor teor de compostos fenólicos

É sabido que as plantas do gênero *Passiflora* são ricas em fenóis totais, no entanto, é natural que esse teor difira entre as espécies do mesmo gênero ou mesmo entre amostras da mesma espécie (CARVALHO et al. 2010). Os valores de fenóis totais encontrados nos

extratos avaliados neste estudo foram inferiores aos relatados para outras espécies do gênero como a *Passiflora alata* e a *P. edulis*, cujos teores foram de  $17,6 \pm 0,016$  % e 9,25% respectivamente (RUDNICKI et al., 2007). Por outro lado, esses teores foram superiores ao encontrado em um extrato metanólico das folhas de *P. nitida* que foi de 0,13% de fenóis totais (BENDINI et al, 2006).

O método extrativo é um importante fator a ser considerando quando se deseja obter uma classe de compostos ativos. Semelhantemente, em um estudo realizado com brotos de feijão foram realizadas extrações por maceração em água, infusão, maceração em etanol e maceração em metanol e dentre esses sistemas extrativos o que apresentou maior teor de fenóis totais foi o extrato obtido por maceração em água em temperatura ambiente (LIMA et al., 2004).

Duas variáveis do processo extrativo podem justificar a diferença no teor de fenóis totais achada para os diferentes extratos provenientes da mesma matéria prima vegetal. Segundo Spigno e De Faveri (2007), a exposição a temperaturas superiores a 60°C inicia a degradação de compostos fenólicos, isso justifica o fato do EAM ter apresentado maior teor de FT do que o EAI, cuja solução extrativa foi exposta a temperatura de 100°C por 10 minutos. Por outro lado, ao que tudo indica, os compostos fenólicos majoritários da planta em estudo eram de alta polaridade sendo mais extraídos pela água do que pelo etanol

No que tange à atividade antioxidante, há diversas metodologias *in vitro* disponíveis para avaliar esse efeito. Neste estudo essa atividade foi avaliada pelos métodos de varredura de radicais DPPH e a pela inibição da lipoperoxidação no sistema ácido linoléico/beta caroteno. O teste de inibição da tirosinase também aborda um efeito antioxidante e foi realizado uma vez que esta é a principal enzima limitante da melanogênese.

No ensaio do DPPH a atividade observada se refere ao efeito varredor do radical por substâncias redutoras presentes no extrato (MOLYNEUX, 2004). Já no ensaio de lipoperoxidação do  $\beta$ -caroteno emulsionado em ácido linoléico, a absorvância diminui à medida que  $\beta$ -caroteno é oxidado e pode-se conhecer em parte o comportamento do antioxidante dos extratos. O resultado pode ser expresso em porcentagem e em cinética de reação, esta pode ser vista em duas etapas, a primeira etapa compreende o período de 15 a 45 minutos e reflete a eficiência do ativo em bloquear reação em cadeia através da interação com os radicais peróxidos. A possibilidade do antioxidante participar de outras reações durante o processo oxidativo é conhecida na segunda parte da curva, entre 70 e 90 minutos (ALMEIDA et al., 2005).

A figura 10 demonstra a cinética de oxidação da emulsão na presença do BHT e dos extratos, todos a 40  $\mu\text{g/mL}$ . É possível verificar que o EAM demonstrou atividade antioxidante muito próxima do BHT, no entanto, este apresentou atividade levemente mais estável tanto na primeira quanto na segunda fase da reação. Os resultados da avaliação espectrofotométrica de proteção do  $\beta$ -caroteno emulsionado em ácido linoléico apresentados na tabela 2, indicam que a ordem de atividade antioxidante por este método foi BHT > EAM > EAI > EHE > EE. O EAM e o EAI apresentaram cinéticas de oxidação muito próximas a do padrão BHT, com inibições de lipoperoxidação aos 120 minutos de  $60,9 \pm 2\%$ ,  $56,3 \pm 2,6$  e  $67,6 \pm 1,6\%$  respectivamente. Sendo que EHE e o EE foram respectivamente 1,3 e 2,6 vezes menos potentes que o EAM.

A inibição da lipoperoxidação se deve em parte aos compostos fenólicos. As hidroxilas ácidas desses compostos lhe conferem propriedade redox, que os possibilitam a agirem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e captarem oxigênio singlete. Logo,

era de se esperar que os extratos EAM de *P. nitida* apresentassem maior atividade antioxidante que os extratos EHE e EE (JAVANMARDI et al., 2003).

As curvas para a atividade varredora de radicais DPPH dos extratos (figura 12) demonstraram que o ácido gálico e todos os extratos apresentaram efeitos concentração-dependente. As razões entre  $CI_{50}$  do extrato e  $CI_{50}$  do ácido gálico foram EAI=56,56; EAM=48,6; EHE= 55 e EE= 60 demonstrando que de terem efeito varredor de radicais, os extratos são muitas vezes menos antioxidantes que o ácido gálico.

A atividade antioxidante é importante em inibidores de melanogênese, pois impede a oxidação de substâncias imprescindíveis para a formação de melanina. Nessa via sintética, a dihidroxifenilalanina (DOPA) é convertida a dopacroma pela ação da enzima tirosinase ou por auto-oxidação e reações subsequentes de oxidação do di-idroxi-indol e do ácido carboxílico dihidroxiindólico terão como produto final o polímero melanina. Assim, a inibição da melanogênese pode ser alcançada por substâncias antioxidantes ou por inibidores da tirosinase (HEO et al., 2010).

A tirosinase é a principal enzima reguladora da melanogênese, pois catalisa as reações limitantes da cascata (SCHALHEUTER, 2010). A capacidade de inibição da enzima é um pré-requisito para formulações que visam o clareamento de pele (PARK et al., 2009). Um dos métodos mais rotineiros para conhecer se um extrato de planta tem potencial de inibir a enzima é colocar a enzima na presença do possível inibidor e depois adicionar o substrato, dihidroxifenilalanina (DOPA), para finalmente observar a intensidade de formação do produto, a dopacroma de cor alaranjada. Apesar da interferência da atividade antioxidante do inibidor analisado, esse ainda é um dos métodos mais diretos de se pesquisar um inibidor da tirosinase (CHANG, 2009).



Com base na estrutura química e no possível mecanismo de ação, as substâncias o-difenólicas representam-se como a maior classe de inibidores da tirosinase. Uma vez que a maioria deles é aceito como substrato da enzima, sua ligação depende apenas da presença, da afinidade e da posição de ligação outro substituinte. As principais classes polifenóis potencialmente inibidoras da tirosinase são: flavonóides, cumarinas e estilbenos. Sendo que destes os flavonóides são reportados como a principal classe de substâncias presentes na família *Passifloraceae* e sendo a *P. nitida* rica em flavonóides e cumarinas (CARVALHO et al., 2010; CHANG, 2009).

Realizado esse ensaio com os extratos das folhas de *P. nitida* observou-se que os efeitos do ácido kójico e dos extratos sobre a enzima foram concentração dependente. Nenhum extrato apresentou inibição enzimática superior a do ácido kójico ( $CI_{50}=1\mu\text{g/mL}$ ). Neste ensaio, mais uma vez o EAM apresentou maior atividade que os demais com  $CI_{50}= 440 \pm 27\mu\text{g/mL}$ , sendo esta atividade muito próxima a do EAI ( $CI_{50}= 475 \pm 28\mu\text{g/mL}$ ). Os extratos EHE e EE foram aproximadamente 2 vezes menos potentes que o EAM para este ensaio.

Semelhantemente ao observado no ensaio de inibição da lipoperoxidação, os extratos aquosos que apresentaram maiores teores de fenóis totais também apresentaram maior inibição da tirosinase, corroborando a afirmação de que essa atividade está relacionada à presença desses compostos nos extratos dessa planta. Outro estudo demonstrou que o extrato das folhas de *Etlíngera elatior* com maior teor de fenóis totais (2,1%) também apresentou maior inibição da tirosinase ( $55.2 \pm 3.1\%$ ) na concentração de  $500\mu\text{g/mL}$ .

Comparando a inibição da tirosinase causada pelos extratos de folhas de *Passiflora nitida* nos extratos EAI, EAM, EHE e EE com de outras plantas reportadas na literatura, pode-se perceber um grande potencial desta planta para esta atividade. (CHAN et al, 2008).

Em um estudo realizado com extratos de folhas das ilhas do Kalimantan central, foram avaliados os efeitos de extratos de folhas, raízes, frutos e cascas de 14 plantas sobre a tirosinase. Os extratos de folhas de *Centella asiática*, *Phyllanthus urinaria*, *Archidendron microcarpum* e *Passiflora foetida* a 500µg/mL inibiram a oxidação da L-DOPA pela tirosinase em 3,5; 3,4; 2,7 e 2,5% respectivamente, ou seja, os extratos das folhas não foram capazes de inibir a enzima de forma significativa (ARUNG et al., 2009).

Por outro lado, em um estudo realizado com extratos de folhas de *Etilingera* sp. a 500 µg/mL que foram considerados fortes inibidores da enzima, demonstraram atividade semelhante à inibição da tirosinase pelos extratos aquosos de *P. nitida* EAI e EAM. Nessa concentração as inibições da tirosinase pelos extratos das folhas das espécies *E. elatior*, *E. fulgens* e *E. maingayi* foram respectivamente 55,2±3,1; 49,3±6,5 e 42,6±4,2%. Extratos de outras espécies testados no estudo em questão apresentaram menor atividade e inferior à inibição da tirosinase pelos extratos EE e EHE de *P. nitida*. Assim, pode-se dizer que as folhas desta planta têm alto potencial em relação a outras espécies analisadas em estudos prévios (CHAN et al., 2008).

O teste de inibição da tirosinase de cogumelo é simples, porém apresenta algumas desvantagens, pois isoladamente não é capaz de representar o comportamento de extratos em meio biológico, portanto, se faz necessário testar o ativo em modelos celulares. Neste sentido, diversos estudos demonstraram que muitos extratos de plantas exibiram atividade inibidora da tirosinase *in vitro*, mas não reduziram o teor de melanina em células (ZHONG et al, 2006). Dentre os modelos escolhidos os mais frequentes são células B16F10 (melanoma murino) e Melan-A (melanócito murino), pois são ricas em melanina, por isso, neste estudo foi avaliado o efeito despigmentante do EAM de *P. nitida* baseado em cultura de células.

Tendo em vista que o EAM apresentou maior teor de fenóis totais, maior atividade antioxidante pelo método do DPPH, maior inibição da lipoperoxidação e inibição da tirosinase, este foi escolhido para continuar os estudos em célula visando conhecer o efeito antioxidante do extrato em um modelo de célula normal, o fibroblasto murino NIH 3T3, mas principalmente conhecer a influencia desse extrato sobre o teor de melanina em melanócitos (Melan-A) e melanomas(B16F10). Porém, antes que esses ensaios pudessem ser realizados, se fez necessário conhecer as concentrações seguras em que o esses experimentos poderiam ser conduzidos e isso se fez através do ensaio de citotoxicidade, pelo método de alamar blue.

A viabilidade celular dos diferentes tipos celulares abordados no estudo foi avaliada pelo método de redução da resazurina ou também conhecido como Alamar Blue. Trata-se de um dos ensaios mais práticos de citotoxicidade pelo qual e possível mensurar a viabilidade celular através da redução da resazurina inicialmente azul pelas células viáveis, tornando-a rosa e mais fluorescente (NAKAYAMA et al., 1997).

Em se tratando de citotoxicidade, pode-se dizer que nos diferentes tipos celulares o EAM se comportou tempo-dependente e no período máximo de exposição (72h) ele também apresentou comportamento concentração-dependente. Realizado o ensaio de citotoxicidade em NIH 3T3, as concentrações escolhidas para o ensaio de atividade antioxidante em nesta célula foram de 0; 1,0625; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50, pois essas concentrações não afetaram a viabilidade celular até o período crônico de exposição da célula ao extrato, ou seja, em 72h de tratamento. Avaliando o efeito do EAM sobre a viabilidade da Melan-a, verificou-se que no período de 48 horas de tratamento a viabilidade celular permaneceu alta nas concentrações até 75µg/mL ( $82,27 \pm 3,89\%$ ), mas após 72 horas de tratamento a viabilidade celular foi de  $69,99 \pm 2,18$  na concentração de 25µg/mL. Em B16F10 tratada com EAM por 48 horas a

viabilidade foi significativamente diferente do controle na concentração de 50µg/mL do extrato com viabilidade média de  $52,53 \pm 3,2\%$ , quando tratada por 72 horas nas concentrações de 25 µg/mL a viabilidade foi de  $65,18 \pm 3,2\%$ . Considerando que a dosagem de melanina celular se daria no período de tratamento de 48h, as concentrações escolhidas para este teste tanto em Melan-A quanto em B16F10 foram de 25µg/mL para baixo uma vez que apresentam viabilidade alta no período de 48h e não foram capazes de matar mais de 50% das células até o período de 72h de incubação.

O ensaio de atividade antioxidante celular (AAC) foi realizado com diclorofluoresceína e AAPH. Ao entrar na célula, o AAPH libera radicais peróxil que ao serem incorporados pela diclorofluoresceína, aumentam sua fluorescência. Extratos antioxidantes são capazes de captar o radical, impedindo o aumento da fluorescência (WOLF e LIU, 2007).

Apesar do EAM ter apresentado atividade antioxidante sendo capaz de seqüestrar radicais livres avaliada pelo método do DPPH e inibir a lipoperoxidação do sistema com ácido linoléico, em concentrações não tóxicas o extrato não foi capaz de captar radicais de maneira significativa no fibroblasto NIH 3T3.

A discrepância entre esses resultados pode ser explicada quando se considera que ensaios como DPPH e inibição da lipoperoxidação não refletem o meio biológico onde estão envolvidos outros fatores como o pH intracelular, a temperatura, enzimas envolvidas e seus produtos. Por isso, testar a atividade antioxidante celular é tão importante pra expressar sua atividade de maneira mais próxima do efeito *in vivo*.

A atividade antioxidante da quercetina em NIH 3T3 encontrada no presente estudo ( $CI_{50} = 4,76 \pm 0,25 \mu\text{mol}$ ) foi semelhante a relatada por WOLF e LIU (2007) onde essa substância foi testada em hepatócitos HepG2 ( $IC_{50} = 5,9 \pm 0,07 \mu\text{mol}$ ) demonstrando atividade semelhante em células diferentes.

Os resultados obtidos para a AAC do EAM e dos extratos também testados por WOLFE e LIU foram bastante diferentes e um fator determinante para isso foi a diferença de citotoxicidade. Enquanto o EAM apresenta 100% de viabilidade de NIH 3T3 até  $50 \mu\text{g/mL}$  em 24 horas de tratamento, os extratos de frutas (maçã, uva verde, uva vermelha) apresentam cerca de 90% de viabilidade em concentrações superiores a  $100 \text{mg/mL}$ . A citotoxicidade do EAM foi, portanto, o primeiro fator responsável por essa diferença uma vez que impossibilitou a análise da atividade do EAM em concentrações mais elevadas. Dessa forma, enquanto a atividade antioxidante mediana média dos extratos das frutas foram:  $10,81 \pm 0,44 \text{mg/mL}$  (mirtilo);  $36,17 \pm 1,20 \text{mg/mL}$  (arando);  $38,60 \pm 3,26$  (maçã);  $42,33 \pm 2,22$  (uva vermelha) e  $53,01 \pm 3,12$  (uva verde), o EAM não apresentou atividade antioxidante nas concentrações possíveis de serem testadas (0 a  $50 \mu\text{g/mL}$ ).

No que tange à produção de melanina, a figura 16 mostra que o efeito do EAM foi diferente nos dois tipos celulares avaliados. Enquanto em Melan-A houve significativa diminuição do teor do biopolímero, no melanoma murino B16F10 o EAM induziu aumento do teor de melanina de maneira concentração-dependente.

As respostas para a diferença de efeito do extrato entre as duas células pode ser atribuída as características próprias destes modelos estudados. Enquanto a Melan-A tem comportamento semelhante ao de melanócito *in vivo*, tendo melanogênese sensível a substâncias antioxidantes e inibidoras da tirosinase, a B16F10 representa uma célula de

melanoma, onde o estresse oxidativo induz o MITF a inibir a expressão de tirosinase, contudo melanina de menor peso molecular permanece sendo produzida por outras proteínas do retículo endoplasmático mesmo na ausência da tirosinase (SARANGARAJAN e APTE, 2006).

Crítérios de eficácia e segurança para pesquisa de clareadores de pele em culturas Melan-A foram estabelecidos por Curto et al (1999). Segundo eles, o produto deve apresentar diminuição de 50% do teor de melanina em concentrações menores que 100µg/mL aliado a baixa citotoxicidade, ou seja, com viabilidade superior a 75% nessa concentração. Além disso, não houve diferença estatística do teor de melanina em melan-a tratada com 25µg/mL de EAM e de Acido kójico na mesma concentração. Dessa forma, quanto à eficácia, o EAM de *P. nitida* deve ser considerado um potencial despigmentante, pois na concentração de 25µg/mL diminuiu significativamente o teor de melanina (54±4%) com alta viabilidade (92±6%) no período testado (48h). Concernente à segurança, o extrato deve ser considerado seguro desde que o tratamento não seja crônico, pois quando tratado na mesma concentração no período de 72h a viabilidade celular nesta concentração cai para 68 ± 2,18%, com 50% da viabilidade em 81,7±0,37µg/mL.

Em melanoma murino B16F10, o EAM induziu aumento do teor de melanina em relação ao controle nas concentrações de 10 e 25µg/mL com porcentagens respectivas de 180 e 200% em relação ao controle. Apesar de o extrato não ter apresentado efeito despigmentante no melanoma, essa diferença é interessante, uma vez que o extrato foi 2 vezes mais citotóxico. Logo, o mesmo poderá ser futuramente avaliado para tratamento também de melanomas.

Há muitos artigos publicados relatando pesquisa de extratos potenciais para a inibição da melanogênese que avaliam apenas a atividade antioxidante e a inibição da tirosinase, os estudos mais completos, em que a atividade despigmentante foi expressiva também costumam apresentar atividade da tirosinase celular, a expressão dessa enzima e de outros fatores que regulam a síntese do biopolímero, tais como MITF e AMPc, PRT1 e 2, por exemplo.

Neste estudo pretendia-se também avaliar o efeito na tirosinase celular, tanto em Melan-a quanto em B16F10. No entanto, como este trabalho foi o pioneiro desta linha de pesquisa no Amazonas, todas as metodologias realizadas em célula foram implementadas neste estudo, o que levou bastante tempo, pois as metodologias envolvem muitas etapas que precisaram ser muito bem ajustadas. Exemplo disso foi a padronização do método de citotoxicidade pelo Alamar blue para cada tipo celular. Este método é um dos mais simples de se avaliar a viabilidade das células, todavia, depende do metabolismo celular. Sendo assim, foi necessário investigar a melhor concentração de células e de reagente, bem como o tempo que melhor representasse a porcentagem de células viáveis. Para isso cada uma das células foi semeada nas concentrações de (0; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10; 20 e  $40 \times 10^4$ ) em quadruplicata para análise após 24, 48 e 72h de semeadura sem tratamentos. Completado o tempo de semeadura, foram adicionados 10 $\mu$ L de Alamar blue (0,02%) e para conhecer o tempo que melhor representasse a proporção de células viáveis pela metabolização da resazurina, foram realizadas leituras a cada 1 hora até a fluorescência ser diretamente proporcional a quantidade de células viáveis. Através disso, conheceu-se que o melhor tempo de metabolização da resazurina pela NIH 3T3 e pela B16F10 foi de 3 horas e 2 horas para melan-a.

Um pouco mais delicado foi padronizar o método de atividade antioxidante celular. Esse método, apesar de ser o mais rápido, envolve muita manipulação da amostra o que pode

refletir no desvio padrão das leituras finais de fluorescência. A padronização foi realizada com uma curva de quercetina e foi rápida. No entanto, no momento do ensaio onde vários extratos e não somente o EAM da *P. nitida* foram testados foi exigida muita destreza para fazer todas as lavagens sem interferir na leitura final das amostras. Mesmo assim, com muita paciência foi possível realizar o experimento de maneira satisfatória conforme descreve a literatura.

Mais trabalhoso foi definir a metodologia de dosagem de melanina celular, pois além de envolver muitas etapas, a diferença de absorbância da melanina para diferentes concentrações de célula é muito tenra, exigindo muita destreza em todas as etapas do processamento da amostra. Varias foram as tentativas de melhorar as leituras, para isso, soluções de melanina foram lidas em espectrofotômetro de varredura e em HPLC visando conhecer o melhor comprimento de onda para detecção do biopolímero e tentou-se também dosar a melanina celular pelo HPLC, no entanto, como o processo de extração é demorado e a padronização da metodologia por HPLC também e a melanina parece degradar após algumas horas em solução, não houve tempo hábil para padronizar a dosagem por esse método. Então, pelas absorbâncias, definiu-se que a melanina deveria ser analisada em 405nm e foi realizada em microplacas de fundo redondo com o volume mínimo de 200 $\mu$ L para não diluir tanto a amostra.

Também tentou-se padronizar o método da atividade da tirosinase celular. Esse método apesar de parecer menos trabalhoso pelas metodologias descritas pela literatura, revelou resultados confusos sem apresentar atividade da enzima em células controle, logo, não foi possível padronizar essa metodologia em tempo hábil de incluir seus resultados neste trabalho.



Todo esse processo de padronização demandou muitos meses de trabalho até chegarmos aos resultados expressos nesta dissertação. Apesar de não ter sido possível realizar a análise da tirosinase *in situ*, este trabalho implementou essas três metodologias: citotoxicidade celular por alamar blue, atividade antioxidante celular e dosagem de melanina em melanomas e melanócitos cujos protocolos estão disponíveis para o grupo nos laboratórios de atividade biológica 1 e 2 da faculdade de ciências farmacêuticas sob a responsabilidade dos mentores deste projeto: Prof. Dr. Emerson Silva Lima e Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos.

Mesmo assim os resultados deste estudo abrem novas perspectivas de pesquisa indicando que o EAM, poderá continuar sendo estudado tanto em relação as suas propriedades cosméticas quanto em relação a sua citotoxicidade seletiva. Em relação ao aspecto fitoquímico, mais estudos se fazem necessários para conhecer quais as substancias ativas desses extratos, bem como se essas substancias atuam isoladamente ou há sinergismo que potencializam sua ação.

## CONCLUSÕES

- Dentre os quatro extratos de *P. nitida* avaliados (EAI, EAM, EHE e EE), o EAM apresentou melhor desempenho nos testes preliminares: dosagem de fenóis totais e atividade antioxidante pelo método do DPPH.
- O EAM também apresentou melhor inibição da tirosinase que os extratos EAI, EHE e EE com  $CI_{50}$  respectivas de  $440 \pm 27$ ;  $475 \pm 28$ ;  $879 \pm 32$  e  $901 \pm 29$   $\mu\text{g/mL}$ .
- Em fibroblastos do tipo NIH 3T3 o EAM, não apresentou atividade antioxidante.
- O EAM mostrou-se mais citotóxico para célula neoplásica, melanoma murino B16F10 do que para as células normais NIH 3T3 e melan-a.
- Na concentração de 25  $\mu\text{g/mL}$  o EAM foi capaz de diminuir o teor de melanina em melanócitos do tipo Melan-A em 54%, mas induziu aumento do polímero em melanoma murino B16F10.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAR, Nita; YOUNG, Antony R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? *Mutation Research* . v.571, p. 121–132, 2005.

ALMEIDA, Joaquim Maurício DUARTE; SANTOS, Ricardo José dos SANTOS; GENOVESE, Maria Inês; LAJOLO, Franco Maria. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais livres DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

ARUNG, Enos Tangke; KUSUMA, Irawan Wijaya; CHRISTY, Eva Oktoberiani; SHIMIZU, Kuniyoshi; KONDO, Ryuichiro. Evaluation of medicinal plants from Central Kalimantan for antimelanogenesis. *Journal of natural medicine*. v. 63, p. 473-480, 2009.

BAUMANN, Leslie. Distúrbios da pigmentação. In: \_\_\_\_\_. *Dermatologia cosmética-Princípios e prática*. 1. ed. Tijuca. Ed. Livraria e editora Revinter Ltda, 2004.

BENDINI, Alessandra; CERRETANI, Lorenzo; PIZZOLANTE, Luca; TOSCHI, Tullia Gallina Toschi; GUZZO, Flavia; CEOLDO, Stefania; MARCONI, Andrea Maria; ANDREETTA, Filippo; LEVI, Marisa. Phenol content related to antioxidant and antimicrobial activities of *Passiflora spp.* Extracts. *European Food Res Technology*, v. 223, p. 102–109, 2006.

BERNACCI, Luis Carlos. Notas sobre *Passiflora inschnoclada* Armas (*Pacifloraceae*). *Acta botânica brasileira*, v. 15, n. 2, p. 197-199, 2001.

BEYLOT, C. What's new in aesthetic dermatology: leers and lasers treatments Quoi de neuf en dermatologie esthétique: comblement et lasers. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 136, S152-S159, 2009.

CARVALHO, Maria José.; PEDROSA, Tatiane N.; SIMPLICIO, F.G.; NUNEZ, C.V.; OHANA, D.T.; PEREIRA, M.M.; LIMA, E.S. Estudo farmacognóstico e atividade *in vitro* sobre a coagulação sanguínea e agregação plaquetária das folhas de *Passiflora nitida* Kunth (*Passifloraceae*). *Acta Amazônica*, v. 40, p. 199-206, 2010.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, L.F.; LIANTO, F.S.; WONG, S.K.; LIM, K.K.; JOE, C.E. ; LIM, T.Y. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*. v. 109, p. 477–483, 2008.

CHAN, E.W.C.; WONG, L.F.; LIANTO, F.S.; WONG, S.K.; LIM, K.K.; JOE, C.E.; LIM, T.Y. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*, v.109, p. 477–483, 2008.

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

COHEN, K.O.; PAES, N.S.; COSTA, A.M.; TUPINAMBÁ, D.D.; SOUZA, H.N.; CAMPOS, A.V.S.; SANTOS, A.L.B.; SILVA, K.N.; FALEIRO, F.G.; FARIA, D.A. Passiflora nítida: características físico-químicas e compostos funcionais. Simpósio internacional de Savanas tropicais, 2008. [www.cpac.embrapa.br/download/631/t](http://www.cpac.embrapa.br/download/631/t). acesso em 24 de novembro de 2009.

COSTIN, Gertrude-E; HEARING, Vicente J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*. v. 21, p. 976- 994, 2007.

CUI, R.; WIDLUND H. R.; FEIGE, E.; LIN, J. Y.; WILENSKY D. L.; IGRAS, V. E.; D\_Orazio, J.; FUNG, C. Y.; SCHANBACHER, C. F.; GRANTER, S. R. and FISHER, D. E. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell*. v.128, p 853–64, 2007.

Curto E. V., Kwong C., Hermersdorfer H., Glatt H., Santis C., Virador V., Hearing V. J., Jr., Dooley T. P. Inhibition of mammalian melanocyte tyrosinase: in vitro comparisons of alkyl *Biochemistry and Pharmacology*, v. 57, p. 663—672, 1999.

DHAWAN, Kamaldeep; DHAWAN, Sanju; SHARMA, Anupam. Passiflora a review update. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, p. 1–23, 2004.

FENOLL, L.G.; PEÑALVER, M.J.; LOPEZ, J.N. Rodriguez; CAVONAS, R. Varón b, F. Garcia; TUDELA, J. Tyrosinase kinetics: discrimination between two models to explain the oxidation mechanism of monophenol and diphenol substrates. The *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 235–246, 2004.

FENOLL, Lorena G.; LOPEZ, José Neptuno Rodriguez; SEVILLA, Francisco Garc|. Analysis and interpretation of the action mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable o-quinones. *Biochimica et Biophysica Acta* , v. 22, n. 1 p. 1548, 2001.

GARCÍA, C.GARCÍA. Lesiones de La pigmentación cutánea. *Medicine*. v. 48; p. 3195-3203, 2010.

GAUTHIER, Yvon. Mélasma : prise en charge globale, Melasma: clinical and therapeutic management. *Dermatologie Cosmétologie*. v.1, p. 113–122, 2004.

GRIMES, Pearl E. Management of hiperpigmentation in darker racial groups. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, v. 28, p. 77-85, 2009.

GUERRA, Miguel Pedro; NODARI, Rubens Onofre. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora UFRGS. 1999.

HEO, Soo-Jin; KO, Seok-Chun; KANG, Sung-Myung; CHA, Seon-Heui; LEE, Seung-Hong; KANG, Do-Hyung Kang; JUNG, Won-Kyo; AFFAN, Abu; OHA, Chulhong; JEON, You-Jin. Inhibitory effect of diphloretohydroxycarmalol on melanogenesis and its protective effect against UV-B radiation-induced cell damage. *Food and Chemical Toxicology*. v. 48, n. 5, p. 1355-1361, 2010.

HERRLING, Thomas; JUNG, Katinka Jung; FUCHS, Jurgen. The role of melanin as protector against free radicals in skin and its role as free radical indicator in hair Spectrochimica *Acta Part*, v. 69, p. 1429–1435, 2008.

HOPKINS, Michael J.G.; SOUZA, Maria Anália D. Passifloraceae. In : RIBEIRO, José Eduardo L. da S.; HOPKINS, Michael J.G.; VICENTINI, Alberto; SOTHERS, Cynthia A.; COSTA, Maria Auxiliadora da S.; BRITO, Joneide M.; SOUZA, Maria Anália D.; MARTINS, Lucia Helena P.; LOHMAN, Lucia G.; ASSUNÇÃO, Paulo Apostolo C.L.; PEREIRA, Everaldo da C.; SILVA, Cosmo Fernandes; MESQUITA, Mariana R.; PROCÓPIO, Lilian C. *Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazonia Central*. Manaus: INPA, 1999.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemistry of Mixed Melanogenesis — Pivotal Roles of Dopakinone. *Photochemistry and Photobiology*, v.84, p. 582–592, 2008.

JAVANMARDIA, J.; STRUSHNOFFB, C.; LOCKEB, E.; VIVANCOB, J.M. Antioxidant activity and total phenolic content of Iranian Ocimum accessions. *Food Chemistry*. v.83, p. 547-550, 2003.

JUNQUEIRA, K.P.; FALEIRO, F.G.; RAMOS, J.D.; BELLON,G.;JUNQUEIRA, N.T.V.; BRAGA,M.K. Variabilidade genética de maracujá-suspiro com base em marcadores moleculares. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 29, n. 3, p. 571-575, 2007.

KANG, H. Young; ORTONNI, J.P. Melasma Update. *Actas Dermosifiliography*, v.100:Supl. 2, p. 10100—03, 2009.

KIM, J.-K.; NOH, J.H.; LEE, S.; CHOI, J.S.; SUH, H.; CHUNG, H.Y., SONG, Y.-O. and CHOI, W.C. The first total synthesis of 2,3,6-tribromo-4,5-ihydroxybenzyl methyl ether (TDB) and its antioxidant activity, Bull. *Korean Chemical Society*, v. 23, n.5, 661-662, 2002.

KIM, Y.J.; UYAMA. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 62, p. 1707–1723, 2005.

LIMA, Vera Lúcia Arroxelas Galvão; MÉLO, Enayde de Almeida; MACIEL, Maria Inês Sucupira; SILVA, Geane Soares Beltrão; LIMA, Daisyvângela Eucrêmia da Silva. Fenólicos totais e atividade antioxidante do extrato aquoso de broto de feijão-mungo (*Vigna radiata* L.) *Total phenolics and antioxidant activity of the aqueous extract of mung bean sprout* (*Vigna radiata* L.). *Revista de Nutrição, Campinas*, v. 17, n.1, p. 53-57, 2004.

LOPEZ, Jose Neptuno Rodriguez; FENOLL, Lorena G.; PENALVER, Maria J.; RUIZ, Pedro Antonio Garcia; MARTINEZ, Ramon Varon; CANOVAS, Francisco Garcia; TUDELA, Jose. Tyrosinase action on monophenols: evidence for direct enzymatic release of o-diphenol. *Biochemical et Biophysica Acta*, 1548 p. 238-256, 2001.

LV, N.; KOO, J.H.; YOON, H.Y.; YU, J.; KIM, K.A.; CHO, I.W.; KWON, K.B.; KWON, K.S.; KIM, H.U.; PARK, J.W.; PARK, B.H. Effect of *Angelica gigas* extract on melanogenesis in B16 melanoma cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 20, p. 763-767, 2007.

MATOBA, Yasuyuki.; KUMAGAI, Takanori; YAMAMOTO, Aiko; YOSHITSU, Hironari; SUGIYAMA, Masanori. Crystallographic Evidence That the Dinuclear Copper Center of Tyrosinase Is Flexible during Catalysis. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 281, n. 13, p. 8981–8990, 2006. [Online] Modificado por MURPHY, K. (2007), disponível em: [http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO\\_figure.jpeg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:PPO_figure.jpeg), acesso em: 23 abr. 2010.

MOLYNEUX, Philip. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant Activity. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOMTAZ, S. Tyrosinase inhibition by extracts and constituents of *Sideroxylon inerme* L. stem bark, used in South Africa for skin lightening. *Journal Ethnopharmacology*, 2008, doi:10.1016/j.jep.2008.06.006.

NAKAYAMA, Graça R.; Caton, Mauren C.; NOVA, P Michael; Zahra, PARANDOOSH. Avaliação do ensaio de Alamar Blue para o crescimento ea viabilidade celular in vitro. *Jornal de métodos imunológicos*. 204, 205, 1997.

OZTURK, Mehmet; OZTURK, Fatma Aydogmus; DURU, Mehmet Emin; TOPÇU, Gulaçti. Antioxidant activity of stem and root extracts of Rhubarb (*Rheum ribes*): An edible medicinal plant. *Food Chemistry*, v.103, p. 623–630, 2007.

PANDYA, Amit G.; GUEVARA, Ian L. Disorders of hyperpigmentation. *Dermatologic Clinics*. v. 18, p. 91-98, 2000.

PARK, H.Y.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, B.A. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, p. 1493 – 1506, 2009.

PASSERON, T.; BALLOTI, R.; ORTONNI, J-P. Mélanogènese Melanogenesis. *EMC-Dermatologie Cosmétologie*. v. 2, p. 204–216, 2005.

QUINN, Anthony. Biology of the skin and dermatological disease. *Medicine Basic Science*, v.32, n. 12, p. 1-3, 2004.

RATNAN, D. Venkat; ANKOLA, D.D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D.K.; KUMAR, M.N.V. Ravi. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAWLINGS, A.V.; MATTS, P.J.; ANDERSON, C.D; ROBERTS. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. *Drug Discovery Today: Disease Mechanisms*. v. 5, n. 2, p. 127-136, 2008.

REGINATTO, Flávio Henrique; DAL-PIZZOL, Felipe Dal-Pizzol; MOREIRA, José Cláudio Fonseca Moreira. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts Food Chemistry. v. 100, p. 719–724, 2007.

ROSE, Paul T. Pigmentary disorders. *Medical Clinics of North America*. v.93, p. 1225-1239, 2009.

ROZANOWSKA, Malgorzata R.; SARNA, TADEUSZ; LAND, EDWARD J. ; TRUSCOTT, T. GEORGE. Free Radical Scavenging Properties of melnin interaction of Eumelanin and pheo-melanin models with reducing and oxidizing radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 26, n. 5/6, p. 518–525, 1999.

RUDNICKI, Martina; OLIVEIRA, Marcos Roberto; PEREIRA, Tiago da Veiga Pereira; REGINATTO, Flávio Henrique; DAL-PIZZOL, Felipe; MOREIRA, José Cláudio Fonseca. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. *Food Chemistry*. v. 100, p. 719–724, 2007.

SANTOS, Marcia Debora dos; BLATT, Cecilia Terumi Teradaira. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*. v. 11, n. 2, 1998.

SARANGARAJAN, Rangaprasad; APTE, Shireesh P. The polymerization of melanin: a poorly understood phenomenon with egregious biological implications. *Melanoma Research*., v. 16, n. 1, p. 3-10, 2006.

SCHALLREUTER KU, KOTHARI S, CHAVAN B, SPENCER JD. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 395-404, 2007.

SCHALLREUTER KU. Advances in Melanocyte Basic Science Research. *Dermatology Clinical*, v.25, p. 283–291, 2007.

SCHMIDT, Julia María Sánchez. Lentiginosis mucocutâneas. *Piel*. v. 23, n.7, p. 356-366, 2008.

SIENNA, Caroline. *Efeitos dos extratos das cascas de Rauwolfia sellowii Mull Arg. E suas frações sobre a viabilidade e a melanogênese em células de melanoma murino B16F10*. Curitiba: UFPR, 2008. Dissertação (mestrado em Biología Celular e Molecular)- Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular 2008.

SILVEIRA, J.E.P.S. *Avaliação dos defeitos in vitro de espécies vegetais como potenciais ativos despigmentantes*. São Paulo: UNESP, 2007. Dissertação (mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências 2007.

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

SINGLETON VL, ROSSI JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SOUSA, Auxiliadora Jeunon Souza; VARGAS, Tiago, Jeunon de Sousa. Anatomia, fisiologia e histologia da pele. In: KEDE, Maria Paulina Villarejo; SABATOVITCH, Oleg (Org.). *Dermatologia estética*. 1. ed. São Paulo: Ed Atheneu, 2004.

SOUSA, Francisca C. F; MELO, Carla T. V.; CITÓ, Maria C. O.; CAVALCANTE, Francisca Helvira. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. *Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy*. v. 18, n. 4. p. 642-654, 2008.

SPENCERI, Elizabeth Arnold. Disorders of pigmentation. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 11, p. 209– 217, 2003.

SPIGNO, G.; DE FAVERI, D. M. Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *Journal of Food Engineering*. v.78, p.793–801, 2007.

TIAN Y, HOSHINO T, CHEN CJ, YABE YE, YABE S, LIU W. The evaluation of whitening efficacy of cosmetic products using a human skin pigmentation spot model. *Skin Research and Technology*, v.15, p. 218–223, 2009.

WOLF, Kelly L.; LIU, Rui Hai. Cellular antioxidant activity (CAA) Assay assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*. v. 55, p. 8896-8907.

YAMAGUCHI Y, HEARING VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, v. 35, n. 2, p. 193-199, 2009.



ZHONG, Shaomin; WU, Yan; SOO-MI, Ahn; ZHAO, Junyu; WANG, Ke; YANG, Shuxia; JAE-HO, Yeon; ZHU, Xuejun. Depigmentation of Melanocytes by the Treatment of Extracts from Traditional Chinese Herbs: a Cell Culture Assay. *Biology and Pharmaceutical Bull.* **v. 29, n.9**, p. 1947—1951, 2006.

ZUANAZZI, José Angelo Silveira; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonoides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo; MENTZ, Lilian Auler; PETRIVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Editora UFRGS. 1999.

# APÊNDICES

**APÊNDICE A: Equipe Científica**

<b>Nome</b>	<b>Formação/Função</b>	<b>Instituição</b>
Dr. Emerson Silva Lima	Farmacêutico-bioquímico Pesquisador: Fapeam;CNPq Orientador	UFAM
Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos	Farmacêutica Pesquisadora: Fapeam;CNPq Co-orientadora	UFAM
Nívea Suely Melo de Oliveira	Farmacêutica-bioquímica Mestranda (Bolsista: CAPES) Executora do projeto de dissertação.	UFAM
Vitor Renato da Silva Carvalho	Farmacêutico Mestrando (Bolsista: CAPES) Colaborador	UFAM
Arleilson de Sousa Lima	Aluno de Farmácia Bolsista Fapeam Colaborador	Uninorte
Dra. Tatiane Pereira de Sousa	Farmacêutica Pesquisadora: FapeamCNPq Colaboradora	UFAM
Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler	Bióloga Pesquisadora: Fapesp;CNPq Colaboradora	USP
Msc. Camila Marinho	Bióloga Pesquisadora	USP

	Colaboradora	
Dr. Roger Chamas	Médico Pesquisador Colaborador	USP
Dr. Francisco Célio Maia Chaves	Engenheiro agrônomo Pesquisador: CNPq Colaborador	EMBRAPA

**APÊNDICE B:** Orçamento e fonte de financiamento

	Valor
Equipamentos	50.000,00
Materiais de consumo	20.000,00
<b>Total</b>	<b>70.000,00</b>

Fonte financiadora:

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM)  
Instituto Nacional de Ciencia e Tecnologia (INCT)

## APÊNDICE C:-Formação, participação em eventos e trabalhos gerados durante a dissertação

Nívea Suely Melo de Oliveira

### Formação

Possui graduação em farmácia pela Universidade Federal do Amazonas (2008). e Complemento de Habilitação em Análises Clínicas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (2010). E ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas em 2009.

### Participação em eventos e resumos publicados em anais de congressos

- **61ª Reunião Anual da SBPC**  
**Trabalho:** Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos das folhas de Maracujá-do-mato (*Passiflora nitida* H.B.K.)  
**Autores:** Nívea Suely Melo de Oliveira, Maria José de Carvalho e Emerson Silva Lima.  
**Categoria:** Apresentação em Banner e Resumo nos Anais do Congresso.
- **II Workshop on Melanoma Model: Novel avenues for melanoma treatment.**  
**Realização:** Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.  
**Categoria:** ouvinte  
**Carga horária:** 12h.
- **XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**  
**Trabalho:** Fenóis totais e atividade antioxidante de extratos de folhas de *Passiflora nitida* (H.B.K.)  
**Categoria:** Pôster.  
  
**Mini-curso:** Pesquisa pré-clínica de medicamentos: protocolos para os ensaios de fitoterápicos- *Pre-clinical research of medicines: protocols for essays of phytoterapics.*  
**Categoria:** ouvinte  
**Carga horária:** 3 horas

### Artigo completo publicado

Freire, Cristina Pessoa Veloso ; Ferreira, Sabrina Baptista ; de Oliveira, Nívea Suely Melo ; Matsuura, Ani Beatriz Jackisch ; Gama, Ivson Lelis ; da Silva, Fernando de C. ; de Souza, Maria Cecília B. V. ; Lima, Emerson Silva ; Ferreira, Vitor Francisco ; OLIVEIRA, N. S. M. . Synthesis and biological evaluation of substituted ?- and ?-2,3-dihydrofuran . naphthoquinones as potent anticandidal agents. Medicinal Chemistry Communications **JCR**, v. 1, p. 1-4, 2010.