UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Frederico Severino Martins

**Estudo sistemático da ação melanogênica do
extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul**

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

**Estudo sistemático da ação melanogênica do
extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientando: Frederico Severino Martins

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/05/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2016

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Martins, Frederico Severino

Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. Ribeirão Preto, 2016.

88 p.: il.; 30 cm

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Medicamentos e cosméticos.

Orientador: Freitas, Osvaldo de

Palavras-chave: vitiligo, microdiálise, moraceae, melanina, doenças negligenciadas

FOLHA DE APROVAÇÃO

Frederico Severino Martins

Título da Tese: Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas para obtenção
do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo de Freitas

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.

Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico esse trabalho à minha família e aos meus avós, que apesar da minha ausência souberam me apoiar e estimular minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, aos meus guias e anjos protetores pela oportunidade de estar aqui, na sintonia de atmosferas espirituais elevadas. Que sutilmente, interpenetram o meu clima psíquico, propagando em mim as ideias sublimes e muitas inspirações avançadas, além de abrir minhas rotas da consciência à frente do serviço de esclarecimento e assistência espiritual por entre os planos da vida...

Aos meus pais, Lázaro e Ana, meu irmão José Eduardo, avós José Severino e Arlinda, e tio José Machado, pelo apoio e estímulo constante.

Ao meu orientador e amigo Prof. Dr. Osvaldo de Freitas, pela sua orientação com pesquisador e pelos conselhos de vida.

Ao prof. Edemilson Cardoso da Conceição da Universidade Federal de Goiás, por fornecer o extrato padronizado de *B.gaudichaudii*.

As professoras *Dra.* Maria José Vieira Fonseca e *Dra.* Lusânia Maria Gregg Antunes por abrirem as portas dos seus laboratórios a minha pesquisa.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Hugo, Maira, Paula, Tais, Amanda, Michele, Paulo, Daniele, Karinna, Leonardo, Alex, Nivea, Andreia, Sherwin, Jasmin, João Franco e Erotildes que de alguma forma contribuíram em minha jornada.

Aos técnicos de laboratório e também amigos, José Maria e José Roberto.

A equipe de segurança da FCFRP 'Seu Antônio', Clovis e Doni.

A equipe do Serviço de Pós-Graduação Eleni, Rosana e Rafael.

A agência de fomento FAPESP pela bolsa concedida número 2012/15979-0

RESUMO

MARTINS, F. S. Estudo sistemático da ação melanogênica do extrato de *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 2016, 78 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a ação melanogênica das furanocumarinas, psoraleno e bergapteno assim como do extrato seco das raízes de *Brosimum gaudichaudii* Trécul, contendo 1,2 % m/m de psoraleno, e 5,2 % m/m de bergapteno. A toxicidade celular *in vitro* foi avaliada pelo teste de incorporação do vermelho neutro em quatro linhagens de células diferentes (fibroblastos-L929, queratinócitos-HaCat, Melanoma-B16F10, e melanócitos-Melam-A) e apresentou resposta dose dependente tanto para os fármacos puros quanto para o extrato de *B. gaudichaudii*. Quando expostas à radiação ultravioleta do tipo A e B houve aumento da toxicidade, proporcional a dose de radiação. A mutagenicidade e genotoxicidade realizadas pelos ensaios de micronúcleo e cometa, mostrou que os compostos são genotóxicos e mutagênicos em doses $\geq 150 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A síntese de melanina *in vitro* realizada em cultura de melanoma B16F10 foi dependente da dose e do tempo de exposição aos fármacos e UV. Nas concentrações máximas usadas ($48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno, $104 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato) o psoraleno aumentou a produção de melanina em 26 %, o bergapteno em 69 %, e o extrato de *B.gaudichaudii* em 163 %. Quando utilizado mistura equivalente $6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno e $26 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno a presente em $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato a produção de melanina foi de 61%. A atividade da tirosinase em culturas de B16F10, tratadas com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno ou bergapteno, quando comparada ao grupo não tratado aumentou em 13% a atividade enzimática, quando associados foi de 37%, e $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato em 54,1%. Com o ensaio de microdiálise *in vivo* observou-se que os fármacos são rapidamente absorvidos pela pele e distribuídos no plasma. Ambos os compostos apresentaram uma cinética linear. O estudo de produção de melanina *in vivo* confirmou que a radiação estimula a produção de melanina assim como o extrato de *B.Gaudichaudii*, e quando associados (PUVA) a síntese de melanina foi 143% maior em comparação ao controle negativo. Os resultados deste trabalho mostraram a capacidade de pigmentação dos fármacos assim como do *B.Gaudichaudii*, revelando ainda o sinergismo entre psoraleno e bergapteno.

Palavras-chave: vitiligo, microdiálise, moraceae, melanina, doenças negligenciadas

ABSTRACT

MARTINS, F. S. Systematic study of melanogenic action of *Brosimum gaudichaudii* Trécul. 2016, 78 p. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

The objective of this study was to evaluate the melanogenic action of furanocoumarins, namely, psoralen and bergapten, as extract of *Brosimum gaudichaudii* Trécul containing 1.2% m / m (psoralen), 5.2% m / m (bergapten) . The cellular toxicity (*in vitro*) was evaluated by neutral red incorporation test in four different cell lines (fibroblasts, L929, keratinocytes, HaCaT, melanoma, B16F10, and melanocyte-Melan-A) and showed dose dependent response to both extracted compounds, as well as the whole extract of *B. gaudichaudii*. The ultraviolet radiation type A and B increased the toxicity associated with the compounds and severity of toxicity was proportional to the radiation dose. The mutagenicity and genotoxicity evaluated by the micronucleus test and comet showed that the compounds are genotoxic and mutagenic compounds at concentrations $\geq 150 \mu\text{g/mL}$. The *in vitro* melanin synthesis, performed in melanoma B16F10, was dose, duration and UV dependent. In the maximum concentration used (48 $\mu\text{g/mL}$ psoralen, 104 $\mu\text{g/mL}$ bergapten and 0.5 mg.mL^{-1} extract) psoralen increased melanin synthesis by 26%, bergapten by 69% and the *B.gaudichaudii* extract by 163%. When administered as an equivalent mixture of 6 $\mu\text{g/mL}$ psoralen and 26 $\mu\text{g/mL}$ of bergapten to 0.5 mg/mL of extract, melanin synthesis was increased by 61%. The enzymatic activity of tyrosinase in B16F10 cultures treated with 20 $\mu\text{g/mL}$ of psoralen or bergapten, when compared to non-treated group, increased by 13%; the increases were 37% and 54.1% in the two-compound mixture and 0.5 mg/mL of whole extract. The *in vivo* microdialysis test in rats showed that the drugs are quickly absorbed through the skin and distributed in plasma. Both compound exhibited linear kinetics. The *in vivo* evaluation also showed that melanin production was stimulated by UV radiation as well as *B.Gaudichaudii* extract. When combined with PUVA, melanin synthesis was 143% higher compared to the negative control.

Key words: vitiligo, microdialysis, Moraceae, melanin, neglected diseases

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vitiligo nas mãos (A), vitiligo generalizado (B)	2
Figura 2: Vitiligo visualizado em lâmpada de Wood	7
Figura 3: Furanocumarinas	8
Figura 4: <i>Brosimum gaudichaudii</i> Trécul	10
Figura 5: Mapa de dispersão do <i>B. gaudichaudii</i>	10
Figura 6: Disposição dos melanócitos na epiderme	11
Figura 7: Representação esquemática da Melanogênese.	12
Figura 8: Cromatograma do extrato de <i>B.gaudichaudii</i> , obtido por HPLC-DAD, coluna LUNA 5 μ C8, 250X4.6mm (Phenomenex®), fase móvel de acetonitrila/ água (55:45), com fluxo isocrático de 0,6mL/min.	41
Figura 9: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e <i>B.gaudichaudii</i> (III) em cultura de melanócitos da linhagem Melam-A , tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA(5, 10 e 15 J/cm ²) e UVB (0,1;0,2 e 0,3 J/cm ² . Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos (teste t de Student's, p<0,1.)	40
Figura 10: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e <i>B.gaudichaudii</i> (III) em cultura de melanoma da linhagem B16F10 , tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA (5, 10 e 15 J/cm ²) e UVB (0,1;0,2 e 0,3 J/cm ² . Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos -teste t de Student's, p<0,05.	41
Figura 11: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e <i>B.gaudichaudii</i> (III) em cultura de fibroblastos da linhagem L929, tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA(5, 10 e 15 J/cm ²) e UVB (0,1;0,2 e 0,3 J/cm ² . Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos -teste t de Student's, p<0,1.	42
Figura 12: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e <i>B.gaudichaudii</i> (III) em cultura de queratinócitos da linhagem HaCat , tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA(5, 10 e 15 J/cm ²) e UVB (0,1;0,2 e 0,3 J/cm ² . Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos - teste t de Student's, p<0,05.	42

Figura 13: Os efeitos de 10, 50, 100,150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno, bergapteno ou extrato padronizado de <i>B.gaudichaudii</i> para 6 h para <i>tail moment</i> (I e II) e <i>tail intensity</i> (III e IV) de células B16F10 avaliado pelo ensaio de cometa	45
Figura 14 Perfis da concentração vs tempo de psoraleno e bergapteno no plasma e pele de ratos Wistar, após a administração tópica.	49
Figura 15: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10 tratadas com psoraleno (I), e bergapteno (II) ,	52
Figura 16: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10, estimulada pelo extrato de <i>B.gaudichaudii</i>	53
Figura 17: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10, tratadas com psoraleno, bergapteno ou <i>B.gaudichaudii</i>	54
Figura 18: Atividade da tirosinase em 5×10^5 células de B16F10.....	55
Figura 19 : Efeito da formulação na pigmentação de ratos da linhagem C57BL/6.	56
Figura 20: Conteúdo me melanina na pele de ratos C57BL/6.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 Resultados do teste de <i>system suitability</i>	35
Tabela 2 Avaliação dos efeitos mutagênicos da psoraleno e bergapteno sobre células B16F10 usando o ensaio de micronúcleos pelo bloqueio da citocinese (CBMN-Cit).....	46
Tabela 3: Avaliação dos efeitos mutagênicos da extrato de <i>B.gaudichaudii</i> sobre células B16F10 usando o ensaio de micronúcleos pelo bloqueio da citocinese (CBMN-Cit).....	47
Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise não compartimental após a administração de 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ou 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de bergapteno em dois grupos independentes (n=4) de ratos machos Wistar.....	50

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABELAS	v
SUMÁRIO	i
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 ETIOPATOGENIA DO VITILIGO	3
1.2 TEORIA AUTOIMUNE	4
1.3 TEORIA GENÉTICA	4
1.4 TEORIA TÓXICA	5
1.5 TEORIA NEURAL	5
1.6 TEORIA BIOQUÍMICA.....	5
1.7 TEORIA DE ADESÃO	6
1.8 TRATAMENTO.....	7
1.9 <i>BROSIMUM GAUDICHAUDII</i> TRÉCUL (MORACEAE)	9
1.10 MELANOGÊNESE	10
2	15
OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	17
MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 MATERIAL VEGETAL	17
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	17
3.3 MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICO E BIOLÓGICO (PSORALENO E BERGAPTENO)	17
3.3.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PSORALENO E BERGAPTENO POR CLAE.....	18
3.3.2 AVALIAÇÃO DO SYSTEM <i>SUITABILITY TEST</i>	18
3.3.3 LINEARIDADE	19
3.3.4 PRECISÃO.....	19

3.3.5 EXATIDÃO	19
3.3.6 ROBUSTEZ	20
3.3.7 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	20
3.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	21
3.4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO SECO DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	21
3.5 AVALIAÇÃO DA TOXIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE E MUTAGÊNICIDADE (<i>IN VITRO</i>), DO PSORALENO, BERGAPTENO E EXTRATO PADRONIZADO DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	21
3.5.1 LINHAGEM CELULAR E CULTIVO	21
3.5.2 SOLUÇÃO ESTOQUE DE VERMELHO NEUTRO (VN)	22
3.5.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	22
3.5.4 ENSAIO DE TOXICIDADE CELULAR (<i>IN VITRO</i>) SEM EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV).....	22
3.5.5 ENSAIO DE TOXICIDADE CELULAR (<i>IN VITRO</i>) COM EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ULTRAVIOLETA (UV) DO TIPO A (UVA) E B (UVB)	23
3.5.6 GENOTOXICIDADE AVALIADA PELO ENSAIO COMETA	23
3.5.7 MUTAGENICIDADE AVALIADA PELO ENSAIO DE MICRONÚCLEO COM O BLOQUEIO DA CITOCINESE	24
3.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA <i>IN VITRO</i>	25
3.6.1 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA EM B16F10 NA AUSÊNCIA DE RADIAÇÃO UV	25
3.6.2 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA EM B16F10 NA PRESENÇA DE UV	26
3.6.3 QUANTIFICAÇÃO DA MELANINA <i>IN VITRO</i>	26
3.6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE TIROSINASE CELULAR <i>IN VITRO</i>	27
3.7 PERFIL FARMACOCINÉTICO DAS FURANOCUMARINAS PSORALENO E BERGAPTENO...	27
3.7.1 SISTEMA DE MICRODIÁLISE.....	27
3.7.2 RECUPERAÇÃO RELATIVA	28
3.7.3 ESTUDO FARMACOCINÉTICO <i>IN VIVO</i>	28
3.7.4 ANÁLISE NÃO COMPARTIMENTAL	29
3.7.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
3.8 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA <i>IN VIVO</i>	31
3.8.1 QUANTIFICAÇÃO DA MELANINA À PARTIR DA PELE DOS ANIMAIS	31
4	34
RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA DROGA VEGETAL	34

4.2 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES QUÍMICOS E BIOLÓGICOS (PSORALENO E BERGAPTENO) EM AMOSTRAS DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	34
4.2.1 LINEARIDADE	36
4.2.2 PRECISÃO	36
4.2.3 EXATIDÃO	36
4.2.4 ROBUSTEZ	36
4.2.5 LIMITES DE DETECÇÃO (LD) E QUANTIFICAÇÃO (LQ)	37
4.3 OBTENÇÃO E PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	37
4.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE CELULAR, GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE (<i>IN VITRO</i>) DO PSORALENO, BERGAPTENO E EXTRATO PADRONIZADO DE <i>B. GAUDICHAUDII</i>	37
4.4.1 TOXICIDADE CELULAR PELO TESTE DE INCORPORAÇÃO DO VERMELHO NEUTRO	37
4.4.2 GENOTOXICIDADE AVALIADA PELO ENSAIO COMETA	44
4.4.3 MUTAGENICIDADE AVALIADA PELO ENSAIO DE MICRONÚCLEO (MN) COM O BLOQUEIO DA CITOCINESE	45
4.5 ESTUDO FARMACOCINÉTICO <i>IN VIVO</i>	48
4.5.1 ANÁLISE NÃO COMPARTIMENTAL	48
4.6 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA <i>IN VITRO</i> E ATIVIDADE DA TIROSINASE	51
4.7 AVALIAÇÃO DA CINÉTICA MELANOGÊNICA <i>IN VIVO</i>	55
5 CONCLUSÕES	60
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Vitiligo ou “lepra branca” é uma dermatose cutânea adquirida, crônica, idiopática, caracterizada por máculas acrômicas demarcadas ou irregulares (Nordlund, 1997). A despigmentação tem predileção por regiões da pele como orifícios – olhos, narinas, boca, mamilos, umbigo, genitália e regiões passíveis de trauma como cotovelos e mãos (fenômeno de Köebner) (Nordlund, 1997) (Figura 1).

Na dermatologia é considerada uma das dermatoses com efeito psicossocial mais devastador (Middelkamp-Hup, 2007). É causada pela perda de funcionalidade dos melanócitos, porém a precisa etiologia ainda é desconhecida (Antelo Dp.; Filgueira Al.; Cunha, 2008). Várias hipóteses são sugeridas, entre outras, autoimunidade, agentes xenobióticos (Middelkamp-Hup, 2007), fatores genéticos e mutação no gene CAT (Ai-Young, 2006).

Há vários subtipos de vitiligo, sendo os mais comuns o não segmentar (bilateral) com curso crônico, progressivo e imprevisível, cujas alterações imunes dominam o cenário da enfermidade. O segmentar, menos frequente ocorre em áreas limitadas de um lado do corpo, usualmente de progressão lenta com episódios de agravamento e cessão do espalhamento, podendo ocorrer repigmentação espontânea, porém raramente de forma completa (Antelo Dp.; Filgueira Al.; Cunha, 2008).

Fontes : <http://alinepsicoblog.blogspot.com.br/2012/09/vitiligo.html>
<http://protetoresdapele.org.br/sua-pele/vitiligo/>

Figura 1: Vitiligo nas mãos (A), vitiligo generalizado (B)

A prevalência do vitiligo varia entre 1 a 8,5 %, independente de sexo, raça e idade (Nordlund, 1997). Aproximadamente 50% dos indivíduos portadores desenvolvem a doença antes dos 20 anos de idade (Lerner, 1959) e cerca de 25% destes, antes dos 8 anos, sendo em média entre 4 e 5 anos (Halder *et al.*, 1987).

Embora não seja contagiosa ou com risco à vida, é psicologicamente devastadora. Considerando ser mais prevalente na faixa etária dos 8 aos 20 anos, a capacidade desfigurante, e a importância dos valores estéticos impostos à sociedade moderna, os portadores da doença, geralmente, apresentam problemas como baixa autoestima, isolamento social e distúrbios psiquiátricos, que reduzem a qualidade de vida. Essa questão é especialmente importante em crianças e adolescentes, pois estão em processo de formação e desenvolvimento do seu senso de identidade (Mattoo *et al.*, 2001; 2002; Alikhan *et al.*, 2011).

Apesar do vitiligo ser uma doença cosmopolita e com grande impacto para a sociedade, ela é considerada como uma doença negligenciada conforme definido por Sec. 526 of the US Federal Food, Drug and Cosmetic Act (21 USC 360bb) (Valle *et al.*, 2012).

Até o ano de 2010 foram conduzidos apenas 57 estudos sobre o vitiligo (Whitton *et al.*, 2010), esse cenário é decorrente da baixa viabilidade financeira para medicamentos específicos ao vitiligo e baixo incentivo público e privado. O que reflete na qualidade de vida dos portadores (Ezzedine *et al.*, 2012).

Por ser uma doença que não tem a etiologia elucidada, várias linhas de tratamento são propostos, mas todas têm o intuito de reestabelecer a pigmentação da pele, porém com variados graus de sucesso (Roelandts, 2002). Dentre as estratégias de tratamento podemos citar: corticoides tópicos, imunomoduladores, análogos da vitamina D, superóxido desmutase, fototerapia (UVA/UVB) ou PUVA terapia (psoralenos + UVA); porém todas com vantagens e desvantagens (Roelandts, 2002).

As opções disponíveis de tratamento deixam a desejar, pois a completa repigmentação dificilmente ocorre e entre 15 a 30% dos pacientes não respondem a nenhuma delas. Repigmentação em torno de 75% é considerado resultado excelente, porém este é obtido em aproximadamente 60% dos pacientes.

1.1 Etiopatogenia do vitiligo

As causas do vitiligo ainda não são bem elucidadas, mas várias teorias foram propostas para explicar o evento de despigmentação, entre outras, a autoimune, genética, tóxica, neural e bioquímica.

1.2 Teoria autoimune

Vitiligo é frequentemente associado com doenças autoimunes ou que comprometem o sistema imunológico, como doenças da tireoide, Addison, Hashimoto, lúpus eritematosos, artrite reumatoide, síndrome de Vogt-Kauanagi-Harada, psoríase, *Lichen planus*, *miastenia gravis* e, em caso de anemias. Casos de vitiligo muitas vezes são precedidos por doenças com manifestação clínica ou subclínica (Ongenae *et al.*, 2003; Engin *et al.*, 2008). Anticorpos anti tirosinases, TRP 1 e 2, Pmel17, MelanA, MART-1, MCR-1, HLA-DR, fatores de transcrição SOX 9 e 10, interleucinas I e II, e super expressão dos receptores de superfície Fc e C3b nas células de Langerhans, assim como Imunoglobulinas IgG1, IgG2 e IgG3, e a proteína C3 da ativação do sistema complemento são ocasionalmente encontradas na membrana basal dos queratinócitos e melanócitos de pacientes com vitiligo (Rezaei *et al.*, 2007).

Estudos sobre células mononucleares do sangue periférico utilizando anticorpos monoclonais associados a análises de citometria de fluxo e microscopia de fluorescência revelaram presença de anormalidades nas células T e natural Killer em pacientes com vitiligo, mas devido à heterogeneidade dos pacientes não foi possível estabelecer um padrão celular característico. (Abraham *et al.*, 1993).

1.3 Teoria genética

Componentes genéticos, multifatorial e hereditário vêm sendo observados em pacientes com vitiligo, cerca de 20 % dos portadores têm um familiar de primeiro grau com vitiligo (Alkhateeb *et al.*, 2002). Majumder *et al* (1993) verificaram que pelo menos três genes alelos são comuns em pessoas com vitiligo, sendo tido como uma desordem poligênica. Em estudos genômicos com 71 famílias brancas e com casos de vitiligo, foram identificadas a presença de AIS1 (marcador genético e auto-imune do diabetes melito tipo 1), locus ativados 1p31 (acil-coenzima A desidrogenase, dihidrolipoamido de cadeia ramificada transacilase E2, família DIRAS, GTP-binding

RAS-like 3) e p32.2 (carnitina palmitoiltransferase II) do cromossomo 17, 8, 11, 19, e 22 (Majumder *et al.*, 1993).

1.4 Teoria tóxica

Essa teoria é baseada no fato de que os fenóis e seus derivados são altamente citotóxicos para as células produtoras de melanina. Segundo Lerner (1971), os melanócitos possuem mecanismos capazes de eliminar produtos endógenos tóxicos como dopaquinona e diidroxindol produzidos durante a síntese de melanina. Em pessoas que por alguma razão esse mecanismo é falho, o acúmulo dessas substâncias pode levar à destruição dos melanócitos (Riley, 1970; Lerner, 1971).

1.5 Teoria neural

Os melanócitos são células derivadas da crista neural durante a formação embriológica, assim alguns autores acreditam que doenças ligadas ao sistema nervoso também podem afetar os melanócitos. Foram observados casos de vitiligo em pessoas com desordem do SNC ou doenças que acometem o sistema nervoso, como neurofibromatose, esclerose tuberosa, sífilis, hanseníase, encefalites virais, e esclerose múltipla (Nelhaus, 1970; Barnes, 1988; Parichy *et al.*, 2007).

1.6 Teoria bioquímica

Tem sido amplamente investigada a hipótese de que o vitiligo possa ser causado por uma disfunção metabólica, não necessariamente relacionada com os melanócitos, o que levaria à produção de metabólitos tóxicos, como catecolaminas, quinonas e espécies reativas de oxigênio (Huang *et al.*, 2002; Dell'anna e Picardo, 2006).

As manchas do vitiligo apresentam fluorescência à luz de Wood, devido ao acúmulo excessivo de 6-biopterina com fluorescência rósea e 7-biopterina com fluorescência, amarelo-esverdeada nas bordas da lesão. Substâncias como L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano são derivados do metabolismo celular e sua presença é comumente encontrada durante a ativação da imunidade celular e em pessoas com vitiligo ativo. Ainda não se sabe a razão pela qual essas moléculas se tornam citotóxicas para os melanócitos (Naughton *et al.*, 1986; Schallreuter *et al.*, 2008).

Danos por estresse oxidativo e o aumento da presença de H_2O_2 são evidentes em pacientes com vitiligo ativo. Assim como foi observado que os melanócitos das bordas das lesões são mais sensíveis ao estresse oxidativo.

O estresse oxidativo tem sido atribuído a diferentes fatores endógenos, entre outros, distúrbio na atividade da monoamina-oxidase A (MAO-A), NADPH-oxidase e síntese e regulação da 6R -L-eritro 5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina (6-BH4). Pacientes com vitiligo têm atividade enzimática reduzida (catalase e glutathione oxidase), assim como de vitamina E, componente nutricional com atividade antioxidante (Lerner, 1971; Naughton *et al.*, 1986; Barnes, 1988; Lei *et al.*, 1997).

Estudos têm relatado o envolvimento dos sistemas adrenérgico e colinérgico no desenvolvimento da doença (Iyengar, 1989). Acetilcolinesterase (AChE) é uma importante enzima na promoção e manutenção do estresse oxidativo, sendo inativada por oxidação das tirosinases e metilases por H_2O_2 . Curiosamente, a atividade da AChE é baixa em lesões de vitiligo, mas retorna ao normal quando o tratamento e a pigmentação se iniciam (Schallreuter *et al.*, 2004). Picardo *et al.* (1994) relataram a liberação anormal de catecolaminas em terminações nervosas autonômicas o que resulta produção excessiva de radicais livres. Além disso, níveis elevados de metabólitos de catecolamina na urina de pacientes com vitiligo foram observados durante o período ativo da doença.

1.7 Teoria de adesão

Essa teoria é explicada pelo aparecimento do vitiligo após traumas na pele, como escoriações, mordidas de animais, lacerações, queimaduras, uso de lâminas, ceras depilatórias, atrito e dermatite constantes sobre certa região da pele. Esse fenômeno foi descrito por Köebner e é conhecido como fenômeno Köebner que relatou que 31% dos pacientes com vitiligo tiveram traumas prévios na pele (Gauthier *et al.*, 2003). Estudos com imuno-histoquímica demonstraram a reduzida expressão da glicoproteína de adesão, tenascina em portadores de vitiligo. (Lightner e Erickson, 1990; Njoo *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 2003).

No Brasil não há diretrizes médicas para o diagnóstico do vitiligo, desta forma, muitos dos médicos brasileiros seguem o *Guidelines European Dermatology* (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013). Atualmente o diagnóstico é clínico, sendo necessária a exclusão de outros distúrbios da pele como: pitiríase alba, hipopigmentação pós-

inflamatória, piebaldismo, além da hipopigmentação induzida quimicamente com catecóis, fenóis alquilados e aldeído cinâmico (Prose, 2005). A *lâmpada de Wood* pode ser usada para diferenciar e avaliar as dimensões da lesão, quando o paciente tem pele clara e de difícil distinção (Figura 2).

Fonte : <http://www.gentenatural.com/medicina/patologias/vitiligo.htm>

Figura 2: Vitiligo visualizado em *lâmpada de Wood*

A mancha causada pelo vitiligo tem as bordas delimitadas, já a lesão por pitíriase alba apresenta irregularidades sutis podendo ter escamações da pele. O piebaldismo é uma doença autossômica e os portadores já nascem com a hipopigmentação, ao contrário do vitiligo que se desenvolve durante a vida. A hipopigmentação pós-inflamatória, ocorre após inflamação severa, sendo um evento raro e reversível. A despigmentação causada por agentes químicos é diferenciada do vitiligo pelo relato do paciente à exposição, se a extensão da área afetada for pequena geralmente a cor da pele se reestabelece (Taieb, 2000; Balkrishnan *et al.*, 2004).

1.8 Tratamento

Na ANVISA não há registro de medicamento específico para o tratamento do vitiligo. Desta forma todas as linhas de tratamento baseiam-se em medicamentos considerados *off label*. A primeira linha de tratamento proposta pelo *Guidelines European Dermatology* (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013) são os imunomoduladores como: corticosteroides tópicos ou oral; inibidores de calcineurina; tacrolimo; e primecolimus (0,1%) (Njoo *et al.*, 1998; Westerhof W, 1999). Destes, os corticosteroides são tidos como a classe de primeira escolha, devido ao baixo custo e janela terapêutica ampla, no entanto a remissão da lesão se dá em 33 % dos casos, sendo que o uso prolongado pode

ocasionar efeitos colaterais como glaucoma, hipertensão arterial sistêmica, aumento de peso e catarata (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013).

A eficácia dos inibidores de calcineurina, tracolimo, e primecolimus é em torno de 54%, no entanto, são medicamentos caros e não disponíveis no Sistema Único de Saúde (SUS) para o tratamento de vitiligo, havendo ainda o risco de causar queimaduras e hiperpigmentações permanentes (Russell, 2002).

A fototerapia é outra linha de tratamento muito utilizada, na qual a produção de melanina é estimulada pela exposição do paciente à luz ultravioleta (UV) e sua eficácia varia entre 40-60%. No entanto, ela é nociva para peles desnudas de melanina, protetor natural contra UV. Atualmente há estudos que comprovam a eficácia de comprimentos de onda de espectro estreito (NB-UVB (311-313 nm), BB-UVB (280-320 nm) e Xenon (308 nm), que são mais seguros evitando danos no DNA (Gawkrodger *et al.*, 2008; Silverberg, 2010).

A PUVA terapia, tem eficácia elevada, de cerca de 70-80%, independente da cronologia da doença e é baseada no uso de furanocumarinas associadas com UV. O *Guidelines European Dermatology* recomenda o uso oral de $1,8 \text{ mg.Kg}^{-1}$, ou 0,001% para uso tópico com posterior exposição ao UV e três repetições por semana (Taieb, Alomar, Boehm, *et al.*, 2013). Os psoralenos são furanocumarinas lineares (Figura 3), que podem ser obtidos por síntese orgânica (processo caro e que gera muitos resíduos químicos) ou extraídos de vegetais como: *Carolus Linnaeus* (L.) - Burm, *Ficus* sp; *Brosimum gaudichaudii* Trécul e outras espécies da família Moraceae (POZETTI & BERNARDI, 1971).

Bergapteno

Psoraleno

Fonte: POZETTI & BERNARDI, 1971.

Figura 3: Furanocumarinas

Apesar da PUVA no tratamento de vitiligo ser uma terapia de uso milenar (2000 a.c) ainda hoje há muitas informações contraditórias em relação a sua segurança e

eficácia. Isoldi *et. al.* (1999) relataram que após 72 horas de exposição do melanoma SK-Mel 28 e C32TG ao PUVA houve um aumento da atividade da tirosinase e da melanogênese, sendo que o mesmo não foi observado na ausência de UVA. Resultados opostos foram descritos por Quevedo *et.al* (2011), em que o 5-MOP não associado à UV foi capaz de estimular a produção de tirosinase e melanina.

A atual legislação brasileira (RE nº 88/04, RE nº 89/04, RE nº 90/04, RE nº 91/04) exige, para o registro de fitoterápicos, a realização de testes que avaliem a eficácia e a segurança dos medicamentos. Os estudos de segurança de toxicidade celular, genotoxicidade e mutagenicidade são fundamentais para subsidiar estudos pré-clínicos e posteriormente os clínicos.

1.9 *Brosimum gaudichaudii* Trécul (Moraceae)

Brosimum gaudichaudii Trécul (Figura 4) é popularmente conhecida como mama cadela, arbóreo de cadela ou algodãozinho do campo. A espécie é caracterizada pelo porte arbustivo, chegando a 4 m de altura, com folhas simples, pecioladas, inflorescências formadas por flores unissexuadas pistiladas e estaminadas. Os frutos são monocárpicos, com receptáculo latescente, globoso e carnoso, que quando maduros, apresentam coloração alaranjada, cuja polpa latescente é adocicada e comestível (BARROSO *et al.*, 2002). Em suas raízes, caules e folhas, é encontrado látex (Figura 4c) de odor característico, usado pela “medicina popular” no tratamento de vitiligo (BARROSO *et al.*, 2002).

Nota : a) Exemplar adulto de *B.gaudichaudii*; (b) Frutos de *B. gaudichaudii* (c); Látex do caule de *B. gaudichaudii*.

Figura 4: *Brosimum gaudichaudii* Trécul

Essa espécie está distribuída em todo país (Figura 5), com predominância no cerrado típico, cerradão e mata mesofítica dos estados do Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, São Paulo, Tocantins e Distrito Federal (BARROSO et al., 2002).

Fonte: adaptado de ALMEIDA et al. 1998. Nota: Os pontos vermelhos indicam a distribuição do *B. gaudichaudii*.

Figura 5: Mapa de dispersão do *B. gaudichaudii*.

O *B. gaudichaudii* é uma espécie domesticada e com viabilidade agrônômica. Essa característica é importante por garantir matéria prima caso essa espécie se torne insumo de um fitoterápico.

1.10 Melanogênese

Os melanócitos são células dendríticas, derivadas dos melanoblastos, os quais se originam da crista neural, sua migração para a pele ocorre após o fechamento do tubo neural (Erickson, 1993). Quando se tornam células completamente desenvolvidas, distribuem-se em diversos tecidos, órgãos e anexos (Bomirski et al., 1988).

Na pele, os melanócitos estão localizados na camada basal da epiderme e, ocasionalmente, na derme, seus dendritos se inserem na camada malpighiana, onde transferem seus melanossomas aos queratinócitos (Figura 6). As unidades epidérmico-melânicas são formadas pela associação de melanócitos e queratinócitos na proporção de 1:30. O número de melanócitos/mm² é em torno de dois mil nas áreas mais expostas ao UV e cerca de mil no restante do corpo (Jimbow *et al.*, 2000). Os diferentes tons de pele e pelos não dependem do número de melanócitos, mas sim, do grau da atividade de síntese da melanina e da proporção entre eumelanina e feumelanina sintetizada (Jimbow *et al.*, 2000; Jones *et al.*, 2002).

Fonte : Storm C.A et al., 2006

Figura 6: Disposição dos melanócitos na epiderme

A síntese da melanina é restrita ao melanossomas contidos nos citoplasmas dos melanócitos (Miranda e Botti, 1983; Jimbow *et al.*, 2000; Jimbow K, 2000), e é iniciada pela hidroxilação da tirosina pela ação da tirosina hidroxilase, formando a DOPA, sendo oxidada pela DOPAquinase formando a DOPAquinona (PHILIPPSEN, 2006; KORMOS et al., 2010). A DOPAquinona é um intermediário altamente reativo,

que na ausência de compostos tióis sofre ciclização, levando à produção de eumelanina, de cor preta ou marrom. Na presença de compostos com grupos tióis, como cisteína, leva à geração de cisteinilDOPAs, e a produção da feomelanina, de cor vermelha ou amarelada (Figura 7) (Ito *et al.*, 2000). A síntese da melanina é um processo dependente de oxigênio e cisteína, o que leva à redução de glutathione, antioxidante endógeno (ROS) (SMIT *et al.*, 2008).

Fonte: (Ito *et al.*, 2000)

Figura 7: Representação esquemática da Melanogênese.

O desenvolvimento do melanossoma é dividido em quatro etapas; i) inicia-se a organização da matriz dos melanossomas, vesículas com material fibroso, sem melanina; ii) a matriz já está organizada com fibras em feixes alongados e paralelos, com aspecto estriado característico dos melanossomas; iii) inicia a produção de melanina e deposição sobre os feixes fibrosos e; iv) ao final da etapa 4 o melanossoma está totalmente preenchido por melanina (Bomirski *et al.*, 1988).

Em geral, o formato dos melanossomas está relacionado ao tipo de pigmento produzido. Melanossomas que sintetizam eumelanina tem forma elíptica e contêm matriz fibrilar, enquanto que os que contêm feomelanina são arredondados com vesículas globulares (Hsin-Su, 1999).

Quando os melanócitos da pele são expostos à radiação UV, ocorre a síntese de diversos fatores epidérmicos que estimulam a melanogênese, como os hormônios

α -MSH e ACTH (Rees e Healy, 1997; Wikberg *et al.*, 2000; Rouzaud *et al.*, 2005). Estes agem como regulador parácrino, estimulando a melanogênese (estímulo do receptor MC1R), proliferação e sobrevivência dos melanócitos (Halaban *et al.*, 1988; Imokawa *et al.*, 1992). O α -MSH bloqueia a apoptose induzida pela radiação UVB e, acelera o reparo do DNA, induzidos, pela radiação (Bohm, 2005).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação melanogênica do psoraleno e bergapteno, assim como do extrato padronizado de *Brosimum gaudichaudii* Trécul.

2.2 Objetivos específicos

- Obtenção e padronização do extrato de *B. gaudichaudii*
- Avaliar o efeito citotóxico, genotóxico e mutagênico do psoraleno, bergapteno, e do extrato de *B. gaudichaudii*, em cultura de melanoma, melanócitos, fibroblastos e queratinócitos;
- Avaliar *in vitro* o perfil farmacodinâmico dos fármacos na produção de melanina;
- Avaliar *in vitro* a relação da produção de melanina e atividade de tirosinase, estimuladas pelos fármacos;
- Estabelecer *in vivo* o perfil farmacocinético do psoraleno e bergapteno após a administração tópica;
- Avaliar *in vivo* o perfil farmacodinâmico do extrato de *B. gaudichaudii* na produção de melanina.

Material e Métodos

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

As raízes de *B.gaudichaudii* foram cuidadosamente (evitando lesões nas cascas) coletadas em uma fazenda situada no município de Jussara-GO (com permissão do proprietário). As coordenadas geográficas da área de coleta foram definidas por triangulação via GPS. Posteriormente a espécie foi identificada pelo Prof. Dr. Edemilson Cardoso da Conceição e uma exsicata (nº 45517), foi depositada no herbário da Universidade Federal de Goiás.

Após serem lavadas, as raízes foram desidratadas em estufa com circulação forçada de ar a 40°C, até atingirem peso constante. Após a desidratação, o material seco foi triturado em moinho de facas e acondicionado ao abrigo de luz e umidade.

3.2 Caracterização da droga vegetal

A droga vegetal foi caracterizada segundo os parâmetros de índice intumescência, teor de cinzas, teor de umidade (por Karl Fisher), granulometria e contaminação microbiológica (BRASIL,2010).

3.3 Método analítico para identificação e quantificação dos marcadores químico e biológico (psoraleno e bergapteno)

As análises foram realizadas usando um Sistema Cromatográfico de Alta Eficiência (CLAE) da marca SHIMADZU PROMINENCE, composto por: bomba de alta pressão, modelo LC-20AT, degaseificador de membrana (on-line) modelo DGU-20A5R, Software "Lab Solution Multi-PDA", sistema controlador do HPLC e interface para o computador modelo CBM-20A, detector espectrofotométrico ""Photodiode Array"" modelo SPDM20A, forno de colunas modelo CTO-20A e amostrador automático modelo SIL-10AF.

A separação cromatográfica foi conduzida em coluna LUNA 5 µ C8, 250X4.6 mm (Phenomenex®). A fase móvel empregada foi uma mistura de acetonitrila/ água (55:45), com vazão isocrática de 0,6 mL.min⁻¹ e detecção em comprimentos de onda de 244 nm para o psoraleno e 220 nm para o bergapteno (Martins, 2010).

3.3.1 Validação do método analítico para identificação e quantificação de psoraleno e bergapteno por CLAE

A validação foi realizada segundo guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos (BRASIL. ANVISA. RE nº 899, de 29 de maio de 2003) e ICH (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use).

3.3.2 Avaliação do System *suitability test*

A avaliação da adequação do sistema foi realizada a partir da análise dos parâmetros: fator capacidade, número de pratos teóricos, fator de cauda, resolução e simetria do pico.

3.3.3 Linearidade

Neste ensaio observou-se o intervalo linear frente a diferentes concentrações de psoraleno e bergapteno (Sigma®, St Louis, MO, USA). A faixa avaliada para a linearidade foi de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ para o psoraleno e para o bergapteno foi de $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ a $200\mu\text{g.mL}^{-1}$. A análise foi realizada em triplicata e em três dias diferentes. As médias das áreas foram plotadas no eixo das ordenadas e as concentrações nos eixos da abscissa, e realizada regressão linear utilizando os mínimos quadrados. A curva padrão foi expressa por $y = ax + b$, onde a é o coeficiente angular e b o coeficiente de intercessão com o eixo das ordenadas.

3.3.4 Precisão

Foi avaliada pela determinação do teor de psoraleno e bergapteno no extrato de *B.gaudichaudii* em 12 replicatas, pelo mesmo analista e instrumentação. Foram avaliadas a precisão intra-dia e inter-dia.

3.3.5 Exatidão

Foi realizada pelo método de adição de padrão a amostra. Foram realizadas 9 determinações com 3 réplicas cada, sendo 3 concentrações: baixa, média e alta. Foram adicionadas concentrações conhecidas de padrão de psoraleno ($2\mu\text{g.mL}^{-1}$) e bergapteno ($30\mu\text{g.mL}^{-1}$), diluídos em metanol P.A, às soluções de extrato metanólico de *B.gaudichaudii*. A exatidão foi expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente:

$$\text{Exatidão} = \frac{CME}{CT} \times 100$$

Onde, CME = concentração média experimental e CT = concentração teórica.

3.3.6 Robustez

Foi avaliada variando o fluxo da fase móvel (0,5 e 0,7 mL/min), lote da coluna cromatográfica e temperatura do compartimento de abrigo da coluna (27 C° e 29 C°).

3.3.7 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Foram determinados utilizando-se as curvas padrão obtidas no teste de linearidade.

Equação 1 e 2 Cálculo dos limites de quantificação e detecção.

$$\text{Eq 1} \quad \text{LD} = \frac{\text{Dp} \times 3}{\text{IC}}$$

$$\text{Eq 2} \quad \text{LQ} = \frac{\text{Dp} \times 10}{\text{IC}}$$

Onde: LD = limite de detecção; Dp = desvio padrão do intercepto com o eixo do y de 3 curvas das 3 curvas padrão; IC = inclinação da curva de calibração

3.4 Obtenção do extrato de *B. gaudichaudii*

O extrato hidroalcoólico foi obtido pelo método de percolação, descrito na Farmacopeia Brasileira 5ª edição. Foram utilizados 2 Kg de material vegetal e 10 L de solução hidro alcoólica 55 % (v/v). A vazão do percolado foi de $0,2 \pm 0,25 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, e os teores de psoraleno e bergapteno foram acompanhados por HPLC até a exaustão da droga vegetal. O extrato foi concentrado em rota evaporador Buchi® R220, até a obtenção de um teor de sólidos de 6,22 % (m/m) (BRASIL, 2010). O extrato aquoso foi liofilizado e estocado em freezer (-22°C) para posterior uso.

3.4.1 Caracterização do extrato seco de *B. gaudichaudii*

O extrato vegetal foi caracterizado segundo os parâmetros de teor de umidade (por Karl Fisher), contaminação microbiológica (BRASIL, 2010) e teores de psoraleno e bergapteno.

3.5 Avaliação da toxicidade celular, genotoxicidade e mutagênicidade (*in vitro*), do psoraleno, bergapteno e extrato padronizado de *B. gaudichaudii*

3.5.1 Linhagem celular e cultivo

A toxicidade celular foi avaliada em quatro linhagens de células, fibroblastos (L929) de camundongos, melanoma (B16F10), melanócitos (Melam-A) de camundongos e, queratinócitos humanos (HaCat). As linhagens celulares L929, B16F10, e HaCat foram cedidas pela Dr^a Maria José Vieira Fonseca da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP e a linhagem de Melam-A foi cedida pela professora Dr^a Miriam Galvonas Jasiulionis do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

As células foram cultivadas separadamente em garrafas de 150 cm² utilizando-se meio de cultivos apropriados e suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF). O meio para o cultivo dos fibroblastos foi em DEMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium- Gibco®), os queratinócitos e o melanoma foram cultivados em RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium- Gibco®), os melanócitos foram cultivados em RPMI suplementado com 200 nM de PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate).

Ao atingir confluência celular entre 85-90%, as células foram tripsinizadas e semeadas em placas de fundo plano com 96 poços em densidade celular específica para cada linhagem.

A toxicidade celular em L929 foi realizada com densidade celular de 4×10^4 células/poço, os queratinócitos e os melanócitos 3×10^4 e o melanoma $1,5 \times 10^4$ células/poço.

Após o repique as células foram mantidas em incubadora de CO₂, a 37°C e 5% de CO₂ (Thermo® HEPA 100), por 24 horas e ao atingir uma confluência celular de 85-90%, as células foram usadas no teste de toxicidade celular, utilizando-se diferentes concentrações de extrato, psoraleno e bergapteno.

3.5.2 Solução estoque de Vermelho Neutro (VN)

Foi preparada uma solução aquosa de vermelho neutro ($40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Sigma Aldrich®), a qual foi estocada em freezer a -22°C .

3.5.3 Preparo das amostras

O extrato e os padrões, psoraleno e bergapteno, foram solubilizados em meios de cultura utilizados na manutenção das linhagens celulares (específicos para cada uma). As concentrações de extrato utilizadas para o cálculo da IC₅₀ foram de $2,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1,6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $1,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,8 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, e as concentrações de psoraleno e bergapteno (5-MOP) foram de $0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,3 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,07 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, $0,04 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ e $0,01 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

3.5.4 Ensaio de toxicidade celular (*in vitro*) sem exposição à radiação ultravioleta (UV)

Após as células atingirem uma confluência entre 80-90% nas microplacas de 96 poços, o meio foi retirado e um novo meio contendo diferentes concentrações de extrato ou padrões foram adicionados. As células foram expostas aos fármacos por períodos de tempo de 24 ou 48 horas.

Ao fim do período de tratamento, o meio contendo os fármacos foi removido e os poços lavados com 200 μL de salina. Então, foi adicionado a cada micro poço, 200 μL de uma solução $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de corante vital de vermelho neutro (VN) solubilizado

em meio incompleto. Novamente as células foram mantidas em incubadora de CO₂, por 3 horas.

Em seguida o meio contendo o VN foi retirado do contato com as células e as mesmas foram lavas por 1 min com 200 µL solução aquosa de cloreto de cálcio 1% e formaldeído 1%. A solução de cloreto de cálcio e formaldeído foi removida e 200 µL de solução etanólica 50% e ácido acético 1 % foi adicionada às células. Após 3 horas em repouso, a densidade óptica do vermelho neutro incorporada aos lisossomos foi determinada em leitor de microplacas de ELISA (Biorad®) a 540 nm (Borenfreund e Puerner, 1985; Stokes *et al.*, 2002).

Com os valores de absorbância obtidos calculou-se a média da viabilidade celular em relação ao grupo controle e uma curva dose-resposta foi estabelecida, a qual possibilitou o cálculo da dose letal mediana (DL₅₀) e da dose letal de 10 % (DL₁₀). As análises estatísticas e os gráficos foram realizados com o auxílio do Software *Graphpad prisma*® 5.0.

3.5.5 Ensaio de toxicidade celular (*in vitro*) com exposição à radiação ultravioleta (UV) do tipo A (UVA) e B (UVB)

O ensaio de toxicidade celular com exposição ao UV foi realizado em microplacas de 96 poços de fundo plano. O cultivo celular e preparo das amostras foi semelhante ao descrito no *item* 3.5.3 e 3.5.4. Após a confluência atingir 80%, o meio foi retirado e um novo meio contendo extrato ou padrão foi adicionado. Após 6 horas de tratamento, as células foram lavadas por 2 vezes com 200 µL de solução salina e então 200 µL de tampão de Hank's (Hank's buffered salt solution) foi adicionado aos micro poços. Em seguida as células foram irradiadas com quantidades subtóxicas de UVA - 5 J/cm², 10 J/cm² e 15 J/cm²- ou UVB 0,1 J/cm², 0,2 J/cm² e 0,3 J/cm²- (dados não publicados) o que representa 5 a 9 horas de exposição ao sol (início as 9:00 a.m). Após a exposição ao UV, o tampão Hank's foi retirado e 200 µL de meio incompleto (sem soro bovino fetal) foi adicionado. As células foram incubadas por mais 42 horas em câmara de CO₂. Ao final das 48 horas o ensaio de toxicidade prosseguiu como descrito por (Borenfreund e Puerner, 1985; Stokes *et al.*, 2002).

3.5.6 Genotoxicidade avaliada pelo ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado de acordo com os métodos descritos por (Singh *et al.*, 1988) e (Tice *et al.*, 2000). As células de B16F10 foram cultivadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas. Então, as células foram tratadas com 5 concentrações de psoraleno, bergapteno ou extrato de *B.gaudichaudii* (10, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 6 horas. Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo e positivo doxorrubicina 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Após o tempo de tratamento as células foram suspensas em 0,5 mL de agarose de baixo ponto de fusão e dispersas em lâminas para microscópio (25,4x76,2 mm) previamente revestida com agarose. Após a solidificação da agarose as lâminas foram incubadas em solução de lise (2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, 10% de DMSO e 1% de Triton X-100) por 12 horas a 4°C. Sendo assim, as células lisadas foram imersas em solução de eletroforese (NaOH a 300 mM e EDTA 1 mM) durante 40 min a 4°C. As condições para a eletroforese horizontal foram de 0,78 V / cm e 300 mA durante 20 min a 4°C. Finalmente, as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização (Tris 0,4 M) por 20 min a 4°C e fixadas em etanol por 5 minutos. As células foram coradas com 50 μL de GelRed (1:10,000) e analisadas em um microscópio de fluorescência com magnificação de 400x (Axiostar, Zeiss, Alemanha) equipado com um filtro de excitação de 515-560 nm, filtro barreira de 590 nm e câmara digital integrada.

A genotoxicidade foi mensurada pelo software cometa Ensaio IV (Perceptive Instruments, Suffolk, UK) tendo como resposta a intensidade da cauda, e o deslocamento da cauda em relação ao centro da cabeça. Foram avaliadas 100 células por tratamento em triplicatas independentes.

3.5.7 Mutagenicidade avaliada pelo ensaio de micronúcleo com o bloqueio da citocinese

O ensaio de micronúcleo foi realizado como descrito (Fenech, 2007). As células de B16F10 foram cultivadas por 24 horas em placas de 6 poços. Então, as células foram tratadas com 5 concentrações de psoraleno, bergapteno ou extrato de *B.gaudichaudii* (10, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) durante 6 horas. Como controle negativo foi utilizado meio de cultivo e positivo doxorrubicina 0,03 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes com PBS (10X) e um novo meio de cultura contendo 3,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ citocalasina B, sendo incubadas por mais 20 horas. Ao

final do tratamento as células foram lavadas duas vezes com PBS (10X) e ressuspensas em solução de citrato de sódio 1% (v/v) a 8°C e fixadas nas lâminas com solução metanólica de ácido acético e formaldeído (3:10:0,1). Dez minutos antes da análise, as lâminas foram coradas com uma solução comercial de 40 µg mL⁻¹ de laranja de acridina.

As frequências de células binucleadas com micronúcleos (**MNI**) foram determinadas em 1000 x ampliação. A frequência de pontes núcleo plásmica (**NPBs**, bio marcadores de cromossomos dicêntricos resultantes de fusões finais dos telômeros ou DNA mis-reparação) e botões nucleares (**NBUDs**, bio marcadores para a amplificação do gene e eventos de dosagem gene alterado) também foram avaliados de acordo com os métodos descritos por (Fenech, 2007). Para avaliar os efeitos citostáticos, o Índice de Divisão Nuclear (**NDI**) foi calculado. Um total de 500 células viáveis por ponto experimental foram marcadas para determinar a percentagem de células com um, dois, três e quatro núcleos, e a NDI foi calculada como se segue: o **NDI** = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / N, em que: M1-M4 representam os números de células com 1-4 núcleos, respectivamente, e N representa o número total de células marcadas. As frequências **MNI**, **NPB** e **NBUD** foram avaliadas em um total de 1000 células binucleadas. O cálculo **NDI** foi medida em células 500 por tratamento. Três experimentos independentes foram realizados.

3.6 Avaliação da cinética melanogênica *in vitro*

3.6.1 Avaliação da cinética melanogênica em B16F10 na ausência de radiação UV

As células B16F10 foram semeadas em placas de 24 poços (18 mm – TPP), com uma concentração de 5 x 10⁵ cel./1 mL/poço. Após a confluência celular atingir 70%, o meio foi descartado e um novo meio RPMI foi adicionado. Ao grupo controle (sem tratamento) foi adicionado apenas RPMI e aos grupos testes foram adicionados diferentes concentrações de extrato ou padrões diluídos em RPMI.

As concentrações utilizadas foram escolhidas com base em dados de toxicidade celulares determinadas pela DL₁₀, sendo eleitas as concentrações de extrato e padrões que mantiveram viabilidade celular ≥ 90%. As concentrações utilizadas de extrato foram 0,05 mg.mL⁻¹, 0,1 mg.mL⁻¹, 0,2 mg.mL⁻¹, 0,3 mg.mL⁻¹, e 0,5 mg.mL⁻¹, as de psoraleno 0,6 µg.mL⁻¹, 1,2 µg.mL⁻¹, 3,6 µg.mL⁻¹, 6 µg.mL⁻¹, 12 µg.mL⁻¹.

¹, 24 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 48 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e as de bergapteno foram de 2,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 5,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 10,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 15,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 104 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Um experimento em paralelo foi conduzido, com uma mistura de psoraleno e bergapteno nas mesmas proporções encontradas em 0,5 mg de extrato de *B. gaudichaudii* (6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ + 26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) respectivamente.

Após o início do tratamento as células permaneceram em contato com os fármacos por 6, 12, 24 ou 48 horas. Os grupos tratados por período inferior a 48 horas, o meio contendo fármaco foi removido e um novo meio de cultivo (200 μL) isento de fármaco foi adicionado às células, as quais permaneceram incubadas em câmara de CO_2 até completarem 48 horas do início do tratamento

3.6.2 Avaliação da cinética melanogênica em B16F10 na presença de UV

Após 6 horas de tratamento com 6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno e/ou 26 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de 5-MOP, ou 0,5 mg.mL⁻¹ de extrato, o meio foi descartado e as células lavadas 2x (200 μL) com PBS. Uma solução de tampão Hank's contendo os fármacos (mesmas concentrações descritas acima) foi adicionada às células e então irradiadas com (5J/cm² de UVA ou a 0,1J/cm² de UVB). Ao término, as células foram lavadas 2x (200 μL) de PBS e um novo meio de cultura contendo fármaco foi adicionado, permanecendo incubadas por um período total de 48 horas.

3.6.3 Quantificação da melanina *in vitro*

Após o tempo de tratamento as células foram retiradas dos poços com auxílio do *Cell Scraper* e suspensas em 2 mL de salina. As células contidas na suspensão foram contadas em câmara de Neubauer e uma alíquota de $4,0 \times 10^5$ células foi retirada e centrifugada a 1800 g por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi utilizado para se determinar o conteúdo de melanina, utilizando a técnica descrita por (Heo *et al.*, 2009)

O *pellet* foi solubilizado em 2 mL de NaOH (1 mol.L⁻¹) e mantido em repouso por 30 minutos a 25°C, em seguida foi centrifugada a 9000 g e o sobrenadante foi utilizado para se determinar o conteúdo de melanina. A densidade óptica foi determinada por espectrofotometria utilizando comprimento de onda de 475 nm

(Shimadzu® UV visível). E a concentração de melanina foi calculada através de uma curva padrão de melanina (Sigma Chemical Co, Missouri, USA).

3.6.4 Avaliação da atividade de tirosinase celular *in vitro*

A determinação da atividade da tirosinase em culturas de melanoma B16F10 baseou-se na metodologia descrita por (Sarkar *et al.*, 2006). As células foram cultivadas em placas de 24 poços de fundo chato, e ao atingir a confluência de 80 %, foram tratadas separadamente com L-tirosina (500 μM), ácido kójico (500 μM), psoraleno (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), bergapteno (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato de *B.gaudichaudii*.

A *L-tirosina* foi usada como controle positivo, o ácido kójico como controle negativo, os ensaios foram realizados em triplicata e os valores expressos em porcentagem. Após o tempo de tratamento (6, 12, 24 e 48 horas) as células foram lavadas com solução salina e suspensas em tampão Hank's, então uma alíquota de $4,0 \times 10^5$ foi separada e centrifugada a 1800 *g* por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* usado para a avaliação da tirosinase.

As células foram suspensas e lisadas com 1 mL PBS com 1% de Triton X-100 e 100 μL , ao lisado celular foi adicionado 900 μL de solução de tampão fosfato pH 7,4 contendo 0,1% (m/v) de L-DOPA. A solução foi mantida em estufa a 37°C por uma hora e em seguida a formação DOPA-cromo foi determinada em espectrofotômetro em 470nm. O tampão fosfato foi utilizado como branco e o resultado foi expresso em relação ao controle não tratado ao qual foi atribuído 100%, para 5×10^5 células de B16F10.

3.7 Perfil farmacocinético das furanocumarinas psoraleno e bergapteno

O estudo farmacocinético foi realizado na Universidade da Florida, Gainesville, Florida, EUA, com supervisão do professor Dr Hartmut Derendorf.

3.7.1 Sistema de microdiálise

Foram utilizadas sondas de microdiálise (CMA 30, CMA microdiálise AB) com um valor de *cut-off* de 6 kDa, membrana externa de diâmetro 0,38 mm, comprimento

da membrana de diálise de 10 mm. As sondas foram ligadas a uma bomba de microinjeção (Harvard Apparatus modelo 55-4150).

3.7.2 Recuperação relativa

Para a determinação da taxa de recuperação *in vitro* por diálise a sonda foi inserida em uma solução (solução salina 0,9%) contendo concentrações conhecidas dos fármacos, o líquido calibrador livre de fármaco foi infundido em fluxo constante através da sonda de microanálise, promovendo assim a retirada do fármaco do meio doador. A taxa de recuperação relativa foi calculada segundo a equação 3.

$$RR (\%) = \left(\frac{C_{dial}}{C_{ext}} \right) \times 100 \quad (\text{Eq 3})$$

Onde a RR % é recuperação relativa, C_{ext} a concentração da solução doadora externa e, C_{dial} é a concentração do soluto dialisado.

Na retrodiálise, as ordens dos componentes são invertidas, a solução inicialmente contendo o fármaco é a profundida pela sonda, e a solução aceptora e livre dos fármacos é a externa. Neste caso a recuperação relativa é descrita por equação 4.

$$RR (\%) = 100 - \left(\frac{C_{dial}}{C_{perf}} \times 100 \right) \quad (\text{Eq 4})$$

Onde a PR % é perda relativa, C_{dial} concentração da solução dialisada e, C_{perf} é a concentração inicial do soluto profundido.

A recuperação relativa foi avaliada usando 3 concentrações diferentes de fármacos (10, 20 ou 30 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e em 3 fluxo (2,0, 3,0 ou 4,0 $\mu\text{L.min}^{-1}$). Três coletas foram realizadas a cada 30 min.

3.7.3 Estudo farmacocinético *in vivo*

Este estudo foi previamente aprovado pelo Comité de ética da University of Florida (IACUC # 201408518). O protocolo utilizado aderiu aos Princípios do

Laboratório Animal Care (NIH publicação # 85-23). Foram utilizados oito ratos machos Wistar, pesando entre 280-320 g, adquiridos do Harlan Laboratories. Foram utilizadas duas doses diferentes dos fármacos 60 e 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno, e 80 e 160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno (n=4 por grupo). Utilizou-se um gel de HPLC 5% para incorporar os fármacos.

No dia do experimento, o animal foi anestesiado com 4% de isoflurano por 2 min numa câmara de indução e mantido em anestesia profunda com 1,9% de isoflurano sob uma manta aquecedora à 37-38° C. As sondas de microdiálise foram introduzidas na derme do animal com o auxílio de uma agulha de calibre 22G. Então a sonda foi ligada à bomba de microdiálise e perfundidos com salina (2,0 $\mu\text{L.min}^{-1}$). Após 30 minutos de equilíbrio, um ensaio de retrodiálise *in vivo* foi realizado para confirmar que as sondas tinham performance (ou desempenho) adequada ao experimento e com intuito de calcular a RR *in vivo*. Em seguida, as sondas foram lavadas com solução salina (4,0 $\mu\text{L.min}^{-1}$) por 45 minutos para se obter a linha de base antes do início do experimento. A formulação foi aplicada sobre a pele (4 cm²) na região do abdômen do animal e os microdialisados foram coletados a cada 30 min por 6 horas.

O sangue foi coletado por punção da artéria carótida (tempos: 0; 5; 15; 30; 60; 120; 180; 240; 300; 360 min). O sangue foi centrifugado a 22 g por 15 min, o plasma foi separado, e o psoraleno e bergapteno foram extraídos com por extração de fase líquida utilizando-se 2 mL metanol 100%. As amostras foram secas em nitrogênio e diluídas em 30 μL de metanol. Os fármacos foram quantificados por HPLC e o método de análise utilizado foi o mesmo proposto por Martins 2010.

3.7.4 Análise Não Compartmental

Os parâmetros farmacocinéticos do psoraleno e bergapteno foram obtidos a partir do perfil plasmático e tecidual (da pele) utilizando as equações descritas por Gibaldi e Perrier (1982) e o software WinNonlin® version 5.3. A constante de velocidade de eliminação (λ) foi determinada pela inclinação *log* linear da curva da concentração tecidual versus o tempo. O tempo de meia vida ($t_{1/2}$) foi estimado pelo $\ln(2)/\lambda$. A área sobre a curva foi determinada pelo método trapezoidal, somando-se a área sob a curva do tempo zero até o último tempo de coleta (ASC_{0-t}) com a área sob a curva extrapolada ($\text{ASC}_{0-\infty}$) (Equação 5).

$$ASC_{0-t} = \left(\frac{Cp_0 + Cp_1}{2} \right) \cdot \Delta t + \left(\frac{Cp_1 + Cp_2}{2} \right) \cdot \Delta t + \dots + \left(\frac{Cp_{(t-1)} + Cp_t}{2} \right) \cdot \Delta t$$

$$ASC_{ext} = \frac{Cp_t}{\lambda} + ASC_{0-t} \quad (\text{Eq 5})$$

Onde Cp_0 , Cp_1 , Cp_2 , são as concentrações teciduais do fármaco nos diferentes tempos de coleta, Cp_{t-1} é o penúltimo ponto de coleta e Cp_t o último. O *clearance* (Cl) foi determinado pela razão entre a dose e a ASC_{0-t} .

O *clearance* total (CL) e o volume de distribuição no *steady state* (Vd) foram determinados segundo as equações 6 e 7.

$$Cl = \frac{D}{ASC_{0-\infty}} \quad (\text{Eq 6})$$

$$Vd = MRT \cdot Cl \quad (\text{Eq 7})$$

Onde D é a dose administrada.

$ASMC_{0-\infty}$ e $ASMC_{0-t}$ foram calculados pelo método trapezoidal segundo as equações 8 e 9.:

$$ASMC_{0-t} = \left(\frac{(Cp_0 \cdot t_0) + (Cp_1 \cdot t_1)}{2} \right) \cdot \Delta t + \dots + \left(\frac{(Cp_{(t-1)} \cdot t_{(t-1)}) + (Cp_t \cdot t_t)}{2} \right) \cdot \Delta t \quad \text{Eq 8}$$

$$ASMC_{0-\infty} = \left(\frac{Cp_t \cdot t}{\lambda} \right) + \left(\frac{Cp_t}{\lambda^2} \right) \quad \text{Eq 9}$$

O tempo de residência ($MRT_{0-\infty}$) foi calculado pela razão entre ASC e ASMC equações 10;

$$MRT = \frac{ASMC_{0-\infty}}{ASC_{0-\infty}} \quad \text{Eq 10}$$

3.7.5 Análise estatística

Os resultados foram comparados utilizando-se análise de variância (ANOVA) com $p \leq 0,05$, como *post test* foi utilizado análise de Tukey, assumindo $p \leq 0,05$.

3.8 Avaliação da cinética melanogênica *in vivo*

O trabalho foi previamente aprovado pelo comitê de ética da Universidade de São Paulo (13.1.914.53.8). Foram utilizados 36 camundongos da linhagem C57BL/6. Quatro grupos de 9 animais foram divididos: controle negativo (CN), controle positivo (UV); grupo tratado com extrato (Bg) e grupo tratado com extrato e UV (Bg+tUV).

Os animais foram mantidos em uma sala climatizada, ciclo claro e escuro de 12 horas e alimentação e água *ad libitum*. No dia anterior ao-experimento os animais foram anestesiados com 1,9% de isoflurano e seus dorsos foram tricotomizados. Os camundongos foram tratados diariamente no mesmo horário, sendo que ao CN foi administrado 200 mg de gel de HPMC (5%), como controle positivo foi utilizado 0,2 mJ/cm² UVA e 0,1 mJ/cm² de UVB; ao (Bg) foi administrado 200 mg de gel contendo 2% de extrato de *B.gauchaudii* (60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP); e ao grupo (Bg + UV) foi administrado 60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP e 30 min após a administração aos animais foram expostos a 0,2mJ/cm² UVA e 0,1 mJ/cm² de UVB.

Ao final do décimo dia os animais foram eutanasiados por overdose de isoflurano e 4 cm² de pele foram retirados para a quantificação de melanina presente.

3.8.1 Quantificação da melanina à partir da pele dos animais

A pele foi pesada e congelada em nitrogênio líquido, após esse processo ela foi triturada e uma amostra de 100 mg foi utilizada para avaliar a síntese de melanina. O material total foi disperso em 2mL de NaOH (1mol.L⁻¹) e agitada em *ultra turrax* a 27,000 rpm por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 9000 g e

o sobrenadante foi utilizado para quantificação da melanina. A densidade óptica foi determinada por espectrofotometria utilizando um comprimento de onda de 475 nm (Shimadzu® UV visível) de acordo com a metodologia descrita por (Heo *et al.*, 2009). A concentração de melanina foi calculada utilizando uma curva padrão de melanina (Sigma Chemical Co, Missouri, USA).

Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização da droga vegetal

O teor de umidade da amostra foi de $5,1 \pm 0,1\%$, sendo que Oliveira et. al., (1998) preconizou que matérias primas vegetais com teores de umidade abaixo de 14 % apresentam baixos riscos de desenvolvimento microbiológico. A presença de umidade em amostras de vegetais aumenta a probabilidade de instabilidade química, física e microbiológica do produto. Desta forma, a umidade residual da droga vegetal de *B. gaudichaudii* está de acordo com padrões de qualidade para esse tipo de insumo.

Os teores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, foram de $3,9 \% \pm 0,2$ e $1,2 \% \pm 0,1$, respectivamente e o índice de intumescência foi de $1,8 \text{ mL.g}^{-1}$. Os teores de psoraleno e bergapteno foram de 0,01 % (m/m) de psoraleno e 0,055 % (m/m) de bergapteno.

O tamanho médio de partícula foi de 400 μm , sendo classificado como pó moderadamente grosso. Segundo List et al., (2000), a droga pulverizada que apresenta partículas de tamanho entre 300-450 μm evita compactação do pó e a formação de canais preferenciais de solvente, favorecendo a extração de compostos bioativos.

4.2 Validação do método analítico para identificação e quantificação dos marcadores químicos e biológicos (psoraleno e bergapteno) em amostras de *B. gaudichaudii*

O perfil cromatográfico está de acordo com o descrito por (Martins, 2010), com tempo de retenção de 13,01 min para o psoraleno e de 16,4 min para o bergapteno (Figura 8). A absorbância máxima para o psoraleno foi em comprimento de onda de 244nm e para o bergapteno em 220nm. Os parâmetros do *System suitability* mostraram que as condições cromatográficas escolhidas foram adequadas para a identificação e quantificação do psoraleno e bergapteno (Tabela 1) (USP).

Figura 8: Cromatograma do extrato de *B. gaudichaudii*, obtido por HPLC-DAD, coluna LUNA 5 μ C8, 250X4.6mm (Phenomenex®), fase móvel de acetonitrila/ água (55:45), com fluxo isocrático de 0,6mL/min.

Tabela 1 Resultados do teste de *system suitability*.

Parâmetro	Ps (n = 9)	5-MOP(n = 9)	Recomend. da Literatura
Tempo de Retenção (min)	13,01 (0,23)	16,4 (0,422)	CV (%) < 2
Fator de cauda (T)	1,00	1,10	T < 2
Número de pratos (N)	40178	39786	N > 2000
Resolução (Rs)		4,9	Rs > 2

Resultados expressos como média (CV, %); Ps, psoraleno; 5-MOP, bergapteno; CV, coeficiente de variação expresso em %.

4.2.1 Linearidade

A curva de resposta versus concentração do analito para a determinação do teor de psoraleno e bergapteno apresentou resposta linear em uma ampla faixa de concentração, obtendo-se valor de coeficiente de correlação linear (r) de 0,9998 e 0,9992 respectivamente.

4.2.2 Precisão

O método se mostrou preciso nas análises intradia e interdia. Nas 12 replicatas os coeficientes de variação dos teores de psoraleno e bergapteno foram de 0,001% e 0,003%.

4.2.3 Exatidão

O método cromatográfico foi exato em todas as concentrações avaliadas, demonstrando valores de exatidão entre 98,91% a 101,44% para psoraleno e de 99,29% a 101,88% para o bergapteno

4.2.4 Robustez

O método foi robusto para temperatura de $28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, fluxo $0,6\text{mL}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, lote da coluna e proporção acetonitrila e água (5% na mudança da proporção de fase móvel).

4.2.5 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram de 0,034 e 0,110 µg.mL⁻¹ para o psoraleno e 1,9 e 10,10 µg.mL⁻¹ para o bergapteno.

4.3 Obtenção e padronização do extrato de *B. gaudichaudii*

O teor de umidade do extrato seco foi de 2,8% (m/m), atividade de água (Aw) 0,22, teor de psoraleno de 1,2% (m/m) e de bergapteno 5,2% (m/m), 88UFC/g de microrganismos totais e ausência de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*.

A Farmacopeia Brasileira 5ª ed preconiza que extratos vegetais, devem conter no máximo 500UFC/g de microrganismos totais e ausência de *Salmonella* sp e *Escherichia coli*. Esses resultados demonstram que o método de processamento e estocagem da amostra foi adequado.

Extratos vegetais com reduzida carga microbiana evitam problemas quando utilizados em culturas de células, uma vez que os microrganismos podem competir pelos nutrientes do meio de cultura, alterar o pH e gerar substância tóxicas que desfavoreçam o desenvolvimento celular (Augusto, 2008).

4.4 Avaliação da toxicidade celular, genotoxicidade e mutagenicidade (*in vitro*) do psoraleno, bergapteno e extrato padronizado de *B. gaudichaudii*

4.4.1 Toxicidade celular pelo teste de incorporação do vermelho neutro

A dose de fármaco necessária para matar 50% das células (DL₅₀) foi determinada para as quatro linhagens celulares: melanócitos (linhagem Melam-A), melanócitos (B16F10 - oriundas de melanomas), fibroblastos (linhagem L929 de origem de fibrosarcoma murino) e queratinócitos (HaCat de origem humana). A DL₅₀ do extrato de *B.gaudichaudii* foi determinada sob duas perspectivas: massa de psoraleno e bergapteno equivalentes no extrato de *B.gaudichaudii*; e massa total de extrato (mg.mL⁻¹).

A escolha das células para avaliar a toxicidade *in vitro* foi baseada no fato de todas terem funções específicas importantes. Os melanócitos são responsáveis pela pigmentação da pele e alvo dos fármacos investigados neste trabalho. Os fibroblastos são responsáveis pela manutenção da estrutura dos tecidos conjuntivos, produzindo

fibras proteicas, colágeno, elastina, glicosaminoglicanas e glicoproteínas, que além fornecerem a tenacidade e elasticidade à pele, são responsáveis pelos processos de cicatrização (Carneiro, 2013). O uso de substâncias ou fármacos que os impeça de exercer suas funções podem causar flacidez, e envelhecimento precoce, agravando a lesão causada pelo vitiligo.

Os queratinócitos são as células mais abundantes da epiderme (80%) e podem ser divididos em: camada basal, a mais profunda e com baixo grau de diferenciação celular, sendo responsável pela regeneração da pele; camada granulosa e camada córnea que são responsáveis pela formação da queratina, e por abrigar os melanossomas ricos em melanina (Mcgrath *et al.*, 2008). Por sua vez, a queratina funciona como uma barreira física ao meio extracorpóreo e assim como a melanina, é um filtro às radiações UV. Os queratinócitos e a proteína p53 são responsáveis pela regulação da produção do hormônio α -MSH, estimulante da produção de melanina (Slominski *et al.*, 2004). Desta forma, avaliar a toxicidade do 5-MOP, psoraleno e do extrato de *B.gaudichaudii* se fez pertinente frente à importância que os melanócitos, fibroblastos e queratinócitos exercem para a pele.

Após 6 horas de exposição aos fármacos, não foi possível determinar a DL_{50} para todos os tipos de célula, pois a morte celular foi mínima ($< 30\%$). A abordagem de aumentar a concentração dos fármacos foi descartada, pois a solubilidade máxima dos mesmos no meio de cultura foi de: psoraleno e 5-MOP $0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$ e do extrato 2 mg.mL^{-1} . Além disso, concentrações mais elevadas dos fármacos podem alterar o pH e o equilíbrio osmótico do meio de cultura, conduzindo a resultados falso positivos (Augusto, 2008).

Em melanócitos (MELAM-A) expostos por 24 e 48h aos fármacos, sem exposição à radiação UV a DL_{50} para o psoraleno foi de $0,155 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 24h e de $1,45 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 48h, valores estatisticamente iguais, $p < 0,1$ (Figura 9, painel I). Para o Bergapteno a DL_{50} foi de $0,230 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 24h e $0,229 \text{ mg.mL}^{-1}$ em 48h, valores estatisticamente iguais, $p < 0,1$ (Figura 9 painel II).

As DL_{50} do extrato de *B.gaudichaudii* foram estatisticamente iguais ($p < 0,1$) para os tempos de 24 e 48 horas de tratamento, $1,78 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $1,67 \text{ mg.mL}^{-1}$ respectivamente (Figura 9 painel III). A $DL_{50 \text{ ex}}$ média ($1,71 \text{ mg.mL}^{-1}$) equivale a $20,5 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno e $88,9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de bergapteno, portanto o extrato é mais tóxico que os fármacos sintéticos e isolados. Isso pode ser atribuído ao sinergismo entre os compostos presentes no extrato.

O UV aumentou a toxicidade dos fármacos, os grupos tratados com 5 J/cm² de UVA não tiveram os valores de DL₅₀ significativamente alterados ($p < 0,1$) em relação aos grupos não irradiados (48 h), no entanto em comparação aos grupos tratados por 24 horas, a toxicidade do psoraleno aumentou em 14%, bergapteno em 20% e do extrato em 15,9%. O aumento da energia irradiada (10 e 15 J/cm² de UVA) acentuou a morte celular, em 23% (10 J/cm²) e 37,9% (15 J/cm²) com o uso do psoraleno, e 42,1% e 57,2% com o bergapteno (Figura 9 painel I e II). Para o extrato, apenas o grupo tratado com 15 J/cm² foi significativamente diferente ($p < 0,1$), com aumento de 32,4% da toxicidade celular (Figura 9 painel III).

Apesar da quantidade energética de UVB ser de grandeza de até 10 vezes menor que a de UVA, resultou em maior morte celular. Em comparação aos grupos não irradiados, 0,1 J/cm² UVB aumentou em 38,4% a toxicidade do 5-MOP, 18,2 % a do psoraleno e 22% do extrato, 0,2 J/cm² elevou em 68,7% letalidade do 5-MOP, 57 % do psoraleno e 41 % do extrato, com 0,3 J/cm² esses valores foram de 78% para o 5-MOP, 74% do psoraleno e 64% para o extrato. (Figura 9 painel I, II e III). A DL₅₀ equivalente de psoraleno e bergapteno para os grupos irradiados com UVB (0,1, 0,2 e 0,3 J/cm²) foram de 7,2, 11,52, e 15,4 µg.mL⁻¹ para o psoraleno, e 31,2, 49,2 e 67,1 µg.mL⁻¹ para o bergapteno, portanto o extrato foi mais tóxico que os marcadores isolados.

I

II

III

Figura 9: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e *B. gaudichaudii* (III) em cultura de melanócitos da linhagem Melam-A, tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA (5, 10 e 15 J/cm²) e UVB (0,1, 0,2 e 0,3 J/cm²). Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos (teste t de Student's, $p < 0,1$.)

Comportamento similar ocorreu com o melanoma (B16F10). Os grupos tratados por 24 e 48 horas com o mesmo fármaco foram estatisticamente iguais ($p < 0,1$) (Figura 10). A toxicidade dos fármacos aumentou quando irradiado com UV, sendo a morte celular mais acentuada com UVB. A exposição das células, previamente tratadas com os fármacos e expostas a 5 J/cm² de UVA aumentou a toxicidade do 5-MOP em 29,1%, e do psoraleno em 12 %, exceto para o extrato. Com 10 J/cm² a toxicidade do 5-MOP aumentou 46,5 %, psoraleno em 31,8%, e 12,1% para o extrato, sendo estatisticamente iguais ao grupo tratado com 5 J/cm². Quinze Joules de UVA diminuíram em 59,5% a DL₅₀ do 5-MOP, 44,7 % do psoraleno e 41 % do extrato (Figura 10).

Com 0,1 J/cm² de UVB o efeito tóxico do 5-MOP aumentou 48,4%, o psoraleno em 16,0 % e 5,0 % o extrato, com 0,2 J/cm² esses valores foram de 70,3 %, 66,0 % e 17,7 % respectivamente. Com 0,3 J/cm² o aumento da toxicidade foi de 79,5 % (5-MOP), 78,0 % (psoraleno) e 58,0 % para o extrato (Figura 10). Em quantidades equivalentes de psoraleno e bergapteno, o extrato foi mais tóxico que os fármacos sintéticos na presença ou não de UV. O extrato considerado como um todo provocou menos morte celular que as substâncias puras (Figura 10, painel III).

Figura 10: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e *B. gaudichaudii* (III) em cultura de melanoma da linhagem B16F10, tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA (5, 10 e 15 J/cm²) e UVB (0,1; 0,2 e 0,3 J/cm²). Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos -teste *t* de Student's, $p < 0,05$.

Para os fibroblastos (L929) e queratinócitos (HaCat) com mesmo regime de tratamento as DL₅₀ foram estatisticamente iguais ($p < 0,1$), (Figura 11 e Figura 12). A irradiação com 5 J/cm² de UVA aumentou a toxicidade do psoraleno e do bergapteno em média 11,5 % e 12,6 % para o extrato, com dez Joules os valores de DL₅₀ reduziram 29,1% para os fármacos puros e 21,9 % para o extrato e com 15 J/cm² esses valores foram de 42,4 % e 35,3 %.

Assim como para as demais linhagens de células, o UVB foi mais tóxico que o UVA. A irradiação de 0,1 J/cm² aumentou a toxicidade do psoraleno e 5-MOP em 55 % e do extrato em 46,2 %, para 0,2 e 0,3 J/cm² esse valores foram de 64,3 % e 78,9 % para os fármacos puros e 59,0 % e 71,3 % para o extrato. A toxicidade do extrato de *B.gaudichaudii* em quantidades equivalentes de 5-MOP e psoraleno foi duas vezes mais tóxico que os fármacos sintéticos.

O UVB (280 a 320 nm) diferentemente do UVA (320 a 400 nm) tem pouca capacidade de penetração na pele porem é mais energético que o UVA e tem maior capacidade de causar eritema e danos ao DNA (Flor *et al.*, 2007), justificando a maior morte celular.

Figura 11: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e *B.gaudichaudii* (III) em cultura de fibroblastos da linhagem L929, tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA (5, 10 e 15 J/cm²) e UVB (0,1; 0,2 e 0,3 J/cm²). Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo).

a,b,c,d,e,f representam diferença significativa entre os grupos -teste *t* de Student's, $p < 0,1$.

Figura 12: Toxicidade celular do psoraleno (I), bergapteno (II) e *B. gaudichaudii* (III) em cultura de queratinócitos da linhagem HaCat, tratados em tempo 24 e 48 horas e com diferentes doses de UVA (5, 10 e 15 J/cm²) e UVB (0,1, 0,2 e 0,3 J/cm²). Os resultados representam a média de 3 experimentos isolados (n = 8 repetições por grupo). *a,b,c,d,e,f* representam diferença significativa entre os grupos - teste *t* de Student's, $p < 0,05$.

Para todas as linhagens de células avaliadas nesse trabalho o psoraleno foi mais tóxico que o bergapteno, o mesmo foi observado em trabalhos anteriores (Yang *et al.*, 1989; Pathak e Fitzpatrick, 1992; Bethea *et al.*, 1999) em que o psoraleno, ao contrário do 5-MOP, tem maior afinidade por bases nitrogenadas do DNA, fazendo ligação cruzada entre adenosina e timina.

4.4.2 Genotoxicidade avaliada pelo ensaio cometa

Os resultados de genotoxicidade estão representados na Figura 13. Os parâmetros *tail intensity* (**TI**) e *moment* (**TM**) foram estatisticamente iguais ($p \leq 0,05$) ao controle negativo para as doses menores que $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em doses superiores, ambos os marcadores químicos e extrato foram genotóxicos. O psoraleno aumentou os valores de **TI** e **TM** em 41.2-88.2 % o bergapteno em 32-64.2 % e o *B.gaudichaudii* em 45.4-78.3 %.

O ensaio cometa é um método sensível e robusto para mensurar danos em DNA (lesões genômicas) de células isoladas e tecidos, rupturas da dupla fita e reparos incompletos, mas não de mutação gênica (Singh *et al.*, 1988; Tice *et al.*, 2000; Fenech, 2007). As células que apresentam um aumento na indução de danos no DNA mostram um padrão alterado de migração de fragmentos a partir do núcleo, indicando a quantidade de DNA quebrado na célula, lembrando a imagem de um cometa. Atualmente, o Cometa é uma abordagem importante na monitorização dos danos genéticos que envolvem baixo nível de exposição (Gaivão e Sierra, 2014). Uma característica importante desse ensaio é o tempo de análise que neste estudo foi de 6 horas. Esse tempo é longo o suficiente para se observar danos ao nível de DNA, mas curto para não permitir que os mecanismos de reparo atuem na correção da dupla fita de DNA.

Várias abordagens tentam explicar e compreender a genotoxicidade das furanocumarinas lineares sobre o DNA. Esses compostos podem intercalar entre a dupla hélice de DNA formando diferentes lesões, incluindo 3,4 e 4,5 monoaductos, cadeias de ligações cruzadas, dano oxidativo e dímeros de pirimidina (Averbeck *et al.*, 1992). No entanto, apenas os resultados desse teste não são suficientes para determinar se um composto é mutagênico sendo necessário ensaios de mutagenicidade.

Figura 13: Os efeitos de 10, 50, 100, 150 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno, bergapteno ou extrato padronizado de *B.gaudichaudii* para 6 h para *tail moment* (I e II) e *tail intensity* (III e IV) de células B16F10 avaliado pelo ensaio de cometa.

Os valores apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão e os dados baseiam-se em três experiências independentes. Controle negativo, meio de cultura; controle positivo, 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de doxorubicina. Grupos testes: psoraleno; bergapteno e *B.gaudichaudii*. #: Significativamente diferente ($p < 0.05$) do grupo de controle negativo.

4.4.3 Mutagenicidade avaliada pelo ensaio de micronúcleo (MN) com o bloqueio da citocinese

O teste do micronúcleo tem sido utilizado nos estudos de compostos mutagênicos e antimutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas. Os micronúcleos, que podem ser um ou mais por células, resultam de fragmentos acêntricos ou cromossomos inteiros que se atrasaram em relação aos demais em sua migração para os polos de célula na anáfase. O ensaio de mutagenicidade revelou que o psoraleno, bergapteno e o extrato padronizado de *B.gaudichaudii* não são mutagênicos nas concentrações avaliadas (Tabela 2 e Tabela 3). A visualização no aumento da incidência da formação de micronúcleos é importante para determinar o grau de mutagenicidade de um composto, visto que MNs expressa o não reparo da lesão genômica causada por compostos exógenos. As células de mamíferos cultivadas *in vitro* conservam as atividades de enzimas de reparo e de fase I, e metabolismo de carcinogênicos tais como citocromos P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também enzimas de fase II, incluindo a glutatona-S-transferases, sulfotranferases, N-acetiltransferases e glucaronosiltransferases (Vos e Wauthier, 1991; Scicchitano e Hanawalt, 1992). Trabalhos anteriores mostraram que o efeito genotóxico das furanocumarinas é devido à capacidade desses compostos formarem monoaductos entre as bases nitrogenadas do DNA (Sage *et al.*, 1993). No entanto foi observada uma alta taxa de reparo dos *cross-link*, o que explica ausência de mutagêneses encontradas nesse trabalho. Já se sabe que a formação de *cross-link* se dá em duas etapas, fase escura que é independente da UV e fase clara que é dependente do UV (Reardon *et al.*, 1991).

Tabela 2 Avaliação dos efeitos mutagênicos do psoraleno e bergapteno sobre células B16F10 usando o ensaio de micronúcleos pelo bloqueio da citocinese (CBMN-Cit).

Tratamento ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CBMN-Cyt						NDI	
	Total no. em 1000 células BN							
	MNI		NPBs		NBUDs		NDI	
	PS	5-MOP	PS	5-MOP	PS	5-MOP	PS	5-MOP
C negativo	20 $\pm$ 4	19 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	4 $\pm$ 2	3 $\pm$ 2	1.7 $\pm$ 0,1	1.6 $\pm$ 0,1
C Positivo	97 $\pm$ 5*	99 $\pm$ 8*	13 $\pm$ 6*	14 $\pm$ 4*	13 $\pm$ 5*	10 $\pm$ 2*	1.7 $\pm$ 0,1*	1.6 $\pm$ 0,1
10	20 $\pm$ 8	17 $\pm$ 3	2 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	1.5 $\pm$ 0,1	1.5 $\pm$ 0,2
50	19 $\pm$ 9	19 $\pm$ 2	1 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2	1.6 $\pm$ 0,1	1.6 $\pm$ 0,2
100	21 $\pm$ 7	19 $\pm$ 6	3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	2 $\pm$ 1	1.7 $\pm$ 0,1	1.6 $\pm$ 0,1

150	23±5	22±4	2±1	2±1	4±1	4±2	1.5±0,2	1.5±0,1
250	23±6	21±5	2±2	2±2	4±2	4±3	1.5±0,1	1.6±0,1

Os valores apresentados são a média $\pm$ SD; BN, células binucleadas ;MNi, micronúcleo; NPBs, pontes;NBUDs, botões nucleares ;NDI, índice de divisão núclea. Os dados apresentados baseiam-se em três experimentos independentes. Controle negativo, meio de cultura ; controle positivo, 0,03 mg.mL⁻¹ de doxorubicina. *: Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05).

Tabela 3: Avaliação dos efeitos mutagênicos do extrato de *B.gaudichaudii* sobre células B16F10 usando o ensaio de micronúcleos pelo bloqueio da citocinese (CBMN-Cit).

Tratamento (μ g.mL ⁻¹)	CBMN-Cyt			NDI
	Total no. em 1000 células BN			NDI
	MNi	NPBs	NBUDs	
	<i>BgEXT</i>	<i>BgEXT</i>	<i>BgEXT</i>	
C negativo	19±2	3±1	3±2	1.6±0,1
C Positivo	99±12*	11±3*	11±5*	1.7±0,1
10	17±8	2±1	2±2	1.6±0,1
50	18±8	1±1	2±2	1.6±0,1
100	20±7	2±1	2±2	1.6±0,1
150	23±6	2±2	4±3	1.5±0,2
250	21±4	1±1	4±2	1.5±0,1

Os valores apresentados são a média $\pm$ SD; BN, células binucleadas ; MNi, micronúcleo; NPBs,pontes; NBUDs, botões nucleares; NDI, índice de divisão núclea. Os dados apresentados baseiam-se em três experimentos independentes. Controle negativo, meio de cultura; controle positivo, 0,03 mg.mL⁻¹ de doxorubicina. *: Significativamente diferente do grupo controle (p <0,05).

4.5 Estudo farmacocinético *in vivo*

A técnica de microdiálise foi adequada para a avaliação da disponibilidade de psoraleno e bergapteno na derme dos ratos. Não foi observado extravasamento de sangue ou processo inflamatório no local de inserção das sondas de microdiálise. A área de 4cm² foi suficiente para espalhar e manter espessura uniforme de formulação.

Os fármacos apresentaram alta taxa de ligação proteica 84 % $\pm$ 3. A extração da furanocumarinas com metanol extraiu 97% dos fármacos ligados à proteína.

4.5.1 Análise Não Compartmental

A recuperação relativa *in vitro* foi inversamente proporcional à taxa de fluxo do líquido. A redução do fluxo de 4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ para 2 $\mu\cdot\text{min}^{-2}$ aumentou a recuperação do bergapteno de 70,3 % para 85,7 %, e do psoraleno de 67,3 % para 84,9 %. A perda relativa também foi inversamente proporcional à taxa de fluxo, 69,0 - 87,0 % para o bergapteno e 70,0 – 85,1 % para o psoraleno. A fim de caracterizar o perfil farmacocinético, o fluxo de 2 $\mu\cdot\text{min}^{-2}$ foi tido como o adequado para subseqüentes estudos *in vivo*. A recuperação e perda relativa não sofreram influência das concentrações dos analitos. A recuperação *in vivo* foi de 76,1 % $\pm$ 1,7 para o bergapteno e 75 % $\pm$ 0,1 para o psoraleno.

A concentração dos fármacos na pele e sangue foram dose-dependentes e estão representadas na Figura 14. Ambas as drogas foram rapidamente absorvidas pela pele e encontradas no sangue.

Figura 14 Perfis da concentração vs tempo de psoraleno e bergapteno no plasma e pele de ratos Wistar, após a administração tópica.

O psoraleno e 5-MOP demonstraram um perfil farmacocinético linear no tecido dérmico e no plasma (Tabela 4 e Tabela 5). Ambas as drogas mostraram rápida absorção e distribuição de gorduras percutâneas para o plasma. As concentrações plasmáticas foram quantificáveis 10 min após a aplicação na pele. A meia vida $T_{1/2}$ (h) dos fármacos foi independente das doses administradas $0,68 \pm 0,4$ horas para o 5-MOP na pele e $1,6 \pm 0,2$ no plasma, para o psoraleno esses valores foram $0,3 \text{ h} \pm 0,01$ e $0,82 \text{ h} \pm 0,2$.

Tabela 4: Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise não compartimental após a administração de 80 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ou 160 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de bergapteno em dois grupos independentes (n=4) de ratos machos Wistar.

Parâmetros	80 $\mu\text{g/kg}$		160 $\mu\text{g/ kg}$	
	Pele	Plasma	Pele	Plasma
C_{max} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,33 $\pm$ 0,01	0,33 $\pm$ 0,06	0,58 $\pm$ 0,1	0,59 $\pm$ 0,1
t_{max} (hr)	0,75 $\pm$ 0,09	0,78 $\pm$ 0,9	0,75 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,11
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.hr/MI/D}$)	0,71 $\pm$ 0,15	0,86 $\pm$ 0,1	0,76 $\pm$ 0,11	0,91 $\pm$ 0,18
$\text{AUC}_{0-\infty}$ /dose ($\mu\text{g.hr/mL}$)	0.038 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01	0,69 $\pm$ 0,018	0,06 $\pm$ 0,01
$T_{1/2}$ (hr)	0,68 $\pm$ 0,11	1,6 $\pm$ 00,19	0,69 $\pm$ 0,12	1,5 $\pm$ 0,2
Vd (L)	0,027 $\pm$ 0,01	0,04 $\pm$ 0,01	0,030 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,01
MRT	-	0,040	-	0,045
Cl	-	0,014	-	0,028

C_{max} - Concentração tecidual máxima; **t_{max}** - tempo para atingir a concentração tecidual máxima; **$\text{AUC}_{0-\infty}$** - Área sobre a curva; **$T_{1/2}$** - Tempo de meia vida; **Vd**- Volume de distribuição; **MRT**- Tempo de residência; **CL**- clearance, (-) não se aplica.

Tabela 5. Parâmetros farmacocinéticos obtidos por análise não compartimental após a administração de 60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ou 120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de psoraleno em dois grupos independentes (n=4) de ratos machos Wistar.

Parâmetros	60 $\mu\text{g.kg}^{-1}$		120 $\mu\text{g.kg}^{-1}$	
	Pele	Plasma	Pele	Plasma
C_{max} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0,27 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0.01	0,42 $\pm$ 0,1	0,48 $\pm$ 0,12
t_{max} (hr)	0,75 $\pm$ 0,13	1,0 $\pm$ 0,1	0,75 $\pm$ 0,14	1,0 $\pm$ 0,1
$\text{AUC}_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.hr/mL/D}$)	0,49 $\pm$ 0,11	0,63 $\pm$ 0,1	0,42 $\pm$ 0,01	0,7 $\pm$ 0,11

AUC _{0-∞} /dose(μg.hr/mL)	0,2±0,01	0,012±0,01	0,42±0,03	0,027±0,001
T _{1/2} (hr)	0,3±0,01	0,82±0,15	0,4±0,033	0,9±0,17
Vd (L)	0,02±0,01	0,03±	0,25±0,001	0,033±0,01
MRT	-	0,031	-	0,069
CL	-	0,034	-	0,062

C_{max} - Concentração tecidual máxima; **t_{max}**- tempo para atingir a concentração tecidual máxima; **AUC_{0-∞}** - Área sobre a curva; **T_{1/2}**- Tempo de meia vida; **Vd**- Volume de distribuição; **MRT**- Tempo de residência; **CL**- clearance (-) não se aplica.

A metodologia de microdiálise foi adequada para a amostragem do psoraleno e bergapteno das amostras, no entanto, a formulação prejudicou a liberação total do fármaco.

O gel de HPMC secou após uma hora da aplicação impedindo a liberação total dos compostos para a pele. Desta forma, a grande variabilidade nos parâmetros farmacocinéticos pode ser atribuída às características da formulação. Seria necessário um estudo comparativo em duas vias de administração diferentes, a intravenosa e tópica. Com essas informações será possível calcular a biodisponibilidade e o tempo de residência dos fármacos (MRT) e se estão distribuídos em mais de um compartimento.

4.6 Avaliação da cinética melanogênica *in vitro* e atividade da tirosinase

As concentrações de fármacos foram eleitas em uma faixa de concentração segura para todas as linhagens de células e determinada pela DL₁₀ (DL_{10Ps} < 70 μg.mL⁻¹; DL_{10 5-MOP} 114 μg.mL⁻¹; D_{ex} 790 μg.mL⁻¹).

O aumento da síntese de melanina apresentou resposta dependente da concentração de fármacos e do tempo de exposição (Figura 15). As células de B16F10 expostas à 26 μg.mL⁻¹ de psoraleno ou 5-MOP por 6 horas, aumentaram a síntese de melanina em 18,2% (Psoraleno) e 17,5% (5-MOP). Após 12 horas de tratamento, o aumento foi de 19,9% e 18,7%, respectivamente. O teor de melanina dos grupos tratados com psoraleno por 24 e 48 horas aumentou para 23,4% e 26,7% respectivamente, e para os grupos com 5-MOP em 22,1% e 26,6%. Apesar de o psoraleno ser de 3-6 % mais efetivo que o 5-MOP, sua dose segura é menor (DL_{10Ps}

$< 70 \mu\text{g.mL}^{-1}$; $\text{DL}_{10\text{ 5-MOP}} 114 \mu\text{g.mL}^{-1}$), $p < 0,1$ justificando o maior uso de bergapteno em terapias voltadas ao vitiligo (Taieb, Alomar, Böhm, *et al.*, 2013). Para as maiores concentrações ($48 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno e $104 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de 5-MOP), a produção de melanina aumentou em 36,7 e 69%, respectivamente.

A inclinação das curvas dose respostas do psoraleno (Figura 15 painel I), mostra que independente do tempo de exposição, a relação entre concentração de fármaco e produção de melanina é mais efetiva entre $3,6\text{-}12 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Acima dessas concentrações tende a um platô, porém, o aumento da concentração aumenta a toxicidade. Para o 5-MOP, esse comportamento não é observado, há uma tendência linear entre a produção de melanina e a concentração de 5-MOP.

Legenda: (---)48horas; (---)24 horas; (---)12 horas (---); 06 horas: (T) desvio padrão.

Figura 15: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10 tratadas com psoraleno (I), e bergapteno (II) ,

Assim como os fármacos isolados, o aumento da melanina estimulada pelo extrato seguiu uma relação dependente do tempo de exposição e dose de fármaco (Figura 16), no entanto, esse efeito foi pronunciado entre os tempos de 6 e 12 horas, bem como em 12 e 24 horas. Em média a produção de melanina aumentou 100%, e entre 24 e 48 horas o aumento foi de 12%, portanto, a síntese de melanina é maior no intervalo de 6 e 12 horas.

l) 48horas (---); 24 horas (---); 12 horas (---); 06 horas (---): (T) desvio

Figura 16: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10, estimulada pelo extrato de *B.gaudichaudii*

O uso de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato aumentou em 163% a produção de melanina (Figura 17) e a mistura equivalente de psoraleno 1,2% ($6 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 5-MOP 5,2% ($26 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou em 61,0%, revelando que o extrato é mais eficiente na produção de melanina. Esse efeito pode ser decorrente do sinergismo entre o psoraleno, bergapteno e outros compostos não quantificados no extrato. Dentre esses compostos há relatos da presença de xantietina; luvangetina; (+) - (2'S,3'R) -1'-hidroximarmesina; marmesina; 1',2'-desidromarmesina; 8-metoximarmesina; 1'-hidroxi3'-O- β -Glucopiranosilmarmesina; e 2',4',4'-triidroxi-3',3'-diprenilchalcona, ácido cinâmico e diidroxicinâmico: ácido-3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2H-6-cromenil)-(E)- propenóico ; ácido-3-(7-metoxi-2,2-dimetil-2H-6-cromenil)propanoico; e ácido-3-(6- metoxibenzo-[b]furan-5-il)propanoico (Monteiro, 2002).

O ultravioleta aumentou a síntese de melanina em relação ao controle em 12%, mas não houve diferença entre as bandas de UV (UVA e UVB). O mesmo foi observado para a PUVA terapia, havendo um aumento da síntese de melanina, mas não houve diferença entre os grupos com UV.

Controle negativo (**Basal**); Psoraleno (**PS**); PS associado ao UVA (**PS+ UVA**); PS associado ao UVB (**PS+ UVB**); Bergapteno (**5-MOP**); 5-MOP associado ao UVA (**5-MOP+UVA**); 5-MOP associado ao UVB (**5-MOP+UVB**) mistura de PS e 5-MOP (**PS+5-MOP**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVA (**PS+5-MOP UVA**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVA (**PS+5-MOP UVA**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVB (**PS+5-MOP UVB**); (T) desvio padrão; ,b, c, d, e, f, g, h, i, j Bonferroni, $p < 0,1$.

Figura 17: Conteúdo melanina presente em 5×10^5 células de B16F10, tratadas com psoraleno, bergapteno ou *B.gaudichaudii*

O aumento da melanogênese foi acompanhado da maior atividade da tirosinase (Figura 18). O estímulo da B16F10 com $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de psoraleno ou bergapteno aumentou a atividade da tirosinase em 13% (sem UV), 16% (com UVA ou UVB), a mistura em 37% (sem UV) e 39% (com UVA ou UVB), e o extrato ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) em 54,1% (sem UV) e 57% (com UVA ou UVB) .

Investigações têm demonstrado que as furanocumarinas podem modificar proteínas e suas atividades, o que indica que os mecanismos de ativação da melanogênese induzida por esses compostos envolvem proteínas específicas, com localização ainda desconhecidas, porém, sem relação com o DNA (Schmitt *et al.*, 1995). A sinalização para síntese e ativação da tirosinase é regulada pelo acoplamento do hormônio α -MSH ao receptor de membrana MC1-R acoplado a proteína Gs, ativando adenilciclase e aumentando a adenosina monofosfato cíclico (AMPC) intracelular, que por sua vez, regula o fator de transcrição CREB. Esse fator

é o responsável pela expressão dos genes de síntese da Tyr, Tyrp1. (Pears *et al.*, 1992; Schauer *et al.*, 1994; Chakraborty *et al.*, 1996).

Controle basal (**Controle**); controle positivo (**L-Tirosina**); Controle negativo (**AKJ-ácido Kójico**); Psoraleno (**PS**); PS associado a UVA (**PS+ UVA**); PS associado a UVB (**PS+ UVB**); Bergapteno (**5-MOP**); 5-MOP associado ao UVA (**5-MOP+UVA**); 5-MOP associado ao UVB (**5-MOP+UVB**) mistura de PS e 5-MOP (**PS+5-MOP**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVA (**PS+5-MOP UVA**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVA (**PS+5-MOP UVA**); mistura de PS e 5-MOP associado ao UVB (**PS+5-MOP UVB**); (T) desvio padrão; ,b,c,d,e,f,g,h,i, j Bonferroni, $p < 0,1$.

Figura 18: Atividade da tirosinase em 5×10^5 células de B16F10

4.7 Avaliação da cinética melanogênica *in vivo*

Durante os 10 dias de experimentos, não foram observadas mudanças comportamentais dos animais, assim como processos inflamatórios e lesões na pele. Após a eutanásia, uma porção de 4 cm^2 de pele foi retirada para a quantificação de melanina. Não foi observada inflamação nos tecidos adjacentes à pele. Visualmente foi evidente a pigmentação da pele nas áreas tratadas (Figura 19). A síntese basal de melanina no dorso foi de $0,017 \mu\text{g.g}^{-1} \pm 0,0018$, controle positivo de $0,2 \text{ J cm}^2$ de UVA e $0,1 \text{ J cm}^2$ de UVB com controle aumentou em 23,5% a quantidade de melanina na pele e a formulação contendo extrato de *B.gaudichaudii* 44,2%. O tratamento

simultâneo usando-se extrato incrementou a síntese de melanina em 143% em relação ao controle negativo.

CN- Controle negativo tratado com gel de HPMC 5%; **UV**- Controle Positivo com UVA (0,2J cm²) e UVB (0,1J cm²); **Bg**- Grupo teste tratado com gel de HPMC 5% incorporado com 2% de extrato de *B.gaudichaudii* (60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP); **Bg+UV**- Grupo teste tratado com gel de HPMC 5% incorporado com 2% de extrato de *B.gaudichaudii* (60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP) e posterior exposição de UVA (0,2J cm²) e UVB (0,1J cm²). **Primeiro dia** – cauda não tratada ; **Décimo dia** - Cauda após 10 dias de tratamento com 2 % de *B.gaudichaudii*, UVA (0,2J cm²) e UVB (0,1J cm²).

Figura 19 : Efeito da formulação na pigmentação de ratos da linhagem C57BL/6.

CN- Controle negativo tratado com gel de HPMC 5%; **UV**- Controle Positivo com UVA (0,2J cm²) e UVB (0,1J cm²); **HEX**- Grupo teste tratado com gel de HPMC 5% incorporado com 2% de extrato de *B.gaudichaudii* (60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP); **HEX+UV**- Grupo teste tratado com gel de HPMC 5% incorporado com 2% de extrato de *B.gaudichaudii* (60 µg.kg⁻¹ de psoraleno e 80 de µg.kg⁻¹ de 5-MOP) e posterior exposição de UVA (0,2J cm²) e UVB (0,1J cm²).

Figura 20: Conteúdo me melanina na pele dos ratos C57BL/6

Assim como observado no ensaio *in vitro*, a síntese de melanina *in vivo* foi superior nos grupos tratados com UV e/ou extrato de *B.gaudichaudii*. A PUVA terapia já foi relatada com diferentes graus de sucesso para a pigmentação da pele de pacientes com vitiligo. Ameen et al 2001 relatou aumento da pigmentação em 70 % dos pacientes após 9 meses de tratamento por via oral, sendo que no grupo placebo houve uma pigmentação em 30 % dos pacientes (Ameen et al., 2001). Westerhof e Nieuweboer-Krobotova observaram pigmentação em 46 % dos pacientes após quatro meses de tratamento e Scherschun et al. cerca de 75% após 6 meses (Westerhof e Nieuweboer-Krobotova, 1997; Kanwar et al., 2005).

Os prováveis mecanismos de ação atribuídos a PUVA terapia se sustentam pelo efeito imunossupressor das furanocumarinas e UV. No entanto, os animais usados para avaliar a melanogênese não apresentavam desequilíbrio imunológico ou vitiligo, o que leva a acreditar que a PUVA regula a melanogênese por vias ainda desconhecidas. Outra hipótese sugerida é que a síntese de melanina é um reflexo do estresse causado pelo UV ou que ela seria uma forma de proteção do DNA contra o ultravioleta (Agar e Young, 2005).

Conclusões

5 CONCLUSÕES

O método analítico foi adequado para a identificação e quantificação do psoraleno e bergapteno em amostras de *B.gaudichaudii*, amostra biológica e em gel de HPMC.

A caracterização do extrato permitiu estabelecer correlação entre os teores dos marcadores químicos e atividade biológica.

Em quantidades equivalentes bergapteno foi mais seguro que o psoraleno e o extrato, no entanto, em relação à massa total, a dose segura de extrato é até 10 vezes maior que os fármacos puros. A associação entre fármacos e UV aumentou a toxicidade, sendo o UVB mais citotóxico que o UVA.

Os compostos estudados foram genotóxicos em concentrações maiores que $150\mu\text{g.mL}^{-1}$, mas não mutagênicos, sugerindo que a célula é capaz de reparar os danos celular.

Todos os fármacos aumentaram a atividade da tirosinase e a síntese de melanina, em melanoma B16F10. Com destaque para o extrato de *B.gaudichaudii*. Foi observada uma provável ação sinérgica entre o psoraleno, bergapteno e UV. Uma relação entre a síntese de melanina, dose de fármaco e tempo foi observada, sendo diretamente proporcionais. A maior atividade farmacológica do extrato pode ser explicada pelo provável sinergismo de outros compostos no extrato.

Apesar da formulação de HPMC ter sido adequada para a rápida liberação (< 1,0 h) do psoraleno e bergapteno, ela desidratou, o que dificultou a liberação e o estudo farmacocinético *in vivo*. Novos estudos são necessários para estabelecer com maior precisão os parâmetros farmacocinéticos do psoraleno e bergapteno. Para isso, uma nova formulação é necessária. Ainda, se faz necessário um estudo complementar intravenoso, para avaliar a influência da formulação, pele e outros compartimentos na biodisponibilidade dos fármacos.

O extrato de *B.gaudichaudii* estimulou a síntese de melanina em ratos da linhagem C57BL/6, assim como UV e a associação do UV e extrato. A melanogênese ocorreu independente do UV, mas foi maior em sua presença.

O *B.gaudichaudii* é uma espécie promissora para a PUVA terapia, tendo como vantagens: i) menor toxicidade celular, mutagenicidade e genotoxicidade que os compostos isolados; ii) maior efetividade no estímulo da melanogênese; iii) por ser uma espécie endêmica do cerrado brasileiro e por já ser doméstica.

Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, Z. et al. Vitiligo, rheumatoid arthritis and pernicious anemia. **J Dermatol**, v. 20, n. 7, p. 418-23, Jul 1993. ISSN 0385-2407 (Print) 0385-2407.

AGAR, N.; YOUNG, A. R. Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2, p. 121-132, 4/1/ 2005. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004907> >.

AI-YOUNG, K. A. C. N.-H. K. M. N. Analysis of allelic variations in the catalase gene in patients with the skin depigmentation disorder vitiligo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 345, p. 5, 2006.

ALIKHAN, A. et al. Vitiligo: a comprehensive overview Part I. Introduction, epidemiology, quality of life, diagnosis, differential diagnosis, associations, histopathology, etiology, and work-up. **J Am Acad Dermatol**, v. 65, n. 3, p. 473-91, Sep 2011. ISSN 1097-6787 (Electronic) 0190-9622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21839315> >.

ALKHATEEB, A. et al. Mapping of an autoimmunity susceptibility locus (AIS1) to chromosome 1p31.3-p32.2. **Hum Mol Genet**, v. 11, n. 6, p. 661-7, Mar 15 2002. ISSN 0964-6906 (Print) 0964-6906 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11912181> >.

AMEEN, M.; EXARCHOU, V.; CHU, A. C. Topical calcipotriol as monotherapy and in combination with psoralen plus ultraviolet A in the treatment of vitiligo. **British Journal of Dermatology**, v. 145, n. 3, p. 476-479, 2001. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2001.04381.x> >.

ANTELO DP.; FILGUEIRA AL.; CUNHA, J. Aspectos imunopatológicos do vitiligo. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 36, n. 3, p. 10, 2008.

AUGUSTO, E. F. P. C., L. R. . **Tecnologia de Cultivo de Células Animais - de Biofármacos a Terapia Gênica** Roca. 1: 528 p. 2008.

AVERBECK, D. et al. New aspects of the repair and genotoxicity of psoralen photoinduced lesions in DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 14, n. 1, p. 47-63, 1992/06/30 1992. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/1011134492850826> >.

BALKRISHNAN, R. et al. Racial differences in the treatment of pigmentation disorders in outpatient settings: analysis of US national practice data. **J Dermatolog Treat**, v. 15, n. 4, p. 227-30, Jul 2004. ISSN 0954-6634 (Print) 0954-6634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15764036> >.

BARNES, L. Vitiligo and the Vogt-Koyanagi-Harada syndrome. **Dermatol Clin**, v. 6, n. 2, p. 229-39, Apr 1988. ISSN 0733-8635 (Print) 0733-8635.

BETHEA, D. et al. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of dermatological science**, v. 19, n. 2, p. 78-88, 1999. ISSN 0923-1811. Disponível em: < <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923181198000644?showall=true> >.

BOHM, M. S., T. E.; ROBINSON, S. J.; HEALY, E.; LUGER, T. A.; SCHWARZ, T.; SCHWARZ, A. . A α -Melanocyte-stimulating Hormone protects from ultraviolet radiation-induced apoptosis and DNA damage. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 7, 2005.

BOMIRSKI, A.; SŁOMINSKI, A.; BIGDA, J. The natural history of a family of transplantable melanomas in hamsters. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 7, n. 2, p. 95-118, 1988/06/01 1988. ISSN 0167-7659. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF00046481> >.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of tissue culture methods**, v.

9, n. 1, p. 7-9, 1985/03/01 1985. ISSN 0271-8057. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/BF01666038> >.

CARNEIRO, J. L. **Histologia Básica**: Guanabara Koogan. 1: 9788527723114 p. 2013.

CHAKRABORTY, A. K. et al. Production and release of proopiomelanocortin (POMC) derived peptides by human melanocytes and keratinocytes in culture: regulation by ultraviolet B. **Biochim Biophys Acta**, v. 1313, n. 2, p. 130-8, Aug 28 1996. ISSN 0006-3002 (Print) 0006-3002 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8781560> >.

DELL'ANNA, M. L.; PICARDO, M. A review and a new hypothesis for non-immunological pathogenetic mechanisms in vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 19, n. 5, p. 406-11, Oct 2006. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785.

ENGIN, B. et al. Narrow-band ultraviolet B phototherapy for the treatment of vitiligo: evidence against an autoimmune pathogenesis. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 22, n. 12, p. 1520-1, Dec 2008. ISSN 1468-3083 (Electronic) 0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18355207> >.

ERICKSON, C. A. From the Crest to the Periphery: Control of Pigment Cell Migration and Lineage Segregation. **Pigment Cell Research**, v. 6, n. 5, p. 336-347, 1993. ISSN 1600-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0749.1993.tb.00611.x> >.

EZZEDINE, K. et al. Revised classification/nomenclature of vitiligo and related issues: the Vitiligo Global Issues Consensus Conference. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 25, n. 3, p. E1-E13, May 2012. ISSN 1755-1471. Disponível em: < <Go to ISI>://000302935000001 >.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nat. Protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 05//print 2007. ISSN 1750-2799. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2007.77> >.

FLOR, J.; DAVOLOS, M. R.; CORREA, M. A. Protetores Solares **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 5, 2007.

GAIVÃO, I. O. N.; SIERRA, L. M. Drosophila Comet Assay: insights, uses and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, 2014-August-29 2014. ISSN 1664-8021. Disponível em: < http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1271&name=genomic_assay_technology&ART_DOI=10.3389/fgene.2014.00304 >.

GAUTHIER, Y. et al. Melanocyte detachment after skin friction in non lesional skin of patients with generalized vitiligo. **Br J Dermatol**, v. 148, n. 1, p. 95-101, Jan 2003. ISSN 0007-0963 (Print) 0007-0963.

GAWKRODGER, D. J. et al. Guideline for the diagnosis and management of vitiligo. **Br J Dermatol**, v. 159, n. 5, p. 1051-76, Nov 2008. ISSN 1365-2133 (Electronic) 0007-0963 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19036036> >.

HALABAN, R. et al. Basic Fibroblast Growth-Factor from Human Keratinocytes Is a Natural Mitogen for Melanocytes. **Journal of Cell Biology**, v. 107, n. 4, p. 1611-1619, Oct 1988. ISSN 0021-9525. Disponível em: < <Go to ISI>://A1988Q306200032 >.

HALDER, R. M. et al. Childhood Vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v. 16, n. 5, p. 948-954, May 1987. ISSN 0190-9622. Disponível em: < <Go to ISI>://A1987H108700005 >.

HEO, S.-J. et al. Effect of phlorotannins isolated from Ecklonia cava on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. **Toxicology in Vitro**, v. 23, n. 6, p. 1123-1130, 2009. ISSN 0887-2333. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233309001179> >.

HSIN-SU, Y. The pigmentary system: Physiology and pathophysiology. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 4, p. 478-478, 1999. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/pubs.Arch Dermatol.-ISSN-0003-987x-135-4-dbk0499> >.

HUANG, C. L.; NORDLUND, J. J.; BOISSY, R. Vitiligo: a manifestation of apoptosis? **Am J Clin Dermatol**, v. 3, n. 5, p. 301-8, 2002. ISSN 1175-0561 (Print) 1175-0561.

IMOKAWA, G.; YADA, Y.; MIYAGISHI, M. Endothelins Secreted from Human Keratinocytes Are Intrinsic Mitogens for Human Melanocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24675-24680, Dec 5 1992. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <Go to ISI>://A1992KA26300079 >.

ITO, S.; WAKAMATSU, K.; OZEKI, H. Chemical Analysis of Melanins and its Application to the Study of the Regulation of Melanogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 103-109, 2000. ISSN 1600-0749. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1034/j.1600-0749.13.s8.19.x> >.

IYENGAR, B. Modulation of melanocytic activity by acetylcholine. **Acta Anat (Basel)**, v. 136, n. 2, p. 139-41, 1989. ISSN 0001-5180 (Print) 0001-5180.

JIMBOW, K. et al. Intracellular vesicular trafficking of tyrosinase gene family protein in Eu- and pheomelanosome biogenesis. **Pigment Cell Research**, v. 13, p. 110-117, 2000. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <Go to ISI>://000089714000019 >.

JIMBOW K, P. J., KATO F, HIROSAKI K, TOYOFUKU K, HUA C, AND YAMASHITA T. Assembly, target-signaling and the intracellular transport of tyrosinase gene family proteins in the initial stages of melanosome biogenesis. **Pigment Cell Res** v. 13, p. 7, 2000.

JONES, K. et al. Modulation of melanogenesis by aloesin: A competitive inhibitor of tyrosinase. **Pigment Cell Research**, v. 15, n. 5, p. 335-340, Oct 2002. ISSN 0893-5785. Disponível em: < <Go to ISI>://000177850500003 >.

KANWAR, A. J. et al. Narrow-band UVB for the treatment of vitiligo: an emerging effective and well-tolerated therapy. **International Journal of Dermatology**, v. 44, n. 1, p. 57-60, 2005. ISSN 1365-4632. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-4632.2004.02329.x> >.

LEI, X. D. et al. Expression of 4alpha-carbinolamine dehydratase in human epidermal keratinocytes. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 238, n. 2, p. 556-9, Sep 18 1997. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

LERNER, A. B. On the etiology of vitiligo and gray hair. **Am J Med**, v. 51, n. 2, p. 141-7, Aug 1971. ISSN 0002-9343 (Print) 0002-9343.

LIGHTNER, V. A.; ERICKSON, H. P. Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. **J Cell Sci**, v. 95 (Pt 2), p. 263-77, Feb 1990. ISSN 0021-9533 (Print) 0021-9533.

MAJUMDER, P. P.; NORDLUND, J. J.; NATH, S. K. Pattern of familial aggregation of vitiligo. **Arch Dermatol**, v. 129, n. 8, p. 994-8, Aug 1993. ISSN 0003-987X (Print) 0003-987X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8352624> >.

MARTINS, F. S., MORAES C.S.S, BARA,.F.T.M, CONCEIÇÃO. Obtainment and characterization of raw material of *Brosimum gaudichaudii* Trecul (Moraceae). **Journal Pharmacy research**, v. 4 n. 10, p. 3, 2010. ISSN 0974-6943.

MATTOO, S. K. et al. Psychiatric morbidity in vitiligo and psoriasis: a comparative study from India. **J Dermatol**, v. 28, n. 8, p. 424-32, Aug 2001. ISSN 0385-2407 (Print) 0385-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560159> >.

_____. Psychiatric morbidity in vitiligo: prevalence and correlates in India. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 16, n. 6, p. 573-8, Nov 2002. ISSN 0926-9959 (Print) 0926-9959 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12482039> >.

MCGRATH, J. A.; EADY, R. A. J.; POPE, F. M. Anatomy and Organization of Human Skin. In: (Ed.). **Rook's Textbook of Dermatology**: Blackwell Publishing, Inc., 2008. p.45-128. ISBN 9780470750520.

MIDDELKAMP-HUP, M. B., JD.; RUIZ-DIAS, F ET AL. Tretment of vitiligo vuldaris with a narrow-band UVB and oral polypodium leucotomos extract: a randomized Double-bind placebo-controlled study. **J Eur Acad Dermatol Venereal**, v. 21, p. 8, 2007.

MIRANDA, M.; BOTTI, D. Harding-Passey Mouse-Melanoma Tyrosinase Inactivation by Reaction-Products and Activation by L-Epinephrine. **General Pharmacology**, v. 14, n. 2, p. 231-237, 1983. ISSN 0306-3623. Disponível em: < <Go to ISI>://A1983QH22500002 >.

MONTEIRO, V. F. F. M., L.; VIEIRA, I. J. C.; SCHRIPSEMA, J.; BRAZ-FILHO, RAHMAN, R. L. A. Phenylated coumarins chalcone and new cinnamic acid and dihydroxinnamic acid derivatives from Brosimum gaudichaudii. **Journal Brazilians Chemica**, v. 13, p. 6, 2002.

NAUGHTON, G. K.; REGGIARDO, D.; BYSTRYN, J. C. Correlation between vitiligo antibodies and extent of depigmentation in vitiligo. **J Am Acad Dermatol**, v. 15, n. 5 Pt 1, p. 978-81, Nov 1986. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622.

NELHAUS, G. Acquired unilateral vitiligo and poliosis of the head and subacute encephalitis with partial recovery. **Neurology**, v. 20, n. 10, p. 965-74, Oct 1970. ISSN 0028-3878 (Print) 0028-3878.

NJOO, M. D. et al. Association of the Kobner phenomenon with disease activity and therapeutic responsiveness in vitiligo vulgaris. **Arch Dermatol**, v. 135, n. 4, p. 407-13, Apr 1999. ISSN 0003-987X (Print) 0003-987x.

NJOO, M. D. et al. Nonsurgical repigmentation therapies in vitiligo - Meta-analysis of the literature. **Archives of Dermatology**, v. 134, n. 12, p. 1532-1540, Dec 1998. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <Go to ISI>://000077622100006 >.

NORDLUND, J. The epidemiology and genetics of vitiligo. **Clinics in Dermatology**, v. 15, n. 6, p. 875-878, Nov-Dec 1997. ISSN 0738-081X. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997YJ79800008 >.

ONGENAE, K.; VAN GEEL, N.; NAEYAERT, J. M. Evidence for an autoimmune pathogenesis of vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 16, n. 2, p. 90-100, Apr 2003. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12622785> >.

PARICHY, D. M.; REEDY, M. V.; ERICKSON, C. A. Regulation of Melanoblast Migration and Differentiation. In: (Ed.). **The Pigmentary System**: Blackwell Publishing Ltd, 2007. p.108-139. ISBN 9780470987100.

PATHAK, M. A.; FITZPATRICK, T. B. The evolution of photochemotherapy with psoralens and UVA (PUVA): 2000 BC to 1992 AD. **J Photochem Photobiol B**, v. 14, n. 1-2, p. 3-22, Jun 30 1992. ISSN 1011-1344 (Print) 1011-1344 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1432383> >.

PEARS, J. S. et al. A case of skin hyperpigmentation due to α -MSH hypersecretion. **British Journal of Dermatology**, v. 126, n. 3, p. 286-289, 1992. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1992.tb00660.x> >.

PROSE, J. S. B. N. S. Vitiligo in children: a review of classification, hypotheses of pathogenesis and treatment. **An Bras Dermatol**, v. 80, n. 6, p. 5, 2005.

REARDON, J. T. et al. Removal of psoralen monoadducts and crosslinks by human cell free extracts. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 17, p. 4623-4629, 1991. ISSN 0305-1048 1362-4962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC328701/> >.

REES, J. L.; HEALY, E. Melanocortin receptors, red hair, and skin cancer. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings, Vol 2, No 1, August 1997**, p. 94-98, 1997. Disponível em: < <Go to ISI>://A1997BJ37T00017 >.

REZAEI, N. et al. Autoimmunity as an aetiological factor in vitiligo. **J Eur Acad Dermatol Venereol**, v. 21, n. 7, p. 865-76, Aug 2007. ISSN 0926-9959 (Print) 0926-9959.

RILEY, P. A. Mechanism of pigment-cell toxicity produced by hydroxyanisole. **J Pathol**, v. 101, n. 2, p. 163-9, Jun 1970. ISSN 0022-3417 (Print) 0022-3417.

ROELANDTS, R. The history of phototherapy: something new under the sun? **J Am Acad Dermatol**, v. 46, n. 6, p. 926-30, Jun 2002. ISSN 0190-9622 (Print) 0190-9622 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12063493> >.

ROUZAUD, F. et al. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 571, n. 1-2, p. 133-152, 2005. ISSN 0027-5107. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0027510704004919> >.

RUSSELL, J. J. Topical tacrolimus: a new therapy for atopic dermatitis. **Am Fam Physician**, v. 66, n. 10, p. 1899-902, Nov 15 2002. ISSN 0002-838X (Print) 0002-838x.

SAGE, E.; DROBETSKY, E. A.; MOUSTACCHI, E. 8-Methoxypsoralen induced mutations are highly targeted at crosslinkable sites of photoaddition on the non-transcribed strand of a mammalian chromosomal gene. **The EMBO Journal**, v. 12, n. 2, p. 397-402, 1993. ISSN 0261-4189 1460-2075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC413222/> >.

SARKAR, C. et al. Human placental protein/peptides stimulate melanin synthesis by enhancing tyrosinase gene expression. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 285, n. 1-2, p. 133-142, 2006/04/01 2006. ISSN 0300-8177. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1007/s11010-005-9069-3> >.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Vitiligo pathogenesis: autoimmune disease, genetic defect, excessive reactive oxygen species, calcium imbalance, or what else? **Exp Dermatol**, v. 17, n. 2, p. 139-40; discussion 141-60, Feb 2008. ISSN 0906-6705.

SCHALLREUTER, K. U. et al. Activation/deactivation of acetylcholinesterase by H₂O₂: more evidence for oxidative stress in vitiligo. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 315, n. 2, p. 502-8, Mar 5 2004. ISSN 0006-291X (Print) 0006-291x.

SCHAUER, E. et al. Proopiomelanocortin-derived peptides are synthesized and released by human keratinocytes. **J Clin Invest**, v. 93, n. 5, p. 2258-62, May 1994. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8182158> >.

SCHMITT, I. M.; CHIMENTI, S.; GASPARRO, F. P. Psoralen-protein photochemistry — a forgotten field. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 27, n. 2, p. 101-107, 1995. ISSN 1011-1344. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/101113449407101S> >.

SCICCHITANO, D. A.; HANAWALT, P. C. Intragenomic repair heterogeneity of DNA damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 98, p. 45-51, 1992. ISSN 0091-6765. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1519617/> >.

SILVERBERG, N. B. Update on childhood vitiligo. **Curr Opin Pediatr**, v. 22, n. 4, p. 445-52, Aug 2010. ISSN 1531-698X (Electronic) 1040-8703 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616733> >.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 3// 1988. ISSN 0014-4827. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014482788902650> >.

SLOMINSKI, A. et al. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiol Rev**, v. 84, n. 4, p. 1155-228, Oct 2004. ISSN 0031-9333 (Print) 0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15383650> >.

STOKES, W. S.; SCHECHTMAN, L. M.; HILL, R. N. The interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods (ICCVAM): a review of the

ICCVAM test method evaluation process and current international collaborations with the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). **ATLA. Alternatives to laboratory animals**, v. 30, p. 23-32, 2002. ISSN 0261-1929.

TAIEB, A. Intrinsic and extrinsic pathomechanisms in vitiligo. **Pigment Cell Res**, v. 13 Suppl 8, p. 41-7, 2000. ISSN 0893-5785 (Print) 0893-5785 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11041356> >.

TAIEB, A. et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 1, p. 5-19, Jan 2013. ISSN 0007-0963. Disponível em: < <Go to ISI>://000314469000034 >.

TAIEB, A. et al. Guidelines for the management of vitiligo: the European Dermatology Forum consensus. **British Journal of Dermatology**, v. 168, n. 1, p. 5-19, 2013. ISSN 1365-2133. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11197.x> >.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206-221, 2000. ISSN 1098-2280. Disponível em: < [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J) >.

VALLE, Y. et al. Multidisciplinary approach to R&D in vitiligo, a neglected skin disease. **Dermatologic Therapy**, v. 25, p. S1-S9, 2012. ISSN 1529-8019. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1111/dth.12009> >.

VOS, J. M.; WAUTHIER, E. L. Differential introduction of DNA damage and repair in mammalian genes transcribed by RNA polymerases I and II. **Molecular and Cellular Biology**, v. 11, n. 4, p. 2245-2252, 1991. ISSN 0270-7306 1098-5549. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC359922/> >.

WESTERHOF W, N.-K. L. M. P. H. G. E. J. LEft-right comparison study of the combination of fluticasone propionate and uv-a vs either fluticasone propionate or uv-a alone for the long-term treatment of vitiligo. **Archives of Dermatology**, v. 135, n. 9,

p. 1061-1066, 1999. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.135.9.1061> >.

WESTERHOF, W.; NIEUWEBOER-KROBOTOVA, L. Treatment of vitiligo with uv-b radiation vs topical psoralen plus uv-a. **Archives of Dermatology**, v. 133, n. 12, p. 1525-1528, 1997. ISSN 0003-987X. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1997.03890480045006> >.

WHITTON, M. E. et al. Interventions for vitiligo. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 1, p. CD003263, 2010. ISSN 1469-493X (Electronic) 1361-6137 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20091542> >.

WIKBERG, J. E. S. et al. New aspects on the melanocortins and their receptors. **Pharmacological Research**, v. 42, n. 5, p. 393-420, Nov 2000. ISSN 1043-6618. Disponível em: < <Go to ISI>://000090102500001 >.

YANG, X. Y. et al. 8-Methoxypsoralen-DNA adducts in patients treated with 8-methoxypsoralen and ultraviolet A light. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 92, n. 1, p. 59-63, Jan 1989. ISSN 0022-202X (Print) 0022-202X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2642513> >.