

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

PALOMA DE JESUS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS B16F10 E
CCD1059SK E DO EFEITO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DO EXTRATO
DE UM FUNGO ENDOFÍTICO.**

BRASÍLIA

2018

PALOMA DE JESUS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS B16F10 E
CCD1059SK E DO EFEITO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DO EXTRATO
DE UM FUNGO ENDOFÍTICO.**

**Trabalho apresentado ao curso de graduação em
Farmácia da Universidade de Brasília, como
requisito parcial para aprovação na disciplina de
Trabalho de Conclusão de Curso.**

**Orientadora: Prof. Dra. Maria de Fátima Borin
Co-orientadora: Michelly de Oliveira Ribeiro**

BRASÍLIA

2018

PALOMA DE JESUS ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO EM CÉLULAS B16F10 E
CCD1059SK E DO EFEITO NA ATIVIDADE DA TIROSINASE DO EXTRATO
DE UM FUNGO ENDOFÍTICO.**

**Trabalho apresentado ao curso de graduação em Farmácia da Universidade de
Brasília, como requisito parcial para aprovação na disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso.**

Brasília, 30 de novembro de 2018

Banca Examinadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Borin (Universidade de Brasília)

Dr. Pedro Góes Mesquita (SABIN – Medicina Diagnóstica)

Dedico esse trabalho ao meu querido pai
Derival (*in memoriam*) que durante toda
sua vida nos ensinou que o caminho dos
estudos sempre será a melhor escolha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ser meu grande guia.

Agradeço ao meu pai, pois sei que continua cuidando de mim.

Nesse momento, quero agradecer não apenas ao apoio durante o desenvolvimento desse trabalho, mas também ao apoio recebido durante esses cinco anos de graduação que se encerram. Gratidão à minha família e em especial à minha amada Mãe, que é minha incentivadora número um, à minha irmã Lucila, que é um pedaço de mim e minha cúmplice de vida. Aos meus irmãos maravilhosos, Breno e Vítório, que foram meus principais companheiros nos finais de semana de experimentos no Farmol. Agradeço também ao meu namorado Higor Henrique, que tanto me apoiou em todos os desafios durante essa caminhada e à minha sogra Mosary, por todo o carinho. Agradeço ainda à minha terapeuta Andrea, que nunca me deixa desistir dos meus sonhos.

Agradeço à minha Professora Fátima Borin, por todos os ensinamentos científicos passados com tanto carinho e acolhimento. Agradeço à minha co-orientadora Michelly, que me recebeu de braços abertos para me orientar nesse trabalho e que me fez ganhar não apenas experiência, mas uma amizade. Agradeço aos demais integrantes do grupo de pesquisa: Daniela, Laíza, Palloma, Rafael e Manuel que sempre estiveram dispostos e me ajudaram muito.

Gostaria de registrar também minha gratidão por toda a família Farmol, que me recebeu durante quatro anos e meio dos meus cinco anos de graduação. Não há palavras para descrever a experiência e bagagem de pesquisa e de vida que acumulei durante esses anos. Obrigada ao Grupo de Pesquisa Cromatina do professor Guilherme Martins por ter aberto a porta da pesquisa científica para mim. Agradecimento especial à Isabel e à Mariella por serem exemplos de pessoa e de profissionais que tenho até hoje.

Não posso deixar de citar meus amigos e companheiros queridos que a farmácia me deu de presente: Ana, Anna, André, Cibele, Cibelle, Leonardo, Lucas, Luiz, Malu, Taís e Vavá. Eu tenho os melhores amigos do Universo.

Agradeço ainda à Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAPDF), ao Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovação e Comunicações (MCTIC), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro a este projeto.

RESUMO

A melanina é principal responsável em humanos pela pigmentação dos cabelos, olhos e pele, sendo produzida pelos melanócitos através da melanogênese, num processo catalisado pela tirosinase e outras proteínas relacionadas à tirosinase. O vitiligo é uma doença autoimune que se caracteriza pela perda de pigmentação da pele e o estresse oxidativo parece desempenhar um papel importante na patogênese da doença. O objetivo deste projeto foi avaliar a citotoxicidade e o efeito na atividade da tirosinase do extrato de um fungo endofítico isolado de folhas de *Bauhinia variegata*, com atividade antioxidante já descrita, com o intuito de verificar sua possível utilização no tratamento do vitiligo. Para isso, o efeito do extrato na atividade da tirosinase foi avaliado *in vitro*. O extrato do fungo diminuiu a atividade da tirosinase em cerca de 70% em relação ao controle. Para o ensaio de citotoxicidade, células da linhagem B16F10 (melanoma de camundongo) e CCD-1059Sk (fibroblastos humanos) foram cultivadas e tratadas com diferentes concentrações do extrato e expostas ou não à radiação UVA (5 J/cm²). O extrato não foi citotóxico para as células B16F10, porém foi citotóxico quando o tratamento com o extrato foi associado à exposição das células à radiação UVA. Em células CCD-1059Sk, o tratamento com o extrato também não foi citotóxico, mas neste caso houve proliferação celular quando o tratamento das células com o extrato foi associado à exposição das células à radiação UVA. A avaliação da produção de melanina e da atividade da tirosinase nas células B16F10 tratadas com o extrato nas concentrações de 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL mostraram que não houve um aumento significativo na produção de melanina ou na atividade da tirosinase celular. Portanto, os resultados obtidos demonstraram que nas concentrações testadas, o extrato do fungo BvFVII não conseguiu induzir a produção de melanina em células B16F10, e promoveu uma diminuição na atividade da tirosinase de cogumelo, usada no ensaio *in vitro*. Concentrações mais altas do extrato serão testadas futuramente.

Palavras-chaves: BvFVII; Melanócito; Fibroblasto; Melanina e Vitiligo.

ABSTRACT

Melanin, the compound primarily responsible in humans for hair, eye and skin pigmentation, is produced by melanocytes through a process called melanogenesis that is catalyzed by tyrosinase and other tyrosinase-related proteins. Vitiligo is an autoimmune disease characterized by a loss of skin pigmentation and oxidative stress seems to be significantly related in the pathogenesis of disease. The objective of this project was to evaluate the cytotoxicity and the effect on the tyrosinase activity of the extract of an endophytic fungus isolated from leaves of *Bauhinia variegata* leaves, which antioxidant activity was already described, in order to verify its possible use in treatment of vitiligo. For this, the effect of extract on tyrosinase activity was evaluated *in vitro*. Fungus extract decreases tyrosinase activity by around 70% when compared to the control. For the cytotoxicity trial, cells from the B16F10 (murine melanoma) and CCD-1059Sk (human fibroblasts) were cultured and treated with different concentrations of the extract and exposed to UVA (5J / cm²) radiation. The extract was not cytotoxic to B16F10 cells, but was cytotoxic when was associated with exposure of the cells to UVA radiation. In CCD-1059Sk cells, the treatment with the extract was not cytotoxic, but in this case there was cell proliferation when cells with the extract treatment was associated with the exposure of the cells to the UVA radiation. The evaluation of melanin production and tyrosinase activity in B16F10 cells treated with the extract at the concentrations of 3.12 µg / mL and 12.5 µg / mL showed that there was no significant increase in melanin production or tyrosinase cellular activity. Therefore, the results obtained demonstrated that the BvFVII fungus extract failed to induce melanin production in B16F10 cells at the concentrations tested, and promoted a decrease in the activity of the mushroom tyrosinase, used in the *in vitro* assay. Higher concentrations of the extract will be tested in the future.

Keywords: BvFVII; Melanocytes; Fibroblast; Melanin and Vitiligo.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Esquema de uma das vias da melanogênese que ocorre no melanossoma..... | 04 |
| Figura 2. Teste de Viabilidade celular sem UVA em células B16F10 | 15 |
| Figura 3. Teste de viabilidade celular com UVA em células B16F10 | 16 |
| Figura 4. Teste de viabilidade celular sem UVA em células CCD- 1059Sk..... | 17 |
| Figura 5. Teste de viabilidade celular com UVA em células CCD- 1059Sk. | 17 |
| Figura 6. Avaliação da atividade da tirosinase na presença do extrato do fungo endofítico | 18 |
| Figura 7. Avaliação da atividade de tirosinase das células tratadas com extrato do fungo endofítico | 19 |
| Figura 8. Avaliação da atividade de tirosinase das células tratadas com extrato do fungo endofítico e irradiadas com UVA. | 19 |
| Figura 9. Avaliação da produção de melanina nas células tratadas com extrato do fungo endofítico. | 20 |
| Figura 10. Avaliação da produção de melanina nas células tratadas com extrato do fungo endofítico com UVA. | 21 |
| Figura 11. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas células tratadas com extrato do fungo BvFVII | 21 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| BVVFVII | Extrato dos metabólitos do fungo VII isolado de folhas da <i>Bauhinia variegata</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) |
| PBS | Solução Salina Tamponada com Fosfato |
| SDS | Dodecil Sulfato de Sódio |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| UV | Ultravioleta |
| MeOH | Metanol |
| MDA | Malondialdeído |
| EROs | Espécies Reativas de Oxigênio |

SUMÁRIO

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 01 |
| 1.1. Vitiligo | 01 |
| 1.2. Melanogênese | 03 |
| 1.3. Estresse oxidativo e seus efeitos no organismo | 05 |
| 1.4. Radiação UV e efeitos na pele | 06 |
| 1.5. Cerrado e <i>Bauhinia variegata</i> | 07 |
| 1.6. Fungo Endofítico | 10 |
| 2. OBJETIVOS | 11 |
| 2.1. Objetivo Geral | 11 |
| 2.2. Objetivos específicos | 11 |
| 3. METODOLOGIA | 12 |
| 3.1. Extrato do fungo endofítico | 12 |
| 3.2. Linhagens celulares e cultivo | 12 |
| 3.3. Irradiação da cultura de células | 12 |
| 3.4. Avaliação da citotoxicidade | 12 |
| 3.5. Ensaio do efeito do extrato na atividade da tirosinase <i>in vitro</i> | 13 |
| 3.6. Ensaio de peroxidação lipídica | 13 |
| 3.7. Avaliação do efeito do extrato do fungo endofítico na melanogênese | 14 |
| 3.7.1. Avaliação do efeito do extrato de fungo endofítico na produção de melanina pelas células B16F10 | 14 |
| 3.7.2. Avaliação da atividade da tirosinase das células B16F10 | 14 |
| 3.8. Quantificação de proteínas | 14 |
| 3.9. Análise estatística | 14 |
| 4. RESULTADOS | 15 |
| 4.1. Avaliação do efeito do extrato do fungo BvFVII na viabilidade de células B16F10 | 15 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.2. Avaliação do efeito do extrato do fungo BvFVII na viabilidade de células CCD1059Sk..... | 16 |
| 4.3. Avaliação de efeito do extrato na atividade da tirosinase <i>in vitro</i> | 18 |
| 4.4 Avaliação do efeito do extrato do fungo BvFVII na melanogênese..... | 18 |
| 4.4.1. Avaliação do efeitos do extrato do fungo BvFVII na viabilidade de células CCD1059Sk..... | 18 |
| 4.4.2. Avaliação da produção de melanina nas células B1620 tratadas com extrato do fungo BvFVII..... | 20 |
| 4.5 Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas células tratadas com extrato do fungo BvFVII | 21 |
| 5. DISCUSSÃO | 22 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 27 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 27 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Vitiligo

O vitiligo é uma doença bastante comum, que pode afetar entre 0,5 e 2% da população mundial. Ele se caracteriza pela hipopigmentação da pele, pode ocorrer em crianças e adultos (LADDHA et al., 2018; NICOLAIDOU; KATSAMBAS; LOTTI, 2015). Ambos os sexos são igualmente afetados. Sua etiologia não foi totalmente elucidada, mas há fortes indícios de que seja uma doença sistêmica autoimune (TORELLO et al., 2018). Apesar de não oferecer risco de vida, essa é uma doença que tem consequências psicossociais e merece empenho e dedicação na busca de tratamentos (SALZES C. EL AL., 2015).

Essa patogênese pode ser subdividida em vitiligo segmentar ou não segmentar e sua extensão pode ser localizada ou generalizada. No vitiligo segmentar, o indivíduo é afetado unilateralmente e na face a parte mais afetada é a região do trigêmeo. Já o vitiligo não segmentar ocorre bilateralmente e simetricamente (SPEECKAERT; VAN GEEL, 2017). Após uma terapia de repigmentação bem sucedida é altamente recomendável a aplicação de inibidores da calcineurina (proteína fosfatase ativadora de células T do sistema imune) para prevenir recidivas (BLEUEL; EBERLEIN, 2018).

Essa doença autoimune, apesar de ser muitas vezes assintomática, causa graves problemas psicológicos, devido à aparência desfigurante gerada por manchas provenientes de regiões despigmentadas na pele do indivíduo (NJOO; WESTERHOF, 2001). Essa patologia está muitas vezes associada a outras doenças autoimunes, incluindo alopecia areata, tireoidite de Hashimoto, anemia perniciosa e diabetes mellitus tipo I (BISHNOI; PARSAD, 2018; LADDHA et al., 2018). O tratamento possui dois objetivos principais: deter a progressão da doença e repigmentar as áreas afetadas. Muitas teorias tentam explicar essa patogênese e as mais importantes incluem uma predisposição genética, destruição autoimune de melanócitos, alterações no estado redox da pele, danos causados por espécies reativas de oxigênio, resposta simpática aumentada e fatores ambientais (RASHIGHI; HARRIS, 2017).

Carmit Levy e Mehdi Khaled sugerem que o evento que antecede a resposta imune é a perda ou o deslocamento de E-caderinas e subsequente apoptose de melanócitos, que resulta na expressão de antígenos. A E-caderina é uma molécula de adesão que liga os melanócitos aos queratinócitos e é mais expressa pelos queratinócitos. Os melanócitos deficientes de E-caderinas são eliminados por estresse

mecânico e por isso que o vitiligo se expressa principalmente em regiões de muito atrito do corpo, como joelhos, cotovelos, tornozelos e áreas acrais (LEVY; KHALED, 2015).

Outra teoria é de que o vitiligo seja desencadeado devido à geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois eles podem afetar melanócitos de forma irreversível ao causar danos na sua membrana e no seu núcleo (LADDHA et al., 2018). Para combater os efeitos do vitiligo localizado, são usados antioxidantes topicamente que possuem em sua composição: *Ginkgo biloba*, pseudocatalase, quelina, vitamina C, vitamina E e ácidos graxos poli-insaturados (KANWAR et al., 2014).

O tratamento do vitiligo abrange várias linhas que tentam atuar nesses diferentes mecanismos desencadeadores da patogênese e inclui modalidades farmacológicas, fototerapêuticas e cirúrgicas. Os tratamentos de estabilização da doença podem, em alguns casos, causar uma repigmentação desejada e a terapia com imunossupressores e imunomoduladores tiveram melhor resposta em associação com exposição ao sol ou à banda estreita de UVB (NB-UVB) (TANG et al., 2018). Metotrexato, azatioprina e corticosteroides sistêmicos são exemplos de compostos empregados para interromper a progressão da doença levando-se em consideração a via autoimune (BISHNOI; PARSAD, 2018).

O tratamento do vitiligo normalmente é feito com a utilização de terapia medicamentosa, composta por corticosteroides e imunomoduladores, radiação ultravioleta, lasers, terapias alternativas, despigmentação, apoio psicológico e camuflagem. Além dessas terapias, outra possibilidade de tratamento é o transplante de melanócitos. As terapias já empregadas atualmente apresentam grande sucesso, principalmente em regiões faciais e cervicais, sucessos moderados no tronco, mas pouco ou nenhum resultado é observado em partes distais ou acrais (FALABELLA; BARONA, 2009).

Ainda há divergência entre autores sobre os tratamentos com doses clínicas de irradiação de banda larga de UVA (BB-UVA) e a banda estreita de UVB (NB-UVB) serem considerados padrões. Foi registrado em estudos anteriores que a radiação média de 5 J/cm^2 não apresenta efeitos adversos na peroxidação lipídica (TANG et al., 2018).

As terapias não convencionais para o vitiligo apresentam resultados interessantes, apesar de necessitarem de mais investigações. Entre elas, podemos citar o uso de ácido alfa-lipóico, flavonoides, fluorouracil, glutathione, L-DOPA, levamisol, L-fenilalanina, melagenina, metais como por exemplo o zinco, minoxidil, minerais, como selênio e manganês, ômega 3, prostaglandinas E2, pseudocatalase, resveratrol, soja e

vitaminas (GIANFALDONI et al., 2018a). Um estudo sobre tratamento de vitiligo em crianças revela possibilidades inovadoras no tratamento fototerápico, que vem obtendo bons resultados e merece destaque, como por exemplo a fototerapia solar seletiva (GIANFALDONI et al., 2018b).

Vários processos naturais no organismo, como a melanogênese, geram espécies reativas e se o sistema antioxidante responsável pela eliminação desses compostos estiver deficiente, podem ocorrer processos patológicos como consequência deste desequilíbrio (LADDHA et al., 2018). Com base nisso, conhecer e estudar esses processos é fundamental para que se possa desenvolver tratamentos eficazes.

1.2. Melanogênese

A melanogênese é um processo complexo de reações químicas que tem como objetivo a síntese da melanina. Resumidamente, o início da cascata de formação do melanócito se inicia em células da crista neural embrionária. A partir delas, temos a célula embrionária chamada melanoblasto, que dá origem aos melanócitos. O melanócito é uma estrutura dendrítica responsável pelo armazenamento e transporte dos melanossomas, que são organelas produtoras de melanina, que por meio do transporte via dendritos chega aos queratinócitos. Cada melanócito está cercado por aproximadamente 36 queratinócitos, que são células componentes da camada mais superficial da pele, conhecida como estrato córneo (PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017; VIDEIRA; LIMA MOURA; VASCONCELOS MAGINA, 2013).

A coloração exibida nos queratinócitos depende, principalmente, de fatores genéticos que dão características específicas aos melanossomas. É importante frisar que o que diferencia a coloração expressa na pele não está ligada diretamente à quantidade de melanócitos que o indivíduo possui, mas sim à quantidade, qualidade e distribuição da melanina e disponibilidade de enzimas e substratos melanogênicos (PILLAIYAR; MANICKAM; JUNG, 2017). Sabe-se atualmente que a regulação da pigmentação dos olhos, pele e cabelos ocorre por mais de 125 genes diferentes, que podem resultar na produção de dois tipos diferentes de melanina, a eumelanina e a feomelanina (XU et al., 2017).

Os melanócitos sofrem ações de fatores intrínsecos, pois se relacionam com o sistema nervoso central, sistema endócrino, sistema imunológico e sistema inflamatório. Por isso, são afetados por condições como gestação e diabetes (VIDEIRA; LIMA MOURA; VASCONCELOS MAGINA, 2013; XU et al., 2017). Eles também sofrem

ação de fatores extrínsecos, que incluem radiação ultravioleta e substâncias químicas (fármacos). A capacidade protetora de espécies reativas de oxigênio (EROs) se deve a uma enzima chave na produção de melanina denominada tirosinase. Essa glicoproteína é dependente de cobre e por isso utiliza o ânion superóxido como substrato para a melanogênese, pois quando o cobre está oxidado a enzima pode ser ativada por doadores de elétrons (VIDEIRA; LIMA MOURA; VASCONCELOS MAGINA, 2013).

Apesar da regulação da melanogênese não ter sido totalmente elucidada, alguns importantes mediadores já foram descritos. Entre eles podemos citar a tirosinase (TYR), a proteína 1 relacionada à tirosinase (TRP-1) e proteína 2 relacionada à tirosina (TRP-2). A tirosinase é responsável por promover a oxidação da L-tirosina em L-dopa e em dopaquinona (DQ) e, apesar de ainda não se saber a função exata da TRP-1 e TRP2, acredita-se que elas tenham funções relacionadas à ativação e estabilização da tirosinase. Outro estimulador da melanogênese bastante conhecido e que merece destaque é o hormônio estimulador de α -melanócito (α -MSH) (VIDEIRA; LIMA MOURA; VASCONCELOS MAGINA, 2013).

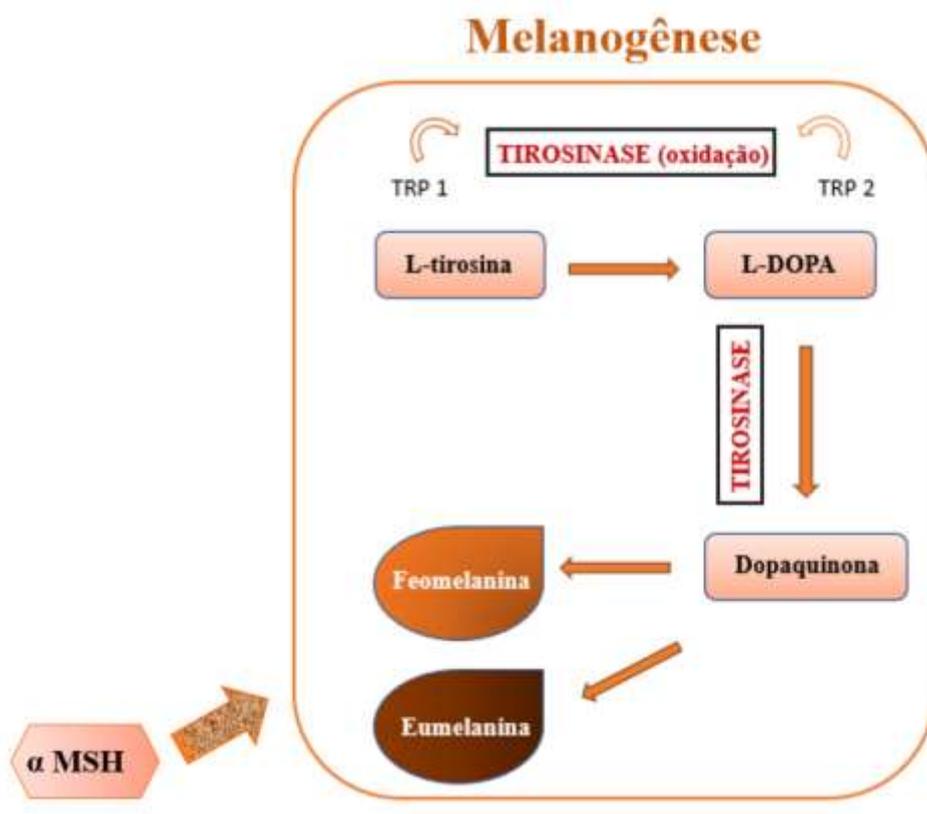


Figura 1. Esquema de uma das vias da melanogênese que ocorre no melanossoma.

Os melanossomas podem produzir melaninas com tonalidades diferentes. A melanina que apresenta coloração castanho-escuro ou preta é conhecida como eumelanina e é mais eficiente na fotoproteção do indivíduo. Já a melanina de coloração amarelo avermelhada se manifesta como fenótipo de pessoas com cabelos ruivos. Essa melanina também se manifesta em pessoas com fototipos de pele I e II, nas quais os tumores de pele são mais comuns e que tem relação direta com a menor fotoproteção promovida por esse tipo de melanina (VIDEIRA; LIMA MOURA; VASCONCELOS MAGINA, 2013). Indivíduos de pele escura e pele clara se diferenciam na suscetibilidade a eritema, mas são igualmente suscetíveis à imunossupressão causada por exposição à radiação UV (DAMIAN; BARNETSON; HALLIDAY, 1999).

1.3. Estresse oxidativo e seus efeitos no organismo

O estresse oxidativo é uma consequência do rompimento da sinalização redox da célula e pode gerar impactos significativos na angiogênese, na inflamação e na ativação de células dendríticas, linfócitos e queratinócitos. Além disso, sabe-se que a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) são ativadores pró-inflamatórios que levam à produção de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. A presença de EROs mantém o estresse oxidativo e é o principal estimulador de danos celulares (CHIMENTI et al., 2018).

As principais espécies reativas de oxigênio são o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($HO\cdot$). O organismo produz defesas naturais contra essas EROs, pois elas são capazes de danificar proteínas, lipídeos, DNA e carboidratos por ligações covalentes ou por ataque às cadeias laterais. O sistema de defesa inclui enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e a catalase (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1981).

O organismo também é capaz de produzir antioxidantes não enzimáticos. O grande desafio, nesse caso, é conseguir interceptar a ERO depois de já ter se formado, para conseguir impedir maiores prejuízos. Após interagirem com a espécie reativa, esses antioxidantes interceptores são capazes de interagir com compostos solúveis em água e conseguem carregá-las para longe de alvos que são mais suscetíveis a danos, como membranas proteicas e lipoproteínas (HICKEY; KUBES, 2009).

O acúmulo de EROs no organismo ocorre devido à falha da homeostase redox e é um dos fatores intrínsecos considerados atualmente como iniciadores da patogênese do vitiligo, pois quando ocorre em áreas específicas da pele, causa a destruição de

melanócitos, causando manchas na pele (AKSOY; ÇELIK, 2018). A presença de EROs também está diretamente relacionada com o envelhecimento da pele e um dos mecanismos pelo qual ele surge no organismo é por meio de um processo ineficaz de transporte de elétrons, que ocorre na mitocôndria. Os ânions radicais superóxidos que surgem produzem um *feedback* positivo que danifica a mitocôndria e piora a eficiência da rede de transporte de elétrons (DAMIANI et al., 2018; KOCHANNEK et al., 2000; SILINA, 2018). Além disso, o estresse oxidativo também tem efeitos deletérios no fígado. Nesse caso, as espécies reativas geradas principalmente pelas enzimas do citocromo P450 nas mitocôndrias dos hepatócitos interagem com proteínas, DNA e lipídeos e resulta em lesão celular (GOPALAKRISHNAN; KALAIARASI, 2013).

Um conhecido indutor do estresse oxidativo é a radiação UV, que contribui bastante no desencadeamento de doenças epidérmicas. Uma das maneiras de avaliar as consequências da radiação em células da pele é por meio do ensaio de peroxidação lipídica, que consiste na dosagem de um biomarcador conhecido do estresse, os hidroperóxidos lipídicos (LOOH), como o Malondialdeído (MDA) (TANG et al., 2018).

1.4. Radiação UV e efeitos na pele

As pessoas estão naturalmente expostas à radiação UV, que abrange a faixa do espectro eletromagnético entre 100 e 400 nm, que corresponde a 10% da radiação total incidente na atmosfera. Ela é subdividida em radiação UVA, com comprimentos de onda entre 315 e 400 nm, UVB, com comprimento de onda entre 280 e 315 nm, e UVC, que possui o menor comprimento de onda, variando entre 100 e 280 nm. A UV sofre importantes atenuações quando entra em contato com componentes da atmosfera, pois é absorvida ou refletida por gases presentes na atmosfera, como o oxigênio, ou pela camada de ozônio. Além disso, essa irradiação é atenuada pela presença de nuvens e altas concentrações de aerossóis. Apesar da atenuação, esses raios ainda atingem a pele de maneira a causar danos e dados mostram que os efeitos da radiação UVB em seres humanos são mais significativos que os efeitos dos raios UVA (CALÒ; MARABINI, 2014).

Um erro muito comum é associar os altos níveis da radiação UV no Brasil ao fenômeno de depleção do ozônio, pois esse efeito é típico de regiões polares, principalmente no hemisfério sul. A latitude é um fator determinante na quantidade de radiação na superfície. Estudos apontam que a maior parte do Brasil se localiza nas

regiões tropicais e devido à latitude, as concentrações de ozônio são naturalmente menores (CORRÊA, 2015).

Alguns efeitos positivos da exposição à radiação UV incluem a síntese de vitamina D, que é importante para o metabolismo do cálcio e do fósforo, auxilia no tratamento do raquitismo, da psoríase, do vitiligo, dermatite atópica e esclerodermia localizada, além de atuar preventivamente em doenças, como osteoporose, diabetes tipo 1, alguns tipos de câncer e doenças autoimunes. A ativação da melanogênese proveniente dessa exposição traz ainda efeitos psicológicos, com melhoramento do humor devido à liberação de endorfina pelos queratinócitos, que pode inclusive levar a uma “dependência” do bronzeamento. Outra consequência interessante atribuída à produção de óxido nítrico induzida por UV é a redução da pressão arterial e efeitos antimicrobianos (CORRÊA, 2015; COUTEAU; DIARRA; COIFFARD, 2016).

Efeitos negativos em decorrência da alta exposição à radiação ultravioleta também já são bem conhecidos e incluem distúrbios oculares (catarata) e consequências na pele, como variantes genéticas, redução da atividade de células de Langerhans, eritema, inflamação, queimaduras, estresse oxidativo, envelhecimento, cânceres e atividade de imunossupressão. Naturalmente a pele apresenta defesas à radiação UV e isso inclui o aumento na produção de melanina (bronzeamento) e antioxidantes usuais como as vitaminas A, E e C. Em relação aos danos mutagênicos, sabe-se que apenas 50% dos dímeros de pirimidina de ciclobutano são reparados durante as primeiras 24 horas, sugerindo que a exposição repetida leve a um aumento na taxa de mutação (ANDO, 2018; CORRÊA, 2015; DAMIAN; BARNETSON; HALLIDAY, 1999; GEGOTEK et al., 2016).

1.5. Cerrado e *Bauhinia variegata*

O cerrado é considerado a maior região de savana da América do Sul, mas sabe-se que apesar da savana ser a vegetação predominante, o cerrado também inclui campo limpo, campo sujo, cerrado *sensu stricto* e cerradão (ALVAREZ-BETANCOURT; GARCIA-SILVENTE, 2014; CASTRO et al., 2016). No Brasil, ele está localizado na região central, limitado pelas florestas da Amazônia a noroeste e pela floresta costeira do atlântico a sudeste. Ele compreende praticamente todo o estado de Goiás e abrange o oeste da Bahia, Minas Gerais e todo o leste do Mato Grosso. Além de incluir grande parte do território brasileiro (24% do território), inclui também partes do Paraguai e da Bolívia (ARAÚJO J ET. AL, 2012; EITEN, 1972).

Pesquisas mostram que a disponibilidade hídrica no ambiente do cerrado tem relação direta com os padrões sazonais e influenciam mutações bacterianas e fúngicas presentes no solo (CASTRO et al., 2016). O cerrado possui grande heterogenicidade de solos, abrange uma ampla diversidade de fauna, flora, micro-organismos e é considerado um dos 25 ambientes mais importantes de biodiversidade. Esses são alguns dos motivos que justificam um crescente interesse de pesquisa sobre esse ambiente (LUCENA I. ET. AL, 2018).

Devido ao desenvolvimento urbano sobre as áreas rurais e ao avanço da agricultura, o cerrado vem perdendo grande parte de seu *habitat*. Dados recentes mostram que já foram desmatados um total de 975,7 mil km², quase metade da área total do bioma. (GUTIÉRREZ; MARINHO-FILHO, 2017).

Dentre os compostos químicos produzidos por plantas pode-se citar compostos fenólicos, flavonoides, terpenos, esteroides, alcaloides, ácidos aromáticos e taninos, e diferentes efeitos biológicos já foram descritos para esses compostos, como antioxidante, antialérgico, antimicrobiano, anticancerígeno, vasodilatador, entre outros. O estudo de plantas medicinais continua atraindo a atenção de muitos pesquisadores em busca de novas drogas (ABBASI et al., 2015; FARAG et al., 2015).

Cuidar do meio ambiente e preservá-lo é um dever e essa preocupação deve andar lado a lado com o desenvolvimento da humanidade. Dessa forma, pesquisas são frequentemente realizadas em busca de alternativas sustentáveis para obtenção de produtos essenciais à sociedade. Um dos importantes fármacos extraídos de recursos naturais é o taxol. Como sua demanda é muito grande, sua obtenção traz grande prejuízo ambiental e uma alternativa que vem sendo desenvolvida é a obtenção desse produto por meio de fungos endofíticos presentes na planta (FARIAS et al., 2018).

Outro tipo de composto considerado essencial nos dias de hoje são os antioxidantes, pois podem ser usados no tratamento de doenças relacionadas à presença de espécies reativas de oxigênio, como o câncer, aterosclerose, processos inflamatórios e diabetes. Além disso, essas substâncias também são relevantes para as indústrias de cosméticos (usadas como agentes antienvhecimento) e para a indústria alimentícia (usadas como conservantes) (PONTES et al., 2017).

Em publicação feita na revista *Nature* no ano 2000, o cerrado brasileiro foi considerado um ponto crítico de biodiversidade, onde as espécies endêmicas estão sofrendo uma perda gigantesca do seu *habitat* e por isso foi considerada uma região que necessita de esforços internacionais de preservação. Ainda, segundo essa pesquisa que

considera o endemismo e o grau de ameaça das espécies, o cerrado é considerado o terceiro maior *hotspot* de biodiversidade do mundo. Segundo esse estudo, em uma área de aproximadamente 1,86 milhões de km², o cerrado possui 10.000 espécies de plantas e entre as famílias de angiospermas destacam-se *Fabaceae*, *Orchidaceae* e *Asteraceae* (RISTINA G, 2000).

A família *Fabaceae* inclui entre 300 e 350 espécies de plantas popularmente conhecidas pelas atividades biológicas antidiabéticas, antioxidantes e anti-inflamatórias. No Brasil, essa família é a que possui maior riqueza em espécies, mas perde em taxa de endemidade para as *Bromeliaceae*, *Myrtaceae*, *Orchidaceae*, *Asteraceae*, *Euphorbiaceae*, *Melastomataceae* e *Apocynaceae*, (FORZZA ET AL, 2010). As três famílias que apresentam maior quantidade de espécies (*Fabaceae*, *Orchidaceae* e *Asteraceae*) são também as mais prevalentes nos Domínios Fitogeográficos Brasileiros, com exceção da Amazônia, do Pampa e do Pantanal (FARAG et al., 2015).

Uma espécie representante da família *Fabaceae* é a *Bauhinia variegata* que é uma planta bem adaptada em regiões tropicais. Em geral, as plantas do gênero *Bauhinia* possuem folhas com uma estrutura peculiar, que se assemelha a uma pisada bovina e por isso são tradicionalmente conhecidas no Brasil como pata de vaca. A *B. variegata* tem origem na Índia e na China, foi adotada como emblema floral de Hong Kong, mas são cultivadas em todo o mundo. Sua floração é branca ou lilás e a planta pode chegar a dez metros de altura (AHMED et al., 2012; CHAN; NG, 2015; FARAG et al., 2015).

Várias estruturas da *B. Variegata* já foram estudadas e tiveram suas características elucidadas. De maneira geral, suas folhas e caules apresentam atividade no tratamento de diabetes, dor, inflamações, infecções microbianas, diarreia, disenteria além de ter propriedade diurética. Há relato na literatura de que as sementes dessa espécie são ricas em proteínas de defesa com ação inibitória sobre tripsina e lectinas (AHMED et al., 2012; CHAN; NG, 2015; FARAG et al., 2015).

Os botões de floração dessa espécie possuem atividade antioxidante elucidada e outra estrutura com potencial atividade biológica é a casca da *B. variegata*. Em estudo realizado com o pó da casca de caule foi registrado propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias. Adicionalmente ela pode ser utilizada em terapia adjuvante com ceftriaxona intravenosa para tratar mastite crônica por *Staphylococcus aureus* em cabra (ABBASI et al., 2015; MANDAL et al., 2014).

Um estudo muito interessante realizado por Govindarajan (2016) mostra o potencial do extrato aquoso das folhas de *B. variegata* como agente redutor e

estabilizador na biossíntese de nanopartículas de prata, utilizado alternativamente aos inseticidas para o controle de vetores transmissores de doenças como malária, dengue e Chikungunya (GOVINDARAJAN et al., 2016).

Metabólicos secundários podem ser produzidos por plantas ou micro-organismos e são conhecidos e usados na medicina tradicional há muitos anos. As plantas podem ser usadas tanto *in natura* quanto processadas para a forma seca, para a obtenção do extrato, tintas, aromatizantes, estimulantes, alucinógenos, inseticidas, agentes terapêuticos entre outros (PONTES et al., 2017). Para manter a preservação da rica flora do bioma Cerrado, torna-se necessário o desenvolvimento de fontes mais sustentáveis para a obtenção dos compostos bioativos. Devido a isso, a obtenção de metabólicos a partir de fungos vem ganhando espaço.

1.6. Fungo Endofítico

O fungo endofítico é um fungo não patogênico, que na maioria das vezes vive em harmonia com os tecidos vegetais, como casca, flores, raízes, caules, folhas e sementes. Ele habita os tecidos da planta, mas não causa patogenicidade. Em troca dos nutrientes fornecidos pela planta, ele proporciona adaptação, aumento do crescimento, aumento de tolerância a estresses e proteção (NUMPONSAK et al., 2018; PANG et al., 2018; PENG et al., 2013).

Historicamente, o fungo endofítico foi a priori descrito com pouca importância biológica para os seres humanos. Até meados de 1870 acreditava-se que eles não tinham efeito prejudicial e nem benéfico. Com o tempo, verificou-se que eles conferiam proteção às plantas, inclusive contra herbívoros. E os mecanismos pelos quais eles conseguem adentrar nas plantas incluem feridas, raízes, estômatos e aberturas causadas por insetos (AZEVEDO J., 1998). Um exemplo clássico da importância da capacidade de produção de compostos bioativos por fungo endofítico, foi o caso do fungo *Taxomyces andreanae* que foi isolado da casca do teixo e demonstrou capacidade de produzir o taxol mesmo que em pequenas quantidades. O taxol é um composto com atividade antitumoral em cânceres de mama e de ovário e por isso tem grande importância para a humanidade (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993).

Em comparação às plantas, os fungos ainda são pouco explorados, apesar de também apresentarem grande diversidade e distribuição no solo. Sabe-se, atualmente, que as propriedades desenvolvidas por um fungo estão diretamente relacionadas aos recursos e características do meio que o cerca (KARST et al., 2013). Alterações em

padrões básicos de cultura, como composição do meio, pH, temperatura, suprimento de oxigênio, suprimento de nutrientes, adição de precursores ou inibidores enzimáticos, são métodos simples para induzir a diversidade química dos fungos. Sabe-se, atualmente, que esses endófitos podem ser utilizados no ramo da medicina, da biotecnologia, da agricultura, na indústria de fabricação de antimicrobianos, inseticidas e agentes anticancerígeno (PANG et al., 2018; XU et al., 2018).

Numponsak (2018) confirmou em sua pesquisa que o ácido indol-3-acético, que é tradicionalmente produzido por plantas, foi produzido também por micro-organismos associados a elas. Isso corrobora a hipótese de que há uma relação entre os produtos desenvolvidos pela planta e pelos micro-organismos que a habitam (NUMPONSAK et al., 2018). A atividade fúngica está além da produção de compostos semelhantes aos produzidos por sua planta hospedeira. Eles são capazes de fazerem uma biotransformação proporcionando diversidade química e produtos inéditos (ARUNRATTIYAKORN et al., 2018).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

A finalidade deste trabalho foi avaliar o efeito citotóxico e de indução da melanogênese dos metabólitos produzidos por um fungo endofítico (BvFVII) em células da pele.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito citotóxico do extrato do fungo BvFVII em células B16F10 e CCD-1059Sk;
- Avaliar o efeito citotóxico do extrato do fungo BvFVII em células B16F10 e CCD-1059Sk, expostas à radiação UV;
- Avaliar o efeito do extrato de fungo BvFVII na atividade da tirosinase *in vitro*;
- Avaliar o potencial do extrato de fungo BvFVII em induzir a produção de melanina em células B16F10 na presença e na ausência de radiação UVA;
- Avaliar a capacidade do extrato em inibir a peroxidação lipídica nas células B16F10.

3. METODOLOGIA

3.1. Extrato do fungo endofítico

O fungo endofítico utilizado neste estudo foi previamente isolado por Mesquita (2011) das folhas de *Bauhinia variegata* (MESQUITA, 2011). As condições de cultivo para aumento da produção de extrato com atividade antioxidante foram padronizadas por Costa (2016) (COSTA, 2016) e o extrato foi produzido por Lima (2017) (LIMA, 2017).

3.2. Linhagens celulares e cultivo

Para os ensaios, foram utilizados dois tipos de linhagens celulares, células de melanoma de camundongo (B16F10) e fibroblastos humanos (CCD-1059Sk). Essas células foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Sigma Aldrich), suplementado com soro fetal bovino (10% - Thermo Fisher Scientific), penicilina G (100 µ/mL) estreptomicina (100µg/mL) e incubadas em incubadora com 5% de CO₂ a 37°C. As células foram sub-cultivadas a cada 2-3 dias, usando salina 0,9% para lavá-las e tripsina 0,25% para desagregá-las do frasco. As células sub-cultivadas foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células/poço para todos os ensaios.

3.3. Irradiação da cultura de células

As células, após serem tratadas em placas para cultura com 96 poços por 48 h, foram lavadas 2 vezes com tampão fosfato-salina sódio 50 mM pH 6,5. Em seguida, adicionou-se às células 500 µL de tampão fosfato-salina e levou-se à exposição com radiação UVA (5 J/cm²) em uma caixa de irradiação fotométrica composta por 2 lâmpadas TLK 40W/10R (Philips, Holland) a 5 cm da fonte de irradiação UV. Após a irradiação, o tampão fosfato-salina foi substituído por meio de cultura e as placas foram novamente incubadas por uma hora.

3.4 Avaliação da citotoxicidade

As células foram semeadas em placa de 96 poços (KASVI) a uma densidade de 1×10^4 células/poço em meio DMEM contendo soro fetal bovino 10% (Thermo Fisher Scientific). Após, acrescentou-se 50 µL do tratamento nas suas respectivas concentrações e incubou-se a 37°C por 48 horas. As células foram ou não irradiadas conforme o procedimento descrito anteriormente. Em seguida, 10 µL do reagente MTT

(brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio - Sigma Aldrich) (5 mg/mL em tampão fosfato-salina) foram adicionados em cada poço das placas e incubados por 2 horas a 37°C. Após 2 horas, 200 µL de isopropanol 20% em HCl 0,01 M foram adicionados em cada poço, para solubilizar o formazan formado (MOSMANN, 1983). Em seguida, foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) das amostras em leitor de placa Multimode Detector BECKMAN COULTER – DTX em 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis com relação ao controle, que foi feito por tratamento das células somente com o veículo usado na diluição do extrato (etanol).

3.5. Ensaio do efeito do extrato na atividade da tirosinase *in vitro*

Foi realizado um ensaio *in vitro* para investigar o efeito do extrato de fungo endofítico sobre a atividade da tirosinase, usando o método descrito por Hwang e colaboradores (2017) com adaptações (HWANG et al., 2017). Resumidamente, o experimento foi realizado em placa de 96 poços, e em cada um dos poços foi adicionado 30 µL de enzima tirosinase de cogumelo (250 U/mL) em tampão fosfato de sódio 50 mM pH 6,5. Como controle negativo foi utilizado o ácido kójico (1 mg/mL) e como controles positivos foram utilizados o psoraleno (0,8 µg/mL - Sigma Aldrich) e o bergapteno (0,27 µg/mL - Sigma Aldrich). Foi feito um controle (branco de reação) e diferentes concentrações do extrato do fungo BvFVII (1,56 µg/mL, 3,12 µg/mL, 6,25 µg/mL, 12,5 µg/m, 25 µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL) foram testadas. A placa foi incubada por 5 minutos a 25°C, foi adicionado 100 µL de L-tirosina 2 mM (Sigma Aldrich) em cada um dos poços e a placa foi novamente incubada por 20 minutos a 25°C. A leitura da absorbância foi feita em 475 nm.

3.6. Ensaio de peroxidação lipídica

A avaliação da peroxidação lipídica nas células foi realizada de acordo com o método descrito por Ohkawa e colaboradores (1979) (OHKAWA; OHISHI; YAGI, 1979). Para o ensaio, foi realizado tratamento em placas de 6 poços por 48 h com o extrato do fungo nas concentrações de 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL. Ao final do tratamento, as células foram expostas a 5 J/cm² de radiação UVA. O lisado celular foi obtido por ciclos de congelamento e descongelamento repetido por 3 vezes.

Em uma placa de 96 poços, foi adicionado 110 µL de água deionizada, 5 µL de dodecilsulfato de sódio 8,1%, 37,5 µL de ácido acético 20%, 37,5 µL de ácido

tiobarbitúrico 0,8% e 10 μ L do lisado celular ou de diferentes concentrações de malonaldeído (MDA), usado como padrão. A mistura foi aquecida por 1 h a 95°C e logo após o aquecimento a amostra foi colocada no gelo para finalizar a reação. A leitura foi realizada em 520 nm na leitora de microplacas Multimode Plate Reader, Perkin Elmer, EnSpire.

3.7. Avaliação do efeito do extrato de fungo endofítico na melanogênese.

Para avaliar o efeito do extrato do fungo BvFVII na melanogênese das células B16F10, foram avaliadas a atividade da tirosinase das células tratadas e a produção de melanina pelas células, como descrito a seguir.

3.7.1. Avaliação do efeito do extrato do fungo endofítico na produção de melanina pelas células B16F10.

As células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações do extrato de fungo BvFVII. Após 48 h, o meio foi retirado dos poços da placa e em seguida os poços foram lavados com PBS. Foi acrescentado 50 μ L de NaOH em DMSO a 10% (Dinâmica) e aquecido a 80° por 30 min. Quando a placa esfriou foi feita a leitura da absorvância no comprimento de onda de 492 nm (HOSOI et al., 1985).

3.7.2. Avaliação da atividade da tirosinase das células B16F10

Foi realizado um ensaio com células B16F10 para avaliar a atividade da tirosinase das células tratadas com o extrato do fungo BvFVII, de acordo com método descrito por (HWANG et al., 2017). As células foram semeadas em placas de 96 poços e tratadas com o extrato. Após 48 h, o meio foi então aspirado e as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato e lisadas com 100 μ L tampão de Triton X100 (10 mL/L). Após a lise, foi adicionado 100 μ L de L-tirosina 2 mM, a placa foi incubada por 2 horas a 25°C e a leitura da absorvância foi, a seguir, feita em espectrofotômetro a 292 nm.

3.8. Quantificação de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi medida pelo ensaio descrito por Lowry (LOWRY et al., 1951) usando a albumina soro bovina como padrão.

3.9. Análise estatística

A análise estatística foi feita com auxílio do programa no GraphPad Prisma versão 5.0. O teste de variância *one-way* ANOVA, seguido de um pós-teste de comparações múltiplas foi usado, sempre que adequado.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito do extrato do fungo BvFVII na viabilidade de células B16F10.

Para verificar a citotoxicidade do extrato de fungo endofítico da *Bauhinia variegata*, células de melanoma de camundongo (B16F10) foram tratadas com concentrações crescentes do extrato e foi realizado ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Os resultados mostram que, nas concentrações testadas, o extrato não diminuiu a viabilidade celular. Entretanto, quando as células tratadas foram expostas à radiação UVA, somente a concentração de 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ não diminuiu a viabilidade das células em mais que 30%. Os resultados deste ensaio podem ser vistos nas figuras 2 e 3.

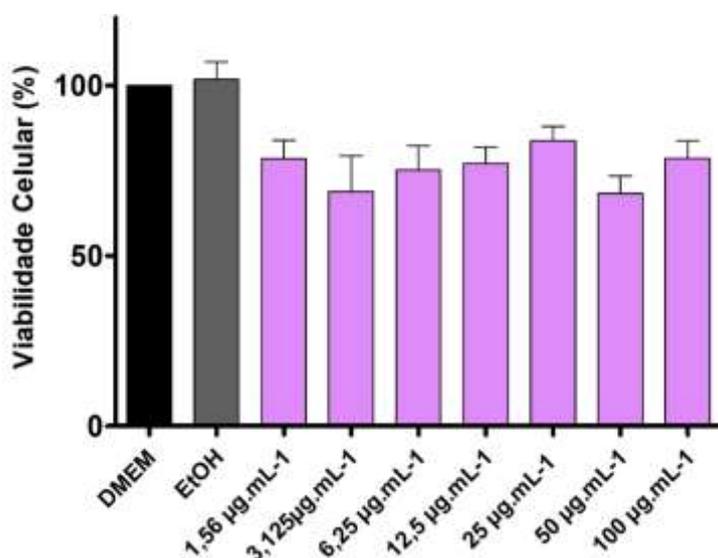


Figura 2. Teste de Viabilidade celular sem UVA em células B16F10.

Células B16F10 foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (EtOH) ou concentrações crescentes de extrato do fungo BvFVII. Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo etanol ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. Tratamento de 48 h.

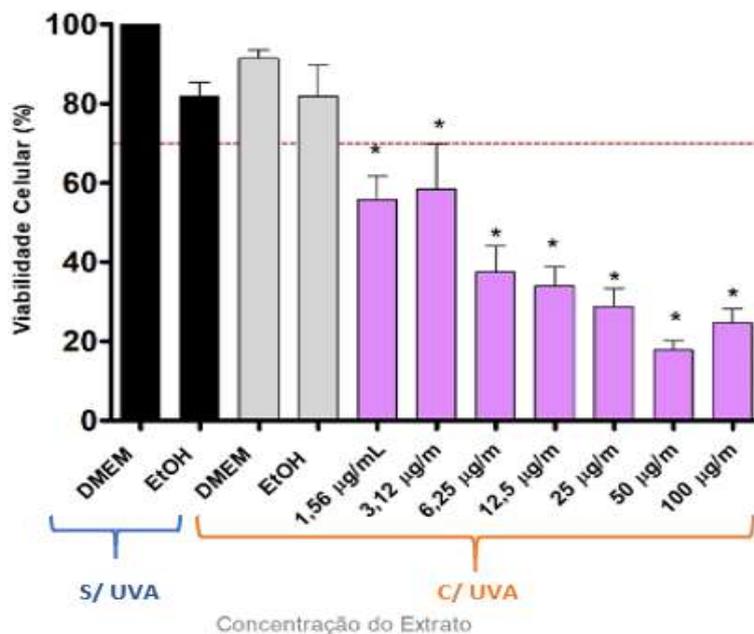


Figura 3. Teste de viabilidade celular com UVA em células B16F10..

Células B16F10 foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (EtOH) ou concentrações crescentes de extrato do fungo BvVII e expostas a radiação de 5 J/cm². Os dados apresentados representam média ± desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo etanol ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100% e * p < 0,05 vs. EtOH (com UVA). Tratamento de 48 h.

4.2. Avaliação do efeito do extrato do fungo BvFVII na viabilidade de células CCD1059Sk

Para avaliar o efeito do extrato do fungo endofítico da *Bauhinia variegata* na viabilidade de fibroblastos humanos (CCD-1059Sk), as células foram tratadas com concentrações crescentes do extrato e foi realizado um ensaio de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT). Os resultados mostram que nenhuma das concentrações testadas diminuiu a viabilidade celular nesta linhagem, e que a exposição das células tratadas à radiação UVA induziu a proliferação celular.

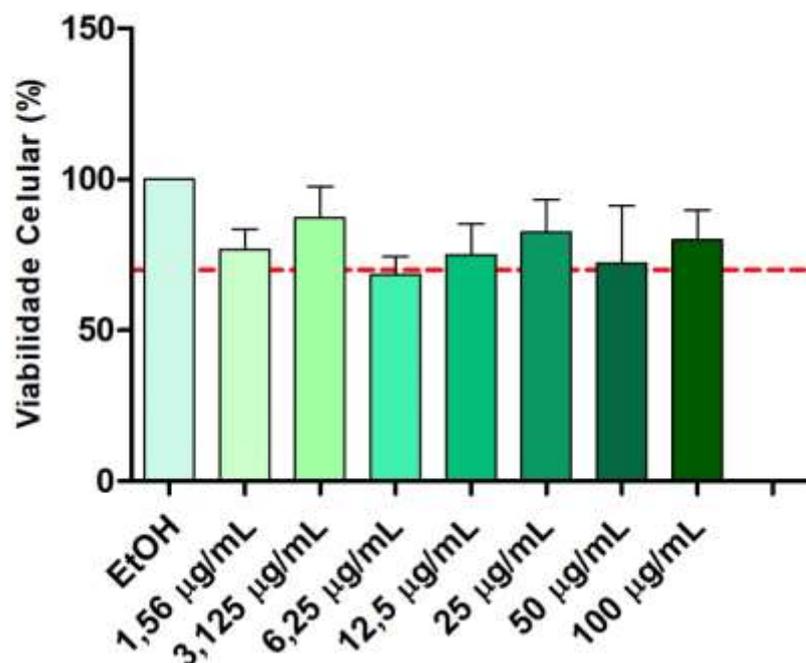


Figura 4. Teste de viabilidade celular sem UVA em células CCD- 1059Sk.

Células CCD- 1059Sk foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (Controle) ou concentrações crescentes de extrato do fungo endofítico. Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo etanol ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100%. Tratamento de 48 h.

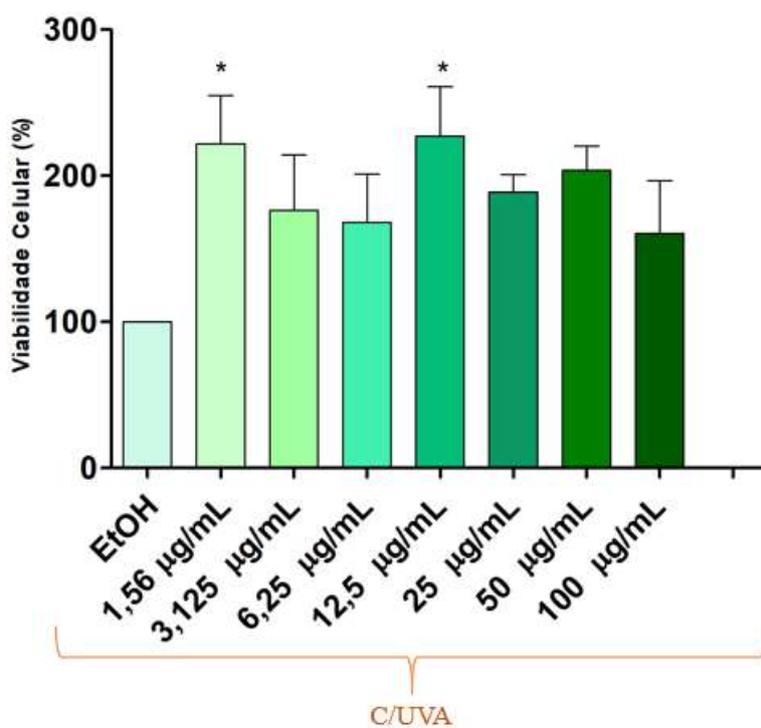


Figura 5. Teste de viabilidade celular com UVA em células CCD- 1059Sk.

Células CCD- 1059Sk foram incubadas com 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) e tratadas com veículo (EtOH) ou concentrações crescentes de extrato do fungo VII e expostas a radiação de 5 J/cm². Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de células viáveis após tratamento com veículo etanol ou extrato, considerando a viabilidade das células não tratadas como 100% e * $p < 0,05$ vs. controle. Tratamento de 48 h.

4.3. Avaliação do efeito do extrato na atividade da tirosinase *in vitro*

Para avaliar o efeito do extrato de fungo endofítico da *Bauhinia variegata* na atividade da enzima que catalisa a reação de produção de melanina, foi realizado um ensaio *in vitro* com uso de tirosinase de cogumelo.

Os resultados mostram que o extrato, nas concentrações avaliadas, diminuiu a atividade da tirosinase *in vitro* e que este efeito foi inversamente proporcional à concentração do extrato como observado na figura 5.

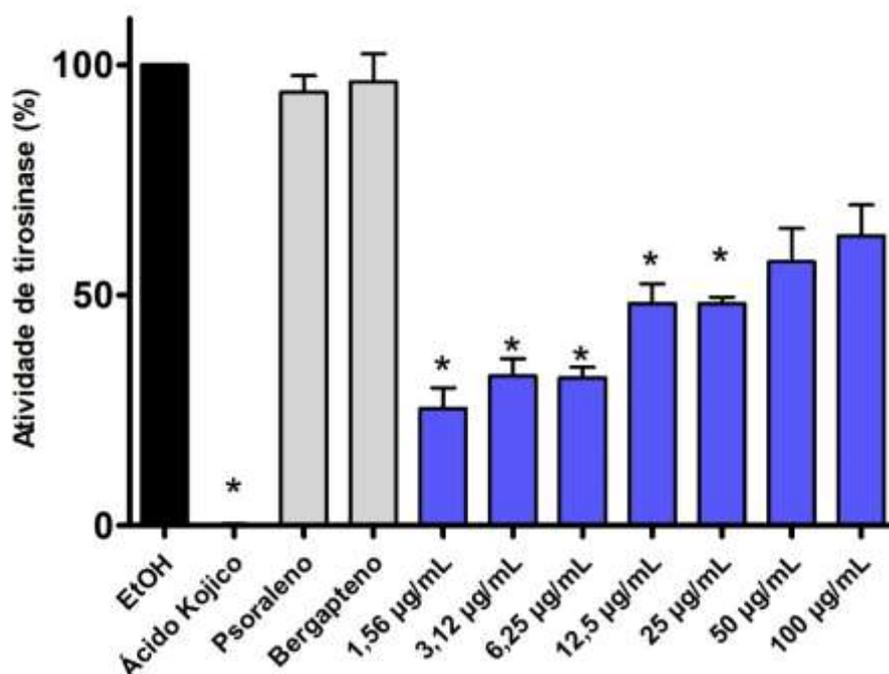


Figura 6. Avaliação da atividade da tirosinase na presença do extrato de fungo endofítico. Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de melanina após tratamento com veículo ou extrato, considerando o EtOH como 100% e * $p < 0,05$ vs. controle. Tratamento de 48 h.

4.4. Avaliação do efeito do extrato do fungo BvVII na atividade da tirosinase e produção de melanina.

4.4.1. Avaliação da atividade da tirosinase de células B16F10 tratadas com o extrato.

Para avaliar a influência do extrato de fungo endofítico da *Bauhinia variegata* na atividade da enzima tirosinase das células, foi realizado um ensaio com células de melanoma de camundongo (B16F10). As concentrações de extrato testadas neste ensaio foram 3,12 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. Essas concentrações de extrato foram selecionadas porque a

concentração de 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ causou a menor redução na viabilidade celular quando as células foram tratadas com extrato e expostas à radiação UVA e a concentração de 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi a menor concentração para a qual foi observada uma diferença de efeito na inibição da atividade da tirosinase no ensaio *in vitro*. Para esse ensaio o hormônio α -MSH (0,02 mM) foi usado como controle positivo de indução da produção de melanina.

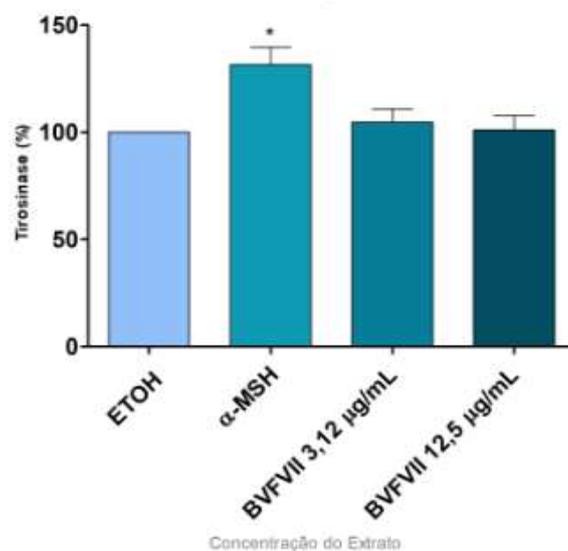


Figura 7. Avaliação da atividade de tirosinase das células tratadas com extrato do fungo endofítico. Células B16F10 foram incubadas e tratadas com veículo (EtOH) ou com extrato nas concentrações de 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ou 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de melanina após tratamento com veículo (EtOH) ou extrato, considerando o EtOH como 100% e * $p < 0,05$ vs. EtOH. Tratamento de 48 h.

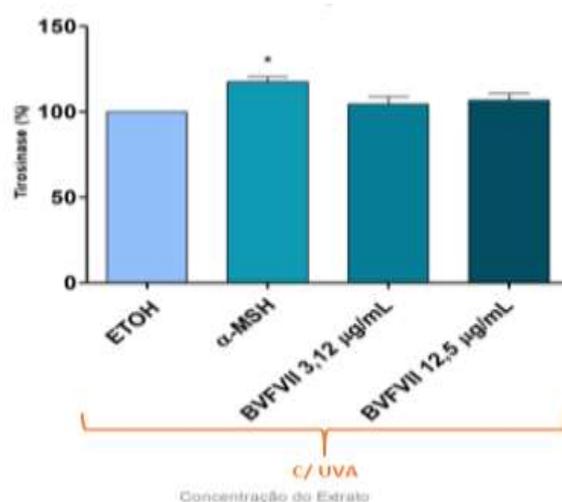


Figura 8. Avaliação da atividade de tirosinase das células tratadas com extrato do fungo endofítico e irradiadas com UVA. Células B16F10 foram incubadas e tratadas com veículo (EtOH) ou as concentrações 3,12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extrato do fungo BvVII e expostas a radiação UVA (5 J/cm^2). Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de melanina após tratamento com veículo ou extrato, considerando o EtOH como 100% e * $p < 0,05$ vs. EtOH. Tratamento de 48 h.

Os resultados mostram que não houve aumento ou diminuição significativa na atividade da tirosinase das células tratadas com o extrato nas concentrações testadas e expostas ou não à radiação UVA.

4.4.2. Avaliação da produção de melanina nas células B16F10 tratadas com extrato do fungo BvVII

Para avaliar o efeito do extrato de fungo endofítico da *Bauhinia variegata* na produção de melanina pelas células de melanoma de camundongo (B16F10), um ensaio foi realizado nas mesmas condições do que investigou o efeito do extrato na atividade da tirosinase das células. Para esse ensaio, o hormônio α -MSH (0,02mM) foi usado como controle positivo de indução da produção de melanina e o ensaio foi feito para células expostas ou não à radiação UVA.

Os resultados do ensaio sugerem que, nas condições do ensaio, o extrato do fungo BvVII não foi capaz de induzir a produção de melanina significativamente e também não inibiu sua produção pelas células.

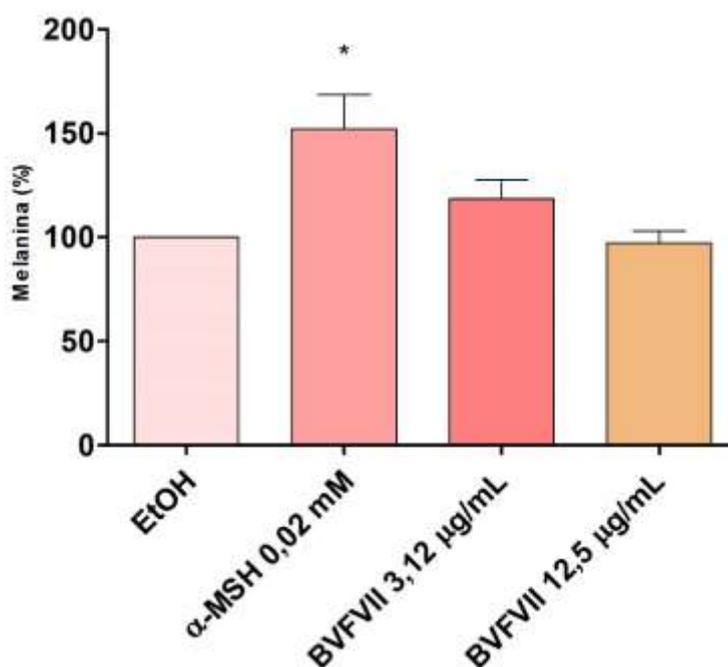


Figura 9. Avaliação da produção de melanina nas células tratadas com extrato do fungo endofítico. Células B16F10 foram incubadas e tratadas com veículo (Controle) ou com as concentrações de 3,12 μ g/mL e 12,5 μ g/mL de extrato do fungo BvVII. Os dados apresentados representam média \pm desvio padrão da porcentagem de melanina após tratamento com EtOH ou extrato, considerando o EtOH como 100% e *p < 0,05 vs. controle. Tratamento de 48 h.

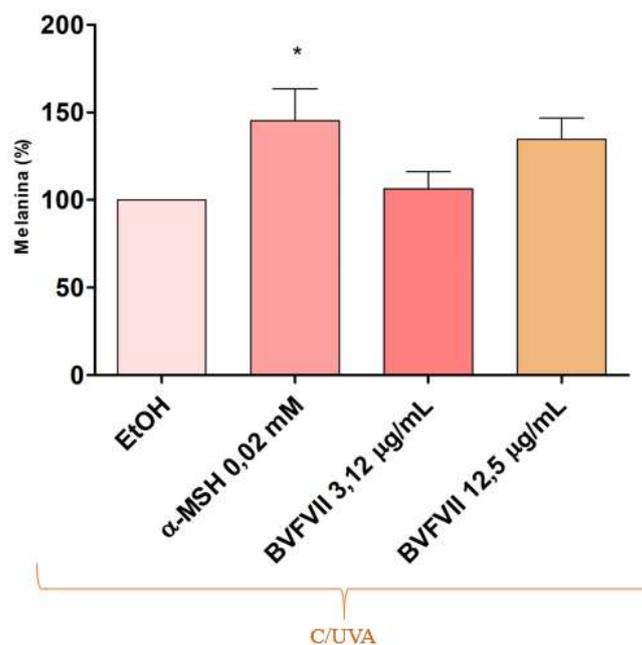


Figura 10. Avaliação da produção de melanina nas células tratadas com extrato do fungo endofítico com UVA. Células B16F10 foram incubadas e tratadas com veículo (Controle) ou com as concentrações de 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL de extrato do fungo BvVII. Os dados apresentados representam média ± desvio padrão da porcentagem de melanina após tratamento com EtOH ou extrato, considerando o EtOH como 100% e *p < 0,05 vs. controle. Tratamento de 48 h.

4.5. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas células B16F10 tratadas com extrato do fungo BvVII.

Para avaliar se o extrato BvFVII exercia alguma atividade antioxidante nos melanócitos, o lisado das células tratadas com o extrato nas concentrações de 3,12 ou 12,5 µg/mL foi submetido a um ensaio de lipoperoxidação.

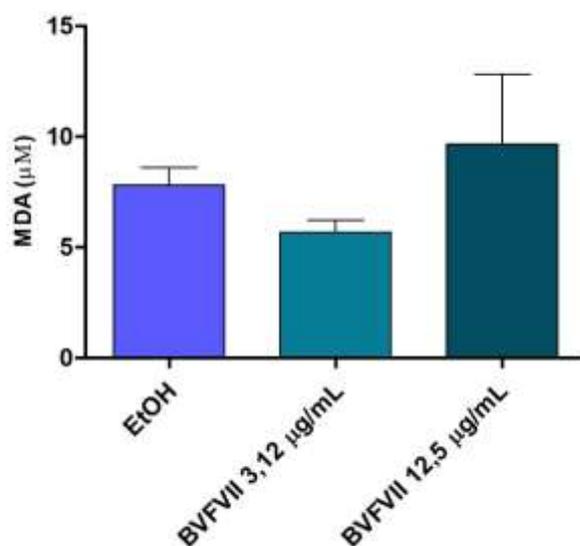


Figura 11. Avaliação dos níveis de peroxidação lipídica nas células tratadas com extrato do fungo BvFVII. Células B16F10 foram incubadas e tratadas com veículo (EtOH) ou com as concentrações de 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL de extrato do fungo BvVII. Os dados apresentados representam média ± desvio padrão da concentração de MDA nas células. Tratamento de 48 h.

5. DISCUSSÃO

Plantas medicinais, além de produzirem compostos com atividades farmacológicas, vivem, muitas vezes, em associação simbiótica com fungos endofíticos, que também são produtores de metabólitos secundários com potencial atividade biológica. Apesar de existirem plantas medicinais em diferentes partes do mundo, estudos publicados revelam que plantas típicas da Ásia são menos produtoras desses metabólitos. As condições ambientais são fundamentais para a produção dos metabólitos com atividade biológica pelas plantas, o que coloca o Brasil numa posição privilegiada por usufruir de dois ricos biomas, o Cerrado e o Pantanal (NORILER et al., 2018).

Além desses biomas, o ecossistema Mangue também é uma grande fonte de plantas e fungos produtores de metabólicos com diversas atividades biológicas (DESHMUKH et al., 2018; RANGANATHAN, 2018).

O bioma Cerrado apresenta uma grande biodiversidade reconhecida internacionalmente e a preservação da sua fauna e flora é uma preocupação relevante. Levando isso em consideração, a produção de metabólitos ativos por fungos endofíticos pode ser considerada como uma estratégia de preservação das plantas que atualmente são economicamente exploradas e que podem chegar à extinção caso essa exploração não seja controlada (CABEZAS et al., 2018).

Em 1993 foi demonstrado que um fungo endofítico denominado *Taxomyces andreanae* associado ao teixo era capaz de produzir o taxol e compostos relacionados. Mas seria necessário uma otimização nas técnicas de cultivo para melhorar a produção do taxol por este fungo (STIERLE et. al., 1993). O taxol é um exemplo clássico da necessidade de novas formas de obtenção de medicamentos pois estudos mostram que cerca de 10.000 kg de casca de teixo são necessários para obtenção de 1 kg dessa substância. Como esse é um importante medicamento anticancerígeno aprovado pela FDA e possui grande demanda de mercado, a quantidade de árvores cultivadas não consegue atender a esta demanda e por isso existe uma busca incessante por novos métodos de produção do composto (FARIAS et al., 2018; MACIEL et al., 2018).

Essa alternativa para a produção de medicamentos bioativos por micro-organismos desperta grande interesse das indústrias, pois permite uma produção em grande escala de substâncias de interesse com um bom rendimento e maior facilidade de manipulação com menor desgaste dos recursos naturais (CABEZAS et al., 2018).

Um estudo de 2015 realizado na Universidade de Brasília descreve que extratos das folhas da *Bauhinia variegata* são capazes de ativar PPAR γ e possuem alta capacidade antioxidante (SILVA, 2015). Além disso, sabe-se que muitos fungos endofíticos que colonizam plantas de forma simbiótica são capazes de produzir os mesmos metabólitos que seus hospedeiros (PONTES et al., 2017). A partir disso, Mesquita (MESQUITA, 2011) isolou das folhas de *B. Variegata* fungos endofíticos que pudessem ser fonte desses mesmos compostos. Um desses fungos produziu metabólitos que, a priori, não apresentaram uma atividade antioxidante muito relevante quando comparados a outros já descritos, teve a produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante otimizada nas condições de cultivo padronizadas por Costa (COSTA, 2016). Em trabalho posterior, Lima (LIMA, 2017) obteve dois extratos a partir do cultivo desse fungo, um extrato em acetato de etila dos metabólitos secretados pelo fungo no meio de cultivo e um extrato metanólico obtido da maceração dos micélios do fungo. No atual trabalho, o extrato utilizado nos experimentos foi o extrato de acetato de etila, pois apresentou uma maior atividade antioxidante.

Há na literatura muitos relatos de agentes reguladores da melanogênese e alguns são derivados vegetais, como componentes ativos da *Rhodiola rosea* (PENG et al., 2013), do *Foeniculum vulgare* (NAM; LEE, 2016) e da *Sageretia thea* (KO; SHRESTHA; CHO, 2018). Outros agentes bastante conhecidos na inibição da melanogênese são a hidroquinona, o ácido kojico, o ácido ascórbico, o ácido retinóico e a arbutina (LEE et al., 2017). Apesar do ácido retinóico ser conhecido pelo seu papel inibidor da melanogênese, Fernandes e colaboradores demonstraram em seus estudos que ele também pode provocar um aumento na produção de melanina na linhagem de células de melanoma B16F10 (FERNANDES et al., 2004).

Atualmente, ainda existem poucos estudos descrevendo extratos vegetais como indutores da melanogênese. Podemos citar um trabalho desenvolvido por Moreira e colaboradores, que mostrou que as folhas e flores de *Pyrostegia venusta*, tradicionalmente utilizada no tratamento de leucodermia e vitiligo, realmente possuem atividade indutora na produção de melanina (MOREIRA et al., 2012).

Este trabalho também teve como objetivo encontrar uma fonte natural de substâncias que possam promover a indução da melanogênese.

Por apresentar atividade antioxidante significativa demonstrada em pesquisas anteriores, esse trabalho propôs o estudo do extrato do fungo isolado das folhas da *B.*

variegata para o tratamento do vitiligo, visto que a ação de espécies reativas de oxigênio é um dos potenciais mecanismos causadores dessa patologia. Outro mecanismo para tratar essa doença autoimune é a administração de substâncias indutoras da melanogênese. Com base nisso, testes foram realizados para investigar se esse extrato poderia ter ação também por essa via e tratar assim o vitiligo.

Para avaliar o efeito do extrato BvFVII na melanogênese, células de melanoma de camundongo B16F10 foram utilizadas. Essa linhagem tem sido intensamente utilizada, pois é relativamente fácil de ser cultivada *in vitro* e seu mecanismo de produção de melanina se assemelha muito ao realizado em melanócitos humanos (CHANG, 2012). Os resultados mostram que as concentrações testadas não promoveram aumento significativo na atividade da tirosinase das células e na produção de melanina. Entretanto, as mesmas concentrações do extrato influenciaram de forma inibitória a atividade da enzima tirosinase em ensaio *in vitro* usando L-tirosina como substrato.

Em estudo realizado por Moreira e colaboradores também houve diferença nos ensaios realizados com a tirosinase de cogumelo, usada no ensaio *in vitro*, e a tirosinase da própria célula (MOREIRA et al., 2012).

A luz solar é dividida em ultravioleta (45%), visível (5%) e infravermelho (50%). A radiação ultravioleta é dividida em UVA, UVB e UVC. A UVA é uma radiação de onda longa e é o que tem maior capacidade penetrante no tecido epitelial alcançando a epiderme e a derme. Ela é a principal responsável pelo efeito bronzeador na pele. A UVB possui onda menor, mas é o mais ativo. Ela é o principal responsável por causar queimaduras, mas tem menor capacidade penetrante, atuando principalmente na camada epidérmica. A luz UVC é a mais energética e consequentemente tem o maior potencial de dano, mas felizmente é absorvida na atmosfera terrestre (SVOBODOVA; WALTEROVA; VOSTALOVA, 2006).

É muito comum que o tratamento para o vitiligo seja associado à exposição à radiação solar. Para examinar a toxicidade potencial do extrato BvFVII associado à exposição UVA, ou a possibilidade de fotoquimioproteção promovida por este extrato, células B16F10 e CCD-1059Sk foram tratadas com diferentes concentrações (1,56 a 100 µg/mL) de extrato por 48 h e expostas ou não à radiação UVA (5 J/cm²). Os resultados mostraram que o extrato não foi citotóxico nas concentrações testadas, pois o tratamento não diminuiu mais que 30% a viabilidade

celular, porcentagem de diminuição de viabilidade celular já considerada não tóxica por outros autores (LIU et al., 2018). Já quando o tratamento das células foi associado à exposição à radiação UVA, foi observada uma diminuição significativa da viabilidade celular na linhagem de melanócitos (B16F10) e uma proliferação celular na linhagem de fibroblastos (CCD-1059Sk).

Para investigar o efeito do extrato na atividade da tirosinase e na produção de melanina, foi realizado um ensaio para avaliar a interferência do extrato na atividade da tirosinase *in vitro*, um ensaio para avaliar a atividade da tirosinase das células B16F10 tratadas com o extrato e expostas ou não à radiação UVA, e um ensaio para avaliar a produção de melanina nas células B16F10 tratadas com extrato e expostas ou não à radiação UVA. No ensaio *in vitro* que avaliou a atividade da tirosinase na presença do extrato, foi observado que o BvFVII diminuiu a atividade da tirosinase em 70% ou menos. Curiosamente, o extrato do fungo BvFVII demonstrou uma maior inibição em concentrações mais baixas. Por ser um extrato e possuir diferentes compostos, é aceitável e justificável o fato dele ser inibidor apenas em menores concentrações. É possível que ele possua uma substância com capacidade inibidora e outra com capacidade estimuladora da atividade enzimática em concentrações diferentes, visto que extratos de plantas podem conter centenas de metabólitos secundários em diferentes concentrações como já demonstrado em outro estudo. (YUNES, 1998). Para a realização dos demais experimentos foram escolhidas as concentrações de 3,12 µg/mL e 12,5 µg/mL. A escolha da concentração 3,12 µg/mL foi baseada no ensaio de viabilidade celular em que os melanócitos foram expostos ao UVA. Nesse ensaio, a concentração de 3,12 µg/mL foi a que mostrou o menor efeito citotóxico. Já a escolha da concentração 12,5 µg/mL se baseou no ensaio da atividade da tirosinase *in vitro* e esta foi a menor concentração que apresentou a menor inibição da atividade da tirosinase no ensaio *in vitro*.

No ensaio de avaliação da atividade da tirosinase das células B16F10 tratadas com extrato BvFVII e expostas ou não expostas à luz UVA, não foi observado aumento significativo da ação da enzima com o tratamento. Os resultados do ensaio de avaliação da produção de melanina pelas células B16F10 tratadas com extrato BvFVII e expostas ou não expostas à luz UVA também mostraram que não houve aumento significativo na produção de melanina com o tratamento.

Para avaliar a atividade antioxidante do extrato do fungo BvFVII nas concentrações testadas, foi realizado um ensaio de peroxidação lipídica, que não

demonstrou atividade antioxidante significativa e tão pouca atividade pró-oxidativa, comumente observada para alguns compostos fenólicos.

A melanina é produzida pelo complexo processo da melanogênese, que é consequência de combinações de reações catalisadas enzimaticamente e quimicamente dentro do melanossoma. Esse processo tem como enzima chave a tirosinase, que é a principal responsável pelo processo. Essa enzima é responsável por oxidar o substrato tirosina em dopaquinona, que é posteriormente convertido em eumelanina e feomelanina. A enzima tirosinase tem origem nos melanócitos e após ser processada no retículo endoplasmático e complexo de Golgi é transportada para os melanossomas (D'MELLO et al., 2016).

A regulação da melanogênese pode ser dividida em três níveis complexos. O primeiro deles se refere à produção de melanócitos na crista neural e sua migração para os locais alvos. A segunda regulação também ocorre em nível celular e se refere às diferentes características que o melanossoma pode apresentar em consequência da quantidade produzida, do tamanho e da densidade de melanina. A terceira e mais complexa regulação ocorre em nível subcelular, em que enzimas ligadas à melanogênese como a tirosinase, TRP1 e TRP2 são reguladas por vias intracelulares. Nesse nível a melanogênese pode ser regulada pelo hormônio alfa-estimulante dos melanócitos (α -MSH), pela via de sinalização Wnt ou ainda pela via da quinase regulada por sinal extracelular (ERK). Essas vias de sinalização subcelulares envolvem o fator de transcrição associado à microftalmia (MITF), que quando regulado positivamente ativa a expressão de enzimas relacionadas à melanogênese (CHANG, 2012). Como o ensaio de avaliação da atividade da tirosinase *in vitro* demonstrou o efeito crescente de estímulo da atividade, novas concentrações do extrato devem ser testadas para avaliar se concentrações mais altas são capazes de aumentarem a atividade da enzima e também se são capazes de induzir a melanogênese nas células.

Será importante elucidar os mecanismos de atuação do extrato de fungo BvFVII. Uma possibilidade seria determinar os níveis de proteínas importantes da melanogênese, como tirosinase TRP1, MITF, Akt/p-Akt, GSK3 β /p-GSK3 β e β -catenina por *western blotting* como descrito por Ko e colaboradores (2018). Outra possibilidade interessante seria a avaliação da transcrição desses genes como feito por Castro e Zenkin (2015). Caso concentrações mais altas do extrato consigam promover o aumento da produção da melanina, ele poderá ser usado para o tratamento de doenças hipopigmentantes, como o

vítigo. Portanto, estudos adicionais serão fundamentais para abordar os mecanismos de ação do extrato.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que, nas concentrações testadas, o extrato do fungo BvFVII não diminuiu a viabilidade celular das células B16F10 e CCD quando estas não foram expostas à radiação UVA, mas diminuiu a viabilidade das células B16F10 quando o tratamento foi associado à exposição à radiação UVA.

O extrato do fungo BvVII não conseguiu induzir a produção de melanina em células B16F10 e diminuiu significativamente a atividade da tirosinase em ensaio *in vitro*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASI, A. M. et al. Ethnomedicinal values, phenolic contents and antioxidant properties of wild culinary vegetables. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 162, p. 333–345, 2015.

AHMED, A. S. et al. The antimicrobial, antioxidative, anti-inflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African Bauhinia species used traditionally to treat diarrhoea. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 3, p. 826–839, 2012.

AKSOY, M.; ÇELIK, H. Dynamic thiol / disulphide homeostasis in vitiligo patients. p. 498–501, 2018.

ALVAREZ-BETANCOURT, Y.; GARCIA-SILVENTE, M. Eyelid detection method based on a fuzzy multi-objective optimization. *Computacion y Sistemas*, v. 18, n. 1, p. 65–78, 2014.

ANDO, H. The maximal cumulative solar UVB dose allowed to maintain healthy and young skin and prevent premature photoaging. p. 1–7, 2018.

ARAUJO J ET. AL, 2012. Characterization of Soil Bacterial Assemblies in Brazilian Savanna-Like Vegetation Reveals Acidobacteria Dominance, v. 64, n.3, p. 760-770, 2012.

ARUNRATTIYAKORN, P. et al. Biotransformation of β -Mangostin by an Endophytic Fungus of *Garcinia mangostana* to Furnish Xanthenes with an Unprecedented Heterocyclic Skeleton. *Journal of Natural Products*, p. acs.jnatprod.8b00519, 2018.

AZEVEDO J., 1998. Fungo endofítico, p. 117-137, 1998.

BISHNOI, A.; PARSAD, D. Clinical and molecular aspects of vitiligo treatments. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, p. 1–12, 2018.

BLEUEL, R.; EBERLEIN, B. Therapeutic management of vitiligo. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, p. 1–5, 2018.

CABEZAS, O. et al. Endophytic fungi isolated from medicinal plants : future prospects of bioactive natural products from *Tabebuia* / *Handroanthus* endophytes. p. 1–30, 2018.

CALÒ, R.; MARABINI, L. Protective effect of *Vaccinium myrtillus* extract against UVA- and UVB-induced damage in a human keratinocyte cell line (HaCaT cells). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 132, p. 27–35, 2014.

CASTRO, A. P. et al. Microbial diversity in cerrado biome (neotropical savanna) soils. *PLoS ONE*, v. 11, n. 2, p. 1–15, 2016.

CASTRO-ROA, D.; ZENKIN, N. Methodology for the analysis of transcription and translation in transcription-coupled-to-translation systems in vitro. *Methods*, v. 86, p. 51–59, 2015.

CHAN, Y. S.; NG, T. B. *Bauhinia variegata* var. *variegata* Lectin: Isolation, Characterization, and Comparison. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 175, n. 1, p. 75–84, 2015.

CHANG, T. S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. *Materials*, v. 5, n. 9, p. 1661–1685, 2012.

CHIMENTI, M. S. et al. Potential Role of Cytochrome c and Tryptase in Psoriasis and Psoriatic Arthritis Pathogenesis: Focus on Resistance to Apoptosis and Oxidative Stress. *Frontiers in Immunology*, v. 9, n. October, 2018.

CORRÊA, M. D. P. Solar ultraviolet radiation: Properties, characteristics and amounts observed in Brazil and south America. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 90, n. 3, p. 297–313, 2015.

COSTA, Karina Oliceira. Otimização das condições de cultivo do fungo endofítico *phomopsis* sp. extraído da *Bauhinia variegata* para produção de metabólitos secundários com atividade antioxidante. Brasília, 2016. 81 p. Dissertação. Faculdade de Saúde, Universidade de Brasília.

COUTEAU, C.; DIARRA, H.; COIFFARD, L. Effect of the product type, of the amount of applied sunscreen product and the level of protection in the UVB range on the level of protection achieved in the UVA range. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 500, n. 1–2, p. 210–216, 2016.

D’MELLO, S. A. N. et al. Signaling pathways in melanogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, p. 1–17, 2016.

DAMIAN, D. L.; BARNETSON, R. S. C.; HALLIDAY, G. M. Low-dose UVA and UVB have different time courses for suppression of contact hypersensitivity to a recall antigen in humans. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 112, n. 6, p. 939–944, 1999.

DAMIANI, E. et al. Modulation of Oxidative Status by Normoxia and Hypoxia on Cultures of Human Dermal Fibroblasts : How Does It Affect Cell Aging ? p. 1–23, 2018.

DESHMUKH, S. K. et al. Fungos Associados a Manguezais : Uma Nova Fonte de Compostos Anticânceres Potenciais. v. 4, n. 3, p. 1–28, 2018.

EITEN, G. The Cerrado Vegetation of Brazil. v. 38, n.2, p. 201-341, 1972

FALABELLA, R.; BARONA, M. I. Update on skin repigmentation therapies in vitiligo. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 22, n. 1, p. 42–65, 2009.

FARAG, M. A. et al. Phytochemical, antioxidant and antidiabetic evaluation of eight *Bauhinia* L. species from Egypt using UHPLC-PDA-qTOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*, v. 119, p. 41–50, 2015.

FARIAS, H. et al. Screening of endophytic fungi stored in a culture collection for taxol production. p. 1–6, 2018.

FERNANDES, S. S. et al. Increase of melanogenesis by retinoic acid: An ultrastructural and morphometric study. *Tissue and Cell*, v. 36, n. 2, p. 95–105, 2004.

FORZZA ET AL. *Catálogo de Plantas e Fungos do Brasil*. v. 136, 2010.

GEGOTEK, A. et al. The cross-talk between electrophiles, antioxidant defence and the endocannabinoid system in fibroblasts and keratinocytes after UVA and UVB irradiation. *Journal of Dermatological Science*, v. 81, n. 2, p. 107–117, 2016.

GIANFALDONI, S. et al. Unconventional Satisfactory? Treatments for Vitiligo: Are They (Un) L-DOPA. v. 6, n. 1, p. 170–175, 2018a.

GIANFALDONI, S. et al. Vitiligo in Children: What's New in Treatment? Excimer lasers. v. 6, n. 1, p. 221–225, 2018b.

GOPALAKRISHNAN, S.; KALAIARASI, T. Hepatoprotective Activity of the Ethanolic Extract of. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v. 5, p. 1–13, 2013.

GOVINDARAJAN, M. et al. Novel synthesis of silver nanoparticles using *Bauhinia variegata*: a recent eco-friendly approach for mosquito control. *Parasitology Research*, v. 115, n. 2, p. 723–733, 2016.

GUTIÉRREZ, E. E.; MARINHO-FILHO, J. The mammalian faunas endemic to the Cerrado and the Caatinga. *ZooKeys*, v. 2017, n. 644, p. 105–157, 2017.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. The role of superoxide and hydroxyl radicals. *FEBS Letters*, v. 128, n. 2, p. 347–352, 1981.

HICKEY, M. J.; KUBES, P. Oxidative Stress: oxidants and antioxidants. n. December 1995, p. 339–348, 2009.

HOSOI, J. et al. Regulation of Melanin Synthesis of B16 Mouse Melanoma Cells by 1α , 25-Dihydroxyvitamin D₃ and Retinoic Acid. *Cancer Research*, v. 45, n. 4, p. 1474–1478, 1985.

HWANG, J. A. et al. Coumestrol Down-Regulates Melanin Production in Melan-a Murine Melanocytes through Degradation of Tyrosinase. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n. 4, p. 535–539, 2017.

KANWAR, A. et al. Randomized controlled study to evaluate the effectiveness of dexamethasone oral minipulse therapy versus oral minocycline in patients with active vitiligo vulgaris. *Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology*, v. 80, n. 1, p. 29, 2014.

KARST, J. et al. Fungal communities in soils along a vegetative ecotone. *Mycologia*, v. 105, n. 1, p. 61–70, 2013.

KO, G. A.; SHRESTHA, S.; CHO, S. K. Sageretia thea fruit extracts rich in methyl linoleate and methyl linolenate downregulate melanogenesis via the Akt/GSK3 β signaling pathway. *Nutrition Research and Practice*, v. 12, n. 1, p. 3–12, 2018.

KOCHANNEK, K. S. et al. Photoaging phenotype. Pdf. v. 35, p. 307–316, 2000.

LADDHA, N. C. et al. Vitiligo: interplay between oxidative stress and immune system. p. 1–10, 2018.

LEE, J. N. et al. Anti-melanogenic effect of gomisins N from *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baillon (Schisandraceae) in melanoma cells. *Archives of Pharmacal Research*, v. 40, n. 7, p. 807–817, 2017.

LEVY, C.; KHALED, M. Ecad vitiligo. *Pigment Cell and Melanoma Research*, v. 28, n. 4, p. 376–377, 2015.

LIMA, A. C. Avaliação da atividade antioxidante do extrato de fungo endofítico. n. 1, 2017.

LIU, Y. et al. Protective Effects of *Euphrasia officinalis* Extract against Ultraviolet B-Induced Photoaging in Normal Human Dermal Fibroblasts. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 11, p. 3327, 2018.

LOWRY, O. H. et al. Protein Measurement with the folin. *J. Biol. Chem.*, v. 193, n. 1, p. 265–275, 1951.

LUCENA I. ET. AL, 2014. Spatial heterogeneity of soils of the Cerrado-. p. 1–6, 2018.

MACIEL, O. M. C. et al. Photoprotective potential of metabolites isolated from algae-associated fungi *Annulohyphomyces stygium*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 178, p. 316–322, 2018.

MANDAL, T. et al. Efficacy evaluation of *Bauhinia variegata* L. stem bark powder as adjunct therapy in chronic *Staphylococcus aureus* mastitis in goat. *Pharmacognosy Magazine*, v. 10, n. 39, p. 512, 2014.

MESQUITA, P. G. Bioprospecção de fungos endofíticos de *Bauhinia variegata* - busca por substâncias agonistas da isoforma gama do receptor ativado por proliferadores peroxissomais e por substâncias antioxidantes. *Journal of Strategic Studies*, v. 34, n. 2, p. 281–293, 2011.

MOREIRA, C. G. et al. Hyperpigmentant activity of leaves and flowers extracts of *Pyrostegia venusta* on murine B16F10 melanoma. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 141, n. 3, p. 1005–1011, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

NAM, J. H.; LEE, D. U. Foeniculum vulgare extract and its constituent, trans-anethole, inhibit UV-induced melanogenesis via ORAI1 channel inhibition. *Journal of Dermatological Science*, v. 84, n. 3, p. 305–313, 2016.

NICOLAIDOU, E.; KATSAMBAS, A. D.; LOTTI, T. M. Vitiligo. *European Handbook of Dermatological Treatments, Third Edition*, v. 1, p. 1023–1031, 2015.

NJOO, M. D.; WESTERHOF, W. Pathogenesis and Treatment. v. 2, n. 3, p. 167–181, 2001.

NORILER, S. A. et al. Bioprospecting and structure of fungal endophyte communities found in the Brazilian biomes, pantanal, and Cerrado. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, n. JUL, p. 1–17, 2018.

NUMPONSAK, T. et al. Biosynthetic pathway and optimal conditions for the production of indole-3-acetic acid by an endophytic fungus, *Colletotrichum fructicola*, 2018.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, v. 95, n. 2, p. 351–358, 1979.

PANG, X. J. et al. Emericellins A and B: Two sesquiterpenoids with an unprecedented tricyclo[4,4,2,1]hendecane scaffold from the liquid cultures of endophytic fungus *Emericella* sp. XL 029. *Fitoterapia*, v. 131, n. September, p. 55–58, 2018.

PENG, L. H. et al. Inhibitory effects of salidroside and paeonol on tyrosinase activity and melanin synthesis in mouse B16F10 melanoma cells and ultraviolet B-induced pigmentation in guinea pig skin. *Phytomedicine*, v. 20, n. 12, p. 1082–1087, 2013.

PILLAIYAR, T.; MANICKAM, M.; JUNG, S. H. Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis. *Cellular Signalling*, v. 40, p. 99–115, 2017.

PONTES, F. C. et al. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw .) DC . v. 6984, p. 6–11, 2017.

RANGANATHAN, N. Secondary metabolite as therapeutic agent from endophytic fungi *Alternaria longipes* strain VITN14G of mangrove plant *Avicennia o?cinalis*. p. 1–12, 2018.

RASHIGHI, M.; HARRIS, J. E. Vitiligo Pathogenesis and Emerging Treatments. *Dermatologic Clinics*, v. 35, n. 2, p. 257–265, 2017.

RISTINA G, DA F. G. A. AND K. J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772): 853–858. [175]. *Nature*, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

SALZES C. EL AL., 2015. The Vitiligo Impact Patient Scale (VIPs): Development and Validation of a Vitiligo Burden Assessment Tool. n. April, 2015.

SILINA, E. V. Regularities of free radical processes and involucional changes of face and neck skin in different age groups. p. 515–520, 2018.

SILVA, C. Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas de *Bauhinia variegata* var. *variegata* DC. para a identificação de agonista do Receptor Ativado, 2015.

SPEECKAERT, R.; VAN GEEL, N. Vitiligo: An Update on Pathophysiology and Treatment Options. *American Journal of Clinical Dermatology*, v. 18, n. 6, p. 733–744, 2017.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and Taxane Production by *Taxomyces andreanae*, an Endophytic Fungus of Pacific Yew. n. 11, p. 2–4, 1993.

SVOBODOVA, A.; WALTEROVA, D.; VOSTALOVA, J. Ultraviolet light induced alteration to the skin. Biomedical papers of the Medical Faculty of the University Palacký, Olomouc, Czechoslovakia, v. 150, n. 1, p. 25–38, 2006.

TANG, L. et al. The effects of phototherapy and melanocytes on keratinocytes. *Experimental and Therapeutic Medicine*, v. 15, n. 4, p. 3459–3466, 2018.

TORELLO, L. et al. Controversial Issues In Vitiligo patients: a review of old and recent treatments. *Dermatologic Therapy*, 2018.

VIDEIRA, I. F. DOS S.; LIMA MOURA, D. F.; VASCONCELOS MAGINA, S. B. L. M. Mecanismos reguladores da melanogênese. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 88, n. 1, p. 76–83, 2013.

XU, F. et al. Optimization of Fermentation Condition for Echinacoside Yield Improvement with *Penicillium* sp. H1, an Endophytic Fungus Isolated from *Ligustrum lucidum* Ait Using Response Surface Methodology. *Molecules*, v. 23, n. 10, p. 2586, 2018.

XU, P. et al. Pimecrolimus increases the melanogenesis and migration of melanocytes *in vitro*. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 21, n. 3, p. 287–292, 2017.

YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmallogicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. v. 21, p. 99–105, 1998.