INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DE COCULTURA DE MELANÓCITOS E
QUERATINÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO LÍQUIDO DA
CASTANHA DE CAJU (LCC) NA PIGMENTAÇÃO EPIDÉRMICA**

BIANCA DA SILVA SUFI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador (a):

Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo

2013

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**UTILIZAÇÃO DE COCULTURA DE MELANÓCITOS E
QUERATINÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO LÍQUIDO DA
CASTANHA DE CAJU (LCC) NA PIGMENTAÇÃO EPIDÉRMICA**

BIANCA DA SILVA SUFI

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

Orientador (a):

Dra. Monica Beatriz Mathor

São Paulo

2013

Dedico, com todo meu amor, este trabalho: aos meus pais, Valdomiro e Adelina, por terem me concebido a vida e pelo amor incondicional; ao meu querido marido, Carlos, por todo seu companheirismo, compreensão e dedicação a mim; ao meu irmão, Andrey, pela amizade e carinho. E agradeço por estarem agora compartilhando comigo desse momento tão importante em minha vida, que para mim se resume numa grande vitória.

A eles minha gratidão e muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a DEUS, que se mostrou criador, que foi criativo. Seu fôlego de vida, em mim, me foi sustento, me dando força e coragem para prosseguir nesta longa caminhada. Por ter plantando em mim um sonho que hoje se materializa. E principalmente, pela vida, que sorri para mim todos os dias, no rosto das pessoas que mais amo.

Aos meus pais, por todo amor e dedicação a mim, em todos esses anos de vida. Mãe, muito obrigada pela grande ajuda e carinho, e por sempre acreditar em mim. Seu amor me deu forças para prosseguir. Pai, sua presença me deu força e confiança, fazendo me sentir capaz. Obrigada por sugerir que eu seguisse esse caminho, e por perceber em mim um talento que minha autocrítica jamais permitiria que se desenvolvesse.

Ao melhor marido do mundo, Carlos, seu carinho, amor, dedicação, paciência, compreensão e principalmente companheirismo me deram forças para chegar até aqui. Amo-te muito!

Ao meu irmão, Andrey, pelo amor, carinho, amizade, e por sempre, desde pequeno, ter acreditado no meu potencial.

À minha orientadora, Dra. Monica Beatriz Mathor, pelos preciosos esclarecimentos, pelas sábias discussões científicas, pela paciência, por me proporcionar conhecimento e ascensão profissional durante o mestrado, pela admirável maneira como conduziu esta orientação, e, principalmente, pela amizade e confiança no meu trabalho.

À professora, Dra. Patrícia Santos Lopes, por sua admirável supervisão, seu valioso apoio durante meu mestrado, seus conselhos construtivos, seu encorajamento contínuo, por me ajudar a chegar até aqui, e, principalmente, por sua amizade e confiança.

Ao Centro de Tecnologia das Radiações (CTR) e ao Centro de Biotecnologia (CB), pelo acolhimento e por permitir a utilização das instalações e propiciar o bom desenvolvimento deste trabalho.

À Comissão de Pós-Graduação do IPEN, pela atenção dispensada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro por meio do processo nº 2010/05824-3.

Ao professor, Dr. Cesar Isaac, da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), e ao Dr. André O. Paggiaro, do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da FMUSP, pela gentil doação das peles para obtenção das células e pelo acolhimento durante o estágio preparatório para trabalhar com cultura celular.

Ao professor, Dr. Paulo Hrihorowitsch Moreno, do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), pela gentil doação das amostras de Óleo de Bergamota e ajuda com a técnica cromatográfica, e à sua aluna de doutorado, Msc. Fabiana Silva de Lima, pela gentil ajuda e atenção com a realização da cromatografia.

Ao professor, Dr. José Osvaldo Beserra Carioca, da Universidade Federal do Ceará (UFC), pela gentil doação da amostra de LCC (Líquido da Castanha de Caju) industrial, e à sua assistente, Elke Montenegro, pela grande ajuda e atenção.

À professora, Dra. Olga Zazuco Higa, por permitir a utilização de seu laboratório quando necessário, pela ajuda, palavras de apoio e amizade.

À professora, Dra. Kayo Okazaki, por, gentilmente, permitir a utilização de sua incubadora de CO₂, quando necessário.

À professora, Dra. Débora Favaro, pelos conselhos a respeito das técnicas de extração.

À professora, Dra. Regina Affonso, por, gentilmente, permitir a utilização de seu laboratório e equipamentos, quando necessário.

À querida amiga, Luciana Oliveira, pelo fornecimento das castanhas de caju da cidade de Várzea Grande, Ceará.

À minha querida e grande amiga, Natália Mencacci Esteves Pedro, com que compartilhei grandes momentos do mestrado e parte deste trabalho. Naty, sem você este trabalho não teria sido o mesmo, sua amizade, inteligência, seu jeito especial de ver as coisas, tudo isso foi fundamental para o sucesso deste projeto e principalmente para eu chegar até aqui. Eu aprendi muito com você, pessoal e profissionalmente. Eu serei eternamente grata a você por tudo, pela gentil hospedagem, e, principalmente, por ser minha amiga “irmã”.

À minha querida “irmãzinha”, Daniele Yoshito, por todos os ensinamentos, pelos maravilhosos momentos que compartilhamos, pela gentil hospedagem, ajuda, e por sua fiel amizade e carinho.

À querida e grande amiga, Stefany Plumeri Santin, por toda ajuda, apoio, consolo, por estar sempre ao meu lado nos momentos alegres e tristes, pela força e, principalmente, amizade e carinho. Ste, você é uma irmã pra mim.

À Andrea Cecilia Dorión Rodas, essa pessoa maravilhosa com que tive o prazer de aprender muito e desfrutar de sua agradável amizade. Obrigada pelos ensinamentos.

À querida Maria de Fátima Guarizo Klingbeil por toda ajuda, ensinamentos, por compartilhar seus conhecimentos, pelos bons papos e amizade.

À prezada amiga Silvana Cereijido Altran, com que aprendi os primeiros passos da cultura celular, por todos os ensinamentos, pela força e amizade.

Ao querido Mosca, menos conhecido por Rodrigo Crespo Mosca, por todo o apoio, carinho, força, caronas, aos grandes momentos de diversão e distração no “bandejão” e amizade.

Ao Fernando Augusto Neves Soares, o herói de BH, pelo apoio, grande ajuda, caronas, amizade, bons momentos e proteção.

Ao Antônio Carlos Martinho Júnior, o Júnior, pelo apoio, ajuda, amizade e por confiar em mim, me emprestando seu carro.

E a todos os grandes amigos que fiz nesta caminhada: Bianca Genesi, Caroline Ferraz, Clécia Souza, Dayane Piffer Luco, Fabiana de Andrade, Gustavo Varca, Henrique P. Ferreira, Luiza Stecher, Marcellly Uemura, Nelson Mendes Alves e Tatiana Matsumoto, pela grande ajuda, amizade, força, consolo nas horas difíceis e pelas boas risadas que demos juntos. Vocês são incríveis!

Aos engenheiros, Elizabeth Somessari e Carlos Gaia, pela irradiação das células, pela esterilização dos materiais e também pela ajuda e amizade.

Aos amigos do CTR: Yasko Kodama, Eduardo Moura, Marcelo, Laércio Carvalho, Stan Vianna, Jorge Ambiel, Vagner Fernandes, Samir Somessari e Paulo de Souza Santos, pelo apoio, palavras de conforto e amizade.

Ao técnico do CTR, Djalma B. Dias, pela incansável ajuda com o processo de extração das amostras e amizade.

Aos doutores do Centro de Biotecnologia (CB): Carlos Roberto J. Soares, Maria Teresa de Carvalho P. Ribela, Cibele Nunes Peroni, Ligia E. M. Ferreira Dias, Maria Helena B. Marumo, Patrick Jack Spencer, por permitirem a utilização de equipamentos, por serem sempre prestativos.

Aos amigos do CB: Peres, Nélío, Johnny, Junqueira, Zé Maria, Vincent, Marcos Capone, Flávio, Fernando, Rodrigo, Rosa Chura-Chambi, Bia, Renata Damiani, Karina Corleto, Tamara, Miriam e Cláudia, por serem prestativos e me ajudarem sempre que precisei, e pela amizade.

Aos secretários: Cláudia Nolla, Marcos Cardoso da Silva, Rute Batista e Arlete Correia, pela constante ajuda e amizade.

Aos amigos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP): Roqueline Alves Lago, Renata Oliveira da Conceição, Silvana Biagioni, Edna Rodrigues, Bruno Valério e Maria Aparecida Moreira (*in memorian*), por me acolherem com carinho e atenção durante o meu estágio.

À empresa Chemyunion, de Sorocaba-SP, e, especialmente, ao funcionário, Wagner Magalhães, por emprestar, inúmeras vezes, o equipamento Radiômetro, para as medições da dose de radiação da câmara.

À minhas queridas avós, Argentina Aparecida Zullian Sufi e Maria da Conceição Gomes da Costa, pelo amor e por torcerem e acreditarem em mim.

Aos meus queridos tios, Adelmiro e Aparecida Andrade de Lima, pela grande ajuda, carinho, atenção e por torcerem por mim.

À minhas queridas amigas: Brenda Martines, Camila Prestes, Daniela Foresti, Érica Galhardo, Jussara Carriel, Patrícia da Silva, Rita de Cássia, Tatiana Ferraz, por se preocuparem comigo, compreenderem minha ausência, por nunca se esquecerem de mim, pela amizade e por torcerem por mim.

Aos amigos da faculdade, da igreja e familiares que torceram por mim, me incluíram em suas orações, me deram apoio e força.

E a todos os que estiveram presentes durante esta jornada, e que acreditaram em mim, me motivando a chegar até aqui. E aqueles que de alguma forma estiveram e estão próximos a mim, fazendo a vida valer cada vez mais a pena.

“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro” (Albert Einstein).

UTILIZAÇÃO DE COCULTURA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DA AÇÃO DO LÍQUIDO DA CASTANHA DE CAJU (LCC) NA PIGMENTAÇÃO EPIDÉRMICA

Bianca da Silva Sufi

RESUMO

Observações feitas pelo próprio autor sugerem potencial ação do Líquido da Castanha de Caju (LCC) na pigmentação da pele, ação esta semelhante a da hidroquinona. O LCC é um líquido contido na casca da castanha de caju, possui característica de resina líquida, bastante viscosa e de odor forte, sua coloração varia de marrom claro, escuro a preto, dependendo do método de extração utilizado, podendo ser denominado de Natural ou Técnico. Este estudo propôs cultivar melanócitos e queratinócitos em cocultura e posteriormente tratá-los com LCC. A L-DOPA, agente estimulador da melanogênese, via da produção de melanina, responsável pela pigmentação da pele, foi utilizada na cocultura para avaliar a ação do LCC. A hidroquinona, conhecido inibidor desta via, foi utilizada na cocultura como controle positivo para o LCC, visto que este poderia apresentar ação semelhante a da hidroquinona. Para a utilização do LCC na cocultura, testes de solubilidade do mesmo para posterior dispersão no meio de cultura, foram necessários, bem como a identificação de seu potencial cito e fototóxico *in vitro*. Para a realização do teste de fototoxicidade foi construída uma câmara específica, atendendo as normas exigidas pelos guias [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol* e OECD TG-432, sendo esta qualificada por método validado. Os testes realizados com o LCC (natural e técnico) indicaram potencial ação destes na pigmentação da pele, estimulando a proliferação de melanócitos em cocultura. Este perfil apresentado, pelos extratos de LCC, é contrário ao da hidroquinona, e ao esperado inicialmente, sendo necessário aprofundar estes estudos. No entanto, estes resultados são promissores, sugerindo a descoberta de um novo tratamento para hipocromias.

USE OF MELANOCYTES AND KERATINOCYTES IN CO-CULTURE FOR EVALUATION OF THE ACTION OF CASHEW NUT SHELL LIQUID (CNSL) IN EPIDERMAL PIGMENTATION

BIANCA DA SILVA SUFI

ABSTRACT

Observations, made by the author, suggest potential action of Cashew Nut Shell Liquid (CNSL) in skin pigmentation, action similar to hydroquinone. The CNSL is a liquid contained inside the shell of the cashew nut, it has features of liquid resin, quite viscous and strong smell. Its color varies from clear or dark brown, to black, depending on the extraction method used, which may be called Natural or Technical. This study aimed to cultivate melanocytes and keratinocytes in co-culture and thus treat them with CNSL. The L-DOPA, stimulating agent of melanogenesis, melanin production pathway, responsible for skin pigmentation, was used to assess the CNSL action in the co-culture. Hydroquinone, known inhibitor of this pathway, was used as positive control for CNSL in the co-culture, since this could provide a similar action to hydroquinone. For use of CNSL in the co-culture, solubility tests, for subsequent dispersion in the culture medium, were necessary, as well as the identification of its cytotoxic and phototoxic potential *in vitro*. To achievement of the phototoxicity tests a specific chamber was built according to the standards required by the guides ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX protocol and OECD TG-432, being qualified by validated method. Tests conducted with the CNSL (natural and technical) indicated their potential actions in skin pigmentation, stimulating the proliferation of melanocytes in co-culture. This behavior presented by the CNSL extracts, is opposite to the hydroquinone, and to the initially expected, being required further studies. However, these results are promising, suggesting the discovery of a new treatment for hypochromia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	26
3. CONSIDERAÇÕES GERAIS	27
3.1 O CAJU	27
3.1.1 O pseudofruto e o fruto	29
3.1.2 Líquido da Castanha de Caju (LCC).....	30
3.2 O SISTEMA TEGUMENTAR	32
3.2.1 A Pele Humana.....	33
3.2.2 Estrutura e funções básicas da pele.....	34
3.2.3 Epiderme	37
3.2.4 Membrana basal	46
3.2.5 Derme	47
3.2.6 Hipoderme.....	48
3.2.7 Anexos da pele	49
3.3 RADIAÇÃO IONIZANTE.....	50
3.3.1 Irradiador de Cobalto 60 (Co ⁶⁰).....	51
3.3.2 Efeitos Biológicos da Radiação.....	52
3.3.3 Radiação de Luz Solar.....	53
3.3.4 Radiação de Luz UV.....	53
3.4 CULTURA DE CÉLULAS E TECIDOS	54
3.4.1 Suplementos adicionados ao meio de cultura	56
3.4.2 Humanização da cultura celular.....	58
3.4.3 Cultura de queratinócitos humanos <i>in vitro</i>	59
3.4.4 Cultura de melanócitos <i>in vitro</i>	61
3.5 TESTES DE CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	62
3.5.1 Citotoxicidade.....	62
3.5.2 Fototoxicidade.....	63
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 OBTENÇÃO DO LCC.....	65
4.1.1 Extração com solvente.....	65
4.1.2 Extração por aquecimento.....	66

4.1.3 Cálculo do rendimento dos extratos do LCC.....	66
4.1.4 Cálculo da densidade dos extratos do LCC.....	66
4.2 AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LCC.....	67
4.3 SOLUBILIDADE DO LCC.....	68
4.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ISOLADAS.....	68
4.4.1 Preparo dos meios de cultura.....	68
4.4.2 Preparo da camada de sustentação.....	69
4.4.3. Processo de isolamento das células epidérmicas.....	70
4.5 CONFIRMAÇÃO DE PRESENÇA DE MELANÓCITOS ATIVOS EM COCULTURA	71
4.6 TESTES DE CITOTOXICIDADE.....	72
4.6.1 Citotoxicidade do LCC.....	72
4.6.2 Citotoxicidade do LCC em cultura de células humanizadas	73
4.6.3 Citotoxicidade para comparação de técnicas de detecção de viabilidade celular	73
4.7 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE MELANOGÊNICA DO LCC.....	74
4.8 CONSTRUÇÃO DE UMA CÂMARA PARA ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE	74
4.9 QUALIFICAÇÃO DA CÂMARA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE FOTOTOXICIDADE	75
4.9.1 Protocolo de Fototoxicidade.....	75
4.9.2 Protocolo de Qualificação da Câmara e Validação do Método de Fototoxicidade	77
4.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ADAPTADO DE FOTOTOXICIDADE PARA QUERATINÓCITOS HUMANOS.....	77
4.11 FOTOTOXICIDADE DO LCC EM QUERATINÓCITOS HUMANOS	78
5. RESULTADOS	79
5.1 OBTENÇÃO DO LÍQUIDO DA CASTANHA DE CAJU.....	79
5.1.1 Extração com solvente.....	79
5.1.2 Extração por aquecimento.....	80
5.1.3 Cálculo do rendimento dos extratos do LCC.....	80
5.1.4 Cálculo da densidade dos extratos do LCC.....	81
5.2 AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO LCC.....	81
5.3 SOLUBILIDADE DO LCC.....	82
5.4 OBTENÇÃO DE CÉLULAS ISOLADAS.....	83
5.5 CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DE MELANÓCITOS ATIVOS EM COCULTURA	84
5.6 TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	85
5.6.1 Citotoxicidade do LCC.....	85
5.6.2 Citotoxicidade do LCC em cultura de células humanizadas	87
5.6.3 Citotoxicidade para comparação de técnicas de detecção de viabilidade celular	88
5.7 DETERMINAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE MELANOGÊNICA DO LCC.....	89
5.8 CONSTRUÇÃO DE CÂMARA PARA ENSAIO DE FOTOTOXICIDADE.....	90
5.9 QUALIFICAÇÃO DA CÂMARA E VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE FOTOTOXICIDADE	93

5.10 VALIDAÇÃO DE MÉTODO ADAPTADO DE FOTOTOXICIDADE	95
5.11 FOTOTOXICIDADE DO LCC EM QUERATINÓCITOS HUMANOS	96
6. DISCUSSÃO	98
7. CONCLUSÃO	108
ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA (FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FSP-USP)	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: FUNDAMENTOS E APLICAÇÕES DA CULTURA DE CÉLULAS EM DIVERSAS ÁREAS (ADAPTADO DE FRESHNEY, 2010).	55
TABELA 2: DADOS DA MÉDIA DOS RENDIMENTOS OBTIDOS DOS EXTRATOS DE LCC, NATURAL E TÉCNICO, DAS CASCAS DAS CASTANHAS DE SP E CE.	80
TABELA 3: DADOS DA PESAGEM DE CADA EXTRATO DE LCC, NATURAL E TÉCNICO, EFETUADA POR CINCO VEZES PARA OBTENÇÃO DA MÉDIA.	81
TABELA 4: DADOS DO CÁLCULO DO FATOR DE RETENÇÃO DOS CONSTITUINTES DAS AMOSTRAS DE LCC TESTADAS.	82
TABELA 5: SOLUBILIDADE DO LCC-TÉCNICO, LCC-NATURAL E EXTRATO CONTROLE (ÓLEO DE GIRASSOL) EM VEÍCULO DMSO, NOS MEIOS DE CULTURA (D10, K+ E K-), NAS PROPORÇÕES DE 1:100, 1:500 E 1:1000, RESPECTIVAMENTE.....	83
TABELA 6: CONTAGEM DE CÉLULAS REALIZADAS NAS QUATRO ETAPAS DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS EPIDÉRMICAS EM CADA UMA DAS TRÊS ETAPAS DE COLETAS.	83
TABELA 7: ESPECIFICAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS DOS EXTRATOS DE LCC; CONTROLES, POSITIVO E NEGATIVO; E SOLVENTES.	85
TABELA 8: DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE IC ₅₀ , IC ₉₀ E PROLIFERATIVA, DAS AMOSTRAS DE LCC TESTADAS NAS CULTURAS, “PADRÃO E HUMANIZADA”.....	87
TABELA 9: DESCRIÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES TESTADAS DOS EXTRATOS E CONTROLE (HIDROQUINONA) NO TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA.....	90
TABELA 10: COMPARATIVO ENTRE A CONTAGEM DE MELANÓCITOS POR CAMPO (AUMENTO DE 10 X) ANTES E APÓS O TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA, EM RELAÇÃO AO CONTROLE DE CÉLULAS.	90
TABELA 11: CONCENTRAÇÕES DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS AO TESTE DE FOTOTOXICIDADE.....	96

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: PROCESSO DE OXIDAÇÃO, QUANDO AQUECIDO O ÁCIDO ANACÁRDICO É DESCARBOXILADO A CARDANOL (OLIVEIRA, 2007).....	23
FIGURA 2: FOTOGRAFIA DE UM CAJUEIRO EM CAMPO LIVRE DE MATOS E ERVAS PARA MELHORAR O SEU DESEMPENHO (FONTE: WWW.NORDESTERURAL.COM.BR).....	27
FIGURA 3: PRIMEIRA ILUSTRAÇÃO DO CAJUEIRO, DE ANDRÉ THEVET EM 1558 (FONTE: PT.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/CAJUEIRO).	28
FIGURA 4: FIGURA 4A MOSTRA A CASCA DA CASTANHA E O LÍQUIDO CONTIDO NA BORDA DA CASCA (FONTE: HTTP://PORTUGUESE.ALIBABA.COM). NA FIGURA 4B, ESTRUTURA DA CASTANHA DE CAJU, MOSTRANDO A REGIÃO DO MESOCARPO DA QUAL SE OBTÉM O LCC (FONTE: WWW.MECOL.COM.BR).....	29
FIGURA 5: ESTRUTURA QUÍMICA DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES DO LCC (OLIVEIRA, 2007).	30
FIGURA 6: MAPA CONCEITUAL EVIDENCIANDO OS COMPONENTES DO SISTEMA TEGUMENTAR (KIERSENBAUM & TRES, 2010).....	33
FIGURA 7: ESTRUTURA DA PELE HUMANA APRESENTANDO TODOS OS SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS (ADAPTADO DE STANFORD CANCER CENTER: WWW.CANCER.STANFORDHOSPITAL.COM/MEDIA/IMAGES/GREYSTONE).	34
FIGURA 8: ESTRUTURA DA EPIDERME EVIDENCIANDO AS CAMADAS QUE A COMPÕEM (FONTE: HTTP://LTC.NUTES.UFRJ.BR/TOXICOLOGIA/MII.PELE.HTM).	37
FIGURA 9: MORFOLOGIA DAS CÉLULAS IMIGRANTES DA EPIDERME (KIERSENBAUM & TRES, 2012).	39
FIGURA 10: QUERATINÓCITOS E OS COMPONENTES DA BARREIRA DE PERMEABILIDADE DA PELE, A EPIDERME (KIERSENBAUM & TRES, 2012).....	40
FIGURA 11: DESENHO ESQUEMÁTICO DE UM MELANÓCITO. SEUS PROLONGAMENTOS CITOPLASMÁTICOS SE INSINUAM ENTRE AS CÉLULAS DA CAMADA BASAL DA EPIDERME. ESSES PROLONGAMENTOS ESTÃO CHEIOS DE GRÃOS DE MELANINA, QUE SÃO TRANSFERIDOS PARA O CITOPLASMA DOS QUERATINÓCITOS (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).	41
FIGURA 12:: MIGRAÇÃO DOS GRÃOS DE MELANINA, PRODUZIDOS PELOS MELANÓCITOS, PARA OS QUERATINÓCITOS NA EPIDERME (FONTE: HTTP://WWW.LAB.ANHB.UWA.EDU.AU/MB140/COREPAGES/INTEGUMENTARY/INTEGUM.HTM).	42
FIGURA 13: VIA DA MELANOGÊNESE. SETAS TRACEJADAS INDICAM ETAPAS DA SÍNTESE RESUMIDAS OU QUE NÃO SÃO COMPLETAMENTE CONHECIDAS (SIENNA, 2008).	43
FIGURA 14: DESENHO ESQUEMÁTICO ILUSTRANDO A PROTEÇÃO EXERCIDA PELO PIGMENTO MELANINA CONTRA A AÇÃO DELETÉRIA DOS RAIOS ULTRAVIOLETAS DA LUZ SOLAR SOBRE AS CÉLULAS EPIDÉRMICAS, SENDO I PELE ESCURA; II PELE CLARA; E III PELE SEM MELANINA (ALBINO) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2002).	43
FIGURA 15: ESTRUTURA QUÍMICA DA L-3,4 DIIDROXIFENILALANINA, L-DOPA (HTTP://WWW.RCSB.ORG/PDB/IMAGES/DAH_600.GIF).	44
FIGURA 16: ESTRUTURA QUÍMICA DA HIDROQUINONA (WWW.DATAAPEX.COM).....	46

FIGURA 17: FOTOMICROSCOPIA EVIDENCIANDO A MEMBRANA BASAL E SEUS COMPONENTES ESTRUTURAIS (KIERSENBAUM & TRES, 2012).....	47
FIGURA 18: CARACTERÍSTICAS DA PELE EM RELAÇÃO À SUA LOCALIZAÇÃO NO CORPO. NA FIGURA A PODE-SE OBSERVAR A PELE ESPESSA (SOLA DOS PÉS E PALMA DAS MÃOS), TENDO UMA VASTA ÁREA DE ESTRATO CÔRNEO COM GRANDE CONTEÚDO DE QUERATINA. NA FIGURA B, OBSERVA-SE UMA PELE DE ESPESSURA FINA, QUE ESTÁ PRESENTE NA MAIOR PARTE DO CORPO COM POUCO ESTRATO CÔRNEO. NA FIGURA C PODE-SE OBSERVAR A PELE DE ESPESSURA AVELUDADA, PRESENTE NO COURO CABELUDO E ÓRGÃOS GENITAIS, COM DESTAQUE, NA FOTOMICROSCOPIA, PARA OS FOLÍCULOS PILOSOS E MAIOR NÚMERO DE GLÂNDULAS SEBÁCEAS PRESENTES (FONTE: HTTP://WWW.LAB.ANHB.UWA.EDU.AU/MB14/COREPAGES/INTEGUMENTARY/INTEGUM.HTM).	49
FIGURA 19: NA FIGURA 21-A, FOTOGRAFIA DO IRRADIADOR DE COBALTO-60 GAMMACELL 220 DO CENTRO DE TECNOLOGIA DAS RADIAÇÕES CTR-IPEN/SP. NA FIGURA 21-B, FOTOGRAFIA, EM AUMENTO, DA CÂMARA DE IRRADIAÇÃO EVIDENCIANDO O LOCAL ONDE AS AMOSTRAS SÃO ACONDICIONADAS (YOSHITO, 2011).	52
FIGURA 20: REPRESENTAÇÃO FOTOGRÁFICA DE REMOÇÃO DE DERME, UMA ETAPA DE OBTENÇÃO DE CÉLULAS PRIMÁRIAS POR MÉTODO ENZIMÁTICO.	71
FIGURA 21: ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PREPARO DO ENSAIO QUÍMICO (TESTE DE FOTOTOXICIDADE) NAS PLACAS DE 96 POÇOS. SENDO: B = BRANCO (CONTÉM SÓ MEIO DE CULTURA); CN = CONTROLE NEGATIVO (CÉLULAS + MEIO DE CULTURA); C1 – C8 = 8 CONCENTRAÇÕES DA SUBSTÂNCIA EM TESTE (CÉLULAS + AMOSTRA).	76
FIGURA 22: ESQUEMA REPRESENTATIVO (A) E FOTOGRAFIA DO SISTEMA EXTRATOR SOXHLET (B), UTILIZADO PARA A OBTENÇÃO DO LCC-NATURAL (ÁCIDO ANACÁRDICO).	79
FIGURA 23: FOTOGRAFIA DO SISTEMA DE SEPARAÇÃO (A) DO LÍQUIDO BRUTO OBTIDO DA EXTRAÇÃO DO LCC-NATURAL, UTILIZADO PARA A EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE (ETANOL 95%). FOTOGRAFIA DO LCC-NATURAL (ÁCIDO ANACÁRDICO) OBTIDO DA TRITURAÇÃO DAS CASTANHAS (B).	79
FIGURA 24: LCC-TÉCNICO PROVENIENTE DA QUEIMA DE CASTANHAS DE CAJU DOS ESTADOS DE SÃO PAULO E CEARÁ, TENDO COMO COMPONENTE MAJORITÁRIO O CARDANOL.	80
FIGURA 25: CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA (TLC), NA QUAL 1 REPRESENTA O CONTROLE (LCC INDUSTRIAL); 2 REPRESENTA O LCC DE SÃO PAULO E 3 O LCC PROVENIENTE DO CEARÁ. SENDO A, B E C, OS CONSTITUINTES DAS AMOSTRAS TESTADAS.	82
FIGURA 26: MICROFOTOGRAFIA DAS CÉLULAS: FIBROBLASTOS, QUERATINÓCITOS E MELANÓCITOS. NA FIGURA A PODE-SE OBSERVAR O <i>FEEDER LAYER</i> EM CULTURA ANTES DO TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA. NA FIGURA B PODE-SE OBSERVAR O MESMO APÓS O TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA. NAS FIGURAS C E D PODE-SE OBSERVAR A COCULTURA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS, EM BAIXA DENSIDADE (COM <i>FEEDER LAYER</i>), ANTES E APÓS O TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA, RESPECTIVAMENTE. NAS FIGURAS E E F OBSERVA-SE A COCULTURA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS, EM ALTA DENSIDADE (SEM CAMADA DE SUSTENTAÇÃO), ANTES E APÓS O TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA, RESPECTIVAMENTE.	84

FIGURA 27: GRÁFICOS CRIADOS COM O PROGRAMA ORIGIN PRO® 7.0. A FIGURA 27A EVIDENCIA AS CURVAS DAS LEITURAS OBTIDAS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE 24 HORAS: ÁCIDO ANACÁRDICO (PONTOS EM PRETO); CARDANOL (PONTOS EM VERMELHO); ÓLEO DE GIRASSOL (PONTOS EM VERDE); PONTOS EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO, VALORES DE MÁXIMO E MÍNIMO DO DESVIO EM RELAÇÃO AO CONTROLE, RESPECTIVAMENTE. A FIGURA 27B EVIDENCIA AS CURVAS DAS LEITURAS OBTIDAS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DE 48 HORAS: ÁCIDO ANACÁRDICO (PONTOS EM PRETO); CARDANOL (PONTOS EM VERMELHO); ÓLEO DE GIRASSOL (PONTOS EM VERDE); PONTOS EM AZUL ESCURO E AZUL CLARO, VALORES DE MÁXIMO E MÍNIMO DO DESVIO EM RELAÇÃO AO CONTROLE, RESPECTIVAMENTE.	86
FIGURA 28: GRÁFICO CRIADO COM O PROGRAMA ORIGIN PRO® 7.0, EVIDENCIANDO AS CURVAS DAS LEITURAS OBTIDAS DO ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DA HIDROQUINONA DE 24H (PONTOS EM PRETO) E 48H (PONTOS EM VERMELHO).	86
FIGURA 29: GRÁFICOS CRIADOS PELO PROGRAMA ORIGIN PRO® 7.0. NA FIGURA 29A, OBSERVA-SE A CITOTOXICIDADE DO ÁCIDO ANACÁRDICO E CARDANOL COM DE 24 HORAS DE CONTATO, NAS CULTURAS “PADRÃO” E HUMANIZADA. NA FIGURA 29B, OBSERVA-SE A CITOTOXICIDADE DOS MESMOS, COM 48 HORAS DE CONTATO, NAS CULTURAS, “PADRÃO” E HUMANIZADA. PONTOS EM AZUL (CULTURA PADRÃO – ÁCIDO ANACÁRDICO); PONTOS EM ROSA (CULTURA HUMANIZADA – ÁCIDO ANACÁRDICO); PONTOS EM AZUL CLARO (CULTURA PADRÃO - CARDANOL); PONTOS EM AMARELO (CULTURA HUMANIZADA - CARDANOL).	87
FIGURA 30: GRÁFICO CRIADO PELO PROGRAMA PHOTOTOX®, COM AS LEITURAS DA CITOTOXICIDADE DO ÓLEO DE BERGAMOTA COM NR (PONTOS EM AZUL) E MTS (PONTOS EM AMARELO).	88
FIGURA 31: FOTOMICROGRAFIA DE CÉLULAS, QUERATINÓCITOS E MELANÓCITOS, EM COCULTURA TRATADAS COM OS EXTRATOS DE LCC (NATURAL E TÉCNICO) E HIDROQUINONA, APÓS O TESTE DE REAÇÃO DE L-DOPA.	89
FIGURA 32: ESBOÇO DE CÂMARA DE FOTOTOXICIDADE COM ÁREA TOTAL DE APROXIMADAMENTE 0,153 m ³ E ÁREA DE TRABALHO DE 153.000 cm ²	91
FIGURA 33: FOTOGRAFIA DA CÂMARA DE FOTOTOXICIDADE COM A PORTA FECHADA ANTES DA PINTURA (A) E COM A PORTA FECHADA APÓS A PINTURA (B).	91
FIGURA 34: FOTOGRAFIA DA CÂMARA DE FOTOTOXICIDADE COM A PORTA ABERTA ANTES DA PINTURA (A) E COM A PORTA ABERTA APÓS A PINTURA (B), EVIDENCIANDO O INTERIOR DA CÂMARA E SEUS COMPONENTES (C).	92
FIGURA 35: GRÁFICO REPRESENTANDO O ESPECTRO DE LUZ UV ABRANGIDO PELO MEDIDOR DE LUZ ULTRAVIOLETA, RADIÔMETRO (FONTE: HTTP://WWW.RC.UNESP.BR).	93
FIGURA 36: GRÁFICO CRIADO PELO PROGRAMA PHOTOTOX®, COM AS LEITURAS FEITAS DA FOTOTOXICIDADE DO LAURIL SULFATO DE SÓDIO (LSS).	94
FIGURA 37: GRÁFICO CRIADO PELO PROGRAMA PHOTOTOX®, COM AS LEITURAS FEITAS DA FOTOTOXICIDADE DO ÓLEO DE BERGAMOTA.	95
FIGURA 38: GRÁFICO CRIADO PELO PROGRAMA PHOTOTOX®, COM AS LEITURAS FEITAS DA CITOTOXICIDADE DA BERGAMOTA EM CÉLULAS BALB/C 3T3 (PONTOS EM AMARELO) E QUERATINÓCITOS (PONTOS EM AZUL).	96

FIGURA 39: GRÁFICO CRIADO PELO PROGRAMA PHOTOTOX[®], COM AS LEITURAS FEITAS DA FOTOTOXICIDADE DO LCC-NATURAL, LCC-TÉCNICO, ÓLEO DE BERGAMOTA, DMSO E HIDROQUINONA, EM CÉLULAS QUERATINÓCITOS E MELANÓCITOS EM COCULTURA. OS PONTOS EM AMARELO REFEREM-SE AO CONTROLE POSITIVO DE CADA AMOSTRA (UVA+), OS PONTOS EM AZUL REFEREM-SE AO CONTROLE NEGATIVO DE CADA AMOSTRA (UVA-).97

LISTA DE ABREVIATURAS E/OU SIGLAS

- μg = microgramas
- A= ampère
- ANOVA= análise de variância
- ARG= arginina
- ATCC= American Type Culture Collection
- ATP= adenosine trifosfato
- BME= *basal medium* de Eagle
- Ca= cálcio
- CCL-92= linhagem celular de fibroblastos murinos
- CE= Ceará
- CL= células de Langerhans
- cm= centímetros
- cm^2 = centímetros quadrados
- CNSL= Cashew Nut Shell Liquid
- CO_2 = dióxido de carbono
- Co^{60} = Cobalto 60
- CYS= cisteína
- DMEM= *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- EDTA= ácido etilenodiaminotetracético
- EEB= encefalopatia espongiforme bovina
- eV= elétrons volt
- F12= *F12 Nutrient Mixture*
- g= gramas
- GLN= glutamina
- HeLa= Henrietta Lacks
- HIS= histidina
- Hz= hertz
- IC= concentração inibitória

- ILE= isoleucina
- Kg= kilogramas
- LCC= Líquido da Castanha de Caju
- L-DOPA= L-3,4 diidroxifenilalanina
- LEU= leucina
- LSS= Lauril Sulfato de Sódio
- LYS= lisina
- m= metros
- m²= metros quadrados
- MEM= meio essencial mínimo
- MET= metionina
- Mg= magnésio
- mg= miligramas
- mL= mililitros
- mm= milímetros
- MSH= Melanocyte Stimulating Hormone
- MTS= composto tetrazólico, reduzida pela atividade de enzimas mitocondriais, a um produto formazana, cuja intensidade de coloração é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis em cultura
- nm= nanômetro
- NR= Neutral Red
- PBS= Phosphate Buffered Saline (Tampão fosfato)
- pH= potencial hidrogeniônico
- PHE= fenilalanina
- PMS= fenazina metasulfato
- Rf= fator de retenção
- rpm= rotações por minuto
- SFB= soro fetal bovino
- SP= São Paulo
- T3= triiodotironina
- TC= toxina colérica

- T-E= tripsina/EDTA
- THR= treonina
- TLC= Thin Layer Chromatography
- TRP= triptofano
- USA= United States of America (Estados Unidos da América)
- UV= ultravioleta
- UVA= ultravioleta do tipo A
- UVB= ultravioleta do tipo B
- UVC= ultravioleta do tipo C
- V= volts
- VAL= valina

LISTA DE SÍMBOLOS

- %= porcentagem
- <= menor que
- >= maior que
- ≥= maior ou igual à
- © = direitos reservados
- ® = marca registrada
- H= hidrogênio
- H₂O= água
- °Brix= escala numérica que mede quantidade de compostos solúveis em uma solução de sacarose.
- °C= grau Celsius
- OH= grupo hidroxila
- α= alfa (radiação)
- β= beta (radiação)
- γ= gama (radiação)

1. INTRODUÇÃO

O caju, *Anacardium occidentale* Linn, fruta do cajueiro é de grande importância cultural e socioeconômica para a região Nordeste do Brasil. O líquido contido na casca é um subproduto da produção de castanha em países tropicais como Brasil, Moçambique, Índia, Tanzânia, Filipinas e Quênia, que são grandes produtores e exportadores mundiais de castanha de caju e CNSL (*Cashew Nut Shell Liquid*), em português, Líquido da Castanha de Caju (LCC). A amêndoa da castanha, que na verdade é o fruto, é muito valorizada constituindo juntamente com o líquido contido na casca da castanha, denominado LCC, o principal produto de exportação (WATANABE et al., 2010; COSTA et al., 2004; FRINGE, 1995). Para se extrair o LCC são utilizados métodos de extração com solventes, processo mecânico (prensagem), ou extração por aquecimento. O LCC pode ser natural ou técnico, dependendo do método de extração. Na extração com solvente ou na prensagem obtém-se o LCC-Natural, no qual o composto majoritário é o ácido anacárdico. A partir da descarboxilação do ácido anacárdico, empregando-se altas temperaturas entre 180 – 300 °C (FIG. 1) obtém-se o LCC-Técnico, que tem o cardanol como componente majoritário (OLIVEIRA, 2007; KUMAR, 2002; TYMAN, 1978).

Figura 1: Processo de oxidação, quando aquecido o Ácido Anacárdico é descarboxilado a Cardanol (OLIVEIRA, 2007).

Observações feitas pelo próprio autor indicam potencial ação do LCC na pigmentação da pele.

A pigmentação da pele é de suma importância, pois protege a mesma dos efeitos indesejáveis causados pelos raios solares. A despigmentação, dependendo da situação, é importante para remoção de manchas ocasionadas por exposição intensa e inadequada ao sol, distúrbios hormonais, comumente

causados por gravidez e uso de medicamentos como os anticoncepcionais, idade e fatores genéticos.

Com a finalidade de beleza e saúde, pois algumas patologias também estão relacionadas com a pigmentação e a despigmentação da pele, a procura por cosméticos para eliminar as manchas indesejáveis da pele é frequente, e a busca para o tratamento de hipocromias, como o vitiligo, também é intensa e importante.

A pele é o maior e mais pesado órgão do corpo humano, recobre toda superfície do mesmo e está subdividida em três níveis, sendo estes a epiderme (camada superior) a derme (camada inferior) e a hipoderme (camada profunda) que serve para unir a derme aos tecidos subjacentes. A pigmentação da pele ocorre pela quantidade, tamanho e tipo de melanina produzida pelos melanócitos, e pela transferência e distribuição desta aos queratinócitos na epiderme, processo esse denominado de melanogênese. Os melanócitos são as células responsáveis pela definição da cor da pele por produzirem a melanina, uma molécula química complexa que se subdivide em eumelanina e feomelanina. O hormônio hipofisário estimulador de melanócito, o MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*), tem por função estimular a via melanogênica a partir de um aminoácido, a tirosina, em presença da enzima tirosinase que auxilia na síntese da melanina. Em razão desta ação, o aminoácido tirosina é transformado em L-3,4 diidroxifenilalanina, denominado L-DOPA, hormônio estimulador de α -melanócitos, que atua na produção de melanina. Devido a esta ação, este hormônio é utilizado em estudos para dosar a quantidade de melanina produzida, com o objetivo de caracterizar a pigmentação da pele (SIENNA, 2008; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; GREATENS, 2005; LEI et al., 2002; PEYREFITTE et al., 1998).

Outro composto com ação sobre a melanogênese é a hidroquinona (dihidroxibenzeno). Por possuir estrutura similar a do precursor da melanina, a enzima tirosinase, a hidroquinona é muito utilizada como agente despigmentante, pois atua na via melanogênica inibindo esta enzima e impedindo a conversão de DOPA a melanina (BANDYOPADHYAY, 2009; LEI et al., 2002). Este composto já é comercializado há vários anos, porém sabe-se que deve ser utilizado em concentrações pré-definidas, de 0,1 a 5%, para evitar reações tóxicas quando em contato com a pele (US Patent nº 2376884, 1945).

Assim como a hidroquinona e sendo o LCC uma resina de origem natural, sua composição pode ser tóxica para as células da pele, tanto quando aplicada diretamente, ou por ativação por radiação solar.

Para tanto, testes de citotoxicidade e fototoxicidade são necessários para identificação do potencial fotocitotóxico ou proliferativo do LCC. A citotoxicidade de uma substância ou produto é avaliada pela redução na viabilidade das células expostas a substância ou produto químico, com o mesmo ensaio, pode-se observar também um provável índice proliferativo. Quanto à fototoxicidade *in vitro*, esta identifica e determina o potencial tóxico da substância ou produto químico em teste induzido por exposição à luz ultravioleta do tipo A (UVA), luz solar, analisando a probabilidade de substâncias ou produtos químicos causarem fotocitotoxicidade *in vivo* (OECD, 2004). A realização dos testes de fototoxicidade é feita em câmara específica para este tipo de ensaio utilizando parâmetros pré-definidos. Este tipo de câmara pode ser adquirido comercialmente, porém também pode ser desenvolvida mediante o protocolo ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay*. INVITTOX n. 78, 2008.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O Líquido da Castanha de Caju (LCC) foi avaliado perante sua propriedade de atuar na pigmentação da epiderme.

2.2 Objetivo Específico

- Obtenção de extratos de LCC por diferentes métodos de extração.
- Avaliar, mediante técnica cromatográfica, os LCCs obtidos de cada região (São Paulo e Ceará) em comparação com o LCC industrial, a fim de verificar se existem diferenças significativas entre eles.
- Encontrar um veículo solubilizante dos constituintes do LCC para dispersão dos mesmos no meio de cultura.
- Identificar o potencial tóxico dos constituintes do LCC nas células, por meio de teste de citotoxicidade *in vitro*, em culturas padrão e humanizadas.
- Avaliar a capacidade do LCC como Inibidor da Melanogênese, em comparação a ação da hidroquinona, utilizada como controle.
- Construir e qualificar uma câmara de fototoxicidade segundo especificações da ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay*. INVITTOX n. 78 (2008) e OECD TG – 432 (2004).
- Validar o protocolo de avaliação de fototoxicidade baseado nos protocolos ©ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay*. INVITTOX n. 78 (2008) e OECD TG – 432 (2004).
- Comparar as técnicas de detecção da citotoxicidade, MTS e Vermelho Neutro (Neutral Red) e o tipo de células utilizadas, Balb/c 3T3 e queratinócitos/melanócitos humanos.
- Identificar o potencial fotocitotóxico das células expostas aos constituintes do LCC na presença e ausência de luz.

3. CONSIDERAÇÕES GERAIS

3.1 O Caju

O cajueiro (FIG. 2), espécie *Anacardium occidentale* Linn, pertence à família *Anacardiaceae*, a qual abrange de 60 a 74 gêneros e 400 a 600 espécies de árvores, arbustos tropicais e subtropicais que produzem frutos como a manga, pistache, umbu, caju-umbu, cajá e seriguela. Do gênero *Anacardium*, originário da América tropical, em especial da região Nordeste do Brasil, o cajueiro é uma das principais plantas frutíferas tropicais, pois na comercialização de seus principais produtos está envolvida uma movimentação de 160 milhões de dólares em exportações gerando muitos empregos diretos e indiretos em todas as atividades de produção, industrialização e comercialização do caju e seus subprodutos (CUNHA, 2011). Sua árvore com 8 a 15 metros de altura e copa bem desenvolvida sendo ereta, compacta ou esparramada, podendo atingir, se em região de condições favoráveis, até 20 metros de envergadura, apresentando caule acachapado e tortuoso (MENDONÇA & MEDEIROS, 2011; LUCENA, 2006; MANGUE, 2001).

Figura 2: Fotografia de um cajueiro em campo livre de matos e ervas para melhorar o seu desempenho (Fonte: www.nordeste rural.com.br).

A ocorrência desta espécie, *Anacardium occidentale* Linn, foi registrada pela primeira vez em 1558 pelos portugueses (FIG. 3). Durante o período da colonização do Brasil, foram os espanhóis e portugueses os responsáveis por

difundirem o cajueiro pelo mundo, em especial aos continentes da África e Ásia. Sua origem é fundamentada em provas circunstanciais que apontam o Brasil, ou ao menos, todo o norte da América do Sul e parte da América Central, na região do Peru e Venezuela, com produção considerável de caju, como o mais provável centro filogenético desta espécie (LUCENA, 2006).

Brasil, Vietnã, Moçambique, Guiné-Bissau, Tanzânia, Indonésia e Índia são responsáveis por 81% da produção mundial de caju e seus derivados. Estando o Brasil no posto de segundo maior produtor mundial de castanha de caju, com aproximadamente 126.425 toneladas (MENDONÇA & MEDEIROS, 2011) e 1.011.400 toneladas de pedúnculo somente no ano de 2001 segundo informações do IBGE (2002). Sendo a região Nordeste a de maior produção nacional com 99% de área colhida e de produção (LUCENA, 2006).

Figura 3: Primeira ilustração do cajueiro, de André Thevet em 1558 (Fonte: pt.wikipedia.org/wiki/cajueiro).

3.1.1 O pseudofruto e o fruto

O caju propriamente dito ou o fruto do caju, que na verdade é o pseudofruto, é a parte carnosa, hipertrofiada, succulenta, da qual se extrai o suco.

O pseudofruto, também denominado pedúnculo ou hipocarpo, quando maduro possui em sua constituição química, pH de 3,5 a 4,5; acidez de 0,22 a 0,52%; água de 84,5 a 90,4%; sólidos solúveis totais 9,8 a 14,0 °Brix; açúcares totais de 7,7 a 13,2%; vitamina C 139,0 a 187,0 mg/100 g e tanino de 0,27 a 0,72% (LUCENA, 2006). Seu tamanho varia de 3 a 20 cm, peso de 15 a 200 g, podendo possuir formato cilíndrico, piriforme, pomóide, cardioide, entre outros e sua coloração varia desde amarelo-canário, laranja ao vermelho mais intenso (LUCENA, 2006).

A castanha, que é o fruto, é de grande importância nutricional, constituída por 5 g de água, 50 a 60 g de óleo, 18 a 20 g de proteínas e 27,2 g de carboidratos. É um aquênio reniforme (FIG. 4), que consiste do pericarpo (a casca) de 3 mm de espessura, de coloração castanho-acinzentado, constituído de um epicarpo coriáceo liso com minúsculos poros e um endocarpo duro, resistente, fortemente mineralizado, separados por um espesso mesocarpo alveolado e uma amêndoa envolta por uma película. O mesocarpo constitui-se de uma camada de células esponjosas no qual se encontra um bálsamo castanho-escuro, impropriamente denominado de óleo, o Líquido da Castanha de Caju, capaz de proteger a amêndoa do ataque de insetos devido ao seu poder inseticida (MENDONÇA & MEDEIROS, 2011). Seu peso pode variar entre 3 a 32 gramas (LUCENA, 2006).

Figura 4: Figura 4A mostra a casca da castanha e o líquido contido na borda da casca (Fonte: <http://portuguese.alibaba.com>). Na figura 4B, estrutura da castanha de caju, mostrando a região do mesocarpo da qual se obtém o LCC (Fonte: www.mecol.com.br).

3.1.2 Líquido da Castanha de Caju (LCC)

O LCC é um subproduto da produção de castanha, é uma resina líquida, bastante cáustica e inflamável, de coloração marrom claro, escuro a preto, de odor forte e característico (WATANABE et al., 2010; VIEIRA & BORTOLI, 2006). O líquido escuro a preto obtido da casca da castanha (aproximadamente 32% do conteúdo da casca) possui larga aplicação industrial sendo utilizado como matéria-prima para produtos como, tintas, vernizes e revestimentos. Tais aplicações são pelo fato do LCC ser facilmente polimerizado por diversas formas. O LCC é também conhecido por possuir ampla atividade biológica, como antimicrobiano, antioxidante e antitumoral, devido a seus componentes principais: o ácido anacárdico, cardanol e cardol derivados do ácido salicílico, com um grupo alquil de 15 carbonos (WATANABE et al., 2010). Este líquido é uma mistura de meta-alquifenóis, que variam no grau de insaturação do grupo ligado ao núcleo benzênico. Para se extrair o LCC são utilizados métodos de extração com solventes ou por processo mecânico (prensagem), ou extração por aquecimento (SILVA et al., 2006). O LCC pode ser natural ou técnico, depende do método de extração. Na extração com solvente ou na prensagem obtém-se o LCC-Natural, no qual o composto majoritário é o ácido anacárdico (60-65%), constituído também de cardol (15-20%), cardanol (10%) e traços de 2-metilcardol. A partir da descarboxilação do ácido anacárdico, utilizando altas temperaturas entre 180 – 300 °C (FIG. 5) obtém-se o cardanol (60-65%) denominado LCC-Técnico, este líquido proveniente da queima das castanhas é também constituído de cardol (15-20%), material polimérico (10%) e traços de 2-metilcardol (FIG. 5). Estudos mostram que o cardol é o constituinte responsável pela toxicidade do LCC (OLIVEIRA, 2007; KUMAR, 2002; TYMAN, 1978).

Figura 5: Estrutura química dos principais constituintes do LCC (OLIVEIRA, 2007).

3.1.2.1 LCC-Natural (Ácido Anacárdico)

Obtido por extração com solventes ou prensagem das cascas da castanha de caju, métodos considerados frios, é denominado de LCC-Natural, por não utilizar técnicas de extração que possam comprometer o estado atual em que o líquido se encontra no interior da casca da castanha.

O ácido anacárdico (ácido 6-pentadecilsalicílico) é um composto fenólico biosintetizado a partir dos ácidos graxos. Este lipídio fenólico apresenta o núcleo do ácido salicílico e uma cadeia lateral de 15 carbonos que podem conter insaturações (AGOSTINI-COSTA et al, 2005). É cientificamente conhecido por possuir propriedade antimicrobiana (inibição de bactérias gram-positivas, incluindo bacilos e estafilococos) e antiacne, podendo ser utilizado em formulações cosméticas com essa finalidade (WATANABE et al., 2010; OLIVEIRA, 2007; KUMAR, 2002; TYMAN, 1978). É também conhecido como anticancerígeno, antiinflamatório, antioxidante, radiosensibilizador e também por possuir atividade moluscicida e larvicida (SUNG et al., 2008).

Plantas como a *Ginkgo biloba*, uma árvore considerada um fóssil vivo por ter sobrevivido à explosão nuclear de Hiroshima, Japão, são amplamente utilizadas na medicina chinesa como ativador da circulação sanguínea e intensificador da memória, e outras espécies de plantas do gênero *Knema*, utilizadas na medicina tailandesa para o tratamento de doenças carcinogênicas, apresentam em sua composição química, ácidos anacárdicos como princípio ativo (AGOSTINI-COSTA et al., 2005). Embora o ácido anacárdico apresente a propriedade de irritante cutâneo, em concentrações $\geq 5\%$, estudos mostraram que esse composto não apresenta potencial mutagênico, carcinogênico ou cocarcinogênico (SUNG, 2008; AGOSTINI-COSTA et al., 2005).

3.1.2.2 LCC-Técnico (Cardanol)

Obtido por aquecimento das cascas da castanha de caju, e, portanto denominado de LCC-Técnico, o cardanol é um componente fenólico com uma cadeia alifática em posição meta com 15 carbonos na estrutura, é um subproduto obtido da descarboxilação do ácido anacárdico, principal componente do líquido da

castanha de caju natural, constitui a porção monofenólica do LCC (GANDHI et al., 2012; WASSERMAN & DAWSON, 1945). É derivado de ácido salicílico e apresenta-se dentro das correntes que privilegiam os processos ecologicamente corretos por ser oriundo de fonte renovável e biodegradável. Este também é muito estudado perante suas propriedades poliméricas (OLIVEIRA, 2007; KUMAR et al., 2002; TYMAN et al., 1978). Derivados do cardanol são aplicáveis na produção de tintas, plastificantes, resinas de troca-iônica. Produtos clorados do cardanol apresentam ação pesticida e derivados sulfonados de cardanol, tetraidro cardanol, e seus éteres fenólicos são utilizados como agentes tensoativos (GANDHI et al., 2012).

Na medicina popular diversas plantas, cascas e flores são utilizadas para o tratamento de doenças como gastrite, asma, dermatites, úlceras, anemias, entre outras, sem comprovação científica. A situação não é diferente com o caju e seus derivados que são amplamente utilizados, sendo o LCC empregado para os mais diversos fins, desde biodiesel a antimicrobiano em cosméticos e larvicida. Portanto, com base em observações do próprio autor, notou-se que o LCC pode possuir ação na pigmentação da pele humana.

3.2 O Sistema Tegumentar

O sistema tegumentar é o maior órgão do corpo, constituído por dois componentes, a pele e os derivados epidérmicos (unhas, pelo e as glândulas sudoríparas, sebácea e mamária) (FIG. 6) (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Figura 6: Mapa conceitual evidenciando os componentes do Sistema Tegumentar (KIRSZENBAUM & TRES, 2010).

3.2.1 A Pele Humana

A pele, também conhecida por membrana cutânea ou sistema tegumentar, é um órgão complexo, o maior e mais pesado do corpo humano. A pele recobre toda a superfície corporal atuando como uma blindagem flexível com a função principal de proteger o organismo, e ao mesmo tempo atuar como barreira de permeabilidade para o meio ambiente. A sua composição química é basicamente 70% água, 25% de proteínas e 3% de lipídios (KHAN et al., 2012; KANĎÁROVÁ, 2006).

A estrutura da pele é especialmente composta de duas camadas principais, a epiderme (camada superior) e a derme (camada inferior) com uma terceira camada variável, denominada tecido subcutâneo ou hipoderme, que serve de junção da derme e epiderme com os tecidos subjacentes (FIG. 7). A pele, em um indivíduo adulto médio, possui área de superfície de 1,2 a 2,2 m² e pesa cerca de 5 kg, correspondendo a 7% do peso total do corpo. A pele se apresenta em

dois tipos, um contendo grandes áreas cobertas por pelos, e outro isenta de pelos, como a pele da palma das mãos e da planta dos pés (KHAN et al., 2012).

Figura 7: Estrutura da pele humana apresentando todos os seus componentes estruturais (adaptado de Stanford Cancer Center: www.cancer.stanfordhospital.com/media/images/greystone).

Além disso, a pele é um órgão de suma importância, pois recebe estímulos como pressão, temperatura e dor. Estes estímulos são transmitidos para o sistema nervoso, e que por fim, conduzem as reações fisiológicas (SCHULZ, 2009).

3.2.2 Estrutura e funções básicas da pele

A pele possui apêndices importantes com funções especializadas. A epiderme e a derme subjacente são camadas firmemente associadas e juntas constituem uma barreira de proteção com espessura que varia de 0.5 mm, por exemplo, nas pálpebras a 4 mm (palma das mãos e planta dos pés), isso em razão da morfologia e espessura da pele serem diferentes em locais distintos (KHAN et al., 2012; KANĎÁROVÁ, 2006). As diferenças na espessura da pele podem ser causadas por diferença nos tamanhos dos estratos dérmicos individuais, como o espessamento do estrato córneo em alguns indivíduos. Gênero e idade também

podem afetar a espessura e estruturas das camadas da pele (MAHMOUD, 2005). Estas duas camadas principais, derme e epiderme, são separadas por uma membrana basal. E uma terceira camada, a subcutânea ou hipoderme, esta localizada abaixo da derme e é composta, sobretudo de adipócitos, embora esta camada não seja tecnicamente parte da pele, desempenha um papel importante atuando como isolante de calor e amortecedor (KANDĚÁROVÁ, 2006; MAHMOUD, 2005).

Quanto à composição química, a pele contém água, proteínas, lipídios, minerais, ácidos nucleicos, glicosaminas, proteoglicanos e outros numerosos componentes químicos. A pele e órgãos afins, juntos, executam uma variedade de funções que podem afetar o sistema metabólico do corpo (KHAN et al., 2012). Tendo a pele quatro funções principais:

- *Proteção do ambiente / barreira biológica:*

A pele age como uma barreira protetora entre o meio ambiente (externo) e o corpo, um papel estratégico de suma importância. Está constantemente exposta a riscos químicos, físicos e biológicos, contra os quais tem que impetrar uma função efetiva de proteção vertical. É um mecanismo de defesa fiável, que está sempre ativo agindo antes das defesas sistêmicas (KRAUSE, 2010).

Atua como uma barreira biológica natural protegendo o organismo e impedindo a penetração de microrganismos através do estrato córneo (KANDĚÁROVÁ, 2006).

- *Proteção do ambiente / barreira química e física:*

Ao passo que como barreira química age em duas direções, uma controlando a perda de água, eletrólitos e outros constituintes do corpo, e outra impedindo a entrada no organismo de compostos prejudiciais ou indesejáveis do ambiente (KANDĚÁROVÁ, 2006). A melanina, o manto ácido, a redução do pH, entre outros fatores contribuem para esta proteção do organismo. E como barreira física, contribuem, sobretudo, as células queratinizadas, pois os glicolipídeos da epiderme auxiliam controlando a entrada e perda de água e substâncias hidrófilas KHAN et al., 2012; SCHULZ, 2009).

- *Barreira contra a radiação ultravioleta (UV):*

A barreira contra a radiação de luz UV atua impedindo a entrada dos raios UV emitidos pelos raios solares e os emitidos pela luz branca que utilizamos para iluminar ambientes fechados e em locais abertos à noite.

Quando a exposição aos raios solares é intensa e frequente, tem-se como resultado a produção de melanina pelos melanócitos, na camada basal, por estimulação da luz UV (KANDĀROVÁ, 2006).

Entretanto, como barreira de proteção contra os raios UV, a pele protege em especial o organismo dos danos que estes raios solares podem causar.

As radiações eletromagnéticas emitidas pelo sol, em um dia de céu aberto sem a presença de nuvens, são divididas em três grupos: radiações UV, radiações no espectro visível e radiação no espectro infravermelho. As radiações UV ainda se subdividem em UVA com espectro de radiação gama (γ) de 230-400 nm, UVB (290-320 nm) e UVC, espectro germicida, entre 100-290 nm (KHAN et al., 2012; SCHULZ, 2009). Os raios UVA, presentes durante o dia todo, propiciam a formação de radicais livres, e com isso, elevam o número de lesões oxidativas não reparadas, que alteram o metabolismo e são responsáveis pelo fotoenvelhecimento, aumentando o risco de surgimento de câncer de pele. Os raios UVB podem provocar queimaduras solares na pele, que resultam em eritemas cutâneos, estes raios estão presentes em maior intensidade entre 10 horas da manhã e 16 horas da tarde. (KHAN et al., 2012; SCHULZ, 2009; VELASCO et al., 2004).

- *Termorregulação:*

A pele também é responsável por manter a temperatura do corpo a aproximadamente 37 °C, este processo é denominado homeostase térmica corpórea. Manter a homeostase do corpo a 37 °C é vital para muitas reações bioquímicas, desta forma quando o ambiente externo está com elevadas temperaturas, a pele esfria o nosso corpo e a água presente no suor evapora. Em situações contrárias, quando o corpo é exposto a baixas temperaturas, a presença do tecido adiposo na camada mais profunda da pele impede a perda de calor do corpo (KHAN et al., 2012; KRAUSE, 2010; KANDĀROVÁ, 2006), no entanto, esta regulação não é suficiente a partir de determinadas temperaturas. O calor também

pode perder-se por radiação, condução, convecção ou evaporação (HALPERN, 2010).

Contudo existem outras funções suplementares importantes exercidas pela pele humana que são: armazenamento, excreção e absorção, e a síntese de moléculas importantes.

3.2.3 Epiderme

A epiderme é a camada mais fina e superficial da pele, responsável pela função de proteção do corpo, pois está em contato direto com o ambiente externo (KHAN et al., 2012). Sua face superficial é plana, compacta e impermeável, crivada de orifícios (poros) dos folículos pilossebáceos e das glândulas, que se originam na derme, porém são anexos da epiderme. Não vascularizada, recebe nutrientes da derme por permeação pelos capilares (KIERSZENBAUM & TRES, 2012). A epiderme pode ser dividida em cinco camadas diferentes: estrato germinativo (estrato basal), estrato espinhoso, estrato granuloso, estrato lúcido (camada de transição) e estrato córneo (FIG. 8). O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é formado por células mortas, Ao passo que as outras quatro camadas internas são formadas por tecidos vivos e, portanto denominada de epiderme viável (SCHULZ, 2009). Os estratos basal e espinhoso formam o estrato de Malpighi.

Figura 8: Estrutura da epiderme evidenciando as camadas que a compõem (Fonte: <http://ltc.nutes.ufrj.br/toxicologia/mlI.pele.htm>).

O estrato germinativo ou camada basal é mitoticamente ativo e responsável pela produção contínua de queratinócitos, que migram para superfície. Este consiste de células-tronco da epiderme, células cilíndricas dispostas em paliçada interrompidas por melanócitos, com espaços intercelulares irregulares. Já o estrato espinhoso encontra-se vastamente disperso na epiderme, contém lipídios enriquecidos com corpos lamelares, responsáveis pela formação do manto hidrolipídico e grãos de queratina e hialina (SCHULZ, 2009; HARRIS, 2009). Possui de 5 a 6 camadas de células espinhosas poligonais achatadas que se expandem à medida que se aproximam da superfície, permitindo a passagem de nutrientes, estando também relacionado à função tátil, e responsável pelo processo de queratinização (HARRIS, 2009). Quanto ao estrato granuloso, este é rico em grânulos de querato-hialina presente nas células, esta característica é em razão do processo de maturação das células (queratinócitos), perdendo posteriormente o núcleo e adquirindo a conformação achatada, sendo formada a camada de queratina (HALPERN, 2010; HARRIS, 2009). O estrato lúcido, presente apenas na pele espessa, é a camada intermediária entre o estrato granuloso e córneo (KIERSENBAUM & TRES, 2012). Os queratinócitos que se diferenciam ao longo do caminho, da camada basal até a superfície, perdem os núcleos e se tornam mais e mais queratinizados, formando uma camada protetora de células mortas, achatadas e sem núcleo, denominada de estrato córneo, composto por açúcares e derivados, aminoácidos e queratina, é hidrofílico e seus lipídios intercelulares são especialmente constituídos de ceramidas, ácidos graxos livres e seus ésteres, e de colesterol (HALPERN, 2010; SCHULZ, 2009). Para percorrer este percurso, do estrato germinativo ao córneo, os queratinócitos precisam de pelo menos 14 dias. O tempo de residência destas células no estrato córneo é de 14 dias, sendo assim, o tempo total de uma célula na epiderme (da camada basal à descamação) é de 28 dias (HALPERN, 2010; SCHULZ, 2009).

3.2.3.1 As células da epiderme

Além de queratinócitos, a epiderme é composta também por outros três tipos celulares, células de Langerhans, células de Merkel e melanócitos (FIG. 9).

Figura 9: Morfologia das células imigrantes da epiderme (KIERSENBAUM & TRES, 2012).

3.2.3.1.1 Células de Langerhans

As células de Langerhans (CL) são células dendríticas provenientes da medula óssea que migram para os tecidos, atravessando todo o corpo, incluindo a epiderme, onde estão presentes em todas as camadas, especialmente no estrato espinhoso, no qual se encontra em maior quantidade (GRAHAM-EVANS et al., 2004). Estas células foram descobertas no século XIX em 1868, por um estudante de medicina da Universidade de Berlin, Paul Langerhans (PEISER, 2005).

As CL estão envolvidas nas respostas imunológicas e pertencem ao sistema dos fagócitos mononucleados. Tem a função de reconhecimento de antígenos e de apresentá-los aos linfócitos T (HALPERN, 2010). Normalmente as CL estão presentes em pequeno número, porém em caso de inflamação as CL encontram-se aumentadas (KHAN et al., 2012; SCHULZ, 2009).

3.2.3.1.2 Células de Merkel

As células de Merkel (CM) estão presentes esparsamente na camada basal da epiderme e presas aos queratinócitos por meio de desmossomos. Estas

são células ligadas à atividade sensorial, estando presentes em associação com os nervos sensoriais. Contém granações características, que correspondem a granações pós-sinápticas, sendo denominadas de receptores da sensibilidade tátil (KHAN et al., 2012; PEISER, 2005).

3.2.3.1.3 Queratinócitos

Os queratinócitos são as células epiteliais mais importantes da epiderme, constituindo cerca de 90% destas. Foram assim denominados, pois seu principal produto é a queratina (KIERSENBAUM & TRES, 2012). Estão originalmente ligados uns aos outros por desmossomos. Desempenham uma função de barreira da pele e boca, protegendo contra a invasão de bactérias e partículas estranhas. São responsáveis pela produção de queratina e formam as cinco camadas da epiderme: estrato germinativo, espinhoso, granuloso, lúcido e estrato córneo (FIG. 10) (HALPERN, 2010; HARRIS, 2009).

Figura 10: Queratinócitos e os componentes da barreira de permeabilidade da pele, a epiderme (KIERSENBAUM & TRES, 2012).

A queratina, é uma proteína responsável pela formação de filamentos intermediários, apresenta peso molecular que varia entre 50 e 70.000 Daltons, podendo ser líquida, forma que constitui a maior parte da queratina que recobre a

superfície cutânea, e sólida que formam os pelos e unhas (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HARRIS, 2009).

No processo de maturação dos queratinócitos sucedem algumas alterações como: perda da atividade mitótica (estrato germinativo); síntese de novas organelas (estrato espinhoso); reestruturação, visivelmente observada pela alteração no formato das células e pelo grau de compactação das camadas; modificações na membrana celular e a síntese de novos lipídios e proteínas (HARRIS, 2009).

3.2.3.1.4 Melanócitos

Os melanócitos são células que se originam dos melanoblastos, células precursoras que migram das cristas neurais do embrião, e atingem a pele entre 8ª e 12ª semanas de vida intrauterina. A transformação de melanoblastos em melanócitos ocorre devido à interação de um ligante do fator de célula-tronco com o receptor c-kit, uma tirosina quinase ligada à membrana (KIERSENBAUM & TRES, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). Eles se encontram na junção dermoepidérmica ou entre os queratinócitos da camada basal da epiderme, possuem citoplasma globoso, no qual surgem os prolongamentos que penetram em reentrâncias das células das camadas basais e espinhosas (FIG. 11) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Figura 11: Desenho esquemático de um melanócito. Seus prolongamentos citoplasmáticos se insinuam entre as células da camada basal da epiderme. Esses prolongamentos estão cheios de grãos de melanina, que são transferidos para o citoplasma dos queratinócitos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Os melanócitos são responsáveis por produzir a melanina, contida nos melanossomos, pigmento de coloração marrom-escuro, que define a cor da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). A transferência da melanina aos queratinócitos adjacentes ocorre por meio dos prolongamentos ramificados, denominados de dendritos dos melanócitos, no qual a melanina é então liberada por secreção citócrina (FIG. 12) (KIERSZENBAUM & TRES, 2012).

Figura 12:: Migração dos grãos de melanina, produzidos pelos melanócitos, para os queratinócitos na epiderme (Fonte: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm>).

3.2.3.1.4.1 Melanogênese: processo de pigmentação da pele

A melanina é uma molécula química complexa que na camada basal da epiderme define a cor da pele, processo este denominado melanogênese (FIG. 13). Esta exerce a função de proteção da pele contra os efeitos deletérios dos raios ultravioletas (FIG. 14). Durante sua produção, a melanina é primeiramente armazenada em pré-melanossomos, originados do Aparelho de Golgi, que são revestidos por uma membrana. Existem três tipos de pigmento de melanina diferentes, a eumelanina (pigmento marrom-escuro ou negro, contendo enxofre em sua composição, dá origem às cores escuras), a feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho amarronzado, composta por enxofre em maior concentração, dá origem às cores claras) e a neuromelanina (preta) (KAMAMOTO et al., 2009; SIENNA, 2008; PEYREFITTE et al., 1998). A eumelanina e a feomelanina são os pigmentos importantes na pigmentação da pele, sendo produzidos a partir da metabolização da tirosina dentro dos melanócitos, que juntamente com os queratinócitos formam unidades cutâneas funcionais, na

proporção de um melanócito para cada 36 queratinócitos. Após a síntese, ocorre a transferência do pigmento aos queratinócitos através dos prolongamentos citoplasmáticos (dendritos) dos melanócitos, e à medida que ocorre a diferenciação dos queratinócitos, os grãos de melanina são juntamente transferidos para a superfície cutânea. Ao passo que, a síntese da neuromelanina ocorre em alguns neurônios especiais do sistema nervoso central, por meio de processos enzimáticos, ou seja, não é sintetizada nos melanócitos (KAMAMOTO et al., 2009).

Figura 13: Via da melanogênese. Setas tracejadas indicam etapas da síntese resumidas ou que não são completamente conhecidas (SIENNA, 2008).

Figura 14: Desenho esquemático ilustrando a proteção exercida pelo pigmento melanina contra a ação deletéria dos raios ultravioleta da luz solar sobre as células epidérmicas, sendo I pele escura; II pele clara; e III pele sem melanina (albino) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2002).

O hormônio MSH tem por função estimular a melanogênese (SIENNA, 2008). A melanogênese, processo de produção e distribuição da melanina na epiderme, se dá a partir de um aminoácido, a tirosina, em presença da enzima tirosinase que auxilia a síntese da melanina (PEYREFITTE et al., 1998). Por esta ação, o aminoácido tirosina é transformado em L-3,4 diidroxifenilalanina, denominado L-DOPA (FIG. 15). A tirosina também atua sobre esta, produzindo dopa-quinona, que após diversas transformações, converte-se em melanina. A enzima tirosinase encontrada nas cisternas do retículo endoplasmático rugoso e em grande quantidade nas vesículas formadas no complexo de Golgi é sintetizada nos polirribossomos. É nessas vesículas, denominadas melanossomos, que se inicia a síntese da tirosinase (KIERSZENBAUM & TRES, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005; SIENNA, 2008).

Figura 15: Estrutura química da L-3,4 diidroxifenilalanina, L-DOPA (http://www.rcsb.org/pdb/images/DAH_600.gif).

A L-DOPA, hormônio estimulador de α -melanócitos, tem sido utilizada para dosear a quantidade de melanina produzida, para caracterizar a pigmentação da pele, ou seja, o processo de melanogênese (LEI et al., 2002). Tais estudos podem ser realizados *in vitro*, utilizando culturas de células da pele.

3.2.3.1.4.2 Discromias: distúrbios relacionados à pigmentação

As discromias ou distúrbios pigmentares são modificações que ocorrem no processo de pigmentação da pele. Os fatores causadores das discromias são diversos como: exposição excessiva aos raios solares, alterações hormonais, utilização de medicamentos (anticoncepcionais, antibióticos e outros), gravidez, reações alérgicas, alterações genéticas, acidentes (queimaduras), inflamações, entre outros. As discromias são classificadas em hiperpigmentação (aumento da produção e transferência de melanina e outros pigmentos), hipopigmentação (diminuição de melanina) e acromias (ausência de melanina na pele) (KAMAMOTO et al., 2009).

A hiperpigmentação da pele ocorre, muitas vezes, por fatores hormonais e ambientais, desencadeando problemas como as manchas na pele, que incluem as efélides, popularmente conhecida como sardas, os nevus, o lentigo, o melasma, dentre outros (SIENNA, 2008; NICOLETTI, 2002). A hiperpigmentação da pele está relacionada a vários fatores, como envelhecimento, gravidez, distúrbios endócrinos, tratamento com hormônios sexuais e exposição ao sol em diferentes graus (NICOLETTI, 2002).

As hipopigmentações ou hipocromias da pele são doenças ocasionadas pela redução no número ou até mesmo o desaparecimento dos melanócitos, por exemplo, vitiligo, pitiríases. As hipocromias caracterizam-se pelo surgimento de manchas brancas na pele, resultantes da diminuição ou destruição dos melanócitos. O fator autoimune também é considerado para o aparecimento das hipocromias, principalmente o vitiligo (KAMAMOTO et al., 2009; GUERRA et al., 2000).

As acromias da pele são caracterizadas pela ausência total de melanina devido a uma disfunção celular, por exemplo, albinismo e leucodermia solar (sardas brancas) (KAMAMOTO et al., 2009; GUERRA et al., 2000).

Existem diversos produtos para o tratamento das discromias. No caso das hiperpigmentações, a hidroquinona é a mais comum, porém nos últimos anos, diversas alternativas estão disponíveis no mercado como o ácido kójico, ácido ascórbico, ácido retinóico, entre outros.

A hidroquinona (diidroxibenzeno) é um composto hidroxifenólico (FIG. 16), principal produto utilizado como agente despigmentante, e também um

conhecido inibidor da melanogênese, processo pelo qual se forma a melanina. Por possuir estrutura similar a do precursor da melanina, a enzima tirosinase, a hidroquinona atua na via melanogênica inibindo esta enzima, impedindo a conversão de L-DOPA a melanina. A hidroquinona afeta a formação, melanização e degradação dos melanossomas, podendo comprometer a estrutura membranosa dos melanócitos, além de causar necrose (BANDYOPADHYAY, 2009; LEI et al., 2002). As reações adversas apresentadas mais comuns são irritação, eritema, dermatite de contato alérgica e hipocromias. Embora a hidroquinona apresente algumas desvantagens, é ainda o agente despigmentante mais prescrito pelos médicos no mundo. Atualmente alguns países Europeus, Japão e Estados Unidos questionaram a segurança da hidroquinona em produtos cosméticos e proibiram o seu uso. Tal ação incentiva a pesquisa por novos agentes despigmentantes (BANDYOPADHYAY, 2009).

Figura 16: Estrutura química da Hidroquinona (www.dataapex.com).

Quanto à hipocromia o tratamento é difícil, os mais comuns são: a utilização de filtro bloqueador solar (prevenção), cosméticos que apenas camuflam as áreas despigmentadas, glicocorticoides tópicos e psoralenos (produto de origem natural que sensibiliza a pele para o bronzamento solar) (GUERRA et al., 2000).

3.2.4 Membrana basal

A membrana basal, camada que suporta a maioria dos epitélios, integra a interface entre a derme e epiderme, diferenciando-se dos tecidos adjacentes em virtude de sua estrutura e composição molecular. Na membrana basal estão fixados os queratinócitos através de hemidesmossomos, que apresentam diâmetros que variam de 500 a 1.000 nm (HARRIS, 2009). Sua espessura oscila de 60 a 140 nm, e na região mais profunda a laminina e a fibronectina, proteínas distintas da matriz extracelular, encontram-se associadas a uma rede de colágeno,

proteoglicanas e outras proteínas, apresentando estrutura trançada com interstícios para acomodar os canais sudoríferos e os infundíbulos dos folículos polissebáceos (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HARRIS, 2009).

A membrana basal é formada de dois componentes: a lâmina basal e a lâmina reticular. A lâmina basal é uma matriz extracelular em formato de lâmina que mantém contato direto com a superfície das células epiteliais, tendo origem no arranjo de moléculas de laminina com colágeno do tipo IV, entactina e proteoglicanas. A lâmina reticular é constituída por fibras de colágeno, que fornecem a sustentação para a lâmina basal, sendo sucessiva ao tecido conjuntivo (FIG. 17) (KIERSENBAUM & TRES, 2012).

Figura 17: Fotomicroscopia evidenciando a membrana basal e seus componentes estruturais (KIERSENBAUM & TRES, 2012).

3.2.5 Derme

A derme é a camada conjuntiva que constitui a porção estrutural do sistema tegumentar. Sua espessura oscila de 0,5 a 3,0 mm, com espessura maior no dorso do que na parte anterior do corpo e mais grossa nos homens do que nas mulheres. A derme consiste em duas camadas sem limites distintos, a camada

papilar e a camada reticular. A camada papilar é formada por numerosas papilas que interpolam com pregas epidérmicas. Os hemidesmossomos ancoram os queratinócitos basais na lâmina basal conferindo estabilidade à interface juncional. O suporte mecânico e a nutrição à epiderme subjacente são proporcionados pelo tecido conjuntivo frouxo formado por fibroblastos, fibras colágenas e fibras elásticas delgadas. A camada reticular é formada por espessos feixes de fibras colágenas e fibras elásticas grossas (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HARRIS, 2009).

No interior da derme, além dos complementos da epiderme (pelos e glândulas sudoríparas e sebáceas), existem também vasos sanguíneos, nervos e elementos celulares compostos por matriz celular, fibroblastos, miofibroblastos e macrófagos. Em parte, a derme também é responsável pela termorregulação, por sustentação da rede vascular e defesa imunológica, em cooperação com as células de Langerhans da epiderme (HARRIS, 2009).

3.2.6 Hipoderme

A hipoderme, ou camada subcutânea da pele, é o apêndice mais profundo da derme, servindo de junção da derme e epiderme aos tecidos subjacentes. É formada por tecido conjuntivo frouxo e células adiposas. A hipoderme é a camada responsável por facilitar o deslizamento da pele sobre as estruturas nas quais se escora. Possui espessura variável que depende da região e do grau de nutrição do organismo, podendo apresentar uma camada variável de tecido adiposo, o qual contribui como isolante térmico, mantendo e armazenando a energia metabólica da pele, bem como desempenhando papel de amortecedor de choques. Esta camada de tecido adiposo, quando desenvolvida, forma o pânículo adiposo, que modela o corpo, mantém a reserva de energia e proporciona proteção contra o frio. Nenhum tecido adiposo está presente na porção subcutânea das pálpebras, do clitóris e do pênis (KIERSENBAUM & TRES, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

3.2.7 Anexos da pele

Durante o desenvolvimento e formação da pele, a epiderme e a derme interagem entre si para originarem as glândulas sudoríparas, sebáceas e mamárias, e os anexos (pelos e unhas). As características apresentadas pela pele dependem da localização em que esta se encontra no corpo, pois dependendo da região pode apresentar folículos pilosos, glândulas (sudoríparas e sebáceas), espessuras diferentes, ora mais finas ora mais espessas, ou aveludadas (quando na presença de pelos) (FIG. 18).

Figura 18: Características da pele em relação à sua localização no corpo. Na figura A pode-se observar a pele espessa (sola dos pés e palma das mãos), tendo uma vasta área de estrato córneo com grande conteúdo de queratina. Na figura B, observa-se uma pele de espessura fina, que está presente na maior parte do corpo, com pouco estrato córneo. Na figura C pode-se observar a pele de espessura aveludada, presente no couro cabeludo e órgãos genitais, com destaque para os folículos pilosos e maior número de glândulas sebáceas presentes (Fonte: <http://www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb14/CorePages/Integumentary/Integum.htm>).

Os folículos pilosos são formados a partir de um agregado de células na camada basal da epiderme, induzidos pela sinalização de moléculas provenientes de fibroblastos do mesoderma, futura derme. Esses aglomerados de células se estendem até a derme, na qual os fibroblastos formam um nódulo abaixo do brotamento do folículo piloso, a papila dérmica, a qual é projetada para o centro do brotamento, momento em que se inicia a divisão e diferenciação das células que formam uma haste delgada e queratinizada, o pelo (KIERSZENBAUM & TRES, 2012; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

A glândula sebácea está presente em todo o corpo, exceto palma das mãos e planta dos pés. Localiza-se na derme e o seu ducto excretor está presente no colo, região intermediária do folículo piloso. Em determinadas regiões do corpo (lábios, canto da boca, glândula do pênis, pequenos e grande lábios da vagina) as glândulas sebáceas podem ser independentes abrindo-se diretamente na superfície da pele (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HALPERN, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

As glândulas sudoríparas podem ser de dois tipos, écrinas ou apócrinas. A glândula sudorípara écrina é uma glândula tubulosa enovelada simples, é abundantemente encontrada na superfície da pele, especialmente na palma das mãos planta dos pés, desempenhando papel de regulador da temperatura corporal (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HALPERN, 2010). As glândulas sudoríparas apócrinas estão localizadas na derme e hipoderme, apresentam estrutura alveolar e estão presentes nas axilas, no monte pubiano, e na região circum-anal. São inervadas por fibras nervosas adrenérgicas e seu ducto excretor abre-se no folículo piloso. São glândulas dependentes de hormônios, tendo início na puberdade (KIERSENBAUM & TRES, 2012; HALPERN, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

Nos anexos da pele também se enquadram as unhas, que são placas de células fortemente queratinizadas presentes na superfície dorsal das falanges terminais dos dedos. É na porção das camadas mais profundas da epiderme (basal e espinhosa) que ocorre a formação da substância da unha. A perda ou ausência da cutícula implica no desenvolvimento de processos inflamatórios e infecciosos na matriz da unha (HALPERN, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005).

3.3 Radiação Ionizante

Radiação são ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com determinada velocidade. É representada por qualquer dos processos físicos envolvidos na emissão e propagação de energia, quer por intermédio de fenômenos ondulatórios, ou por meio de partículas repletas de energia cinética. É

a energia que se propaga de um ponto a outro no espaço ou num meio material (CNEN, 2010).

A definição de radiação ionizante é dada pela radiação cuja energia é superior à energia de ligação dos elétrons, sendo suficiente para ejetar elétrons presentes nos átomos e moléculas, e convertê-los em partículas de carga elétrica, denominada de íons. Além do mais, reações dessas espécies, íons e elétrons, geralmente, aumentam a formação de radicais livres altamente reativos, os quais eventualmente conduzem as reações químicas. A química da radiação é a área de estudo responsável por pesquisar mudanças químicas no sistema que é produzido pela absorção de radiação ionizante (DAHLAN, 2001).

Existem dois tipos de radiação ionizante: a radiação eletromagnética e a de partículas de carga de alta energia. A radiação eletromagnética compreende as: ondas de rádio, micro-ondas, luz visível, luz ultravioleta, raios-x e raios-gama. Porém, apenas os raios x e gama, de comprimento de onda curto, são capazes de ionizar átomos e moléculas, pois possuem alta energia, da ordem de 50 eV (elétrons volt). A radiação de partículas de carga de alta energia pode ser de partículas carregadas positiva ou negativamente, são geradas por máquinas como: acelerador de elétrons e pósitron de acelerador de feixe de íons. Além do mais, tais partículas também podem ser obtidas de radioisótopos, como partículas, beta (β) e alfa (α) (DAHLAN, 2001).

Contudo, a irradiação ionizante pode ser obtida de duas fontes diferentes, as máquinas de descargas elétricas e os radioisótopos. Os radioisótopos mais comumente e comercialmente utilizados são cobalto-60 e césio-137 (DAHLAN, 2001).

3.3.1 Irradiador de Cobalto 60 (Co^{60})

O radioisótopo cobalto-60, originado a partir do cobalto-59, é um isótopo instável, formado pela reação de captura de 1 nêutron. É muito utilizado como fonte de radiação gama, devido sua longa meia-vida de 5,27 anos (IAEA, 2005). O irradiador Gammacell 220, localizado no Centro de Tecnologia das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CTR, IPEN/CNEN-SP) opera a 220 V (volts), 3 fases, 60 hertz (Hz), fonte de 15 ampéres (A). É

composto por 35 lápis tubulares, contendo sete fios de Co^{60} cada, de 20 cm de altura, completamente vedados por soldagem, que contornam internamente a câmara primária totalmente isolada (FIG. 19) (IAEA, 2005; ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED, 1968).

Figura 19: Na figura 21-A, fotografia do irradiador de Cobalto-60 Gammacell 220 do Centro de Tecnologia das Radiações CTR-IPEN/SP. Na figura 21-B, fotografia, em aumento, da câmara de irradiação evidenciando o local onde as amostras são acondicionadas (YOSHITO, 2011).

3.3.2 Efeitos Biológicos da Radiação

Seja a radiação de origem natural ou produzida pelo homem, alta ou baixa dose, qualquer que seja esta, produzirá algum efeito biológico quando em contato com o homem. O contato de um corpo ou objeto com a radiação, é denominado de irradiação (CNEN, 2010; USNRC, 2012).

Os efeitos biológicos da radiação sobre o corpo (átomos, moléculas, células, tecidos e órgãos) podem ser diretos e indiretos. O efeito direto é definido pela interação da radiação com os átomos das moléculas de DNA, ou algum outro componente celular importante para a sobrevivência da célula. Esta interação pode afetar a capacidade de reprodução da célula, e, portanto podendo ocorrer mutação (modificação), ou apoptose (morte celular). O efeito indireto, e mais

provável de ocorrer, é a interação da radiação com o material contido na célula, ou seja, a água, que constitui a maior parte. Tal interação quebra as ligações que mantêm as moléculas de água (H_2O) unidas, produzindo fragmentos como hidrogênio (H) e hidroxilas (OH). Tais fragmentos podem interagir com outros fragmentos e íons, esta ação pode induzir a formação de outras moléculas de água, na melhor das situações, ou de radicais livres, os quais podem ser prejudiciais à saúde (USNRC, 2012).

3.3.3 Radiação de Luz Solar

Em 1543, um cientista polonês, Nicolau Copérnico declarou que o Sol, era o centro do universo e não a Terra, como se pensava. Este, aparentemente, está ativo a 4,6 bilhões de anos, e possui combustível suficiente para permanecer em atividade por mais 5 bilhões de anos, sendo primordial para o desenvolvimento e continuidade da vida na Terra (DIFFEY, 1990).

O Sol emite diversos tipos de radiações, que são filtradas pela camada de ozônio presente na atmosfera da Terra. As ondas radioativas emitidas pelo sol são: raios infravermelhos (correspondentes a 50% da energia dessas ondas emitidas pelo sol), os quais são responsáveis por nos manter aquecidos aqui na terra; raios de espectro visível (que respondem por 40% da energia), os quais podem ser vistos a olho nu, e que formam um componente essencial para a fotossíntese das plantas; e radiações de espectro ultravioleta, correspondentes a 10% da energia da luz solar (VAQUERO, 2007;).

3.3.4 Radiação de Luz UV

A luz UV é uma radiação eletromagnética de comprimento de onda longo, capaz de iniciar mudanças químicas em um dado sistema, por outra via que não é a ionização, e sim, a via de excitação de espécies eletronicamente, denominada fotoquímica, na qual, cada fóton de luz é responsável por excitar uma molécula (DAHLAN, 2001). A radiação UV é produzida pelo Sol, porém também

pode ser obtida por outras fontes pelo homem, por meio de lâmpadas e câmaras de bronzeamento.

Como descrito no item anterior (3.3.3), as radiações UV correspondem a 10% da energia dos raios emitidos pelo sol, sendo 1% UVB e 9% UVA, os raios UVA são os mais penetrantes, devido ao seu longo comprimento de onda, chegando a atingir a derme. Enquanto que os raios UVB são menos penetrantes e seus efeitos são sobre a epiderme, ocasionando queimaduras em caso de longa exposição ao sol. Já os raios UVC são os mais prejudiciais à saúde (germicida), porém, possuem comprimento de onda muito curto, e, portanto não atingem a pele, pois são quase totalmente retidos na atmosfera pela camada de ozônio (VAQUERO, 2010; DIFFEY, 1990).

Os raios UV, geralmente, promovem os efeitos indesejáveis e prejudiciais da luz solar sobre os sistemas biológicos (VAQUERO, 2010). Atualmente, os raios UV são reconhecidamente a única causa de câncer de pele no mundo (SOUZA et al., 2004).

3.4 Cultura de células e tecidos

O termo genérico, cultura de tecidos, abrange a cultura de órgãos e células. A cultura de órgãos caracteriza-se pela cultura tridimensional de um tecido íntegro, que mantém algumas ou todas as propriedades histológicas do tecido *in vivo*. Enquanto que a cultura celular refere-se ao cultivo de células dispersas retiradas de um tecido, a partir de cultura primária, linhagem celular ou estirpe celular, seja por desagregação química, mecânica ou enzimática (FRESHNEY, 2010).

A utilização destas células para a realização de testes *in vitro*, como por exemplo, citotoxicidade e fototoxicidade, pode reduzir a utilização de animais para identificar o perfil tóxico de uma substância, substituindo o ensaio *in vivo*. Esta abordagem vai de encontro aos novos conceitos de substituição, redução e refinamento na utilização de animais em estudos científicos, melhor direcionando o estudo *in vivo*.

No início do século XX, Harrison (1907) e Carrel (1912), foram os pioneiros no desenvolvimento da cultura de tecidos, com o propósito de estudar o

comportamento das células animais, sem a presença das variações sistêmicas, que podem surgir quando *in vivo*, tanto durante a homeostasia normal, quanto sob o estresse de um experimento. Primeiramente, a técnica foi desenvolvida com tecidos fragmentados, a qual restringiu o crescimento para migração radial das células, a partir do fragmento do tecido posicionado em placa de cultura. Esta técnica era muito utilizada quando se possui pouco material (tecido) para a realização da cultura primária. Somente em 1916, Rous & Jones desenvolveram a técnica enzimática com fragmentos de tecidos macerados submetidos à desagregação celular por ação de enzimas (FRESHNEY, 2010).

As células e os tecidos são cultivados em soluções contendo sais, aminoácidos, vitaminas, soros, entre outros (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). O preparo da cultura de tecido ou órgão pode ser por método denominado explante, no qual o tecido é fragmentado e cultivado aderido à superfície de garrafas próprias para cultura celular ou placas de Petri, método desenvolvido por Harrison (1907) e Carrel (1912). Ou o método enzimático, no qual o tecido é cortado em fragmentos menores que 1 mm e estes são submetidos a sucessivas agitações para extração das células com a utilização de agentes enzimáticos, por exemplo, solução de Tripsina/EDTA.

A cultura de células possui ampla aplicação, sendo incorporada em estudos das mais diversas áreas com diferentes finalidades (TAB. 1).

Tabela 1: Fundamentos e aplicações da cultura de células em diversas áreas (adaptado de FRESHNEY, 2010).

FUNDAMENTOS	APLICAÇÕES
ATIVIDADE INTRACELULAR: Transcrição de DNA, síntese de proteínas, metabolismo de energia e drogas, ciclo celular, diferenciação, apoptose.	PRODUTOS DE CÉLULAS: Biotecnologia, projeto de biorreatores, produtos de recuperação celular, processamento “ <i>down-stream</i> ”*.
FLUXO INTRACELULAR: Processamento de RNA, receptores de hormônios, fluxo de metabólitos, mobilização de cálcio, transdução de sinal, transporte por membrana.	IMUNOLOGIA: Epitopos da superfície celular, hibridomas, citocinas e sinalização, inflamação.
GENÔMICA: Análises genéticas, transfecção, infecção, transformação, imortalização, senescência.	FARMACOLOGIA: Ação da droga, interações entre receptor e ligante, metabolismo da droga, resistência à droga.
PROTEÔMICA: Produtos de gene, fenótipo celular, vias metabólicas.	ENGENHARIA DE TECIDOS: Construção de tecidos, matrizes e arcabouço, fonte de células-tronco, propagação e diferenciação.
INTERAÇÃO CÉLULA-CÉLULA: Morfogênese, controle parácrino, proliferação celular, cinética, cooperação metabólica, adesão e motilidade celular, matriz de interação, invasão.	TOXICOLOGIA: Infecção, citotoxicidade, mutagênese, carcinogênese, irritação, inflamação.

* Isolamento e purificação de um produto formado biotecnologicamente, em um estado adequado para uso.

3.4.1 Suplementos adicionados ao meio de cultura

Cada componente presente no meio de cultura, é de suma importância, pois asseguram que as células sobrevivam por longos períodos em cultura, além de garantir uma reprodutibilidade experimental confiável.

Até o início dos anos 50 as células eram cultivadas em meios naturais a base de extratos de tecidos e fluidos corporais (FRESHNEY, 2010). Em 1955, surgiram os meios de cultura, quimicamente definidos com base em análise de fluidos corporais e bioquímica nutricional. Estes, utilizados há mais de 50 anos, caracterizados como meio base de Eagle (BME, *basal medium*, Eagle), proposto por Eagle (1955) e meio essencial mínimo (MEM), desenvolvido por Eagle (1959), não são resultantes de um planejamento para o desenvolvimento de meio de cultura, e sim, o objetivo inicial era estabelecer componentes essenciais para a sobrevivência e o crescimento de células animais. Tal objetivo foi alcançado com a utilização de 13 aminoácidos essenciais (ARG, CYS, GLN, HIS, ILÊ, LEU, LYS, MET, PHE, THR, TRP e VAL), 6 vitaminas, 6 espécies iônicas, glicose, e um desconhecido complexo de componentes presentes no soro animal, elementos estes indispensáveis e suficientes para a propagação de uma ampla variedade de células animais (EAGLE, 1977; RHEINWALD & GREEN, 1975a).

Mais tarde, Rheinwald e Green (1975a), desenvolveram o meio considerado “padrão ouro”, específico para a cultura de queratinócitos. O meio composto por *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), meio base de Eagle (1955) modificado por Dulbecco (1959), e *F12 Nutrient Mixture* (F12) na proporção de 2:1, respectivamente (RHEINWALD & GREEN, 1975a). Contudo, apenas estes componentes não são suficientes para o bom crescimento e sobrevivência das células em cultura, sendo necessária a adição de outros suplementos, a saber:

Soro Fetal Bovino (SFB) é uma mistura complexa composta por fatores de crescimento, proteínas, vitaminas, hormônios, entre outros fatores essenciais para a manutenção e o desenvolvimento celular (VALK et al., 2010). Entretanto, podem conter, também, agentes externos, como: endotoxinas bacterianas, bactérias, fungos, contaminantes virais, príons, micoplasmas. Tais agentes adventícios não promovem qualquer efeito sobre a morfologia e o crescimento das células, porém, uma vez presentes no soro, é praticamente impossível eliminá-los (FALKNER et al., 2005).

Antibiótico e Antimicótico são utilizados no meio de cultura como técnica preventiva ao crescimento de bactérias e fungos. Alguns estudos sugerem que a utilização destes deve ser evitada sempre que possível, pois os microrganismos podem desenvolver resistência. Além disso, os antibióticos podem apresentar efeitos adversos no crescimento celular (VALK et al., 2010).

Glutamina (precursora da síntese de proteínas e ribonucleotídeos) é utilizada em cultura como importante combustível para a respiração celular, e fonte de energia e carbono para as células. No entanto, a glutamina é instável em solução, com meia vida de 3 a 5 dias, resultando na desaminação da glutamina gerando um subproduto, a amônia, que pode ser tóxica para as células. A solução é a L-Glutamina (alanil-glutamina), um dipeptídeo, que é estável em meio de cultura e biodisponível devido à ação da dipeptidase (FRESHNEY, 2010; VALK et al., 2010).

Adenina é uma base púrica, encontrada nos ácidos nucleicos (RNA e DNA). Participa da respiração celular, na forma de adenosina trifosfato (ATP) (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000). É utilizada no meio de cultura com a finalidade de inibir o crescimento dos fibroblastos, favorecendo a seleção de queratinócitos.

A adição de alguns hormônios é essencial para o crescimento dos queratinócitos, como:

T3 (triiodotironina), hormônio tireoidiano, é um aminoácido hidrofóbico modificado. Este hormônio, juntamente com outros: insulina, hidrocortisona e estrógeno; atua regulando o transporte pela membrana, a diferenciação e constituição da superfície celular. No meio de cultura serve de suporte para diversos tipos celulares, e melhora o rendimento celular quando utilizado em soluções com redução ou ausência de soro (FRESHNEY, 2010; VALK et al., 2010).

Insulina é uma proteína bastante solúvel no plasma sanguíneo. Atua no meio de cultura como mitógeno, estimulando a proliferação celular, desencadeando a mitose. Tal efeito se deve a propriedade de promover a absorção de glicose e aminoácidos (FRESHNEY, 2010; JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2000).

Toxina Colérica (TC) aumenta a concentração celular de AMP cíclico, sendo assim, aumenta a divisão celular em cultura de células epidérmicas humanas (HAWLEY et al., 1980).

Fator de crescimento epidérmico, *epidermal growth factor* (EGF), de Cohen, foi a primeira melhoria que ocorreu no meio de cultura após 1975. Este polipeptídeo atua estimulando a migração dos queratinócitos para fora da região central das colônias, aumentando a expansão das mesmas. Promove aumento do número de populações clonogênicas, por uma via diferente da utilizada pela toxina colérica (PARKINSON & YEUDAL, 2002; GREEN et al., 1979).

Hidrocortisona, um anti-inflamatório, é a forma sintética do hormônio corticosteroide, o cortisol. Na cultura, é adicionada ao meio para manter a taxa de crescimento, a morfologia das colônias ordenadas e características, promover a fixação das células, proliferação celular a uma taxa ligeiramente superior. Pode impedir a degradação da camada de sustentação, e em determinadas condições, ser citostático, e induzir a diferenciação celular (FRESHNEY, 2010; PARKINSON & YEUDAL, 2002; RHEINWALD & GREEN, 1975b).

A hidrocortisona, a TC e o EGF formam uma fração responsável pelo aumento da população clonogênica, taxa de crescimento, e tempo de vida das células em cultura. Enquanto, a insulina e o T3 reduzem a necessidade de soro no meio (passando de 20% para 10%) (PARKINSON & YEUDAL, 2002). Sob essas condições de cultivo de células, é possível isolar clones de queratinócitos isentos de fibroblastos viáveis (RHEINWALD & GREEN, 1975b).

3.4.2 Humanização da cultura celular

No início dos anos 80, o método de cultivo proposto por Rheinwald e Green, em 1975, abriu caminho para que epitélios cultivados *in vitro*, fossem utilizados para fins terapêuticos (BULLOCK et al, 2006). Desde então, a literatura descreve sua ampla aplicação no tratamento de queimaduras, fechamento de áreas cruentas resultantes da remoção de nevus gigante, tatuagens, revestimento de áreas doadoras de retalho, entre outras (HERSON, 1999; DE LUCA et al, 1992). No entanto, a partir dos anos 90 começa a preocupação com a possibilidade de transmissão aos pacientes, de patógenos existentes em células e

materiais utilizados para o cultivo dessas e de outras células, destinadas a fins clínicos; como por exemplo, viroses animais, zoonoses e Encefalopatia Espongiforme Bovina (EEB) (MANELLO et al, 2007; SUN et al, 2004). Além das questões éticas que envolvem a utilização de animais em experimentos científicos.

Por tais preocupações, Yoshito (2011) e Altran (2011), buscaram a humanização da cultura celular, substituindo componentes xenobióticos do meio de cultura por similares humanos.

A insulina bovina, tradicionalmente empregada, é um mitógeno para os queratinócitos (FRESHNEY, 2005), portando a solução foi substituí-la por insulina recombinante humana (ALTRAN, 2011). O SFB, obtido por meio de punção cardíaca de feto bovino (ALDÉN et al, 2007), foi substituído por lisado de plaquetas humanas (YOSHITO, 2011). Na camada de sustentação (*feeder layer*) constituída de linhagem de fibroblastos murinos, houve a substituição destes por fibroblastos humanos, obtidos de pele humana por método explante, submetidos à radiação por raios gama (YOSHITO, 2011).

Já a TC ativa a adenil ciclase de forma irreversível, de modo que a multiplicação dos queratinócitos continua mesmo após sua retirada (GREEN et al., 1979), sendo assim, esta foi omitida do meio já durante as primeiras passagens (ALTRAN, 2011).

Os resultados obtidos por Yoshito (2011) e Altran (2011), mostraram que os componentes xenobióticos podem ser substituídos por similares humanos, ou omitidos, sem afetar o desempenho da cultura habitual de células, permitindo o alcance de resultados com a cultura humanizada, similares aos obtidos com a cultura padrão.

3.4.3 Cultura de queratinócitos humanos *in vitro*

Os queratinócitos humanos, por proliferação, migração, diferenciação e apoptose, regulam e mantém com precisão a epiderme, tecido de autorrenovação. Na camada basal, os queratinócitos possuem a função de se dividirem, sendo estimulados e regulados por vários fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas produzidos pelos mesmos (SHIRAKATA, 2010).

Os queratinócitos podem ser cultivados tanto em baixa densidade (dependente de camada de sustentação), quanto em alta densidade.

3.4.3.1 Camada de Sustentação (Feeder Layer)

Em 1955, Puck e Marcus, descreveram, pela primeira vez, a utilização de células irradiadas por raios-x, para auxiliarem na formação de colônia de células isoladas na mesma cultura, utilizando células HeLa. Este foi denominado de “efeito alimentador”. Estes autores sugeriram que as células alimentadoras (*feeder layer*) proporcionavam fatores de curta duração necessários para a formação de colônias. Eles também mostraram que os anticorpos citotóxicos eram absorvidos por estas células alimentadoras protegendo as células dependentes de seus efeitos (PUCK & MARCUS, 1955).

Rothfels, Kupelweiser e Parker (1963) mostraram que células irradiadas por raios-x ou mesmo não irradiadas podem apresentar efeito de alimentação para outras células (ROTHFELS apud STOKER & SUSSMAN, 1965, p. 645).

3.4.3.2 Cultura de Queratinócitos em baixa densidade

A cultura em baixa densidade consiste de queratinócitos cultivados na densidade de 5×10^3 células / cm^2 , sobre *feeder layer*.

Em 1975, Rheinwald e Green, estabeleceram um modelo *in vitro* de células mesenquimais, fibroblastos de linhagem 3T3, irradiadas com raios-x, com atividade proliferativa inativada pela radiação, porém sem alterações na sua capacidade de produzir fatores de crescimento essenciais para o bom desenvolvimento das células epiteliais (MAAS-SZABOWSKI et al., 2002; PARKINSON & YEUDALL, 2002; RHEINWALD & GREEN, 1975a; RHEINWALD & GREEN, 1975b). Esta técnica apresenta como vantagem a contribuição para a adesão e proliferação dos queratinócitos, além de possibilitar a utilização inicial de menos queratinócitos para seu desenvolvimento em cultura.

3.4.3.3 Cultura de Queratinócitos em alta densidade

Na alta densidade os queratinócitos são cultivados sem a camada de sustentação, em densidade 10 vezes superior (5×10^4 células / cm^2) que a padronizada para cultura de baixa densidade. Como vantagem esta técnica dispensa a utilização de fibroblastos pós-mitóticos como camada de sustentação, sendo desnecessário o cultivo e posterior tratamento dos fibroblastos para serem usados como *feeder-layer* (KLINGBEIL, 2006; MAAS-SZABOWSKI et al., 2002).

Prignano (1999) concluiu que os queratinócitos cultivados em alta densidade, isentos da camada de sustentação, diferenciavam a partir da primeira passagem, permanecendo assim nas subsequentes. E que a presença da camada de sustentação aumenta a quantidade de tonofibrilas e desmossomos, reduzindo a diferenciação dos queratinócitos (PRIGNANO et al., 1999).

Com estes estudos, foi possível observar que o bom desenvolvimento dos queratinócitos depende da presença das células mesenquimais (fibroblastos), pois estas produzem fatores solúveis que auxiliam fortemente no estímulo ao crescimento dessas células (MAAS-SZABOWSKI et al., 2002).

3.4.4 Cultura de melanócitos *in vitro*

Estudos mostram que melanócitos isolados de biópsias da pele têm sido cultivados *in vitro* com sucesso nas mesmas condições de cultivo dos queratinócitos. Fatores de crescimento básicos produzidos pelos fibroblastos, fatores mitogênicos presentes em extratos de melanoma, astrocitomas e células de linhagens de fibroblastos, tem contribuído para o crescimento de melanócitos *in vitro*, dobrando o número de células em cultura no período de 4 a 10 dias. Muitos dos fatores de crescimento conhecidos como EGF e hormônios como insulina, T3, hidrocortisona, entre outros, não auxiliam no crescimento e proliferação dos melanócitos (DE LUCA et al., 1988).

De Luca (1988), mostrou que melanócitos cultivado em cultura com queratinócitos (cocultura), tiveram seu tempo de duplicação modificado de 4 a 10 dias para 24 horas, uma melhora significativa, fortemente estimulada pela presença de queratinócitos em cocultura, pois os queratinócitos possuem

informações necessárias para direcionarem a organização fisiológica dos melanócitos na camada basal do epitélio em cultura (DE LUCA et al., 1988).

3.5 Testes de Citotoxicidade e Fototoxicidade *in vitro*

Os experimentos de citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro*, avaliam substâncias químicas, novas ou desconhecidas, em contato com as células da pele, com a finalidade de avaliar o potencial tóxico destas substâncias, presumindo os efeitos causados por tais componentes quando em contato com a pele em ausência e presença de luz.

3.5.1 Citotoxicidade

A década de 80 foi marcada por uma fase de esforço considerável no sentido de estabelecer a utilidade de testes de citotoxicidade *in vitro* para prever o potencial tóxico de substâncias químicas *in vivo*. Os resultados obtidos da toxicidade *in vitro* corroboram com os obtido *in vivo*, provando a eficiência destes testes na predição da toxicidade aguda de novos produtos químicos (GARLE et al., 1994).

Os testes de citotoxicidade podem ser realizados por meio de métodos que verificam a taxa de morte celular (apoptose) ou a taxa de viabilidade celular. O método mais comumente utilizado é o MTS.

O MTS é um método colorimétrico que determina o número de células viáveis em ensaios de citotoxicidade, proliferação celular ou quimiossensibilidade. Contém um composto tetrazólio [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2H-tetrazólio]. O MTS quando em contato com as células é reduzido, por estas, à formazana, um produto solúvel no meio de cultura de tecidos, esta conversão é realizada por enzimas desidrogenase encontradas em células metabolicamente ativas. A leitura da absorbância de formazana a 490 nm é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (PROMEGA, 2009).

3.5.2 Fototoxicidade

A Fototoxicidade é definida por uma reação tóxica, causada por uma determinada substância aplicada à pele e seguida de exposição à luz. Esta reação pode ser provocada ou aumentada mesmo com baixas doses da substância, ou ainda induzida por irradiação da pele após a administração sistêmica de uma substância (OECD, 2004).

O teste de fototoxicidade *in vitro* identifica e determina o potencial tóxico da substância ou produto químico em teste induzido por exposição à luz. A fotocitotoxicidade de uma substância ou produto é avaliada pela redução na viabilidade das células expostas a substância ou produto químico na presença em relação à ausência de luz. Este teste identifica a probabilidade de substâncias ou produtos químicos testados em causarem fotocitotoxicidade *in vivo* (OECD, 2004).

3.5.2.1 Câmara para ensaio de fototoxicidade

Para a realização dos testes de fototoxicidade é necessária utilização de uma câmara específica. Esta câmara é comercializada, porém o guia [®]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay*. INVITTOX n. 78 (2008), descreve os requisitos necessários para a sua construção.

Segundo o guia, a câmara deverá proporcionar um ambiente estável, ter aproximadamente 80 cm de altura e 50 cm de largura, permitir um bom ajuste da distância de exposição entre a placa e a luz UV, de aproximadamente 60 cm, para alcançar uma radiação UVA de $1,7 \text{ mW/cm}^2$ ($= 1 \text{ J/cm}^2$ para 10 minutos de exposição), sendo que para o teste de fototoxicidade, o protocolo OECD Toxicity Guide – 432, preconiza que a dose de radiação, sobre o composto químico em contato com as células, deve atingir 5 J/cm^2 (ECVAM, 2008; OECD, 2004).

A simulação solar deve ser feita com lâmpada de arco de xenônio e filtros apropriados, para permitir somente a passagem dos raios UVA. Sua fonte de luz deve ser estável e uniforme, de modo a atender os critérios de qualidade espectral especificados pelo guia (AZEVEDO-FILHO, 2010).

A medida para validação e controle da dose de radiação emitida deve ser efetuada com o auxílio de um dispositivo físico. Este dispositivo físico deve

determinar o número de fótons absorvidos em um dado feixe de luz em um espaço definido (KUHN, 2004). Estes são subdivididos em dois principais tipos de detectores: os térmicos (que convertem energia radiante em calor), por exemplo, bolômetros e termistores; e fotoelétricos (que convertem energia radiante em corrente elétrica). Para detectar luz visível e UV são utilizados os que convertem energia eletromagnética em corrente elétrica, sendo estes: luxímetro, que mede a intensidade da luz visível, e radiômetro espectral que mede a irradiância emitida pela luz UV (AZEVEDO-FILHO, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os testes descritos a seguir, foram realizados sob condições adequadas de assepsia, garantindo resultados confiáveis e eficientes nos testes. A higienização de superfícies, equipamentos e ambientes, foi periodicamente executada cumprindo os procedimentos operacionais padrões (POPs).

Em caso de ocorrência de contaminação, ou resíduo de tecidos utilizados para obtenção de células isoladas, os mesmos foram submetidos à ação de hipoclorito 2%, por 30 minutos, antes de serem descartados em sacos plásticos (branco leitoso), apropriados para o descarte de material infectante. Estes sacos foram devidamente depositados em recipiente adequado para coleta seletiva de materiais biológicos e hospitalares.

4.1 Obtenção do LCC

As castanhas foram coletadas de cajueiros provenientes das cidades de Salto de Pirapora-SP e Várzea Grande-CE. Após coletadas, estas foram limpas e submetidas a dois diferentes métodos de extração.

Os líquidos, obtidos em cada técnica de extração, foram acondicionados em frascos âmbar e armazenados em geladeira, à temperatura entre 2-8 °C.

4.1.1 Extração com solvente

Obtenção do **LCC-Natural**, segundo método proposto por Logrado (2005). As castanhas foram partidas ao meio e retirou-se a noz interna. As cascas foram primeiramente pesadas e submetidas à extração com solvente, Etanol 95% (CAAL 11460), em Extrator Soxhlet, a temperatura máxima de 60 °C, por 4 horas. O extrato bruto obtido foi submetido à evaporação a temperatura de 50 °C, para eliminação do solvente.

4.1.2 Extração por aquecimento

Para obtenção do **LCC-Técnico**, foi realizada a extração mediante o aquecimento das castanhas em estufa de secagem (ORION® Mod. 520, FANEM), temperatura entre 180 e 220 °C por 45 minutos.

4.1.3 Cálculo do rendimento dos extratos do LCC

As cascas das castanhas, antes de serem submetidas às técnicas de extração para obtenção dos extratos de LCC, natural e técnico, foram pesadas em balança granatária (Mod. AR5120, OHAUS). Após, a extração, os líquidos obtidos de cada técnica foram recolhidos e pesados, separadamente, em béquer de vidro ao abrigo da luz, em balança semi-analítica (Mod. AB304-5, METTLER TOLEDO).

Os dados obtidos foram compilados para obtenção da média do rendimento de LCC, natural e técnico, por peso e por castanha, considerando apenas as cascas, sem a presença da noz interna.

4.1.4 Cálculo da densidade dos extratos do LCC

A fórmula utilizada para o cálculo da densidade foi:

$$D = \frac{m}{v}$$

Onde: D = densidade; m = massa; e, v = volume.

Os extratos de LCC, natural e técnico, foram pesados com auxílio de uma ponteira, em balança semi-analítica. Para tanto, as ponteiros eram primeiramente pesadas antes de sugar 1 mL da amostra e após, o conjunto era pesado novamente, eliminando posteriormente o peso da ponteira. Foi pesado 1 mL de cada amostra por cinco vezes, a fim de se obter a média. Os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão das médias. Sendo utilizado para a análise estatística o programa Microsoft Excel, mediante o software assistente (XL Toolbox) para elaboração do teste ANOVA, que identifica significâncias estatísticas entre as diferenças determinadas pela análise de

variância (p). Considerando-se valores de $p < 0,05$ (resultados significativos), $p > 0,05$ (resultados não significativos).

4.2 Avaliação dos constituintes do LCC

Os constituintes do LCC proveniente de castanhas de caju originais da cidade de Salto de Pirapora-SP (substância testada) foram comparados com os constituintes do LCC proveniente de castanhas de caju originais da cidade de Várzea Grande-CE (controle positivo), mediante técnica de Cromatografia em Camada Fina (TLC – Thin Layer Chromatography) realizada em colaboração com o Dr. Paulo Hrihorowitsch Moreno do Instituto de Química da USP. O Dr. Osvaldo Beserra Carioca da Universidade Federal do Ceará, gentilmente doou uma amostra de seu LCC industrial para ser utilizado como controle, sendo um “padrão” cromatográfico para comparar com os LCCs obtidos conforme técnica do item 4.1.

A técnica cromatográfica utilizada foi a TLC em cromatofolha-alumínio (CCF-C/25 Merck sílica gel 60F₂₅₄), a fase móvel utilizada foi clorofórmio e metanol (95:5), a fase reveladora foi o anisaldeído sulfúrico, sendo a folha mantida em estufa a 110 °C por 5 minutos. O fator de retenção (R_f) dos constituintes foi calculado mediante a fórmula:

$$R_f = \frac{D1 \text{ (distância percorrida pela amostra)}}{D2 \text{ (distância percorrida pelo solvente)}}$$

Onde:

Os dados do R_f foram compilados em tabela.

4.3 Solubilidade do LCC

Para solubilidade do LCC, Natural e Técnico, foram preparadas as soluções mãe na proporção de 1:50 (20 µg/mL), sendo volume LCC:volume solvente Dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções mãe foram diluídas em meio de cultura (D₁₀, K+ e K-) nas seguintes proporções (1:100); (1:500); (1:1000), sendo volume de solução mãe:volume de meio de cultura. As diluições feitas foram acondicionadas em tubos de ensaio de vidro com tampa plástica, e colocadas em estufa a 37 °C, CO₂ 5%, por 24 e 48 horas. Após este período foi feita a leitura e interpretação dos resultados, e os mesmos foram fotografados. Os critérios adotados para leitura e interpretação dos dados foram: muito solúvel (MS), solúvel (S), parcialmente solúvel (PS) e não solúvel (NS).

4.4 Obtenção de células isoladas

A pele, obtida de mamoplastia redutora, foi doada por pacientes com idade entre 18 e 40 anos, após leitura e autorização do “termo de consentimento livre e esclarecido”, por intermédio do Banco de Tecidos do Instituto Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – ICHC-FMUSP. O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – FSPUSP, conforme Anexo 1.

4.4.1 Preparo dos meios de cultura

Meio para cultivo de fibroblastos (D₁₀):

O D₁₀, assim denominado pelo nosso laboratório, é composto por meio DMEM (GIBCO 12800-017) acrescido de 4 mM de L-Glutamina (GIBCO 25030-081), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen 15240-062) e 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO 16030-074).

Meio para cultivo de queratinócitos:

O meio de cultura utilizado para a semeadura de queratinócitos, quando em baixa densidade, denominado pelo nosso laboratório de K- (menos), é composto por DMEM (GIBCO 12800-017) e F12 (GIBCO 21700075) na proporção de 1:2, respectivamente, acrescido de 4 mM de L-Glutamina (GIBCO 25030-081), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, 0,25 µg/mL de anfotericina B (Invitrogen 15240-062), adenina (0,18 mM), hidrocortisona (0,4 µg/mL), T3 (20 pM), TC (0,1 nM), insulina de pâncreas bovino (5 µg/mL) e 10% de Soro Fetal Bovino (GIBCO 16030-074). Este mesmo meio de cultura quando utilizado para as subseqüentes trocas de meio, para manutenção das células, ou para a semeadura de queratinócitos em alta densidade, é acrescido de EGF (10 ng/mL) e denominado de K+ (mais).

Meio de cultura humanizado para cultivo de fibroblastos e queratinócitos padronizado por Yoshito (2011) e Altran (2011), respectivamente:

O meio humanizado constitui-se dos mesmos componentes do meio de cultura habitual, no entanto, os componentes xenobióticos são substituídos por similares de origem humana. Sendo o soro fetal bovino presentes nos meios D₁₀, K- e K+, substituído por lisado de plaquetas humanas, 10% para D₁₀ e 5% para K- e K+, e a insulina de pâncreas bovino (presente apenas nos meios K- e K+) é substituída por insulina recombinante humana.

4.4.2 Preparo da camada de sustentação

Os fibroblastos murinos foram obtidos da ATCC (*American Type Culture Collection*), empresa na qual o pesquisador Howard Green depositou a linhagem 3T3-J2, passando a ser denominada de CCL-92.

Estes fibroblastos, criopreservados, foram descongelados e 5×10^5 células foram semeadas em garrafas de cultura de 75 cm² e ao atingirem o estado de subconfluência (70 a 80% de células), as células foram lavadas com solução fisiológica 0,9% (p/v), em seguida foram adicionados 3 mL de solução de Tripsina (Sigma 8540C) 0,05% e EDTA (Ácido Etilenodiaminotetracético) (Sigma E6758) 0,02%. A reação enzimática foi realizada a 37 °C, até que as células se desprendessem do fundo da garrafa, cerca de 5 minutos. A ação da solução de

T-E (tripsina-EDTA) foi neutralizada com solução contendo íon cálcio e albumina (v/v). O conteúdo da garrafa de cultura foi transferido para um tubo de fundo cônico e centrifugado (*Fischer Scientific*, Mod. Marathon 8 K) por 5 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e o botão (*pellet*) de células foi ressuspenso em meio de cultura e estas contadas em câmara hemocitométrica (Câmara de Neubauer). Em seguida foi feita a amplificação em novas garrafas, até a obtenção de um número suficiente de células. Atingida a quantidade desejada para cada experimento, procedeu-se a nova tripsinização e no momento que as células se encontravam no tubo cônico, estas foram irradiadas com dose de 60 Gy, em irradiador com fonte de Cobalto-60, tipo GammaCell.

Para o preparo da camada de sustentação humanizada, foi utilizada a técnica anteriormente descrita, porém com fibroblastos humanos e meio de cultura com 10% de lisado de plaquetas, ao invés de soro fetal bovino e utilizando dose de irradiação de 70 Gy (YOSHITO, 2011).

4.4.3. Processo de isolamento das células epidérmicas

A pele, após limpeza e descontaminação com solução fisiológica 0,9% (p/v) (1 minuto), álcool etílico 70% (30 segundos) e dois banhos complementares de solução fisiológica (1 minuto cada), foi armazenada em geladeira em tubo plástico de fundo cônico (tipo Falcon), contendo DMEM, por no máximo 24 horas. Decorrido este período, a mesma foi submetida ao processo de obtenção de células epidérmicas isoladas. Para tanto, retirou-se o máximo possível da derme (FIG. 20), com auxílio de tesoura, descartando-a adequadamente. Do restante, epiderme, foram cortados fragmentos menores que 1 mm, os quais foram acondicionados em frasco apropriado (*Wheaton USA*, *Patent* nº 357261, *Thomas Scientific*), contendo solução Tripsina 0,05%/EDTA 0,02%, mantidos sob agitação, em estufa a 37 °C e CO₂ 5%, por 30 minutos, neutralizadas com igual volume de uma solução contendo íons cálcio e albumina e contadas em Câmara de Neubauer, este processo foi repetido até máxima obtenção das células isoladas. Posteriormente estas foram semeadas em garrafas de cultura, contendo *feeder layer* constituído de fibroblastos murinos irradiados e

incubadas em estufa a 37 °C e CO₂ 5%. O meio de cultura (K-) foi trocado após 48 horas, por meio K+, para o desenvolvimento e crescimento de queratinócitos.

Figura 20: Representação fotográfica de remoção de derme, primeira etapa para a obtenção de células primárias por método enzimático.

As células obtidas da pele, por método enzimático, foram mantidas em cultura até que atingissem a subconfluência, e posteriormente foram tripsinizadas, sendo desprendidas da garrafa pela ação da solução de tripsina 0,05% / EDTA 0,02%, por aproximadamente 20 minutos. Após, foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 rpm, e contadas em Câmara de Neubauer. Uma parte das células foi congelada em meio próprio para congelamento (contendo meio de cultura, 30% de soro fetal bovino e 10% de DMSO) e a outra parte recolocada em cultura para a realização dos experimentos.

4.5 Confirmação de presença de melanócitos ativos em cocultura

Os queratinócitos e melanócitos foram cultivados segundo método descrito no item 4.4.3, na densidade de 5×10^3 células/cm², sobre camada de sustentação. Após atingirem a subconfluência foram tripsinizados e semeados em placas de multipoços, em alta densidade (5×10^4 células/cm²), sem a camada de sustentação, e em baixa densidade (5×10^3 células/cm²), com *feeder layer*, e mantidos em estufa a 37 °C, CO₂ 5%, trocando-se o meio a cada 48 horas. Após quatro dias os melanócitos foram identificados pela sua morfologia e reatividade, por meio do teste de reação de L-DOPA, com visualização e contagem de cinco

campos por poço, em microscópio óptico, em aumento de 10X, sendo que os poços contendo as células foram fotografados antes e após a execução do teste.

O teste de reação de L-DOPA consiste em: lavar os poços com DMEM (sem soro); aspirar e colocar formalina neutra, incubando por 20 minutos a 4 °C; aspirar e lavar com PBS; colocar solução de permeabilização, (solução Hepes 100 mM, sacarose 1 M, NaCl 4 M, MgCl₂ 1 M, triton X-100 10% e água ultrapura q.s.p.), incubando por 5 minutos a temperatura ambiente; após, lavar novamente com PBS, aspirar e colocar Tampão Fosfato 0.1M pH 7.4, incubando por 5 minutos a temperatura ambiente; e por fim, colocar Solução de L-DOPA, mantendo em estufa 37 °C, CO₂ 5% por 3 horas.

4.6 Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram utilizados tanto para determinar as concentrações tóxicas do LCC (natural e técnico), quanto para comparação de diferentes técnicas de detecção da viabilidade celular para utilização na fototoxicidade.

4.6.1 Citotoxicidade do LCC

Foram semeados $2,4 \times 10^4$ queratinócitos/poço (alta densidade) em meio de cultura próprio para o cultivo dos mesmos (K+) em placas de 96 poços (área de 0,28 cm²/poço), sendo incubados a 37 °C, CO₂ 5%. Decorridas 24 horas desde o início da semeadura, o meio de cultura foi removido e foram adicionadas 10 concentrações diferentes do **LCC-Natural** (cardanol), **LCC-Técnico** (ácido anacárdico), óleo de Girassol (controle negativo do LCC), DMSO (solvente do LCC), hidroquinona (controle positivo, 2-4%, sendo estas as concentrações de uso em cosméticos) e água ultrapura (MilliQ, solvente da hidroquinona) no meio de cultura. Após 24 e 48 horas de contato das amostras com as células, iniciou-se o ensaio de viabilidade celular, a saber:

Este consiste da remoção do meio contendo as amostras, e substituição deste por meio contendo solução de MTS/PMS (Promega - CellTiter 96® AQueous

Non-Radioactive Cell Proliferation Assay). A leitura foi feita após 3 horas de contato da solução MTS/PMS com as células, a 490 nm, em leitor de placas tipo Elisa (Multiskan EX 355, Thermo Electron Corporation), para avaliação da proliferação celular. Os dados obtidos foram compilados no programa Origin Pro[®] 7.0 para análise e obtenção da curva de citotoxicidade das amostras.

4.6.2 Citotoxicidade do LCC em cultura de células humanizadas

As células, queratinócitos e melanócitos, foram cultivados em cocultura denominada humanizada, metodologia proposta e desenvolvida por YOSHITO, 2011 e ALTRAN, 2011. Na cultura humanizada a camada de sustentação é constituída de fibroblastos humanos irradiados, e os componentes xenobióticos dos meios de cultura, tanto o meio D10 para o cultivo de fibroblastos, quanto o meio para queratinócitos, denominado meio K, são substituídos por outros de origem não animal. O soro fetal bovino é substituído por lisado de plaquetas humanas, e a insulina bovina por insulina humana (vide item 4.4.1). Após o cultivo em cultura humanizada procedeu-se conforme descrito no item 4.5, sendo os extratos de LCC (natural e técnico) e seu solvente (DMSO), testados e comparados com os resultados obtidos da citotoxicidade da cultura padrão.

4.6.3 Citotoxicidade para comparação de técnicas de detecção de viabilidade celular

O OECD preconiza a utilização de vermelho neutro, Neutral Red (NR) (N3246, INVITROGEN), para a leitura da viabilidade celular a 540 nm. No entanto, foi testada a substituição de NR por solução de MTS/PMS com leitura a 490 nm, em razão de o MTS apresentar fácil manipulação em relação ao NR, para tanto, foi realizado um teste duplo de citotoxicidade conforme item 4.6.1, diretamente na substância referência (Óleo de Bergamota) para os testes de fototoxicidade, e os resultados de cada leitura, NR e MTS/PMS respectivamente, foram comparados entre si.

4.7 Determinação da Inibição da Atividade Melanogênica do LCC

Procedeu-se conforme o descrito no item 4.5. As concentrações de LCC (natural e técnico) e hidroquinona testadas foram pré-determinadas, mediante teste de citotoxicidade.

As concentrações testadas dos extratos (LCC natural e técnico) foram equivalentes à IC_{50} e a uma das doses consideradas proliferativas, sendo que nos poços que receberam as doses de IC_{50} , foi semeado o dobro de células.

Foram semeadas 5×10^4 células/cm² (alta densidade), em placas de 12 poços com área de 3,8 cm²/poço. Decorridas 24 horas de semeadura, o meio foi descartado, sendo adicionado meio de cultura contendo concentrações do **LCC-Natural** e **LCC-Técnico** em cada poço, em triplicata, utilizando meio de cultura como controle negativo e hidroquinona como controle positivo, as placas foram incubadas a 37 °C e CO₂ 5%, por 24 horas. Após esse período, o meio foi trocado para retirada das amostras e as culturas foram mantidas por mais quatro dias, ocorrendo a troca de meio a cada 48 horas. Posteriormente, as células foram submetidas ao teste de reação de L-DOPA conforme método descrito no item 4.5.

4.8 Construção de uma Câmara para ensaio de Fototoxicidade

De acordo com o protocolo [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol*, a câmara foi projetada em estrutura de aço inoxidável, chapas de 3 mm, pintura em tinta preta fosca, contendo duas lâmpadas de luz UVA (BL-T8, SYLVANIA). A distância, entre a lâmpada e a base que acomoda as placas, deve ser de 60 cm para se alcançar um bom ajuste da dose de radiação sobre a placa, que deve ser de 1 J/cm² por 10 minutos, sendo a dose total de 5 J/cm². A altura da câmara é de no máximo 80 cm, para conter uma área escura para acomodar o controle negativo (citotoxicidade). A largura da câmara é de 50 cm, espaço suficiente para acomodar seis placas ao mesmo tempo. Para a calibração da radiação emitida pela luz UVA dentro da câmara foi utilizado um medidor radiométrico (UV Meter Basic, Honle UV Technology), gentilmente cedido pela empresa Chemyunion de Sorocaba-SP.

4.9 Qualificação da Câmara e Validação do Método de Fototoxicidade

A qualificação da câmara e validação do método de fototoxicidade consistiu em duas etapas, sendo o método desenvolvido segundo os protocolos: OECD TG-432 e [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol*, a saber:

As células, fibroblastos Balb/c 3T3, foram cultivadas em placas de 96 poços, na densidade de semeadura recomendada de $1,5 \times 10^4$ células por poço. A substância de referência escolhida para a qualificação da câmara e validação do método foi o Lauril Sulfato de Sódio (LSS, CAS nº 151-21-3), por se tratar de uma substância conhecidamente não fototóxica (controle negativo), recomendada pelo guia OECD, e o Óleo de Bergamota (Italy Orpue, 001533, GIVAUDAN), uma substância conhecidamente fototóxica, como controle positivo.

4.9.1 Protocolo de Fototoxicidade

A substância de ensaio deve sempre ser preparada na hora, imediatamente antes da sua utilização, realizando-se o ensaio ao abrigo da luz para evitar a fotoativação ou degradação da substância antes da irradiação. Para o teste foram preparadas duas placas, sendo uma para determinação de citotoxicidade, UVA- (negativo) e outra para determinação de fototoxicidade, UVA+ (positivo). Utilizando-se um repipetador, adicionou-se 100 µL de meio de cultura nos poços periféricos da placa de 96 poços (= branco), e nos poços restantes foi adicionado 100 µL da suspensão de células. As placas foram incubadas por 24 h (37 °C, CO₂ 5%), este período de incubação permite a aderência e recuperação das células.

No segundo dia após a incubação, o meio de cultura foi retirado e adicionados 100 µL de *Phosphate Buffered Saline* contendo 0,1% (p/v) de Ca²⁺ e 0,13% (p/v) de Mg²⁺ (PBS+), para obter a concentração de 0,1 mg/mL (agitada até atingir aparência translúcida para o olho nu), a partir da qual foram preparadas oito diferentes concentrações entre 0,005 e 0,1 mg/mL da amostra em teste (FIG. 21). As células foram incubadas (37 °C, CO₂ 5%) por 1 hora.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
C	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
D	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
E	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
F	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
G	B	CN	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	CN	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

Figura 21: Esquema representativo do preparo do ensaio químico (teste de fototoxicidade) nas placas de 96 poços. Sendo: B = branco (contém só meio de cultura); CN = Controle Negativo (células + meio de cultura); C1 – C8 = 8 concentrações da substância em teste (células + amostra).

Decorrido este período, uma placa (UVA positivo) foi submetida à exposição da luz UVA, sendo irradiada em temperatura ambiente, por 75 minutos, na câmara construída conforme item 4.9. A outra placa foi mantida na área escura da câmara, em ausência de luz (controle UVA negativo), estando em temperatura ambiente pelo mesmo período da placa UVA positivo.

A substância em teste foi retirada, as placas foram lavadas com PBS+, o tampão foi substituído por meio de cultura e as placas foram novamente incubadas em estufa por 18-22 horas.

No terceiro dia, procedeu-se ao ensaio de viabilidade celular conforme descrito no item 4.6.1.

Para a interpretação dos resultados, o guia OECD preconiza um fator de foto irritação, *Photo Irritation Factor* (PIF), com base na fórmula:

$$PIF = \frac{IC_{50}(-Irr)}{IC_{50}(+Irr)}$$

Onde, PIF (fator de foto irritação); $IC_{50}(-Irr)$ é a dose correspondente a 50% de morte celular do controle não irradiado; $IC_{50}(+Irr)$ é a dose correspondente a 50% de morte celular do controle irradiado.

Para substância com $PIF < 2$, não fototóxico; para PIF entre 2 e 5, toxicidade provável; para $PIF > 5$, substância fototóxica.

4.9.2 Protocolo de Qualificação da Câmara e Validação do Método de Fototoxicidade

Especificamente para esta fase, seguindo o protocolo supracitado (4.9.1), utilizando-se como substância de referência o LSS, foram colocadas em exposição à luz UVA, nove placas de 96 poços, contendo 8 concentrações diferentes da amostra, sendo que cada placa foi correspondente a 1 Joule até que se atingisse 9 Joules, ou seja, a primeira placa recebeu 1 J/cm², a segunda placa recebeu 2 J/cm², a terceira recebeu 3 J/cm², e assim sucessivamente, até que a nona placa recebeu 9 J/cm². Uma décima placa contendo a amostra permaneceu na área escura para controle negativo (UVA-). Além disso, realizou-se também o ensaio com o Óleo de Bergamota, utilizando-se apenas duas placas, sendo uma para UVA+, nas condições exatas do item 4.9.1 (5 J/ cm²) e outra para UVA-.

Todos os dados obtidos foram compilados no programa Phototox[®] para análise e interpretação dos resultados.

4.10 Validação de Método Adaptado de Fototoxicidade para queratinócitos humanos

Para adaptação do teste de fototoxicidade aos experimentos com queratinócitos/melanócitos, seguiu-se a metodologia proposta no item 4.9.1, com substituição das células, fibroblastos Balb/c 3T3, por queratinócitos e melanócitos cultivados em cocultura (item 4.4.3). Neste teste foi utilizado o corante MTS com leitura em leitor de placas tipo Elisa, a 490 nm, e a substância referência utilizada foi o Óleo de Bergamota (Italy Orpue, 001533, GIVAUDAN), *Citrus bergamia*, testado em oito concentrações diferentes, sendo escolhido por possuir como componente majoritário o bergapteno (5-metoxypsoraleno, 5-MOP), responsável por sua atividade fotossensível.

Os resultados obtidos foram compilados no programa Phototox[®] e analisados para verificar se existem diferenças significativas entre as culturas de células.

4.11 Fototoxicidade do LCC em queratinócitos humanos

O potencial fototóxico do LCC (natural e técnico) foi identificado por meio do teste de fototoxicidade, seguindo o método validado no item 4.10, substituindo a substância referência (Óleo de Bergamota) por oito concentrações de LCC e seu solvente, sendo a concentração mais alta 100 µg/mL.

Os resultados obtidos foram compilados e analisados no programa Phototox[®].

5. RESULTADOS

5.1 Obtenção do Líquido da Castanha de Caju

5.1.1 Extração com solvente

As cascas foram submetidas à extração com solvente (FIG. 22). O extrato bruto obtido foi submetido à separação por evaporação, para eliminação do solvente. O LCC obtido por extração sem aquecimento é denominado **LCC-Natural**, e seu componente majoritário é o ácido anacárdico. Este apresentou coloração marrom acastanhado, odor forte e característico (FIG. 23).

Figura 22: Esquema representativo (A) e fotografia do Sistema Extrator Soxhlet (B), utilizado para a obtenção do LCC-Natural (ácido anacárdico).

Figura 23: Fotografia do Sistema de separação (A) do líquido bruto obtido da extração do LCC-Natural, utilizado para a evaporação do solvente (Etanol 95%). Fotografia do LCC-Natural (ácido anacárdico) obtido da trituração das castanhas (B).

5.1.2 Extração por aquecimento

Após o aquecimento obteve-se um óleo de odor forte e característico e coloração marrom-escuro a preto (FIG. 24), sendo denominado **LCC-Técnico**.

Figura 24: **LCC-Técnico** proveniente da queima de castanhas de caju dos estados de São Paulo e Ceará, tendo como componente majoritário o cardanol.

5.1.3 Cálculo do rendimento dos extratos do LCC

Média do rendimento do LCC, natural e técnico, para as castanhas de São Paulo e Ceará (TAB. 2).

Tabela 2: Dados da média dos rendimentos obtidos dos extratos de LCC, natural e técnico, das cascas das castanhas de SP e CE.

<i>Origem</i>	<i>Peso da castanha (casca bruta)</i>	<i>LCC-Natural peso líquido (g/castanha)</i>	<i>Rendimento (%)</i>	<i>Peso da castanha (casca bruta)</i>	<i>LCC-Técnico peso líquido (g/castanha)</i>	<i>Rendimento (%)</i>
São Paulo	2,50 g	0,42	17	2,68 g	0,72	27
Ceará	3,18 g	0,68	21	3,15 g	1,25	39

As castanhas do Ceará apresentaram maior rendimento dos que as castanhas provenientes do estado de São Paulo, em ambas as técnicas. Além disso, a técnica de extração por aquecimento, na qual se obtém o **LCC-Técnico**, apresentou maior rendimento quando comparado com a técnica de extração com solvente, na qual se obtém o **LCC-Natural**.

5.1.4 Cálculo da densidade dos extratos do LCC

Abaixo dados obtidos do cálculo da densidade do LCC, natural e técnico, apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Dados da pesagem de cada extrato de LCC, natural e técnico, efetuada por cinco vezes para obtenção da média.

Pesagem (vezes)	Amostras	
	LCC-Natural (g/mL)	LCC-Técnico (g/mL)
1	1,0014	1,0032
2	1,0004	0,9980
3	0,9899	0,9920
4	0,9964	1,0020
5	0,9986	0,9964
Σ média	0,9973	0,9984

$$p = 0,074157$$

Foi feita a análise estatística dos dados obtidos da densidade de cada amostra, pelo método ANOVA. Observando o resultado de p (variância), a diferença de densidade entre os extratos, **LCC-Natural** (ácido anacárdico) e **LCC-Técnico** (cardanol), pode-se observar que os mesmos não são estatisticamente diferentes.

5.2 Avaliação dos constituintes do LCC

Na figura 25 é possível observar a cromatografia do LCC obtido das castanhas de São Paulo e Ceará em comparação com o LCC industrial utilizado como “padrão”, proveniente da empresa Irmãos Fontenele S/A – Comércio, Indústria e Agricultura.

Figura 25: Cromatografia de camada fina (TLC), na qual 1 representa o controle (LCC industrial); 2 representa o LCC de São Paulo e 3 o LCC proveniente do Ceará. Sendo A, B e C, os constituintes das amostras testadas.

Na tabela 4 é possível observar o resultado do fator de retenção (R_f) de cada constituinte (A, B e C) das amostras testadas (1, 2 e 3).

Tabela 4: Dados do cálculo do fator de retenção dos constituintes das amostras de LCC testadas.

Rf dos constituintes	Amostras		
	1 (controle)	2 (LCC São Paulo)	3 (LCC Ceará)
A	0,33	0,33	0,33
B	0,52	0,52	0,52
C	0,74	0,74	0,74

5.3 Solubilidade do LCC

Sabendo-se que as resinas, como o LCC, geralmente são insolúveis em meio aquoso, os extratos de LCC obtidos foram inicialmente solubilizados em DMSO, em uma solução mãe de 1:50, para então testar sua dispersão nos meios de cultura que são utilizados nos experimentos. Na tabela 5 foi possível observar macroscopicamente que, utilizando-se DMSO como veículo solubilizante, o **LCC-Natural** (ácido anacárdico) e **LCC-Técnico** (cardanol) foram dispersos nos meios de cultura (D_{10} , K- e K+), não havendo formação de precipitado ou separação de fases nas diluições testadas, a saber, 1:100, 1:500 e 1:1000. A partir destes resultados o DMSO foi considerado um bom veículo para solubilizar o LCC, possibilitando prosseguir com os demais experimentos em cultura de células.

Tabela 5: Solubilidade do LCC-Técnico, LCC-Natural e extrato controle (óleo de girassol) em veículo DMSO, nos meios de cultura (D10, K+ e K-), nas proporções de 1:100, 1:500 e 1:1000, respectivamente.

Meio de Cultura	Controle	Extrato Controle	LCC-Técnico	LCC-Natural
D ₁₀
	N/A	(S) / (S) / (S)	(S) / (MS) / (MS)	(S) / (S) / (MS)
K ⁺
	N/A	(S) / (S) / (S)	(S) / (MS) / (MS)	(S) / (S) / (MS)
K ⁻
	N/A	(S) / (S) / (S)	(S) / (MS) / (MS)	(S) / (S) / (MS)

Legenda: N/A (não se aplica); S (solúvel); MS (muito solúvel).

5.4 Obtenção de células isoladas

As células obtidas da pele, por método enzimático, foram utilizadas em todos os experimentos. Estas foram congeladas, e à medida que os experimentos prosseguiam, eram descongeladas e colocadas em cultura para a realização dos mesmos. Foram isoladas células de quatro doadoras obtendo-se um rendimento médio de $17,3 \times 10^6$ células por biópsia (TAB. 6).

Tabela 6: Contagem de células realizadas nas quatro etapas de obtenção de células epidérmicas em cada uma das três etapas de coletas.

Doador nº	Coletas			
	1ª	2ª	3ª	Total de células
439	$0,2 \times 10^6$	$4,5 \times 10^6$	$12,2 \times 10^6$	$16,9 \times 10^6$
440	$0,3 \times 10^6$	$5,0 \times 10^6$	$12,6 \times 10^6$	$17,9 \times 10^6$
442	$0,2 \times 10^6$	$4,8 \times 10^6$	$12,1 \times 10^6$	$17,1 \times 10^6$
443	$0,1 \times 10^6$	$4,9 \times 10^6$	$12,3 \times 10^6$	$17,3 \times 10^6$

5.5 Confirmação da presença de melanócitos ativos em cocultura

Partindo-se do princípio de que queratinócitos e melanócitos podem ser cultivados em cocultura utilizando *feeder layer* ou somente a cocultura em alta densidade, propôs-se a validação da presença de melanócitos ativos em ambas coculturas utilizando-se L-DOPA como agente determinante, segundo método proposto por DE LUCA et al (1988). Na Figura 26, as setas destacam os melanócitos ativos.

Figura 26: Microfotografia das células: fibroblastos, queratinócitos e melanócitos. Na figura A pode-se observar o *feeder layer* em cultura antes do teste de reação de L-DOPA. Na figura B pode-se observar o mesmo após o teste de reação de L-DOPA. Nas figuras C e D pode-se observar a cocultura de melanócitos e queratinócitos, em baixa densidade (com *feeder layer*), antes e após o teste de reação de L-DOPA, respectivamente. Nas figuras E e F observa-se a cocultura de melanócitos e queratinócitos, em alta densidade (sem camada de sustentação), antes e após o teste de reação de L-DOPA, respectivamente.

Analisando a figura 26 observa-se que, embora a camada de sustentação melhore o desempenho de queratinócitos em cultura, mantendo-os

basais e não diferenciados, para o cultivo de melanócitos, a cocultura com queratinócitos é favorável, porém, principalmente quando em alta densidade.

5.6 Teste de Citotoxicidade

5.6.1 Citotoxicidade do LCC

Concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade das amostras de **LCC-Natural** (ácido anacárdico), **LCC-Técnico** (cardanol), óleo de girassol (controle negativo), DMSO (solvente LCC), hidroquinona (controle positivo) e água ultrapura (solvente hidroquinona) (TAB. 7).

Tabela 7: Especificação das concentrações utilizadas dos extratos de LCC; controles, positivo e negativo; e solventes.

Amostra	LCC-Técnico µg/mL	LCC-Natural µg/mL	Óleo de Girassol µg/mL	DMSO µg/mL	Hidroquinona mg/mL	Água ultrapura mg/mL
1	0,053	0,053	0,053	2,60	40,00	360,00
2	0,050	0,050	0,050	2,30	30,00	270,00
3	0,040	0,040	0,040	1,96	20,00	180,00
4	0,033	0,033	0,033	1,62	10,00	90,00
5	0,027	0,027	0,027	1,31	5,00	45,00
6	0,020	0,020	0,020	0,98	1,00	9,00
7	0,016	0,016	0,016	0,78	0,50	4,95
8	0,014	0,014	0,014	0,65	0,10	0,90
9	0,008	0,008	0,008	0,40	0,05	0,45
10	0,005	0,005	0,005	0,25	0,01	0,09

A figura 27 (A e B) evidencia a curva de citotoxicidade, comparando as amostras de ácido anacárdico, cardanol e óleo de girassol (controle), de 24 e 48 horas de contato, sendo as concentrações correspondentes do solvente (DMSO) consideradas como 100% para os cálculos da porcentagem de viabilidade celular. A figura 28 evidencia a curva de citotoxicidade da Hidroquinona em 24 e 48 horas de contato, sendo os volumes de água ultrapura correspondentes (solvente) considerados como 100% para o cálculo da viabilidade.

Figura 27: Gráficos criados com o programa Origin Pro[®] 7.0. A figura 27A evidencia as curvas das leituras obtidas do ensaio de citotoxicidade de 24 horas: ácido anacárdico (pontos em preto); cardanol (pontos em vermelho); óleo de girassol (pontos em verde); pontos em azul escuro e azul claro, valores de máximo e mínimo do desvio em relação ao controle, respectivamente. A figura 27B evidencia as curvas das leituras obtidas do ensaio de citotoxicidade de 48 horas: ácido anacárdico (pontos em preto); cardanol (pontos em vermelho); óleo de girassol (pontos em verde); pontos em azul escuro e azul claro, valores de máximo e mínimo do desvio em relação ao controle, respectivamente.

Analisando os gráficos da figura 27, é possível observar que o ácido anacárdico (**LCC-Natural**) apresenta perfil de menor toxicidade em relação ao cardanol (**LCC-Técnico**), apresentando uma faixa proliferativa até a concentração de 0,027 µg/mL. Sendo que em 48 horas de contato da amostra com as células, a toxicidade aumenta em ambos. Enquanto que, o controle negativo, óleo de girassol, manteve-se linear ao controle em 24 horas, apresentando aumento em sua proliferação quando em 48 horas de contato com as células.

Figura 28: Gráfico criado com o programa Origin Pro[®] 7.0, evidenciando as curvas das leituras obtidas do ensaio de citotoxicidade da Hidroquinona de 24h (pontos em preto) e 48h (pontos em vermelho).

A hidroquinona apresentou um índice de citotoxicidade (IC_{50}) de 7,5 mg/mL, como pode ser observado no gráfico (FIG. 28). No entanto, apresentou também uma aumento na viabilidade celular a partir de 20 mg/mL. Contudo, a faixa comumente aplicada em cosméticos (1 a 5 mg/mL), não apresentou citotoxicidade significativa em 24 e 48 horas.

5.6.2 Citotoxicidade do LCC em cultura de células humanizadas

As concentrações testadas dos extratos de LCC, natural e técnico, na cultura humanizada, foram as descritas na TAB. 7. A figura 29 evidencia o comportamento das amostras em cultura “padrão” e humanizada (24 e 48 horas). Resultados da IC_{50} , IC_{90} e concentração proliferativa, de ambas as culturas (TAB 8).

Figura 29: Gráficos criados pelo programa Origin Pro® 7.0. Na figura 29A, observa-se a citotoxicidade do ácido anacárdico e cardanol com 24 horas de contato, nas culturas “padrão” e humanizada. Na figura 29B, observa-se a citotoxicidade dos mesmos com 48 horas de contato, nas culturas, “padrão” e humanizada. Pontos em azul (cultura padrão – ácido anacárdico); pontos em rosa (cultura humanizada – ácido anacárdico); pontos em azul claro (cultura padrão - cardanol); pontos em laranja (cultura humanizada - cardanol).

Tabela 8: Descrição das concentrações de IC_{50} , IC_{90} e proliferativa, das amostras de LCC testadas nas culturas, “padrão e humanizada”.

Amostra	Cultura 24 h		Cultura 48 h	
	padrão	humanizada	padrão	humanizada
	(µg/mL)		(µg/mL)	
□ Proliferativa Ácido Anacárdico	0,016	0,016	0,008	0,007
□ Proliferativa Cardanol	0,016	0,016	0,008	0,007
IC ₉₀ Ácido Anacárdico	0,049	0,052	0,027	0,038
IC ₉₀ Cardanol	0,028	0,022	0,021	0,017
IC ₅₀ Ácido Anacárdico	0,052	>0,053	0,050	0,051
IC ₅₀ Cardanol	0,032	0,026	0,029	0,020

Analisando a figura 29 é possível observar que, tanto o ácido anacárdico, quanto o cardanol apresentaram perfil proliferativo quando em cultura de células humanizadas. Contudo, as concentrações tóxicas do ácido anacárdico mostraram-se mais tóxicas quando em cultura “padrão”, enquanto que as concentrações tóxicas do cardanol mostraram-se mais potencialmente tóxicas na cultura humanizada em relação à cultura “padrão”. Ambos, quando em 48 horas de contato com as células, tiveram seu perfil citotóxico aumentado nas duas condições. A tabela 8 evidencia bem a diferença observada, nos gráficos da figura 29, entre as culturas.

5.6.3 Citotoxicidade para comparação de técnicas de detecção de viabilidade celular

Primeiramente realizou-se o teste de citotoxicidade para a substituição de NR por solução de MTS/PMS (FIG. 30), no qual a substância referência utilizada foi o Óleo de Bergamota em oito diferentes concentrações, variando de 0,0203 a 0,1621 mg/mL.

Figura 30: Gráfico criado pelo programa Phototox[®], com as leituras da citotoxicidade do Óleo de Bergamota com NR (pontos em azul) e MTS (pontos em amarelo).

Observando-se os resultados obtidos (FIG. 30), é possível observar que não houve diferença significativa entre os corantes NR e MTS/PMS. Sendo o corante MTS escolhido para a realização dos testes, devido sua fácil manipulação.

5.7 Determinação da Inibição da Atividade Melanogênica do LCC

Na figura 31 é possível observar as células, queratinócitos e melanócitos em cocultura, após a reação de L-DOPA, em comparação com o controle de células, sem a adição de qualquer substância teste, e controle positivo, a hidroquinona, substância conhecida por inibir os melanócitos em cultura. As concentrações testadas dos extratos estão descritas na tabela 9.

Após Reação de L-DOPA	Concentração Proliferativa	Concentração IC 50
Ácido Anacárdico
Cardanol
Controle de células
Controle (Hidroquinona)

Figura 31: Fotomicrografia de células, queratinócitos e melanócitos, em cocultura tratadas com os extratos de LCC (natural e técnico) e Hidroquinona, após o teste de reação de L-DOPA.

Tabela 9: Descrição das concentrações testadas dos extratos e controle (hidroquinona) no teste de reação de L-DOPA.

Extratos	Concentrações	Descrição
Ácido Anacárdico	IC ₅₀ = 0,052 µg/mL [] Proliferativa = 0,016 µg/mL	Concentrações determinadas pelo programa Phototox [®] , sendo uma (IC ₅₀) suficiente para morte de 50% das células e a outra considerada proliferativa para as células.
Cardanol	IC ₅₀ = 0,032 µg/mL [] Proliferativa = 0,016 µg/mL	
Hidroquinona	5 mg/mL	Concentração aplicada em cosméticos.

Observando os resultados obtidos (FIG 31) pode-se concluir que o **LCC-Natural** atua sobre as células proliferando-as, especialmente os melanócitos. Enquanto que o **LCC-Técnico** nas mesmas condições, não apresentou tal efeito, porém, este quando na concentração de IC₅₀, pareceu estimular a proliferação de melanócitos, efeito este similar ao **LCC-Natural** nas mesmas condições.

Tal comportamento é também observado mediante a contagem de melanócitos que foi realizada por campo (TAB. 10), na qual se observa uma significativa diferença entre o **LCC-Natural** e o **LCC-Técnico**, em relação a quantidade de melanócitos. Também é possível verificar a eficácia da L-DOPA na visualização dos melanócitos ativos, que produzem melanina, pois se tornam mais evidentes por adquirirem coloração marrom escuro, facilitando assim a contagem dos mesmos na cocultura com queratinócitos.

Tabela 10: Comparativo entre a contagem de melanócitos por campo (aumento de 10x) antes e após o teste de reação de L-DOPA, em relação ao controle de células.

Amostras	Contagem de células em relação ao controle (%)	
	Antes da L-DOPA	Após a L-DOPA
LCC-Natural	24	35
LCC-Técnico	9	17

5.8 Construção de câmara para ensaio de Fototoxicidade

Esboço da câmara para ensaio de fototoxicidade desenvolvida de acordo com [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol* (FIG. 32). Fotografia da câmara evidenciando toda parte interna, externa e seus componentes (FIG. 33 e 34).

Figura 32: Esboço de câmara de fototoxicidade com área total de aproximadamente $0,153 \text{ m}^3$ e área de trabalho de 153.000 cm^2 .

Este esboço para a construção da câmara permitiu uma visualização de como a câmara deveria ser, seguindo as normas estabelecidas pelo guia para ensaio de fototoxicidade da [©]ECVAM, facilitando o desenvolvimento da mesma, por parte dos construtores.

Figura 33: Fotografia da câmara de fototoxicidade com a porta fechada antes da pintura (A) e com a porta fechada após a pintura (B).

Figura 34: Fotografia da câmara de fototoxicidade com a porta aberta antes da pintura (A) e com a porta aberta após a pintura (B), evidenciando o interior da câmara e seus componentes (C).

Na figura 33 e 34, a câmara em aço inox, antes e após a pintura. É possível observar, com a porta aberta, a área escura para citotoxicidade (controle UVA-, negativo), a plataforma na qual são colocadas as placas para exposição à luz UVA emitida pelas duas lâmpadas UVA, que se localizam na parte superior interna da câmara.

A intensidade da luz UVA da câmara foi medida e calibrada com Radiômetro equipado com sensor de UVA, com espectro de 320 a 400 nm (FIG. 35).

Figura 35: Gráfico representando o espectro de luz UV abrangido pelo medidor de luz ultravioleta, Radiômetro (Fonte: <http://www.rc.unesp.br>).

O equipamento utilizado para a calibração da radiância emitida pela luz UVA (FIG. 35), é o mesmo indicado pelos guias que padronizam a qualificação e a validação da câmara. Os resultados obtidos pelo equipamento mostraram que a dose de 5 J/cm^2 , foi atingida em 75 minutos de exposição, enquanto que os guias preconizam um tempo de 50 minutos para atingir a mesma dose.

5.9 Qualificação da Câmara e Validação do Método de Fototoxicidade

Para a validação do teste de fototoxicidade e qualificação do equipamento, o LSS (controle negativo), substância referência escolhida, e recomendada pelo guia OECD, foi utilizada, para este teste de fototoxicidade, em nove diferentes posições (FIG. 36), com oito diferentes concentrações entre 0,007 e 0,100 mg/mL. O Óleo de Bergamota (controle positivo) (FIG. 37) também foi utilizado nas mesmas oito diferentes concentrações do LSS, sendo exposta uma placa UVA+ e outra UVA-.

Figura 36: Gráfico criado pelo programa Phototox[®], com as leituras feitas da fototoxicidade do Lauril Sulfato de Sódio (LSS).

Na figura 36 analisa-se os resultados obtidos da exposição de 9 placas sob luz UV, tendo cada uma permanecido nestas condições até que a última atingisse 9 J/cm², sendo que uma placa permaneceu no escuro sob as mesmas condições, como controle negativo. As 9 placas expostas a luz tiveram seus resultados comparados com a placa de controle negativo e os valores do PIF (Fator de Foto Irritação) (vide item 4.9.1) do LSS oscilou entre 1 e 1,288, ou seja, substância não fototóxica, segundo a classificação do PIF, no guia OECD, estando esta dentro do estabelecido.

Na figura 37, é possível observar o gráfico obtido da leitura da absorbância da fototoxicidade do Óleo de Bergamota em fibroblastos (Balb/c 3T3).

Figura 37: Gráfico criado pelo programa Phototox[®], com as leituras feitas da fototoxicidade do Óleo de Bergamota.

O PIF obtido do Óleo de Bergamota foi igual a 2,475, ou seja, de acordo com o preconizado pelo guia OECD, esta substância possui provável fototoxicidade.

Tais resultados (FIG. 36 e FIG. 37) indicam, portanto, que a câmara pode ser considerada qualificada.

5.10 Validação de Método Adaptado de Fototoxicidade

Adaptação do teste de fototoxicidade, por meio de um teste de citotoxicidade, das células queratinócitos e melanócitos em cocultura, visto que o guia estabelece a utilização de células Balb/c 3T3 para a execução do teste. A substância referência foi o Óleo de Bergamota, em oito concentrações (5.9).

Figura 38: Gráfico criado pelo programa Phototox[®], com as leituras feitas da citotoxicidade da Bergamota em células Balb/c 3T3 (pontos em amarelo) e queratinócitos (pontos em azul).

Observando os resultados obtidos (FIG. 38) foi possível verificar que os queratinócitos também respondem ao teste, com diferentes concentrações de Óleo de Bergamota, assim como os fibroblastos. Sendo possível a adaptação do método para a utilização de queratinócitos para a realização do teste de fototoxicidade dos extratos de LCC (natural e técnico).

5.11 Fototoxicidade do LCC em queratinócitos humanos

Após adaptação do teste de fototoxicidade para utilização em queratinócitos e melanócitos em cocultura, o **LCC-Natural** e **LCC-Técnico** foram submetidos ao teste para identificação do potencial fototóxico dos mesmos. A hidroquinona, o Óleo de Bergamota e o DMSO (solvente) também foram testados. As concentrações avaliadas estão descritas na tabela 11.

Tabela 11: Concentrações das amostras submetidas ao teste de fototoxicidade.

Amostra nº	LCC-Natural (mg/mL)	LCC-Técnico (mg/mL)	Solvente DMSO (mg/mL)	Óleo de Bergamota (mg/mL)	Hidroquinona (mg/mL)
1	0,007	0,007	0,007	0,004	0,007
2	0,010	0,010	0,010	0,007	0,010
3	0,015	0,015	0,015	0,010	0,015
4	0,021	0,021	0,021	0,015	0,021
5	0,031	0,031	0,031	0,021	0,031
6	0,046	0,046	0,046	0,031	0,046
7	0,068	0,068	0,068	0,046	0,068
8	0,100	0,100	0,100	0,068	0,100

A figura 39 evidencia os resultados obtidos da fototoxicidade das amostras supracitadas.

Figura 39: Gráfico criado pelo programa Phototox[®], com as leituras feitas da fototoxicidade do LCC-Natural, LCC-Técnico, Óleo de Bergamota, DMSO e hidroquinona, em células queratinócitos e melanócitos em cocultura. Os pontos em amarelo referem-se ao controle positivo de cada amostra (UVA+), os pontos em azul referem-se ao controle negativo de cada amostra (UVA-).

Observando a figura 39 pode-se observar que apenas o Óleo de Bergamota apresentou toxicidade, com $PIF > 5$. O LCC (natural e técnico), seu solvente (DMSO) e a hidroquinona, não apresentaram perfil fototóxico, estando todas estas amostras com $PIF < 2$.

6. DISCUSSÃO

O Líquido da Castanha de Caju (LCC) possui diversos elementos em sua composição como ácido anacárdico, cardanol, cardol, 2-metilcardol e traços de material polimérico. Sendo os principais o ácido anacárdico e o cardanol. Tais componentes podem ser obtidos por diversas técnicas de extração como prensagem, aquecimento e a utilização de solventes (OLIVEIRA, 2007; KUMAR, 2002; TYMAN, 1978).

O LCC é um produto bastante cáustico. A ideia de testá-lo em cultura de células epidérmicas partiu, primeiramente, de observações feitas pelo próprio autor, que ao notar o contato direto do LCC com a pele humana, acidentalmente, observou uma mudança no aspecto da pele, sugerindo um efeito pigmentante num primeiro momento, e após, um efeito similar a um “peeling”, ocorrendo descamação da região afetada, com consequente efeito despigmentante, devido ação da própria descamação.

Os extratos obtidos do LCC, por meio das técnicas de extração com solvente, para obtenção do **LCC-Natural** (FIG. 23), que possui como componente majoritário o ácido anacárdico, e extração por aquecimento para obtenção do **LCC-Técnico** (FIG. 24), que possui como composto majoritário o cardanol, apresentaram características conforme as descritas na literatura, a saber:

- Coloração marrom claro, acastanhado para o **LCC-Natural**;
- Coloração marrom escuro a preto para o **LCC-Técnico**;
- Característica de resina líquida;
- Odor forte e característico para ambos, sendo este último observado pelo autor do trabalho.

A técnica de extração por aquecimento possibilitou maior rendimento do LCC (27 e 39%), quando comparada a técnica de extração com solvente (17 e 21,3%). Além disso, as castanhas provenientes do Estado do Ceará apresentaram maior rendimento (21,3 e 39%) quando comparada as castanhas do Estado de São Paulo (17 e 27%), em ambas as técnicas (TAB. 2). Apesar das castanhas do Ceará serem maiores (em torno a 25%), em relação às castanhas de São Paulo, a quantidade de LCC obtida com as castanhas do Ceará superou esta proporcionalidade (61,9% e 73,6%, para o LCC Natural e LCC Técnico,

respectivamente). Contudo, o LCC obtido de cada técnica foi suficiente para a execução de todos os experimentos em todas as repetições necessárias, obtendo-se densidade média de 0,997 (TAB. 3) (FRINGE, 1995).

Quanto à cromatografia em camada fina (TLC – Thin Layer Chromatography) foi possível verificar na figura 25 que não existem diferenças significativas entre os LCCs obtidos de São Paulo e Ceará, quando em comparação com o LCC industrial, comercialmente utilizado. A tabela 4 aponta os dados do fator de retenção (R_f) obtidos de cada componente presente no LCC das amostras testadas e controle, evidenciando a não existência de diferenças entre os compostos testados, reforçando o que foi visualizado na figura 25.

O LCC é uma resina não solúvel em meio aquoso (VIEIRA & BORTOLI, 2006). Esta característica dificulta a execução dos testes do mesmo em cultura de células.

Sendo assim, o próximo passo foram as dispersões dos **LCC-Natural** e **LCC-Técnico** no meio de cultura para o cultivo de fibroblastos, queratinócitos e melanócitos, sendo para isso necessário um veículo solubilizante. O veículo utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO), em razão de este ser indicado na literatura como solubilizante do LCC e também por não ser tóxico às células quando em concentrações menores que 1% (GUISSONI, 2011; TANNEBERGER et al., 2010). Com o LCC dissolvido em DMSO (solução mãe 1:50), foram testadas as dispersões 1:100, 1:500 e 1:1000, nos meios de cultura correspondentes a cada tipo celular, sendo possível estas diluições, sem precipitação do composto (TAB. 5).

No intuito de observar a ação do LCC *in vitro*, de maneira a reproduzir sua ação *in vivo*, foram utilizadas células epidérmicas com poucas passagens, obtidas a partir de fragmentos de pele humana de doadoras de mamoplastia redutora, por intermédio do Banco de Tecidos do ICHC-FMUSP.

A obtenção das células epidérmicas foi bem sucedida, sendo aplicada a técnica de extração por método enzimático (vide item 4.4.3), pois tal procedimento possibilita maior obtenção de queratinócitos e melanócitos, que são as células alvo deste trabalho, por estarem diretamente relacionadas à pigmentação da pele (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 2005). O rendimento médio foi de $173,4 \times 10^5$ células por fragmento (TAB. 6), sendo as mesmas congeladas e posteriormente

descongeladas na medida em que foi necessário para o desenvolvimento deste trabalho.

Os melanócitos são as células responsáveis pelo processo de pigmentação da pele, denominado de via melanogênica (KAMAMOTO et al., 2009; SIENNA, 2008; PEYREFITTE et al., 1998). Para o cultivo destas células o ambiente mais adequado é a cocultura com queratinócitos, visto que estes melhoram significativamente o tempo de duplicação dos melanócitos em cocultura, fornecendo fatores de crescimento (DE LUCA et al., 1988).

Para tanto, os melanócitos foram testados em cocultura com queratinócitos, em condições de alta densidade e baixa densidade (com a camada de sustentação) (MAAS-SZABOWSKI et al., 2002; PRIGNANO et al., 1999). Para melhor visualização dos mesmos foi testada a utilização de L-DOPA. A DOPA é precursor da melanina, participando ativamente da via melanogênica (KAMAMOTO et al., 2009; SIENNA, 2008; PEYREFITTE et al., 1998). Na cocultura foi utilizada como agente determinante da presença de melanócitos ativos, marcando-os por intensificação da cor.

Apesar de a literatura indicar que o ambiente mais adequado para o cultivo de queratinócitos é a cultura sobre camada de sustentação (DE LUCA et al., 1988). Os resultados obtidos da padronização do teste de reação de L-DOPA na cocultura de melanócitos e queratinócitos (FIG. 26), evidenciou, por meio de visualização microscópica, que a cocultura destas células em alta densidade, sem a camada de sustentação, foi a mais adequada para o intuito deste trabalho, pois possibilitou a obtenção de um maior número de melanócitos. Além disso, a L-DOPA facilitou a visualização específica dos melanócitos presentes na cocultura, tornando-os mais visíveis.

As coculturas em alta densidade, desde então, foram adotadas para a realização dos experimentos seguintes.

Sendo assim, por meio do teste de citotoxicidade, iniciaram-se os ensaios com os extratos de LCC (natural e técnico) em células, para identificação do perfil tóxico dos mesmos. O **LCC-Natural**, o **LCC-Técnico**, o óleo de girassol, a hidroquinona, e os solventes (DMSO e água ultrapura) foram testados em 10 concentrações diferentes (TAB. 7). A hidroquinona foi analisada como controle positivo, visto que esta é um conhecido inibidor da via melanogênica

(BANDYOPADHYAY, 2009; LEI et al., 2002), a mesma via estudada para a ação do LCC (vide item 2.1). O óleo de girassol foi testado como controle negativo, por se tratar de um composto com ácidos graxos insaturados na sua composição e cadeia com 18 carbonos (FONSECA & GUTIERREZ, 1974), semelhante ao LCC e não possuir ação conhecida sobre a pigmentação da pele. Os solventes de todas as amostras foram testados (DMSO e água ultrapura), sendo que, para o cálculo da viabilidade celular, para a curva de citotoxicidade, as suas absorbâncias foram consideradas como 100%, método *Carrier-Solvent*. Tal técnica possibilita a visualização do real comportamento da amostra em teste, excluindo qualquer interferência que possa existir no resultado, por parte do solvente, visto que, os valores se interpolam para realizar os cálculos (FRESHNEY, 2010; OECD, 2010; FRADE et al., 2006).

Analisando-se os resultados da curva de citotoxicidade (FIG. 27), observa-se que, o **LCC-Natural** (ácido anacárdico), apresentou-se menos tóxico às células ($IC_{50} = 0,052 \mu\text{g/mL}$) em relação ao **LCC-Técnico** ($IC_{50} = 0,032 \mu\text{g/mL}$), sendo mais proliferativo nas concentrações entre 0,005 e 0,040 $\mu\text{g/mL}$ (de 125 a 145%) em 24 horas de contato com as células. Enquanto que, em 48 horas de contato, seu perfil proliferativo reduziu para os valores de 100%, apresentando toxicidade a partir de 0,027 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50} = 0,050 \mu\text{g/mL}$). Quanto ao **LCC-Técnico** (cardanol) em concentrações de 0,005 a 0,020 $\mu\text{g/mL}$, não apresentou diferenças no perfil proliferativo, em relação ao seu controle (100%) em 24 horas (FIG. 27A), aumentando sua toxicidade a partir de 0,020 $\mu\text{g/mL}$ ($IC_{50} = 0,032 \mu\text{g/mL}$), após 48 horas de contato com as células (FIG. 27B). O óleo de girassol (controle negativo para o LCC), nas mesmas condições (de 24 e 48 horas), apresentou perfil linear semelhante ao controle, com atividade proliferativa em 48 horas, nas concentrações de 0,005 a 0,040 $\mu\text{g/mL}$, apresentando toxicidade a partir de 0,052 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo ocorreu com a hidroquinona (FIG 28), que manteve comportamento similar em ambas as condições (24 e 48 horas), sendo citotóxica em concentrações maiores que 7,5 mg/mL. No entanto, a partir de 20 mg/mL, ocorreu uma mudança no perfil de citotoxicidade da hidroquinona, apresentando aumento significativo na viabilidade celular, tal fato pode ser em decorrência do corante utilizado para os testes de citotoxicidade, o MTS, que interage com as células formando um componente denominado formazana. A formazana é um

subproduto da redução de MTS, por enzimas desidrogenase presentes nas células metabolicamente ativas, ou seja, células viáveis (PROMEGA, 2009). Sendo assim, células em apoptose estão em elevada atividade mitocondrial, assim como as células viáveis, o que poderia explicar esse aumento repentino na curva de citotoxicidade da hidroquinona. Outra explicação para este comportamento poderia ser a ocorrência de um fenômeno denominado hormese. No campo da biologia e medicina, o termo hormese é definido como uma resposta adaptativa de células ou organismos expostos a um estresse moderado, geralmente intermitente (CALABRESE et al., 2010; MATSSON, 2008; CALABRESE, 2004). Outro fato que pode ter ocorrido é a coloração da hidroquinona ter interferido nas leituras, visto que este é um componente de coloração muito forte, especialmente em concentrações mais altas, e de difícil remoção do poço, apenas com lavagem com solução salina. Apesar disso, o resultado obtido não foi considerado invalidado, pois foi possível avaliar a hidroquinona, nas concentrações de interesse deste estudo (aplicadas em cosméticos), que não apresentaram perfil citotóxico. Porém, para um estudo mais aprofundado do que poderia estar ocorrendo em altas concentrações, pode-se realizar outros métodos de citotoxicidade, como o método metabólico, que determina a apoptose celular por medição da resposta metabólica (por exemplo, DNA, RNA, atividade da desidrogenase) (FRESNEY, 2010). Ou outros que avaliam a viabilidade celular com substituição do corante MTS por outros com coloração diferente da substância teste, como: Azul de Tripiano, Eritrosina, Naftaleno Preto, Iodeto de Propídio, Vermelho Neutro, ou método de fluorescência (FRESHNEY, 2010; MALMONGE et al., 1999; CRUZ et al., 1998). Ou mesmo a realização de testes específicos para identificar a ocorrência de estresse celular, como: exposição a ozônio, exposição à radiação ultravioleta, submissão a estresse oxidativo e estresse energético (CALABRESE et al., 2010; MATTSON, 2008).

Estes resultados descritos, até o momento, foram obtidos utilizando as culturas de células “padrão ouro”, porém, estas culturas envolvem elementos xenobióticos (MANELLO et al., 2007; SUN et al., 2004). Assim sendo, propôs-se avaliar o comportamento citotóxico das amostras testadas, em ambiente mais próximo do que ocorreria *in vivo*, determinando a citotoxicidade em cultura de células humanizadas (ALTRAN, 2011; YOSHITO, 2011). Comparando os

resultados das curvas de citotoxicidade do **LCC-Natural** e **LCC-Técnico**, em 24 horas nas culturas de células, padrão e humanizadas (FIG. 29A), conclui-se que ambos os extratos, quando em cultura humanizada, tiveram seu perfil proliferativo aumentado, nas concentrações entre 0,005 e 0,05 µg/mL para o **LCC-Natural** e entre 0,005 e 0,02 µg/mL para o **LCC-Técnico**. Enquanto que em 48 horas de contato com as células (FIG. 29B), o **LCC-Técnico** apresentou-se mais tóxico na cultura humanizada, em relação à cultura padrão (IC_{50} = 0,020 e 0,029 µg/mL, respectivamente, TAB. 8). Ao passo que o **LCC-Natural** não teve sua toxicidade alterada na cultura humanizada após 48 horas de contato (IC_{50} =0,051 µg/mL). Com tais observações pode-se concluir que o **LCC-Técnico** pode ser mais agressivo quando *in vivo*. Já os resultados do **LCC-Natural**, indicam que este pode proporcionar ação menos agressiva *in vivo*.

Visto que o LCC (natural e técnico) pode ter ação sobre a pigmentação da pele, podendo futuramente se tornar princípio ativo em produtos cosméticos com esta finalidade. Testes de fototoxicidade foram necessários para identificar o potencial tóxico dessas substâncias, quando expostas à luz do sol (OECD, 2004). Para tanto, no intuito de otimizar o ensaio de fototoxicidade, procedeu-se com a padronização do método para utilização do corante MTS/PMS, ao invés de NR, como preconizado pelos guias, sendo realizado um teste de citotoxicidade testando os dois corantes nas mesmas condições (tipo celular e substância referência, Óleo de Bergamota). O resultado observado na figura 30 indicou que, quando realizado o ensaio em solução de MTS/PMS, a resposta apresentada foi semelhante à do NR, ou seja, eles não são iguais, porém respondem ao teste com o mesmo tipo de comportamento.

Para melhor visualização da ação do LCC (natural e técnico) nas concentrações com 50% de toxicidade (IC_{50}) e naquelas que indicaram atividade proliferativa, partiu-se para as culturas de células em placas com poços de maior área, possibilitando visualizar e registrar o comportamento dos extratos de LCC. As células, melanócitos e queratinócitos, cultivadas em alta densidade, após receberem tratamento com as amostras foram submetidas ao teste de reação de L-DOPA. As concentrações testadas foram (TAB. 9): IC_{50} e proliferativa, do **LCC-Natural** (0,052 e 0,016 µg/mL, respectivamente) e **LCC-Técnico** (0,032 e 0,016 µg/mL). A hidroquinona, na concentração de 5 mg/mL (aplicada em

cosméticos), também foi avaliada como controle positivo da reação, devido ao seu conhecido potencial inibidor da via melanogênica (BANDYOPADHYAY, 2009; LEI et al., 2002). As fotografias presentes na figura 31 apontam que o **LCC-Natural** (ácido anacárdico), na concentração proliferativa, estimulou visivelmente um aumento na população de melanócitos, em relação ao controle de células, diferentemente do **LCC-Técnico** (cardanol) na mesma condição. Os dados da contagem de melanócitos por campo, em aumento de 10x, antes e após o teste de reação de L-DOPA, apresentados na tabela 10, também indicam maior atividade proliferativa dos melanócitos por parte do **LCC-Natural**, em relação ao **LCC-Técnico**, quando comparados ao controle de células, tanto antes como após o teste de reação de L-DOPA. Estes dados também comprovaram a eficácia da L-DOPA na identificação de melanócitos ativos, por coloração. Estes resultados indicam que, o **LCC-Natural** possui efeito contrário ao esperado inicialmente, sendo provável pigmentante, ao invés de despigmentante cutâneo. Tal ação deve ser mais estudada e explorada, podendo o **LCC-Natural** se tornar base para um possível tratamento para hipocromias, como o vitiligo e outras (KAMAMOTO et al., 2009; GUERRA et al., 2000).

No entanto, quanto a IC_{50} , ambos apresentaram a mesma ação, porém, o cardanol pareceu ter estimulado a proliferação de melanócitos, em comparação com a concentração proliferativa do mesmo e com o controle de células. Diante disso, sugere-se que o cardanol possui ação mais tóxica para queratinócitos, e que células como melanócitos, mais resistentes, podem suportar os efeitos tóxicos do mesmo. Quanto à hidroquinona, sua ação foi inibitória da via melanogênica, como esperado.

Os tratamentos para hipocromias são raros e os poucos existentes são foto dependentes, ou seja, que sensibilizam a pele por ação da luz do sol (KAMAMOTO et al., 2009; GUERRA et al., 2000), portanto diante do comportamento apresentado pelas substâncias em estudo, optou-se por testar a fototoxicidade das mesmas. Porém para a execução deste, é importante a utilização de uma câmara específica (ECVAM, 2008; OECD, 2004).

Esta câmara foi desenhada (FIG. 32) e construída atendendo as normas descritas no guia [®]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol* (vide item 4.8). A câmara em estrutura de aço inox 3 mm (FIG. 33), conta com os acessórios necessários

para a execução do teste (FIG. 34). Sua calibração, realizada com radiômetro equipado com sensor UVA (HONLE AMERICA) (FIG. 35), mostrou que em 75 minutos de exposição da placa na luz UVA, consegue-se atingir 5 J/cm^2 , como padronizado pelos guias (ECVAM, 2008; OECD, 2004).

A qualificação da mesma foi realizada mediante teste de fototoxicidade, recomendado pelo guia OECD, o qual indica a utilização de uma das substâncias padronizadas pelo mesmo como referência negativa (substância não fototóxica) e outra como referência positiva (substância com provável fototoxicidade ou fototóxica) (ECVAM, 2008). O protocolo de fototoxicidade também indica a utilização de *Phosphate Buffered Saline* (PBS) contendo 0,1% (p/v) de Ca^{2+} e 0,13% (p/v) de Mg^{2+} (PBS+), pois estes sais iônicos presentes na solução tampão impedem que as células, durante a lavagem, se desprendam da superfície do poço, sendo empregado também, neste caso, quando as células permanecem fora da incubadora por um longo período de tempo (DULBECCO & VOGT, 1954). Sabendo-se que as células permanecem fora da incubadora de CO_2 por um período de aproximadamente 75 minutos, o protocolo também indica que após a irradiação das células, as mesmas devem retornar a incubadora (37°C , 5% CO_2), permanecendo nesta por um período de 18 a 22h, para então, serem submetidas ao teste de MTS, período este considerado suficiente para recuperação celular (ECVAM, 2008; OECD, 2004). Para a execução do teste de fototoxicidade, como substância referência negativa, foi escolhido o Lauril Sulfato de Sódio (LSS, $\text{PIF} \leq 2$), recomendado pelo guia OECD, aplicado em oito diferentes concentrações entre 0,007 e 0,100 mg/mL. A substância referência positiva escolhida foi o Óleo de Bergamota, devido ao fato de ser um óleo, servindo assim como controle para o LCC, e também por constar na literatura sua possível atividade fotossensível, sendo considerada uma substância com provável fototoxicidade (KANĎÁROVÁ, 2006). Os valores obtidos do PIF, fator de foto irritação (item 4.9.1), do Lauril Sulfato de Sódio (substância negativa), nas nove posições testadas, variaram de 1 a 1,288 (FIG. 36). Quanto ao Óleo de Bergamota (FIG. 37), o PIF atingido com as células Balb/c 3T3 foi 2,475, ou seja, substância com provável fototoxicidade. Estes resultados indicaram que a câmara está apta para a realização dos testes de fototoxicidade, em qualquer das posições.

Contudo, visto que todos os testes realizados com o LCC (natural e técnico) foram executados em melanócitos e queratinócitos, já que estes estão envolvidos na pigmentação da pele, e os guias ([©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol* e OECD TG – 432) para ensaio de fototoxicidade preconizam a utilização de fibroblastos, Balb/c 3T3, no intuito de mantermos os resultados coerentes ao mesmo tipo celular, foi realizada a adaptação do teste, com a utilização de queratinócitos e melanócitos em cocultura, ao invés da linhagem Balb/c 3T3 (4.10). Os resultados obtidos no teste de citotoxicidade (FIG 38) mostraram que os fibroblastos podem ser igualmente substituídos pelos queratinócitos e melanócitos em cocultura, pois a resposta a este teste nos dois tipos celulares foi semelhante, validando-se a adaptação do teste.

Os extratos de LCC (natural e técnico), o solvente (DMSO), a hidroquinona e o Óleo de Bergamota, foram avaliados em oito diferentes concentrações (TAB. 10), pelo teste de fototoxicidade, afim de, identificar se estes possuem ação citotóxica quando em presença de luz solar. A hidroquinona foi testada, pois foi utilizada como controle para o LCC em experimentos anteriores. Enquanto que, o Óleo de Bergamota foi testado como controle para o LCC, servindo de padrão para óleos fixos, e controle positivo para a fototoxicidade. O DMSO (solvente do LCC) foi avaliado, pois este deve estar presente em todos os testes, evitando que os resultados obtidos possam ser influenciados pela presença do mesmo. Os resultados da fototoxicidade (FIG 39) evidenciaram que nenhuma das amostras testadas, com exceção do Óleo de Bergamota, possui perfil citotóxico quando em presença de luz, pois todas apresentaram PIF entre 1 e 1,3, estando dentro dos valores considerados não fototóxicos (<2) pelo guia OECD (vide item 4.9.1). No entanto, o Óleo de Bergamota, que já havia se mostrado com provável fototoxicidade em fibroblastos Balb/c 3T3 (FIG. 37) (vide item 5.9), quando em contato com queratinócitos e melanócitos em cocultura, este apresentou um PIF de 5,352, ou seja, de acordo com o OECD, substância fototóxica. Sendo assim, pode-se entender que melanócitos e queratinócitos são mais sensíveis aos efeitos deletérios dos raios ultravioletas emitidos pelo sol, do que os fibroblastos, quando em contato com uma substância fototóxica. Este resultado também serve para reforçar a qualificação da câmara para estes testes, comprovando sua aptidão.

Sumarizando os resultados obtidos, observou-se que o **LCC-Natural** e **LCC-Técnico**, possui ação sobre as células, em especial melanócitos, proliferando-as. Tal efeito deve ser mais bem estudado e delineado, conhecendo-se melhor o mecanismo de ação e por qual via ocorre. Os resultados obtidos neste trabalho apontam que, o **LCC** pode ser uma potencial substância para tratamento de discromias, tanto por hiperpigmentação direta, quanto utilizando um processo de descamação inicial, dependendo da concentração aplicada e do tipo de extração para obtenção do mesmo.

A realização de novos testes se faz necessária, no entanto, os resultados alcançados neste trabalho, direcionam o caminho a ser seguido em etapas futuras.

7. CONCLUSÃO

Conclui-se que o **LCC-Natural** (ácido anacárdico) apresenta ação direta sobre os melanócitos proliferando-os nas concentrações entre 0,005 e 0,04 µg/mL, podendo possuir potencial ação como pigmentante da pele. Ao passo que o **LCC-Técnico** (cardanol) apresentou-se mais citotóxico às células, sendo proliferativo apenas nas concentrações entre 0,005 e 0,02 µg/mL, quando comparado com o **LCC-Natural**.

Conclusões das etapas que levaram a atingir os objetivos propostos:

- ✓ Foi possível obter quantidades suficientes de LCC por duas diferentes técnicas de extração, a saber: extração com solvente (LCC-Natural) e extração por aquecimento (LCC-Técnico), obtendo-se respectivamente os componentes majoritários, ácido anacárdico e cardanol;
- ✓ A avaliação do LCC de São Paulo e Ceará mediante técnica cromatográfica (TLC) em comparação com o LCC industrial, comercialmente utilizado, evidenciou que resultados obtidos foram os mesmos, tanto entre os LCCs obtidos de ambas as regiões, quanto o LCC controle, podendo qualquer deles ser utilizados nos teste *in vitro*, sem interferirem nos resultados;
- ✓ Os extratos foram dissolvidos em DMSO e dispersos em meio de cultura, de maneira a utilizar o solvente em concentração máxima de 0,2%;
- ✓ Os índices citotóxicos dos extratos, na cultura padrão, foram: $IC_{50,24h} = 0,052 \text{ µg/mL}$ e $IC_{50,48h} = 0,050 \text{ µg/mL}$, para o ácido anacárdico; $IC_{50,24h} = 0,032 \text{ µg/mL}$ e $IC_{50,48h} = 0,029 \text{ µg/mL}$, para o cardanol. Os resultados obtidos com as culturas padrão “ouro” podem ser utilizados para comparação com a literatura científica;
- ✓ Para as culturas humanizadas, os valores obtidos foram: $IC_{50,24h} > 0,053 \text{ µg/mL}$ e $IC_{50,48h} = 0,051 \text{ µg/mL}$, para o ácido anacárdico; $IC_{50,24h} = 0,026 \text{ µg/mL}$ e $IC_{50,48h} = 0,020 \text{ µg/mL}$, para o cardanol. Os resultados obtidos das culturas humanizadas, por estarem em condições mais próximas da pele humana, são considerados um melhor parâmetro para predizer o que pode ocorrer *in vivo*;
- ✓ O **LCC-Natural** teve ação contrária à da hidroquinona, estimulando a atividade proliferativa dos melanócitos, ao passo que o **LCC-Técnico** em

concentrações correspondentes à IC_{50} (0,032 $\mu\text{g/mL}$, por 24 horas de contato), teve uma ação tóxica para os queratinócitos, ao mesmo tempo em que, estimulou a proliferação dos melanócitos;

- ✓ Foi possível substituir o método de detecção preconizado pelos guias oficiais (*Neutral Red*) pela reação com MTS/PMS;
- ✓ A câmara, proposta para a realização do teste de fototoxicidade, foi desenvolvida atendendo as normas exigidas pelos guias [©]ECVAM DB-ALM: INVITTOX *protocol*, e OECD TG 432, sendo qualificada, validada e, portanto considerada apta para realização de testes de fototoxicidade;
- ✓ O método de fototoxicidade em fibroblastos Balb/c 3T3, foi adaptado à células epidérmicas, mantendo comportamento esperado conforme predito nos guias para ensaio de fototoxicidade. As amostras de **LCC-Natural**, **LCC-Técnico**, DMSO, hidroquinona, submetidas a este teste, não apresentaram fototoxicidade. Enquanto que o Óleo de Bergamota apresentou fototoxicidade, como era esperado.

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da (Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo FSP-USP)

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – COEP/FSP
Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

OF.COEP/184/10

21 de julho de 2010.

Prezada Pesquisadora e Orientadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo – COEP/FSP, **analisou**, de acordo com a Resolução n.º 196/96 do Conselho Nacional de Saúde – CNS e suas complementares, o protocolo de pesquisa n.º **2153**, intitulado **"UTILIZAÇÃO DE CO-CULTURA DE MELANÓCITOS E QUERATINÓCITOS PARA AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO LÍQUIDO DA CASTANHA DE CAJU (LCC) COMO AGENTE DESPIGMENTANTE"**, área temática **GRUPO I**, sob responsabilidade da pesquisadora **Bianca da Silva Sufi** e orientação da Doutora **Mônica Beatriz Mathor**, considerando que o projeto apresentado não se enquadra em pesquisa com seres humanos em saúde.

Cabe informar que a folha de rosto será estornada do Sistema Nacional de Ética em Pesquisa – SISNEP, bem como o Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (C.A.A.E.) gerado.

Atenciosamente,

Claudio Leone
Professor Titular
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FSP/USP

Ilm.ª Sr.ª
Dr.ª Mônica Beatriz Mathor
Centro de Tecnologia das Radiações - CTR
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN/CNEN-SP

Av. Dr. Arnaldo, 715 – Cerqueira César – CEP 01246-904 – São Paulo – SP
Contato: (55 11) 3061.7779 | CEP@FSP.USP.BR | WWW.FSP.USP.BR

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGOSTINI-COSTA, T.S.; JALES, K.A.; OLIVEIRA, M.E.B.; GARRUTI, D.S. Determinação espectrofotométrica de ácido anacárdico em amêndoas de castanha de caju. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 2005.
2. ALDÉN, A.; GONZALES, L.; PERSSON, A.; CHRISTENSSON, K.; HOLMQVIST, O.; OHLSON, S. Porcine platelet lysate as supplement for animal cell culture. **Cytotechnology**, v. 55, n. 1, p. 3-8, 2007.
3. ALTRAN, S.C. **Substituição dos componentes xenobióticos empregados no meio de cultura para manutenção de queratinócitos humanos, por similares de origem humana**. 2011. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo.
4. ATOMIC ENERGY OF CANADA LIMITED. **Instruction manual - Gammacell 220 – Cobalt 60 irradiation unit**. 6. ed. Ottawa: [s. n.], 1968.
5. AZEVEDO-FILHO, C.A.; **Construção de uma câmara de fotoestabilidade, estudo da fotodegradação da vitamina A e da ação antioxidante do polifosfato de sódio em misturas de nutrição parenteral**. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife, PE.
6. BANDYOPADHYAY, D. Topical Treatment of Melasma. **Indian Journal of Dermatology**, n. 04, v. 54, p. 303-309, 2009.
7. BULLOCK, A.J.; HIGHAM, M. C.; MACNEIL, S. Use of human fibroblasts in the development of a xenobiotic-free culture and delivery system for human keratinocytes. **Tissue Engineering**, v. 12, n. 2, p. 245-255, 2006.
8. CALABRESE, E.J.; MATTSON, M.P.; CALABRESE, V. Displays hormesis: occurrence and biomedical significance. **Belle Newsletter**, v. 16, n. 2, p. 1-65, 2010.
9. CALABRESE, E.J. Hormesis: a revolution in toxicology, risk assessment and medicine. **European Molecular Biology Organization**, v. 4, p. 1-4, 2004.
10. CNEN – Comissão nacional de Energia nuclear. **Radioatividade**. Disponível em: <[http://www. Cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf](http://www.Cnen.gov.br/ensino/apostilas/radio.pdf)>. Acesso em: 20 out. 2010.
11. COORPORATION BLOOMFIELD, N.J., A COORPORATION OF NEW JERSEY. E. Schwenk, Montclair, E.E. Henderson, N.J. Montville. **Hydroquinone Composition**. US Pat. 2376884. 29 mai. 1945.

12. COSTA, T.S.A.; JALES, K.A.; GARRUTI, D.S.; PADILHA, V.A.; LIMA, J.B.; AGUIAR, M.J.; PAIVA, J.R. Teores de ácido anacárdico em pedúnculos de cajueiro *Anacardium microcarpum* e em oito clones de *Anacardium occidentale varnanum* disponíveis no Nordeste do Brasil. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, v. 34, n. 04, p. 1075-1080, 2004.
13. CRUZ, A.S; FIGUEIREDO, C.A.; IKEDA, T.I.; VASCONCELOS, A.C.E.; CARDOSO, J.B.; SALLES-GOMES, L.F. Comparação de métodos para testar a citotoxicidade “in vitro” de materiais biocompatíveis. **Revista de Saúde Pública**, v. 32, n. 2, p. 153-159, 1998.
14. CUNHA, E.M. **Caracterização preliminar dos produtores de caju beneficiados pelo projeto Cajusol em Serra do Mel – RN**. 2011. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação). Universidade Federal Rural do Semiárido, Angicos, RN.
15. DAHLAN, K.Z.M. Radiation Sciences. In: PHILIPS, G.O.; NATHER, A. **Advances in tissue banking v. 5 The Scientific basis of Tissues Transplantation** World Scientific, 2001.
16. DE LUCA, M.; D’ANNA, F.; BONDANZA, S.; FRANZI, A.T.; CANCEDDA, R. Human epithelial cells induced human melanocytes growth *in vitro* but only skin keratinocytes regulates its proper differentiation in the absence of dermis. **Journal of Cell Biology**, v. 107, p. 1919-1926, 1988.
17. DE LUCA, M.; ALABANESE, E.; CANCEDDA, R.; VIACAVA, A.; FAGGIONI, A.; ZAMBRUNO, G.; GIANNETTI, A. Treatment of leg ulcers with cryopreserved allogenic cultured epithelium. **Archives of Dermatology**, v. 128, n. 5, p. 633-638, 1992.
18. DIFFEY, B.L.; LARKO, O. Solar ultraviolet radiation effects on biological systems. **Physics in Medicine and Biology**, v.36, n. 3, p. 299-328, 1990.
19. DULBECCO, R.; VOGT, M. Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. **Journal of Experimental Medicine**, v. 99, p. 167-182, 1954.
20. EAGLE, H. Amino Acid metabolism in mammalian cell cultures. **Science**, v. 130, n. 5, p. 432-437, 1977.
21. ©ECVAM DB-ALM: *INVITTOX* protocol: 3T3 NRU Phototoxicity Assay. **INVITTOX** n. 78, p. 5-18, 2008.
22. FLAKNER, E.; APPL, H.; EDER, C.; LOSERT, U.M.; SCHÖFFL, H.; PFALLER, W. Serum free cell culture: the free access on line database. **Toxicology in Vitro**, v. 20, p. 395-400, 2006.
23. FONSECA, H.; GUTIERREZ, L.E. Composição em ácidos graxos de óleos vegetais e gorduras animais. **Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**, v. 31, p. 485-490, 1974.

24. FRADE, R.F.M.; MATIAS, A.; BRANCO, L.C.; AFONSO, C.A.M.; DUARTE, C.M.M. Effect of ionic liquids on human colon carcinoma HT-29 and CaCo-2 cell lines. **Green Chemistry**, v. 9, p.873-877, 2007.
25. FRESHNEY, R.I. **Culture of Animal Cells**. 6.ed. New Jersey, NJ.: Wiley-Blackwell, 2010.
26. FRINGE, V. **Extração dos fenóis do bálsamo de caju**. 1995. Dissertação (Mestrado). Departamento de Química da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
27. GANDHI, T.; PATEL, M.; DHOLAKYIA, B.K. Studies on effect of various solvents on extraction of cashew nut shell liquid (CNSL) and isolation of major phenolic constituents from extracted CNSL. **Journal of Natural Product and Plant Resource**, v. 2, p. 135-142, 2012.
28. GARLE, M.J.; FENTEM, J.H.; FRY, J.R. *In vitro* cytotoxicity tests for the prediction of acute toxicity *in vivo*. **Toxicology In Vitro**, v. 8, n. 6, p. 1303-1312, 1994.
29. GRAHAM-EVANS, B.; COHLY, H.H.P.; YU, H.; TCHOUNWOU, P.B. Arsenic-induced genotoxic and cytotoxic effects in human keratinocytes, melanocytes and dendritic cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 1, n. 2, p. 83-89, 2004.
30. GREATENS, A. Effective inhibition of melanosome transfer to keratinocytes by lectins and niacinamide is reversible. **Rev. Exp. Dermat.**, v. 14, 2005.
31. GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Cell Biology**, v. 76, n. 11, p. 5665-5668, 1979.
32. GUERRA, L.; CAPURRO, S.; FRANCESCO, M.; PRIMAVERA, G.; BONDANZA, S.; CANCEDDA, R.; LUCI, A.; DE LUCA, M.; PELLEGRINI, G. Treatment of “stable” vitiligo by timed surgery and transplantation of cultured epidermal autografts. **Archives of Dermatology**, v. 136, p. 1381-1389, 2000.
33. HALPERN, M.J. Fisiopatologia da pele. **Biblioteca Virtual – Fisiopatologia**, 2010. Disponível em: <http://www.webbiblioteca.com/index>. Acesso em: 30 set. 2012.
34. HARRIS, M.I.N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 3.ed. São Paulo, SP.: Senac, 2009.
35. HAWLEY-NELSON, P.; SULLIVAN, J.E.; KUNG, M.B.S.; HENNINGS, H.; YUSPA, S.H. Optimized conditions for the growth of human epidermal cells in culture. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 75, p. 176-182, 1980.

36. HERSON, M.R. ***Estudo da composição in vitro de substituto cutâneo dermo-epidérmico constituído por epitélio de queratinócitos cultivados sobre base dérmica alógena***. 1999. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo.
37. INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. ***Gamma irradiators for irradiations processing***. Viena, Austria, 2005.
38. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. ***Biologia Celular e Molecular***. 6.ed. Rio de Janeiro, RJ.:Guanabara Koogan, 2002.
39. JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. ***Histologia Básica***. 10.ed. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan, 2005.
40. KAMAMOTO, F.; HERSON, M.; FERREIRA, M.C.; Tratamento de cicatrizes hipocrômicas pós-queimaduras com transplante de melanócitos cultivados *in vitro*. ***Revista Brasileira de Cirurgia Plástica***, v. 24, n. 1, p. 82-90, 2009.
41. KANĎÁROVÁ, H. ***Evaluation and validation of reconstructed human skin models as alternatives to animal tests in regulatory toxicology***. 2006. Tese (Doutorado). Department of Biology, Chemistry and Pharmacy of Freie Universität Berlin, Berlin.
42. KHAN, B.A.; AKHTAR, N.; RASUL, A.; KHAN, H. MURTAZA, G.; ALI, A.; KHAN, K.A.; ZAMAN, S.; JAMEEL, A.; WASEEM, K.; MAHMOOD, T. Human skin, aging and antioxidants. ***Journal of Medicinal Plants Research***, v. 6, p. 1-6, 2012.
43. KIERSZENBAUM, A.L.; TRES, L.L. ***Histologia e Biologia Celular: uma introdução à patologia***. 3.ed. Elsevier, 2012.
44. KLINGBEIL, M.F.G.; ***Comparação de dois métodos de obtenção celular para cultura primária de queratinócitos bucais humanos***. 2006. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo.
45. KRAUSE, K.I. ***Neuropeptide und Lipide der Haut***. 2010. Dissertação (Mestrado). Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin.
46. KUHN, H.J.; BRASLAVSKY, S.E.; SCHIMIDT, R. ***Chemical actinometry***. *Pure Appl Chem.*, v. 76, n. 12, p. 2105 – 2146, 2004.
47. KUMAR, P.P.; Paramashivappa, P.J.;Vithayathil, P.J., Subra Rao, P.V.;Srinivasa Rao A. (2002) Process for isolation of cardanol from technical cashew (*Anacardium occidentale*.) nut shell liquid. ***Journal of Agriculture and Food Chemistry***, 50, 4705-4708.
48. LEI, T.C.; VIRADOR, V.M.; VIEIRA, W.D.; HEARING, V.J. A Melanocyte–Keratinocyte Coculture Model to Assess Regulators of Pigmentation *in Vitro*. ***Analytical Biochemistry***, v. 305, p.260-268, 2002.

49. LOGRADO, L.P.L.; SANTOS, C.O.; ROMEIRO, L.A.S.; COSTA, A.M.; FERREIRA, R.O.; CAVALCANTI, B.C.; MORAES, O.M.; COSTA-LATUFO, L.V.; PESSOA, C.; SANTOS, M.L. Synthesis and cytotoxicity screening of substituted isobenzofuranones designed from anacardic acids. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 3480-3489, 2010.
50. LUCENA, V.M.X.; **Diversidade genética entre genótipos de cajueiro (*Anacardium Occidentale L.*) e qualidade do fruto e pseudofruto**. 2006. Dissertação (Mestrado) – Faculdade Federal de Roraima, Boa Vista.
51. MAAS-SZABOWSKI, N.; STARK, H.J.; FUSENIG, N.E. Cell interaction and epithelial differentiation. In: FRESHNEY, R.I. **Culture of epithelial cells**. New York: Wiley-liss, 2002. Cap. 2. p. 31-63.
52. MAHMOUD, A.M.M. **Radioimmunoassay and radiochemical procedure for determination of cutaneous uptake and metabolism of sex steroid hormones**. 2005. Tese (Doutorado). Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freie Universität Berlin, Berlin.
53. MALMONGE, S.M.; ZAVAGLIA, C.A.C; SANTOS JR, A.R.; WADA, M.L.F. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de polihema: um estudo *in vitro*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, 1999.
54. MANGUE, J.R. **Controlo químico e biológico de oídio de cajueiro (*Oidium anacardii* Noach)**. 2001. Tese (Doutorado). Faculdade de Agronomia e Engenharia Florestal da Universidade Eduardo Mondlane, Maputo.
55. MANNELLO, F.; TONTI, G.A. No breakthroughs for human mesenchymal and embryonic stem cell culture: conditioned medium, feeder layer or feeder-free; medium with fetal calf serum, human serum or enriched plasma; serum-free, serum replacement non-conditioned medium or ad-hoc formula? All that glitters is not gold! **Stem Cells**, v. 25, n. 7, p. 1603-1609, 2007.
56. MATTSON, M.P. Hormesis defined. **National Institute of Health**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008.
57. MENDONÇA, V. MEDEIROS, L.F. Culturas do cajueiro, do coqueiro e mamoeiro. **Boletim Técnico UFERSA**, v. 3, p. 1-81, 2011.
58. NICOLETTI, M. Hiperpigmentações: aspectos gerais e uso de despigmentantes cutâneos. **Revista Cosmetics & Toiletries**, v. 14, 2002.
59. OECD. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. **OECD/OCDE**, n. 129, 2010.
60. OECD. *In vitro* 3T3 NRU phototoxicity test. Guideline for testing of chemicals. **OECD/OCDE**, n. 432, 2004.

61. OLIVEIRA, L.D.M. ***Síntese, caracterização e funcionalidade de aditivos de lubricidade, derivados do LCC***. 2007. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.
62. PARKINSON, E.K.; YEUDALL, W.A. The epidermis. In: FRESHNEY, R.I. ***Culture of epithelial cells***. New York, NY.: Wiley-Liss, 2002. Cap. 3. p. 65-94.
63. PEISER, M. ***Stimulation Von isolierten Langerhans-Zellen aus der humanen epidermis mit T-Zellen und Gefahren-Signalen***. 2005. Tese (Doutorado). Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin, Berlin.
64. PEYREFITTE, G. Biologia da pele. In: PEYREFITE, G.; MARTINI, M.C.; CHIVOT, M. ***Cosmetologia, biologia geral e biologia da pele***. São Paulo: Andrei, 1998. Parte 3. p. 329-478.
65. PRIGNANO, F.; DOMENICI, L.; GERLINI, G.; PIMPINELLI, N.; ROMAGNOLI, R. Human keratinocytes cultured a feeder layer undergo progressive loss of differentiation markers. ***Histology and Histopathology***, v. 14, p. 797-803, 1999.
66. PROMEGA. CellTiter 96® AQueous Non-Radiative Cell Proliferation Assay. ***Promega®***, p. 1-16, 2009.
67. PUCK, T.T.; MARCUS, P.I. A rapid method for viable cell titration and clone production with HeLa cells in tissue culture: the use of x-irradiated cells to supply conditioning factors. ***Biochemistry***, v. 41, p. 432-437, 1955.
68. RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Formation of keratinizing epithelium in culture by a cloned cell line derived from teratoma. ***Cell***, v. 6, n. 3, p. 317-330, 1975a.
69. RHEINWALD, J.G.; GREEN, H. Serial cultivation of human epidermal keratinizing colonies from single cells. ***Cell***, v. 6, n. 3, p. 331-334, 1975b.
70. SCHULZ, M. ***Absorption properties of Crospovidone and use of Crospovidone in drug-in-adhesive patches***. 2009. Dissertação (Mestrado). Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin, Berlin.
71. SHIRAKATA, Y. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. ***Journal of Dermatological Science***, v. 59, p. 73-80, 2010.
72. SIENNA, C. ***Efeitos do extrato das cascas de Rauwolfia sellowii Müll Arg. E suas frações sobre a viabilidade e a melanogênese em células de melanoma murino B16F10***. 2008. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

73. SILVA, M.C.D.; CONCEIÇÃO, M.M.; FERNANDES Jr., V.J.; SANTOS, I.M.G.; SOUZA, A.G. Avaliação do efeito antioxidante do LCC em óleo e biodiesel de mamona. **Revista Biodiesel**, p. 192-194, 2006.
74. SOUZA, S.R.P.; FISCHER, F.M.; SOUZA, J.M.P. Bronzeamento e risco de melanoma cutâneo: resvisão da literature. **Revista Saúde Pública**, v. 38, p. 588-598, 2004.
75. STOKER, M.G.P.; SUSSMAN, M. Studies on the action of feeder layers in cell culture. **Experimental Cell Research**, v. 38, p. 645-653, 1965.
76. SUN, T.; HIGHAM, M.; LAYTON, C.; HAYCOCK, J.; SHORT, R.; MACNEIL, S. Developments in xenobiotic-free culture of human keratinocytes for clinical use. **Wound Repair Regen.**, v.12, n. 6, p. 626-634, 2004.
77. SUNG, B.; PANDEY, M.K.; AHN, K.S.; YI, T.; CHATURVEDI, M.M.; LIU, M.; AGGARVAL, B.B. Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), na inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kB α kinase, leading to potentiation of apoptosis. **Blood Journal**, v. 111, p. 4879-4891, 2008.
78. TYMAN, J.H.P. Quantitative analysis of the phenolic composition of natural Cashew Nut Shell Liquid (*Anacardium occidentale*) by thin-layer chromatography, densitometry and ultraviolet spectrophotometry. **Journal of Chromatography**, p. 159-172, 1978.
79. UNITED STATES NUCLEAR REGULATORY COMMISSION (USNRC). **Technical Training Center: Biological Effects of Radiation**. 2012.
80. VALK, J. V.; BRUNNER, D.; SMET, K.; SVENNINGSSEN, F.A.; HONEGGER, P.; KNUDSEN, L.E.; LINDL, T.; NORABERG, J.; PRICE, A.; SCARINO, M.L.; GSTRAUNTHALER, G. Optimization of chemically defined cell culture media – Replacing fetal bovine serum in mammalian *in vitro* methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, p. 1053-1063, 2010.
81. VAQUERO, J.M. Historical sunspots observations: a review. **Advances in Space Research**, v. 40, n. 7, p. 929-941, 2007.
82. VELASCO, M.V.R.; RIBEIRO, M.E.; BENDIN, V.; OKUBO, F.R.; STEINER, D. Rejuvenescimento da pele por “peeling” químico: enfoque no “peeling” de fenol. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n.1, p. 71-79, 2004.
83. VIEIRA, L.; BORTOLI, S. A. Efeito do óleo de castanha de caju incorporado na dieta artificial de *Anticarsia gemmatilis* Hübner, 1818 (Lepidoptera: Noctuidae). **Livro de Resumos e Programa Oficial**. Piracicaba: Sociedade Entomológica do Brasil, 2003.

84. WASSERMAN, D.; Dawson, C. R. Cashew nut shell liquid: Comparison of the monophenol isolated from Commercial Raw Cashew Nut Shell Liquid and from Commercial Cardanol. ***Industrial and Engineering Chemistry***, v. 37, n. 4, p. 396-399, 1945.
85. WATANABE, Y.; SUZUKI, R.; KOIKE, S.; NAGASHIMA, K.; MOCHIZUKI, M.; FORSTER, R.J.; KOBAYASHI Y. *In vitro* evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and proprionate-enhacing agent for ruminants. ***American Dairy Science Association***, v.93, p. 5258-5267, 2010.
86. YOSHITO, D. ***Cultivo e irradiação de fibroblastos humanos em meio enriquecido com lisado de plaquetas para obtenção de camada de sustentação em cultura de células da epiderme***. 2011. Dissertação (Mestrado). Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, São Paulo.