

ADRIANA ELIAS PIRES QUEVEDO

**Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos
de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam
induzidas por radiação UVA.**

CAMPO GRANDE

2011

ADRIANA ELIAS PIRES QUEVEDO

**Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos
de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam
induzidas por radiação UVA.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-
-graduação em Saúde e Desenvolvimento
na Região Centro-Oeste da Universidade
Federal de Mato Grosso do Sul para
obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fatima
Cepa Matos.

Coorientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre
Carollo.

CAMPO GRANDE

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

ADRIANA ELIAS PIRES QUEVEDO

Atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* Trécul e *Dorstenia brasiliensis* Lam induzidas por radiação UVA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul para obtenção do título de Doutor.

Campo Grande (MS), 28 de novembro de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos – Presidente
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Auro Nomizo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto –
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Neli Kika Honda
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Nájla Mohamad Kassab
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Profa. Dra. Danielle Serra de Lima Moraes
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira - Suplente
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

“[...] não há enfermidade contra a qual não haja ervas em esta terra, nem os índios naturais dela têm outra botica ou usam de outras medicinas.”

Frei Vicente de Salvador em História do Brasil 1500-1627

Dedicatória

Aos meus pais Dario Xavier Pires e Tânia Mara Elias Pires, que sempre incentivaram minha formação acadêmica, me apoiaram em todos os momentos e pelo amor incondicional.

Ao meu amado marido Sócrates Campos Quevedo dos Santos, que sempre acreditou no sucesso do meu trabalho, pela compreensão, amor e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

A Deus.

À profa. Dra. Maria de Fatima Cepa Matos, pela preciosa orientação deste trabalho, apoio, confiança, pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células – UFMS e pelo auxílio no preparo da tese e artigos.

Ao prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo pela coorientação nos experimentos cromatográficos, disponibilização do CLAE do laboratório de Farmacognosia - UFMS, pela paciência e auxílio no preparo do artigo.

À profa. Dra. Zaira da Rosa Guterrez pelos experimentos com Drosophila realizados no laboratório de Citogenética e Mutagênese - UEMS de Mundo Novo, pelo apoio, amizade, hospitalidade e auxílio no preparo do artigo.

À doutoranda Danielle Bogo da UFMS pelos ensaios de citotoxicidade e amizade.

À doutoranda Renata Trentin Perdomo da UFMS pelos reformatação dos cálculos de citotoxicidade trazidos para o laboratório.

À profa. Dra. Cláudia Andréa Lima Cardoso, pela disponibilização do CLAE do Centro de Pesquisa em Biodiversidade - UEMS de Dourados e amizade.

Ao mestrando Fábio Henrique Fernandes e à graduanda Marilyn Aparecida E. de Matos da UFMS, e aos graduandos Tiago Felipe de Senes Lopes e Sandra de Souza Ferreira da UEMS de Mundo Novo pelo auxílio nos diversos experimentos e apoio.

Ao profs. Drs. Auro Nomizo, Nájla Mohamad Kassab e Danielle Serra de Lima Moraes pela participação da banca de defesa e correções.

À profa. Dra. Neli Kika Honda pela L-Dopa, acetona, solicitude e pelas valiosas correções na banca de qualificação e na banca de defesa.

Ao prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira pelas minuciosas correções na banca de qualificação e na banca de defesa.

Ao prof. Dr. Walmir Silva Garcez pela disponibilização da lâmpada UVA, paciência e solicitude.

Ao Dr. Arnildo Pott pela identificação das exsiccatas de *Brosimum* e *Dorstenia*.

Ao biólogo João Fabri, técnico de laboratório, pelo auxílio com as exsiccatas e outros experimentos na farmacognosia.

À profa. Esp. Ana Paula B. Zandavalli, proprietária da Farmácia Vide Vida, pelo exemplo de profissional farmacêutico, pela solicitude, por disponibilizar amostras de plantas medicinais, metoxaleno e pela amizade.

Ao prof. Me. Teófilo Fernando Mazon Cardoso pelo auxílio no preparo dos percolados e ensaios preliminares de incorporação dos extratos em cremes e géis.

À Me. Regina Cheli Prati pelo auxílio na vida, no trabalho e na pesquisa.

A Alípio de Castro pelo auxílio nas coletas dos espécimes.

À profa. Me. Ubirazilda Maria Resende pela identificação de exemplares de *Brosimum*.

À Dra. Débora Marchetti Chaves Thomaz pelo auxílio no uso do liofilizador.

À FUNDECT pela bolsa concedida e auxílio financeiro.

Presto agradecimentos finais, porém não menos importantes, às minhas irmãs Cláudia e Fernanda e queridas sobrinhas Letícia e Carolina pela alegria do convívio, carinho e amizade; à minha sogra Nilza Maria e minha cunhada Eny pelo apoio e carinho e ao casal Jaqueline e Lucinei pela amizade.

Também aos meus parentes, amigos, alunos e professores presentes na defesa.

RESUMO

As furanocumarinas lineares ou psoralenos são fotossensibilizadores empregados na dermatologia associados a ultravioleta A no tratamento de doenças como o vitiligo. A fotoquimioterapia tem reações adversas imediatas (náuseas, prurido, eritema e xerodermia) e tardias (carcinogênese e, possivelmente, catarata). No Brasil, não existe medicamento fitoterápico ou medicamentos contendo extratos de plantas para tratamento do vitiligo que estejam de acordo com a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. O objetivo deste estudo foi analisar extratos de espécies do Cerrado que contêm furanocumarinas e avaliar suas atividades melanogênica, mutagênica e antiproliferativa. A quantificação das furanocumarinas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) revelou 40,77 mg/g de 5-metoxipsoraleno (5-MOP) no extrato de *Brosimum gaudichaudii* e 85,33 mg/g de psoraleno + 5-MOP no extrato de *Dorstenia brasiliensis*. Foram obtidos perfis cromatográficos para controle de qualidade dos extratos em cromatografia em camada delgada (CCD) e em CLAE-DAD. A dorstenina foi identificada no extrato de *D. brasiliensis* por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM). Os extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* e as furanocumarinas psoraleno, 5-MOP e 8-metoxipsoraleno (8-MOP) apresentaram forte atividade antiproliferativa (GI_{50} de 2,45; 2,05; 0,25; 2,30; e 0,28 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) no ensaio *in vitro* com células B16-F10 pelo método SRB na presença de UVA. Todas as amostras foram inativas na ausência da irradiação. Foram padronizados dois ensaios para avaliação da atividade melanogênica: ativação da tirosinase e dosagem de melanina. Ambos os extratos apresentaram a atividade. Os extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* apresentaram atividade genotóxica no teste *in vivo* SMART (*Somatic Mutation And Recombination Teste*) de asas de *Drosophila melanogaster* na presença de UVA. O extrato de *D. brasiliensis* apresentou maior genotoxicidade que o extrato de *B. gaudichaudii* no teste SMART com descendentes da linhagem padrão (ST) de *D. melanogaster*. A avaliação do teste na linhagem de alta bioativação (HB) evidenciou presença de substâncias progenotóxicas como componentes do extrato de *B. gaudichaudii*. Na ausência de UVA o extrato de *D. brasiliensis* apresentou pequena, porém significativa atividade genotóxica.

PALAVRAS-CHAVE: *Brosimum gaudichaudii*, *Dorstenia brasiliensis*, vitiligo, antiproliferativa, genotóxica, citotóxica, furanocumarinas.

ABSTRACT

The linear furanocoumarins or psoralens are photosensitizers used in dermatology associated with ultraviolet A in the treatment of diseases such as vitiligo. Photochemotherapy has immediate adverse reactions (nausea, pruritus, erythema and xeroderma) and late (carcinogenesis and possibly cataracts). In Brazil, there are no medication or herbal products containing plant extracts for treatment of vitiligo that comply with current legislation of the National Agency for Sanitary Vigilance. The objective of this study was to analyze extracts of species of the Cerrado containing furanocoumarins and evaluate their melanogenic, mutagenic and antiproliferative activities. The quantification of furanocoumarins by high performance liquid chromatography coupled with photodiode array detector (HPLC-DAD) revealed 40.77 mg / g of 5-methoxypsoralen (5-MOP) in *Brosimum gaudichaudii* extract and 85.33 mg / g of psoralen + 5-MOP in *Dorstenia brasiliensis* extract. Chromatographic profiles were obtained for quality control of extracts on thin layer chromatography (TLC) and HPLC-DAD. The dorstenin was identified in the *D. brasiliensis* extract by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The extracts of *B. gaudichaudii* and *D. brasiliensis* and the furanocoumarins psoralen, 5-MOP and 8-methoxypsoralen (8-MOP) showed strong antiproliferative activity (GI_{50} of 2.45, 2.05, 0.25, 2.30, and 0.28 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively) in the in vitro assay with B16-F10 cells by SRB method in the presence of UVA. All samples were inactive in the absence of irradiation. Two tests were standardized for evaluate melanogenic activity: activation of tyrosinase and melanin dosage. Both extracts showed activity. The extracts of *B. gaudichaudii* and *D. brasiliensis* showed genotoxic activity in the in vivo Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) of the wings of *Drosophila melanogaster* in the presence of UVA. The extract of *D. brasiliensis* showed higher genotoxicity that the extract of *B. gaudichaudii* the SMART with descendants of the pattern strain (ST) of *D. melanogaster*. The evaluation of the test in the high bioactivation strain (HB) revealed the presence of progenotoxic substances as components of the extract of *B. gaudichaudii*. In the absence of UVA, the *D. brasiliensis* extract showed small, but significant genotoxic activity.

KEYWORDS: *Brosimum gaudichaudii*, *Dorstenia brasiliensis*, vitiligo, antiproliferative, genotoxic, citotoxic, furanocoumarins.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Medicamentos fitoterápicos	23
2.2 Furanocumarinas	25
2.3 Melanogênese	28
2.3.1 Ultravioleta e Melanogênese	31
2.4 Vitiligo	32
2.4.1 Tratamento	33
2.5 Plantas contendo furanocumarinas	37
2.5.1 Família Moraceae	37
2.5.1.1 O gênero <i>Brosimum</i> e a espécie <i>Brosimum gaudichaudii</i>	37
2.5.1.2 O gênero <i>Dorstenia</i> e a espécie <i>Dorstenia brasiliensis</i>	39
2.6 Genotoxicidade	43
2.6.1 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)	43
2.7 Câncer	46
2.7.1 Medicamentos anticâncer	48
2.8 Atividade antiproliferativa	50
2.8.1 Ensaio colorimétrico com sulforrodamina B	51
3 OBJETIVOS	52
3.1 Objetivo geral	52
3.2 Objetivos específicos	52
4 MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1 Solventes, padrões e equipamentos	53
4.2 Material vegetal	54
4.3 Avaliação cromatográfica	58
4.4 Teste da atividade antiproliferativa	59
4.5 Padronização dos ensaios de ativação da melanogênese	62
4.6 Avaliação da atividade genotóxica	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1 Material vegetal	70

5.2 Preparo dos percolados e extratos.....	71
5.3 Avaliação cromatográfica	72
5.3.1 Cromatografia em camada delgada.....	72
5.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa	73
5.4 Avaliação da atividade antiproliferativa	81
5.4.1 Ensaio de citotoxicidade em células normais	87
5.5 Avaliação da atividade melanogênica	89
5.6 Avaliação da atividade genotóxica	92
5.7 Sumário geral	102
6. CONCLUSÕES	104
7 REFERÊNCIAS.....	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleo fundamental das furanocumarinas lineares	24
Figura 2 - Exemplos de furanocumarinas lineares ou psoralenos.....	26
Figura 3 - 5-Metoxipsoraleno e a formação de fotoadutos com DNA.....	27
Figura 4 - Mecanismo de ação do cloridrato de amotosaleno para a inativação de leucócitos	27
Figura 5 - Rota biossintética das eumelaninas e feomelaninas a partir da L-tirosina que ocorre dentro dos melanossomas	29
Figura 6 - Máculas cutâneas brancas características do vitiligo.....	34
Figura 7 - Furanocumarinas e piranocumarinas identificadas em <i>Brosimum gaudichaudii</i>	38
Figura 8 - Furanocumarinas identificadas em <i>Dorstenia brasiliensis</i>	42
Figura 9 - Esquema representativo de divisão mitótica normal e com mutação de ponto em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	44
Figura 10 - Esquema representativo de divisão mitótica com deleção e com não-disjunção em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	Erro! Indicador não definido. 45
Figura 11 - Esquema representativo de divisão mitótica com recombinação (entre locus <i>flr</i> e <i>mwh</i>) e (entre centrômero e locus <i>flr</i>) em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	45
Figura 12 - Esquema representativo de divisão mitótica com dupla recombinação em células primordiais dos discos imaginais de asas de <i>Drosophila melanogaster</i>	46
Figura 13 - Embalagem (a) contendo uma fita (b) para medição de dose de irradiação ultravioleta UVA e UV-Vis (320 - 420 nm), da UV-Tec Messtechnik, Alemanha	54
Figura 14 - Fotografia do espécime de <i>Brosimum gaudichaudii</i> do qual foi coletada amostra da raiz.....	55
Figura 15 - Fotografia de um dos espécimes de <i>Dorstenia brasiliensis</i> do qual foram coletados o rizoma e a raiz.....	55

Figura 16 - Esquema simplificado representando o processo de coleta, processamento e extração dos farmacógenos de ambas as espécies do estudo.....	57
Figura 17 - Uma das placas do experimento de avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos de <i>Brosimum gaudichaudii</i> e de <i>Dorstenia brasiliensis</i> , de psoraleno, 8-metoxipsoraleno e 5-metoxipsoraleno em células B16-F10 (melanoma murino) sendo irradiada com luz UVA 365nm	60
Figura 18 - Esquema representando o conteúdo das cavidades da placa de 6 poços utilizada para avaliação da melanogenicidade do 8-metoxipsoraleno (8-MOP) na presença de UVA e seu correspondente controle negativo	64
Figura 19 - Esquema representativo de cruzamento padrão e de cruzamento de alta bioativação metabólica em <i>Drosophila melanogaster</i>	66
Figura 20 - Esquema com fotografias ilustrando a metodologia do teste SMART utilizado com adaptações para o estudo	68
Figura 21 - Porcentagens de rendimento na preparação dos percolados e extratos de <i>Brosimum gaudichaudii</i> e <i>Dorstenia brasiliensis</i> e de furanocumarinas psoraleno e 5-metoxipsoraleno neles contidos	72
Figura 22 - Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada dos padrões psoraleno (1), 5-metoxipsoraleno (2), extrato de <i>Dorstenia brasiliensis</i> (3), percolado de <i>Dorstenia Brasiliensis</i> (4), extrato de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (5), percolado de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (6), tendo como fase móvel a mistura tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60:40:3) e revelação com KOH 5%, seguida de visualização com luz UVA (365 nm)	73
Figura 23 - Cromatograma do percolado (superior) e do extrato (inferior) de <i>Brosimum</i> por CLAE-DAD em acetonitrila-água 55:25 (v/v), fluxo de 1 mL / minuto, 223 nm.....	75
Figura 24 - Cromatograma do percolado (superior) e do extrato (inferior) de <i>Dorstenia brasiliensis</i> por CLAE-DAD em acetonitrila-água 55:25 (v/v), fluxo de 1 mL / minuto, 223 nm.	76
Figura 25 - Bandas de absorção do psoraleno, 5-metoxipsoraleno e da substância D obtidas do extrato de <i>Dorstenia brasiliensis</i> em detector de arranjo de fotodiodo (DAD)	78

- Figura 26 - Cromatograma do extrato de *Dorstenia brasiliensis* obtido por CG-EM com temperatura da interface e do injetor de 280°C, modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), gás de arraste Hélio, fluxo de 0,6 mL / minuto, temperatura da coluna iniciando em 150°C, com aquecimento de 10°C por minuto até 240°C e em seguida de 5°C por minuto até 280°C, temperatura esta em que permaneceu por 20 minutos.79
- Figura 27 - Espectro de massas do psoraleno, 5-metoxipsoraleno e da substância D do extrato de *Dorstenia brasiliensis* obtidos por CG-EM com temperatura da interface e do injetor de 280°C, modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), gás de arraste Hélio, fluxo de 0,6 mL / minuto, temperatura da coluna iniciando em 150°C, com aquecimento de 10°C por minuto até 240°C e em seguida de 5°C por minuto até 280°C, temperatura esta em que permaneceu por 20 minutos80
- Figura 28 - Furanocumarina dorstenina81
- Figura 29 - Perfis cromatográficos dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (superior) e *Dorstenia brasiliensis* (inferior) por CLAE-DAD em aumento gradiente da relação entre os solventes metanol – água de 15:85 (v/v) para 100:0 (v/v) em 40 minutos, voltando à condição inicial em 10 minutos, fluxo de 0,9 mL / minuto, 254 nm.....82**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 30 - Curva concentração-resposta gerada a partir da exposição de células de melanoma murino B16-F10 ao 8-MOP na presença de UVA. GI₅₀, inibição do crescimento de 50% das células; TGI, inibição total do crescimento e LC₅₀, concentração necessária para morte de 50% das células83
- Figura 31 - Curva concentração-resposta gerada a partir da exposição de células de melanoma murino B16-F10 aos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e de *Dorstenia brasiliensis* (EDB), a psoraleno, a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e a 8-metoxipsoraleno (8-MOP) na presença de UVA85
- Figura 32 - Ativação da tirosinase em células de melanoma murino pelo 8-MOP e extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) usando a dosagem de tirosinase na presença de irradiação UVA91
- Figura 33 - Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST), após os tratamentos com 8-MOP, extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG) com irradiação UVA..... 101

- Figura 34 - Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com 8-MOP na presença e ausência de irradiação UVA .. 102
- Figura 35 - Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com extrato de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) na presença e ausência de irradiação UVA 102
- Figura 36 - Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com extrato de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) na presença e ausência de irradiação UVA 102

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Quantidades de psoraleno e 5-metoxipsoraleno (5-MOP) em percolados de *Brosimum gaudichaudii* (PBG) e *Dorstenia brasiliensis* (PDB) (quantidade \pm DP) (mg/g) usando o método com CLAE-DAD.76
- Tabela 2 - Quantidades de psoraleno e 5-metoxipsoraleno (5-MOP) em extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) (quantidade \pm DP) (mg/g) usando o método com CLAE-DAD.76
- Tabela 3 - Crescimento (%) de células neoplásicas B16-F10 expostas aos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG), a psoraleno, a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e a 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em presença de UVA.83
- Tabela 4 - Crescimento celular (%) de células normais VERO expostas aos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em presença de UVA.88
- Tabela 5 - Atividade citotóxica (GI_{50}) dos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e da furanocumarina 8-MOP em linhagens de células normais VERO e em células neoplásicas B16-F10 com irradiação de luz UVA com seus correspondentes índices de seletividade (IS).89
- Tabela 6 - Ativação da tirosinase em células de melanoma murino pelo 8-MOP e extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) usando a dosagem de tirosinase na presença e ausência de irradiação UVA.90
- Tabela 7 - Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com 8-MOP, extrato seco de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e de extrato seco de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) sem irradiação UVA (n=40).....94

Tabela 8 - Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de <i>Drosophila melanogaster</i> do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com 8-MOP, extrato seco de <i>Dorstenia brasiliensis</i> (EDB) e de extrato seco de <i>Brosimum gaudichaudii</i> (EBG) com irradiação UVA (n=40).....	96
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- 5-MOP = 5-metoxipsoraleno ou bergapteno (5-MOP)
- 8-MOP = 8-metoxipsoraleno (8-MOP) ou metoxaleno ou xantotoxina
- ACTH = hormônio adrenocorticotrófico
- AMPc = adenosina monofosfato cíclica
- ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ASP = proteína sinalizadora agouti
- ATCC = *American Type Culture Collection*
- ATP = adenosina trifosfato
- B16-F10 = células de melanoma murino
- BH = heterozigoto balanceado
- CCD = cromatografia em camada delgada
- Cdks = quinases ciclina-dependentes
- CG-EM = cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
- CLAE = cromatografia líquida de alta eficiência
- CLAE-DAD = cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos
- CREB = proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPc
- CSIR = Conselho de Pesquisa Científica e Industrial na África do Sul
- DDT = diclorodifeniltricloroetano
- DMEM = meio mínimo essencial modificado por *Dulbecco*
- DMSO = dimetilsulfóxido
- DNA = ácido desoxirribonucleico
- EBG = extrato de *Brosimum gaudichaudii*
- EDB = extrato de *Dorstenia brasiliensis*
- EDTA = ácido etilenodiaminotetracético
- GI₅₀ = concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular
- HB = cruzamento de alta bioativação
- IC₅₀ = concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular
- IS = índice de seletividade

LC₅₀ = concentração que causa 50% de morte celular
L-DOPA = 3,4-di-hidroxifenilalanina
m = massa
MC1-R = receptor de melanocortina 1
MH = trans-heterozigoto marcado
MITF = fator de transcrição associado à microftalmia
MTT = brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NCI = Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos
OMS = Organização Mundial da Saúde
P.A. = pureza analítica
PBS = tampão fosfato salino
pH = potencial hidrogeniônico
PKA = proteína quinase A
PMSF = fluoreto de fenil metil sulfonila
PNPIC = Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PUVA = psoralenos + UVA (320-400 nm)
Rf = fator de retenção
RNA = ácido ribonucleico
RNAm = ácido ribonucleico mensageiro
RPMI 1640 = meio Instituto Memorial *Roswell*
SMART = *Somatic Mutation And Recombination Teste*
SRB = sulforrodamina B
ST = cruzamento padrão
TGI = *total growth inhibition*
TMP = 4,5', 8-trimetilpsoraleno ou triosaleno
TOP1 = topoisomerase 1
TOP2 = topoisomerase 2
TRP-1 = tirosinase relacionada à proteína 1
TRP-2 = dopacromo-tautomerase
USP = *Pharmacopeia Americana*
UV = ultravioleta
UVA = ultravioleta A
UVB = ultravioleta B

UVC = ultravioleta C

v = volume

VERO = células de rim de macaco verde africano

XTT = hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina]carbonil]-2H-tetrazólio

α -MSH = hormônio estimulante de melanócitos do tipo α ou melanocortina

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas contendo furanocumarinas para propósitos medicinais datam de 2000 a.C., sendo usadas há séculos por egípcios e indianos para tratamento de uma variedade de doenças de pele. As furanocumarinas lineares ou psoralenos são compostos fotossensibilizadores comumente empregados na dermatologia (oral ou topicamente) associadas à irradiação ultravioleta A (fotoquimioterapia ou PUVA: psoralenos + UVA) no tratamento de doenças de pele (ROSA e NATALI, 2009). As furanocumarinas mais utilizadas no tratamento PUVA são o 8-metoxipsoraleno (8-MOP), o 5-metoxipsoraleno (5-MOP), e o 4,5,8-trimetilpsoraleno (TMP) (SAID *et al.*, 1997; MILIONI *et al.*, 2001).

Dentre as doenças mais tratadas com o PUVA está o vitiligo, uma doença que se caracteriza por despigmentação da pele com formação de manchas esbranquiçadas (MÜLLER e RAMOS, 2004) e sua patogênese é ainda incerta (PACIFICO e LEONE, 2011). Dados genéticos apoiam uma herança poligênica, multifatorial e não-mendeliana (FALABELLA e BARONA, 2008). Diversos mecanismos patogênicos têm sido propostos com alterações da imunidade humoral e celular, estresse oxidativo por alteração mitocondrial (descrito como melanocitorragia), catecolaminas, citocinas epidérmicas, desregulações metabólicas e também uma hipótese de convergência com defeitos simultâneos (FALABELLA e BARONA, 2008; PACIFICO e LEONE, 2011). Acarreta uma série de transtornos emocionais nos pacientes e cujo tratamento efetivo ainda se constitui um desafio (ROSA e NATALI, 2009). Atinge de 0,5 a 2% da população mundial, podendo acometer todas as raças, ambos os sexos e aparecer em qualquer idade, com média de aparecimento ao redor dos 20 anos (STEINER e VILLAS, 2004). Em relação ao sucesso terapêutico, algumas formas do vitiligo mostram-se mais resistente a tratamentos (STEINER e VILLAS, 2004) e muitas vezes a repigmentação varia muito e atinge 100% em poucos casos dependendo do tipo de pele. Em muitos casos, é necessário de um a três anos de tratamento para se obter resultados ótimos (BELLET e PROSE, 2005). Além disso, os pacientes tratados pela fotoquimioterapia estão sujeitos a indesejáveis reações adversas imediatas (náuseas, prurido, eritema e xerodermia) e/ou tardias (carcinogênese e, possivelmente, catarata) (FILQUEIRA *et al.*, 2006). Faz-se ainda necessário relatar que a grande variedade de tratamentos

oferecidos, muitas vezes por leigos, é de eficácia duvidosa e utilizada sem acompanhamento médico.

Atualmente não existe medicamento fitoterápico ou medicamentos contendo extratos de plantas para tratamento do vitiligo que estejam de acordo com a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil.

O Cerrado brasileiro possui espécies nativas que contêm furanocumarinas como *Styrax ferrugineus* da família *Styracaceae*, *Ficus citrifolia*, *Ficus guaranitica*, *Brosimum gaudichaudii*, várias espécies de *Dorstenia*, da família *Moraceae*, além de espécies não nativas que fornecem frutos para alimentação como limão, figo e bergamota.

Dentre as vantagens do uso de extratos vegetais na farmacoterapêutica, pode-se citar que estes podem ser tão ativos quanto um fármaco sintético e apresentar maior segurança de uso (ROCHA, 2009). Parte disso deve-se a menor concentração dos compostos ativos em drogas vegetais ou extratos se comparado a um medicamento contendo apenas um fármaco, pois frequentemente os compostos ativos agem sinergisticamente entre eles e com outros componentes do fitocomplexo (YUNES *et al.*, 2001; VAGNER, 2009).

Considerando as diretrizes do Ministério da Saúde que se propõe a inserir o uso de plantas medicinais e fitoterápicos para a promoção da saúde e a estimular o desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos, aliadas à necessidade de um tratamento seguro, eficaz e de qualidade para o vitiligo que atenda às necessidades da população, torna-se de real importância analisar comparativamente extratos das espécies para estudo das furanocumarinas e de outros metabólitos secundários presentes.

Frente a estas considerações, este trabalho visa avaliar as atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de plantas do Cerrado etnofarmacologicamente selecionadas. Pretende-se, também, avaliar suas potencialidades para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico seguro para o tratamento do vitiligo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Medicamentos fitoterápicos

Grande parte da população dos países em desenvolvimento depende da medicina tradicional para sua atenção primária, tendo em vista que 80% desta população utilizam práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde e 85% desta utilizam plantas ou preparações destas (YUNES *et al.*, 2001). O Brasil apresenta a maior biodiversidade do planeta, além da rica diversidade étnica e cultural, que detém o conhecimento na utilização das ervas e plantas medicinais (SCHENKEL *et al.*, 1999; ROCHA, 2009).

No final da década de 70, a Organização Mundial da Saúde (OMS) já alertava sobre a necessidade de desenvolvimento de políticas públicas para facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar nos sistemas de atenção à saúde e promover o uso racional dessa integração com o objetivo de proteger e promover a saúde (BRASIL, 2006a).

O Ministério da Saúde, seguindo a recomendação, publicou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde em 2006 (BRASIL, 2006a). No mesmo ano aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006b). Ambas buscam fomentar a pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população. Visam também garantir e promover a segurança, a eficácia e a qualidade no acesso a plantas medicinais e fitoterápicos e promover e reconhecer práticas populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros.

As plantas medicinais estão sujeitas a variações na sua composição química tal como alteração no teor de princípios ativos, o que pode ocorrer segundo as diferentes fases do seu estado vegetativo, a biota, o clima, bem como o período de coleta (época e outros), o processo de secagem (temperatura, tempo e outros), o armazenamento e o processo de extração, o que exige um maior rigor na padronização do produto final: o fitoterápico (VILEGAS, 2001). O desenvolvimento

de produtos fitoterapêuticos depende da sua padronização que garante não somente a autenticidade do extrato da planta, como também a capacidade de uso dose-relacionada (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Segundo a ANVISA, medicamentos fitoterápicos são os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais e cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilizações, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. São caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2010a).

A resolução RDC 14, de 31 de março de 2010 (BRASIL, 2010a), que regulamenta atualmente o registro de fitoterápicos, traz algumas novidades em relação a resoluções anteriores: passa a permitir o registro de medicamentos fitoterápicos contendo droga vegetal como ativo, desde que a comprovação de segurança e eficácia ocorra por meio da realização de estudos clínicos e pré-clínicos. Nestes casos, deve-se apresentar o relatório de controle de qualidade da droga vegetal. Com relação às mudanças no controle de qualidade do derivado vegetal, o fabricante do produto acabado deverá apresentar no laudo de análise do derivado vegetal, informações referentes aos resíduos de solventes (para extratos não obtidos por etanol ou água) e a avaliação da ausência de aflatoxinas (a ser realizado quando citado em monografia específica em Farmacopeia reconhecida ou quando existir citação em literatura científica da necessidade dessa avaliação ou de contaminação da espécie por aflatoxinas). Além disso, deverá apresentar resultado do perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica também para o derivado vegetal, além do produto acabado. Segundo a RDC 14 (BRASIL, 2010a) o perfil cromatográfico constitui-se no padrão cromatográfico de constituintes característicos, obtido em condições definidas, que possibilite a identificação da espécie vegetal em estudo e a diferenciação de outras espécies e a prospecção fitoquímica, em testes de triagem, qualitativos ou semiquantitativos, que utilizam reagentes de detecção específicos para evidenciar a presença de grupos funcionais característicos na matéria-prima vegetal e que auxiliam na identificação da espécie vegetal e a diferenciação de outras espécies.

A comprovação da eficácia deve ser feita para cada indicação terapêutica solicitada no registro seguindo a Instrução Normativa nº 5, publicada em março de 2010 (BRASIL, 2010b), que traz a relação de referências bibliográficas que podem

ser utilizadas para avaliar segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos registrados por meio do Sistema da Pontuação.

2.2 Furanocumarinas

As furanocumarinas são moléculas formadas pela condensação de um anel furano ao anel aromático do núcleo cumarínico (MURRAY, 1995) (Figura 1). Podem ser classificadas em angulares e lineares de acordo com a posição do anel furano em relação aos outros anéis. São de ocorrência natural ou sintética (CHIMICHI *et al.*, 2002). Podem ser fitoalexinas, já que a sua formação é muitas vezes induzida na planta em resposta a um estímulo, particularmente pela infecção por fungos (CHAUDARY *et al.*, 1985).

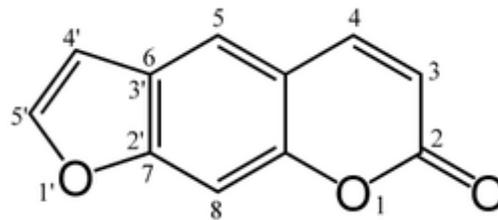


Figura 2 - Núcleo fundamental das furanocumarinas lineares.
Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

As furanocumarinas são usadas há séculos por egípcios e indianos para tratamento de uma variedade de doenças de pele (MILIONI *et al.*, 2001). Além disso, são descritas várias atividades farmacológicas importantes como analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antiviral, anticoagulante, além dos seus conhecidos efeitos fotossensibilizantes (ABDEL-KADER, 2003). São também usadas como *probe* em biologia molecular e química dos ácidos nucleicos (CHIMICHI *et al.*, 2002).

Distúrbios cutâneos como o vitiligo (distúrbio de pigmentação devido à perda de melanócitos da epiderme) e a psoríase (caracterizada pela proliferação aumentada das células epidérmicas) são tratados com furanocumarinas (FAPERJ 2000).

As furanocumarinas mais utilizadas nos tratamentos são as lineares, também chamadas de psoralenos, sendo estas o 8-MOP (8-metoxipsoraleno, xantotoxina ou

metoxaleno), o 5-MOP (5-metoxipsoraleno ou bergapteno), e o TMP (4,5,8-trimetilpsoraleno ou triosaleno) (Figura 2) (SAID *et al.*, 1997; MILIONI *et al.*, 2001). O termo PUVA (psoralenos + UVA) é empregado para o tratamento com psoralenos associado à irradiação de luz ultravioleta A.

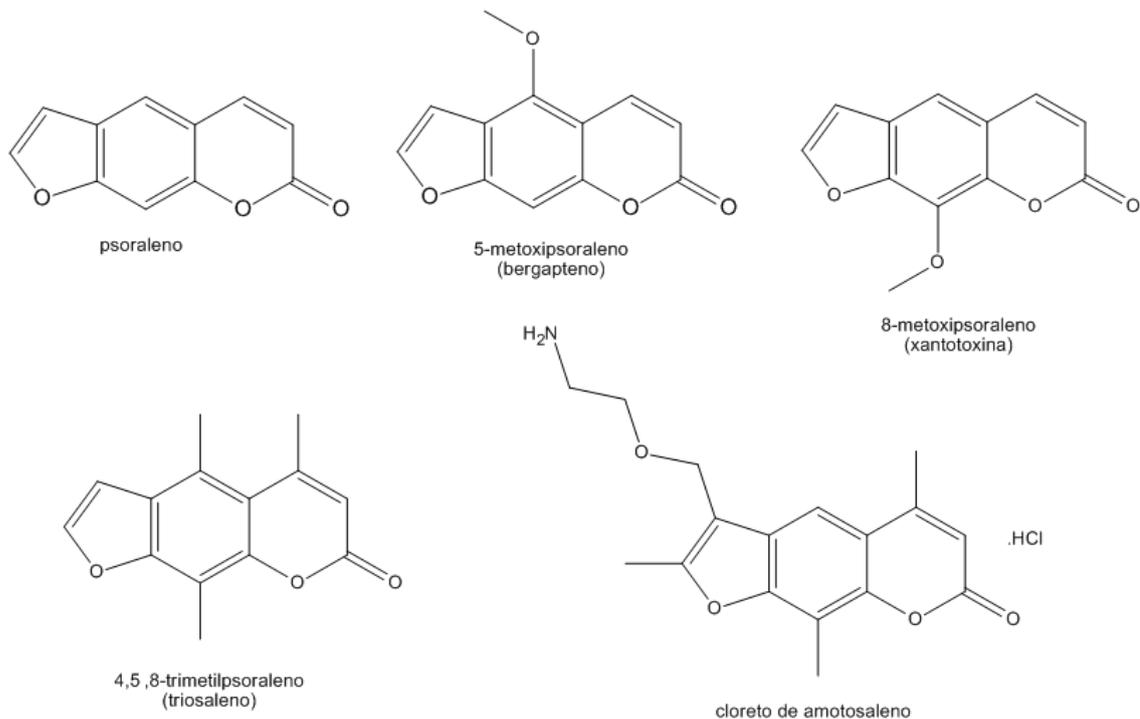


Figura 2 – Exemplos de furanocumarinas lineares ou psoralenos.

Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

Furanocumarinas lineares ou psoralenos exibem estruturas tricíclicas planares, hidrofóbicas, com dois sítios fotorreativos (3,4-pirona e 4',5'-dupla ligação furano) (BETHEA *et al.*, 1999). Absorvem energia na região do ultravioleta (UV) na faixa de comprimento de onda entre 300 e 400 nm (UVA). Após a absorção do fóton, as furanocumarinas formam um estado tripleto excitado, que pode reagir com moléculas, tais como: o DNA, intercalando-se com as bases pirimídicas do DNA formando fotoadutos (DIAWARA e TRUMBLE, 1997; BETHEA *et al.*, 1999) (Figura 3); e o oxigênio formando radicais livres como o radical superóxido que podem então reagir com DNA, RNA, proteínas e lipídios, ocasionando lesões nas células que os contêm (DIAWARA e TRUMBLE, 1997).

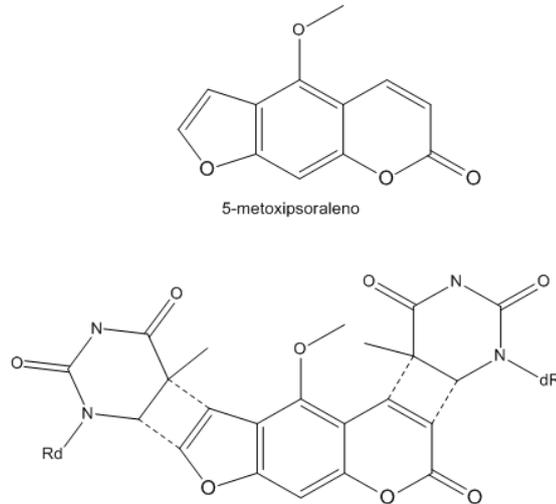


Figura 3 – 5-Metoxipsoraleno e a formação de fotoadutos com DNA.

Fonte: Lapronti *et al.* (2003).

A formação de fotoadutos é bem representada na figura 4, que esquematiza a ligação fotoativada do amotosaleno ao DNA de leucócitos, levando a efetiva inativação destes. Esse psoraleno é utilizado para inativação fotoativada de patógenos e leucócitos em componentes de plaquetas, prevenindo a doença do enxerto contra hospedeiro pós-transfusional. O amotosaleno é um aminopsoraleno que difere do 8-MOP pela introdução de um grupo com carga positiva, resultando em formação de fotoadutos com ligação mais forte com os ácidos nucleicos (CORASH e LIN, 2004).

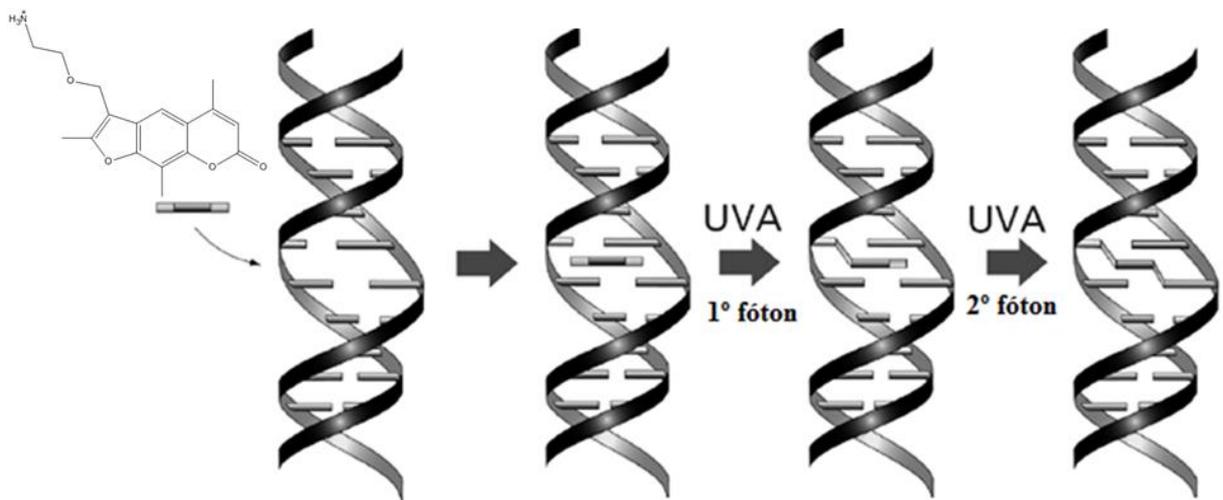


Figura 4 - Mecanismo de ação do cloridrato de amotosaleno para a inativação de leucócitos.

Fonte: Adaptada de Corash e Lin (2004).

Apesar do tratamento PUVA ter importante atividade terapêutica, os pacientes estão sujeitos a indesejáveis reações adversas, tanto em curto prazo (eritema, hiperpigmentação, genotoxicidade) como em longo prazo (catarata, risco de câncer de pele) (CHIMICHI *et al.*, 2002). O aumento no uso dos psoralenos na medicina tem sido ligado à alta incidência de câncer de pele e outras desordens, tais como as trocas entre cromátides irmãs, as mutações gênicas e as aberrações cromossômicas em humanos (DIAWARA e TRUMBLE, 1997).

Nijsten e Stern (2003) relatam inclusive, que mesmo 15 anos após a interrupção do tratamento com PUVA não há significante decréscimo do risco de desenvolvimento de câncer de pele.

2.3 Melanogênese

A substância inicial do processo biossintético da melanina é a tirosina, um aminoácido essencial que sofre atuação química da tirosinase, um complexo enzimático cúprico-proteico, sintetizado nos ribossomos dos melanócitos. A tirosinase é transferida através do retículo endoplasmático para o Aparelho de Golgi, onde é aglomerada em organelas elípticas, altamente especializadas, chamadas melanossomos que é a sede dos fenômenos bioquímicos que originam a melanina e onde ela é armazenada (MIOT *et al.*, 2009) (Figura 5).

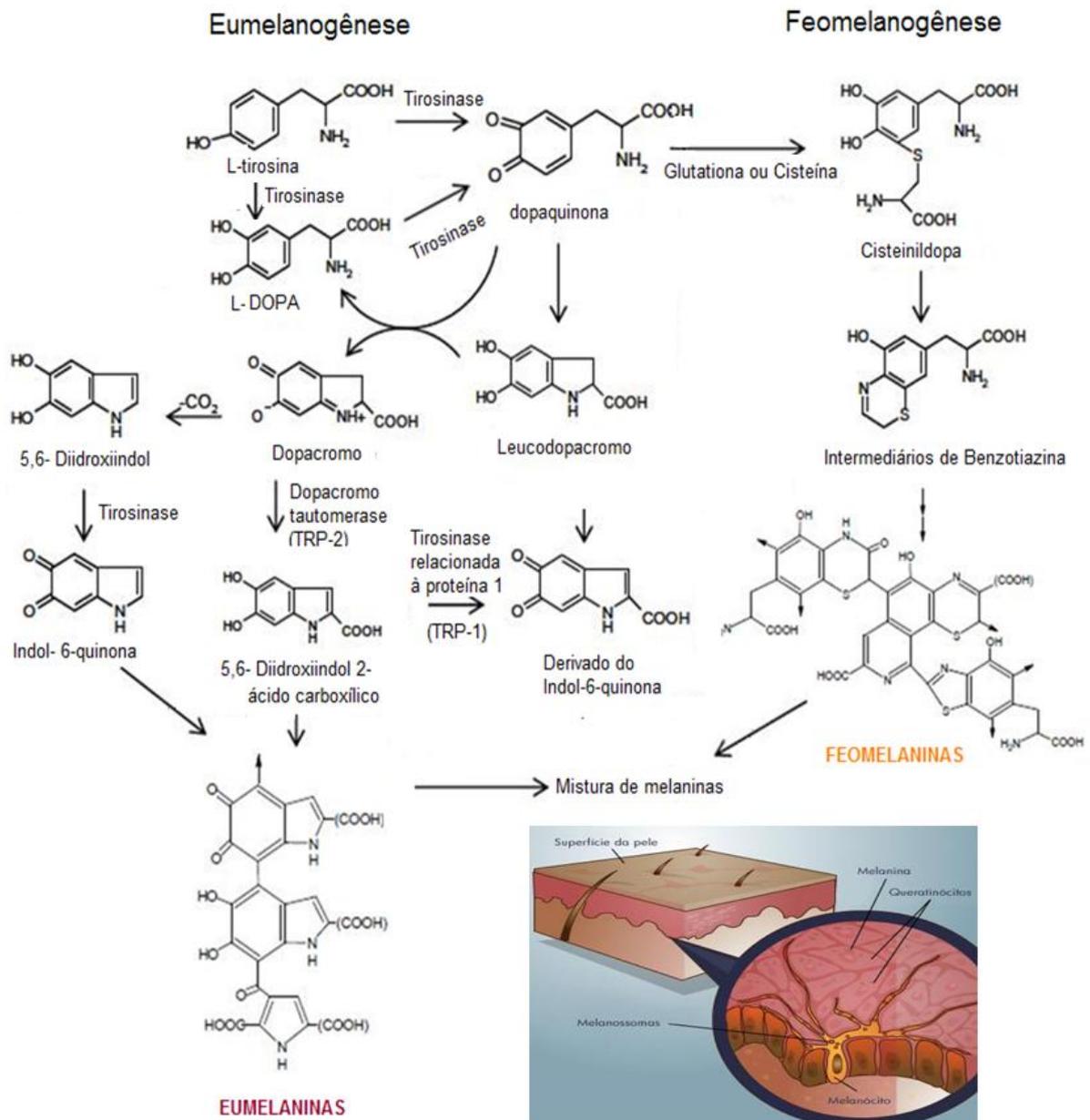


Figura 5 - Rota biossintética das eumelaninas e feomelaninas a partir da L-tirosina que ocorre dentro dos melanossomos.
 Fonte: Modificada de Chang *et al.* (2009).

Quando repletos de melanina, os melanossomos são injetados no interior dos queratinócitos, da unidade epidérmico-melânica correspondente, através dos prolongamentos dendríticos dos melanócitos (atividade citocrínica). Uma vez no interior dos queratinócitos, os melanossomos tendem a distribuir-se no citoplasma, sobre a parte superior do núcleo, de forma a protegê-lo das radiações ultravioleta. Tem sido sugerido que a melanina, no interior destas células atua, também, como varredor de radicais livres fotoproduzidos, protegendo o DNA celular (MIOT *et al.*, 2009).

Os três membros da família relacionada à tirosinase: tirosinase; tirosinase relacionada à proteína 1 (TRP-1) e dopacromo-tautomerase (TRP-2) estão envolvidos no processo de melanogênese, levando à produção de eumelanina ou feomelanina (MIOT *et al.*, 2009) (Figura 5).

A tirosinase é uma enzima que requer cobre como cofator e que catalisa duas etapas da síntese de melanina. A primeira delas, limitante da melanogênese, é a hidroxilação da tirosina a 3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA) ou diretamente a *o*-dopaquinona. A *o*-dopaquinona é convertida a L-DOPA e à dopacromo por meio de auto-oxidação em pH fisiológico. A L-DOPA também é substrato da tirosinase, sendo oxidada a *o*-dopaquinona enzimaticamente. Finalmente, a eumelanina é formada por meio de uma série de reações oxidativas a partir do diidroindol e do ácido diidroindol-2-carboxílico, os quais são formados a partir do dopacromo. Na presença de cisteína e de glutathione, a dopaquinona é convertida em cisteinildopa ou glutathionildopa, a partir das quais a feomelanina é formada (KIM e UYAMA, 2005; CHANG, 2009). A eumelanina é um polímero marrom e a feomelanina, amarelado (MIOT *et al.*, 2009).

A eumelanina absorve e dispersa a luz ultravioleta atenuando sua penetração na pele e reduzindo os efeitos nocivos do sol. A feomelanina, por outro lado, tem um grande potencial em gerar radicais livres, em resposta à radiação UV causando danos ao DNA e, dessa forma, pode contribuir para os efeitos fototóxicos da radiação UV (MIOT *et al.*, 2009).

Vários fatores estão associados à síntese de tirosinase, sendo os principais a adenosina monofosfato cíclica (AMPC) e a proteína quinase A (PKA). O AMPC, formado a partir da adenosina trifosfato (ATP) pela adenilato ciclase, desempenha uma função chave na regulação da melanogênese, aumentando a atividade da tirosinase pré-formada e a quantidade de RNAm da tirosinase. Através da ativação da PKA e consequente fosforilação e ativação da proteína de ligação ao elemento responsivo a AMPC (CREB), o AMPC promove aumento na expressão do fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), fator crucial para o desenvolvimento e diferenciação dos melanócitos. Como resultado, o MITF liga-se e ativa o promotor da tirosinase, estimulando sua síntese (LEE *et al.*, 2007).

As propriedades de fotoproteção da melanina na pele humana ocorrem pela absorção e dispersão, tanto da luz ultravioleta quanto da luz visível. Essa absorção

aumenta linearmente na faixa de 720-620 nm e a partir de então, exponencialmente, por meio de ondas mais curtas (300-600 nm).

Os principais fatores reguladores para a quantidade e qualidade da melanina, produzida pelos melanócitos, incluem radiação UV, hormônio estimulante de melanócitos do tipo α ou melanocortina (α -MSH), proteína sinalizadora agouti (ASP) e MC1-R (ROCHA e MOREIRA, 2007).

Mais de 120 genes que parecem regular a pigmentação têm sido identificados. Porém, os efeitos do α -MSH mediados pelo MC1-R, o qual é expresso na superfície dos melanócitos, tem sido considerado o ponto chave para pigmentação. O α -MSH estimula a atividade da tirosinase e a síntese de melanina *in vivo* e em cultura de melanócitos, via MC1-R (MIOT *et al.*, 2009).

2.3.1 Ultravioleta e Melanogênese

A radiação ultravioleta (UV) corresponde à porção da radiação solar com comprimento de onda entre 200 e 400 nm. A radiação UV mostrou-se relacionada ao estímulo da melanogênese por aumento da atividade da tirosinase (ABERDAM *et al.*, 1993; MIOT *et al.*, 2009), principalmente pela ação na enzima DOPA oxidase (ABERDAM *et al.*, 1993). Após uma única exposição à radiação UV, verifica-se o aumento no tamanho dos melanócitos, e em exposições repetidas, o aumento do número de melanossomas repletos de melanina transferidos aos queratinócitos e o aumento no número de melanócitos ativos (MIOT *et al.*, 2009). Em sucessivas radiações verifica-se estímulo à síntese *de novo* de melanina (ABERDAM *et al.*, 1993). Além disso, a densidade dos melanócitos, em estudos comparativos, é maior nas áreas fotoexpostas (MIOT *et al.*, 2009).

A radiação ultravioleta C (UVC) (200-290 nm) é basicamente germicida. A ultravioleta B (UVB) (290-320 nm) induz a produção de α -MSH e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) nos melanócitos e queratinócitos. Esta mesma radiação causa eritema após um período de latência de 2 a 7 horas, pigmentação, alterações que induzem ao câncer cutâneo; e é a principal responsável pelas queimaduras solares. A ultravioleta A (UVA) (320-400 nm) tem maior penetração na pele. Além de induzir a pigmentação e alterações cancerígenas, é a principal indutora de

fotosensibilidade. Esta radiação também promove eritema, que surge mais tardiamente, e que pode tornar-se gradualmente mais intenso (MIOT *et al.*, 2009).

A faixa de radiação UVA entre 320 nm e 340 nm (UVA II) tem maior capacidade de produzir eritema e pigmentação que a faixa entre 340 nm e 400 nm (UVA I). Além de eritema, a UVA II provoca a diminuição das células de *Langerhans* e lesões nos vasos da derme que são alterações semelhantes às ocasionadas pela UVB. A UVB é 800 a 1.000 vezes mais ativa que a UVA no que diz respeito à produção de eritemas e outros efeitos na pele (COSTA e LACAZ, 2001).

A UVA atua potencializando os efeitos da UVB, e provoca na pele não pigmentada o aumento do infiltrado celular e das células endoteliais, a necrose de coagulação e a pigmentação imediata (em consequência da oxidação da melanina pré-formada pelo oxigênio livre), além de ativar outros cromóforos como as riboflavinas e quinona (COSTA e LACAZ, 2001).

2.4 Vitiligo

O vitiligo é uma desordem cutânea da pigmentação caracterizada por máculas cutâneas brancas bem circunscritas (Figura 6) resultantes da perda de melanócitos da epiderme cutânea, afetando 0,5 a 4,0 % da população mundial (TRUITE *et al.*, 2007). Pode acometer todas as raças, ambos os sexos e aparecer em qualquer idade, com média de aparecimento ao redor dos 20 anos (STEINER e VILLAS, 2004). Sua etiologia não está completamente elucidada, mas estudos têm sugerido que mecanismos autoimune, genético, tóxico/metabólico e neural podem desempenhar papéis na patogênese desta doença (TRUITE *et al.*, 2007). Segundo Steiner e Villas (2004) as teorias incluem a presença de autoanticorpos, a participação de células T citotóxicas, a autodestruição dos melanócitos por produtos intermediários da melanogênese, defeitos intrínsecos e extrínsecos dos próprios melanócitos ou da unidade epidermomelânica, além de prováveis alterações nas terminações nervosas.



Figura 6 - Máculas cutâneas brancas características do vitiligo.

Fonte: <http://comunidadebib.blogspot.com/2011/01/vitiligo-doenca-que-mexe-com-o.html>

Possui prognóstico reservado e acarreta uma série de transtornos emocionais nos pacientes. A principal dificuldade enfrentada pelo portador é a discriminação e o preconceito (GON *et al.*, 2005). A intervenção psicológica em pacientes com vitiligo pôde constatar a existência de conteúdos reprimidos, somatizados em sintomas físicos (MÜLLER e RAMOS, 2004).

De acordo com sua extensão e forma de distribuição na pele, o vitiligo pode ser classificado nos tipos localizado e generalizado (STEINER e VILLAS, 2004). O vitiligo do tipo localizado pode ser dividido nos subtipos focal e segmentar. O focal é caracterizado pela presença de uma ou mais máculas acrômicas em uma determinada área, sem distribuição específica. O segmentar, pela presença de uma ou mais máculas acrômicas envolvendo um segmento unilateral do corpo, frequentemente seguindo a distribuição de um dermatomo. O tipo generalizado pode ser do subtipo acrofacial com presença de lesões típicas na parte distal das extremidades e face; do subtipo vulgar com máculas acrômicas de distribuição aleatória; ou ainda do subtipo misto, que unem características dos subtipos acrofacial e vulgar, segmentar e acrofacial e/ou vulgar.

2.4.1 Tratamento

No que se refere ao tratamento de doenças cutâneas, no entendimento da psicodermatologia, além do tratamento farmacológico, necessita-se de um

acompanhamento psicoterápico (MÜLLER e RAMOS, 2004). Dentre os medicamentos, os corticosteroides tópicos constituem uma das primeiras opções de tratamento para os indivíduos portadores de vitiligo e é, geralmente, a primeira escolha para aqueles com a forma localizada da doença e/ou aqueles que têm um componente inflamatório, mesmo que subclínico (STEINER e VILLAS, 2004).

As furanocumarinas 8-MOP e TMP são opções encontradas para a fotoquimioterapia, sendo prescritas para uso tópico ou oral. A repigmentação com PUVA varia muito e em poucos casos atinge 100%. Além disso, é necessário de um a três anos de tratamento para se obter resultados ótimos. Em geral, os tipos de pele mais escuras (STEINER e VILLAS, 2004; BELLET e PROSE, 2005), a doença do tipo generalizada subtipo vulgar ou a que apresenta lesões mais recentes respondem melhor ao tratamento. A face é a área que melhor responde à terapia, enquanto que as áreas distais das extremidades e a genitália raramente respondem a ela. Geralmente não respondem ao tratamento também o vitiligo rapidamente progressivo. Sabe-se que pacientes jovens e morenos costumam ser mais aderentes ao tratamento do que idosos de pele clara (STEINER e VILLAS, 2004).

Estudos têm demonstrado que a PUVA pode aumentar o risco de câncer de pele. Mas a necessidade de múltiplas exposições por tempo prolongado e a sua correlação para o aumento significativo do risco ainda está em debate (LEITE *et al.*, 2004).

No PUVA oral é essencial proteger os olhos com lentes que filtram a radiação UVA a partir do momento da ingestão do psoraleno. O principal efeito colateral é o eritema produzido pela UVA, que ocorre de 24 a 36 horas depois e pode variar desde um avermelhamento da pele até a formação de bolhas e necrose. Outras reações adversas como prurido, náuseas e vômito são observadas. O prurido é, frequentemente, controlado com emolientes e, eventualmente, com esteroides tópicos, e as náuseas com o fracionamento da medicação (STEINER e VILLAS, 2004).

As principais contraindicações para o uso do PUVA são: doenças hepáticas e renais, doenças fotossensíveis, catarata, glaucoma e câncer de pele. O risco para carcinoma de pele é, em média, 2,6 vezes superior ao da população, com predomínio nas áreas não fotoexpostas. Novos tratamentos utilizando 5-metoxipsoraleno em vez de 8-metoxipsoraleno e fototerapia com ultravioleta B (UVB) de banda estreita têm mostrado bons resultados, com menor fototoxicidade e menos

efeitos colaterais (STEINER e VILLAS, 2004). Porém, segundo Costa e Lacaz (2001), a UVB produz importantes alterações cutâneas, que podem variar desde eritemas leves até queimaduras com bolhas dependendo da dose de radiação e do tipo de pele, além de fotoenvelhecimento, cânceres cutâneos e imunodepressão após exposições constantes e prolongadas.

A PUVA tópica é uma tentativa para limitar a área que se torna fotossensível e evitar alguns efeitos do psoraleno sistêmico (BELLET e PROSE, 2005). O 8-metoxipsoraleno na concentração de 0,1% é o mais frequente psoraleno utilizado e é aplicado nas áreas acometidas 30 a 60 minutos antes da exposição à radiação que inicia em $0,25 \text{ J/cm}^2$ com aumento de $0,12$ a $0,25 \text{ J/cm}^2$ até que o eritema seja atingido (STEINER e VILLAS, 2004). A complicação dessa terapia é o aparecimento de reações bolhosas fototóxicas. Nestes acometimentos, o paciente deve ser bastante esclarecido sobre a importância do uso de fotoprotetores de amplo espectro a partir do momento da utilização do psoraleno (STEINER e VILLAS, 2004).

Outros medicamentos constituem também uma opção para esses pacientes e incluem a pseudocatalase, a helioterapia, a terapia com a UVB, o extrato de placenta humana (*Melagenina Plus*, desenvolvido em Cuba e muito conhecido no Brasil), o Kuva (à base de *Ammi visnaga*), a fenilalanina tópica e sistêmica (por ser aminoácido necessário para síntese de melanina), e os antioxidantes. Os imunomoduladores têm sua eficácia comprovada no tratamento da dermatite atópica e psoríase, e há grandes perspectivas de sucesso também com o vitiligo (STEINER e VILLAS, 2004).

Apesar da ampla variedade de opções terapêuticas, incluindo medicações tópicas e orais, fotoquimioterapia e terapias de despigmentação, ainda não há nenhum tratamento ótimo para o vitiligo. Sabe-se que aproximadamente um terço dos pacientes tratados atinge resultados satisfatórios e o tratamento deve ser realizado por longos períodos (STEINER e VILLAS, 2004).

Quando o paciente não responde às terapias clínicas existentes para o vitiligo, o enxerto ou transplante de melanócitos pode ser uma alternativa de tratamento, com a deposição de grupamentos de células funcionantes no local afetado. Essa modalidade terapêutica, entretanto, só é válida quando a doença está estável (STEINER e VILLAS, 2004).

Outros tratamentos à base de plantas medicinais (chás, xaropes, tinturas, óleos, extratos, formulações com derivados vegetais) são também indicados por amigos, pastorais, outros pacientes (cipó de São João, mama-cadela, capim cidreira, óleo de bergamota), por lojas virtuais como Loja Virtual Oficina de Ervas (tintura e comprimidos de mama-cadela); Pharmacia Natural (extrato de serralha, extrato de mama-cadela); Napie Extratos Vegetais (extrato de mama-cadela, no caso definida como *Zantoxylon rhoifolium*); Farmácia FACCI (Composto para Vitiligo Vitilikla's-MCS à base de *Echinodorus grandiflorus*, *Anchietea salutaris*, *Boerhaavia hirsuta* e *Baccharis trimera*).

No Brasil, muitos medicamentos, fitoterápicos ou não, têm os registros ou a renovação dos registros indeferidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo muitas vezes retirados do mercado durante o tratamento dos usuários. O Viticromin® da SAUAD Química LTDA - GO (comprimidos, solução tópica e pomada à base de *Brosimum gaudichaudii*), por exemplo, teve a renovação do registro indeferida junto à ANVISA (BRASIL, 2011) por estar em desacordo com a legislação vigente. Outros medicamentos sem registro na ANVISA foram retirados do mercado tais como:

I) Composto Vegetal Harmonize da Harmonize Farmácia de Manipulação – MG: à base de plantas medicinais como serralha, mama cadela e outras. Segundo o fabricante contêm substâncias que estimulam a produção da melanina, são hepatoprotetoras, imunoestimulantes e anti-inflamatórias. É comercializada na forma de cápsula, xarope e loção, sendo que esta última possui também como componente, a desonida;

II) Pomada de Foz do Iguaçu da Farmácia Viva Flora: à base de óleo de macadâmia, ureia, vitaminas A e E e ácido salicílico.

Atualmente não existe medicamento fitoterápico ou medicamentos contendo extratos de plantas para tratamento do vitiligo que estejam de acordo com a legislação vigente da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) no Brasil.

A busca de compostos naturais capazes de estimular a produção de melanina na epiderme tem ganhado importância recentemente priorizando o desenvolvimento de formulações não tóxicas para o tratamento do vitiligo, especialmente por meio de aplicações tópicas (TRUITE *et al.*, 2007).

2.5 Plantas contendo furanocumarinas

Várias famílias de plantas são conhecidas como produtoras de furanocumarinas, dentre as quais podemos citar: membros da família Apiaceae (aipo, por exemplo), Rutaceae (plantas cítricas, por exemplo) e Moraceae (ABDEL-KADER, 2003).

2.5.1 Família Moraceae

2.5.1.1 O gênero *Brosimum* e a espécie *Brosimum gaudichaudii*

O gênero *Brosimum* compreende 15 espécies e 12 subespécies resultantes da distribuição geográfica descontínua de algumas delas. O gênero se distribui desde o México, Antilhas, Cuba e Jamaica, até o sul do Brasil, predominantemente em áreas de terra firme não inundáveis de floresta tropical Amazônica, mas apresenta espécies que se estendem até a área de Cerrado e transição da Mata Atlântica (SILVA, 2007). As espécies do gênero *Brosimum* são caracterizadas por serem arbóreas, algumas de grande porte (mais de 40 metros de altura).

Brosimum gaudichaudii é conhecida como mamica de cadela, mama-cadela ou ainda maminha-cadela. Espécie com sistema reprodutivo monoico, com inflorescência bissexuada subglobosa. Seu estilete e estigma são quase inconspícuos, principalmente depois que as flores estaminadas estão abertas. A infrutescência constitui-se em uma drupa carnosa indeiscente formada a partir do receptáculo da inflorescência que se torna amarelo ou marrom avermelhado (SILVA, 2007). É uma espécie nativa do cerrado brasileiro, com uma ampla distribuição por todo o Brasil central (MARTINS, 1995). As cascas da raiz desta espécie são usadas na medicina popular na forma de chá para o tratamento do vitiligo (VILEGAS *et al.*, 1993).

O nome popular mamica de cadela também é encontrado referindo-se às espécies *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e *Zanthoxylum riedelianum* Eng. da família

Rutaceae. Ambas são também conhecidas como mamica-de-porca e tembetari (LORENZI, 1992).

Por meio de análises da casca da raiz de *B. gaudichaudii* foram identificados (MONTEIRO *et al.*, 2002):

- derivados do ácido cinâmico: ácido 3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-6-cromenil)-(E)-propanoico, ácido 3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2*H*-6-cromenil) propanoico e ácido 3-(6-metoxibenzo[*b*]furan-5-il)propanoico;
- cumarinas (Figura 7):
 - furanocumarinas: psoraleno, 5-MOP, gaudichaudina, 1',2'-dehidromarmesina, marmesina, 8-metoximarmesina, (+)-(2'*S*,3'*R*)-1'-hidroximarmesina, e 1'-hidroxi-3'-O-β-glucopiranosilmarmesina;
 - piranocumarinas: xantiletina e luvangetina;

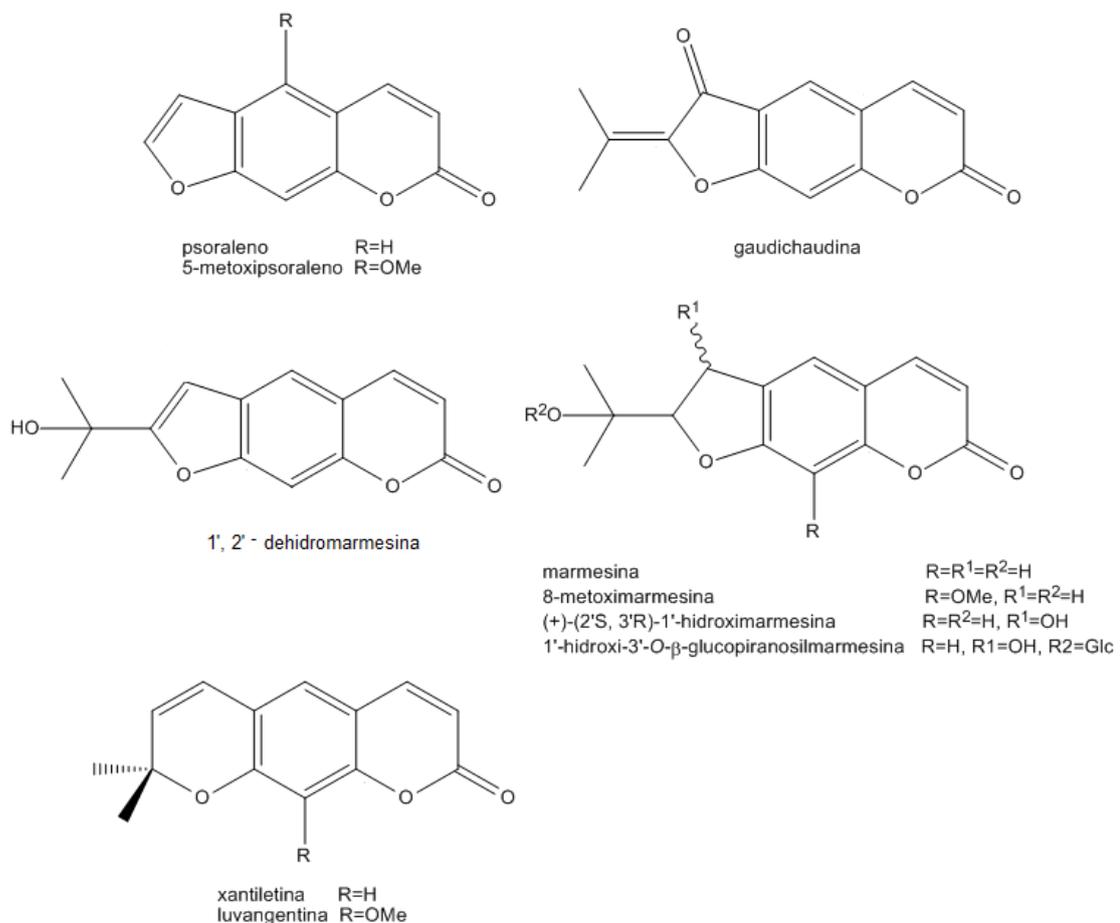


Figura 7 – Furanocumarinas e piranocumarinas identificadas em *Brosimum gaudichaudii*.

Fonte: adaptado de Monteiro *et al.* (2002).

- chalcona: 2',4',4-triidroxi-3',3-diprenilchalcona;
- esteroides: β -sitosterol e 3-O- β -D-glicopiranosil- β -sitosterol;
- triterpeno: β -amirina.

O extrato metanólico da casca da raiz *B.gaudichaudii* mostrou atividade mutagênica no teste com *Salmonella typhimurium* e em células do ovário de hamster chinês (CHO). Varanda *et al.* (2002) sugerem que, como as furanocumarinas são componentes principais do extrato, seriam elas as responsáveis pela atividade, mas salienta que estudos adicionais são necessários para identificar outras possíveis substâncias que podem contribuir para os efeitos observados.

O estudo da toxicidade aguda e subaguda do extrato seco de *B. gaudichaudii* em ratos (*Rattus norvegicus*) apresentou resultados de baixa toxicidade considerando o tempo de exposição dos animais à droga, os níveis das concentrações (3, 10 e 20 vezes a concentração terapêutica considerada 10 mg/kg) e os resultados obtidos quando comparados com os parâmetros de toxicidade pré-estabelecidos (AMORIM *et al.*, 2004).

Ensaio de toxicidade aguda em camundongos para determinação da concentração letal média e aproximada demonstraram baixa toxicidade do extrato da raiz de *B. gaudichaudii* (CUNHA *et al.*, 2008). O extrato das folhas também não apresentou toxicidade significativa na determinação da DL₅₀ em camundongos e no bioensaio com *Artemia salina* (FERREIRA, 2008).

Em ensaio para avaliação da atividade tripanocida realizado com tratamento e pré-tratamento de camundongos infectados por *Tripanossoma cruzi*, o extrato das folhas de *B. gaudichaudii* reduziu a parasitemia e/ou induziu atraso no seu aparecimento (FERREIRA, 2008).

2.5.1.2 O gênero *Dorstenia* e a espécie *Dorstenia brasiliensis*

O gênero *Dorstenia* Linne (Moraceae) é representado por 170 espécies em todo o mundo (FRANKE, 2001; ABEGAZ, 2002), sendo 37 espécies brasileiras. Quase todas as espécies do gênero *Dorstenia* são herbáceas e campestres, geralmente crescendo em locais sombreados (CARAUTA, 1996a). Há espécies que se destacam pela beleza ornamental e outras pelos rizomas aromáticos. A maioria

se concentra no Brasil-sudeste à beira dos riachos e grotões rochosos (CARAUTA, 1996b).

A maior parte é conhecida na medicina popular como carapiá ou figueirilha (CARDOSO *et al.*, 1999). Plantas medicinais do gênero *Dorstenia* eram denominadas como Cayapiá pelos indígenas do Brasil na época do seu descobrimento, sendo utilizada para o tratamento das febres e como antídoto contra picadas de animais peçonhentos. Os colonizadores portugueses as descreveram com os nomes carapiá e contra-erva (GURGEL, 2004).

O nome carapiá também é encontrado referindo-se a *Cordia superba* Cham. (LORENZI, 1992) da família Boraginaceae e a *Sida macrodon* da família das Malváceas (CORRÊA, 1931). A primeira espécie também pode ser encontrada com os nomes de árvore de ranho e grão de galo (LORENZI, 1992) e a segunda, como malva do campo (CORRÊA, 1931).

O gênero *Dorstenia* é usado em terapia com plantas medicinais em muitos países na África e América do Sul e Central como antiofídico e antirreumático, além do uso em infecções e doenças de pele (CARDOSO *et al.*, 1999; ABEGAZ *et al.*, 2002).

Além de ácidos graxos e esteróis, este gênero é reconhecido como uma rica fonte de derivados benzofuranos, cumarinas preniladas e geraniladas, flavonoides C-prenilados e C-geranilados, estirenos e triterpenoides (ABEGAZ *et al.*, 2000).

Estruturalmente, as furanocumarinas em *Dorstenia* apresentam-se pouco diversificadas, havendo predomínio de furanocumarinas angulares ou lineares simples tais como 5-MOP, psoraleno, isopimpineline, pimpineline e isobergapteno (VILEGAS *et al.*, 1997). Encontra-se também a presença de furanocumarinas preniladas como 5-metoxi-3-(3-metil-but-2-enil)-psoraleno e 5,8-dimetoxi-3-(3-metilbut-2-enil)-psoraleno em *D. gigas* (FRANK *et al.*, 2001); a dorstenina em *D. brasiliensis* (KUSTER *et al.*, 1994), em *D. contrajerva* e em *D. bahiensis* (SANTANA *et al.*, 2004); e seu análogo insaturado em *D. brasiliensis* (KUSTER *et al.*, 1994) e em *D. cayapiaa* (SANTANA *et al.*, 2004) e O-[3-(2,2-dimetil-3-oxo-2H-furan-5-il)-3-hidroxi-butil]-bergaptol e O-[2-(5-hidroxi-2,6,6-trimetil-3-oxo-2H-piran-2-il)etil]bergaptol em *D. elliptica* (ABEGAZ *et al.*, 2004).

Estudos fitoquímicos do gênero relatam ainda a ocorrência de cardenolídeos (CASAGRANDE *et al.*, 1974), triterpenos (VILEGAS *et al.*, 1997),

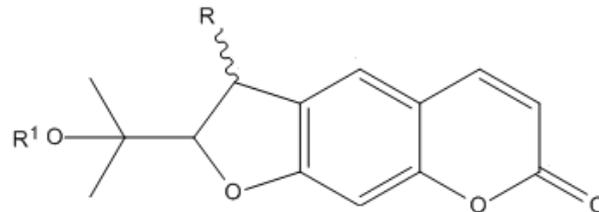
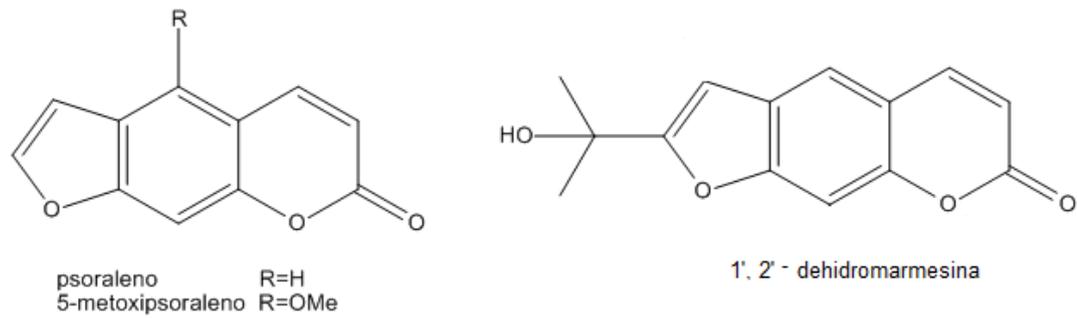
ácidos graxos (POZETTI, 1988), esteroides (KUSTER *et al.*, 1994), diferentes benzofuranos (WOLDU *et al.*, 1988) e vários flavonoides geranilados e prenilados (NAGDJUI *et al.*, 1998a; NAGDJUI *et al.*, 1998b; NAGDJUI *et al.*, 1999).

Dorstenia brasiliensis é uma espécie herbácea perene, nativa do Brasil, encontrada em São Paulo, Goiás, Mato Grosso, Bahia, Pernambuco e, principalmente, em Minas Gerais e Rio Grande do Sul. Conhecida como cayapiá verdadeiro, é a mais importante do gênero, sob o ponto de vista terapêutico e a única admitida na farmacopeia de vários países (CORRÊA, 1931). Pode ser encontrada como sinonímia científica de *D. multiformes* (SEPLANTEC, 1979; CONCEIÇÃO, 1980). Tem folhas compridas e de bordas arredondadas, nascendo bem próximas ao solo (ALZUGARAY; ALZUGARAY, 1983) e inflorescência discoide bissexuada. A infrutescência constitui-se de uma drupa deiscente formada a partir do desenvolvimento da parte superior do exocarpo (SILVA, 2007). Apresentam rizoma cilíndrico, ovoide, curto, aromático, fibroso e amarelado (CORRÊA, 1931). Possui variedades como *D. brasiliensis* var. *major*, *palustris*, *tomentosa* e *typica* (CARAUTA, 1996b).

D. brasiliensis é conhecida no Brasil como carapiá, caiapiá ou contraerva e as cascas de sua raiz têm sido usadas na medicina popular para o tratamento de doenças do sistema digestivo, febre tifoide (ALMEIDA, 1993; UCHIYAMA *et al.*, 2002), como antiofídico, nas leucorreias, em enfermidades na pele, em irregularidades menstruais como dismenorreia e amenorreia (ALZUGARAY e ALZUGARAY, 1983; ALMEIDA, 1993) e na solidificação de ossos fraturados (CORRÊA, 1931) em mistura com a taiuiá (*Trianosperma tayuya*) (ALZUGARAY; e ALZUGARAY, 1983).

Análises das raízes/rizomas da espécie *D. brasiliensis* identificaram (KUSTER *et al.*, 1994; UCHIYAMA *et al.*, 2002):

- cumarinas:
 - cumarinas simples: 7-hidroxycumarina (umbeliferona);
 - furanocumarinas (Figura 8): psoraleno; 5-MOP, dorstenina e seu análogo insaturado; (2'S,3'R)-3'-hidroximarmesina 4'-O-β-D-glucopiranosídeo; (2'S)-marmesina 4'-O-α-L-ramnopiranosil (1→6)-O-β-D-glucopiranosídeo; (2'S,3'R)-3'-hidroximarmesina e 1',2'-dehidromarmesina;



(2'S)-marmesina 4'-O- α -L-ramnopiranosil (1 \rightarrow 6)-O- β -D-glucopiranosídeo R = H , R¹= α -L- Rha (1 \rightarrow 6) β -D- Glc

(2'S,3'R)-3'-hidroximarmesina 4'-O- β -D-glucopiranosídeo R =OH, R¹= β -D- Glc

(2'S,3'R)-1'-hidroximarmesina R =OH, R¹=H

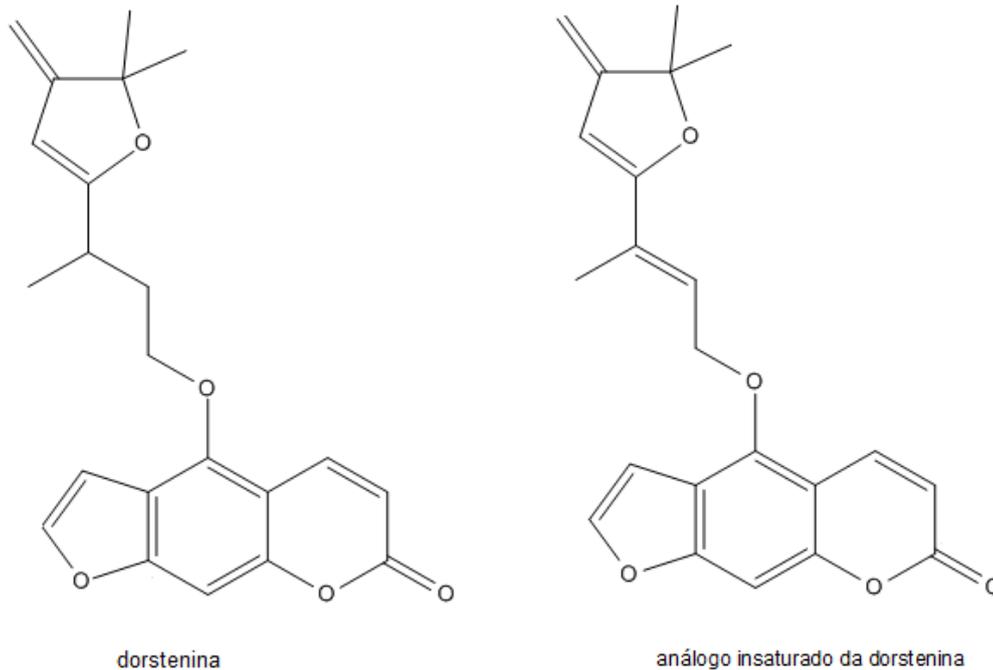


Figura 8 – Furanocumarinas identificadas em *Dorstenia brasiliensis*.
Fonte: adaptado de Kuster *et al.* (1994) e Uchiyama *et al.* (2002)

- terpenoides:

- esteroide: 3-O- β -glucopiranosilsterol;
- diterpenoides: ácido 14a-hidroxi-7,15-isopimaradien-18-oico;

- triterpenoides: ácidos dorstênicos A e B;
- açúcar: sacarose.

2.6 Genotoxicidade

2.6.1 Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART)

O SMART (*Somatic Mutation And Recombination Teste*) é um ensaio *in vivo* muito versátil, eficiente e de pouco custo financeiro utilizado para detectar a genotoxicidade induzida por substâncias puras ou misturas complexas. A *Drosophila* é um ótimo organismo-modelo em pesquisas genéticas, pois tem ciclo de vida curto (aproximadamente 10 dias a 25°C), prole numerosa, manutenção fácil, fartura de mutantes e cromossomos gigantes. Além disso, 70% dos genes associados a doenças humanas têm correspondentes em *Drosophila* (SEPEL e LORETO, 2010). A espécie utilizada, *Drosophila melanogaster*, possui ainda caracteres morfológicos bem definidos, um grande número de linhagens mutantes bem caracterizadas geneticamente e um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, o que permite a biotransformação de agentes xenobióticos (GRAF *et al.*, 1996). Esta última característica do ensaio aumenta a confiabilidade dos resultados, pois envolve a ativação metabólica que é relevante para os seres humanos, podendo ativar ou inativar compostos químicos, diferentemente dos ensaios de mutagenicidade *in vitro* (PRESTON *et al.*, 1987).

Até 1999, cerca de 300 compostos químicos já haviam sido avaliados no teste SMART de asa de *D. melanogaster* e estão documentados em aproximadamente 100 publicações (VOGEL *et al.*, 1999). Entre os compostos avaliados, incluem-se drogas antineoplásicas, agentes intercalantes, compostos indutores de pontes de DNA-DNA e DNA-proteína, inibidores de topoisomerasas e inibidores da síntese de DNA.

O SMART de asa de *D. melanogaster* fundamenta-se na premissa de que durante o desenvolvimento embrionário, grupos de células (discos imaginais das asas) proliferam mitoticamente até o ponto em que se diferenciam, durante a

metamorfose, em estruturas que originam as asas das moscas adultas. Este bioensaio faz uso de dois genes marcadores para a forma dos pelos das asas: pelos múltiplos (*mwh*, 3-0.3) e pelos cujo formato lembram uma “chama de vela”, do inglês *flare* (*flr³*, 3-38.8), baseando-se na indução de alterações genéticas que originam a perda de heterozigose em células larvais, que são heterozigotas para estes dois genes recessivos (GRAF *et al.*, 1984).

A análise de adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos *mwh* + / + *flr³* (trans-heterozigoto marcado – MH) permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais (Figuras 9 a 12).

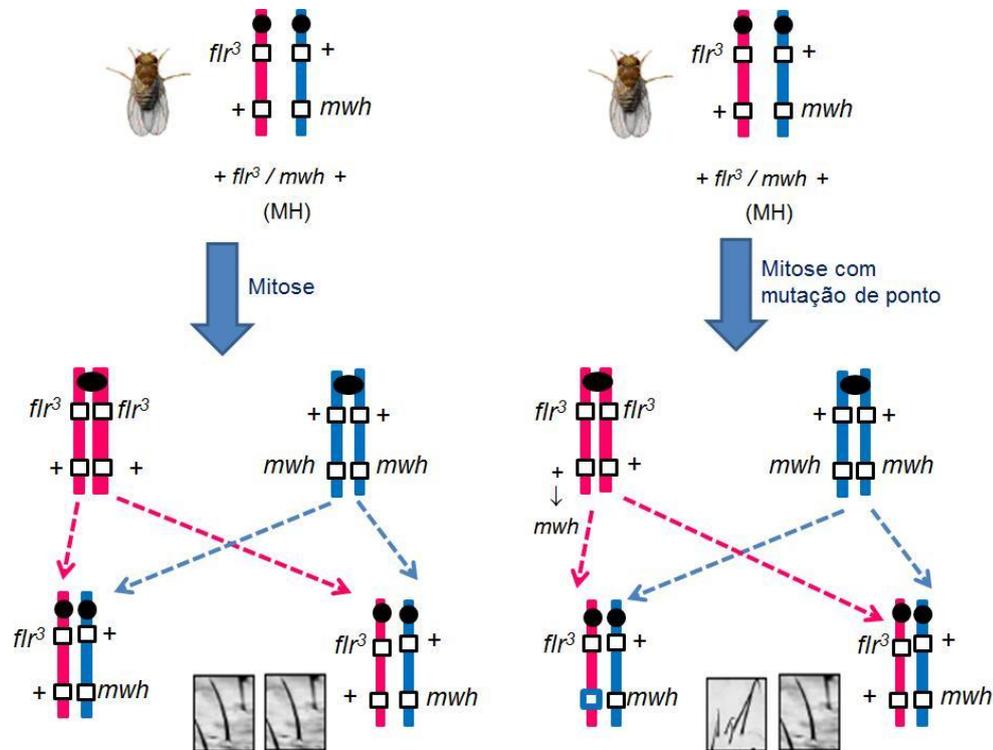


Figura 9 - Esquema representativo de divisão mitótica normal e com mutação de ponto em células primordiais dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*.

Fonte: adaptada de Graf *et al.*, 1984.

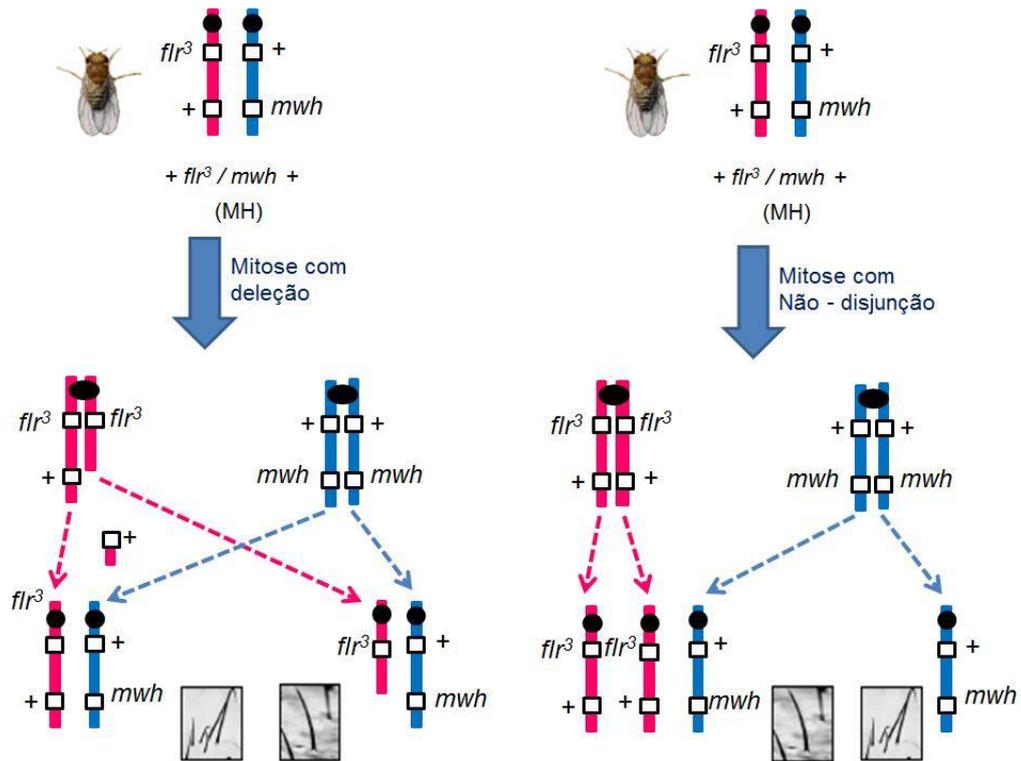


Figura 10 - Esquema representativo de divisão mitótica com deleção e com não-disjunção em células primordiais dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*.

Fonte: adaptada de Graf et al., 1984.

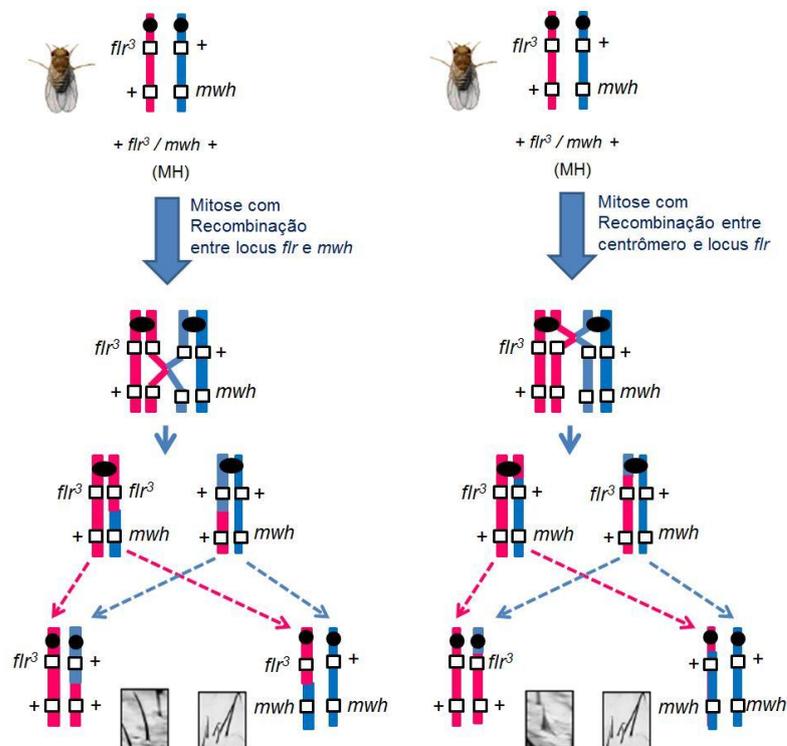


Figura 11 - Esquema representativo de divisão mitótica com recombinação (entre locus flr e mwh) e (entre centrômero e locus flr) em células primordiais dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*.

Fonte: adaptada de Graf et al., 1984.

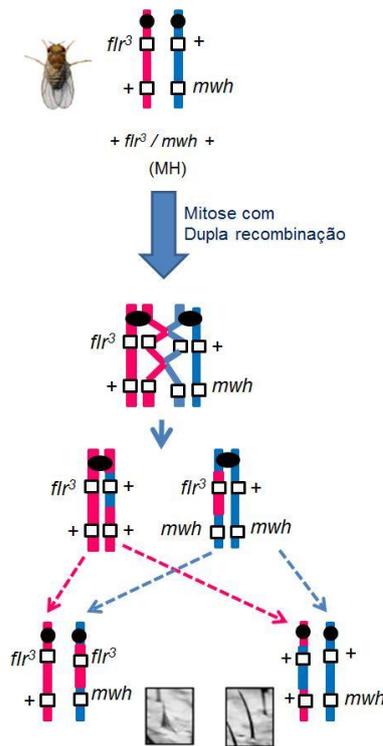


Figura 12 - Esquema representativo de divisão mitótica com dupla recombinação em células primordiais dos discos imaginais de asas de *Drosophila melanogaster*.
Fonte: adaptada de Graf *et al.*, 1984.

A análise dos indivíduos (heterozigoto balanceado – BH), ou seja, sem a perda da heterozigose para o gene *flare*, permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas. No entanto, devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis. A célula que sofreu perda do alelo selvagem desenvolverá o fenótipo mutante, durante a metamorfose no estágio de pupa, e pode ser diferenciada facilmente das demais (GUZMÁN-RINCÓN e GRAF, 1995).

2.7 Câncer

O desenvolvimento do câncer é um processo de múltiplos passos envolvendo mutação e seleção de células com capacidade progressivamente aumentada para proliferação, sobrevivência, invasão e metástase. Inicia-se com uma alteração genética que leva à proliferação anormal de uma única célula, seguida pelo supercrescimento de uma população derivada desta célula e mutações adicionais

com seleção clonal, ou seja, seleção de descendentes com vantagens como crescimento mais rápido, maior sobrevivência celular ou outras propriedades (COOPER, 2001; DEVLIN, 2007; RANG *et al.*, 2004).

Muitos fatores podem afetar a probabilidade de que o câncer se desenvolva, incluindo exposição a agentes iniciadores e a promotores de tumor. Os agentes iniciadores induzem mutações em genes-alvo-chave, sendo este o evento inicial do desenvolvimento do câncer. Incluem-se nesta classe a radiação solar ultravioleta (principal causa do câncer de pele), os vírus tumorais, os químicos carcinogênicos da fumaça do tabaco (principais causas identificadas do câncer humano) e as aflatoxinas (potente carcinogênico do fígado). Os promotores de tumor agem pela estimulação da proliferação celular levando ao supercrescimento da população de células durante os primeiros estágios do desenvolvimento do tumor. São exemplos desta classe os ésteres de forbol e os hormônios, particularmente o estrogênio (COOPER, 2001).

As células cancerosas têm comportamentos diferentes da célula normal como: estímulo autócrino de crescimento (produção anormal de um fator do crescimento); insensibilidade à inibição do crescimento por contato; secreção de proteases que facilitam a invasão de tecidos adjacentes; secreção de fatores de angiogênese; falhas na diferenciação e em atingir a apoptose (levando ao aumento da idade e/ou da sobrevivência da célula com danos não reparados no DNA) (COOPER, 2001; RANG *et al.*, 2004).

As alterações genéticas envolvidas na iniciação e progressão do tumor incluem a ativação de oncogenes celulares e a inativação de genes supressores de tumor (COOPER, 2001).

Os oncogenes celulares provêm de genes de células normais chamados proto-oncogenes. São genes celulares reguladores importantes, em muitos casos codificadores de proteínas que controlam a proliferação celular normal. Esses genes são convertidos em oncogenes por mutações pontuais ou rearranjos de genes resultantes de translocações nos cromossomos levando ao aumento da expressão gênica ou à atividade descontrolada das proteínas codificadas, o que resulta em proliferação celular anormal e desenvolvimento do tumor (COOPER, 2001).

Os genes supressores de tumor são reguladores negativos da proliferação celular e do desenvolvimento do tumor que em muitos tumores são perdidos ou inativados. Mutações nesses genes levam à eliminação de proteínas regulatórias

negativas e parecem ser as alterações moleculares mais comuns que levam ao desenvolvimento de tumores humanos. Em vários casos, produtos de genes supressores de tumor e de oncogenes agem de forma antagônica nas mesmas vias celulares regulatórias (COOPER, 2001).

2.7.1 Medicamentos anticâncer

Medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas categorizadas, incluindo as indicadas como antibacterianas, anticoagulantes, antiparasitárias, imunossupressoras e anticancerígenas (NEWMAM *et al.*, 2003). No que se referem aos anticancerígenos, as pesquisas atualmente buscam moléculas que atuem com mecanismos específicos para cada tipo de enfermidade, como inibição da polimerização da tubulina, atuação no DNA, bloqueadores enzimáticos ou de microtúbulos celulares. Moléculas que atuam pelo último mecanismo citado representam grupo das substâncias mais atrativas e promissoras como anticancerígenas de aplicação clínica para grande variedade de câncer (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Os agentes hoje conhecidos com ação sobre o câncer podem ser classificados em dois grupos. O primeiro é constituído por aqueles que inibem a iniciação do processo carcinogênico e o segundo, por aqueles que inibem a proliferação celular durante as fases de promoção e progressão do câncer. No primeiro grupo pode ser citado como exemplo o chá verde, *Camellia sinensis*, podendo ter sua ação justificada pelos flavonoides e outros compostos fenólicos presentes, especialmente a 3-galato-epigalocatequina, que possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos. No segundo grupo estão os agentes supressores de câncer, cuja ação é a mais procurada no desenvolvimento de novos fármacos, pois atuam após a instalação da doença. A descoberta de novos anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Anticancerígenos podem atuar diretamente no DNA das células, ou indiretamente por inibição de funções metabólicas do DNA (BRANDÃO *et al.*, 2010). As enzimas DNA topoisomerases são enzimas que catalisam mudanças topológicas

do DNA necessárias para muitos processos celulares, tais como replicação e transcrição, por meio de quebra e rearranjo das fitas de DNA na forma correta (PIÑERO *et al.*, 1996; RIBAS *et al.*, 1996). A enzima DNA topoisomerase I, também conhecida como TOP1, promove a quebra de uma das fitas de DNA e permite o giro da fita quebrada sobre a fita intacta, de forma a reduzir a tensão torcional da molécula. Algumas substâncias, como a camptotecina, um alcaloide extraído de uma árvore ornamental chinesa, *Camptotheca acuminata* Decne. (Cornaceae), inibem a religação do DNA depois da quebra mediada pela TOP1 (BRANDÃO *et al.*, 2010). A enzima DNA Topoisomerase II (TOP2) induz a quebra das duas fitas do DNA, reduzindo a tensão torcional no DNA durante a replicação e condensação dos cromossomos nos núcleos durante a divisão da célula. A quebra é momentânea e o reparo do DNA é feito pela mesma TOP2. A função de religação da TOP2 pode ser bloqueada por inibidores dessa enzima e, como consequência, o período em que as duas fitas permanecem quebradas é mais longo e geralmente leva as células a ativarem a via da apoptose. O etoposídeo, um derivado semissintético da podofilotoxina extraída da seiva de plantas como a *Podophyllum peltatum*, possui esse mecanismo de ação (BRANDÃO *et al.*, 2010).

Outras substâncias exercem seus efeitos interagindo com proteínas e microtúbulos. Estes últimos são polímeros de proteínas componentes do citoesqueleto e essenciais em células eucarióticas para o desenvolvimento e a forma das células, para transporte de componentes, para sinalização celular e para o processo de separação dos cromossomos duplicados durante a mitose. A função desses microtúbulos na mitose e divisão celular faz dos mesmos importantes alvos para busca de agentes anticancerígenos. A vimblastina e a vincristina, isoladas das folhas da espécie *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. (Apocynaceae) agem por esse mecanismo (BRANDÃO *et al.*, 2010). Outro exemplo é a chalcona pedicina (20,50-diidroxí-30,40,60-trimetoxichalcona), isolada das folhas de *Fissistigma languinosum* (Annonaceae), cuja atividade antimitótica e citotóxica em células neoplásicas é devido a inibição do processo de montagem dos microtúbulos (ALIAS *et al.*, 1995).

Outras moléculas alvo usadas para o desenvolvimento de novas opções de tratamento são as proteínas transdutoras de sinais, as quinases, que regulam processos malignos em células. O resveratrol, por exemplo, é uma fitoalexina produzida por vários vegetais como a *Vitis vinifera* L. (Vitaceae) que afeta os estágios da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão, além de suprimir a

angiogênese e a metástase. Devido a sua estrutura fenólica, também possui comprovada atividade antioxidante, por inibição da formação de radicais livres, o que justifica a redução do estresse oxidativo e mutagênico (BRANDÃO *et al.*, 2010).

O flavopiridol é um flavonoide totalmente sintético cujo esqueleto base é o produto natural rohitukina isolado de *Dsoxylum binectarigerum* Hook. F. (Meliaceae) responsável pela atividade anti-inflamatória e imunomoduladora. O flavopiridol mostrou-se ativo na tirosina quinase, sendo um inibidor específico de quinases ciclina-dependentes (Cdk). Estas moléculas estão desreguladas em células cancerosas, o que contribui para a resistência do tumor aos agentes citotóxicos, incluindo a radiação. Portanto, inibidores destas aumentam a eficácia de quimioterápicos e tratamentos por radiação em inúmeros tipos de células tumorais. Apesar de resultados pré-clínicos promissores, a atividade clínica observada para o flavopiridol em tipos variados de câncer foi menor que a esperada (BRANDÃO *et al.*, 2010).

2.8 Atividade antiproliferativa

A atividade antiproliferativa é considerada um parâmetro para a detecção da atividade antitumoral (RAMIREZ-MARES *et al.*, 2004). Os ensaios de atividade antiproliferativa podem ser desenvolvidos em várias metodologias: contagem celular, ensaios clonogênicos, medida de incorporação de nucleotídeos radioativos ou métodos colorimétricos (HENRIKSSON *et al.*, 2006). Na maior parte dos métodos colorimétricos, a taxa de crescimento e multiplicação é medida indiretamente por algum indicador de crescimento por meio do aparecimento de coloração, cuja intensidade é diretamente proporcional ao número de células presentes (HOUGHTON *et al.*, 2007).

Existem diferentes tipos de ensaios colorimétricos que utilizam corantes como (HENRIKSSON *et al.*, 2006):

- cristal violeta, cuja função é detectar células vivas;
- sais de tetrazólio (MTT ou Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio e o XTT ou hidróxido de 2,3-bis(2-metóxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[fenilamina)carbonil]-2H-tetrazolio, que detecta células metabolicamente ativas;

- *alamar blue*, que quantifica a viabilidade das células, extremamente estável e não tóxico para as células, considerado teste superior ao MTT;
- SRB ou sulforrodamina B, que cora proteínas dentro das células.

2.8.1 Ensaio colorimétrico com sulforrodamina B

O teste da sulforrodamina B (SRB) é um método simples, sensível, reprodutível e rápido para avaliação da atividade antiproliferativa (VICHAI e KIRTIKARA, 2006). O SRB é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfônicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos de proteínas. O teste se baseia na habilidade da SRB se ligar a componentes proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético, independentemente da atividade metabólica das células. Estima indiretamente o número de células presentes corando o total de proteína celular (SKEHAN *et al.*, 1990). É mais prático que o teste MTT, pois permite a leitura do resultado horas depois do ensaio e não necessariamente imediatamente como no ensaio do MTT (HOUGHTON *et al.*, 2007). A superioridade do método SRB em relação ao MTT foi descrita por Keepers *et al.* (1991).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades melanogênica, genotóxica e antiproliferativa de extratos de *Brosimum gaudichaudii* e *Dorstenia brasiliensis* induzidas por radiação UVA.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da presente pesquisa são:

- a) Realizar análise farmacognóstica de duas espécies do Cerrado: *Brosimum gaudichaudii* e *Dorstenia brasiliensis*;
- b) Quantificar o teor de furanocumarinas em percolados e extratos;
- c) Obter perfil cromatográfico das tinturas e extratos;
- d) Avaliar a atividade antiproliferativa dos extratos *in vitro* em células de melanoma;
- e) Avaliar a citotoxicidade dos extratos *in vitro* em células normais;
- f) Avaliar a ativação da melanogênese dos extratos em células de melanoma;
- g) Avaliar genotoxicidade *in vivo* dos extratos em *Drosophila melanogaster*;
- h) Comparar as atividades biológicas dos extratos, descritas acima, na presença e ausência de UVA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solventes, padrões e equipamentos

O psoraleno e o 5-metoxipsoraleno (99% de pureza) foram adquiridos da *Sigma Chemical*. O 8-metoxipsoraleno (Metoxalen - *Pharmacopeia Americana* com mínimo 98% de pureza) foi fornecido pela DEG importadora de produtos químicos por meio da Farmácia Vide Vida. Os solventes empregados para extração foram de grau analítico Dinâmica® e os solventes empregados em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD) foram grau CLAE (Darmstadt, Alemanha). A água utilizada foi tratada pelo sistema Milli-Q (Millipore).

A trituração das amostras coletadas foi realizada em micromoinho elétrico TECNAL 648. Os percolados foram obtidos em percoladores de vidro com capacidade para 1 e 2 litros. A evaporação do etanol foi realizada em evaporador rotatório FISATOM modelo 802A acoplado a banho-maria FISATOM modelo 550 e bomba a vácuo FAMAC 56. Os extratos foram liofilizados em aparelho *Edwards* com bomba a vácuo R8 e pesados em balança analítica BIOPRECISA FA-2104N (precisão 0,0001g).

Nas análises por cromatografia em camada delgada (CCD) foram utilizadas placas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Merck.

As análises qualitativas e quantitativas por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo *Shimadzu*, com sistema de solvente binário – Modelo LC-20AD – combinado com um detector com arranjo de fotodiodos – Modelo SPD-M20A (*Shimadzu*). Um computador equipado com o programa *LabSolutions* foi usado para preparar os cromatogramas e medir a área dos picos. A separação dos psoralenos por CLAE foi realizada utilizando uma coluna de fase reversa *Shimadzu* octadecil *Shim-pack* CLC-ODS de 25 cm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno e diâmetro de partícula de 5 µm com uma pré-coluna (2,5 cm x 4,6mm) contendo mesma fase.

Para análise dos extratos por cromatografia em fase gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM) foi utilizado cromatógrafo *Shimadzu* 17 combinado

com detector seletivo de massa – Modelo QP 5000 (*Shimadzu*). A separação dos picos foi realizada utilizando uma coluna LM-5 (5% fenil 95% dimetilpolisiloxano) de 15 m de comprimento; 0,2mm de diâmetro interno e espessura do filme de 0,2 µm.

Além dos equipamentos já citados, empregaram-se também nos ensaios desenvolvidos: banho-maria FANEM modelo 100; capela de fluxo laminar LABCONCO *Purifier Class II Biosafety*; centrífuga CELM LS-3 plus; centrífuga EPPENDORF 5415D; centrífuga SIGMA 2K15 (4°C); fitas UV-Tec para medição de dose de irradiação ultravioleta UVA e UV-Vis (320 - 420 nm), da UV-Tec *Messtechnik*, Alemanha (Figura 13); incubadora HEPA *Class 100*; leitor de Microplacas THERMO PLATE, *TP-Reader*, microscópio AXIOVERT 40C; vortex BIOMIXER QL-901.

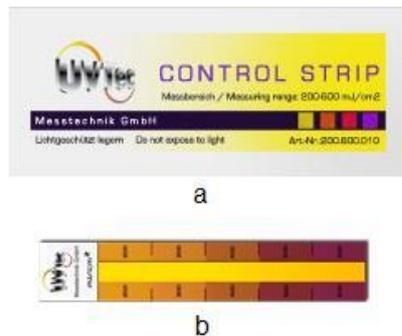


Figura 13 – Embalagem (a) contendo uma fita (b) para medição de dose de irradiação ultravioleta UVA e UV-Vis (320 - 420 nm), da UV-Tec *Messtechnik*, Alemanha.

Fonte: <http://www.uv-tec.de/sites/en/index.php?page=produkte>

4.2 Material vegetal

Amostras de raiz de um indivíduo de *B. gaudichaudii* (Figura 14) foram coletadas no Parque dos Poderes, em terreno arenoso, no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, em agosto de 2008. Amostras de partes subterrâneas (rizomas + raízes) de uma centena de indivíduos de *D. brasiliensis* (Figura 15) foram coletadas na região do “Inferninho”, em região de terra vermelha, também no município de Campo Grande. Ambas as amostras foram coletadas de indivíduos com flores e/ou frutos. A identificação das espécies foi realizada pelo Dr. Arnildo Pott e o material testemunha depositado no Herbário da Universidade

Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande (CGMS), Mato Grosso do Sul, Brasil sob a numeração 22325 e 22883, respectivamente.



Figura 14 – Fotografia do espécime de *Brosimum gaudichaudii* do qual foi coletada amostra da raiz. A, local de coleta; B, frutos; C, raiz exposta.

Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

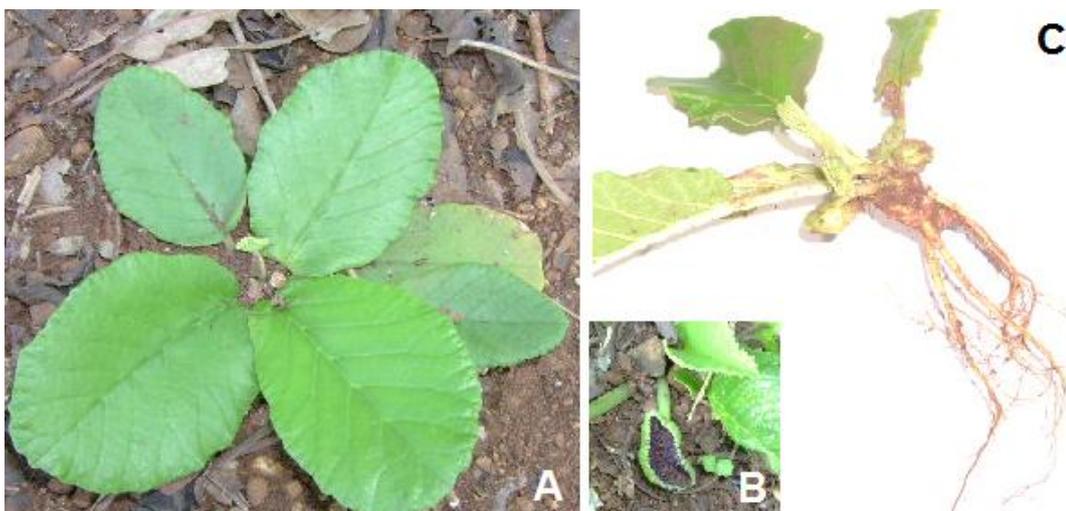


Figura 15 – Fotografia de um dos espécimes de *Dorstenia brasiliensis* do qual foram coletados o rizoma e a raiz. A, local de coleta; B, detalhe da inflorescência discoide; C, espécime com as partes subterrâneas expostas.

Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

A amostra da raiz de *Brosimum gaudichaudii*, coletada de modo a não prejudicar o desenvolvimento do indivíduo, foi lavada em água corrente e, em seguida, sua casca foi separada, manualmente, com auxílio de faca de aço inox. As partes subterrâneas de *Dorstenia brasiliensis* coletadas não foram lavadas em água corrente, devido a seu pequeno tamanho e muitas ramificações, pois a água poderia ficar retida sobre a amostra, alterando resultado da porcentagem de umidade. Foi realizada apenas uma delicada retirada da terra aparente na amostra. Em seguida, as amostras foram secas em estufa com circulação de ar à temperatura de 40°C até peso constante e trituradas em micromoinho elétrico até pó grosso segundo a USP 23, ou seja, 100% < que 0,840 µm e 40% ≤ 250µm.

Os ensaios para determinação de umidade e cinzas totais foram realizados empregando-se as técnicas descritas pela Farmacopeia Brasileira IV. As pesagens de cada ensaio foram repetidas até estabilização do peso e os resultados foram expressos em porcentagens após cálculo da média e desvio padrão de três determinações.

A determinação de umidade foi efetuada com as amostras pulverizadas (3 g) utilizando aquecimento em estufa 105°C, durante 5 horas. O teor de cinzas foi adquirido a partir de 3 g carbonizada em fogo direto e incinerada em mufla a 450°C, durante 5 horas, até peso constante.

Os aspectos relacionados a cor, odor, textura, dentre outros, foram descritos para as amostras frescas e secas, antes e após a pulverização. Parte do material pulverizado de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* foi submetido à extração por percolação com etanol-água 7:3. Esta proporção dos solventes foi encontrada em ensaios preliminares. A proporção vegetal/eluente utilizada foi de 1:5 com a produção de aproximadamente 20 gotas de percolado por minuto, totalizando um período de aproximadamente 48 horas de percolação para *B. gaudichaudii* e 12 horas para *D. brasiliensis*.

Parte dos percolados foi armazenada a 4°C em vidro âmbar para análises posteriores. Os percolados foram então levados a evaporador rotatório a 40 °C e as soluções aquosas resultantes foram levadas ao liofilizador. Devido à formação de bolhas e projeção dos conteúdos durante a liofilização, foi necessário o congelamento das amostras na parede dos recipientes que as continham antes de serem colocadas no liofilizador. O procedimento foi realizado submergindo os recipientes com as amostras em acetona com pedras de gás carbônico sólido,

realizando movimentos rotatórios para que as amostras congelassem com espessura homogênea em toda a superfície dos recipientes. As amostras foram mantidas no liofilizador por 48 horas. Todos os experimentos foram repetidos pelo menos em duplicata (Figura 16).

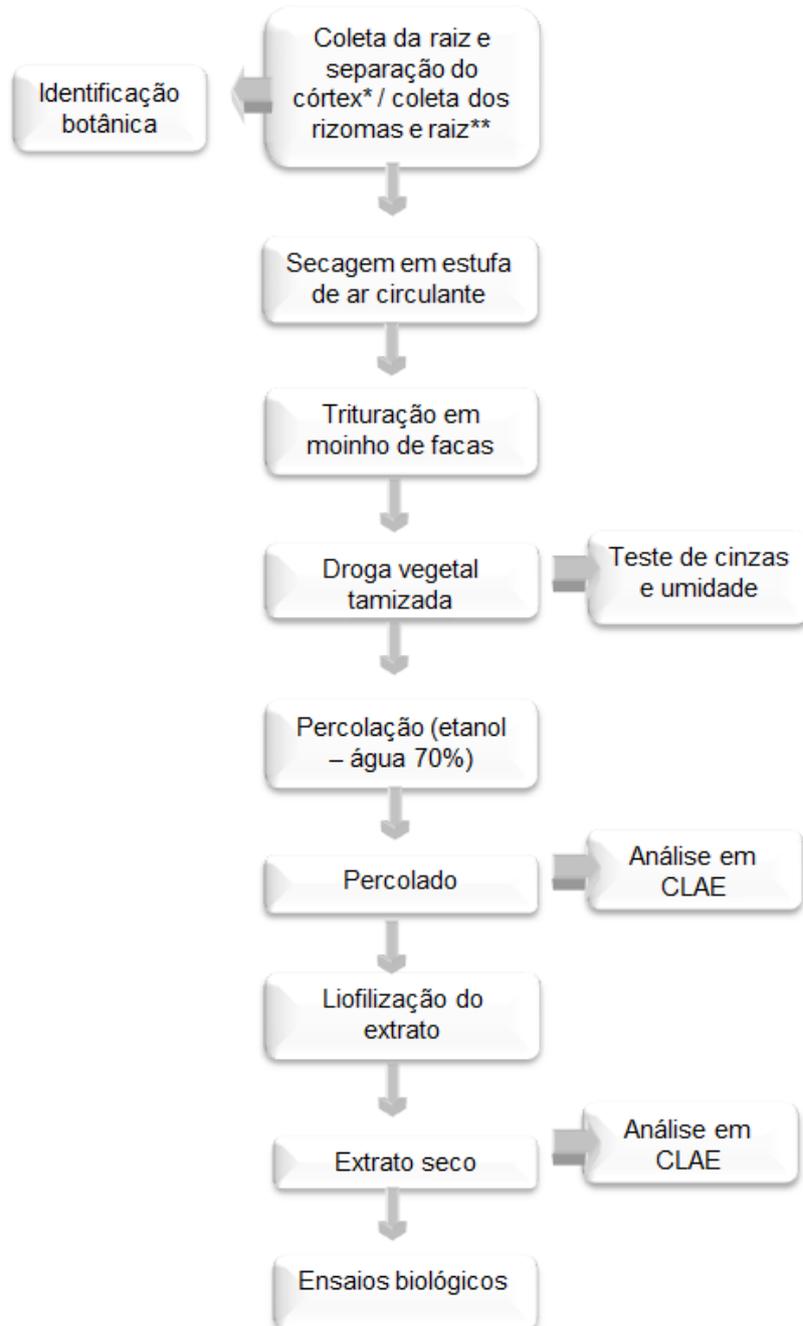


Figura 16 – Esquema simplificado representando o processo de coleta, processamento e extração dos farmacógenos de ambas as espécies do estudo.

* de *Brosimum gaudichaudii*; ** de *Dorstenia brasiliensis*.

4.3 Avaliação cromatográfica

Foram testados vários eluentes para obtenção do perfil em cromatografia em camada delgada (CCD). O eluente que se demonstrou mais adequado foi a mistura tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60:40:3) (DALL'STELLA, 2008), pois este sistema permitiu um melhor espaçamento entre as manchas dos padrões e a distinção de colorações das furanocumarinas. A revelação mais adequada, pelas mesmas razões, foi a revelação com KOH 5% seguida de visualização com luz UVA em 365 nm.

Para análise CLAE-DAD, os percolados foram dissolvidos em etanol-água 7:3 na proporção de percolado / eluente 1:20 (v/v) para *B. gaudichaudii* e 1:100 (v/v) para *D. brasiliensis*. Os extratos foram dissolvidos em etanol-água 7:3 na proporção de extrato / eluente 1:1 (m/v). Todas as amostras foram levadas a sonicação por 10 minutos, filtradas em filtro Millex de 0,45µm para posterior injeção em CLAE.

Para avaliação quantitativa de psoraleno e 5-MOP nos percolados e extratos foi utilizada uma condição isocrática, com eluente acetonitrila-água 55:25 (v/v), fluxo de 1 mL / minuto, tempo de análise de 15 minutos em comprimento de onda de 223 nm (PIRES *et al.*, 2004).

As quantificações de psoraleno e 5-MOP nas amostras foram realizadas por meio de curva de calibração externa. Os padrões foram dissolvidos separadamente em metanol grau CLAE para obter soluções de estoque, e em seguida diluídas para concentrações entre 0,10 µg/mL e 202,00 µg/mL e analisadas em CLAE. Cada determinação foi realizada cinco vezes. Para cada padrão, um cromatograma correspondente foi obtido e um gráfico foi construído relacionando área e concentração.

Os coeficientes de correlação foram determinados por meio da regressão linear da curva de calibração. Os parâmetros da equação (inclinação e intercepto) de cada curva padrão foram utilizados para obter os valores de concentração para as amostras. As análises foram iniciadas no Centro de Pesquisa em Biodiversidade da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, MS, sob a supervisão da Profa. Dra. Cláudia Andréa Lima Cardoso e continuaram no Laboratório de Farmacognosia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, sob a supervisão do Prof. Dr. Carlos Alexandre Carollo.

Para obtenção do perfil cromatográfico em CLAE-DAD dos percolados e extratos de *D. brasiliensis* e *B. gaudichaudii*, a condição gradiente mais adequada partia de um aumento gradiente da relação entre os solventes metanol – água de 15:85 (v/v) para 100:0 (v/v) em 40 minutos, voltando à condição inicial em 10 minutos, totalizando um tempo de 50 minutos com fluxo de 0,9 mL / minuto em comprimento de onda de 254 nm.

Para avaliação de outros constituintes dos extratos foi utilizado o cromatógrafo em fase gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM) com temperatura da interface e do injetor de 280°C, modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV). O gás de arraste utilizado foi Hélio com fluxo de 0,6 mL / minuto. A temperatura da coluna iniciou-se com 150°C, com aquecimento de 10°C por minuto até 240°C e em seguida de 5°C por minuto até 280°C, temperatura esta em que permaneceu por 20 minutos, totalizando 35 minutos de análise. As análises foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS.

4.4 Teste da atividade antiproliferativa

O teste da atividade antiproliferativa foi realizado no Laboratório de Cultura de Células e Biologia Molecular da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a supervisão da Profa Dra. Maria de Fatima Cepa Matos. Para a avaliação da atividade antiproliferativa foi utilizada a linhagem de células neoplásicas B16-F10 (ATCC – CRL-6322, células de melanoma murino) doada pelo Prof. Dr. Auro Nomizo da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Também foi utilizada uma linhagem de células normais, VERO (ATCC – CCL-81, de rim de macaco verde africano) adquirida do Instituto Adolpho Lutz, São Paulo para a determinação do índice de seletividade.

Todo o procedimento para o manuseio das células foi realizado conforme Freshney (2005). As células estavam mantidas em nitrogênio líquido e para os testes foram descongeladas e cultivadas em frascos estéreis em meio de cultura RPMI 1640 para B16-F10 e meio mínimo essencial modificado por *Dulbecco* (DMEM) para células VERO, suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 50 µg de

gentamicina / mL (Europharma) (meio completo). Em seguida foram colocadas a 37 °C em atmosfera úmida contendo CO₂ (5%).

Uma vez que as células são aderentes, foi feita a remoção com solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo meio de cultura completo. Após centrifugação a baixa rotação, o meio com tripsina foi desprezado e as células ressuspensas em pequeno volume de meio completo.

A contagem de células viáveis foi feita com *Trypan Blue*[®] em Câmara de Neubauer. A suspensão de células foi preparada para que em cada cavidade da placa de 96 poços fosse depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 células/cavidade. As placas foram estabilizadas por incubação por 24 h a 37 °C na incubadora de CO₂. Com as células já aderidas, uma alíquota de cada fração das amostras-teste: extrato de *B. gaudichaudii* (chamado neste estudo de EBG), extrato de *D. brasiliensis* (chamado de EDB), psoraleno, 5-MOP e o controle positivo 8-MOP, previamente dissolvidas em DMSO foram diluídas em meio de cultura com a maior concentração utilizada de 0,4%. Foram utilizadas 4 concentrações de cada amostra-teste ou controle positivo (0,25; 2,5; 25 e 250 µg/mL), sendo cada uma adicionada em 3 cavidades (triplicata). Na coluna 1, denominada controle negativo, as células foram cultivadas na ausência de qualquer amostra-teste.

Após 30 minutos da adição dos extratos EBG e EDB, de psoraleno, 5-MOP e 8-MOP, a placa foi irradiada com luz UVA 365nm em toda sua extensão (Lâmpada Mineralight UVGL-25). Para a padronização da dose de irradiação UVA foram utilizadas fitas de medição de luz UV. A dose padronizada foi de 940 mJ/cm², com irradiação de 1,04 mW/cm² por 15 minutos a uma distância de 3 cm do conteúdo das cavidades com a placa de cultura com a tampa (Figura 17).



Figura 17 – Uma das placas do experimento de avaliação da atividade antiproliferativa dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* e de *Dorstenia brasiliensis*, de psoraleno, 8-metoxipsoraleno e 5-metoxipsoraleno em células B16-F10 (melanoma murino) sendo irradiada com luz UVA 365nm.

Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

Para avaliar a ação dos compostos na ausência da luz UVA, uma segunda placa foi semeada nas mesmas condições acima, e nesta não foi feita a irradiação da luz.

Todas as placas voltaram para a incubadora a 37 °C, onde permaneceram até o final do período de exposição das células às amostras-teste (48 h).

As células foram então fixadas com ácido tricloroacético 40% por 30 minutos a 4°C e coradas com SRB, que tem como princípio a coloração das proteínas de membrana celular (SKEHAN *et al.*, 1990).

Na última etapa deste método foi utilizado o tampão Tris Base 10 mM, que solubiliza o corante ligado às proteínas de membrana das células fixadas. Em seguida as placas foram submetidas à agitação por 10 minutos para dissolução das proteínas coradas. A leitura foi realizada em leitor óptico de microplacas em 540nm.

Foram obtidas as absorvâncias da amostras-teste (T), do controle negativo (CN), do branco das amostras-teste (B) e do início da incubação, ou seja, antes da adição das amostras-teste (T₀).

Usando essas absorvâncias, a resposta celular à incubação com as amostras-teste pode ser um estímulo do crescimento celular, uma inibição do crescimento, ou ainda, não ocorrer nenhum efeito da amostra-teste sobre as células.

Se $T > CN$ a amostra-teste estimulou o crescimento celular. Se $T \geq T_0$ e $< CN$, a amostra-teste inibiu o crescimento celular, ou seja, houve um efeito citostático. Para estas condições, o cálculo do crescimento celular (%) é realizado pela fórmula $100 \times [(T - T_0) / (CN - T_0)]$ (MONKS *et al.*, 1991).

Se $T < T_0$, a amostra-teste induziu morte celular, ou seja, efeito citocida e pode ser calculada por $100 \times [(T - T_0) / T_0]$ (MONKS *et al.*, 1991).

Com os valores do crescimento celular (%) em todas as concentrações das amostras-teste, foram elaborados gráficos por regressão não linear, tipo sigmoidal empregando-se o programa de análise de dados *Origin 6.0*. Os valores abaixo de 100% e acima de zero representam inibição de crescimento, enquanto os valores negativos representam morte celular.

A partir dos gráficos, três níveis de efeito são calculados: 1) concentração da amostra-teste que causa 50% de inibição do crescimento celular (IC₅₀), ou seja, quando a concentração reduz em 50% a quantidade de proteínas em relação ao controle negativo durante o período de incubação; 2) concentração que causa inibição total do crescimento (TGI - *total growth inhibition*), ou seja, a concentração

que faz com que a quantidade de proteína no fim da incubação com a amostra-teste seja igual à quantidade do começo e; 3) concentração que causa 50% de morte celular (LC_{50}), ou seja, concentração que causa 50% de morte celular (MONKS *et al.*, 1991).

Amostras-teste com $GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ foram consideradas ativas (ITARATH *et al.*, 2004). O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) em seu programa de triagem de drogas anticâncer considera forte atividade antineoplásica valores $GI_{50} \leq 4,0 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1991). Fouche *et al.* (2008) adotam o critério do Conselho de Pesquisa Científica e Industrial na África do Sul (CSIR), que considera uma droga com atividade anticâncer moderada se $6,25 \mu\text{g/mL} < TGI < 15 \mu\text{g/mL}$ em pelo menos duas linhagens de células neoplásicas. No presente trabalho, os compostos foram considerados inativos quando $GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$.

O índice de seletividade (IS) pode indicar a seletividade de um composto entre uma linhagem neoplásica e uma normal, indicando o potencial uso deste composto em testes clínicos. Assim, neste estudo, o IS corresponde à divisão entre o valor da GI_{50} de cada composto-teste na linhagem de células normais VERO e o valor da GI_{50} de cada composto na linhagem de células neoplásicas. ($IS = GI_{50} \text{ VERO} / GI_{50} \text{ células neoplásicas}$). Foi considerado significativo um valor de IS maior ou igual a 2,0 (HOUGHTON *et al.*, 2007), ou seja, este valor significa que o composto é duas vezes mais ativo na linhagem de células neoplásicas B16-F10 do que em células normais (VERO).

4.5 Padronização dos ensaios de ativação da melanogênese

Para a avaliação da melanogenicidade dos extratos foram padronizados dois ensaios: de dosagem de melanina e de avaliação da ativação da tirosinase em células de melanoma murino (B16-F10) na presença e ausência de UVA. Também foram realizados experimentos apenas com a irradiação de UVA sobre as células para avaliar a atividade melanogênica da UVA na ausência dos compostos.

Como controle positivo foi utilizado o 8-MOP em concentração que permitia o crescimento celular de aproximadamente 70% das células segundo resultados

obtidos no teste de atividade antiproliferativa (0,25 µg/mL), já que em concentrações maiores a atividade antiproliferativa elevada não permitia avaliação da atividade celular de síntese de melanina e tirosinase pela alta taxa de inibição do crescimento celular.

As concentrações dos extratos foram determinadas de acordo com a quantidade de furanocumarinas presentes, de forma que a concentração de psoraleno + 5-MOP em cada amostra fosse equivalente a 0,25 µg/mL, para melhor comparação com o controle positivo. Essas condições visaram avaliar se o estímulo à melanogênese estaria vinculado apenas às furanocumarinas ou se haveria interação sinérgica aditiva ou antagônica entre os componentes dos extratos. O 5-MOP também foi utilizado na mesma concentração (0,25 µg/mL).

Foram testadas várias quantidades de células de melanoma murino (B16-F10) para o ensaio com cada amostra testada e controle positivo: 10^4 ; 10^5 , 2×10^5 , 10^6 , 2×10^6 e 5×10^6 . A escolha da quantidade de células buscou obter resultados com valores de absorvância mensuráveis e reprodutivos nas repetições dos ensaios. Foram utilizadas placas de 96, 24, 12 e 6 poços segundo a quantidade de células. O uso da placa de 6 poços permitiu o teste com maior número de células por cavidade, que se mostraram bem aderidas após as 24 horas de incubação.

O cultivo e manutenção da linhagem foram os mesmos realizados para o teste de atividade antiproliferativa. Para ambos os experimentos de avaliação da melanogenicidade, foi padronizada a placa de 6 poços contendo 2.500.000 células/cavidade. Para avaliação de cada amostra-teste ou controle positivo foram utilizadas 5.000.000 células, ou seja, 2 cavidades para se obter resultados reprodutivos (Figura 18). Foram adicionados às cavidades 2,5 mL de meio RPMI com 50 µL/mL de gentamicina e após 24h, adicionados mais 2,5 mL de meio no controle negativo e 2,5 mL das amostras-teste ou controle positivo diluídos em meio com no máximo 0,4% de DMSO.

Foi incidida luz UVA 365nm 30 minutos após a adição da droga com irradiância de $1,04 \text{ mW/cm}^2$ a uma distância de 3 cm, com dose de irradiação total de 940 mJ/cm^2 .

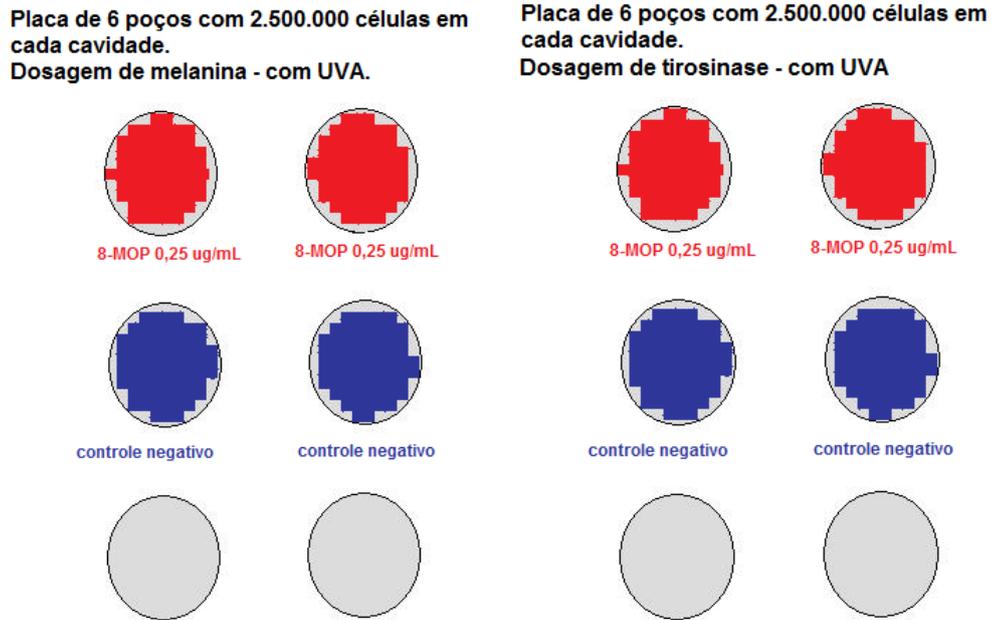


Figura 18 – Esquema representando o conteúdo das cavidades da placa de 6 poços utilizada para avaliação da melanogenicidade do 8-metoxipsoraleno (8-MOP) na presença de UVA e seu correspondente controle negativo.

As células com o meio foram coletadas por meio de “*Scrape*” e centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. Foi adicionado 1 mL de PBS gelado sobre o *pellet*, realizada a homogeneização e nova centrifugação a 3000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e o procedimento de lavagem com PBS repetido. O mesmo procedimento descrito foi realizado para obtenção do *pellet* para dosagem de melanina ou para dosagem da ativação da tirosinase.

Para dosagem de melanina, foi padronizada a adição de 200 μ L de NaOH 1M (para romper as células e solubilizar a melanina) sobre o *pellet* e realizada a homogeneização. Foram testados vários procedimentos para solubilização da melanina: utilização do vortex por 30 minutos (GUAN *et al.*, 2008), incubação por 1 hora a 80°C (IM *et al.*, 2003) e permanência em temperatura ambiente por 16h (MATSUDA *et al.*, 2004). Mostraram-se mais reprodutivos os resultados obtidos com a mistura sendo mantida por 16h em temperatura ambiente. Em seguida, realizou-se a centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos para clarificar o sobrenadante. Para a leitura da absorbância foram testados um espectrofotômetro com cubeta de quartzo com volume para 1 mL e um leitor de microplacas e os comprimentos de onda de 475 nm (IM *et al.*, 2003, MATSUDA *et al.*, 2004) e 492nm (GUAN *et al.*, 2008) com a subtração da absorbância do branco de cada valor de absorbância obtida. O

conteúdo de melanina das células B16-F10 cultivadas sem as amostras-teste foi correspondente ao valor controle de 100% (GUAN *et al.*, 2008).

Leituras mais reprodutivas foram encontradas no uso do leitor de microplacas em 492nm. A ativação da melanogênese foi calculada a partir da relação do teor de melanina das amostras-teste e do controle positivo com o controle negativo, considerando os seus correspondentes desvios padrão em três experimentos independentes.

Para dosagem da ativação da tirosinase, foi testada a diluição do *pellet* em solução de PBS e em misturas de PBS com Triton e PMSF e os volumes de 100, 150 e 200 μ L. Foram obtidos resultados mais homogêneos na adição de 150 μ L de PBS Triton 0,2% PMSF 1mM sobre o *pellet*. Após a homogeneização das células do pellet com a referida solução, a mistura foi congelada em nitrogênio líquido e posteriormente mantida a - 20 °C durante 24 horas. Após este período, as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente, centrifugadas a 13000 rpm por 30 minutos a 4°C conforme Im *et al.* (2003). Ao sobrenadante foram adicionados vários volumes da enzima L-DOPA 6mmol/L, sendo o volume de 150 μ L escolhido por obter maior absorvância após o final do ensaio. A mistura de células em PBS + Triton + PMSF em contato com a solução aquosa de L-DOPA foi mantida a 37°C por 1 hora (GUAN *et al.*, 2008). Após a reação, o conteúdo teve sua absorvância lida no leitor de microplacas a 492 nm conforme Guan *et al.* (2008) e em 475 nm conforme Im *et al.* (2003) com a subtração da absorvância do branco de cada valor de absorvância obtida. O melhor comprimento de onda para obtenção de dados reprodutíveis foi 492 nm e a ativação da tirosinase foi expressa segundo a equação: % ativação = $(A - B)/B \times 100\%$, onde *A* representa a absorvância do composto teste, e *B* a absorvância do controle negativo (GUAN *et al.*, 2008).

4.6 Avaliação da atividade genotóxica

Para aumentar o conhecimento sobre o potencial genotóxico e os mecanismos mutagênicos associados aos extratos EBG e EDB, esses compostos foram avaliados por meio do ensaio SMART com adaptações, utilizando linhagens de *Drosophila melanogaster* que apresentam genes marcadores recessivos para o

número de pelos (*mwh*) e para a forma do mesmo (*flr³*). Estes marcadores permitem quantificar os danos ocasionados ao DNA das células somáticas das asas de *D. melanogaster*. Este teste pode detectar um conjunto diversificado de eventos mutacionais, como mutações pontuais, deleções e certos tipos de aberrações cromossômicas, assim como de recombinação mitótica (GRAF *et al.*, 1984).

Na análise das lesões induzidas, pode-se contabilizar o número total de manchas ou o tipo de mancha encontrada, sendo que o primeiro aspecto fornece dados quantitativos, enquanto que o segundo elucidada quanto ao tipo de lesão ocorrida. As manchas simples pequenas correspondem a mutação dos pelos de 1 ou 2 células vizinhas e as manchas simples grandes correspondem a mutação dos pelos de 3 ou mais células vizinhas, ambas as manchas contendo apenas um tipo de mutação, na forma de pelos múltiplos ou pelo em forma de “chama de vela”. As manchas gêmeas correspondem à mutação de células contendo pelos múltiplos e em célula vizinha o pelo em forma de “chama de vela”, independente do número de células vizinhas mutadas (GRAF *et al.*, 1984).

Para este ensaio, foram utilizados dois diferentes cruzamentos valendo-se dos marcadores para a forma dos pelos das asas (Figura 19):

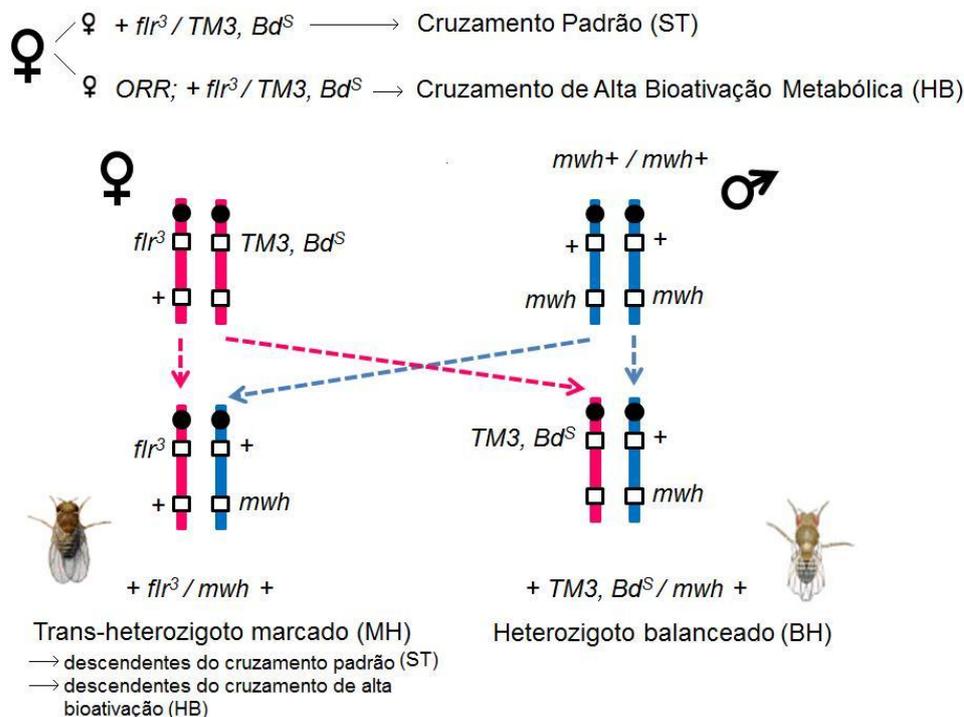


Figura 19 - Esquema representativo de cruzamento padrão e de cruzamento de alta bioativação metabólica em *Drosophila melanogaster*.

Fonte: adaptada de Graf *et al.*, 1984.

1) Cruzamento padrão (*Standard cross* – *ST*): fêmeas virgens da linhagem *flare* (*flr*), com genótipo *flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* (abreviado como *flr³/TM3, Bd^S*) foram cruzadas com machos da linhagem *multiple wing hairs* (*mwh*), com genótipo *mwh/mwh*.

2) Cruzamento de alta bioativação metabólica (*High bioactivation cross* – *HB*): fêmeas virgens da linhagem *ORR/flare* (*ORR/flr*), com genótipo *ORR/ORR; flr³/ln(3LR)TM3, ri p^p sep I(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* (abreviado como *ORR; flr³/TM3, Bd^S*) foram cruzadas com machos *mwh/mwh*. A linhagem *ORR/flare* possui os cromossomos 1 e 2 provenientes da linhagem *Oregon R* (*R*), resistente ao pesticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), contendo genes responsáveis por alto nível de enzimas de metabolização do tipo citocromo P(CYP)6 A2 (GRAF; SCHAIK, 1992). A comparação entre os resultados de ambas as linhagens permite avaliar a presença de compostos mutagênicos ativados ou inativados *in vivo* pela metabolização enzimática.

De ambos os cruzamentos foram coletados ovos por um período de 8 horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% em água) e uma camada de fermento de padaria (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementado com açúcar. Após 72 horas \pm 4 horas, larvas de 3^o estágio foram lavadas com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de larvas foram transferidos para tubos de ensaio e em seguida foi adicionado um volume de 3 mL de água contendo um dos extratos ou o 8-MOP, previamente dissolvidos em Twin-80 e etanol, de tal forma que a concentração final destes não excedesse 0,2 e 0,5 % respectivamente. Foram utilizadas três concentrações de cada extrato (0,4; 0,8; 1,6 mg/mL) e três do 8-MOP (0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL). Após 30 minutos da adição dos extratos e do 8-MOP, os conteúdos das cavidades receberam tratamento UVA 365 nm (Lâmpada Mineralight UVGL-25) por 15 minutos com irradiância de 1,04 mW/cm² a uma distância de 3 cm, com concentração de irradiação total de 940 mJ/cm². A padronização foi realizada com auxílio das fitas de medição de luz UV. No controle negativo, as larvas foram expostas ao mesmo volume de água contendo Twin-80 e etanol (0,2 e 0,5% respectivamente) e tratadas com UVA. Para avaliar a atividade mutagênica dos compostos na ausência da luz UVA, o mesmo experimento foi realizado sem irradiação da luz. Logo em seguida, os conteúdos dos tubos de ensaio foram transferidos para frascos de vidros contendo 1,5g de meio de cultura alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®). Adultos emergentes portadores dos

dois tipos de genótipos $mwh + / + flr^3$ (trans-heterozigoto marcado – MH) e $mwh + / + TM3, Bd^S$ (heterozigoto balanceado – BH) foram coletados e fixados em etanol 70%.

As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure e analisadas quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400x. Foram realizados 3 experimentos independentes (Figura 20) em dois protocolos de tratamentos: na presença e na ausência de irradiação UVA, totalizando 1600 asas analisadas. Para o preparo da curva de sobrevivência, foram contados os indivíduos vivos após 7 dias provenientes do experimento realizado com 20 larvas.

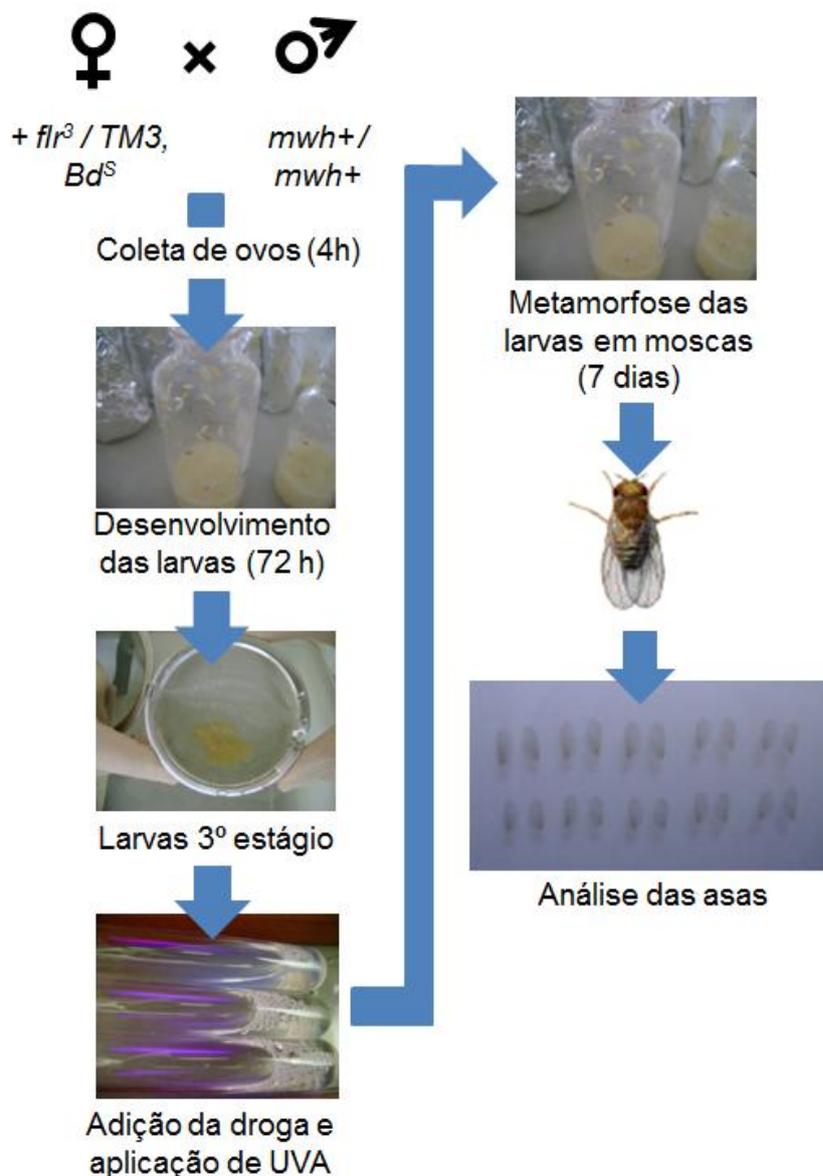


Figura 20 – Esquema com fotografias ilustrando a metodologia do teste SMART utilizado com adaptações para o estudo.

Fonte: QUEVEDO AEP, 2011.

A análise da superfície dorsal e ventral das asas considera o número de manchas que fornece dados quantitativos e o tipo de mancha que permite identificar o evento genotóxico induzido. Manchas simples que expressam apenas um dos genes mutantes, *flr³* ou *mwh*, indicam a ocorrência de mutação gênica e/ou cromossômica, bem como recombinação. Entretanto, manchas gêmeas formadas por células adjacentes expressando os fenótipos *flr³* e *mwh* originam-se, exclusivamente, de eventos recombinacionais (GRAF *et al.*, 1984). A distinção entre manchas simples pequenas (1-2 células mutantes) e manchas grandes (3 ou mais células mutantes) é importante porque as primeiras são formadas durante o último e/ou penúltimo ciclos de divisão mitótica que estão ocorrendo na pupa, enquanto que as grandes são produzidas mais cedo, durante o desenvolvimento da larva. As manchas simples pequenas são originadas por mutações cromossômicas (aneuploidia) e/ou grandes deleções, independente do tempo em que elas foram induzidas, já que essas células apresentam uma baixa taxa de divisão celular (GRAF *et al.*, 1984).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Material vegetal

A seleção da casca da raiz de *B. gaudichaudii* como parte da planta a ser estudada deve-se a análises anteriores no caule, folhas e raízes que permitiram verificar que mais de 99% das furanocumarinas se encontravam na raiz, menos de 0,01% no caule e estavam ausentes nas folhas. Além disso, mais de 90% das furanocumarinas presentes na raiz se encontram na casca (PIRES, 2004). As partes subterrâneas de *D. brasiliensis* foram selecionadas para o estudo baseado nas indicações etnomédicas (ALICE *et al.*, 1995; ALMEIDA, 1993). Além disso, as partes subterrâneas são detentoras de mais de 50% da massa total de cada indivíduo.

O porte arbustivo ou arbóreo de *B. gaudichaudii* em contraposição ao porte rasteiro de *D. brasiliensis* apoia a escolha do segundo como fonte de extratos contendo furanocumarinas. Além disso, em *D. brasiliensis* há maior facilidade de obtenção da parte da planta utilizada, menor tempo para obtenção de novos indivíduos adultos e facilidade de reprodução, permitindo uma extração sustentável e a possibilidade de se obter matérias-primas mais uniformes por meio de técnicas de domesticação da espécie. Segundo Viu *et al.* (2007), o uso e a coleta indiscriminados do córtex da raiz de *B. gaudichaudii* podem acelerar seu processo de extinção ou a erosão genética da espécie.

Em relação às características organolépticas, ambas as amostras frescas das espécies apresentaram odor adocicado característico de figo. A casca da raiz de *B. gaudichaudii* fresca e após a secagem possui coloração marrom-avermelhada, tendo na sua porção interna (antes em contato com o cerne) coloração esbranquiçada, que vai adquirindo tons esverdeados 2 horas após a coleta. As partes subterrâneas de *D. brasiliensis* possuem coloração marrom escuro antes e após a secagem, sendo as colorações mantidas após a pulverização.

A secagem da casca da raiz de *B. gaudichaudii* eliminou 74,7% do seu peso inicial, resultando em 1090 g. Das partes subterrâneas de *D. brasiliensis*, também secas, obteve-se 251 g de material. Os resultados dos testes de cinza e

umidade para *B.gaudichaudii* e *D. brasiliensis* foram $6,11 \pm 0,16$ % e $10,55 \pm 0,05$ % de cinzas totais e $15,93 \pm 0,61$ % e $15,65 \pm 0,31$ % de umidade, respectivamente.

5.2 Preparo dos percolados e extratos

Parte dos 1090 g de material pulverizado de *B. gaudichaudii* e dos 251 g de material de *D. brasiliensis* (600g e 160g, respectivamente) foi extraída por percolação. A percolação farmacopeica foi selecionada como método de extração por produzir extratos com teor de marcadores e perfil cromatográfico reproduzíveis, por ser um método eficiente na extração, por apresentar menor risco de reações químicas devido à temperatura utilizada em relação a outros métodos como a extração com *Sohxlet* dentre outros, e ser capaz de ser ampliada para escala comercial. Além disso, por ser extração hidroalcoólica, não é necessária a apresentação de informações referentes aos resíduos de solventes no laudo de análise do derivado vegetal pelo fabricante do produto acabado (BRASIL, 2010a).

Para o estudo farmacológico das espécies, a forma farmacêutica escolhida foi o extrato seco. O extrato seco têm sido uma tendência no mercado fitoterápico mundial, em razão da maior uniformidade dos lotes produzidos e da maior concentração e padronização dos constituintes ativos (FERREIRA e LEITE, 2009).

Foram produzidos 3000 mL de percolado de *B. gaudichaudii* e 800 mL de percolado de *D. brasiliensis*. O extrato preparado a partir do percolado de *B. gaudichaudii* resultou em 188,4 g e o extrato de *D. brasiliensis*, em 42,4 g. Ambos os extratos apresentaram-se bastante higroscópicos, de coloração marrom e consistência firme. Os rendimentos da obtenção dos extratos a partir de material vegetal seco pulverizado foram 31,4% e 26,5% para *B. gaudichaudii* e *D. brasiliensis*, respectivamente (Figura 21).

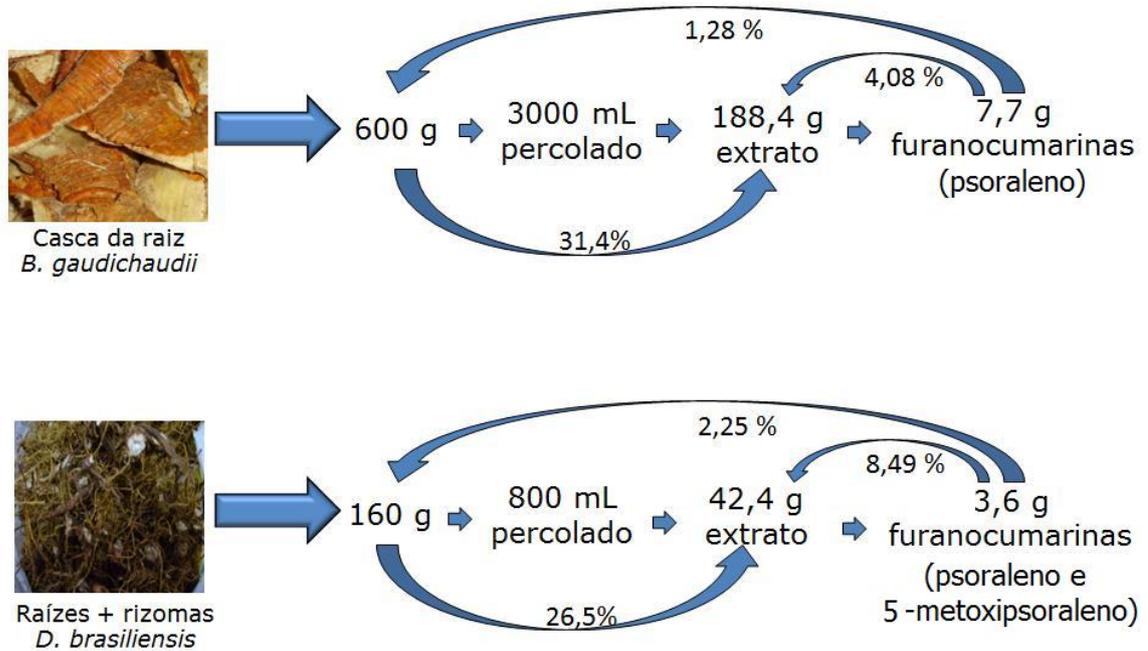


Figura 21 – Porcentagens de rendimento na preparação dos percolados e extratos de *Brosimum gaudichaudii* e *Dorstenia brasiliensis* e de furanocumarinas psoraleno e 5-metoxipsoraleno neles contidos.

5.3 Avaliação cromatográfica

Os métodos cromatográficos são recomendados para controle de qualidade dos produtos fitoterápicos com muitas vantagens sobre outros métodos (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

5.3.1 Cromatografia em camada delgada

A condição cromatográfica escolhida permitiu a obtenção de um perfil cromatográfico para as amostras com a visualização das manchas relacionadas às furanocumarinas psoraleno e 5-MOP (Figura 22).

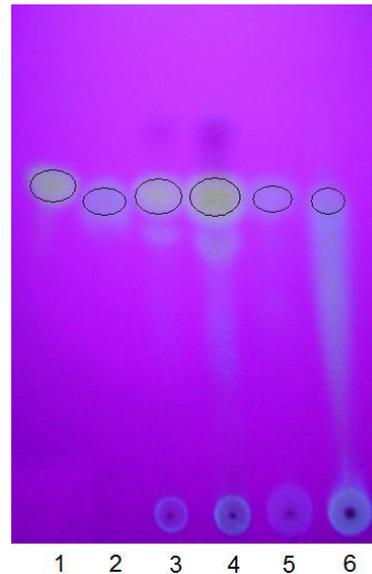


Figura 22 – Perfil cromatográfico em cromatografia em camada delgada dos padrões psoraleno (1), 5-metoxipsoraleno (2), extrato de *Dorstenia brasiliensis* (3), percolado de *Dorstenia brasiliensis* (4), extrato de *Brosimum gaudichaudii* (5), percolado de *Brosimum gaudichaudii* (6), tendo como fase móvel a mistura tolueno - acetato de etila - ácido fórmico (60:40:3) e revelação com KOH 5%, seguida de visualização com luz UVA (365 nm).

O padrão de psoraleno adquiriu coloração azul com fator de retenção (R_f) de 0,64 e o 5-metoxipsoraleno, coloração amarela, com R_f de 0,61. Quando psoraleno e 5-metoxipsoraleno estão conjuntamente presentes, como no percolado e extrato de *D. brasiliensis*, tem-se uma única mancha amarelada com R_f intermediário entre 0,61 e 0,64.

5.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia em fase gasosa

O método utilizado para quantificação das furanocumarinas nos percolados e extratos secos obtidos por liofilização de *D. brasiliensis* e *B. gaudichaudii* foi previamente desenvolvido e validado para soluções orais de quatro matrizes diferentes contendo misturas de tinturas hidroalcoólicas de plantas, dentre elas a *D. multifomes*, sendo que uma das matrizes continha apenas a tintura de *D. multifomes* (PIRES *et al.*, 2004). Este método foi aplicado com sucesso para quantificação de psoraleno e 5-metoxipsoraleno nos percolados e extratos neste trabalho, pois garantiu a separação dos picos cromatográficos das substâncias de

interesse e a avaliação da pureza destes picos demonstrou que eram atribuídos a apenas um componente (Figuras 23 e 24).

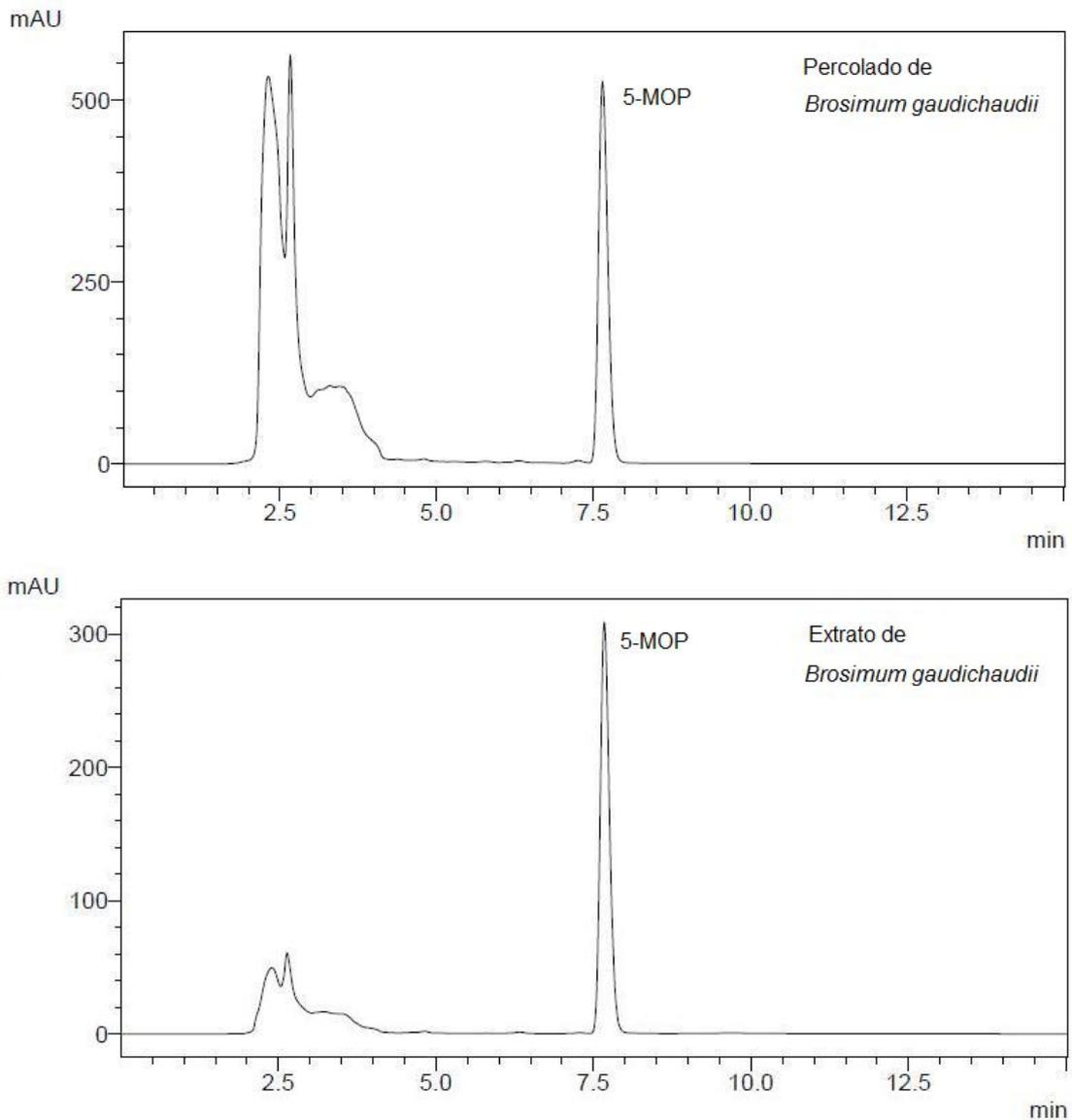


Figura 23 - Cromatograma do percolado (superior) e do extrato (inferior) de *Brosimum* por CLAE-DAD em acetonitrila-água 55:25 (v/v), fluxo de 1 mL / minuto, 223 nm. 5-MOP, 5-metoxipsoraleno.

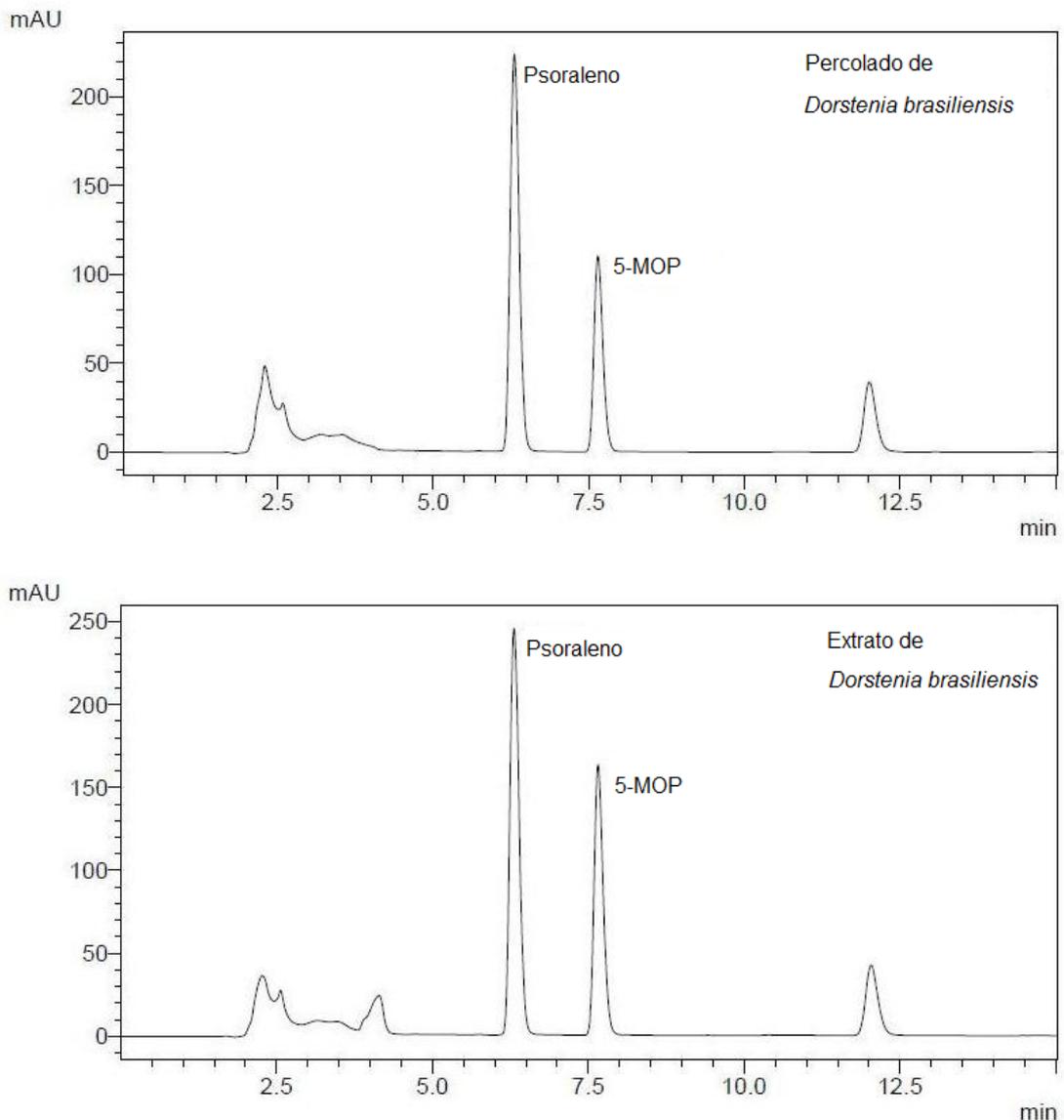


Figura 24 - Cromatograma do percolado (superior) e do extrato (inferior) de *Dorstenia brasiliensis* por CLAE-DAD em acetonitrila-água 55:25 (v/v), fluxo de 1 mL / minuto, 223 nm. 5-MOP, 5-metoxipsoraleno.

As médias de erro das áreas dos picos das replicatas das injeções (n=5) foram menores que 1%, mostrando boa repetibilidade da curva de calibração. A linearidade do método foi determinada por regressão linear. Os demais parâmetros foram baseados no método para quantificação de furanocumarinas desenvolvido e validado previamente para outras matrizes contendo furanocumarinas (PIRES *et al.*, 2004).

As tinturas de *B. gaudichaudii* e *D. brasiliensis* apresentaram 0,85 mg/mL e 3,18 mg/mL de furanocumarinas (psoraleno + 5-MOP), respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1 - Quantidades de psoraleno e 5-metoxipsoraleno (5-MOP) em percolados de *Brosimum gaudichaudii* (PBG) e *Dorstenia brasiliensis* (PDB) (quantidade \pm DP) (mg/g) usando o método com CLAE-DAD.

Amostras	Psoraleno	5-MOP
PBG	< LD	0,85 \pm 0,01
PDB	2,10 \pm 0,04	1,08 \pm 0,03

DP, desvio padrão; LD, limite de detecção

O extrato de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e o extrato de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) apresentaram 40,77 mg e 85,33 mg de furanocumarinas (psoraleno + 5-MOP) por grama, respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2 – Quantidades de psoraleno e 5-metoxipsoraleno (5-MOP) em extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) (quantidade \pm DP) (mg/g) usando o método com CLAE-DAD.

Amostras	Psoraleno	5-MOP
EBG	< LD	40,77 \pm 0,29
EDB	56,33 \pm 0,68	29,00 \pm 0,43

DP, desvio padrão; LD, limite de detecção

Considerando-se o rendimento de furanocumarinas (psoraleno + 5-MOP) por grama de droga vegetal seca pulverizada, obtiveram-se 10,10 mg/g de casca da raiz seca pulverizada de *B. gaudichaudii* e 69,88 mg/g de partes subterrâneas secas pulverizadas de *D. brasiliensis*. Celeghini *et al.* (2007) obtiveram 10,54 mg de furanocumarinas (psoraleno + 5-MOP) por grama de rizoma seco pulverizado de amostra comercial de *D. brasiliensis* utilizando maceração com ultrassom como método de extração. Esses valores sugerem um bom rendimento da extração de furanocumarinas pela percolação selecionada para esse estudo, mesmo que este método de extração não tenha sido selecionado por este motivo.

Buscou-se a obtenção de extratos ricos na maior parte dos metabólitos secundários para obtenção de um perfil cromatográfico adequado para o controle de qualidade. Também de matéria-prima representativa para ensaios de atividade farmacológica, pois é amplamente reconhecido que a atividade biológica de uma espécie vegetal muitas vezes está baseada na interação sinérgica entre os diversos

componentes nela presentes e não apenas na ação de uma substância isolada (VILEGAS *et al.*, 2009).

Avaliando-se as bandas de absorção dos demais picos do cromatograma do EBG em CLAE-DAD, verificou-se que tanto o percolado como o extrato apresentavam uma mistura de substâncias nos tempos de retenção entre 2,5 e 4,0 minutos contendo um fenilpropanoide e flavonoides (Figura 23). Porém a condição cromatográfica desenvolvida e validada para quantificação de furanocumarinas não permitia identificação nem quantificação daquelas substâncias devido à sobreposição dos picos.

Realizando-se a mesma avaliação com o cromatograma de EDB, observou-se que o pico com tempo de retenção de 12 minutos (Figura 24), chamado de substância D para este estudo, continha bandas de absorção semelhantes às de 5-MOP (Figura 25). O psoraleno apresentou bandas em 203, 246 e 292 nm enquanto que o 5-metoxipsoraleno em 222, 250-268 e 311 nm e a substância D em 223, 261 e 310 nm (Figura 25). Esse dado sugere que a substância D contenha parte de sua molécula semelhante ao 5-MOP.

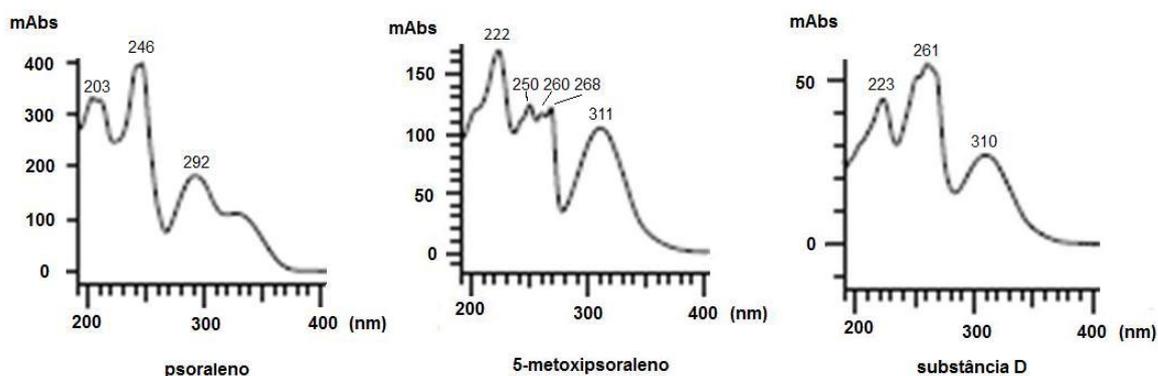


Figura 25 – Bandas de absorção do psoraleno, 5-metoxipsoraleno e da substância D obtidas do extrato de *Dorstenia brasiliensis* em detector de arranjo de fotodiodo (DAD).

Para identificar a substância D, o extrato EDB foi avaliado em cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) obtendo-se o cromatograma representado na figura 26.

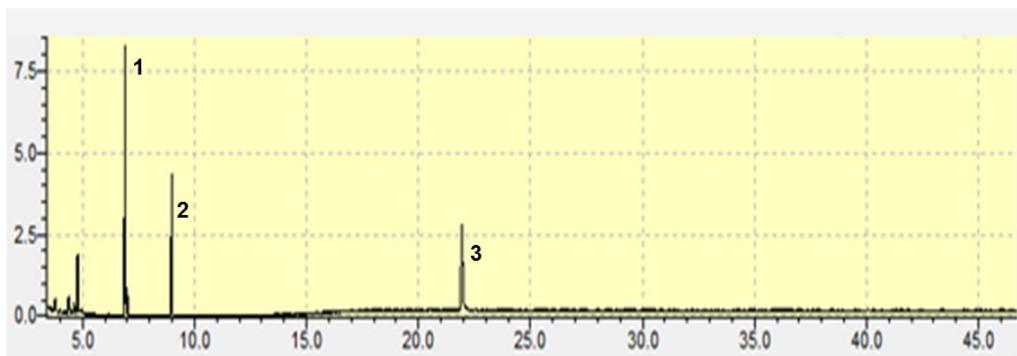


Figura 26 - Cromatograma do extrato de *Dorstenia brasiliensis* obtido por CG-EM com temperatura da interface e do injetor de 280°C, modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), gás de arraste Hélio, fluxo de 0,6 mL / minuto, temperatura da coluna iniciando em 150°C, com aquecimento de 10°C por minuto até 240°C e em seguida de 5°C por minuto até 280°C, temperatura esta em que permaneceu por 20 minutos.

No cromatograma de EDB obtido por CG-EM (Figura 26) puderam ser identificados o psoraleno (1) e o 5-metoxipsoraleno (2) nos tempos de retenção de 7 e 9 minutos, respectivamente, comparando-se os dados dos fragmentogramas de massas obtidos (Figura 27) com os da literatura (NASSAR *et al.*, 2010). O psoraleno foi identificado pelo mecanismo de fragmentação: m/z 186 [M^+ , $C_{11}H_6O_3$] com perdas sucessivas de três moléculas de monóxido de carbono, obtendo-se os fragmentos: m/e 158 [$M-CO$] $^+$, 130 [$158-CO$] $^+$ e 102 [$130-CO$] $^+$, a perda do radical etila a partir do fragmento $m/e = 102$ origina o fragmento $m/e = 76$, e a partir deste origina $m/e = 51$ (Figura 27). O 5-metoxipsoraleno pelo mecanismo: m/z 216 [M^+ , $C_{12}H_8O_3$], m/e 201 [M^+-CH_3], seguido de quatro perdas sucessivas de moléculas de monóxido de carbono, obtendo-se os fragmentos m/e : 173 [$201-CO$] $^+$, 145 [$173-CO$] $^+$, 117 [$173-CO$] $^+$ e 89 [$117-CO$] $^+$ (Figura 27).

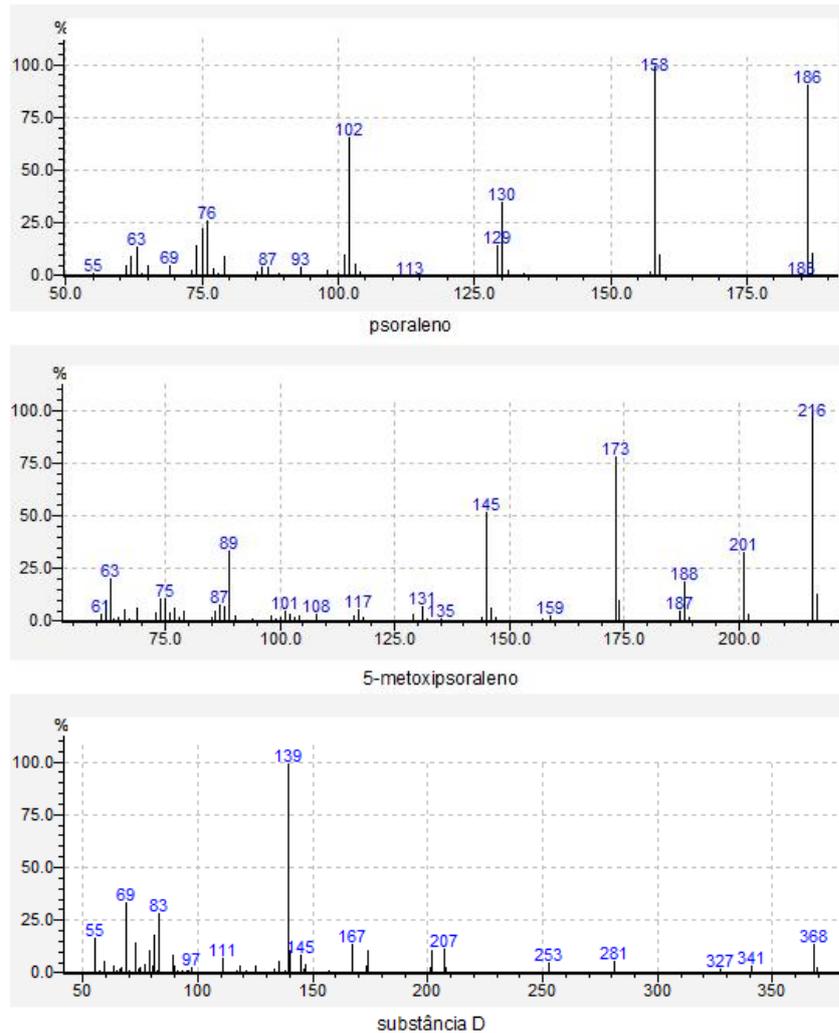


Figura 27 – Espectro de massas do psoraleno, 5-metoxipsoraleno e da substância D do extrato de *Dorstenia brasiliensis* obtidos por CG-EM com temperatura da interface e do injetor de 280°C, modo de ionização por impacto de elétrons (70 eV), gás de arraste Hélio, fluxo de 0,6 mL / minuto, temperatura da coluna iniciando em 150°C, com aquecimento de 10°C por minuto até 240°C e em seguida de 5°C por minuto até 280°C, temperatura esta em que permaneceu por 20 minutos.

O pico 3 assinalado no cromatograma de EDB com tempo de retenção de 23 minutos (Figura 26) provavelmente corresponde ao pico em 12 minutos do cromatograma do extrato na condição de quantificação em CLAE-DAD (Figura 24) anteriormente chamado de substância D. Foi sugerido que a molécula possuía uma porção semelhante ao 5-MOP pela avaliação das bandas de absorção.

O fragmentograma de massas obtido a partir do pico 3 (Figura 26) indica que a substância D seja a furanocumarina dorstenina (Figura 28) pela comparação dos fragmentos com os da literatura (TERREAUX *et al.*, 1995) e já foi descrita em *D. brasiliensis* (KUSTER *et al.*, 1994), *D. contrajerva* e *D. bahiensis* (TERREAUX *et al.*, 1995).

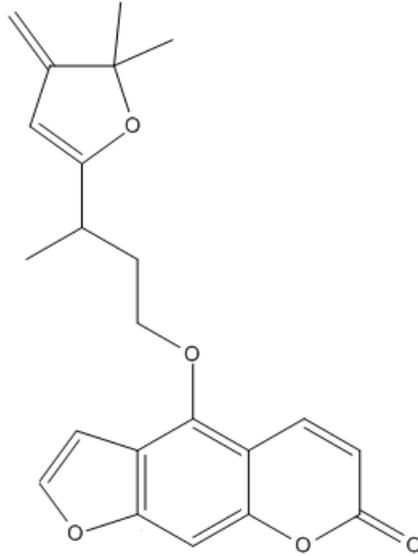


Figura 28 – Furanocumarina dorstenina.

Fonte: Terreaux *et al.*, 1995.

A partir da RDC 14 (BRASIL, 2010a), a vigilância sanitária passa a exigir também, além do perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica do produto acabado, o perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica do seu derivado vegetal de partida (percolado, extrato seco entre outros). Neste sentido, buscou-se uma condição cromatográfica gradiente que produzisse um perfil cromatográfico mais representativo para as espécies em estudo, com melhor separação dos picos das substâncias mais polares que as furanocumarinas. Na melhor condição gradiente encontrada, pode-se observar picos mais definidos para as substâncias mais polares em relação à condição isocrática. Neste caso, os tempos de retenção do psoraleno e 5-MOP são 18,9 minutos e 23,1 minutos, respectivamente (Figura 29).

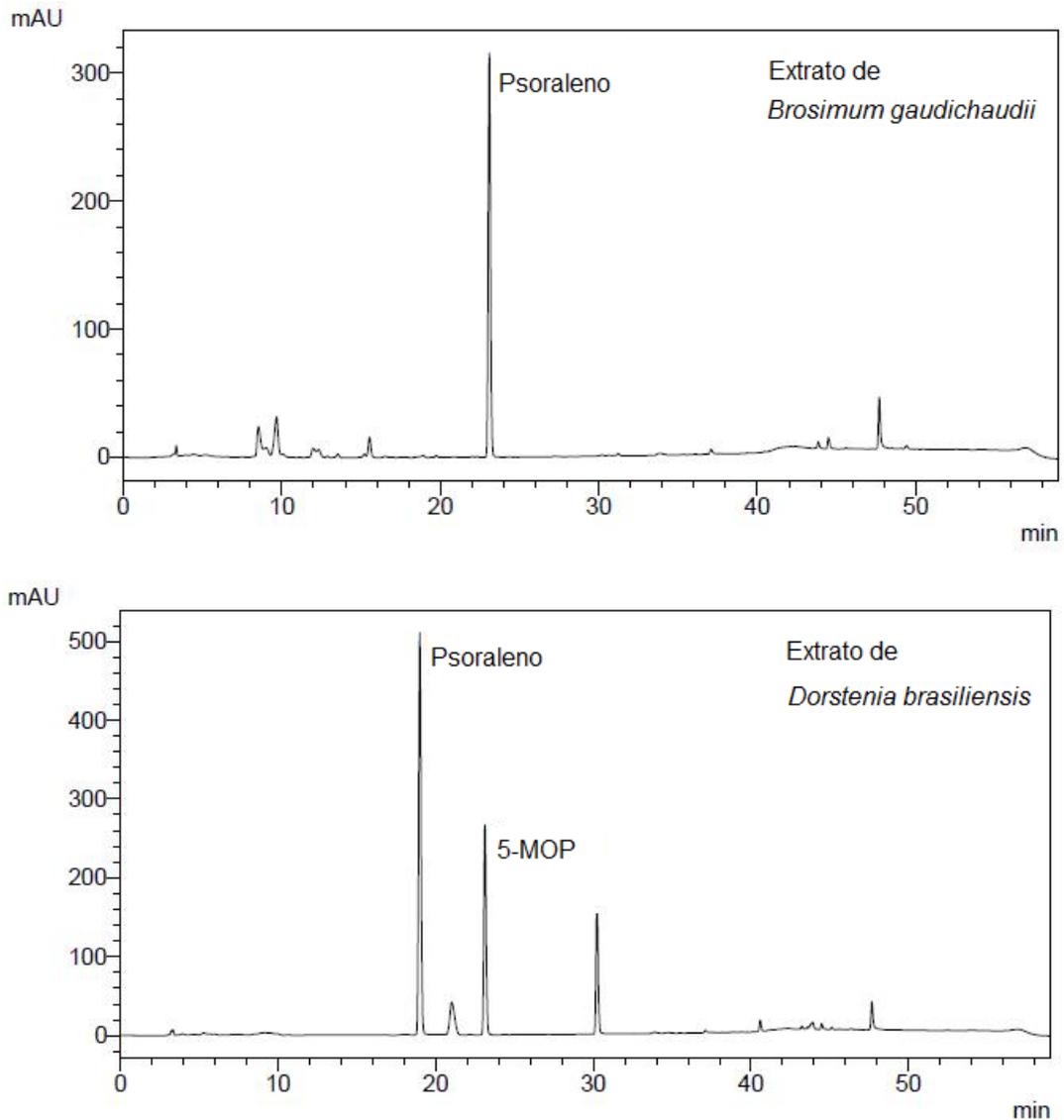


Figura 29 - Perfis cromatográficos dos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (superior) e *Dorstenia brasiliensis* (inferior) por CLAE-DAD em aumento gradiente da relação entre os solventes metanol – água de 15:85 (v/v) para 100:0 (v/v) em 40 minutos, voltando à condição inicial em 10 minutos, fluxo de 0,9 mL / minuto, 254 nm. 5-MOP, 5-metoxipsoraleno.

5.4 Avaliação da atividade antiproliferativa

As atividades antiproliferativas dos extratos EBG e EDB e das furanocumarinas psoraleno, 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e 8-metoxipsoraleno (8-MOP) foram avaliadas em cultura de células neoplásicas B16-F10 tratadas e não tratadas com UVA. As furanocumarinas psoraleno e 5-MOP foram testadas por

serem as furanocumarinas quantificadas nos extratos. O 8-MOP foi utilizado como controle positivo por ser uma das furanocumarinas mais utilizadas no tratamento PUVA (SAID *et al.*, 1997; MILIONI *et al.*, 2001).

A curva concentração-resposta é uma das melhores formas de se visualizar a atividade antiproliferativa das amostras testadas. Com esse tipo de gráfico é possível verificar se a substância em questão possui efeito citostático (pontos da curva acima do ponto zero), efeito citocida (pontos da curva abaixo do ponto zero) ou inibição total do crescimento quando $T=T_0$, ou seja, a concentração que promove 100% de inibição celular (TGI) é o valor no eixo da abscissa onde a curva corta o eixo das ordenadas. A Figura 30 mostra a atividade antiproliferativa de 8-MOP sobre a linhagem celular neoplásica B16-F10 com a representação dos pontos relacionados às variáveis GI_{50} , LC_{50} e TGI, que foram exatamente calculadas no programa de dados *Origin 6.0*.

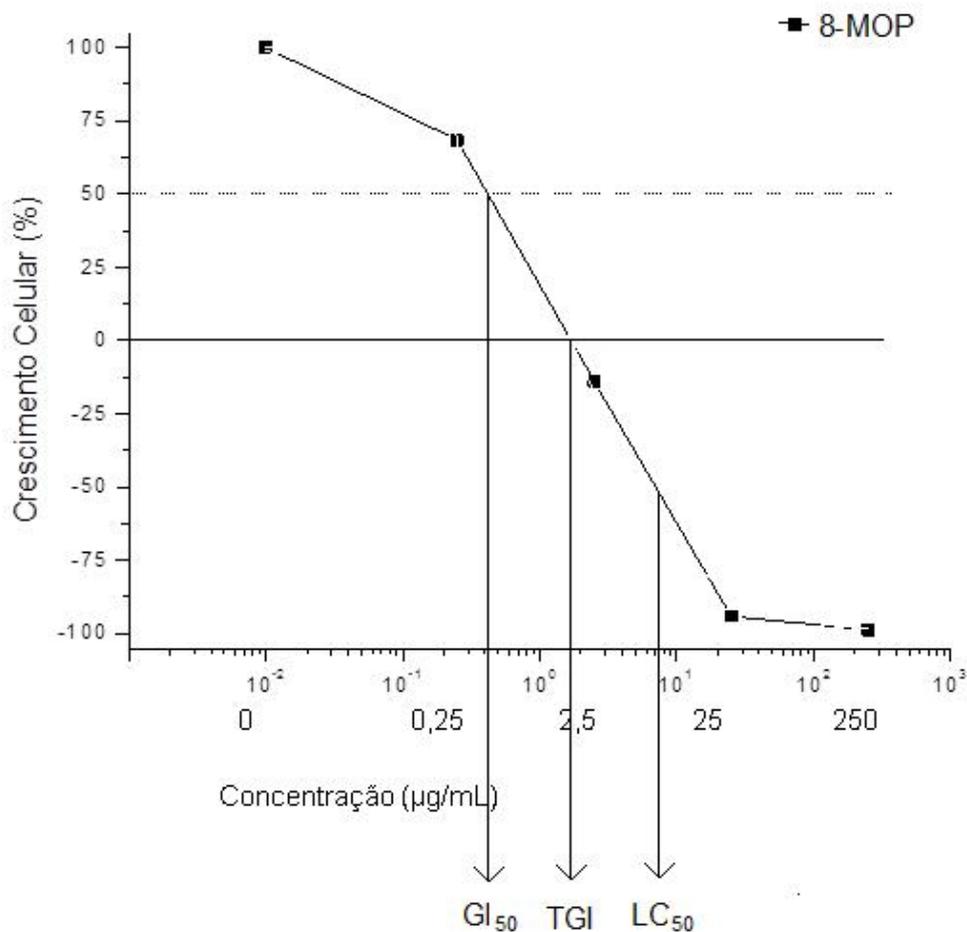


Figura 30 - Curva concentração-resposta gerada a partir da exposição de células de melanoma murino B16-F10 ao 8-MOP na presença de UVA. GI_{50} , inibição do crescimento de 50% das células; TGI, inibição total do crescimento e LC_{50} , concentração necessária para morte de 50% das células.

Todas as amostras-teste foram citostáticas nas concentrações de 0,25 µg/mL. Os extratos EBG, EDB e o 5-MOP apresentaram atividade citostática na concentração de 2,5 µg/mL e foram citocidas nas concentrações de 25 µg/mL e 250 µg/mL. O extrato EDB e o 5-MOP foram citostáticos na concentração de 2,5 µg/mL e o psoraleno e o 8-MOP citocidas nesta concentração (Tabela 3).

Tabela 3 – Crescimento (%) de células neoplásicas B16-F10 expostas aos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG), a psoraleno, a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e a 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em presença de UVA.

Amostra	Concentração (µg/mL)	Crescimento celular (%) ± DP
EBG	0,25	76,66 ± 0,35
	2,5	49,46 ± 0,20
	25	-56,70 ± 1,99
	250	-94,76 ± 0,15
EDB	0,25	64,06 ± 0,55
	2,5	42,30 ± 1,05
	25	-95,50 ± 0,45
	250	-96,66 ± 0,15
psoraleno	0,25	60,03 ± 0,05
	2,5	-50,56 ± 0,55
	25	-88,86 ± 0,15
	250	-95,66 ± 1,26
5-MOP	0,25	73,5 ± 0,50
	2,5	46,36 ± 0,15
	25	-87,06 ± 1,35
	250	-100 ± 0
8-MOP	0,25	68,50 ± 0,90
	2,5	-14,00 ± 0,60
	25	-94,06 ± 0,057
	250	-98,7 ± 0,3

DP, desvio padrão.

A figura 31 representa a curva concentração-resposta obtida com os extratos EBG e EDB, psoraleno, 5-MOP e 8-MOP sobre a linhagem de células neoplásicas B16-F10 tratadas com UVA.

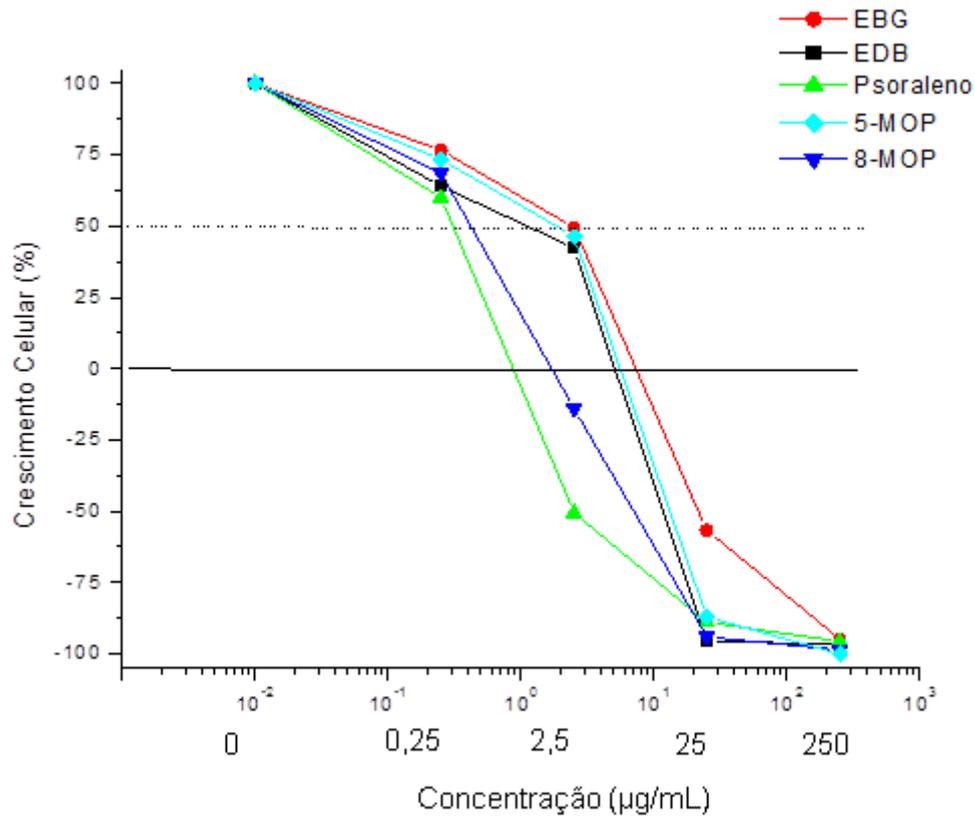


Figura 31 - Curva concentração-resposta gerada a partir da exposição de células de melanoma murino B16-F10 aos extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e de *Dorstenia brasiliensis* (EDB), a psoraleno, a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e a 8-metoxipsoraleno (8-MOP) na presença de UVA.

Os valores de GI_{50} de EBG, EDB, psoraleno, 5-MOP e 8-MOP em células B16-F10 sob a luz UVA foram 2,45; 2,05; 0,25; 2,30; e 0,28 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Todas as amostras-teste foram ativas segundo critério de Itarath *et al.* (2004), ($GI_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$) e de forte atividade antineoplásica segundo critério do Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (NCI) ($GI_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$). A menor citotoxicidade do 5-MOP em relação ao 8-MOP pode explicar que o tratamento PUVA utilizando 5-MOP em vez de 8-MOP tem mostrado bons resultados, com menor fototoxicidade e menos efeitos colaterais (STEINER e VILLAS, 2004).

A forte atividade antineoplásica do psoraleno, 5-MOP e 8-MOP corroboram o interesse no potencial anticâncer dos psoralenos no tratamento de

tumores sólidos e na prevenção da proliferação *in vitro* de células neoplásicas como as de carcinoma de bexiga (KEANE *et al.*, 1992), carcinoma mucoepidermoide (WU *et al.*, 1992) e de câncer de mama (Wu *et al.*, 1998) entre outros. Dentre os relatos, Leite *et al.* (2004) avaliaram a atividade do 8-MOP com irradiação UVA em células de melanoma humano SK-Mel 37 pelo método MTT, encontrando um valor de GI₅₀ de 14,4 µM (3,10 µg/mL) em 48 horas de incubação. Isoldi *et al.* (1999) também avaliaram a atividade do 8-MOP com irradiação UVA em células de melanoma humano SK-Mel 28 e C32TG. Relatam que nas primeiras 24h de tratamento houve um aumento da proliferação celular seguido de atividade antiproliferativa e melanogênica em 48 e 72h de incubação. Estes dados corroboram os resultados obtidos no presente estudo com 48h de incubação, ainda que não seja possível comparar as mesmas variáveis, uma vez que os métodos empregados foram diferentes.

A maioria dos fármacos utilizados atualmente no tratamento de câncer ou danificam o DNA ou inibem a replicação do DNA (COOPER, 2001), ou seja, são fármacos com atividade antiproliferativa. Wang *et al.* (2011) relata que o psoraleno pode inibir o crescimento de células neoplásicas: K562 (célula eritroleucemia humana), K562/ADM (linhagem resistente a doxorrubicina K562), KB (linha de carcinoma oral humana) e KBv200 (linhagem resistente à vincristina); e de células normais primárias HPDL (ligamento periodontal humano).

A efetividade do tratamento dos psoralenos com a UVA tem sido atribuída às suas propriedades de ligação fotoinduzida ao DNA (PATHAK e FITZPATRICK, 2004). Algumas investigações têm demonstrado que o psoraleno fotoativado também pode modificar proteínas e suas atividades (SCHMITT *et al.*, 1995) podendo envolver, ao menos em parte, um possível mecanismo envolvendo sítios de ligação específicos para psoralenos nas células, com localização precisa ainda não conhecida, porém sem relação com o DNA (LASKIN *et al.*, 1985). Laskin e Lee (1985) relatam a associação da ligação de 8-MOP e TMP fotoativados às células KB (linhagem de células humanas epiteliais) com a inibição da ligação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGF) e a sua internalização, indicando que a membrana celular pode ser um alvo importante para a ação psoralenos fotoativados na modulação do crescimento e da diferenciação das células da epiderme.

Os valores de GI₅₀ dos extratos e furanocumarinas indicam forte atividade antiproliferativa em todas as amostras. Os valores de GI₅₀ dos extratos estão de

acordo com as furanocumarinas neles presentes, pois o EDB (GI₅₀ de 2,05) possui psoraleno (GI₅₀ de 0,25) e 5-MOP (GI₅₀ de 2,30) e o EBG (GI₅₀ de 2,45), possui apenas o 5-MOP (GI₅₀ de 2,30).

O EDB também possui a furanocumarina dorstenina, que não foi quantificada para este estudo, pois sua atividade fotossensibilizante é bem menor (LOPES *et al.*, 2001). Lopes *et al.* (2001) associam a menor ação fotossensibilizante à formação de, principalmente, monoaddutos com o DNA, enquanto ambos, psoraleno e 5-MOP possuem alta ação fotossensibilizante devido à formação de diadutos.

Os valores de GI₅₀ dos extratos e furanocumarinas obtidos neste estudo inferem que o uso dos extratos tem vantagens em relação ao uso das furanocumarinas psoraleno e 5-MOP isoladas, pois os extratos possuem forte atividade antiproliferativa, mesmo contendo 4% a 9% de furanocumarinas em sua composição. Os compostos ativos de um fitocomplexo podem agir sinergicamente entre eles ou com outros compostos, resultando em maior atividade biológica (VAGNER, 2009). Para melhor compreensão pode-se relatar que os compostos triterpênicos: ácidos dorstênicos A e B isolados de *D. brasiliensis*, na concentração de 40 µM, demonstraram atividade antiproliferativa com IC₅₀ de 5 µg/mL do ácido dorstênico A sobre células L-1210 e com IC₅₀ de 10 µg/mL do ácido dorstênico B sobre células HL-60 (UCHIYAMA *et al.*, 2002). Em *Brosimum*, no caso na casca da raiz de *B. utile*, foram registradas isoflavonas citotóxicas anticarcinogênicas (FERRARI *et al.*, 2005).

A presença de fitocomplexos nos extratos EBG e EDB também poderia representar menores efeitos colaterais no uso tópico ou oral pela presença de flavonoides. DUFALL *et al.* (2003) relataram que flavonoides isolados de *D. manni* atuam com eficiência frente a radicais livres, com atividade similar à quercitina. Também *D. multifomes* apresentou atividade antioxidante no seu extrato bruto e nas frações hexano, acetato de etila e clorofórmica, tendo esta última ação superior ao padrão rutina (BALESTRIN, 2006). Pode-se relatar também que os terpenoides α-amirina e β-amirina presentes em *Dorstenia* apresentam uma atividade antioxidante relativa significativa, quando comparado aos padrões: vitamina C e rutina (BALESTRIN *et al.*, 2008) o que poderia auxiliar na preservação dos tecidos saudáveis no tratamento das doenças de pele. As atividades analgésicas e/ ou anti-inflamatória apresentadas pela infusão de *Dorstenia brasiliensis* é relacionada por

alguns autores, pelo menos em parte à suas atividades antioxidantes, pois parecem inibir a ação de alguns dos oxidantes gerados na inflamação (DALL' STELLA, 2008).

Neste trabalho, todas as amostras-teste na ausência de UVA foram inativas ($GI_{50} > 250 \mu\text{g/mL}$). Os dados estão em conformidade com os de Montagner (2007) que não observou atividade antiproliferativa do 8-MOP em células de carcinoma de laringe (HEp-2), carcinoma de cólon (Caco-2) e de carcinoma de intestino (HCT-8) na ausência de UVA. Mar *et al.* (2001) também relataram não haver atividade do psoraleno em células de carcinoma de pulmão (A541) e de carcinoma de fígado (HEpG2) na ausência de UVA. Entretanto foi relatado por Rosa *et al.* (2005) que frações do extrato de *B. gaudichaudii* em concentrações acima de $100 \mu\text{g/mL}$ demonstraram atividade citotóxica pelo método colorimétrico MTT em cultura de células B16-F10 na ausência de UVA.

5.4.1 Ensaio de citotoxicidade em células normais

Uma vez que foi encontrada atividade antiproliferativa das amostras-teste na linhagem de células neoplásicas, foi feito o mesmo ensaio da SRB para avaliação da citotoxicidade em células de uma linhagem normal (VERO, de rim de macaco verde africano) uma vez que um dos objetivos do trabalho é avaliar o potencial dos extratos como ativador da melanogênese em pacientes com vitiligo, e a presença de citotoxicidade em células normais poderia dificultar a avaliação.

Nas células tratadas com UVA, o EBG causou um estímulo do crescimento de células VERO nas concentrações de 0,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$, foi citostático em 25 $\mu\text{g/mL}$ e citocida em 250 $\mu\text{g/mL}$. O EDB foi citostático nas três menores concentrações (0,25; 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e 25 $\mu\text{g/mL}$) e foi citocida na maior. O 5-MOP causou um estímulo do crescimento em 0,25 $\mu\text{g/mL}$, sendo citostático em 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e citocida em 25 e 250 $\mu\text{g/mL}$. O 8-MOP foi citostático nas duas menores concentrações (0,25 e 2,5 $\mu\text{g/mL}$) e citocida nas maiores (25 e 250 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Crescimento celular (%) de células normais VERO expostas aos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e a 5-metoxipsoraleno (5-MOP) e 8-metoxipsoraleno (8-MOP) em presença de UVA.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Crescimento celular (%) \pm DP
EBG	0,25	193,67 \pm 0,50
	2,5	156,43 \pm 0,15
	25	69,87 \pm 1,95
	250	-27,97 \pm 4,80
EDB	0,25	89,17 \pm 0,25
	2,5	72,67 \pm 0,30
	25	11,20 \pm 1,50
	250	-43,97 \pm 1,12
5-MOP	0,25	182,30 \pm 0,30
	2,5	92,33 \pm 1,55
	25	-33,66 \pm 1,65
	250	-56,00 \pm 1,45
8-MOP	0,25	94,97 \pm 1,15
	2,5	38,67 \pm 0,15
	25	-16,60 \pm 1,75
	250	-48,53 \pm 0,96

DP, desvio padrão.

Uma vez que o EDB e o 8-MOP causaram inibição do crescimento em todas as concentrações utilizadas, foi possível calcular os valores de GI_{50} para estas amostras-teste, e o índice de seletividade (IS) (Tabela 5). Entretanto, estes não foram seletivos sobre a linhagem B16-F10 em relação à linhagem de células normais, VERO (IS < 2,0).

Tabela 5 – Atividade citotóxica (GI_{50}) dos extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e da furanocumarina 8-MOP em linhagens de células normais VERO e em células neoplásicas B16-F10 com irradiação de luz UVA com seus correspondentes índices de seletividade (IS).

Linhagens celulares	EDB	8-MOP
VERO	3,73	2,22
B16-F10	2,70	2,45
IS	1,4	0,9

GI_{50} , concentração que inibe 50% do crescimento celular; IS = $GI_{50}VERO / GI_{50}B16-F10$.

O 5-MOP e o extrato EBG estimularam o crescimento de células normais VERO em uma e duas concentrações, respectivamente, o que não permitiu o cálculo da GI_{50} para estas amostras e, portanto, de seus índices de seletividade. Porém foi verificada durante os experimentos alguma seletividade da atividade citotóxica destas amostras sobre células neoplásicas em relação às células normais. Pode-se utilizar como exemplo, o crescimento celular de células neoplásicas (-56,7%) e de células normais (69,9%) na presença de EBG 25 $\mu\text{g/mL}$ + UVA. Esta seletividade incipiente poderia auxiliar no processo de proliferação de células saudáveis no tratamento de distúrbios de pele e no estímulo à melanogênese.

5.5 Avaliação da atividade melanogênica

A padronização de dois ensaios para avaliação da melanogênese foi realizada. Ambos os ensaios foram padronizados com o número de 5.000.000 de células para tratamento com cada amostra-teste ou controle positivo. Tanto o ensaio de ativação da tirosinase como o ensaio de dosagem de melanina mostraram resultados reprodutíveis pelos métodos padronizados com a leitura das absorbâncias das soluções finais em leitor de microplacas em 492 nm.

No ensaio de ativação da tirosinase na presença de UVA, os extratos EBG e EDB e o 5-MOP e 8-MOP apresentaram 50,8%; 84,37%; 89,37 e 77,3%, respectivamente, de ativação da melanogênese em relação ao controle negativo (Tabela 6 e Figura 32).

Tabela 6 – Ativação da tirosinase em células de melanoma murino pelo 8-MOP e extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) usando a dosagem de tirosinase na presença e ausência de irradiação UVA.

Experimento	Amostra	Absorbância ¹	% Ativação ²
com UVA	EBG 6,25 µg/mL	0,724	50,8
	EDB 2,94 µg/mL	0,885	84,37
	5-MOP 0,25 µg/mL	0,909	89,37
	8-MOP 0,25 µg/mL	0,851	77,3
	Controle negativo	0,480	
sem UVA	8-MOP 0,25 µg/MI	0,534	23
	Controle negativo	0,434	

¹Os valores de absorbância a 492nm já estão descontados dos valores do branco para cada experimento. ²% ativação = $(A - B)/B \times 100\%$; A, composto teste; B controle negativo

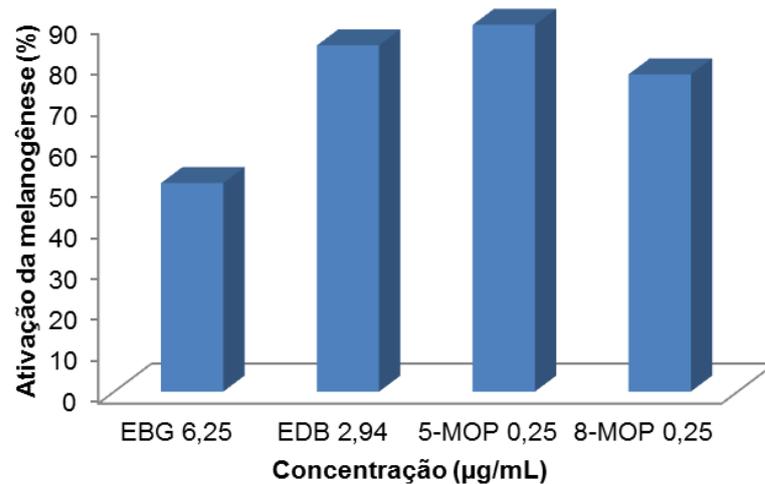


Figura 32 – Ativação da tirosinase em células de melanoma murino pelo 8-MOP e extratos de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) e *Dorstenia brasiliensis* (EDB) usando a dosagem de tirosinase na presença de irradiação UVA.

As absorbâncias do controle negativo na presença e ausência de UVA foram similares indicando que somente a irradiação não alterou a quantidade de tirosinase nas condições do ensaio. Entretanto, houve 23% de ativação da melanogênese pela presença do 8-MOP em relação ao controle negativo na ausência de UVA, o que demonstra que a furanocumarina isolada é capaz de ativar a melanogênese, mesmo na ausência da irradiação, porém em menor grau (3 X menor). Segundo os

resultados obtidos, a atividade melanogênica das amostras-teste avaliada pela ativação da tirosinase parece ser estimulada com a irradiação UVA.

No ensaio padronizado para avaliação da melanogenicidade pela dosagem de melanina, resultados preliminares baseados nas absorvâncias obtidas indicam que a furanocumarina 8-MOP 0,25 µg/mL aumentou a quantidade de melanina em relação ao controle negativo na presença de irradiação UVA.

A participação da irradiação UVA na atividade melanogênica dos psoralenos tem resultados contraditórios na literatura. Em Isoldi *et al.* (1999), a exposição crônica (72h) de células de melanoma SK-Mel 28 e C32TG ao 8-MOP na ausência de UVA aumentou a atividade da tirosinase e a exposição rápida (30 minutos) não promoveu resposta. Na combinação da exposição rápida ao 8-MOP com a irradiação UVA o tratamento torna-se tão eficaz quanto o tratamento crônico (ISOLDI *et al.*,1999). De acordo com Fonseca e Prista (2000), o tratamento com psoralenos fotoativados promove espessamento da camada córnea, produzindo uma reação inflamatória e o aumento da quantidade de melanina na área que recebeu a radiação, benéfica ao tratamento do vitiligo. A pigmentação surge então em torno dos folículos pilosos e se alastra centrifugamente. Teregun *et al.* (1999) relatam que na terapia PUVA, várias células são afetadas, inclusive linfócitos circulantes no sangue periférico, promovendo alívio de muitas doenças que são associadas a desordens imunológicas. Segundo Steiner e Villas (2004), psoralenos fotoativados também estimulam imunocitoquinas e mediadores inflamatórios que agem como sinais para migração de melanócitos a partir dos folículos pilosos da pele sã, induz a transferência dos melanossomas para os queratinócitos, estimulam a melanogênese por meio da proliferação de melanócitos, aumento do número de melanossomas e ativação da síntese de tirosinase (COSTA e LACAZ, 2001). Também aumentam a expressão da tirosinase e o estímulo à melanogênese (MENGEAUD e ORTONNE, 1996).

Entretanto, Marwan *et al.* (1990) relatam que a atividade melanogênica do 8-MOP, do 5-MOP e do TMP em células de melanoma murino S-91 e B16 parece ser independente da irradiação UVA. Guan *et al.* (2008) utilizaram o 8-MOP como controle positivo em avaliação da ativação da melanogênese em células de melanoma B16 sem irradiação com UVA obtendo resultados positivos. No estudo de Rosa *et al.* (2005), frações do extrato aquoso de *B. gaudichaudii* e o 5-MOP induziram melanogênese em células B16-F10 na ausência de UVA na faixa de

concentração de 100 a 500 µg/mL e 50 a 100 µg/mL, respectivamente. Neste mesmo estudo sem uso de radiação UVA, o extrato bruto da casca da raiz de *B. gaudichaudii* em contato com células B16F10 demonstrou aumento significativo da expressão para RNAm (RNA mensageiro) para tirosinase. As células exibiram concentração máxima de melanina após 24 horas de tratamento, não havendo aumento significativo da atividade até 48h (ROSA, 2005). Piao *et al.* (2004) relatam, inclusive, que uma furanocumarina, a 9-hidroxi-4-metoxipsoraleno isolada de *Angelica dahurica*, age como inibidor potente da atividade da tirosinase.

Na tentativa de padronizar o teor de furanocumarinas presentes em todas as amostras-teste para 0,25 µg/mL em ambos os ensaios, foram utilizadas concentrações de 6,25 µg/mL e 2,94 µg/mL para os extratos EBG e EDB, respectivamente. Entretanto, estas concentrações dos extratos podem ter interferido no resultado do estímulo à melanogênese devido à forte atividade antiproliferativa dos mesmos e os resultados da ativação da melanogênese devem ser maiores que os mensurados neste ensaio.

Novos experimentos precisam ser realizados para avaliar os extratos EBG e EDB, o 5-MOP e o 8-MOP em doses menos citotóxicas nos ensaios de avaliação da melanogenicidade já padronizados. Também o estímulo à ativação da atividade da tirosinase e aumento de melanina pelo 8-MOP sem irradiação de UVA devem ser mais investigados para confirmar os resultados encontrados nos testes.

5.6 Avaliação da atividade genotóxica

Como controle positivo foi utilizado o 8-MOP, pois é relatado na literatura que quando associado à UVA, é um gerador de *cross-linking* no DNA e ocasiona efeitos mutagênicos (ROSA *et al.*, 2007). Neste mesmo estudo também empregado como genotoxina fotoativada em células V79 (fibroblastos de pulmão de *hamster* chinês) para investigação do efeito preventivo de uma droga antioxidante na prevenção da genotoxicidade.

A tabela 7 apresenta os resultados dos ensaios utilizando tratamento com os extratos, com o 8-MOP e os respectivos controles negativos na ausência de UVA com *D. melanogaster* nas linhagens de cruzamento padrão (ST) e de alta

bioativação (HB). Cada concentração de cada amostra ou controle positivo foi analisada em 40 asas de indivíduos descendentes do cruzamento padrão (ST) e 40 asas de indivíduos descendentes do cruzamento de alta bioativação (HB) de *D. melanogaster*, totalizando 800 asas analisadas.

Tabela 7 - Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com 8-MOP, extrato seco de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e de extrato seco de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) sem irradiação UVA (n=40).

Compostos	Concentração (mg/mL)	Manchas simples pequenas (1-2 células)m=2			Manchas simples grandes (>2 células) m=5			Manchas gêmeas m=5			Total de manchas m=2			Frequência de mutação por 10 ⁵ células	
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D		
ST	Controle		10	0,25		1	0,03		1	0,03		12	0,30		1,23
	8-MOP	0,1	12	0,30	i	2	0,05	i	1	0,03	i	15	0,38	i	1,54
		0,2	13	0,33	i	2	0,05	i	0	0,00	i	15	0,38	i	1,54
		0,4	14	0,35	i	3	0,08	i	0	0,00	i	17	0,43	i	1,74
		0,8	17	0,43	i	1	0,03	i	0	0,00	i	18	0,45	i	1,84
	EDB	0,4	13	0,33	i	2	0,05	i	0	0,00	i	15	0,38	i	1,54
		0,8	17	0,43	i	1	0,03	i	0	0,00	i	18	0,45	i	1,84
		1,6	24	0,60	+	4	0,10	i	1	0,03	i	29	0,73	+	2,97
	EBG	0,4	14	0,35	i	0	0,00	i	1	0,03	i	14	0,35	i	1,43
		0,8	12	0,30	i	2	0,05	i	0	0,00	i	14	0,35	i	1,43
1,6		16	0,40	i	3	0,08	i	0	0,00	i	19	0,48	i	1,95	
HB	Controle		12	0,30		2	0,05		1	0,03		15	0,38		1,54
	8-MOP	0,1	10	0,25	-	0	0,00	i	0	0,00	i	10	0,25	-	1,02
		0,2	15	0,38	i	3	0,08	i	1	0,03	i	19	0,48	i	1,95
		0,4	18	0,45	i	4	0,10	i	4	0,10	i	26	0,65	i	2,66
		0,8	16	0,40	i	1	0,03	i	0	0,00	i	17	0,43	i	1,74
	EDB	0,4	14	0,35	i	0	0,00	i	0	0,00	i	14	0,35	-	1,43
		0,8	16	0,40	i	1	0,03	i	0	0,00	i	17	0,43	i	1,74
		1,6	28	0,70	+	0	0,00	i	0	0,00	i	28	0,70	+	2,87
	EBG	0,4	12	0,30	i	2	0,05	i	0	0,00	i	14	0,35	-	1,43
		0,8	16	0,40	i	0	0,00	i	0	0,00	i	16	0,40	i	1,64
1,6		15	0,38	i	2	0,05	i	1	0,03	i	18	0,45	i	1,84	

ST: cruzamento padrão; HB: cruzamento de alta bioativação; Fr.: frequência; D: diagnóstico estatístico com o programa SMART baseado no teste binomial condicional de acordo com níveis de significância de Kastenbaum–Bowman ($\alpha = \beta = 0,05$) de acordo com Frei e Würzler (1988); +: positivo, -: negativo, i: inconclusivo; m: fator de multiplicação.

Os resultados desse ensaio demonstraram que não houve variação significativa do número total de manchas no tratamento com o controle positivo (furanocumarina 8-MOP) e com o extrato EBG em comparação com o controle negativo na ausência de radiação UVA nos indivíduos ST e HB de *D. melanogaster* (Tabela 7). Esses dados sugerem que não há moléculas presentes no 8-MOP e no extrato EBG que se tornam genotóxicas após biotransformação na ausência de UVA pois a linhagem HB possui altos níveis da enzima citocromo oxidase e detecta, portanto, compostos que depois de biotransformados se tornam mais genotóxicos.

O extrato EDB na maior concentração (1,6 µg/mL) apresentou pequena genotoxicidade na ausência de UVA sobre os indivíduos ST e HB. A mutação se apresentou na forma de manchas simples pequenas (mutações dos pelos de uma ou duas células vizinhas), o que sugere que moléculas presentes em pequena quantidade no extrato são genotóxicas nos períodos finais do desenvolvimento larval.

Outro experimento foi realizado utilizando o tratamento com UVA. Mais 800 larvas de *D. melanogaster* de ambas as linhagens (ST e HB) foram expostas por 30 minutos às amostras-teste ou ao controle positivo em solução aquosa antes de serem irradiadas com UVA. Este período de 30 minutos permitiu o contato das amostras-teste com as larvas e a ingestão destes por elas, de forma que a radiação pôde atuar nas amostras em contato com as células do organismo ou até mesmo dentro delas.

Os indivíduos ST e HB tratados com os extratos EDB e EBG e o 8-MOP apresentaram alta frequência de formação de mutações no tratamento com UVA, o que significa que tanto os extratos como o controle positivo apresentaram genotoxicidade (Tabela 8).

Tabela 8 - Frequência de manchas mutantes observadas em asas de descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) de *Drosophila melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e cruzamento de alta bioativação (HB) após tratamento crônico com 8-MOP, extrato seco de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e de extrato seco de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) com irradiação UVA (n=40).

Compostos	Concentração (mg/mL)	Manchas simples pequenas (1-2 células)m=2			Manchas simples grandes (>2 células) m=5			Manchas gêmeas m=5			Total de manchas m=2			Frequência de formação de mutações por 10 ⁵ células			
		Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D	Nº	Fr	D				
ST	Controle				8	0,20		4	0,10		2	0,05		14	0,35		1,43
	8-MOP	0,1	6	0,15	i	96	2,40	+	4	0,10	i	106	2,65	+	10,86		
		0,2	12	0,30	i	85	2,13	+	5	0,13	i	102	2,55	+	10,45		
		0,4	26	0,65	+	69	1,73	+	12	0,30	+	107	2,68	+	10,96		
	EDB	0,4	9	0,23	i	25	0,63	+	2	0,05	i	36	0,90	+	3,69		
		0,8	24	0,60	+	37	0,93	+	3	0,08	i	64	1,60	+	6,56		
		1,6	105	2,63	+	33	0,83	+	51	1,28	+	189	4,70	+	19,36		
	EBG	0,4	5	0,13	-	33	0,83	+	2	0,05	i	40	1,00	+	4,10		
		0,8	8	0,20	i	43	1,08	+	4	0,10	i	55	1,38	+	5,64		
		1,6	14	0,35	i	39	0,98	+	3	0,08	i	56	1,40	+	5,74		
HB	Controle				13	0,33		1	0,03		0	0,00		14	0,35		1,43
	8-MOP	0,1	7	0,18	-	24	0,60	+	1	0,03	i	32	0,80	+	3,28		
		0,2	14	0,35	i	42	1,05	+	0	0,00	i	56	1,40	+	5,74		
		0,4	23	0,58	i	66	1,65	+	1	0,03	i	90	2,25	+	9,22		
	EDB	0,4	21	0,53	i	9	0,23	+	7	0,18	+	37	0,93	+	3,79		
		0,8	42	1,05	+	16	0,40	+	9	0,23	+	67	1,68	+	6,86		
		1,6	93	2,33	+	33	0,83	+	37	0,93	+	163	4,08	+	16,70		
	EBG	0,4	6	0,15	-	20	0,50	+	29	0,73	+	55	1,38	+	5,64		
		0,8	9	0,23	-	41	1,03	+	70	1,75	+	120	3,00	+	12,30		
		1,6	15	0,38	i	49	1,23	+	75	1,88	+	139	3,48	+	14,24		

ST: cruzamento padrão; HB: cruzamento de alta bioativação; Fr.: frequência; D: diagnóstico estatístico com o programa SMART baseado no teste binomial condicional de acordo com níveis de significância de Kastenbaum–Bowman ($\alpha = \beta = 0,05$) de acordo com Frei e Würigler (1988); +: positivo, -: negativo, i: inconclusivo; m: fator de multiplicação.

Os dados da avaliação do 8-MOP na linhagem ST demonstram que a genotoxicidade desta furanocumarina não variou significativamente com o aumento das concentrações (frequência de mutações / 10^5 células entre 4,10 e 5,74). Segundo Bethea *et al.* (1999) os danos causados no DNA pelo 8-MOP, em doses subletais, e pela radiação UVA, podem induzir reparos no DNA. Esta indução ao reparo poderia explicar o não aumento da frequência de mutações no tratamento da linhagem ST, mesmo com o aumento da concentração do 8-MOP. Nessa linhagem, o 8-MOP induziu um número maior de manchas simples grandes nas asas, o que infere que a atividade genotóxica principal, neste caso, ocorre nos períodos mais iniciais do desenvolvimento larval. Um pequeno número, porém significativo, de mutações do tipo manchas gêmeas e do tipo manchas simples pequenas foram induzidas na maior concentração (0,4 mg/mL), o que sugere que essa furanocumarina seja capaz de induzir mutação por recombinação (dupla recombinação gênica ou recombinação entre o centrômero e o locus *flr*) e em períodos finais do desenvolvimento larval, respectivamente, quando usada em alta concentração. A concentração de 0,8 mg/mL e 1,6 mg/mL não foram analisadas para o controle positivo devido o grande número de manchas grandes nas asas, manchas estas com até 400 células vizinhas contendo pelos múltiplos, o que dificultou a análise e a avaliação dos dados.

O extrato EDB demonstrou um aumento dose-dependente da genotoxicidade (frequência de mutações / 10^5 células: 3,69; 6,56 e 20,39). Na concentração mais baixa (0,4 mg/mL), o EDB induziu maior número de manchas simples grandes, o que significa que atuou mais pronunciadamente nos períodos iniciais do desenvolvimento larval. Na concentração intermediária (0,8 mg/mL), houve um aumento significativo do número de manchas simples pequenas, o que sugere presença de moléculas em menor quantidade no extrato capazes de induzir mutação em períodos finais do desenvolvimento. Na concentração mais alta (1,6 mg/mL) houve aumento significativo (4 X) do número de manchas pequenas e de manchas gêmeas (17 X). Esse último dado sugere que o extrato EDB também contenha concentrações pequenas de componentes capazes de induzir mutação por recombinação (dupla recombinação gênica ou recombinação entre o centrômero e o locus *flr*).

O resultado da avaliação do extrato EBG na linhagem ST demonstra que a genotoxicidade apresentada também não variou significativamente com o aumento

das concentrações (frequência de mutações / 10^5 células entre 4,10 e 5,74) e o maior número de manchas simples grandes em todas as concentrações sugere que contenha moléculas genotóxicas nos períodos iniciais do desenvolvimento larval.

Comparando-se os resultados das amostras-teste e do controle positivo 8-MOP na concentração de 0,4 mg/mL, pode-se concluir que a atividade genotóxica do 8-MOP é até três vezes maior que as atividades de EDB e de EBG, que se mostraram semelhantes, ou seja, 8-MOP > EDB \cong EBG. Se considerarmos o conteúdo de furanocumarinas no extrato EDB na concentração de 1,6 mg/mL, que corresponde a 0,13 mg/mL por quantificação em CLAE-DAD, podemos comparar suas características genotóxicas (frequência de mutações / 10^5 células de 20,39 com 105 manchas simples pequenas, 33 manchas simples grandes e 51 manchas gêmeas nas 40 asas analisadas) com a da furanocumarina 8-MOP em concentração semelhante: 0,10 mg/mL (frequência de mutações / 10^5 células de 10,86 com 26 manchas simples pequenas, 69 manchas simples grandes e 12 manchas gêmeas nas 40 asas analisadas). A partir dessa comparação, podemos sugerir que a genotoxicidade do extrato EDB provém de efeito sinérgico das furanocumarinas com outras moléculas presentes no extrato, da presença de outras moléculas também genotóxicas no extrato (aumento de 17 X do número de manchas simples pequenas e 12 X de manchas gêmeas), assim como efeito antagônico de outros compostos com as furanocumarinas (diminuição de 3 X do número de manchas simples grandes).

Essa mesma comparação pode ser realizada com o extrato EBG na concentração de 1,6 mg/mL, que possui 0,06 mg/mL de furanocumarinas, o que corresponde a cerca de metade da menor concentração de 8-MOP utilizada no experimento (0,10 mg/mL). A comparação sugere um aumento significativo do número de manchas simples pequenas (4 X) que pode ser devido um efeito sinérgico das furanocumarinas com outras moléculas presentes no extrato ou presença de outras moléculas genotóxicas no extrato que agem nos períodos finais do desenvolvimento larval.

Cabe ressaltar que as furanocumarinas presentes nos extratos EDB (psoraleno e 5-MOP) e EBG (psoraleno) e a furanocumarina 8-MOP são moléculas semelhantes (diferem na presença ou posição de uma metoxila no núcleo furanocumarínico). Porém, há necessidade de se realizar novos ensaios utilizando

também as furanocumarinas psoraleno e 5-MOP para se confirmar as relações sinérgicas e antagônicas sugeridas acima.

O ensaio com UVA na linhagem de alta bioativação de *D. melanogaster* (HB) demonstrou que os extratos EDB, EBG e o 8-MOP apresentaram genotoxicidade dose-dependente (Tabela 8). O 8-MOP diminuiu a sua genotoxicidade na linhagem de alta bioativação, principalmente nas menores concentrações e permaneceu com maior porcentagem de manchas simples grandes, o que infere que a furanocumarina não aumenta sua atividade genotóxica após a biotransformação, continuando a agir nos períodos mais iniciais do desenvolvimento larval.

O EDB na linhagem HB não apresentou diferenças significativas na frequência de mutações em relação à linhagem ST. Observou-se, no entanto, discreto aumento do número de manchas simples pequenas na menor concentração, sugerindo moléculas que se tornaram genotóxicas após a biotransformação, agindo nos períodos finais do desenvolvimento larval.

O EBG apresentou aumento (2 X) na frequência de mutações na linhagem HB em relação à linhagem ST nas duas maiores concentrações. Na análise dos tipos de manchas, percebe-se que o aumento da genotoxicidade provém do maior número de manchas gêmeas em todas as concentrações utilizadas (14 X; 17 X; 25 X nas concentrações de 0,4; 0,8 e 1,6 mg/mL) em relação a linhagem padrão. Esses dados sugerem que o extrato possui grande quantidade de moléculas progenotóxicas capazes de induzir mutação por recombinação (dupla recombinação gênica ou recombinação entre o centrômero e o locus *flr*). Moléculas estas não relacionadas às furanocumarinas, comparando-se com as características do 8-MOP que não aumentou sua genotoxicidade com a biotransformação celular.

Segundo Teregun *et al.* (1999); Zarabska *et al.* (2000), o tratamento com furanocumarinas fotoativadas pode levar tanto à replicação, síntese e reparo do DNA, como à inibição da síntese de DNA ou morte da célula dependendo da dose utilizada. Leveque *et al.* (2002) acreditam que a inibição da síntese de DNA pode explicar o efeito benéfico do PUVA nas desordens proliferativas como psoríase. Além disso, o reparo do DNA induzido por doses subletais de psoralenos (BETHEA *et al.*, 1999) pode proteger as células saudáveis da mutagenicidade.

De acordo com os resultados deste estudo, sugere-se que a morte celular induzida pela alta genotoxicidade dos extratos EBG e EDB seja útil no tratamento da psoríase, por ser um distúrbio proliferativo, e no vitiligo, se considerarmos a possível

participação de defeitos intrínsecos e extrínsecos dos próprios melanócitos ou da unidade epidermomelânica em sua etiologia.

A comparação entre os controles negativos do ensaio sem UVA (Tabela 7 e Figura 33) e com UVA (Tabela 8 e Figura 33) demonstrou que a UVA utilizada no ensaio, de maneira isolada, não apresentou efeito genotóxico sobre as células do disco imaginal das larvas.

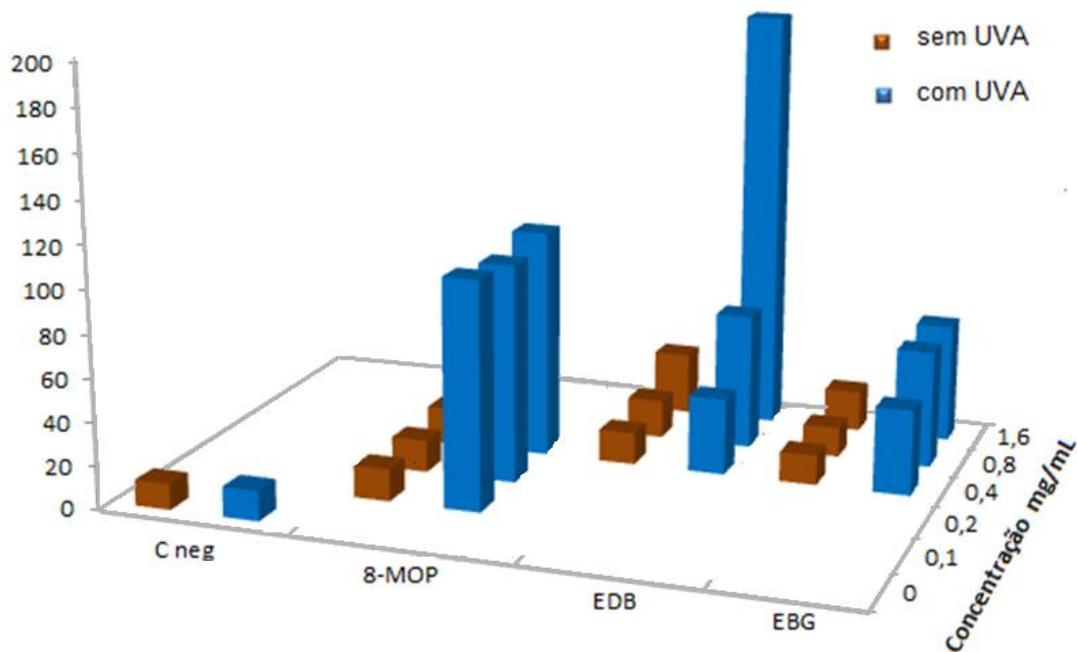


Figura 33 - Número total de manchas mutantes observadas em asas de descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST), após os tratamentos com 8-MOP, extratos de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) e *Brosimum gaudichaudii* (EBG) com irradiação UVA.

Para avaliar a sobrevivência dos indivíduos de *D. melanogaster* de ambas as linhagens após o tratamento com as amostras-teste, realizou-se a curva de sobrevivência. Na avaliação da curva de sobrevivência pode-se perceber que, devido à manipulação das larvas e das moscas adultas, mesmo sem o tratamento, houve redução do número de sobreviventes entre 20 a 30% no controle negativo. Não houve diferença significativa entre o número de larvas do controle negativo tratado e não tratado com UVA (Figuras 34 a 36).

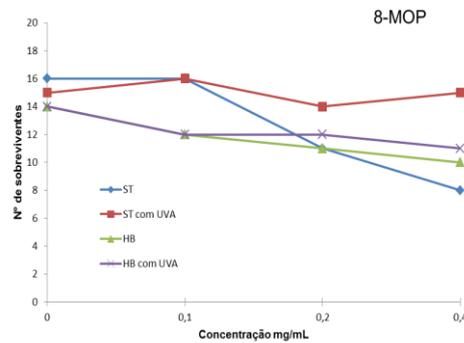


Figura 34 – Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com 8-MOP na presença e ausência de irradiação UVA.

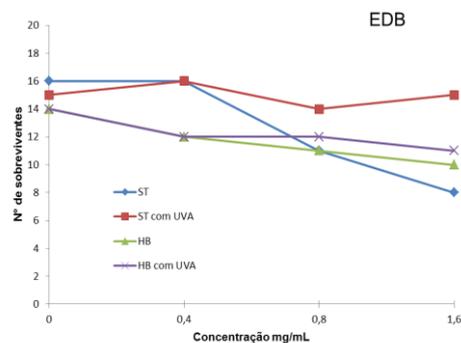


Figura 35 – Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com extrato de *Dorstenia brasiliensis* (EDB) na presença e ausência de irradiação UVA.

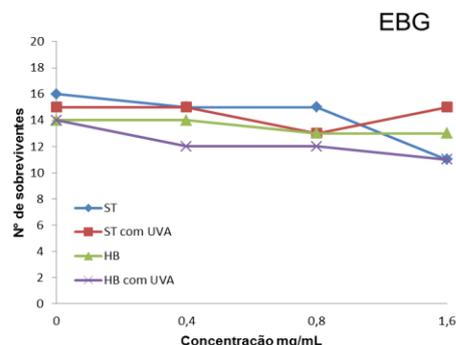


Figura 36 – Curva de sobrevivência obtida em tratamento crônico de 20 descendentes heterozigotos marcados (MH) do cruzamento padrão (ST) e do cruzamento de alta bioativação (HB) de *Drosophila melanogaster*, após o tratamento com extrato de *Brosimum gaudichaudii* (EBG) na presença e ausência de irradiação UVA.

5.7 Sumário geral

- a) A análise farmacognóstica da raiz de *Brosimum gaudichaudii* e das partes subterrâneas de *Dorstenia brasiliensis* foi realizada.
- b) Os perfis cromatográficos por CCD e por CLAE-DAD foram obtidos para os percolados e extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis*.
- c) Os teores de furanocumarinas (psoraleno + 5-MOP) dos percolados e dos extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* foram obtidos por método validado em CLAE-DAD.
- d) A furanocumarina dorstenina foi identificada no percolado e no extrato de *D. brasiliensis* por CG-EM.
- e) Os extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis*, o psoraleno, o 5-metoxipsoraleno e o controle positivo 8-metoxipsoraleno apresentaram forte atividade antiproliferativa em células de melanoma murino B16-F10 na presença de UVA. Na ausência de UVA, tanto os extratos como as substâncias puras foram inativos.
- f) Os extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis*, o 5-metoxipsoraleno e o controle positivo 8-metoxipsoraleno apresentaram forte atividade citotóxica em células normais VERO na presença de UVA. O extrato de *B. gaudichaudii* e o 5-metoxipsoraleno estimularam em baixas concentrações.
- g) Os resultados preliminares das dosagens de tirosinase e melanina indicam que houve ativação da melanogênese para os controles positivos e/ou extratos, na presença de UVA em células de melanoma murino.
- h) Os extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* e o controle positivo 8-metoxipsoraleno foram genotóxicos em indivíduos descendentes de cruzamento padrão de *Drosophila melanogaster* na presença de UVA. Apenas o extrato de *D. brasiliensis* apresentou genotoxicidade dose-dependente. Na ausência de UVA, apenas o extrato de *D. brasiliensis* apresentou atividade genotóxica.
- i) O extrato de *B. gaudichaudii* e o controle positivo apresentaram atividade genotóxica principal no início do desenvolvimento dos indivíduos e o extrato de *D. brasiliensis* nos períodos finais.
- j) O extrato de *D. brasiliensis* apresentou aumento significativo da atividade genotóxica em descendentes de cruzamento de alta bioativação de *Drosophila*

melanogaster, principalmente na forma de manchas gêmeas indicando presença de moléculas progenotóxicas que induzem mutação por recombinação gênica.

k) A comparação das atividades dos extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* fotoativados nos ensaios *in vitro* revelou que o extrato de *B. gaudichaudii* apresenta menor atividade tóxica em células normais e atividade antiproliferativa semelhante à do extrato de *D. brasiliensis* em células neoplásicas.

l) A comparação dos extratos no ensaio *in vivo* SMART na presença de UVA revelou maior atividade genotóxica do extrato de *D. brasiliensis* em relação ao extrato de *B. gaudichaudii*. Porém a presença de substâncias progenotóxicas no extrato de *B. gaudichaudii* o torna praticamente tão genotóxico quanto o outro extrato após a biotransformação.

6. CONCLUSÕES

Os resultados das atividades dos extratos de *B. gaudichaudii* e de *D. brasiliensis* obtidos neste estudo revelaram que ambos os extratos possuem atividade melanogênica. Também que o extrato de *B. gaudichaudii* possui menor citotoxicidade em células normais e menor genotoxicidade no modelo *in vivo*. Apesar de conter moléculas progerotóxicas em sua composição, sabe-se que no organismo humano a ativação destas moléculas é realizada principalmente em enzimas microsossomiais hepáticas após a entrada destas na circulação sanguínea. Portanto, o extrato de *B. gaudichaudii* parece ser o melhor candidato para continuação do trabalho para desenvolvimento de uma formulação tópica para o tratamento tópico do vitiligo na presença de UVA. Salienta-se porém, a necessidade do extrativismo sustentável para evitar a erosão da espécie.

7 REFERÊNCIAS

Abdel-Kader MS. New ester and furocoumarins from the roots of *Pituranthos tortuosus*. J Braz Chem Soc. 2003; 14(1):1-7.

Abegaz BM, Ngadjui BT, Dongo E, Bezabih MT. Chemistry of the Genus *Dorstenia*. Curr Org Chem. 2000; 4(10): 1079-1090.

Abegaz BM, Ngadjui BT, Dongo E, Ngameni B, Nindi MN, Bezabih M. Chalcones and other constituents of *Dorstenia prorepens* and *Dorstenia zenkeri*. Phytochemistry. 2002; 59:877-883.

Abegaz BM, Ngadjui BT, Folefoc GN, Fotso S, Ambassa P, Bezabih M, Dongo E, Rise F, Petersen D. Prenylated flavonoids, monoterpenoid furanocoumarins and other constituents from the twigs of *Dorstenia elliptica* (Moraceae). Phytochemistry. 2004; 65: 221–226.

Aberdam E, Roméro C, Ortonne J. Repeated UVB irradiations do not have the same potential to promote stimulation of melanogenesis in cultured normal human melanocytes. J Cell Sci. 1993; 106(4):1015-1022.

Pacifico A, Leone G. Photo(chemo)therapy for vitiligo. Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine. 2011, 27(5): 261-277.

Alias Y, Awang K, Hadi AHA, Thoison O, Sévenet T, Païs M. An Antimitotic and Cytotoxic Chalcone from *Fissistigma lanuginosum*. J Nat Prod. 1995; 58(8): 1160–1166.

Alice CB, Siqueira NCS, Mentz LA, Silva GAAB, José KFD. Plantas medicinais de uso popular: atlas farmacognóstico. Canoas: ULBRA; 1995.

Almeida ER. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus, 1993.

Alzugaray D, Alzugaray, C. Plantas que curam. São Paulo: Companhia Lithográfica Ypiranga, 1983.

Amorim MEP, da Cunha LC, da SILVEIRA, N.A. Estudo da toxicidade aguda e subaguda de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (mamacadela) em ratos (*Rattus norvegicus*) Revista Eletrônica de Farmácia. 2004; 1(1):52.

Balestrin L, Dias JFG, Miguel OJ, Dall'Stella DSG, Miguel MD. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2008; 18(2): 230-235.

Balestrin, L. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades alelopáticas, antimicrobianas e antioxidante da *Dorstenia multiformis* Miquel, Moraceae. [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2006.

Bellet JS, Prose NS. Vitiligo em crianças: uma revisão de classificação, hipóteses sobre patogênese e tratamento. An Bras Dermatol. 2005; 80(6): 631-636.

Bethea D, Fullmer B, Syed S, Seltzer G, Tiano J, Rischko C. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. *J Dermatol Sci.* 1999; 19:78-88.

Brandão HN, David JP, Couto RD, Nascimento JAP, David, JM. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Quim Nova.* 2010; 33(6), 1359-1369.

Brasil. Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Portaria Nº 971 de 04 de maio de 2006. *Diário Oficial da União – Sec. 1*, 04 maio 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RDC Nº 14 de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2010a.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RE Nº 167 de 14 de janeiro de 2011. Dispõe sobre o indeferimento registro e renovação de registro de medicamento. *Diário Oficial da União – Sec. 1*, 24 de janeiro de 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa Nº 5, de 31 de março de 2010, a qual traz a relação de referências bibliográficas que podem ser utilizadas para avaliar segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos registrados através do Sistema da Pontuação. 2010b.

Carauta JPP. *Dorstenia* L. (Moraceae) do Brasil e países limítrofes [Dissertação]. Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996b.

Carauta JPP. Moráceas do estado do Rio de Janeiro. *Albertoa*; 1996a; 4(13):196.

Cardoso CAL, Vilegas W, Honda NK. Quantitative determination of furocoumarins in samples of “carapiá” by capillary gas chromatography. *Chromatographia*. 1999; 50 (1/2): 11-14.

Casagrande C, Ronchietti F, Russo G. The structure of syriogenin. *Tetrahedron*. 1974; 30:3587-3559.

Celeghini RMS, Yariwake JH, Lanças FM. Otimização das condições de extração hidroalcoólica das furanocumarinas de *Dorstenia brasiliensis* Lam. por maceração com ultra-som e análise quantitativa por CLAE/UV e fluorescência. *Rev Bras PI Med*. 2007; 9(2): 61-66.

Chang T. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int J Mol Sci*. 2009; 10(6): 2440–2475.

Chaudary SK, Ceska O, Warrington PJ, Ashwood-Smith MJ. Increased furocoumarin content of celery during storage. *J Agric Food Chem*. 1985, 33: 1153-1157.

Chimichi S, Boccalini M, Cosimelli B, Viola G, Vedaldi D, Dall'Acqua F. A convenient synthesis of psoralens. *Tetrahedron*. 2002; 58:4859-4863.

Conceição M. As plantas medicinais do ano 2000. Brasília: Tao; 1980.

Cooper, GM. A célula – uma abordagem molecular. 2ed. Artmed, Porto Alegre, 2001. p. 633-669.

Corash L, Lin L. Novel processes for inactivation of leukocytes to prevent transfusion associated graft-versus-host disease. Bone Marrow Transplant. 2004; 33: 1–7.

Corrêa MP. Dicionário de Plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura; 1931.

Costa JE, Lacaz E. Fotoprotetores. Med Cutan Ibero Lat Am. 2001; 29(3):145-152.

Cunha LC, Paula JR, Sá VA, Amorim MEP, Barros ICM, Brito LAB, Silveira N. Acute toxicity of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. root extract in mice: determination of both approximate and median lethal doses. Rev Bras Farmacogn. 2008; 18(4):532-538.

Dall’Stella DSG. Estudo fitoquímico aplicado da fração solúvel do extrato etanólico bruto da *Dorstenia multiformis* Miquel (MORACEAE) [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2008.

Devlin TM. Manual de Bioquímica Química com Correlações Clínicas. São Paulo: Editora Blücher, 2007.

Diawara MM, Trumble JT. Linear furanocoumarins. In: D’Mello J P F (Ed). Handbook of plant and fungal toxicants. New York: CRC Press, 1997.

Dufall KG, Ngadjui B, Simeon K, Abegaz B, Croft, K. Antioxidant activity of prenylated flavonoids from the West African medicinal plant *Dorstenia mannii*. J Ethnopharmacol. 2003; 87: 67–72.

Faperj 2000. Quando os linfócitos passam para o time adversário. Rio de Janeiro, ano III, n. 18, p.6-7, jun.jul 2001. Disponível em: http://www.faperj.br/interna.phtml?obj_id=301. Acesso em: 15 abril 2011.

Falabella R, Barona MI. Update on skin repigmentation therapies in vitiligo. Pigment Cell Melanoma Res. 2008; 22: 42–65.

Ferrari F, Monache FD, Suárez AI, Arvelo F, Compagnone RS. New cytotoxic isoflavone from the root bark of *Brosimum utile*. Nat Prod Res. 2005; 19(4): 331 – 335.

Ferreira LA, Leite JPV. Desenvolvimento de formulações fitoterápicas. In: Leite JPV (org.) Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 205-251.

Ferreira, PC. Toxicidade e atividade tripanocida do extrato bruto de *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae) (Mama-cadela) no pré-tratamento e tratamento de camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* [Dissertação]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia; 2008.

Filqueira AL, França E, Azulay DR, Azulay RD. Tratamento pelas Radiações. In: Azulay RD, Azulay DR (Org.). Dermatologia. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. Cap. 46.

Fonseca A, Prista LN. Manual de Terapêutica Dermatológica e Cosmetologia. Roca, 2000.

Fouche G, Cragg GM, Pillay P, Koleniskova N, Maharaj VJ, Senabe J. *In vitro* anticancer screening of South African plants. J Ethnopharmacol. 2008; 119: 455–461.

Franke K, Porzel A, Masaoud M, Adam G, Schmidt J. Furanocoumarins from *Dorstenia gigas*. Phytochemistry. 2001; 56:611-621.

Frei H, Würzler FE. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. Mutat Res. 1998; 203: 308-397.

Freshney IR. Culture of animal cells. A manual of Basic Technique. 5^o ed. New York: Wiley-Liss, 2005.

Gon MCC, Rocha MM, Gon AS. Análise do conceito de estigma em crianças com dermatoses crônicas. Revista Brasileira de Terapia Comportamental e Cognitiva. 2005; 7(1): 15-20.

Graf U, Schaik NV. Improved high bioactivation cross for the wing mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Mutat Res. 1992; 271: 59-67.

Graf U, Spanó MA, Guzmán Rincón J, Abraham SK and Andrade HH. The wing somatic mutation and recombination test (SMART) in *Drosophila melanogaster*. An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex

mixtures as well as for studies of antigenotoxicity. African Newsletter on Occupational Health and Safety. 1996; 6(1):9-13.

Graf U, Würigler FE, Katz AJ, Frei H, Juon H, Hall CB, Kale PG. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. Environ Mutagen. 1984; 6:153-188.

Guan S, Su W, Wang N, Li P, Wang Y. A potent tirosinase activator from radix *Polygoni multiflori* and its melanogenesis stimulatory effect in B16 melanoma cells. Phytother Res. 2008; 22: 660-663.

Gurgel CBFM. A fitoterapia indígena no Brasil colonial. Conferência do XI Encontro Regional de História. 2004. Associação Nacional de História. Rio de Janeiro. Disponível em URL http://www.rj.anpuh.org/conteudo/view?ID_CONTEUDO=305. Acesso em 12 out 2011.

Gusmán-Rincón J, Graf U. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation And Recombination Test as a biomonitor. In: Butterworth FM et al. (eds.). Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes. New York: Plenum Press, 1995. p.169-181.

Henriksson E, Kjellén E, Wahlberg P, Wennerberg J, Kjellstrom JH. Differences in estimates of cisplatin-induced cell kill in vitro between colorimetric and cell count/colony assays. In Vitro Cell Dev Biol Anim. 2006; 42: 320-323.

Hideaki Matsuda H, Kawaguchi Y, Yamazaki M, Hirata N, Naruto S, Sanuma Y, Kaihatsu T, Kubo M. Melanogenesis Stimulation in Murine B16 Melanoma Cells by

Piper nigrum Leaf Extract and Its Lignan Constituents. Biol Pharm Bull. 2004; 27(10): 1611-1616.

Houghton P, Fang R, Techatanawat I, Steventon G, Hylands PJ, Lee CC. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. Methods. 2007; 42 (4): 377-387.

Im SJ, Kim KN, Yun YG, Lee JC, Mun YJ, Kim JH *et al.* Effect of *Radix Ginseng* and *Radix Trichosanthis* on the melanogenesis. Biol Pharm Bull. 2003; 26: 849–853.

Isoldi MC, Scarparo AC, ROBERT IVAN Schumacher RI, Castrucci AML. Psoralen Activity and Binding Sites in Melanotic and Amelanotic Human Melanoma Cells. Pigment Cell Res. 1999; 12: 367-375.

Itharat A, Houghton PJ, Eno-Amooquaye E, Burke PJ, Sampson JH, Raman A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. J Ethnopharmacol. 2004; 90: 33-38.

Keane TE, Petros JA, Velimirovich B, Yue KT, Graham SD Jr. Methoxypsoralen phototherapy of transitional cell carcinoma. Urology. 1994; 44(6): 842-846.

Keepers YP, Pizao EP, Peters G J, van Ark-Otte J, Winograd B, Pinedo, HM. Comparison of the sulphorhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. Eur J Cancer. 1991; 27(12): 1717.

Kim YJ, Uyama, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. *Cell Mol Life Sci.* 2005; 62(15): 1707-1723.

Kuster RM, Bernardo RR, Da Silva AJR, Parente JP, Mors WB. Furocoumarins from the rhizomes of *Dorstenia brasiliensis*. *Phytochemistry.* 1994; 36(1): 221-223.

Lapronti I, Bianchi N, Borgatti M, Fibach E, Prus E, Gambari R. Accumulation of γ -globin mRNA in human erythroid cells treated with angelicin. *Eur J Haematol.* 2003; 71: 189-195.

Laskin JD, Lee E, Yurkow EJ, Laskin DL, Gallo MA. A possible mechanism of psoralen phototoxicity not involving direct interaction with DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 1985; 82: 6158-6162.

Laskin JK, Lee E. Psoralen binding and inhibition of epidermal growth factor binding by psoralen/ ultraviolet light (PUVA) in human epithelial cells. *Biochemical Pharmacology.* 1991; 41(1): 125-132.

Lee J, Jung E, Lee J, Huh S, Boo YC, Hyun CG, Kim YS, Park, D. Mechanisms of melanogenesis inhibition by 2,5-dimethyl-4-hydroxy-3(2H)-furanone. *Br J Dermatol.* 2007; 157(2): 242-248.

Leite VC, Santos RF, Chen LC, Guillo LA. Psoralen derivatives and longwave ultraviolet irradiation are active in vitro against human melanoma cell line. *J Photochem Photobiol B.* 2004; 76: 49-53.

Leveque N, Muret P, Mary S, Bérard M, Makki S, Pierre Kantelip J, Humbert P. Validation of a microdialysis-gas chromatographic-mass spectrometric method to assess 8-methoxypsoralen in psoriatic patient dermis. *J Chromatogr B*. 2002; 780:119-127.

Lopes D, Oliveira RR, Kaplan MA, Lage CS, Leitão AC. Photosensitization and mutation induced in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* strains by dorstenin, a psoralen analog isolated from *Dorstenia bahiensis*. *Planta med*. 2001; 67: 820-824.

Lorenzi H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

Mar W, Je KH, Seo EK. Cytotoxic constituents of *Psoralea corylifolia*. *Arch Pharm Res*. 2001; 24(3): 211-213.

Martins MV. *Brosimum gaudichaudii* Tréc. a brazilian medicinal plant. *Newsletter-G-15 Gene Bank for medicinal plants*. 1995; 7-8: 9.

Marwan MM, Jiang J, Castrucci AML, Hadley Me. Psoralens Stimulate Mouse Melanocyte and Melanoma Tyrosinase Activity in the Absence of Ultraviolet Light. *Pigment Cell Res*. 1990; 3(4): 214-221.

Mengeaud V, Ortonne J-P. PUVA (5-methoxypsoralen plus UVA) enhances melanogenesis and modulates expression of melanogenic proteins in cultured melanocytes. *J Invest Dermatol*. 1996; 107(1): 57-62.

Milioni K, Bloom E, Maibach HI. Nuclear Receptor for Psoralen in Cultured Human Skin Fibroblasts. In: Toxicology of Skin, Maibach HI. Philadelphia: Taylor and Francis, 2001. p. 501-529.

Miot LDB, Miot HA, Silva MG, Marques MEA. Fisiopatologia do melasma. *An Bras Dermatol*. 2009; 84(6): 623-635.

Monks, A, Scudiero D, Skehan P, Shoemaker R, Paull K, Vistica D, Curtis H, Langley J, Cronise P, Vaigro-Wolf A, Gray-Goodrich M, Campbell H, Mayo J, Boyd M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1991; 83(11): 757-766.

Montagner C. Atividades antifúngica, citotóxica (células tumorais humanas) e hemolítica de cumarinas naturais e semi-sintéticas [Dissertação]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.

Monteiro VFF, Mathias L, Vieira IJC, Schripsema J, Braz-Filho R. Prenylated coumarins, chalcone and new cinnamic acid and dihydrocinnamic acid derivatives from *Brosimum gaudichaudii*. *J Braz Chem Soc*. 2002; 13(2): 281-287.

Müller MC, Ramos DG. Psicodermatologia: uma interface entre Psicologia e Dermatologia. *Psicologia Ciência e Profissão*. 2004; 24(3): 76-81.

Murray RDH. Coumarins. *Nat Prod Rep*. 1995; 6: 477-505.

Nagdjuj BT, Abegaz BM, Dongo E, Tamboue H, Fogue K. Geranylated and prenylated flavonoids from the twigs of *Dorstenia manni*. *Phytochemistry*. 1998a; 48(2): 349-354.

Nagdjuj BT, Dongo E, Happi EN, Bezabih M, Abegaz BM. Prenylated flavones and phenylpropanoid derivatives from roots *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry*. 1998b; 48(4): 733-737.

Nagdjuj BT, Tabopda TK, Dongo E, Kapche GWF, Sandor P, Abegaz BM. Dorsilurins C, D and E, three prenylated flavonoids from the roots of *Dorstenia psilurus*. *Phytochemistry*. 1999; 52: 731-735.

Nassar MI, Aboutabl EA, Makled YA, El-Khrisy EA, Osman AF. Secondary metabolites and pharmacology of *Foeniculum vulgare* MILL. Subsp. *Piperitum*. *Rev Latinoamer Quím*. 2010; 38(2): 103-112.

Newman DJ, Cragg GM, Snader K M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981–2002. *J Nat Prod*. 2003; 66(7): 1022-1037.

Nijsten TEC, Stern, RS. The increased risk of Skin Cancer Is Persistent After Discontinuation of Psoralen+Ultraviolet A: A Cohort Study. *J Invest Dermatol*. 2003; 121(2): 252-258.

Oliveira LCP, Mause R, Nunomura SM. Quantitative HPLC analysis of some marker compounds of hydroalcoholic extracts of *Piper aduncum* L. *J Braz Chem Soc*. 2005; 16(6B): 1439-1442.

Pathak MA, Fitzpatrick TB. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. *J Photochem Photobiol B*. 1992; 14:3-22.

Piao XL, Baek, SH, Park MK, Park JH. Tyrosinase-inhibitory furanocoumarin from *Angelica dahurica*. Biol Pharm Bull. 2004; 27:1144-1146.

Piñero J.; López Baena M.; Ortiz T.; Cortés, F. Sister chromatid Exchange induced by DNA topoisomerases poisons in late replicating heterochromatin: influence of inhibition of replication and transcription. Mutat. Res. 1996; 354: 195-201.

Pires A.E. Desenvolvimento e validação de metodologias para determinação de furanocumarinas em medicamentos fitoterápicos. [Dissertação]. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul; 2004.

Pires AE, Honda NK, Cardoso CAL. A method for fast determination of psoralens in oral solutions of phytomedicines using liquid chromatography. J Pharm Biomed Anal. 2004; 36(2): 415 – 420.

Pozetti GL. Estudo químico de *Dorstenia bryoniifolia* MART EX MIQ. (MORACEAE). Ecl Quím. 1988; 13: 41-51.

Preston RJ, Sebastian JRS, McFee AF. The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. Mutat Res. 1987; 189 (2): 175–183.

Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguaiensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. Mutat Res. 2004; 554: 53-65.

Rang HP, Ritter JM, Dale MM. In: Farmacologia. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004.

Ribas G.; Xamena N.; Creus A; Marcos R. Sister-chromatid exchange (SCE) induction by inhibitors of DNA topoisomerases in cultured human lymphocytes. *Mutat Res.* 1996; 368: 205-211.

Rocha LM, 2009. Controle de qualidade de drogas vegetais e fitoterápicos. In: Leite JPV (org.) *Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, p. 253-276.

Rocha LM, Moreira LMA. Diagnóstico laboratorial do albinismo oculocutâneo. *J Bras Patol Med Lab.* 2007; 43(1): 25-30.

Rosa EC, Natali MRM. Vitiligo: um problema que não pode passar em branco. *SaudPesq.* 2009; 2(1): 119-126.

Rosa FC. Avaliação da atividade melanogênica *in vitro* e *in vivo* de extratos de *Brosimum gaudichaudii* e *Dorstenia sp* em melanomas de ratos e pele de cobaias. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Universidade de Ribeirão Preto; 2005.

Rosa RM, Moura DJ, Romano E Silva AC, Saffi J, Pêgas Henriques JA. Antioxidant activity of diphenyl diselenide prevents the genotoxicity of several mutagens in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res.* 2007; 631(1):44-54.

Said A, Makki S, Muret P, Humbert P, Millet J. Psoralens percutaneous permeation across the human whole skin and the epidermis in respect to their polarity (in vitro study). *J Dermatol Sci.* 1997; 14: 136-144.

Santana L, Uriarte E, Roleira F, Milhazes N, Borges F. Furocoumarins in Medicinal Chemistry. Synthesis, Natural Occurrence and Biological Activity. *Current Medicinal Chemistry*. 2004; 11: 3239-3261.

Schenkel EP, Gosman G, Petrovick PR. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões CMO *et al.* *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFSC, 1999. p.291.

Schmitt IM, Chimenti S, Gasparro FP. Psoralen-protein photochemistry – a forgotten field. *J Photochem Photobiol B*. 1995; 27(2): 101-107.

Sepel LMN, Loreto ELS. 2010: Um século de *Drosophila* na genética. *Genética na Escola*. 2010; 5(2): 42-47.

Seplantec. Inventário de plantas medicinais do estado da Bahia. Salvador: Subsecretaria de Ciência e Tecnologia, 1979.

Silva, WS. Sistemática filogenética dos gêneros neotropicais da tribo Dorstenieae Dumort. *Brosimum* Sw, *Helianthostylis* Baillon e *Trymatococcus* Poepp. & Endl. (MORACEAE). [Dissertação]. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2008.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. New Colorimetric Cytotoxicity Assay For Anticancer-Drug Screening. *J Natl Cancer Inst*. 1990; 82: 1107-1112.

Steiner D, Villas RT. Vitiligo. *An Bras Dermatol*. 2004; 79(3): 335-351.

Suffness SM, Pezzuto JM. Assays for cytotoxicity and antitumor activity. Chapter 4. In: Methods of Plant Biochemistry, Vol. 9. (K. Hostettmann ed.). Academic Press, London, 1991. p.71-133.

Teregun M, Ozturk S, Selman-Pakoglu N. An unusual cause of burn injury: unsupervised use of drugs that contain psoralens. J Burn Care Rehabil. 1999; 20: 2-5.

Terreaux C, Maillard M, Stoeckli-Evans, Gupta MP, Downum KR, Quirke JME, Hostettmann K. Structure revision of a furanocoumarin from *Dorstenia contrajerva*. Phytochemistry. 1995; 39(3): 645-647.

Truite CVR, Philippsen GS, Ueda-Nakamura T, Natali MR, Dias Filho BP, Bento AC, Baesso ML, Nakamura CV. Percutaneous penetration, melanin activation and toxicity evaluation of a phytotherapeutic formulation for vitiligo therapeutic. Photochem Photobiol. 2007; 83:1529-1536.

Uchiyama T, Hara S, Makino M, Fujimoto Y. seco-Adianane-type triterpenoides from *Dorstenia brasiliensis* (Moraceae). Phytochemistry. 2002; 60: 761-764.

Vagner H. Pesquisa fitomédica no novo milênio: tendências e mudanças. In: Yunes RA, Cechinel Filho V (orgs.) 2. ed. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Univali, 2009. p. 35-49.

Varanda EA, Pozetti GL, Lourenço MV, Vilegas W, Raddi MSG. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. J Ethnopharmacol. 2002; 81: 257-264.

Varanda EA. Atividade mutagênica de plantas medicinais. Rev Ciênc Farm Básica Apl. 2006; 27(1): 1-7.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. Nat Protoc. 2006; 1(3): 1112-1116.

Vilegas JHY, Lanças FM, Vilegas W, Pozetti GL. Further triterpenes, steroids and furocoumarins from Brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). J Braz Chem Soc. 1997; 8: 529-535.

Vilegas JHY. Técnicas modernas de extração e de análise cromatográfica aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais brasileiras. [Tese de Livre Docência]. São Carlos: Universidade de São Paulo; 2001.

Vilegas W, Cardoso CAL, Quevedo AEP. Controle químico de qualidade de fitoterápicos e plantas medicinais. In: Yunes RA, Cechinel Filho V (orgs.) 2. ed. Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. Itajaí: Univali, 2009.p.165-166.

Vilegas W, Pozetti GL, Vilegas JHY. Coumarins from *Brosimum gaudichaudii*. J Nat Prod. 1993; 56(3): 416-417.

Viu AFM, da Costa EA, Viu MAO, Silva JF, Campos LZO. Avaliação do efeito de diferentes substratos sobre a germinação e o crescimento de plântulas de *Brosimum gaudichaudii* Trec.(mama-cadela). Revista Brasileira de Biociências. 2007; 5 (2): 960-962.

Vogel W, Graf U, Frei H, Nivard MMJ. The results of assays in *Drosophila* as indicators of exposure to carcinogens. In: The Use of Short- and medium – Term Tests for Carcinogens and Data on Genetic Effects in Carcinogenic Hazard Evaluation (McGregor, D.B., Rice, J.M., Venitt, S., eds.). IARC Sci. Publi., 146, 1999. p.427-470.

Wang Y, Hong C, Zhou C, Xu D, Qu H, Cheng Y. Screening antitumor compounds psoralen and isopsoralen from *Psoralea corylifolia* L. seeds. Evid Based Complement Alternat Med. 2009; 8: 1-7.

Woldu Y, Abegaz B, Botta B, Monache GD, Monache FD. Styrenes from *Dorstenia barnimiana*. Phytochemistry. 1988; 27(4): 1227-1228.

Wu JZ, Situ ZQ, Wang W, Chen JY, Liu B. Antitumor activity of psoralen on mucoepidermoid carcinoma cell line MEC-1. Chin Med J. 1992; 105(11): 913-7.

Wu S, Zhang Z, Zhao J. An experimental study on antitumor activity of psoralen on mammary cancer cell line EMT6 in vitro and in vivo. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 1998; 23(5): 303-305.

Yunes RA, Pedrosa RC, Filho VC. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. Quim Nova. 2001; 24(1): 147-152.

Zarabska Z, Waszkowska E, Caffieri S, Dall'Acqua F. PUVA (psoralen+UVA) photochemotherapy: processes triggered in the cells. Il Farmaco. 2000; 55: 515-520.