UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR
NÍVEL MESTRADO

ERICA DE TÁSSIA CARVALHO CARDOSO

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE POR ANÁLOGOS DO ÁCIDO KÓJICO

BELÉM
2014

ERICA DE TÁSSIA CARVALHO CARDOSO

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE POR ANÁLOGOS DO ÁCIDO KÓJICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Celular

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento

Co-Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio Loureiro Maués

BELÉM

2014

ERICA DE TÁSSIA CARVALHO CARDOSO

INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA TIROSINASE POR ANÁLOGOS DO ÁCIDO KÓJICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Biologia Celular

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento - Orientador
Laboratório de Neuroquímica Molecular e Celular (ICB - UFPA)

Prof. Dr. Luiz Carlos Santana da Silva – Avaliador
Laboratório de Erros Inatos do Metabolismo (ICB - UFPA)

Profa. Dra. Maria Elena Crespo-Lopez - Avaliadora
Laboratório de Farmacologia Molecular (ICB - UFPA)

Apresentado em: 14/11/14

AGRADECIMENTOS

Mestrado em Neurociências e Biologia Celular...Anos de estudos, dedicação, trabalho, persistência, sucessos e fracassos, mas, sobretudo, de esperança. Sem dúvida, nem tudo foi vivido como queria, muitos sonhos foram perdidos ou adiados, algumas vezes deixei-me abater e desanimar. Porém, foram os obstáculos superados que me permitiram vir até aqui agradecer e celebrar esta coragem, tantas vezes colocada à prova.

Nesta árdua caminhada pude contar com o auxílio de vários companheiros, os quais tornaram essa caminhada mais significativa, seja pelo apoio, pelo carinho ou pela simples companhia. Assim, agradeço a UFPA; PPGNBC; CAPES e FAPESPA pela oportunidade e pelo fomento cedido.

Ao Profº Dr. José Luiz do Nascimento obrigada pelo trabalho a mim confiado, pelo direcionamento e constante preocupação como o andamento deste trabalho.

As amigas Neidiane Ramos (“gasparzinha”) e Fernanda Lobo pelo café, pela amizade, pelo apoio e por sempre providenciar os materiais utilizados durante os experimentos, sem os quais nada poderia ser feito.

Ao Profº Dr. Luís Antônio Loureiro Maués pela dedicação e ajuda valiosa. Obrigada por tudo.

A Profª Dra. Gilmara Bastos e toda família LNI pelo carinho, apoio, incentivo e pelos momentos de descontração fundamentais neste período.

Ao Profº Dr. Luíz Santana e seu aluno Israel pelo auxílio, em diferentes etapas desse trabalho.

A Profª Dra. Jeannie Santos e a família PET-Farmácia/UFPA pelo auxilio nos primeiros passos da vida acadêmica, fundamentados na audácia e qualidade.

A Luciana de Cássia pelo modelo de pessoa, profissional e pesquisadora, pela amizade e por ter me conduzido e orientado muitas vezes durante esta minha “Odisséia no Pará”.

A minha família (Maria de Fátima Carvalho, João Antônio Cardoso, Elem Cardoso e Wellison Cardoso) por todo amor que dedicam a mim, pela capacidade de compreender minha ausência, meu estresse e jamais pouparem esforços quando se trata em colaborar com minha felicidade e realização pessoal e profissional. Todo o meu amor e agradecimento a estes que são meu refúgio, meu socorro, meu alicerce, sem os quais eu nada seria.

A cima de tudo, louvo e agradeço a Deus por cuidar de mim, pela experiência dos erros e acertos durante este mestrado e por ter colocado em meu caminho pessoas tão especiais que me auxiliaram. “Eis a vitória que vence o mundo: a nossa Fé!”.

RESUMO

A tirosinase é uma enzima chave para a biossíntese de melanina. É uma enzima "cobre-dependente" que pode existir em três estados intermediários: desoxi (Cu^{1+}-Cu^{1+}), oxi (Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}) e met (Cu^{2+}-Cu^{2+}). Apresenta atividade bifuncional, pois oxida fenóis ou catecóis em seus o-difenóis correspondentes, sendo que o processo de oxidação de fenóis pode ser descrito por cinética de Michaelis-Menten. Distúrbios na tirosinase estão associados com hiperpigmentação e escurecimento enzimático de frutas e fungos. Assim a busca por substâncias de origem natural ou sintética capazes de regular o comportamento desta enzima é fator chave para o tratamento de tais desordens. Nesta perspectiva, no presente trabalho buscou-se analisar bioquimicamente a atividade anti-tirosinase de análogos do ácido kójico derivados de 4H- pironas (**S-01, S-02, S-03 e S-04)** e derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas **(S-05, S-06, S-07 e S-08)**, quimicamente planejadas por modelagem molecular no LPDF, do ICEN da UFPA. A cinética das substâncias **S-02, S-04, S-06, S-07** e **S-08** apresentaram inibição do tipo competitiva, semelhante ao padrão de inibição do ácido kójico, com valores de K*i* de 145,0 ± 20,0 µM; 64,0 ± 10,0 µM; 4,0 ± 0,0 µM; 6,0 ± 0,0 µM; 9,0 ± 0,0 µM, respectivamente, e de 5,0 ± 0,0 µM para o ácido kójico, enquanto a substância **S-01** apresentou uma inibição do tipo mista (K*i* = 999,0 ± 150,0 µM). Já as substâncias **S-03** e **S-05** não apresentaram atividade inibitória. As substâncias testadas demonstraram alto grau de segurança tanto na integridade de membrana de eritrócitos em teste de hemólise, quanto na viabilidade em teste com MTT em culturas de fibroblasto MRC_5, em cultura de células nervosas de retina de embrião de galinha e em melanoma B16F10. Assim, demonstrou-se que as substâncias **S-02, S-04, S-06, S-07 e S-08** apresentam atividade como potentes inibidores de tirosinase, podendo ser candidatos no tratamento de desordens de pigmentação.

Palavras-chave: Tirosinase, melanina, cinética enzimática, ácido kójico e inibidores de tirosinase.

ABSTRACT

Tyrosinase is an enzyme's key for melanin biosynthesis. It is a "copper-dependent" enzyme which exhibits three intermediate states: deoxy (Cu^{1+}-Cu^{1+}) oxy (Cu^{2+}-O^{2}-Cu^{2+}) and met (Cu^{2+}-Cu^{2+}). This enzyme has bifunctional activity since it can oxidize phenol or catechols in their corresponding o-diphenols. In addition, oxidation of phenols can be described by Michaelis-Menten kinetics. Hyperpigmentation disorders and enzymatic browning of fruit and fungi is associated with tyrosinase.Therefore the research for substances of natural or synthetic origin that could have an effective regulation on the behavior of this enzyme is a key factor of the treatment of such disorders. In this perspective, the present study consisted in analyze the biochemically anti-tyrosinase activity of kojic acid and its analogues derivatives from 4H-pyrones (**S-01, S-02, S-03** and **S-04**) and derivatives from diidropirano [3, 2-b] cromenodionas (**S-05, S-06, S-07 and S-08**) chemically designed by molecular modeling in LPDF from ICEN UFPa. The kinetics of substances **S-02, S-04, S-06, S-07** and **S-08** showed competitive inhibition, similar to the pattern of inhibition of kojic acid with K*i* values = 145,0 ± 20,0 µM; 64,0 ± 10,0 µM; 4,0 ± 0,0 µM; 6,0 ± 0,0 µM; 9,0 ± 0,0 µM, respectively, and 5,0 ± 0.0 µM for kojic acid, while **S-01** had mixed type of inhibition (Ki = 999,0 ± 150,0 µM). Since the **S-03** and **S-05** substances showed no inhibitory activity. The substances tested demonstrated a high degree of safety both in the integrity of the erythrocyte membrane in the hemolysis test as in the test with MTT viability in cultures of MRC_5 fibroblasts, culture of nerve cells from chicken embryo retina and B16F10 melanoma. Thus, it was demonstrated that **S-02, S-04, S-06, S-07** and **S-08** substances have potent activity as inhibitors of tyrosinase and may be candidates for the treatment of pigmentation disorders.

Keywords: Tyrosinase, melanin, enzyme kinetics, kojic acid and tyrosinase inhibitors

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01: Ciclo catalítico da tirosinase, descrevendo os mecanismos monofenolase (TH) e difenolase (DO) da tirosinase..... **12**

Figura 02: Esquema mostrando a via melanogênica que conduz à formação de eumelanina e / ou feomelanina, com as enzimas melanogênicas envolvidas no processo..... **15**

Figura 03: Regulação dos genes que participam da melanogênese via ativação do MC1-R e PKC- β..... **16**

Figura 04: Estrutura da epiderme apresentando os melanócitos da camada basal em comunicação com os queratinócitos formando as unidades epidérmicas... **18**

Figura 05: Formação do melanossoma com as enzimas melanogênicas envolvidas... **19**

Figura 06: Esquema representando os possíveis tipos de transferência melanossomal. (A) Conceito tradicional mostrando filipódia nanotubular, (B) Conceito tradicional mostrando endocitose em "e" e fagocitose em "p". (C) Conceito tradicional mostrando citofagocitose e (D) Novo mecanismo proposto por Ando *et al* (2011)..... **20**

Figura 07: Síntese de melanina, nos melanócitos, durante a melanogênese..... **21**

Figura 08: Esquema mostrando os gráficos com os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten (a) e a transformada duplo-recíproca de Lineweaver-Burk (b)..... **24**

Figura 09: Esquema do mecanismo de inibição competitiva com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente..... **25**

Figura 10: Esquema do mecanismo de inibição acompetitiva com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente..... **26**

Figura 11: Esquema do mecanismo de inibição mista com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente..... **27**

Figura 12: Gráfico Lineweaver-Burk do mecanismo de inibição não-competitiva pura **28**

Tabela 01: Substâncias com atividade anti-tirosinase..... **29**

Figura 13: Estrutura molecular do ácido kójico e seus análogos derivados de 4H-pironas (S-01, S-02, S-03 e S-04) e derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (S-05, S-06, S-07 e S-08) utilizados neste trabalho..... **31**

Tabela 02: Deslocamento de pico do spectro UV-Visível das reações do ácido kójico e seus análogos com Cu^{2+} ou tirosinase..... **37**

Figura 14: Cinética enzimática da tirosinase na presença do ácido kójico..... **38**

Figura 15: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-01 e S-02..... **40**

Figura 16: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-03 e S-04..... **41**

Figura 17: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-05 e S-06..... **42**

Figura 18: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-07 e S-08..... **43**

Figura 19: Ensaio de hemólise para avaliar a integridade de membrana celular ao ácido kójico e seus análogos..... **44**

Figura 20 Citotoxicidade da linhagem de MRC_5 tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04..... **46**

Figura 21: Citotoxicidade das culturas de células de retina de embrião de galinha (E7C8) tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04..... **47**

Figura 22: Citotoxicidade de células B16F10 tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04..... **48**

LISTA DE ABREVIATURAS

AC: Adenilato Ciclase

AK: Ácido kójico

ATP: Trifosfato de Adenosina

BH_4: Tetrahidrobiopterina

cAMP: Monofosfato de Adenosina Cíclico

CMF: Meio livre de cálcio

CREB: Proteínas de Ligação ao Elemento de Resposta ao cAMP

DAG: Diacilglicerol

DCT: Dopacromo Tautomerase

DHI: 5,6-Dihidroxiindol

DHICA: 5,6-Dihidroxiindol Carboxílico

DMEM: Meio de Eagle modificado por Dulbecco, meio nutritivo para células

DMSO: Dimetilsulfóxido

E: Enzima livre

EC: Classificação Enzimológica

E_{desoxi}: Enzima na forma desoxi

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EI: Complexo Enzima-Substrato

E_{met}: Enzima na forma met

E_{oxi}: Enzima na forma oxi

ES: Complexo Enzima-Substrato

ESI: Complexo Enzima-Substrato-Inibidor

FBS: Soro Fetal Bovino

gp: glicoproteína

I: Inibidor Enzimático

IC_{50}: Concentração inibitória de 50%

IP3: Inositol 1,4,5-trifosfato

K_i: Constante de Inibição

K_i': Constante de Inibição do inibidor acompetitivo

$K_{m\ app}$: Constante de Michaelis-Menten aparente

K_m: Constante de Michaelis-Menten

L-DOPA: L-3,4-di-hidroxifenilalanina

MC1-R: Receptores de Melanocortina

MITF: Fatores de Transcrição Associados a Microftalmia

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

Na^+/K^+-ATPase: Bomba de Sódio e Potássio ATPase

NM: Neuromelanina

PAR-2: Receptor II Ativado por Protease

PBS: Tampão Fosfato Salina

PG: Glóbulos Pigmentares de Membrana

PKA: Proteína Quinase A

PKC- β: Proteína Cinase C-β

RE: Retículo Endoplasmático

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

S-01: 2-Etil-3-hidroxi-4H-piran-4-ona

S-02: Ácido 5-hidroxi-4-oxo-4H-pirano-2-carboxílico

S-03: Ácido 3-hidroxi-2metil-4-pirona

S-04: Ácido 3-hidroxi-1,2-dimetil-4(1)-piridona

S-05: 2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-10-fenil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona

S-06: 2-(clorometil)-10-(4-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H, 10H)-diona

S-07: 4-(2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-4,9-dioxo-4,6,7,8,9,10-hexahidropirano[3,2-b]cromen10 -il)benzonitrilo

S-08: 2-(clorometil)-10-(4-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-dihidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H, 10H)-diona

TGN: Rede Trans-Golgi

TH: Tirosina Hidroxilase

TRP-1: Proteínas Relacionadas à Tirosinase 1

TRP-2: Proteínas Relacionadas à Tirosinase 2

UV: Raios Ultravioletas

V_{max}: Velocidade máxima

α K_m: Constante de Michaelis-Menten na presença do inibidor

α: Grau de afinidade

α': Grau de afinidade do inibidor acompetitivo

α-MSH: Hormônio Melanócito Estimulante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 11
1.1 TIROSINASE 11
1.2 MELANOGÊNESE 16
1.3 MECANISMO CINÉTICO APLICÁVEL A TIROSINASE 23
1.4 INIBIDORES DE TIROSINASE 28
2. OBJETIVO 32
2.1 OBJETIVO GERAL 32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32
3. MATERIAIS E MÉTODOS 33
3.1 REAGENTES 33
3.2 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO COM COBRE 33
3.3 ENSAIO ENZIMÁTICO 33
3.4 ENSAIO DE HEMÓLISE 34
3.5 CITOTOXICIDADE EM MELANOMA, FIBROBLASTO E TECIDO NERVOSO 35
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA 36
4. RESULTADOS 37
4.1 EFEITO DA INTERAÇÃO COM COBRE 37
4.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE INIBIÇÃO 37
4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA 44
4.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE 45
5. DISCUSSÃO 49
6. CONCLUSÃO 56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS... 57

1 INTRODUÇÃO

1.1 TIROSINASE

A melanina é um pigmento escuro sintetizado no interior de vesículas denominadas melanossomas (presentes no interior de células especializadas conhecidas como melanócitos), pela ação da enzima tirosinase no processo designado melanogênese (LIN & FISHER, 2007; CICHOREK *et al*, 2013).

A melanina possui inúmeras propriedades que são benéficas para o organismo, dentre elas, absorção de raios ultravioletas (UV) e eliminação de radicais livres induzidos pela exposição aos comprimentos de onda UV, antes que estes interajam com outros componentes celulares (JHAPPAN, NOONAN & MERLINO, 2003; LIN & FISHER, 2007; COSTIN & HEARING, 2007; BUSH & SIMON, 2007; PARK *et al*, 2009; CICHOREK *et al*, 2013).

A melanina não é uma única substância, mas sim um grupo de diversas substâncias, todas com propriedades similares. As melaninas são compostos escuros, formadas pela polimerização oxidativa de compostos fenólicos e indólicos. As melaninas são produzidas por microrganismos, plantas e animais, e facilmente estão complexadas com proteínas ou carboidratos (LANGFELDER *et al*, 2003; FARIAS, 2008).

A tirosinase é uma glicoproteína presente na membrana melanossomal que apresenta três domínios: um interno, que corresponde a região catalítica, contendo resíduos de histidina, as quais se ligam íons cobre; um transmembrana e um citoplasmático que participa no transporte da enzima para os melanossomas (SLOMINSKI *et al*, 2004; SCHALLREUTER *et al*, 2008; PARK *et al*, 2009).

Durante o processo de formação do melanossoma a enzima tirosinase é processada na rede trans-Golgi (TGN), onde obtém dois íons cobre, e em seguida esta enzima é transportada para os melanossomas de fase II via intermediários endossomais. Ainda não está claro como os íons cobres (necessários para a atividade da tirosinase) são integrados a esta enzima, porém, Petris *et al* (2000) e Olivares *et al* (2003) demonstraram que o transporte de cobre de Menkes (presentes na TGN) são necessários para a carga de cobre na tirosinase, independente do enovelamento da enzima (OLIVARES & SOLANO, 2009).

No entanto, os processos de pós-tradução e o tráfego da tirosinase através da via secretora são cruciais para formação da enzima ativa. Desse modo, proteínas como

chaperonas e a calnexina apresentam importante papel por auxiliarem na manutenção do enovelamento correto e no transporte da tirosinase (OLIVARES *et al*, 2003).

A tirosinase (EC 1.14.18.1; L-DOPA oxidoredutase, catecolase, difenoloxidase, polifenol oxidase) é uma enzima que catalisa etapas de oxidação sequenciais com vários substratos fenólicos. Deste modo, esta enzima apresenta atividade bifuncional (figura 01), oxidando fenóis ou catecóis em seus o-difenóis correspondentes. Com atividade de monooxigenase, também chamada de atividade cresolase, pois pode promover a adição de um grupo hidroxila na posição orto do anel aromático; e também atividade difenolase, também chamada de atividade catecolase, pois oxida estes o-difenóis para produzir o-quinonas (oxidação das hidroxilas) (ROOSEBOOM COMMANDEUR, & VERMEULEN, 2004; HAGHBEEN & TAN, 2003).

O mecanismo exato da reação da tirosinase ainda permanece parcialmente obscuro, mas admite-se que a cinética de Michaelis-Menten descreve o processo de oxidação de o-difenol pela tirosinase, enquanto que a hidroxilação de monofenóis por esta mesma enzima é caracterizada como uma fase lag (latência), cuja lenta velocidade de reação não pode ser prevista pela cinética de Michaelis-Menten (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002; OLIVARES, 2003).

A tirosinase é uma enzima “cobre-dependente”, assim dependendo da valência do íon cobre e da ligação deste ao oxigênio molecular, o sítio ativo da tirosinase pode existir em três estados intermediários: desoxi (Cu^{1+}-Cu^{1+}), oxi (Cu^{2+}-O_2-Cu^{2+}) e met (Cu^{2+}-Cu^{2+}). A forma met (E_{met}) é convertida na forma desoxi (E_{desoxi}) pela redução de dois elétrons, esta é capaz de fixar reversivelmente o oxigênio molecular, levando à forma oxi (E_{oxi}) (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002; OLIVARES, 2003).

As moléculas de tirosinase presentes nas células estão principalmente na forma E_{met}, também denominada forma de repouso, a qual é incapaz de se ligar ao oxigênio molecular. Esta forma não catalisa monofenóis (p. ex.: a tirosina), mas tem afinidade para se ligar a eles, resultando em um período de repouso da enzima, no qual há interação química, porém não há catálise (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002; OLIVARES, 2003).

Apesar deste fenômeno, uma pequena porção desta enzima pode estar em uma forma diferente de E_{met}, como E_{oxi}, a qual pode reagir com monofenóis, gerando difenóis, restituindo lentamente a enzima à forma E_{desoxi}, uma vez que apenas uma pequena parcela de enzima funcional encontra-se disponível (figura 01). Contudo, o aumento subsequente no nível de difenóis (p. ex.: L-DOPA) produz um maior recrutamento de E_{desoxi}, pois os difenóis podem reagir com E_{oxi} gerando E_{met} e consequentemente reage com E_{met} gerando E_{desoxi}, o que

favorece para que mais enzimas saiam da condição de sequestro (E_{met}) e possam reagir com monofenois (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002; OLIVARES, 2003).

Este processo continua até que a taxa de transformação de o-difenol para o-quinona se iguale a taxa de geração de o-difenol. O L-DOPA (L-3,4-di-hidroxifenilalanina) é o responsável pelo recrutamento das enzimas que estão na condição de sequestro, pois reduz E_{met} para E_{desoxi} (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002).

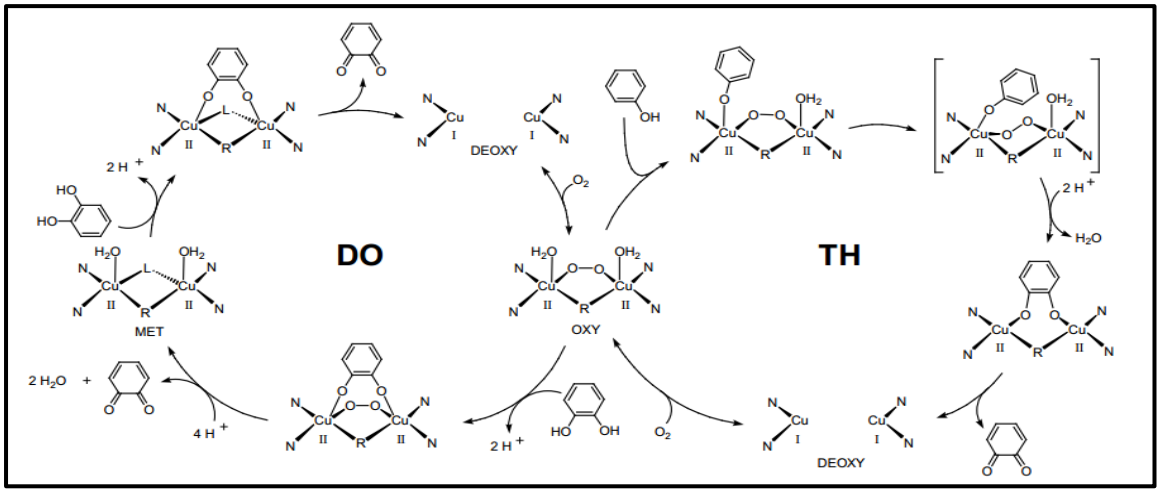

Figura 01: Ciclo catalítico da tirosinase, descrevendo os mecanismos monofenolase (TH) e difenolase (DO) da tirosinase (Fonte: OLIVARES, 2003).

Schallreuter *et al* (2008) relatam que, além do L-DOPA, outras espécies doadoras de elétrons, como peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, ânion superóxido, óxido nítrico, hidroxilamina, ditionito, Fe^{2+} e ditiotreitol podem reagir com a E_{met} transformando-a em E_{desoxi} , e esta consequentemente pode passar para a E_{oxi}.

Segundo o mesmo autor, a tirosinase pode apresentar atividade catecolase e peroxidase, uma vez que esta enzima pode fazer uso de ânion superóxido como substrato para a melanogênese e assim proteger os melanócitos contra essas espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCHALLREUTER *et al*, 2008).

Em humanos, mutações que inativam a tirosinase são responsáveis por albinismo oculocutâneo (albinismo tipo I), que é a forma mais grave do albinismo devido a ausência total de melanina (VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013).

Por outro lado, maior exposição a radiação UV contribui com o aumento de ROS e consequentemente maior expressão de tirosinase como mecanismo de defesa contra estes, uma vez que quantidade excessiva destas espécies reativas se não forem facilmente

eliminadas podem contribuir para o desenvolvimento de melanoma (uma das formas mais agressivas do câncer de pele) (RAO *et al*, 2013).

As tirosinases são amplamente distribuídas em microrganismos, plantas e animais, entretanto, a identidade das sequências genéticas, a estrutura e a região do sitio ativo são conservadas entre as diferentes espécies (OLIVARES & SOLANO, 2009). Estudos são direcionados para a tirosinase de cogumelos (tirosinase de mushroom) devido ser este modelo promissor para se obter maiores informações sobre a estrutura e suas propriedades enzimáticas (CLAUS & DECKER, 2006), tais estudos podem ser usados como base para diversas aplicações biotecnológicas (HALAOULI *et al*, 2006).

Em animais também são relatadas outras duas enzimas (Proteínas Relacionadas à Tirosinase-1 e -2 TRP-1 e TRP-2) que exibem homologia (40%) e identidade (70%) significativa com a tirosinase. Elas, assim como a tirosinase, estão presentes na membrana do melanossoma e são importantes para a transformação dos compostos intermediários em polímeros de melanina mais estruturados (figura 02) (ITO & WAKAMATSU, 2003; OLIVARES & SOLANO, 2009).

A TRP-2, também chamada de dopacromo tautomerase (TRP-2/DCT, EC 5.3.3.12, L-dopacromo isomerase), catalisa a tautomerização ceto-enólica de dopacromo para ácido 5,6-dihidroxiindol carboxílico (DHICA) (figura 02). A TRP-2 atua de forma semelhante a tirosinase, porém requer íons zinco para exercer a sua atividade (VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013). TRP-2 é também marcador de melanoma amelanótico e melanótico, diferente da tirosinase e da TRP-1, as quais estão ausentes em melanomas amelanóticos (LEE *et al*, 2011).

A TRP-1, também denominada de glicoproteína gp 75 (TRP-1/gp 75) é importante para estabilização e ativação da tirosinase. Juntamente com a tirosinase a TRP-1 oxida o DHICA dando origem a eumelanina (figura 02). A TRP-1 também tem um papel importante na síntese de melanossoma, por isso é muitas vezes utilizada como marcador de células em proliferação, pois apresenta imunoreatividade nos melanossomas, tanto em células normais quanto em malignas. Além disso, a TRP-1 diminui a ação do estresse oxidativo devido o seu efeito de peroxidase, por isso está relacionada ao vitiligo, no qual ocorre a morte prematura de melanócitos devido aumento da sensibilidade ao estresse oxidativo causado por alterações na TRP-1. Do mesmo modo, mutações no gene da TRP-1 são responsáveis pelo albinismo oculocutâneo tipo III, resultando em hipopigmentação da pele e do cabelo (GHANEM & FABRICE, 2011; VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013).

Outra enzima que também está presente na membrana melanossomal (adjacente a tirosinase) e no citosol é a tirosina hidroxilase (TH, EC 1,14,16,2), enzima pertencente a uma família de enzimas que promove a catálise em L-aminoácidos aromáticos hidroxilados. A TH presente na membrana melanossomal auxilia na ativação da tirosinase. Quando presente no citosol, a TH catalisa a primeira reação na via de síntese das catecolaminas, convertendo L-tirosina em L-DOPA na presença da tetrahidrobiopterina (BH_4) e do oxigênio, determinando o funcionamento adequado de todo o sistema dopaminérgico (OLIVARES & SOLANO, 2009; LENARTOWSKI & GOC, 2011; VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013).

Deste modo, observa-se que as atividades das enzimas melanogênicas influenciam não somente no tipo de melanina produzida, mas também no controle refinado da síntese deste pigmento, garantindo assim a sobrevivênvia dos melanócitos (ITO & WAKAMATSU, 2003; WAKAMATSU *et al*, 2006;WAN, HU & HE, 2011).

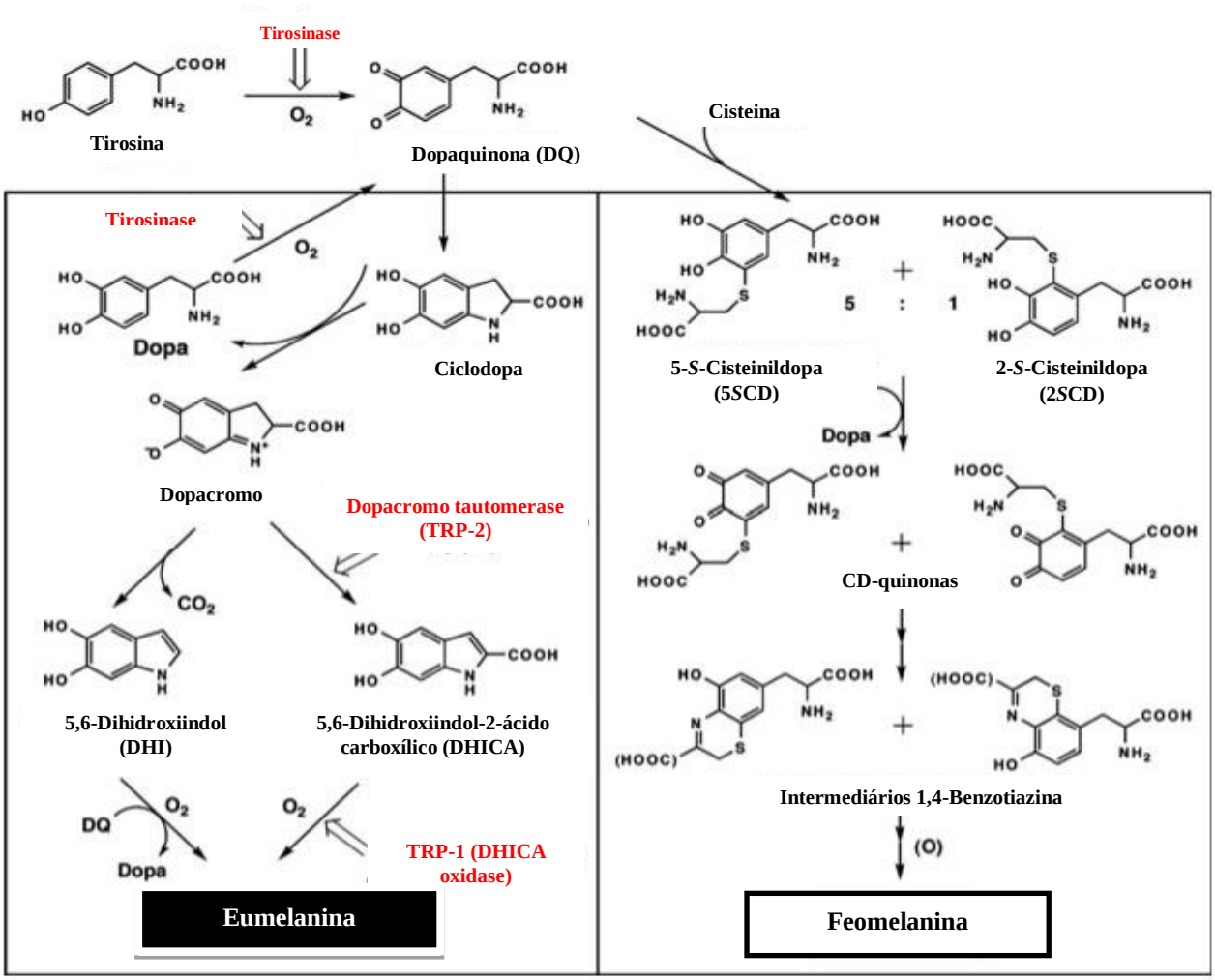

Figura 02: Esquema mostrando a via melanogênica que conduz à formação de eumelanina e / ou feomelanina, com as enzimas melanogênicas envolvidas no processo. (Fonte: Adaptado de ITO & WAKAMATSU, 2011).

1.2 MELANOGÊNESE

A melanogênese é o processo bioquímico responsável pela síntese de melanina, o qual ocorre quando os receptores de melanocortina (MC1-R, receptores da família da proteína G, com sete domínios transmembranares) presentes na membrana dos melanócitos, são ativados pela ligação do hormônio melanócito estimulante (α-MSH), e assim sinalizam para a enzima adenilato ciclase (AC) que catalisa a conversão do trifosfato de adenosina (ATP) para monofosfato de adenosina cíclico (cAMP). O aumento nos níveis de cAMP ativa a proteína quinase A (PKA), a qual se transloca para o núcleo dos melanócitos para fosforilar proteínas de ligação a elementos de resposta ao cAMP (CREB) (figura 03) (HERRAIZ *et al* , 2009).

CREB fosforilada aumenta a expressão de fatores de transcrição associados a microftalmia (MITF), o qual se liga nas sequências promotoras de genes pigmentares, da dopacromo tautomerase (TRP-2/DCT), da TRP-1 e da enzima tirosinase, desse modo promovendo o aumento da síntese de melanina (JHAPPAN, NOONAN & MERLINO, 2003; HOCKER, SING & TSAO, 2008; HERRAIZ *et al*, 2009).

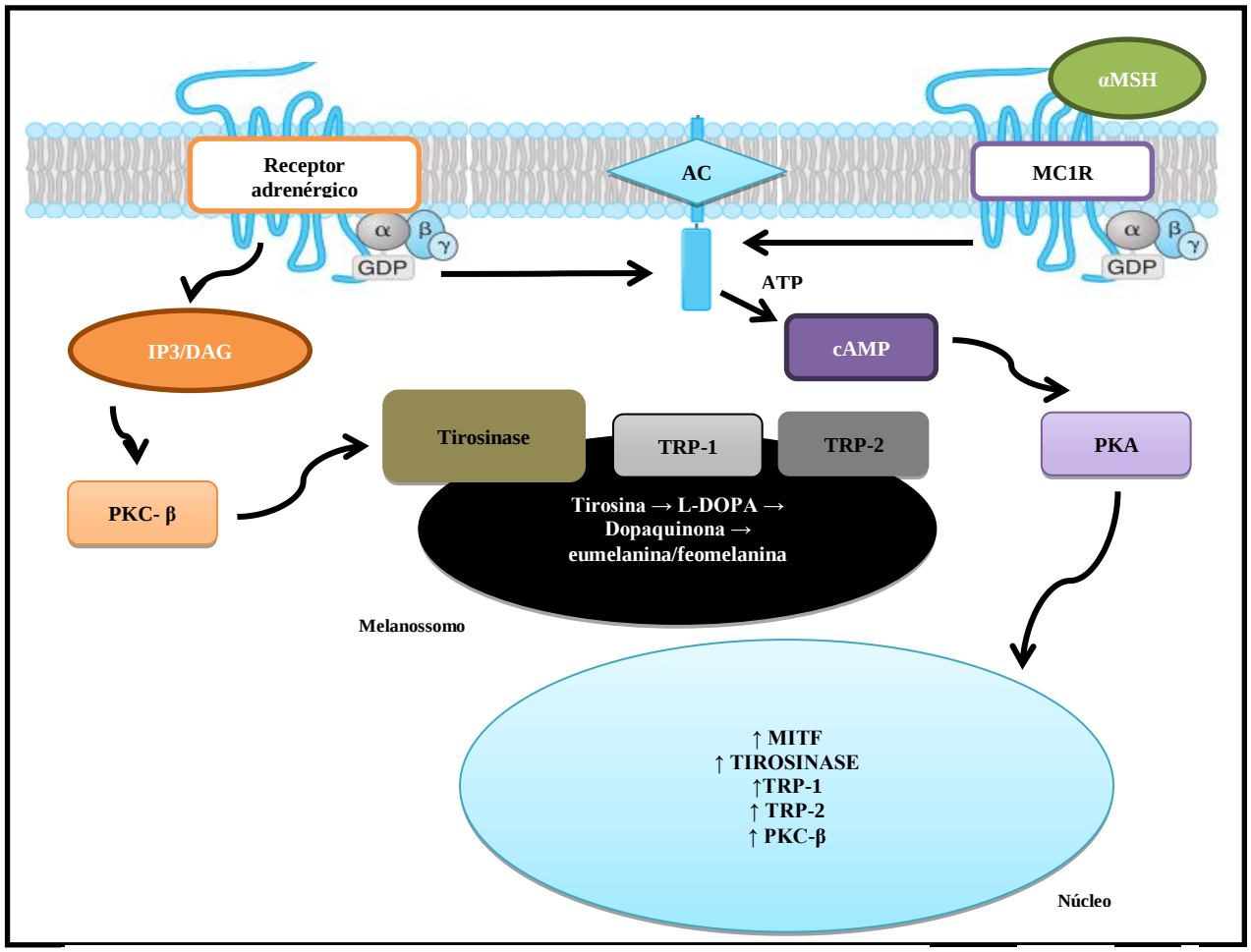

Figura 03: Mecanismo celular da melanogênese via ativação do MC1-R e PKC- β (Fonte: Autor).

A tirosinase também pode ser ativada pela fosforilação de dois resíduos de serina da proteína cinase C-β (PKC- β), em resposta a ativação de receptores α_1-adrenérgicos no melanócito (VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013).

Na pele a melanina é distribuída pelas unidades epidérmicas (figura 04) que são compostas por um melanócito rodeado por queratinócitos (LIN & FISHER, 2007; CICHOREK *et al*, 2013). Também há comunicação entre os elementos da unidade epidérmica e os fibroblastos dérmicos, a qual é estabelecida por fatores segregados e por contato célula-célula (YAMAGUCHI, BRENNER & HEARING, 2007).

Os queratinócitos (figura 04) são os principais componentes da epiderme, constituindo 95% da população desta, eles se replicam na camada basal e sofrem diferenciação celular à medida que migram para a superfície da epiderme. Os queratinócitos são responsáveis pela produção de queratina que funciona como uma barreira de proteção para a pele (JHAPPAN, NOONAN & MERLINO, 2003). Os grânulos de melanina são acumulados na região acima do núcleo dos queratinócitos, agindo como filtro protetor a radiação UV, e sua remoção ocorre quando há descamação das células epidérmicas (PLONKA *et al*, 2009).

Os queratinócitos controlam o crescimento e atividade dos melanócitos através de um sistema de fatores de crescimento parácrinos e através de moléculas de adesão celular (HAASS & HERLYN, 2005; LEE, 2012). Os melanócitos e queratinócitos são também a fonte local dos diferentes hormônios que regulam a proliferação de melanócitos, melanogênese e formação de dendritos melanocíticos (SULAIMON & KITCHELL, 2003).

Os melanócitos (compõem apenas 1-2% da população da epiderme) são derivados a partir de células progenitoras da crista neural que migram para epiderme durante o início do desenvolvimento humano, localizam-se principalmente na junção dermo-epidérmica e sua densidade na pele varia entre as diferentes partes do corpo, numa proporção de 1:4 à 1:10 melanócitos para os queratinócitos basais (ZBYTEK *et al*, 2013; IBRAHIM & HALUSKA, 2009). Porém, os mecanismos precisos que controlam a organização e o número de melanócitos na epiderme são desconhecidos (CICHOREK *et al*, 2013).

A função dos melanócitos epidérmicos (figura 04) é sintetizar, armazenar e transferir os pigmentos de melanina para os queratinócitos. Essa transferência se dá por organelas denominadas melanossomas (que contêm enzimas-chave como a Tirosinase, TRP-1, TRP-2, e o MITF), através de ramificações dendríticas de um melanócito para aproximadamente 36 queratinócitos, na unidade epidérmica (HEARING, 2000; LEE & NOH, 2013; STECK, 2014).

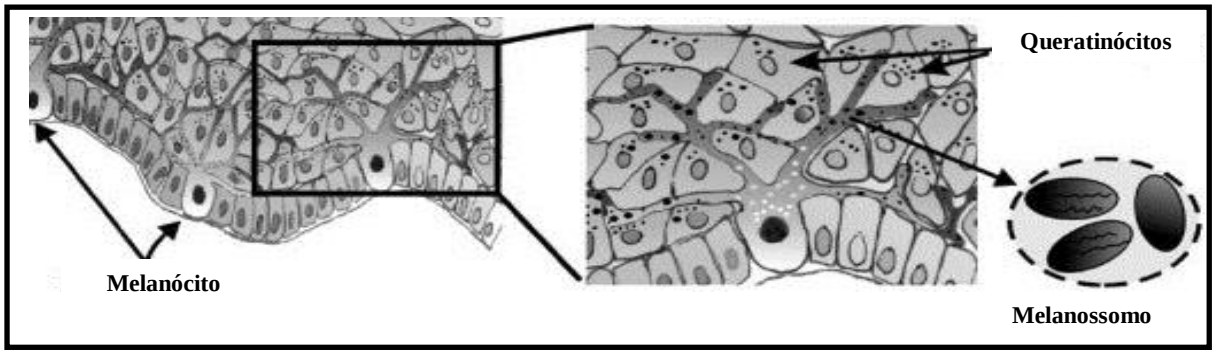

Figura 04: Estrutura da epiderme apresentando os melanócitos da camada basal em comunicação com os queratinócitos formando as unidades epidérmicas. (Fonte: Adaptado de CICHOREK *et al*, 2013).

Estudos ultra-estruturais sugerem que existem quatro estágios de maturação dos melanossomas para formar a melanina (figura 05). A fase I (pré-melanossoma) corresponde ao primeiro vacúolo originado a partir do retículo endoplasmático (RE), o qual não pode sintetizar melanina devido não possuir enzimas melanogênicas (STURM, 2006). A tirosinase será transportada da rede trans-Golgi para os pré-melanossoma originando os melanossomas de fase II que já são capazes de sintetizar melanina do tipo feomelanina, devido a formação dos feomelanossomos nesta fase. Os melanossomas de fase II amadurecem para as fases III (depósito de melanina) e IV (melanócito totalmente cheio de melanina) após o recrutamento das enzimas TRP-1 e TRP-2. Nestas fases há a formação dos eumelanossomos (que produzem eumelanina), os quais necessitam também de uma matriz fibrilar organizada para sua formação. Assim, melanossomas maduros migram para a periferia dos melanócitos para então serem transferidos para os queratinócitos (SLOMINSKI *et al*, 2004; SCHERER & KUMAR, 2010).

Em condições patológicas (por exemplo, melanoma) este processo ordenado de maturação dos melanócitos é desregulado, podendo a tirosinase ser ativada no melanossoma de fase I, e consequentemente a melanina ser depositada no interior de organelas do tipo granular e não globosas como os melanócitos, sem uma matriz fibrilar organizada (SLOMINSKI *et al*, 2004).

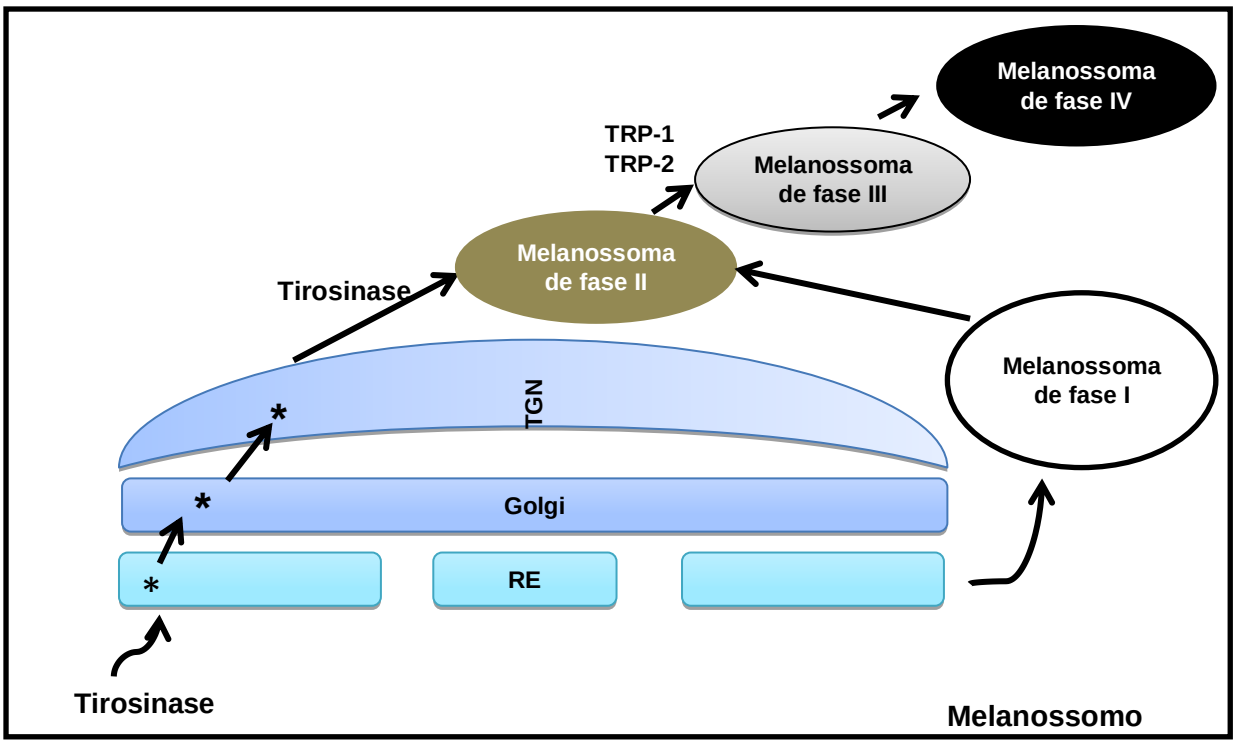

Figura 05: Formação do melanossoma com as enzimas melanogênicas envolvidas. (Fonte: Adaptado de SLOMINSKI *et al*, 2004).

O processo de transferência dos melanossomas para os queratinócitos ainda não é bem esclarecido (figura 06), tendo a fusão de membranas plasmáticas; a liberação de melanossoma no espaço extracelular, com consequente captação por fagocitose pelo queratinócitos; a citofagocitose de dendritros; transferência de vesículas e a "apocopação" (liberação de um pedaço da célula) como possíveis mecanismos (PARK *et al*, 2009; ZBYTEK *et al*, 2013, SCHERER & KUMAR, 2010).

No entanto, Ando *et al* (2011, 2012) propõe um modelo de transporte vesicular, onde glóbulos pigmentares de membrana (PG) contendo múltiplos melanossomas e algumas mitocôndrias são formados a partir de filipódias nos denditros dos melanócitos, e então liberados para o espaço extracelular, onde estes PG são capturados pelas microvilosidades dos queratinócitos, que por ação da via do receptor II ativado por protease (PAR-2), terá a membrana do PG degradada, liberando os melanossomas no citoplasma dos queratinócitos (figura 05 D).

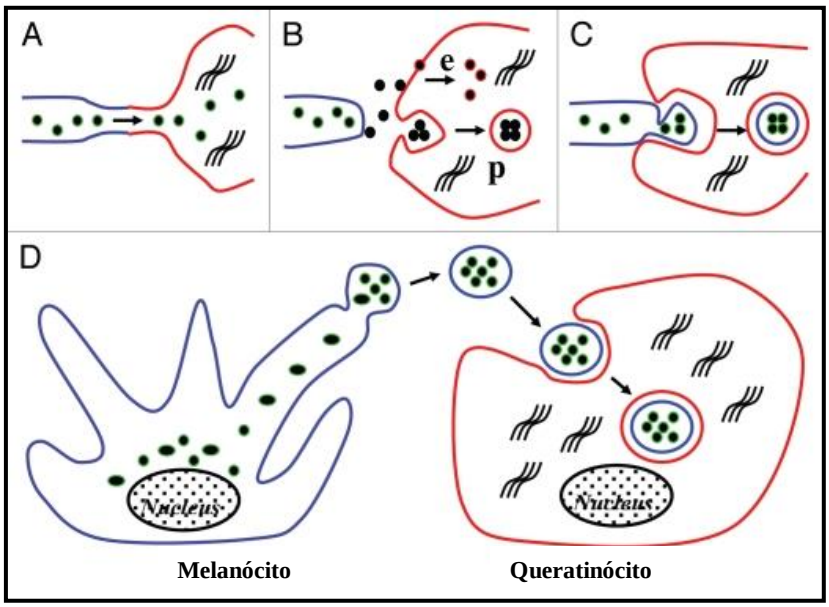

Figura 06: Esquema representando os possíveis tipos de transferência melanossomal. (A) Conceito tradicional mostrando filipódia nanotubular, (B) Conceito tradicional mostrando endocitose em "e" e fagocitose em "p". (C) Conceito tradicional mostrando citofagocitose e (D) Novo mecanismo proposto por Ando *et al* (2011).

As diferenças raciais e étnicas na cor da pele estão relacionadas com o número, tamanho, forma, distribuição e degradação dos melanossomas (TSATMALI, ANCANS & THODY, 2002; COSTIN & HEARING, 2007; LIN & FISHER, 2007; LEE & NOH, 2013).

A presença de melanina no corpo humano não está restrita apenas a epiderme, pois a literatura relata a presença deste pigmento na retina, íris, orelha interna e em células dopaminérgicas e noradrenérgicas. Sendo que os melanócitos extracutâneos sintetizam e armazenam em seus citoplásmas os pigmentos de melanina, não transferindo-os para células adjacentes, tal como os melanócitos epidérmicos (BRITO & KOS, 2008; FEDOROW *et al*, 2005; CICHOREK *et al*, 2013).

Com base nas suas moléculas precursoras, as melaninas são classificadas em quatro grupos: Feomelanina (solúvel, formado a partir da polimerização oxidativa da cisteína-dopa, com coloração avermelhado-amarelado); eumelanina (insolúvel, formado a partir de sequências oxidativas da tirosina, L-3,4-di-hidroxifenilalanina (L-DOPA), dopamina e outras catecolaminas, com coloração acastanhada-preta); neuromelanina (formada pela polimerização oxidativa de algumas moléculas de dopamina e noradrenalina, sendo que este mecanismo ainda não está bem elucidado) e alomelanina (formado pela oxidação de polifenóis, como catecóis e 1,8-dihidroxinaftaleno, amplamente difundida em fungos) (PALMER *et al*, 2000; JHAPPAN, NOONAN & MERLINO, 2003; FEDOROW *et al*, 2005; ITO & WAKAMATSU, 2010).

Os tipos de melanina a serem produzidos dependem da disponibilidade de substratos e da enzima melanogênica (figura 07). Assim, a tirosinase realiza a hidroxilação de L-tirosina em L-DOPA e do L-DOPA a dopaquinona (etapas limitantes da velocidade de síntese de melanina). A dopaquinona pode reagir com a cisteína-dopa originando a 2- ou 5-cisteina-dopa que em seguida sofrer polimerização oxidativa formando a feomelanina (ITO & WAKAMATSU, 2003; SLOMINSKI *et al*, 2004; SIMON *et al*, 2009; HEARING, 2011; ITO & WAKAMATSU, 2011).

Na ausência de tióis, a dopaquinona sofre ciclização espontânea para dopacromo, o qual perde espontaneamente ácido carboxílico e gera 5,6-dihidroxiindol (DHI), que rapidamente se oxida e polimeriza para formar a eumelanina. No entanto, se a dopacromo tautomerase (TRP-2/DCT) estiver presente o dopacromo formará o ácido 5,6-dihidroxiindol carboxílico (DHICA) que sofrerá catálise pela tirosinase e TRP-1 originando também a eumelanina (ITO & WAKAMATSU, 2003; SLOMINSKI *et al*, 2004; SIMON *et al*, 2009; HEARING, 2011; VIDEIRA , MOURA & MAGINA, 2013).

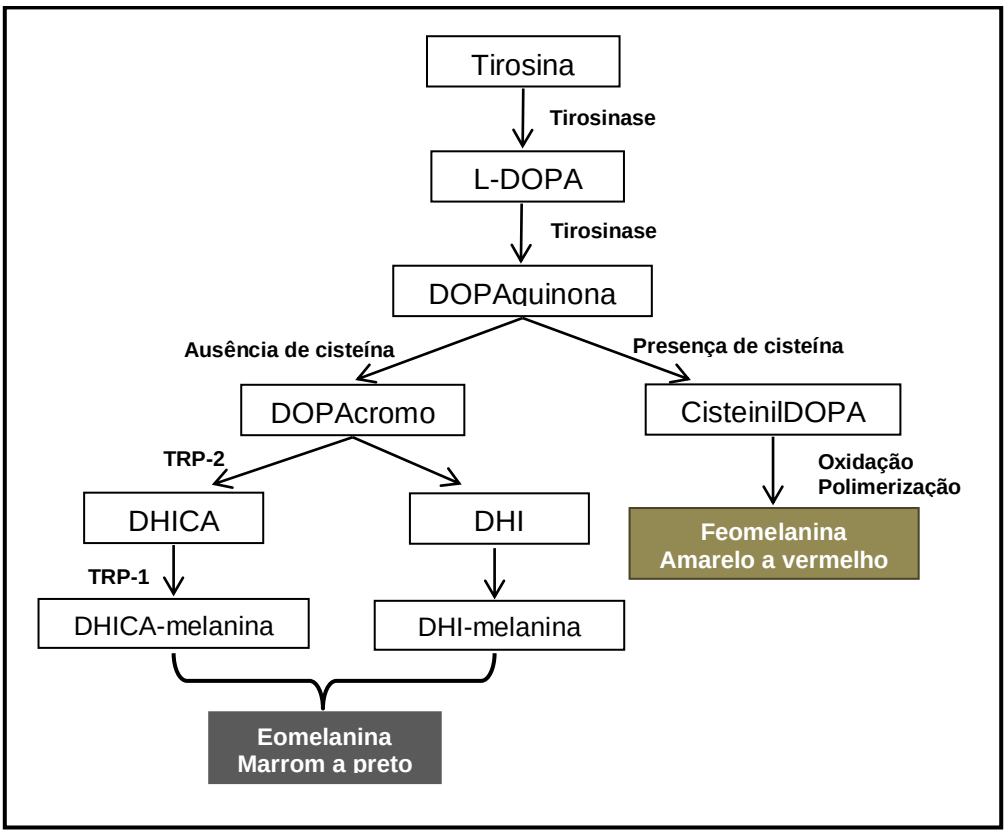

Figura 07: Síntese de melanina, nos melanócitos, durante a melanogênese. (Fonte: Adaptado de CICHOREK *et al*, 2013).

A melanina do cabelo é uma mistura de eumelanina e feomelanina, sendo que a proporção entre elas determina a cor do cabelo (ITO & WAKAMATSU, 2011). A melanina no cabelo preto é de 99% eumelanina, enquanto em cabelos loiros há apenas cerca de 23% de eumelanina, já cabelos vermelhos contém eumelanina e feomelanina na proporção de 1:1 (ITO & WAKAMATSU, 2010). A eumelanina é muito mais eficiente que a feomelanina no processo de proteção contra raios UV, por isso os cânceres de pele são mais comuns em pessoas de pele clara (TSATMALI, ANCANS & THODY, 2002; CHIN, 2003; ROUZAUD *et al*, 2005).

A melanina presente no epitélio pigmentar da retina é principalmente eumelanina, independente da cor da pele, enquanto que este pigmento na íris pode ser eumelanina ou feomelanina. A quantidade de melanina presente nos olhos influencia no processo de adaptação à luz após um período de escuridão, logo quanto menor a quantidade de melanina presente nos olhos, maior a dificuldade de adaptação à claridade (BEHN *et al*, 2003), além disso é postulado que a melanina tem um papel no desenvolvimento da retina, porém este mecanismo ainda não está bem elucidado. (OETTING, 2000).

Não existem estudos conclusivos em humanos que investiguem os tipos de melanina dentro da estria vascular da orelha interna, mas estudos em camundongos demonstraram o predomínio de eumelanina (BARTELS *et al*, 2001; FEDOROW *et al*, 2005). Sabe-se que os melanócitos presentes na estria vascular da orelha interna são responsáveis por manter uma composição iônica normal neste tecido através de uma bomba de Na^+/K^+-ATPase e dos canais de potássio, sendo assim essenciais para a audição em mamíferos (TACHIBANA, 2001).

A neuromelanina (NM) é produzida somente no sistema nervoso, principalmente no mesencéfalo (substancia nigra) por uma população específica de neurônios dopaminérgicos e noradrenérgicos. Segundo Fedorow *et al* (2005) este pigmento está presente principalmente em humanos, em quantidades menores em primatas e ausentes nas demais ordens taxonômicas. Este autor afirma ainda que a produção de neuromelanina se dá através de uma via simples de auto-oxidação, que não depende de ligação a enzima tirosinase. Apesar deste relato de ausência da produção de neuromelanina nas demais ordens, Romeo *et al* (2014) afirma que é possível induzir a produção deste pigmento em ratos Sprague-Dawley através de estímulo luminoso.

Na literatura é reportado que a neuromelanina desempenha um possível papel protetor no interior da célula, evitando o acúmulo de substâncias tóxicas, tais como pesticidas e neurolépticos (LAI *et al*, 2002; ZECCA *et al*, 2003; OSTERGREN *et al*, 2004; FEDOROW *et al*, 2005). Este pigmento também possui a capacidade de se ligar a metais como ferro,

zinco, cobre, manganês, crómio, cobalto, chumbo, mercúrio e cádmio (ZECCA *et al*, 2002). Também há evidências de que o grau de pigmentação dos neurônios do mesencéfalo pode ser utilizado como critério no diagnóstico da doença de Parkinson, pois a diminuição de neuromelanina no mesencéfalo favorece o desenvolvimento desta doença (FEDOROW *et al*, 2005).

Assim o conhecimento dos mecanismos cinéticos das enzimas envolvidas no processo de melanogênese e das substâncias que podem alterar esses mecanismos constitui um nicho científico importante que pode favorecer o desenvolvimento de novos medicamentos e aditivos alimentares (VIDEIRA, MOURA & MAGINA, 2013).

1.3 MECANISMO CINÉTICO APLICÁVEL A TIROSINASE

A tirosinase, em sua fase difenolase, apresenta um comportamento cinético de acordo com o postulado por Leonor Michaelis e Maud Menten, os quais definem que a etapa limitante da velocidade de uma reação enzimática é a quebra do complexo enzima-substrato (ES) em produto (P) e enzima livre (E), o que foi denominado de hipótese do estado estacionário (JOHNSON, 2013).

Na cinética Michaeliana, na qual participa um único substrato, para uma concentração fixa de enzima, a atividade do estado estacionário varia hiperbolicamente com o aumento da concentração do substrato (S) até se aproximar de uma velocidade máxima (V_{max}), na qual toda a enzima presente forma um complexo com o substrato gerando ES, nesta condição, diz-se que a enzima está "saturada" com o S, e o aumento de S na reação não é capaz de alterar a velocidade (figura 08a) (NELSON & COX, 2011, p. 195).

A relação entre a concentração do substrato (S) e a velocidade máxima (V_{max}) é estabelecida por meio de K_m (constante de Michaelis-Menten), como mostra a equação de Michaelis-Menten: $\boldsymbol{V_0} = \frac{V_{max}\,[S]}{K_m + [s]}$ (VOET *et al*, 2008, p. 364; NELSON & COX, 2011, p. 196-198; JOHNSON, 2013).

A constante de Michaelis-Menten (K_m) geralmente é usada como um indicador de afinidade da enzima pelo substrato, de modo que K_m é único para cada par enzima-substrato, assim, substratos diferentes que agem com uma dada enzima apresentam valores de K_m diferentes, reciprocamente, enzimas diferentes agindo sobre um mesmo substrato possuem valores de K_m diferentes (VOET *et al*, 2008, p. 364; NELSON & COX, 2011, p. 196-198; JOHNSON, 2013). No entanto, Nelson & Cox (2011, p. 198) destaca que aspectos específicos

do mecanismo da reação enzimática como o número e as velocidades relativas das várias etapas da reação influenciam no verdadeiro significado de K_m.

A definição operacional estabelece que K_m é numericamente igual a concentração do substrato capaz de gerar metade da V_{max} de reação, sendo expressa como: $Km = \frac{Vmax}{2}$ (VOET *et al*, 2008, p. 364; NELSON & COX, 2011, p. 196-198; JOHNSON, 2013).

A equação de Michaelis-Menten pode sofrer transformações e assim evidenciar uma análise específica. Um exemplo é a transformada duplo-recíproca denominada de equação de Lineweaver-Burk: $\frac{1}{V_0} = \frac{1}{Vmax*[S]} + \frac{1}{Vmax}$ (figura 08b). Esta equação permite uma determinação cuidadosa dos dados experimentais de V_{max} (eixo das abcissas), K_m (eixo das ordenadas) e dos mecanismos de inibição de enzimas (VOET *et al*, 2008, p. 367; NELSON & COX, 2011, p. 197; JOHNSON, 2013).

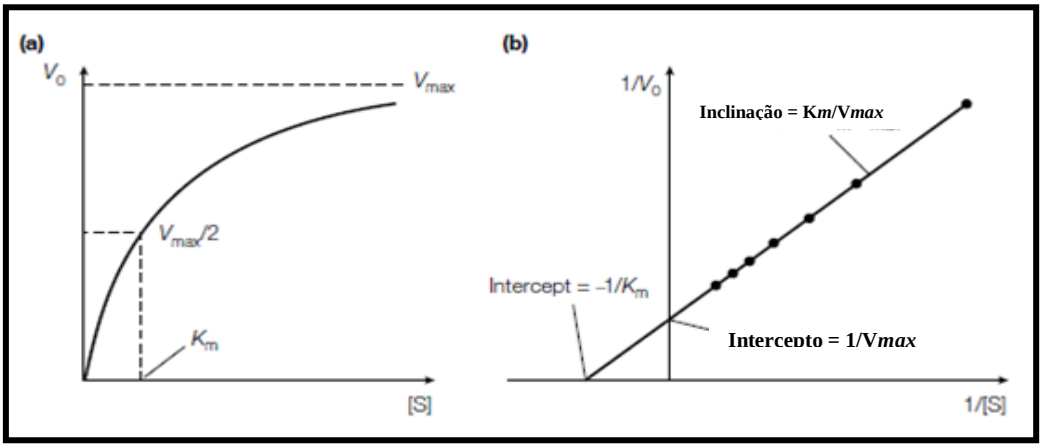

Figura 08: Esquema mostrando os gráficos com os parâmetros cinéticos da equação de Michaelis-Menten (a) e a transformada duplo-recíproca de Lineweaver-Burk (b) (Fonte: http://www.expertsmind.com/topic/enzyme-kinetics/lineweaverburk-plot-94296.aspx).

Substâncias denominadas inibidores enzimáticos (I) alteram a atividade da enzima, diminuindo ou interrompendo a catálise. Como as enzimas estão envolvidas em quase todos os processos celulares, os inibidores enzimáticos estão entre os medicamentos mais importantes (VOET *et al*, 2008, p. 370; NELSON & COX, 2011, p. 201).

Existem duas classes de inibidores enzimáticos: Irreversíveis e reversíveis. Os inibidores irreversíveis ligam-se covalentemente a enzima, ou formam uma ligação não-covalente estável, ou ainda destroem um grupo funcional essencial para a atividade da mesma. Os inibidores enzimáticos reversíveis podem diminuir a atividade da enzima de forma

competitiva, acompetitiva ou mista (VOET *et al*, 2008, p. 370; NELSON & COX, 2011, p. 201).

Os Inibidores competitivos (figura 09) competem com o substrato pelo sítio ativo da enzima. Muitos destes inibidores apresentam estrutura similar à estrutura do substrato e combinam-se com a enzima formando um complexo EI, porém não há reação. Na presença de um inibidor competitivo, a equação de Michaelis-Menten torna-se: $V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + [s]}$, onde αK_m corresponde ao K_m observado na presença do inibidor (também chamado de K_m aparente – $K_{m\ app}$).

O grau de afinidade do inibidor competitivo pela enzima é influenciado por um fator α que relaciona diretamente a concentração do inibidor (I) com a constante de inibição (K_i), como expressa a equação: $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_i}$, sendo K_i a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor à enzima, de modo que $K_i = \frac{[EI][I]}{[EI]}$ (VOET *et al*, 2008, p. 372-377; NELSON & COX, 2011, p. 202).

A competição não altera V_{max}, uma vez que maiores concentrações de substrato são capazes de deslocar o inibidor do sítio ativo da enzima, e assim a reação se processa normalmente, porém aumenta o $K_{m\ app}$ devido a afinidade com a enzima exercida pelo inibidor (VOET *et al*, 2008, p. 371-372; NELSON & COX, 2011, p. 202).

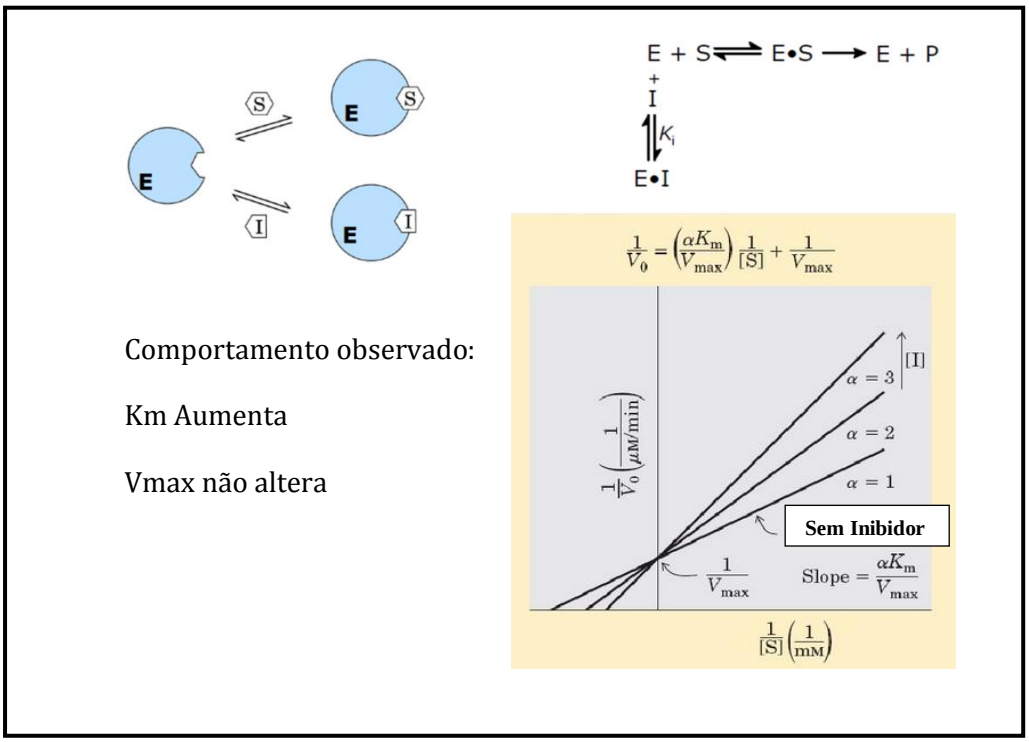

Figura 09: Esquema do mecanismo de inibição competitiva com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente (Fonte: Adaptado de NELSON & COX, 2011, p. 201-202).

Outro tipo de inibição reversível é a acompetitiva (ou incompetitiva) (figura 10), nesta não há semelhança entre o inibidor e o substrato, e o inibidor liga-se diretamente ao complexo ES (em um sítio diferente do sítio ativo) fazendo com que a enzima neste complexo seja inativada, isso é refletido nos parâmetros V_{max} e K_m, os quais sofrem diminuição. Esta relação é expressa na equação de Michaelis-Menten para este tipo de inibição, onde: $V_0 = \frac{Vmax\,[S]}{Km+\alpha'[s]}$, nesta equação α é indicado como α' e ele multiplica a concentração do substrato no denominador da equação e não o K_m, sendo expresso como: $\alpha' = 1+\frac{[I]}{Ki'}$, onde K_i' é a constante de equilíbrio para a ligação do inibidor acompetitivo, de modo que $Ki' = \frac{[ESI][I]}{[ESI]}$ (VOET *et al*, 2008, p. 372-377; NELSON & COX, 2011, p. 203).

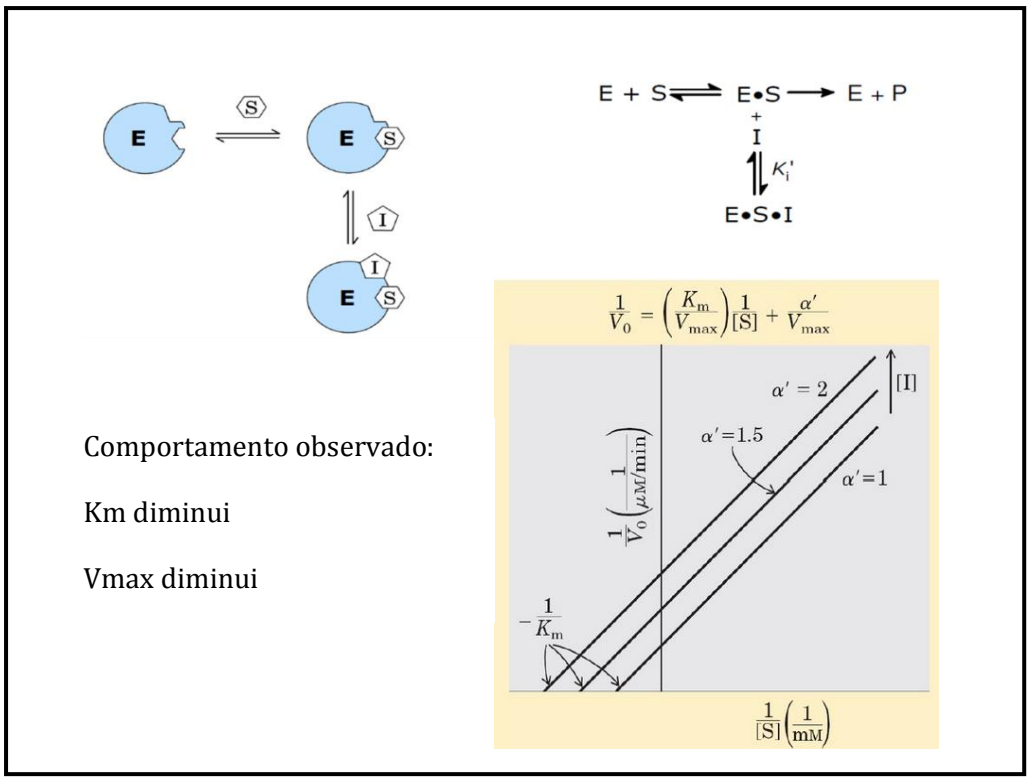

Figura 10: Esquema do mecanismo de inibição acompetitiva com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente **(**Fonte: Adaptado de NELSON & COX, 2011, p. 201-202).

Inibidores reversíveis também podem agir de maneira mista (figura 11), interagindo tanto com a enzima quanto com o complexo enzima-substrato (inibição mista), logo o inibidor que apresenta este comportamento tem afinidade pelo sítio ativo da enzima e por outros sítios de ligação. Nesse tipo de inibição a equação de Michaelis-Menten também sofre uma adaptação,

sendo expressa como: $V_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_m + \alpha'[s]}$. Por apresentar o fator α multiplicando K_m (como na inibição competitiva) e α' multiplicando S (como na inibição acompetitiva) essa inibição é chamada mista, causando diminuição de V_{max} e aumento ou diminuição de K_m, dependendo dos valores de α e α' (VOET *et al*, 2008, p. 377; NELSON & COX, 2011, p. 203).

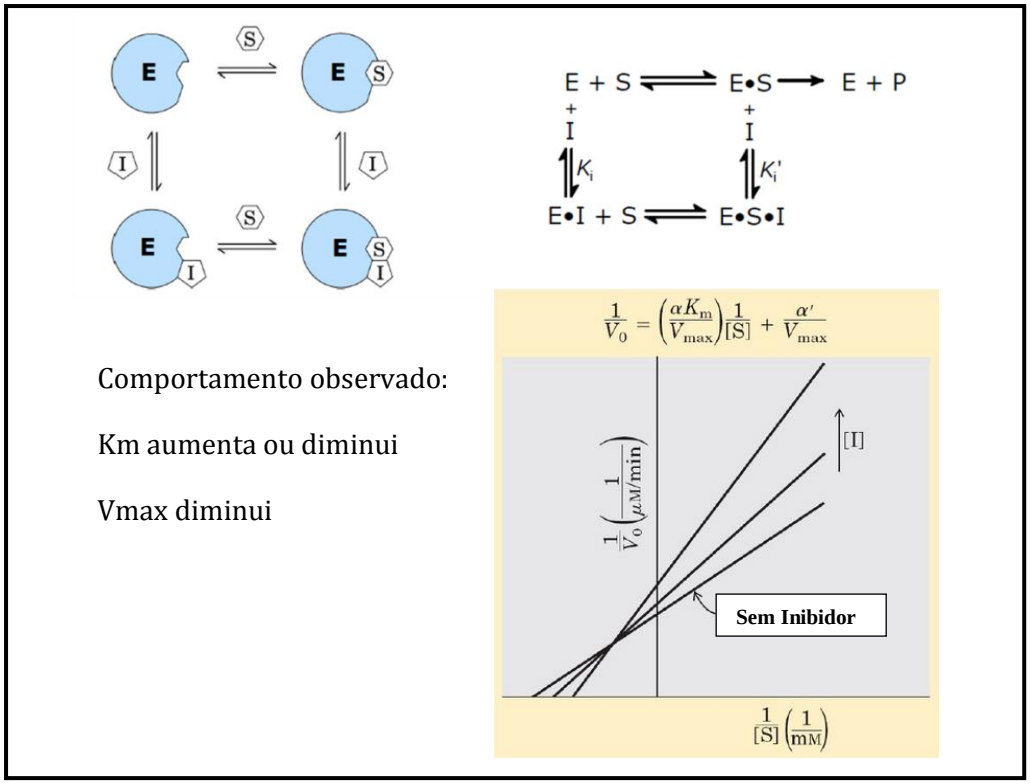

Figura 11: Esquema do mecanismo de inibição mista com o gráfico Lineweaver-Burk correspondente (Fonte: Adaptado de NELSON & COX, 2011, p. 201-202).

Quando em uma inibição mista a enzima livre e o complexo enzima-substrato forem capazes de se ligar ao inibidor com a mesma afinidade, indica que $\alpha = \alpha'$, refletindo apenas na diminuição de V_{max}, sem alteração de K_m aparente. Este fenômeno é denominado inibição não-competitiva pura (figura 12) (VOET *et al*, 2008, p. 377).

O complexo ESI (formado nos tipos de inibição acompetitiva, mista e não-competitiva pura) apresenta menor eficiência em formar produto, o que é refletido na diminuição do V_{max} nos tipos de inibição que formam este complexo (MURRAY *et at* 2007, p. 64).

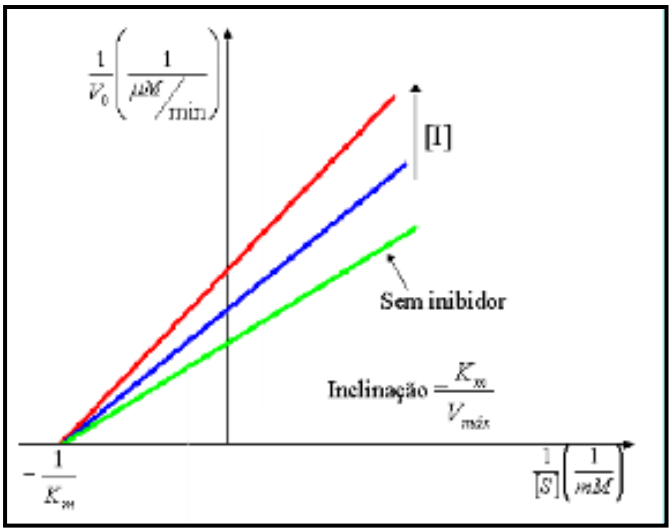

Figura 12: Gráfico Lineweaver-Burk do mecanismo de inibição não-competitiva pura (Fonte: http://www.docstoc.com/docs).

1.4 INIBIDORES DE TIROSINASE

Embora a melanina apresente principalmente ação fotoprotetora na pele humana, o acúmulo anormal de melanina originando manchas pigmentadas pode se tornar um problema estético significativo, influenciando na qualidade de vida de pessoas que apresentam essa desordem. Do mesmo modo, o escurecimento enzimático em frutas e fungos é indesejável, uma vez que diminui o valor comercial desses produtos (CHANG, 2009; SAGHAIE *et al*, 2013).

Tais fenômenos estão diretamente relacionados ao poder de catálise exercido pela enzima tirosinase, assim, o entendimento desse mecanismo cinético e a busca por novas substâncias capazes de regular o comportamento desta enzima são fatores chaves para o tratamento das desordens de pigmentação. Cada vez mais busca-se novos inibidores de tirosinase (de origem natural ou sintética) para uso em alimentos e cosméticos, na maioria dos estudos conduzidos para investigar novos inibidores utiliza-se como padrão positivo o ácido kójico (CHANG, 2009; SAGHAIE *et al*, 2013).

O ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-γ-pirona, figura 13) é um metabólito fúngico que atua como agente quelante de íons de metais de transição (como o Cu^{+2} e Fe^{+3}), sendo capaz de eliminar radicais livres (KIM E UYAMA, 2005; SAGHAIE *et al*, 2013). É utilizado como agente clareador de pele (LIM, 1999; NOHYNEK *et al*, 2004; HA *et al*, 2007; CICHOREK *et al*, 2013), e possui atividade como aditivo alimentar para evitar o escurecimento enzimático de alimentos (BURDOCK *et al*, 2001; BLUMENTHAL, 2004;

BENTLEY, 2006; CHANG, 2009); como agente anti-tumoral (BURDOCK *et al*, 2001; GOMES *et al*, 2001; MOTO *et al*, 2006; TAMURA *et al*, 2006) e radioprotetor (EMAMI *et al*, 2007).

O ácido kójico inibe competitivamente a etapa monofenolase da tirosinase, já na etapa difenolase desta enzima o ácido kójico atua como inibidor misto (SCHURINK *et al*, 2007; CHANG, 2009; SAGHAIE *et al*, 2013). Desse modo, o mecanismo desempenhado por este agente envolve a afinidade pelo sítio ativo da enzima, onde há quelação dos íons Cu^{+2} presentes, e a ligação em um sítio diferente do ativo, realizando inibição não-competitiva (SENDOVSKI *et al*, 2011).

Apesar destes benefícios, o ácido kójico é utilizado de forma limitada pela indústria de cosméticos, uma vez que este agente causa irritação da pele devido a sua citotoxicidade e as formulações com este agente são instáveis, o que dificulta o armazenamento (SAGHAIE *et al*, 2013).

Além do ácido kójico, a literatura relata vários agentes, pertencentes a diferentes classes metabólicas, com possível atividade anti-tirosinase, como os apresentados na tabela 01.

Tabela 01: Substâncias com atividade anti-tirosinase.

SUBSTÂNCIAS COM ATIVIDADE ANTI-TIROSINASE	REFERÊNCIA
Polifenóis (kaempferol, galangina e a quercetina)	KUBO *et al*, 2000a
Benzaldeídos e derivados de benzoatos(como ácido gálico, ácido benzóico, anísico, anisaldeído, ácido cinâmico e ácido metoxicinâmico)	LEE, 2002; KUBO *et al*, 2000b; KUBO *et al*, 2003
Lipídios de cadeias longas (como triacilglicerol e trilinoleína)	JEON *et al*, 2006
Fitoesteróis, como os isolados de partes aéreas da *Trifolium balansae*	SABUDAK *et al*, 2006
Antraquinonas como 1,8-di-hidroxi-2-metoxi-3-metilantraquinona	LEU *et al*, 2008
Inativadores irreversíveis (como cloreto de cetilpiridínio, 3,5-di-hidroxifenil-decanoato).	CHEN *et al*, 2003; QIU *et al*, 2005

Apesar da indústria de cosméticos disponibilizar no mercado tratamentos já estabelecidos para hiperpigmentação, como hidroquinona, arbutina, ácido kójico, aloesin, e 4-

n-butil-resorcinol que são potentes agentes farmacológicos, estes frequentemente apresentam reações adversas, o que limita seu uso (HYOJIN *et al*, 2012).

Como os agentes anti-tirosinase podem funcionar através de diferentes mecanismos (controlando a atividade e a transcrição da tirosinase, TRP-1 e TRP-2; interferindo na captação e distribuição dos melanossomas em queratinócitos e/ou regulando a degradação e *turnover* da melanina e dos melanossomos nos queratinócitos), a associação de agentes anti-tirosinase, combinando mecanismos de ação diferentes, vem sendo utilizada, garantindo assim melhor eficiência (HYOJIN *et al*, 2012). Todavia, a citotoxicidade, a estabilidade e a permeabilidade desses agentes ainda constituem um desafio a ser transposto (BATTAINI *et al*, 2002; HYOJIN *et al*, 2012 ; SAGHAIE *et al*, 2013).

Deste modo, a utilização de técnicas recentes de modelagem molecular pode ser de grande utilidade para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos planejados pela análise de dados teóricos, da estrutura-atividade de forma tridimensional, envolvendo a invenção, descoberta, planejamento, identificação e preparação de compostos biologicamente ativos, com o estudo do seu metabolismo, a interpretação do seu modo de ação molecular e a construção das relações entre estrutura e atividade biológica (CARVALHO *et al*, 2003).

Nesta perspectiva, o Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da UFPA através de técnicas de modelagem molecular, investigaram o potencial anti-tirosinase dos análogos do ácido kójico derivados de 4H- pironas (figura 13): 2-Etil-3-hidroxi-4H-piran-4-ona **(S-01)**; Ácido 5-hidroxi-4-oxo-4H-pirano-2-carboxílico **(S-02)**; Ácido 3-hidroxi-2metil-4-pirona **(S-03)** e Ácido 3-hidroxi-1,2-dimetil-4(1)-piridona **(S-04)**, que já são moléculas conhecidas, porém pela primeira vez analisados teoricamente para este fim (LIMA *et al*,2014).

Também foram investigadas o potencial anti-tirosinase das substâncias inéditas, quimicamente planejadas e sintetizadas por este laboratório, como análogos do ácido kójico derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (figura 13): substâncias 2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-10-fenil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-05)**; 2-(clorometil)-10-(4-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-06)**; 4-(2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-4,9-dioxo-4,6,7,8,9,10-hexahidropirano[3,2-b]cromen-10-il)benzonitrilo **(S-07)** e 2-(clorometil)-10-(2-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-dihidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-08)**.

Assim, no presente trabalho buscamos investigar experimentalmente se tais substâncias são inibidores de tirosinase e apresentam efeito citotóxico em diferentes culturas celulares.

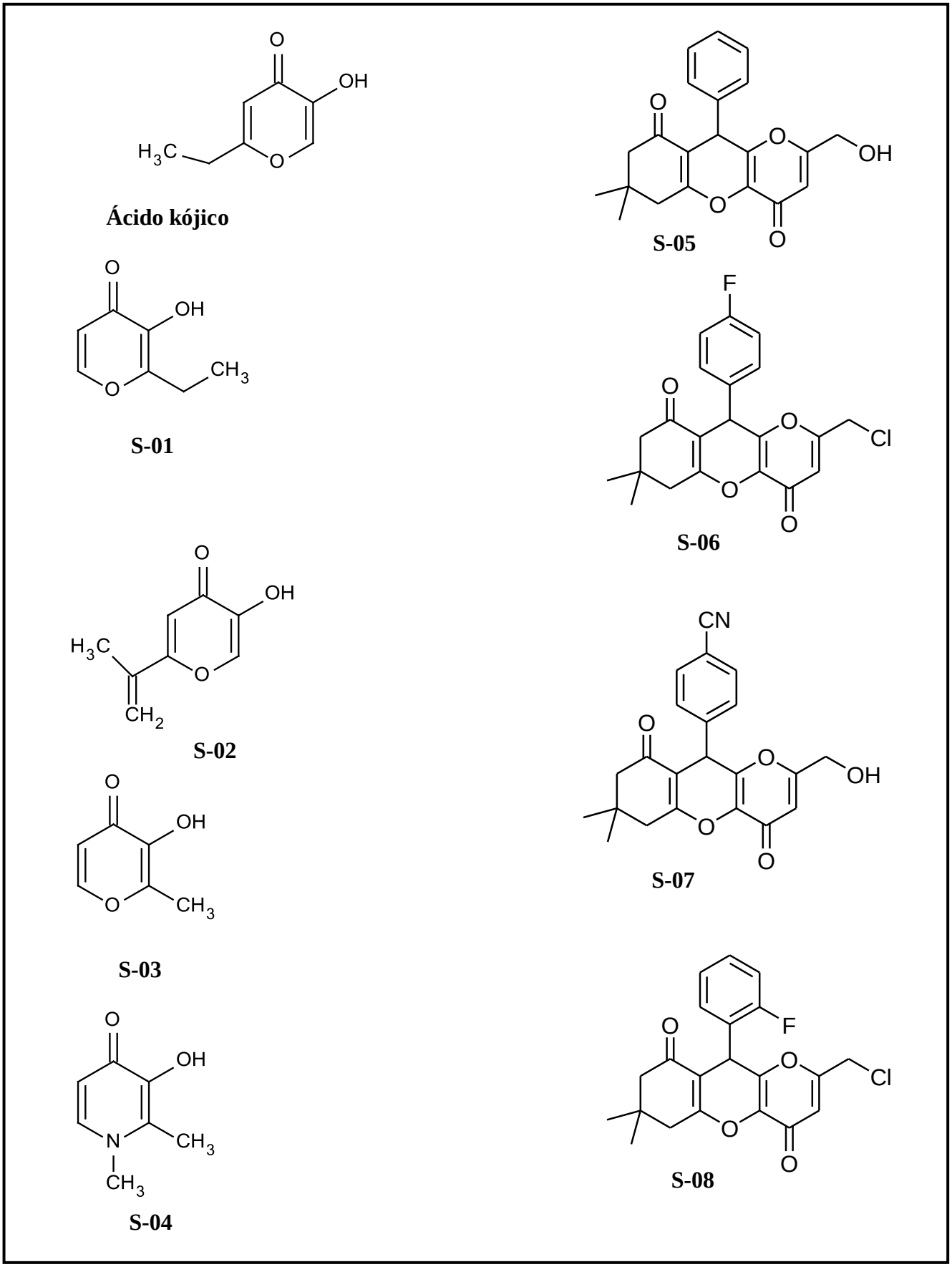

Figura 13: Estrutura molecular do ácido kójico e seus análogos derivados de 4H- pironas (S-01, S-02, S-03 e S-04) e derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (S-05, S-06, S-07 e S-08) utilizados neste trabalho (Fonte: Autor).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar bioquimicamente a ação inibidora de tirosinase e o efeito citotóxico *in vitro* de análogos do ácido kójico derivados de 4H-pironas e derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a capacidade de ligação do ácido kójico e seus análogos com o cobre II (Cu^{2+}) pelo deslocamento de pico de absorvância no espectro UV-Visível;
- Determinar os parâmetros cinéticos da tirosinase na reação com L-DOPA, de acordo com a equação de Michaelis-Menten;
- Determinar os parâmetros cinéticos e o mecanismo de inibição do acido kójico e de seus análogos na reação enzimática com a tirosinase;
- Examinar o grau de segurança da integridade de membranas celular perante a incubação com ácido kójico ou seus análogos;
- Avaliar o grau de citotoxicidade do ácido kójico ou seus análogos em diferentes culturas celulares (B16F10 – células de melanoma de camundongos; MRC_5 – fibroblasto fetal de pulmão humano e retina de embrião de galinha – E7C8).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

Os reagentes: Tirosinase de mushroom, L-DOPA, Sulfato de cobre II, dimetilsulfóxido (DMSO) e Ácido kójico foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich. As substâncias: 2-Etil-3-hidroxi-4H-piran-4-ona **(S-01)**; Ácido 5-hidroxi-4-oxo-4H-pirano-2-carboxílico **(S-02)**; Ácido 3-hidroxi-2metil-4-pirona **(S-03)**; Ácido 3-hidroxi-1,2-dimetil-4(1)-piridona **(S-04)**; 2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-10-fenil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-05)**; 2-(clorometil)-10-(4-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-di-hidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-06)**; 4-(2-(hidroximetil)-7,7-dimetil-4,9-dioxo-4,6,7,8,9,10-hexahidropirano[3,2-b]cromen-10-il)benzonitrilo **(S-07)** e 2-(clorometil)-10-(4-fluorofenil)-7,7-dimetil-7,8-dihidropirano[3,2-b]cromeno-4,9(6H,10H)-diona **(S-08)** foram cedidas pelo Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, do Instituto de Ciências Exatas e Naturais da UFPA.

3.2 DETERMINAÇÃO DA INTERAÇÃO COM COBRE

Para determinar o poder de quelação de Cu^{2+} pelo ácido kójico e seus análogos foi realizada uma curva espectral UV-visível (250-500 nm) de acordo com Kubo *et al* (2000a). Sendo usada uma solução de sulfato de cobre II como fornecedor de Cu^{2+} para as reações.

Nas reações foram adicionados 1 mL de sulfato de cobre II (250 μM) com 1mL de ácido kójico ou seus análogos (25, 50 e 100 μM). As misturas foram incubadas a 25°C durante 10 min e realizada a curva espectral, em espectrofotômetro (SPECTRUM SP-2000 UV).

3.3 ENSAIO ENZIMÁTICO

A cinética da enzima tirosinase foi realizada de acordo com Kubo *et al* (2000a) com modificações para placa de 96 poços. Foram incubados 160 μL do substrato L-DOPA em diferentes concentrações (0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 3 e 4 mM), com 20 μL da enzima tirosinase de cogumelo (2,4U) e 20 μL do ácido kójico ou seus análogos S-01, S- 02, S-03, S-04, S-05, S-06, S-07 e S-08 em diferentes concentrações (0,025; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mM) ou tampão (atividade sem inibição).

As soluções foram preparadas em Tampão Fosfato Salina (PBS) pH 7,2. No entanto as substâncias S-05, S-06, S-07 e S-08 foram solubilizadas previamente em DMSO, de modo que na reação a concentração das mesmas foi de 5%. Todas as reações foram iniciadas pela adição da enzima com o uso de pipetador multicanal e a velocidade da reação (formação de dopacromo) avaliada como a variação da absorvância-minuto (média ± erro padrão da média) registrada em leitor de microplaca com filtro de 490 nm, ao longo dos 5 primeiros minutos.

Como controle também foi realizada a incubação apenas da enzima com o ácido kójico ou seus análogos, para demonstrar que estes na ausência do substrato não geram variação na absorvância ao longo do tempo.

Os parâmetros cinéticos de K*m*, V*max*, K*i* e análise estatística como declive (variação do Km_{app}), r^2, média e erro padrão da média foram determinados com o auxilio do programa GraphPad Prisma® 5.00.

3.4 ENSAIO DE HEMÓLISE

Para investigar o grau de segurança do ácido kójico e seus análogos frente a integridade da membrana celular, foi realizado o teste de hemólise, de acordo com Oliveira *et al* (2014). O sangue de um rato foi coletado com heparina, centrifugado a 3000 rpm/5min, os eritrócitos foram lavados com solução salina (NaCl 0,85%; $CaCl_2$ 10mM) e novamente centrifugados, sendo então diluídos a 2 % em salina (solução de eritrócito).

O ensaio foi realizado em placa de 96 poços (*n=4*), nele 100 µL do ácido kójico na concentração de 0,4 mM; ou de S-01 a S-04 (3,2 e 1,6 mM); ou de S-05 a S-08 (0,8 mM diluídas em 10% de DMSO) foram adicionados na presença de 100 µL da solução de eritrócito.

Como controle positivo de hemólise foram incubados 80 µL de salina, mais 20 µL de Triton X-100 a 1% com 100 µL da solução de eritrócitos. Como controle negativo foram incubado 100 µL de salina com 100 µL da solução de eritrócito. Um segundo controle negativo (para as drogas diluídas em DMSO) foi realizado pela incubação de 100 µL de solução salina contendo 10 % de DMSO com 100 µL da solução de eritrócito. Após 1 h de incubação a placa foi centrifugada (3000 rpm/5min) e 100 µL do sobrenadante transferido e lido em leitora de microplaca com filtro para 450 nm. Os resultados foram expressos como percentagem pela fórmula: $\%_{hemólise} = \frac{A-\bar{x}C^-}{\bar{x}\ \Delta C^+} x\ 100.$

Onde: A é a absorvância da amostra; $\bar{x}C^{-}$ é a média do controle negativo; $\bar{x}\ \Delta C^{+}$ é a média da diferencial entre controle positivo e controle negativo. Sendo os dados apresentados como média ± desvio padrão.

3.5 CITOTOXICIDADE EM MELANOMA, FIBROBLASTO E TECIDO NERVOSO

As linhagens B16F10 (células de melanoma de camundongos) e MRC_5 (fibroblasto fetal de pulmão humano) foram cultivadas, separadamente, em garrafa de 25 cm^2, com meio nutritivo DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS), 10 U/ml de penicilina e 10 µg/ml de gentamicina, em estufa a 37° C e atmosfera com 5 % de CO_2, efetuando-se a troca do meio a cada dois dias, até atingir confluência adequada.

Para a realização do experimento, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e dissociadas quimicamente por ação de 2 mL de solução de tripsina 0,05 %/EDTA 0,02 % em PBS por 5 min, seguido de inativação com 4 mL de meio de cultivo. As células foram centrifugadas (1500 rpm / 5 min), o precipitado suspenso com 5 mL de meio e a concentração celular determinada por contagem em hemocitômetro com solução do corante vital azul trypan 0,4% em PBS.

Foram semeadas 50000 cél./poço num volume de 500 µL em placa de 24 poços. Após 24 h de cultivo em estufa de CO_2 o meio foi removido e efetuado o tratamento (n = 4) com as substâncias S-01, S-02, S-03, S-04 e ácido kójico em diferentes concentrações (0,25 mM; 0,5 mM e 1 mM) em meio de cultivo. O grupo Controle foi realizado contendo apenas meio de cultivo.

Para a obtenção da cultura de células do tecido nervoso, as retinas de embrião de galinha da linhagem Cobb, com sete dias de embrião (E7) foram dissecadas em meio livre de cálcio (CMF), dissociadas quimicamente com solução de tripsina e semeadas em meio nutritivo DMEM / 10% FBS numa densidade de três retinas por placa de 24 poços. A cultura foi mantida em estufa de CO_2 com a troca do meio efetuada a cada dois dias. Com oito dias de cultivo (C8) foi efetuado o tratamento com as drogas testes de igual modo como descrito no parágrafo anterior.

A citotoxicidade foi avaliada pela análise da viabilidade celular estimada pelo método proposto por Mosmann (1983) com modificações, o qual consiste na conversão do cromógeno solúvel, brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), pela ação de desidrogenases presentes em células viáveis, em formazan pouco solúvel (precipitado escuro

no interior das células), podendo ser solubilizado e lido em espectrofotômetro com comprimento de onda de 570 nm.

Com 24h de tratamento o meio foi removido e as células incubadas por 2 h em estufa de CO_2 com 500 µL de solução de MTT 0,5 mg/mL em meio de cultivo. Após este período, o sobrenadante foi removido e o formazan (incorporado as células) foi solubilizado com 300 µL de DMSO e a absorvância determinada em leitor de microplaca, sendo os resultados expressos como percentagem do grupo Controle.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Como análise estatísticas, para aqueles resultados que necessitaram, será realizada a análise de variância um critério (*ANOVA*) seguido pelo pós-teste de Tukey, com o uso do programa estatístico *BioEstat* versão 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DA INTERAÇÃO COM COBRE

A análise do espectro UV-Visível para verificar se o ácido kójico e seus análogos possuem a capacidade de interagir com íons cobre II (Cu^{2+}) é apresentado na Tabela 02, onde é possível observar um deslocamento batocrômico (deslocamento do espectro UV-Visível para um maior comprimento de onda) na interação do ácido kójico com íons cobre II (Cu^{2+}) da solução de $CuSO_4$ (265 → 305 nm). Esse comportamento batocrômico também foi observado nas interações entre o cobre II (Cu^{2+}) e as substâncias S-01 (285 → 325 nm), S-02 (275 → 315 nm), S-03 (275 → 310 nm), S-04 (280 → 295 nm), S-06 (270 → 305 nm) e S-07 (270 → 310 nm).

O espectro UV-Visível da S-05 não apresentou deslocamento quando em solução com íons cobre II (Cu^{2+}), possivelmente devido não haver interação entre eles.

A substância S-08 também foi capaz de interagir com íons Cu^{2+}, no entanto esta interação promoveu um deslocamento hipsocrômico (deslocamento do espectro UV-Visível para um menor comprimento de onda), S-08 (315 → 310 nm).

Tabela 02: Deslocamento de pico do espectro UV-Visível das reações do ácido kójico e seus análogos com Cu^{2+}.

Substância	**Pico do Cu^{2+} (nm)**
Ácido Kójico (50 µM)	265 → 305
S-01(50 µM)	285 → 325
S-02 (50 µM)	275 → 315
S-03(50 µM)	275 → 310
S-04 (25 µM)	280 → 295
S-06 (50 µM)	270 → 305
S-07 (50 µM)	270 → 310
S-08 (100 µM)	315→ 310

4.2 ANÁLISE DO PADRÃO DE INIBIÇÃO

A cinética da tirosinase na ausência de inibidor mostrou comportamento típico de enzima michaeliana (figura 08 a) com valor de K*m*= 0,299 ± 0,03 mM e V*max* = 0,029 ± 0,00 D.O./min, estes parâmetros não apresentaram alterações significativas quando repetidos para

realização da cinética com as demais substâncias (Fig. 14A; 15 A; 15D; 16A; 16B; 17A; 17B; 18A e 18D).

A cinética para o ácido kójico (figura 14 A) mostrou que este foi capaz de promover inibição bastante significativa na atividade da tirosinase, podendo ser confirmado pelo gráfico de Linewaver-Burk (figura. 14 B), para esta substância a inibição apresentada é do tipo competitiva, com K*i*=0,005 ± 0,00 mM. Na figura 14 C é apresentado a variação do K*m* aparente (K*m* $_{app}$) em função da concentração do inibidor, nela podemos constatar que o aumento da concentração do ácido kójico promove aumento progressivo nos valores de K*m* $_{app}$, mostrando um declive acentuado de 60,55 ± 13,45 e r^2= 0,95, o que reforça o caráter competitivo deste inibidor.

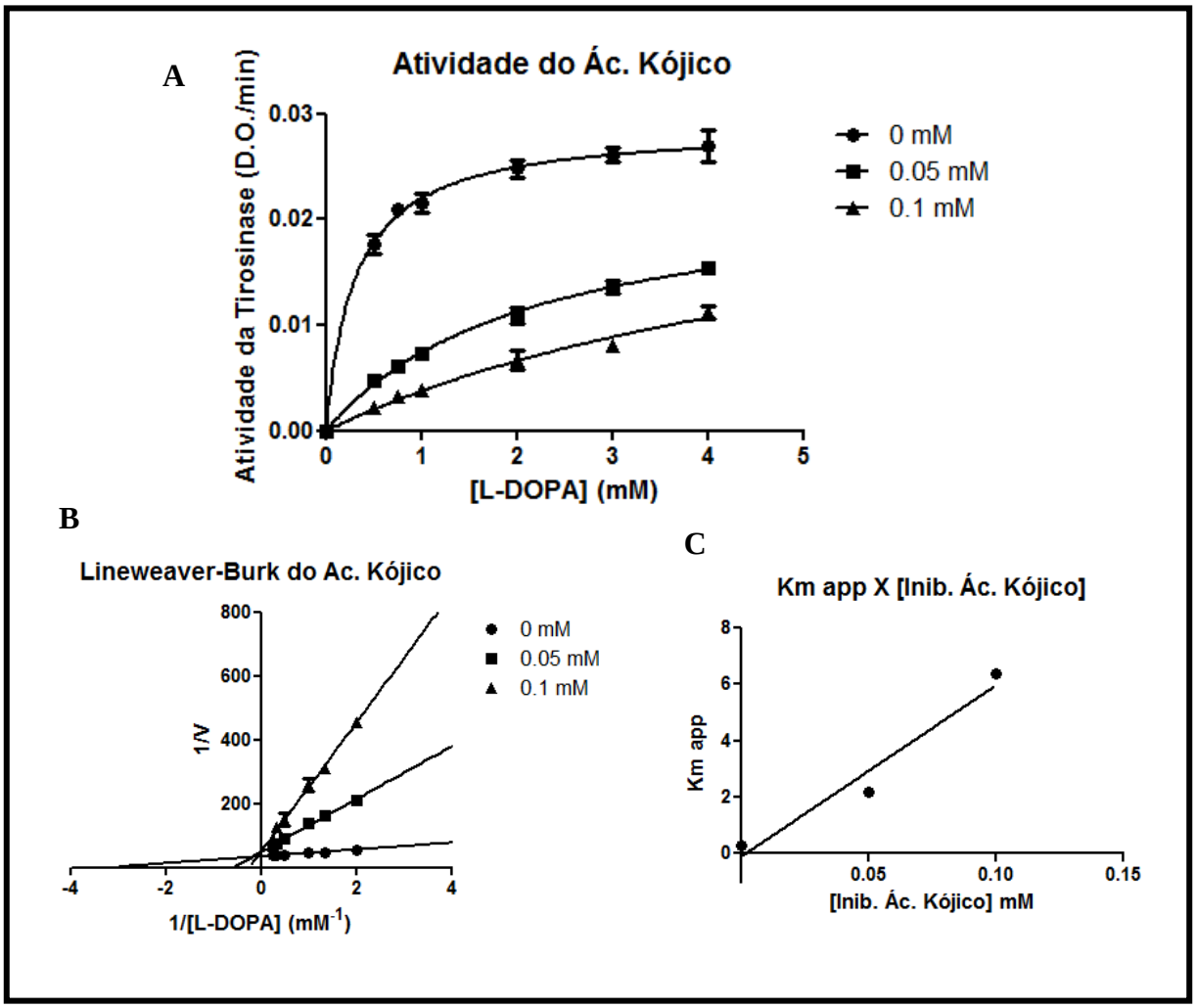

Figura14: Cinética enzimática da tirosinase na presença do ácido kójico. (A) Cinética de Michaelis-Menten e (B) transformada de Lineweaver-Burk nas concentrações de 0; 0,05 e 0,1 mM de ácido kójico, mostrando inibição do tipo competitiva. (C) Variação do K*m* aparente em função da concentração de Ác. kójico. Dados são apresentados como média (*n*=3).

A análise cinética com a substância S-01 mostrou ser esta um bom inibidor (figura 15 A), sendo que a análise do gráfico de Linewaver-Burk para este tratamento (figura 15 B) revelou uma inibição do tipo mista, com K*i*= 0,999 ± 0,15 mM. Também foi possível observar que a variação do K*m* $_{app}$ em função da concentração do inibidor apresentou um declive pouco acentuado (0,18 ± 0,03; r^2= 0,92) (figura 15 C).

A substância S-02 também demonstrou ser inibidor de tirosinase, como observado pela cinética Michaeliana na figura 15 D. A análise do gráfico de Linewaver-Burk (figura 15 E) para esta substância demonstrou ser a inibição do tipo competitiva, com K*i*= 0,145 ± 0,02 mM e variação crescente do K*m* $_{app}$ em função da concentração da S-02 (figura. 15 F) com um declive acentuado de 3,26 ± 0,65 e r^2= 0,93.

A cinética da substância S-03 (figura 16 A) não apresentou atividade inibidora, porém a curva cinética na presença desta substância apresentou valores de V*max* maior que na ausência desta (V*max* = 0,030; V*max'* = 0,033 e V*max''* = 0,041, para as concentrações de 0; 0,8 e 1,6 mM, respectivamente).

A cinética da substância S-04 (figura 16 B) mostrou um comportamento típico de inibição competitiva, o qual foi confirmado pela análise da transformada de Linewaver-Burk (figura 16 C), com K*i*= 0,064 ± 0,01 mM, o mesmo evidenciado pelo declive acentuado (5,30 ± 0,27; r^2= 0,99) da variação do K*m* $_{app}$ em função do aumento da concentração desta substância (figura 16 D).

A análise cinética da substância S-05 mostrou que esta não apresentou atividade inibidora para as concentrações testadas (figura 17 A).

Similar ao observado para a S-04, a análise cinética de S-06 (figura 17 B), S-07 (figura 18 A) e S-08 (figura 18 D), também apresentaram comportamento típico de inibidor competitivo, o que foi confirmado pela análise da transformada de Linewaver-Burk, com K*i*= 0,004± 0,00 mM para S-06 (figura 17 C), K*i*= 0,006 ± 0,00 mM para S-07 (figura 18 B) e K*i*= 0,009 ± 0,00 mM para S-08 (figura 18 E), e pelo elevado valor de declive na análise da variação do K*m* $_{app}$ em função da concentração do inibidor: 42,19 ± 7,58 e r^2= 0,94 para S-06 (figura 17 D); 22,12 ± 1,98 e r^2= 0,98 para S-07 (figura 18 C) e 19,92 ± 1,37 e r^2= 0,99 para S-08 (figura 18 F).

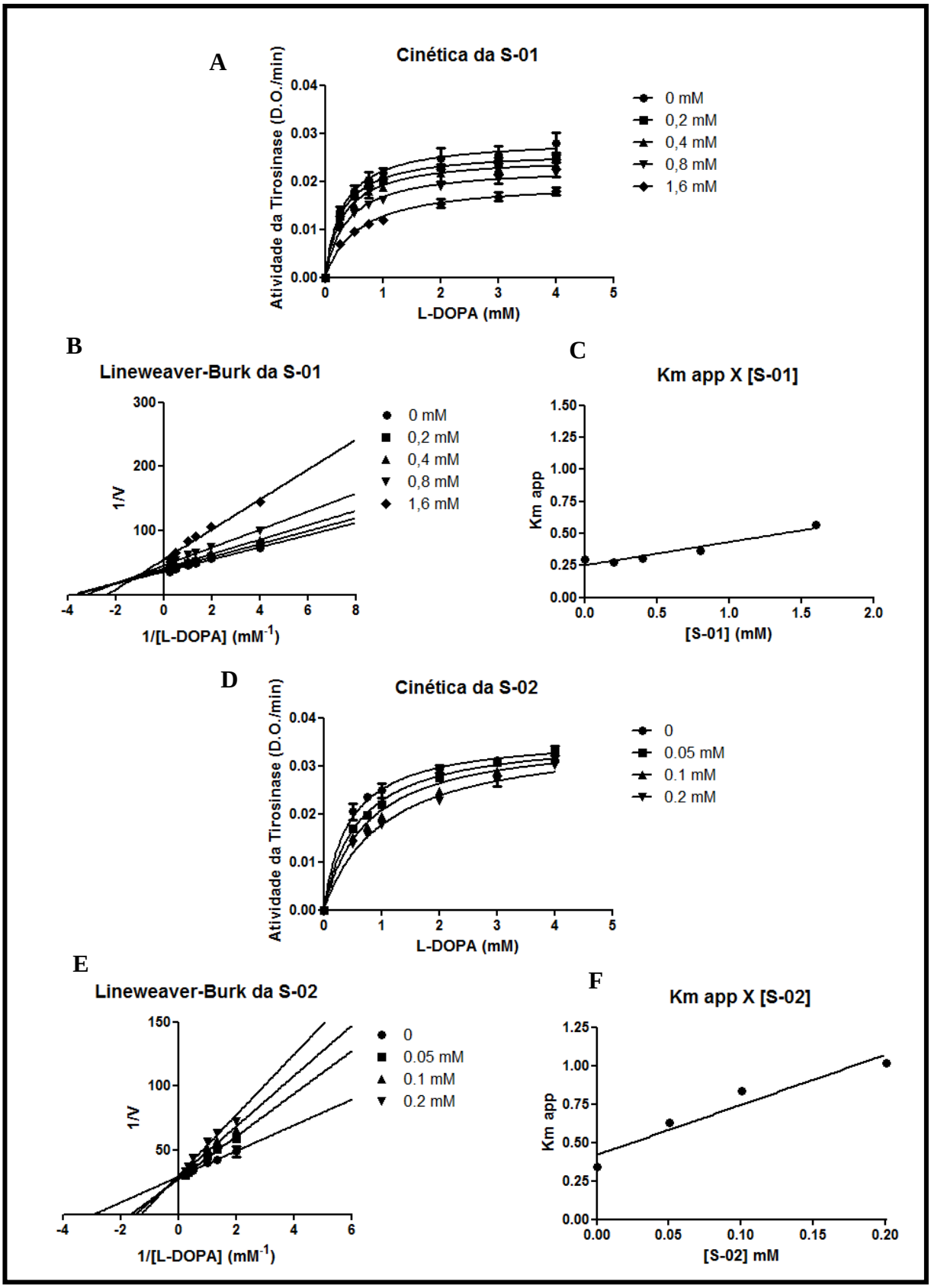

Figura15: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-01 e S-02. (A) Cinética de Michaelis-Menten e (B) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo mista nas concentrações de 0; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mM de S-01. (C) Variação do Km aparente em função da concentração de S-01. (D) Cinética de Michaelis-Menten e (E) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo competitiva nas concentrações de 0; 0,05; 0,1 e 0,2 mM de S-02. (F) Variação do Km aparente versus concentração de S-02. Dados são apresentados como média (n=3).

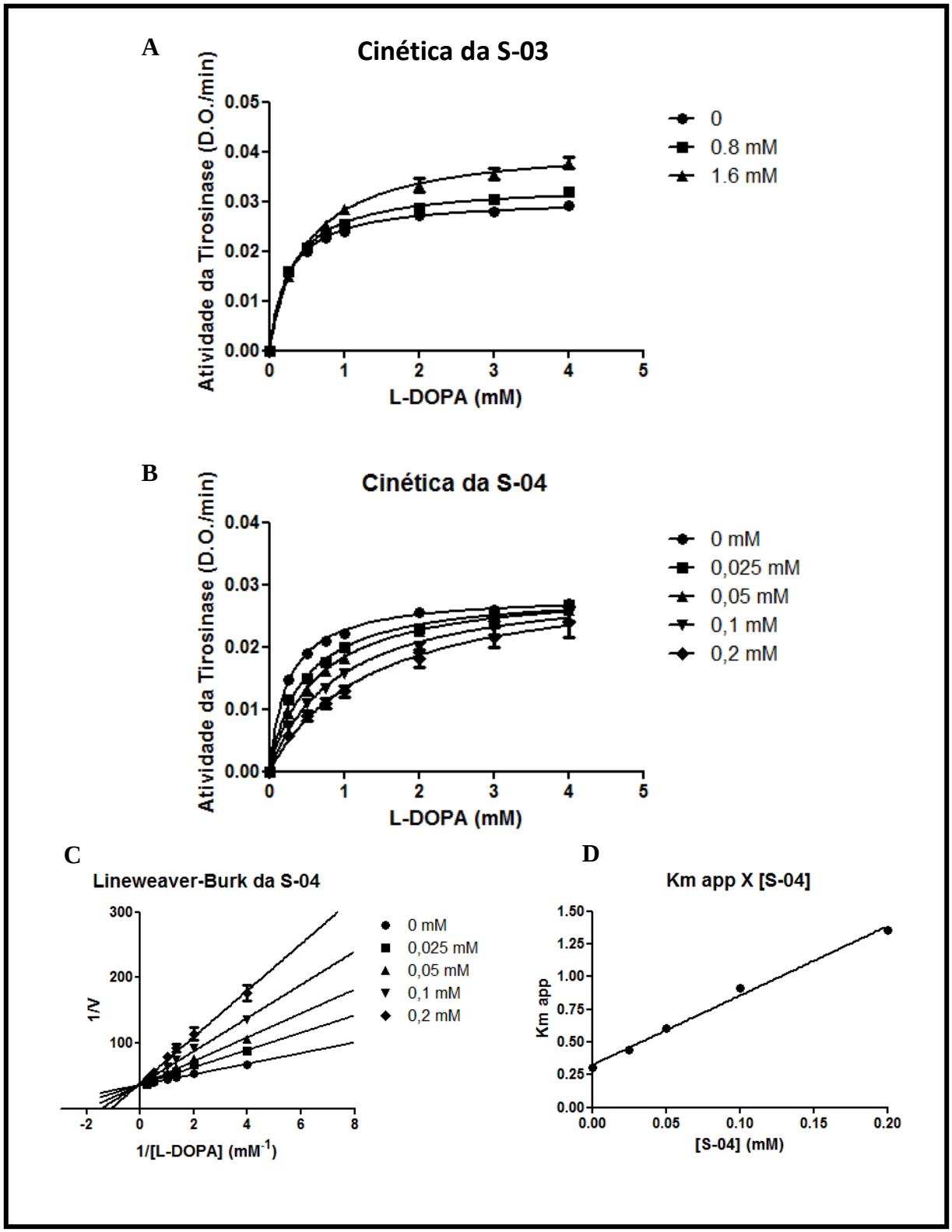

Figura16: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-03 e S-04. (A) Cinética de Michaelis-Menten nas concentrações de 0; 0,8 e 1,6 mM de S-03 não mostrou ação inibitória mas sim como um possível co-fator. (B) Cinética de Michaelis-Menten e (C) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo competitiva nas concentrações de 0; 0,025; 0,05; 0,1 e 0,2 mM de S-04. (D) Variação do Km aparente versus concentração de S-04. Dados são apresentados como média (*n*=3).

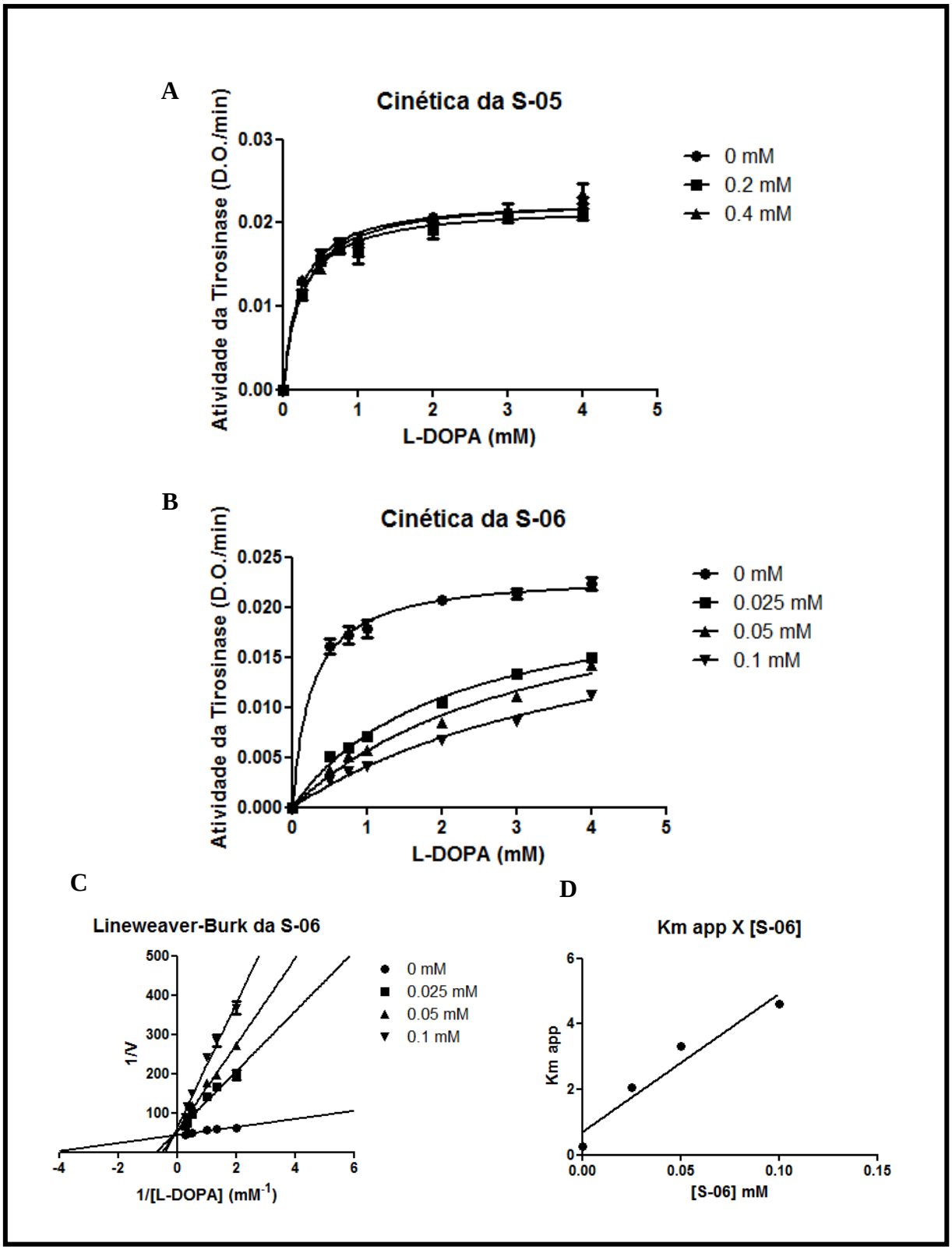

Figura17: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-05 e S-06. (A) Cinética de Michaelis-Menten nas concentrações de 0; 0,4 e 0,8 mM de S-05 não mostrou ação inibitória. . (B) Cinética de Michaelis-Menten e (C) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo competitiva nas concentrações de 0;0,025; 0,05; e 0,1 mM de S-06. (D) Variação do Km aparente versus concentração de S-06. Dados são apresentados como média (*n*=3).

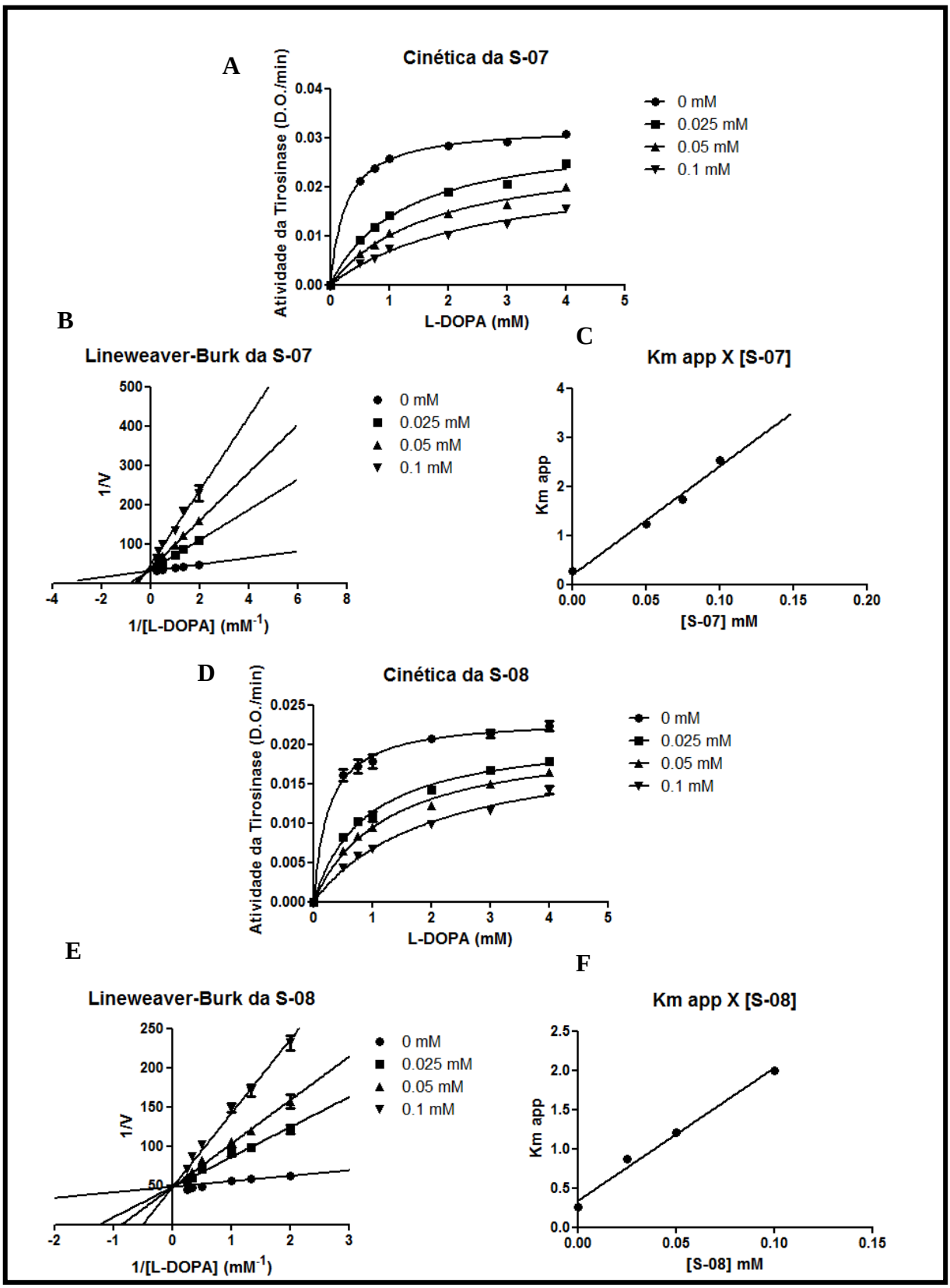

Figura18: Cinética enzimática da tirosinase com as substâncias S-07 e S-08. (A) Cinética de Michaelis-Menten e (B) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo competitiva nas concentrações de 0; 0,025; 0,5 e 0,1 mM de S-07. (C) Variação do Km aparente em função da concentração de S-07. (D) Cinética de Michaelis-Menten e (E) transformada de Lineweaver-Burk mostrando inibição do tipo competitiva nas concentrações de 0; 0,025; 0,5 e 0,1 mM de S-08. (F) Variação do Km aparente versus concentração de S-08. Dados são apresentados como média (*n*=3).

4.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA

Para investigar o grau de segurança da integridade da membrana celular frente ao ácido kójico e seus análogos foi realizado o teste de hemólise (figura 19). Nele podemos constatar que 1,6 mM da S-01 gerou 50% de hemólise (*n*=3), enquanto a incubação com 0,8 mM causou apenas 2% (*n*=3).

O ácido kójico (na concentração de 0,2 mM) e os análogos S-02, S-03 e S-04 (nas concentrações de 1,6 mM) e S-05, S-06, S-07 e S-08 (nas concentrações de 0,4 mM) não apresentaram atividade hemolítica.

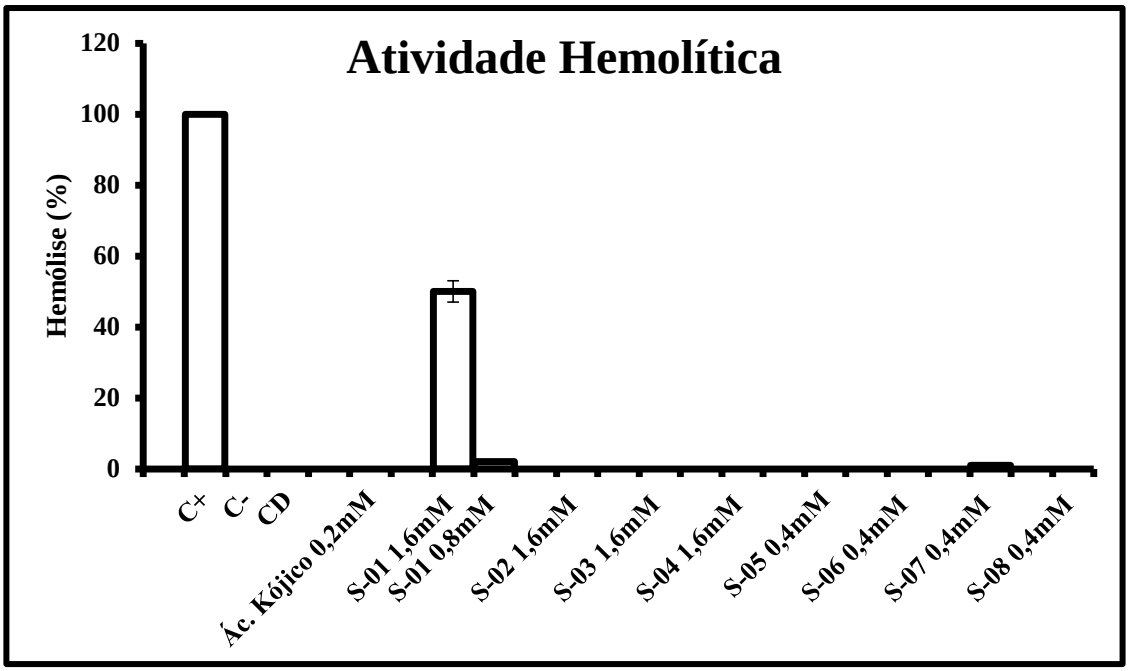

Figura 19: Ensaio de hemólise para avaliar a integridade de membrana celular ao ácido kójico e seus análogos. Controle positivo (C^+, solução de eritrócito tratadas com Triton X-100 a 0,1%), Controle negativo (C^-, eritrócitos sem tratamento) e Controle negativo com DMSO (CD).

4.4 ANÁLISE DA CITOTOXICIDADE

A figura 20 apresenta a atividade citotóxica em linhagem de fibroblasto fetal de pulmão humano (MRC5) após tratamento com ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04 incubadas por 24h em diferentes concentrações. Nesta é possível observar que os grupos de células tratadas com ácido kójico nas concentrações de 250 µM (104 ± 0 %), 500 µM (100 ± 5 %) e 1000 µM (100 ± 5 %) não apresentaram efeito citotóxico, não exibindo diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 3 %).

Um comportamento semelhante foi observado no grupo de células tratadas com S-01 (Fig. 20) nas concentrações de 250 µM (96 ± 2 %), 500 µM (92 ± 2 %) e 1000 µM (93 ± 2 %), as quais também não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 5 %).

As células da linhagem MRC5 após tratamento com S-02 (Fig. 20) apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle (100 ± 5 %), exibindo uma viabilidade de 88 ± 1 %; 86 ± 2 % e 79 ± 3 % nos grupos tratados com concentrações de 250 µM, 500 µM e 1000 µM, respectivamente.

As células tratadas com S-03 (Fig. 20), semelhante as células tratadas com ácido kójico e S-01, nas concentrações de 250 µM (99 ± 2 %), 500 µM (93 ± 6 %) e 1000 µM (93 ± 3 %) também não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 1 %).

Efeito citotóxico foi observado nas células tratadas com S-04 (Fig. 20), onde houve um comprometimento de 24% na viabilidade das células tratadas com 250 µM (76 ± 3 %) e 500 µM (76 ± 2 %) desta substância, e um comprometimento de 30% quando tratada com 1000 µM (70 ± 2 %) da S-04, exibindo assim uma significativa diferença quando comparadas ao grupo controle (100 ± 1 %).

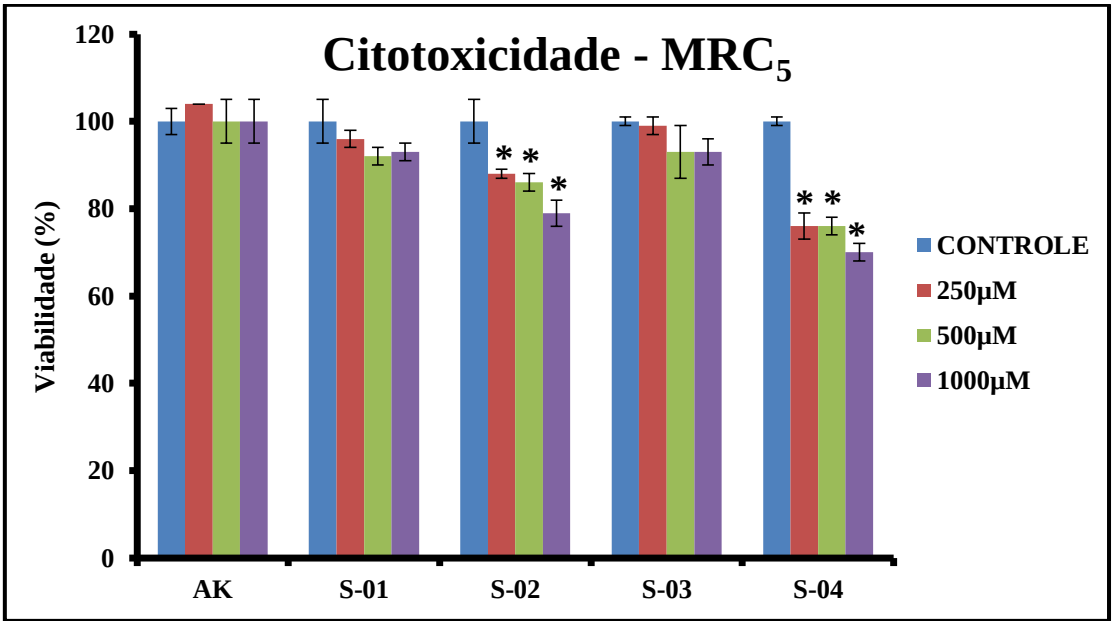

Figura 20: Análise da citotoxicidade em linhagem MRC_5 tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04, nas concentrações de 250, 500 e 1000 µM, mais o grupo controle de cada tratamento. *n* = 4 e *p < 0,01 (*ANOVA*, seguido do teste de Tukey).

A figura 21 apresenta a análise de citotoxicidade em culturas de células de retina de embrião de galinha (E7C8) após tratamento com ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04 incubadas por 24h em diferentes concentrações. Estas células quando submetidas a tratamento com ácido kójico nas concentrações de 250 µM (96 ± 2 %), 500 µM (95 ± 4 %) e 1000 µM (96 ± 4 %) não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 4 %). Tal comportamento também foi observado no grupo de células tratadas com S-01 (Fig. 21) nas concentrações de 250 µM (99 ± 1 %), 500 µM (101 ± 2 %) e 1000 µM (98 ± 2 %), as quais também não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 3 %).

Já as culturas de células de retina de embrião de galinha (E7C8) tratadas com S-02 (87 ± 4 %; 81 ± 3 %; 79 ± 6 %), S-03 (87 ± 4 %; 81 ± 3 %; 79 ± 6 %) e S-04 (87 ± 1 %; 86 ± 2 %; 87 ± 2 %), nas concentrações de 250 µM, 500 µM e 1000 µM, respectivamente, apresentaram diferença significativa em relação ao grupo controle (100 ± 3 %).

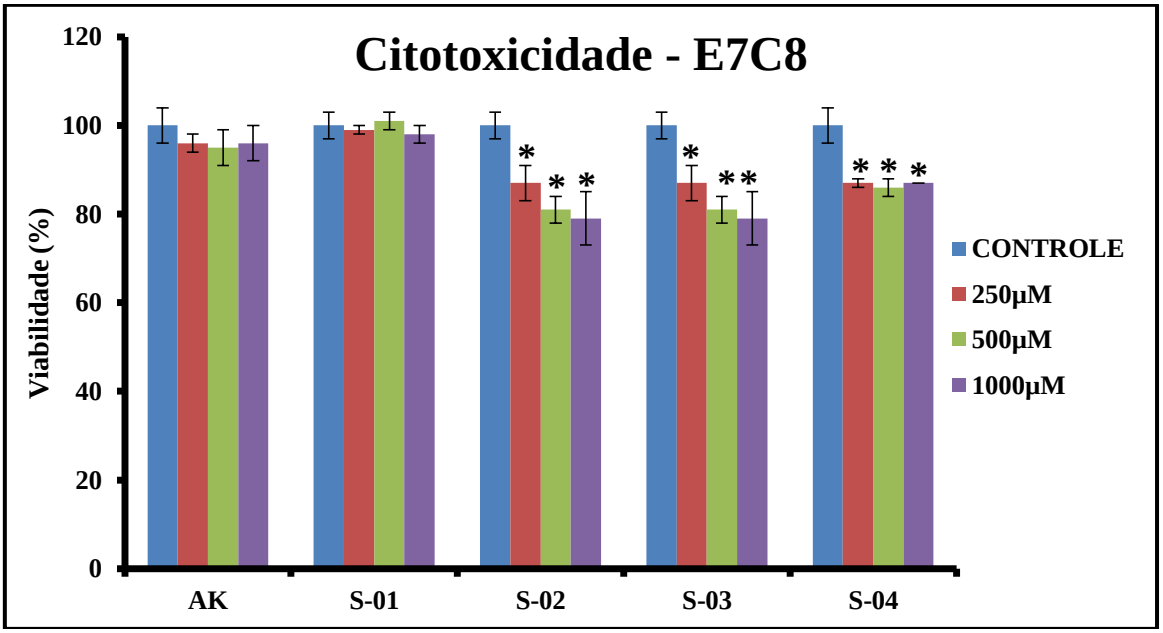

Figura 21: Análise da citotoxicidade em culturas de células de retina de embrião de galinha (E7C8) tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04, nas concentrações de 250, 500 e 1000 µM, e o grupo controle de cada tratamento. n = 4 e *p < 0,01 (ANOVA, seguido do teste de Tukey).

As células de melanoma de camundongos (B16F10) também foram submetidas a tratamento com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04, por 24h em diferentes concentrações (Fig. 22). O tratamento realizado com o ácido kójico (Fig.22) na concentração de 250 µM (96 ± 4 %) não apresentou diferença significativa em relação ao controle (100 ± 3 %), porém as concentrações de 500 µM (85 ± 2 %) e 1000 µM (83 ± 4 %) foram significativamente diferentes do controle, exibindo um efeito citotóxico de 15% e 17% respectivamente.

O tratamento com S-01 nas concentrações de 250 µM (100 ± 2 %), 500 µM (98 ± 4 %) e 1000 µM (100 ± 3 %) não apresentaram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 4 %).

O tratamento com o análogo S-02 na concentração de 250 µM (96 ± 3 %) não apresentou diferença significativa em relação ao controle (100 ± 6 %), porém as concentrações de 500 µM (57 ± 2 %) e 1000 µM (49 ± 1 %) foram significativamente diferentes do controle, exibindo assim um valor de $IC_{50\%}$ na concentração de 1000 µM.

O tratamento com S-03 nas concentrações de 250 µM (102 ± 2 %) e 500 µM (96 ± 2 %) não exibiram diferença significativa quando comparadas ao grupo controle (100 ± 4 %), já a concentração de 1000 µM (88 ± 3 %) desta substância foi capaz de promover um efeito citotóxico de 12%, quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com a S-04 promoveu efeito citotóxico, sendo este de 43% na concentração de 250 µM (57 ± 0 %), 42% com 500 µM (58 ± 2 %) e uma redução de 45% da viabilidade quando tratadas com 1000 µM (55 ± 1 %), mostrando assim valor elevado para a $IC_{50\%}$, superior as concentrações aqui testadas.

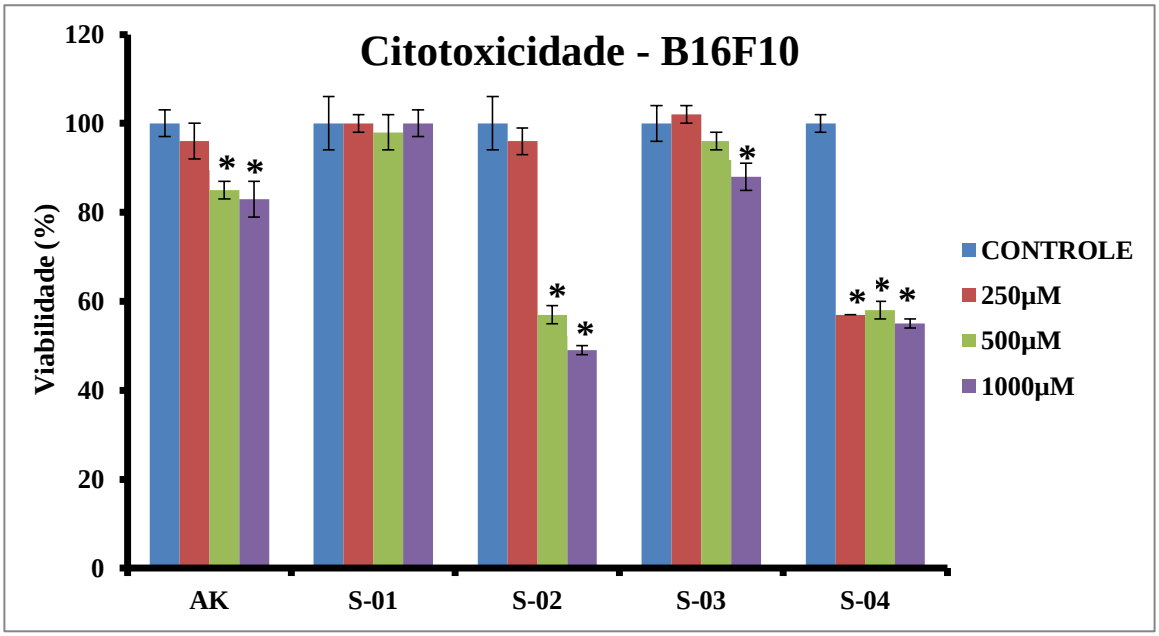

Figura 22: Análise da citotoxicidade em células B16F10 tratadas por 24h com o ácido kójico e seus análogos S-01, S-02, S-03 e S-04, nas concentrações de 250, 500 e 1000 µM, e o grupo controle de cada tratamento. *n* = 4 e *p < 0,01 (*ANOVA*, seguido do teste de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Neste trabalho investigamos bioquimicamente a atividade inibidora de tirosinase e o efeito citotóxico de análogos do ácido kójico derivados de 4H-pironas (S-01, S-02, S-03 e S-04) e derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (S-05, S-06, S-07 e S-08) em tirosinase de cogumelo. Tais substâncias foram elucidadas teoricamente para esta finalidade através de técnicas de modelagem molecular, segundo Lima *et al* (2014).

É importante ressaltar que hidroxipironas, como o ácido kójico, são caracterizadas pela versatilidade de síntese, propiciando a elaboração de inúmeros derivados moleculares que apresentam elevada afinidade com metais (por exemplo, o Cu^{2+}), sendo excelentes escolhas para diagnósticos e/ou formulações terapêuticas, uma vez que podem interagir com enzimas que possuem metais na sua estrutura (THOMPSON *et al*, 2006).

Para avaliar se os análogos do ácido kójico aqui apresentados são capazes de interagir com o cobre da enzima tirosinase foram analisadas as curvas espectrais UV-visível (tabela 01, pag. 38) de interações entre o ácido kójico e seus análogos (S-01, S-02, S-03, S-04, S-06, S-07 e S-08) com uma solução de sulfato de cobre II ($CuSO_4$), de acordo com o método proposto por Kubo *et al* (2000a), Saewan *et al* (2011) e Yue-Xiu *et al* (2012). Nossos resultados apresentaram uma mudança batocrômica, ou seja, para um maior valor de comprimento de onda, no pico de absorvância das substâncias S-01, S-02, S-03, S-04, S-06, S-07 e ácido kójico quando em solução com sulfato de cobre II ($CuSO_4$). Porém o análogo S-08 apresentou um deslocamento hipsocrômico, ou seja, para um menor comprimento de onda, quando em solução com $CuSO_4$.

Tal comportamento é sugestivo de que houve uma interação entre os análogos do ácido kójico aqui apresentados com íons Cu^{2+}. Estes resultados confirmam os achados teóricos de Lima *et al* (2014), os quais utilizaram técnicas de docagem molecular para comprovar que os análogos do ácido kójico S-01, S-02, S-03 e S-04 possuem afinidade (em ordem decrescente de afinidade: S-04 > S-02 > S-03 > S-01) por íons cobre, sendo que S-02 e S-04 são capazes de interagir com o sítio catalítico da enzima tirosinase, a qual possui íons Cu^{2+} em sua estrutura.

A literatura relata que um aumento da cadeia lateral do ácido kójico com anéis aromáticos pode vir a contribuir com um aumento da afinidade desta substância por íons como Cu^{2+}, o que pode ser evidenciado por técnicas computacionais de docagem molecular (NOH *et al*, 2009). Esta possibilidade foi positiva para as substâncias S-06, S-07 e S-08, as quais apresentam similaridade com o ácido kójico que contém um núcleo pirona, enquanto os

derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas, apresentam um núcleo pirano substituído com anéis aromáticos em seu esqueleto carbônico, as quais foram capazes de ter boa interação com íons Cu^{2+}. No entanto tal comportamento não foi observado para S-05, a qual não demonstrou mudança no pico de absorvância da droga na presença dos íons Cu^{2+} da solução, sugerindo que esta droga não interage com este íon.

Para confirmar os dados teóricos analisados por docagem e dinâmica molecular de que os análogos aqui apresentados possuem atividade anti-tirosinase, buscou-se avaliar a capacidade de tais análogos inibir *in vitro* a enzima tirosinase de cogumelo. Nossa análise baseou-se na atividade difenolase da tirosinase (utilizando como substrato para a reação o L-DOPA), uma vez que o comportamento cinético para formação do dopacromo está de acordo com a cinética de Michaelis-Menten, enquanto que a atividade monofenolase (por exemplo, a reação da tirosinase com a tirosina) ocorre com uma lenta velocidade de catálise, o que dificulta uma análise michaeliana (CABANES, CHAZARRA & GARCIA-CARMONA, 2002; OLIVARES, 2003).

Deste modo, observou-se que a cinética da tirosinase com o substrato L-DOPA apresentou um K*m*= 0,299 ± 0,03 mM e V*max* = 0,029 ± 0,00 D.O./min, comprovando assim a boa funcionalidade do método empregado.

O ácido kójico é um conhecido inibidor de tirosinase (LIM, 1999; NOHYNEK *et al*, 2004; HA *et al*, 2007; SCHURINK *et al*, 2007; CHANG, 2009; CICHOREK *et al*, 2013; SAGHAIE *et al*, 2013), por isso neste trabalho esta substância foi empregada como um inibidor padrão da enzima, como mostrado na análise cinética (figura 14 A, B e C). O ácido kójico exibiu atividade inibitória com concentrações relativamente baixas como 0,05 e 0,1 mM, exibindo assim um K*i* = 0,005 ± 0,00 mM, o qual mostrou ser menor do que o descrito por Parvez *et al* (2006) (K*i* = 0,014 mM).

A pesar de alguns estudos relatarem que o ácido kójico inibe a atividade difenolase da tirosinase de maneira mista (PARVEZ *et al*, 2006; SCHURINK *et al*, 2007; CHANG, 2009; SENDOVSKI *et al*, 2011; SAGHAIE *et al*, 2013), neste trabalho foi observado que a cinética de inibição comporta-se de maneira competitiva, uma vez que a variação de Km_{app} gerou um declive bastante acentuado da reta (declive = 60,55; r^2 = 0,95) na figura 14 (C), o que reforça o caráter competitivo deste inibidor.

A análise cinética para investigar o potencial de inibição dos derivados de 4H-pirona (S-01, S-02, S-03 e S-04) mostrou que a S-01 exerce inibição do tipo mista, como observado na figura 15 (A e B), com K*i* = 0,999 ± 0,15 mM, o que é ressaltado na análise da variação do Km_{app} (figura 15 C), que demonstra pequena variação do mesmo em função do aumento da

concentração do inibidor (0,2; 0,4; 0,8 e 1,6 mM), gerando assim uma reta com pequena inclinação (declive 0,18; r^2 = 0,95), o que é compatível para esse tipo de inibição.

Lima *et al* (2014), por meio de técnicas computacionais de docagem molecular (simulação da interação enzima-inibidor), elucidaram que S-01 pode interagir com asparagina 260 e metionina 280, mas não é capaz de interagir com os cobres do sítio ativo da tirosinase. Assim, uma hipótese para este tipo de inibição seria que a S-01 pode interagir com o sítio ativo, porém de uma forma diferente dos demais inibidores capazes de interagir diretamente com o cobre, ou também há possibilidade de S-01 interagir com um sítio alostérico, causando a inibição do tipo mista, com um fraco poder de inibição da catálise, como evidenciado pelo alto valor de K_i observado.

As substâncias S-02 (figura 15 D e E) e S-04 (figura 16 B e C) apresentaram atividade inibidora de tirosinase. Ambas exibiram um comportamento competitivo mesmo em concentrações relativamente baixas, como 0,05 mM para S-02 e 0,025mM para S-04, ratificada pela variação de Km_{app} destas substâncias (fig. 15 (F) e 16 (D)) com um declive da reta com valores relativamente elevados (declive de S-02 = 3,26 e declive de S-04 = 5,30), compatíveis com uma inibição do tipo competitiva. Tais comportamentos muito se assemelham ao do ácido kójico, o que segundo os achados computacionais de Lima *et al* (2014), ocorre devido, S-02 e S-04 serem capazes de quelar o Cu^{2+} da enzima, assim como o ácido kójico, aumentando a distância entre eles, e assim prejudicando a catálise (LIMA *et al*, 2014).

A pesar desse comportamento, S-02 e S-04 exibiram valores de K_i (K_i = 0,145 ± 0,02 mM e K_i = 0,064 ± 0,01 mM, respectivamente) mais elevado que o do ácido kójico, o que ocorre possivelmente devido diferentes graus de afinidades destas substâncias com a enzima, o que é confirmado por Lima *et al* (2014) quando relata a variação da energia livre de Gibbs (ΔG^o) para a interação dessas substâncias com o sítio ativo da tirosinase, na seguinte sucessão: mais negativo para o ácido kójico em comparação ao S-04 e este em relação ao S-02 ($\Delta G^o_{AK} < \Delta G^o_{S-04} < \Delta G^o_{S-02}$), assim mostrando que o grau de espontaneidade (e consequentemente afinidade) para a formação do complexo enzima-inibidor é maior para o AK > S-04 > S-02.

A análise da cinética da S-03 não apresentou atividade inibidora de tirosinase, embora a presença desta substância tenha aumentado os valores de Vmax desta cinética nas concentrações de 0,8 e 1,6 mM (figura 16 A). Diante desse comportamento buscou-se analisar se tal substância poderia estar se comportando como um co-fator, baseado no ensaio de Kubo *et al* (2000a), o qual mostrou que a quercetina (sua substância em estudo) por facilitar a

oxidação da tirosinase, melhora a atividade cinética da tirosina como substrato, e desse modo age como co-fator. Baseado nessa evidência, foi realizado um ensaio de cinética da S-03 com tirosina como substrato, de acordo com o método proposto por Kubo *et al* (2000a), porém não apresentou diferença significativa em comparação a incubação na ausência de S-03, assim não caracterizando esta substância como um possível co-fator.

O fato de S-03 não se comportar como inibidor na cinética enzimática está de acordo com os achados de Lima *et al* (2014) que por meio de estudos de docagem molecular computacional, relataram que tal substância apresenta pouca influência no sítio ativo da tirosinase, uma vez que a variação da energia de Gibbs padrão (ΔG^o) para esta substância é menos negativa que as demais ($\Delta G^o_{AK} < \Delta G^o_{S-04} < \Delta G^o_{S-02} < \Delta G^o_{S-03}$), confirmando os achados aqui apresentados.

Na avaliação da atividade cinética dos compostos derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (substâncias S-05, S-06, S-07 e S-08), os análogos S-06 (fig. 17 B e C), S-07 (fig. 18 A e B) e S-08 (fig. 18 D e E) apresentaram boa atividade inibidora de tirosinase, as quais exibiram um comportamento competitivo com uma concentração relativamente baixa de 0,025 mM, ratificada pela variação de Km_{app} destas substâncias, com declives relativamente elevados (fig. 17 D, declive de S-06 = 42,19; 18 C, declive de S-07 = 22,12 e 18 F, declive de S-08 = 19,92), compatíveis com uma inibição do tipo competitiva.

A presença dos grupamentos 2-(clorometil) e 10-(4-fluorofenil) na molécula S-06, 2-(hidroximetil) e 10-benzonitrilo na molécula S-07 e 2-(clorometil) e 10-(2-fluorofenil) na molécula S-08, colaboram com a qualidade de inibição apresentada por tais inibidores, uma vez que essas expansões na moléculas com elementos eletronegativos podem contribuem para a ligação da molécula a uma cadeia lateral da enzima, próximo ao sítio ativo, o que está de acordo com a hipótese de NOH *et al* (2009), o qual afirma que o aumento da cadeia lateral do ácido kójico, com anéis aromáticos aumenta a afinidade das substâncias com a tirosinase. No entanto, a substância S-05, a qual apresenta um grupo 2-hidroximetil e um grupo 10-fenil não apresentou atividade inibitória, desse modo o grupamento fenil, por não apresentar nenhuma substituição com elemento eletronegativo (o que diminui sua hidrofobicidade) pode estar contribuído negativamente com o poder de inibição desta molécula, possivelmente por sofrer forças de repulsão a este grupamento hidrofóbico.

Comparando os análogos S-06 e S-08, os quais só diferem quanto a posição do flúor no radical 10-flúorofenil, observou-se que a S-06, a qual apresenta flúor na posição *para* dirigente exibe um poder de inibição mais elevado que a S-08, na qual o flúor está na posição *orto* dirigente. Tal como o flúor da S-06, a S-07 apresenta um radical Ciano na posição *para*

dirigente, a qual também apresentou uma inibição mais eficiente que a S-08 que apresenta o fluor na posição *orto* dirigente, demonstrando assim que grupamentos eletronegativos na posição *para* dirigente do anel 10-fenil contribuem de maneira mais eficiente para o acoplamento da molécula no sítio ativo.

Esta alta afinidade das substâncias S-06, S-07 e S-08 é reflexo dos baixos valores de K*i* por elas apresentados (K_i = 0,004 ± 0,00 mM; K_i = 0,006 ± 0,00 mM e K_i = 0,009 ± 0,00 mM, respectivamente), os quais muito se assemelham ao do ácido kójico (K*i* = 0,005 ± 0,00 mM). Logo, comparado aos derivados de 4H-pirona (S-01, S-02 e S-04), os derivados de diidropirano[3,2-b]cromenodionas (substâncias S-06, S-07 e S-08) mostraram-se muito mais potentes, podendo apresentar maior eficiência para inibir a tirosinase.

Diante da cinética de inibição da tirosinase apresentada pelos análogos em estudo, buscou-se neste trabalho analisar o grau de segurança de tais substâncias. Para isso, a análise do grau de hemólise é um bom modelo para se investigar o grau de segurança de novos fármacos devido a sua fácil obtenção por punção venosa e isolamento por simples centrifugação, além disso, os eritrócitos representam um bom modelo para avaliar a interação fármaco-membrana, pois fornece informações sobre as alterações na composição lipídica, alterações enzimáticas e de outras proteínas de membrana (OLIVEIRA *et al*, 2014).

Nesta perspectiva, foi realizado o ensaio de hemólise, pelo tratamento de eritrócitos com ácido kójico (0,2 mM); S-01, S-02, S-03 e S-04 (1,6 mM) e S-05, S-06, S-07 e S-08 (0,4 mM), vale ressaltar que as concentrações aqui testadas correspondem as concentrações máximas utilizadas no ensaio de cinética, além disso, como os análogos S-05, S-06, S-07 e S-08 apresentam restrição de solubilidade, foram então previamente solubilizados em DMSO e testados na concentração limítrofe de 0,2 mM, contendo 5% de DMSO.

Neste ensaio o ácido kójico e os análogos de S-02 a S-08 não apresentaram efeito hemolítico, apresentando alto grau de segurança para a membrana dos eritrócitos nas concentrações testadas. A única substância que apresentou efeito hemolítico foi a S-01, com 50% de hemólise na concentração de 1,6 mM. Porém na concentração de 0,8 mM o índice de hemólise foi muito baixo (2%), mostrando que esta droga ainda apresenta um bom grau de segurança, uma vez que concentrações de substâncias exógenas no plasma dificilmente alcancem valores tão altos como estes aqui analisados.

Uma vez demonstrado o grau de segurança do ácido kójico e seus análogos frente a integridade da membrana de eritrócitos, buscamos investigar se essas substâncias em concentrações superiores às testadas no ensaio de inibição da tirosinase (250, 500 e 1000 µM) promoveriam efeito citotóxico em diferentes linhagens de células.

Como modelo celular derivado de tecido conjuntivo, utilizamos a linhagem de fibroblastos fetal de pulmão humano (MRC_5). Nesta observamos que o tratamento realizado com ácido kójico, S-01 e S-03 não apresentaram efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, exibindo assim um bom grau de segurança destas substâncias nesta linhagem.

Já as substâncias S-02 e S-04 apresentaram uma pequena diminuição da viabilidade, a qual foi de 12%, 14% e 21%, para a S-02 e 24%, 24% e 30% para a S-04 nas concentrações de 250, 500 e 1000 µM, respectivamente. Tais efeitos não chegaram a comprometer 50% da viabilidade, logo S-02 e S-04 ainda podem ser consideradas seguras, pois as concentrações nas quais foram citotóxicas excedem bastante as concentrações que apresentaram atividade inibidora da tirosinase, a qual a menor foi de 25 µM.

Também buscamos avaliar o grau de segurança para células do tecido nervoso, tratadas com as substâncias aqui estudadas, usando como modelo cultura de células de retina de embrião de galinha (E7C8). O tratamento com ácido kójico e S-01 não apresentaram efeito citotóxico em nenhuma das concentrações testadas, exibindo assim um bom grau de segurança das mesmas. Já S-02, S-03 e S-04 mostraram um pequeno efeito citotóxico, sendo este de 12%, 19% e 21% para a S-02 e S-03, e de 13%, 14% e 13% para S-04 nas concentrações de 250, 500 e 1000 µM.

Apesar desta diminuição da viabilidade, S-02 e S-04 ainda podem ser consideradas seguras para células do tecido nervoso, uma vez que as concentrações testadas neste ensaio excedem, em muito, as concentrações testadas no ensaio de cinética, onde estas mostraram uma boa inibição enzimática a partir da concentração de 25 µM. Enquanto a S-03 não mostrou ser inibidor enzimático da tirosinase, mesmo em alta concentração (1,6mM).

Uma vez que muitos melanomas hiperexpressam a tirosinase e consequentemente apresentam uma alta produção de melanina, foi nosso intuito investigar neste trabalho a citotoxicidade do ácido kójico e seus análogos em linhagem de melanoma B16F10, que além de ser uma célula cancerígena, apresentando alta taxa de replicação, é um dos modelos de célula produtora de melanina mais utilizado na literatura para testes *in vitro* na busca de alternativas para clareadores de pele (MATSUDA *et al*, 2009; JEONG *et al*, 2012; HAN *et al*, 2014).

Nesta linhagem o tratamento com ácido kójico não apresentou efeito citotóxico na concentração de 250 µM, porém exibiu uma diminuição da viabilidade de 15% e 17% nas concentrações de 500 e 1000 µM, respectivamente. Tal comportamento diferiu do observado na linhagem MRC_5 e cultura de retina E7C8, nas quais o ácido kójico não apresentou

citotoxicidade. Essa diferença possivelmente deve-se a B16F10 possuir alta taxa de proliferação e assim, um pequeno efeito citostático no tratamento já é capaz de apresentar uma diminuição considerável da viabilidade avaliada pelo método do MTT, quando comparado ao grupo controle.

O tratamento com S-01 na B16F10 não apresentou citotoxicidade em nenhuma das concentrações testadas, exibindo alto grau de segurança, semelhante ao observado nas demais linhagens aqui testadas (MRC_5 e cultura de retina E7C8). Já o tratamento da B16F10 com S-02, semelhante ao ácido kójico, não apresentou efeito citotóxico na concentração de 250 µM, mas exibiu uma diminuição da viabilidade de 43% e 51% nas concentrações de 500 e 1000 µM, mostrando ser bastante tóxica nestas concentrações, efeito bem mais pronunciado que o apresentado pelo ácido kójico.

O tratamento com S-03 não promoveu efeito citotóxico na linhagem B16F10 nas concentrações de 250 e 500 µM, apresentando apenas uma pequena diminuição da viabilidade (12%) na concentração de 1000 µM, exibindo assim um grau de segurança nesta linhagem, semelhante ao observado para a linhagem MRC_5 e para a cultura de retina E7C8.

A substância S-04 apesar do excelente efeito como inibidor da tirosinase, causando inibição com apenas 25 µM, apresentou efeito citotóxico em todas as culturas testadas neste trabalho, sendo mais intenso na linhagem B16F10. Esse efeito citotóxico só não foi maior que o apresentado por S-02 na maior concentração testada ($IC_{50\%}$ = 1000 µM). No entanto, devemos considerar que o efeito citotóxico aqui observado é decorrente de concentrações superiores àquelas capazes de promover inibição da tirosinase, portanto esse efeito não inviabiliza o uso dessas substâncias com finalidade terapêutica, visto que a alta potência como inibidor pode possibilitar o uso em concentrações menores.

Assim, as moléculas análogas do ácido kójico S-02, S-04, S-06, S-07 e S-08, estudadas neste trabalho, apresentaram atividade como potentes inibidores de tirosinase, podendo ser candidatos para o desenvolvimento de agentes terapêuticos no tratamento de desordens de pigmentação e prevenção do escurecimento enzimático em alimentos industrializados, agregando assim valor estético, terapêutico e comercial.

6. CONCLUSÕES

- Das substâncias testadas, apenas a S-05 não apresentou alteração no pico de absorvância quando em solução com sulfato de cobre II. A substância S-08 apresentou deslocamento hipsocrômico e as demais deslocamento batocrômico com a solução de sulfato de cobre II;
- Apenas a substâncias S-01 apresentou comportamento cinético como inibidor misto. As substâncias S-02, S-04, S-06, S-07, S-08 e ácido kójico apresentaram inibição do tipo competitiva, enquanto as substâncias S-03 e S-05 não apresentaram atividade como inibidor de tirosinase, nas concentrações testadas;
- As substâncias S-06, S-07 e S-08 foram as que exibiram melhor atividade inibidora, com valores de K*i* próximos ao do ácido kójico;
- Dos análogos testados apenas a S-01 apresentou atividade hemolítica considerável na maior concentração testada, mostrando assim, bom grau de segurança para todas as moléculas neste ensaio;
- O tratamento com o ácido kójico e os análogos S-01, S-02, S-03 e S-04 apresentaram baixo grau de citotoxicidade em culturas de fibroblastos MRC_5 e em células de retina de embrião de galinha, porém S-02 e S-04 apresentaram diminuição da viabilidade em culturas de melanoma B16F10;
- Assim, os análogos do ácido kójico S-02, S-04, S-06, S-07 e S-08, mostraram ser potenciais candidatos para pesquisas terapêuticas no tratamento de desordens de pigmentação que envolvam a hiperatividade da tirosinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDO, H.; NIKI, Y.; YOSHIDA, M.; ITO, M.; AKIYAMA, K.; KIM, J. H.; YOON, T. J.; MATSUI, M. S.; YAROSH, D. B.; ICHIHASHI, M. Involvement of pigment globules containing multiple melanososmes in the transfer of melanosomes from melanocytes to keratinocytes. **Cell Logistics**. 1: 12-20, 2011.

ANDO, H.; NIKI, Y.; ITO, M.; AKIYAMA, K.; MATSUI, M. S.; YAROSH, D. B.; ICHIHASHI, M. Melanosomes Are Transferred from Melanocytes to Keratinocytes through the Processes of Packaging, Release, Uptake, and Dispersion. **Journal of Investigative Dermatology** 132: 1222–1229, 2012.

BARTELS, S.; ITO, S.; TRUNE, R. D.; NUTTALL, L. A. Noise-induced hearing loss: the effect of melanin in the stria vascularis. **Hearing Research**.154: 116–123, 2001.

BATTAINI, G.; MONZANI, E.; CASELLA, L.; LONARDI, E.; TEPPER, A. W. J. W.; CANTERS, G. W.; BUBACCO, L. Tyrosinase-catalyzed Oxidation of Fluorophenols. **Journal of Biological Chemistry**. 277 (47): 44606–44612, 2002.

BEHN, D.; DOKE, A.; RACINE, J.; CASANOVA, C.; CHEMTOB, S.; LACHAPELLE, P. Dark adaptation is faster in pigmented than albino rats. **Documenta Ophthalmologica**. 106: 153–159, 2003.

BENTLEY, R. From miso, *saké* and *shoyu* to cosmetics: a century of science for kojic acid. **Natural Product Reports**. 23: 1046–1062, 2006.

BLUMENTHAL, C. Z. Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 39: 214–228, 2004.

BRITO, F. C.; KOS, L. Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 21: 464-470, 2008.

BURDOCK, G. A.; SONI, M. G.; CARABIN, I. G. Evaluation of health aspects of kojic acid in food. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 33: 80–101, 2001.

BUSH, W. D.; SIMON, J. D. Quantification of Ca(2+) binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 20: 134-139, 2007.

CABANES, J.; CHAZARRA, S.; GARCIA-CARMONA, F. Tyrosinase Kinetics: A Semi-quantitative Model of the Mechanism of Oxidation of Monohydric and Dihydric Phenolic Substrates. **Journal of Theoretical Biology**. 214: 321-325, 2002.

CARVALHO, I.; PUPO, M. T.; BORGES, A. D. L.; BERNARDES, L. S. C. **Quimica Nova**. 26 (3): 428-438, 2003.

CHANG, T. S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**. 10(6): 2440-2475, 2009.

CHEN, Q. X.; HUANG, H.; KUBO, I. Inactivation kinetics of mushroom tyrosinase by cetylpyridinium chloride. **Journal of Protein Chemistry**. 22: 481-487, 2003.

CHIN, L. The genetics of malignant melanoma: Lessons from mouse and man. **Nature Reviews/Cancer**. 3: 559–570, 2003.

CICHOREK, M.; WACHULSKA, M.; STASIEWICZ, A.; TYMINSKA, A. Skin melanocytes: biology and development. **Postepy Dermatology and Allergology**. XXX (1): 30-41, 2013.

CINÉTICA ENZIMÁTICA. Disponível em: <http://www.docstoc.com/docs/ 107967021/Apresenta%EF%BF%BD%EF%BF%BDo-do-PowerPoint>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

CINÉTICA ENZIMÁTICA. Disponível em: <http://www.expertsmind.com/topic/ enzyme-kinetics/lineweaverburk-plot-94296.aspx>. Acesso em 20 de fevereiro de 2014.

CLAUS, H.; DECKER, H. Bacterial tyrosinases. **Systematic and Applied Microbiology**. 29: 3–14, 2006.

COSTIN, G. E.; HEARING, V. J. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress**. J. FASEB**. 21: 976-994, 2007.

EMAMI, S.; HOSSEINIMEHR, S. J.;TAGHDISI, S. M.;AKHLAGHPOOR, S. Kojic acid and its manganese and zinc complexes as potential radioprotective agents**. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 17: 45–48, 2007.

EVANS, S. M.; SCHRLAU, A. E.; CHALIAN, A. A.; ZHANG, P.; KOCH, C. J. Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. **Journal of Investigative Dermatology**. 126: 2596-606, 2006.

FARIAS, R. O. **ANÁLISE DE POLISSACARÍDEOS E TIROSINASE DE *Lentinula boryana* (BERK & MONT) PEGLER: UM MACROFUNGO COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**. 2008. 181f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

FEDOROW, H.; TRIBL, F.; HALLIDAY, G.; GERLACH, M.; RIEDERER, P.; DOUBLE, L. K. Neuromelanin in human dopamine neurons: Comparison with peripheral melanins and relevance to Parkinson's disease. **Progress in Neurobiology**. 75: 109–124, 2005.

GHANEM, G.; FABRICE, J. Tyrosinase related protein 1 (TYRP1/gp75) in human cutaneous melanoma. **Molecular Oncology**. 5: 150-155, 2011.

GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N.; GONZALEZ, S.; TEDESCO, A. C. The antioxidant action of *Polypodium leucotomos* extract and kojic acid: reactions with reactive oxygen species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 34: 1487–1494, 2001.

HAN, E.; CHANG, B.; KIM, D.; CHO, H.; K, S. Melanogenesis inhibitory effect of aerial part of *Pueraria thunbergiana* in vitro and in vivo. **Archives of Dermatological Research**. 306: 1-16, 2014.

HA, Y. M.; CHUNG, S. W.; SONG, S.; LEE, H.; SUH, H.; CHUNG, H. Y. 4-(6-Hydroxy-2-naphthyl)-1,3-bezendiol: a potent, new tyrosinase inhibitor. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. 30: 1711–1715, 2007.

HAASS, N. K.; HERLYN, M. Normal human melanocyte homeostasis as aparadigm for understanding melanoma. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 10: 153-163, 2005.

HAGHBEEN, K.; TAN, E. W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. **Analytical Biochemistry**. 312(1): 23-32, 2003.

HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C.; HAMDI, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnogical applications. **Journal of Applied Microbiology**. 100: 219-232, 2006.

HEARING, V. J. The melanosome: the perfect model for cellular responses to the environment**. Pigment Cell Research**. 13 (Suppl. 8): 23–34, 2000.

HEARING, V. J. Determination of melanin synthetic pathway. **Journal of Investigative Dermatology**. 131: 8-11, 2011.

HERRAIZ, C.; JIMÉNEZ-CERVANTES, C.; ZANNA, P.; GARCÍA-BORRÓN, J. C. Melanocortin-1 receptor mutations impact differentially on signalling to the cAMP and the ERK mitogen-activated protein kinase pathways**. Federation of European Biochemical Societies**. 583: 3269–3274, 2009.

HOCKER, T. L.; SINGH, M. K.; TSAO, H. Melanoma genetics and therapeutic approaches in the 21st century: Moving from the benchside to the bedside. **Society for Investigative Dermatology**. 128: 2575–2595, 2008.

IBRAHIM, N.; HALUSKA, F.G. Molecular pathogensis of cutaneous melanocytic neoplasms. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. 4: 551–579, 2009.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Quantitative Analysis of Eumelanin and Pheomelanin in Humans, Mice, and Other Animals: a Comparative Review. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 16: 523–531, 2003.

ITO, S.; WAKAMATSU,K. Human hair melanins: What we have learned and have not learned from mouse coat color pigmentation. **Pigment Cell and Melanoma Research**, 24: 63–74, 2010.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Diversity of human hair pigmentation as studied by chemical analysis of eumelanin and pheomelanin. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 25: 1369–1380, 2011.

JEONG, M.; YANG, K.; KIM, J.; NAM, B; KIM, G.; LEE, S.; SEO, S.; JO, W. Inhibitory effects of *Asterina pectinifera* extracts on melanin biosynthesis through tyrosinase activity. **International Journal of molecular Medicine**. 31: 205-212, 2013.

JEON, H. J.; NODA, M.; MARUYAMA, M.; MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; SUQIVAMA, M. Identification and kinetic study of tyrosinase inhibitors found in sake lees. J. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 54: 9827-9833, 2006.

JHAPPAN, C.; NOONAN, F. P.; MERLINO, G.Ultraviolet radiation and cutaneous malignant melanoma. **Oncogene**, 22: 3099–3112, 2003.

JOHNSON, K. A. A century of enzyme kinetic analysis, 1913 to 2013. **FEBS** Letters. 587: 2753–2727, 2013.

KIM, Y. J.; UYAMA, H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: structure, inhibition mechanism and perspective for the future. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 62(15): 1707-1723, 2005.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; CHAUDHURI, K. S.; KUBO, Y.; SÁNCHEZ, Y.; OGURA, T. Flavonols from *Heterotheca inuloides*: tyrosinase inhibitory activity and structural criteria. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 8: 1749-1755, 2000a.

KUBO, I.; KINST-HORI, I.; KUBO,Y.; YAMAGIWA, Y.; KAMIKAWA, T.; HARAGUCHI, H. Molecular design of antibrowning agents. **Journal Agriculture and Food Chemistry**. 48: 1393-1399, 2000b.

KUBO, I.; CHEN, Q. X.; NIHEI, K. Molecular design of antibrowning agents: antioxidative tyrosinase inhibitors. **Food Chemistry**. 81: 241-247, 2003.

LAI, L. C .B.; MARION, A. S.; TESCHKE, K.; TSUI, C. K. J. Occupational and environmental risk factors for Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**. 8: 297–309, 2002.

LANGFELDER, K.; STREIBEL, M.; JAHN, B.; HAASE, G.; BRAKHAGE, A. A. Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. **Fungal Genetics and Biology**. 38: 143-158, 2003.

LEE, A. Y. Role of keratinocytes in the development of vitiligo. **Annals Dermatology**. 24: 115-125, 2012.

LEE, A. Y.; NOH, M. The regulation of epidermal melanogenesis via cAMP and /or PKC signaling pathways: insights for the development of hypopigmenting agents. **Archives of Pharmacal Research**. 36: 792–801, 2013.

LEE, E. J.; LEE, Y. S.; HWANG, S.; KIM, S.; HWANG, J. S.; KIM, T. Y. N-(3,5-Dimethylphenyl)-3-Methoxybenzamide (A3B 5) Targets TRP-2 and Inhibits Melanogenesis and Melanoma Growth. **Journal of Investigative Dermatology**. 131: 1701–1709, 2011.

LEE, H. S. Tyrosinase inhibitors of *Pulsatilla cernua* root-derived materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 50: 1400-1403, 2002.

LENARTOWSKI, R.; GOC, A. Epigenetic, transcriptional and posttranscriptional regulation of the tyrosine hydroxylase gene. **International Journal of Developmental Neuroscience**, 29: 873-883, 2011.

LEU, Y. L.; HWANG, T. L.; HU, J. W.; FANG, J. Y. Anthraquinones from *Polygonum cuspidatum* as tyrosinase inhibitors for dermal use. **Phytotherapy Research**. 22: 552-556, 2008.

LIMA, C. R.; SILVA, J. R. A.; CARDOSO, E. T. C.; SILVA, E. O.; LAMEIRA, J.; NASCIMENTO, J. L. M.; BRASIL, D. S. B.; ALVES, C. N. Combined Kinetic Studies and Computational Analysis on Kojic Acid Analogous as Tyrosinase Inhibitors. **Molecules**. 19: 9591-9605, 2014.

LIM, J.T. Treatment of melasma using kojic acid in a gel containing hydroquinone and glycolic acid. **Dermatologic surgery**. 25: 282–284, 1999.

LIN, Y. J.; FISHER, E.D. Melanocyte biology and skin pigmentation. **Nature**. 445: 843-850, 2007.

MATSUDA, H.; NAKASHIMA, S.; ODA, Y.; NAKAMURA, S.; YOSHIKAWA, M. Melanogenesis inhibitors from the rizomes of *Alpinia officinarum* in B16 melanoma cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 17: 6048-6053, 2009.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of lmmunological Methods**. 65: 55-63, 1983.

MOTO, M.; MORI, T.; OKAMURA, M.; KASHIDA, Y.; MITSUMORI, K. Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. **Archives of Toxicology**. 80: 299–304, 2006.

MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; RODWELL, V. W. **Harper: Bioquímica Ilustrada**. 27ª ed. São Paulo: McGraw-Hill, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

NOH, J.; KWAK, S.; SEO, H.; SEO, J.; KIM, B.; LEE, Y. Kojic acid-amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. 19: 5586-5589, 2009.

NOHYNEK, G. J.; KIRKLAND, D.; MARZIN, D.; TOUTAIN, H.; LECLERC-RIBAUD, C.; JINNAI, H. An assessment of the genotoxicity and human health risk of topical use of kojic acid [5-hydroxy-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one]. **Food and Chemical Toxicology**. 42: 93–105, 2004.

OETTING, S. W. The tyrosinase gene and oculocutaneous albinism type 1(OCA1): a model for understanding the molecular biology of melanin formation. **Pigment Cell Research**. 13: 320–325, 2000.

OLIVARES, C. **DETERMINANTES ESTRUCTURALES DEL PROCESAMIENTO Y LA ACTIVIDAD CATALITICA DE TIROSINASA.** 2003. 241f. Tese (Doutorado) Escola de Doutorado em Integração e Modulação de Sinais em Biomedicina, Universidade de Murcia, Murcia, 2003.

OLIVARES, C.; SOLANO, F. New insights into the active site structure and catalytic mechanism of tyrosinase and its related proteins. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 22: 750–760, 2009.

OLIVARES, C.; SOLANO, F.; GARCIA-BORRON, J. C. Conformation-dependent Post-translational Glycosylation of Tyrosinase. **Journal of Biological Chemistry**. 278: 15735–15743, 2003.

OLIVEIRA, M. B.; PRADO, A. H.; BERNEGOSSI, J.; SATO, C. S.; BRUNETTI, I. L.; SCARPA, M. V.; LEONARDI, G. R.; FRIBERG, S. E.; CHORILLI, M. Topical Application of Retinyl Palmitate-Loaded Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for the Treatment of Skin Aging. **BioMed Research International**. 1-7, 2014.

OSTERGREN, A.; ANNAS, A.; SKOG, K.; LINDQUIST, G. N.; BRITTEBO, B. E. Long-term retention of neurotoxic beta-carbolines in brain neuromelanin. **Journal of Neural Transmission**. 111: 141–157, 2004.

PALMER, J. S.; DUFFY, D. L.; BOX, N. F.; AITKEN, J. F.; O'GORMAN, L. E.; GREEN, A. C.; HAYWARD, N. K.; MARTIN, N. G.; STURM, R. A. Melanocortin-1 receptor polymorphisms and risk of melanoma: Is the association explained solely by pigmentation phenotype? **American Journal of Human Genetics**. 66: 176–186, 2000.

PARK, Y. H.; KOSMADAKI, M.; YAAR, M.; GILCHREST, A. B. Cellular mechanisms regulating human melanogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**. 66: 1493-506, 2009.

PARVEZ, S.; KANG, M.; CHUNG, H.; CHO, C.; HONG, M.; SHIN, M.; BAE, H. Survey and Mechanism of Skin Depigmenting and Lightening Agents. **Phytotherapy Research**. 20: 921-934, 2006.

PETRIS, M. J.; STRAUSAK, D.; MERCER, J. F. The Menkes copper transporter is required for the activation of tyrosinase. **Human Molecular Genetics**. 9(19): 2845–2851, 2000.

PLONKA, P. M.; PASSERON, T.; BRENNER, M.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; THOMAS, A.; SLOMINSKI, A.; KADEKARO, A. L.; HERSHKOVITZ, D.; PETERS, E.; NORDLUND, J. J.; ABDEL-MALEK, Z.; TAKEDA, K.; PAUS, R.; ORTONNE, J. P.; HEARING, V. J.; SCHALLREUTER, K. U. What are melanocytes really doing all day long…? **Experimental Dermatology**. 18: 799-819, 2009.

QIU, L.; CHEN, Q. X.; WANG, Q.; HUANG, H.; SONG, K. K. Irreversibly inhibitory kinetics of 3,5dihydroxyphenyl decanoate on mushroom (*Agaricus bisporus*) tyrosinase. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. 13: 6206-6211, 2005.

RAO, A. R.; SINDHUJA, H. N.; DHARMESH, S. M.; SANKAR, K. U.; SARADA, R.; RAVISHANKAR, G. A. Effective Inhibition of Skin Cancer, Tyrosinase, and Antioxidative Properties by Astaxanthin and Astaxanthin Esters from the Green Alga *Haematococcus pluvialis***. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 61(16): 3842-3851, 2013.

ROMEO, S.; CAMILLO, D. D.; SPLENDIANI, A.; CAPANNOLO, M.; ROCCHI, C.; ALOISI, G.; FASCIANI, I.;CORSINI, G. U.; SCARNATI, E.; LOZZI, L.; MAGGIO, R.

Eyes as Gateways for Environmental Light to the Substantia Nigra: Relevance in Parkinson's Disease. **Scientific World Journal**. 1-7, 2014.

ROOSEBOOM, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; VERMEULEN, N. P. E. Enzyme-catalyzed activation of anticancer prodrugs. **Pharmacological Reviews**. 56(1): 53-102, 2004.

ROUZAUD, F.; KADEKARO, A. L.; ABDEL-MALEK, Z. A.; HEARING, V. J. MC1R and the response of melanocytes to ultraviolet radiation. **Mutation Research**. 571: 133-52, 2005.

SABUDAK, T.; KHAN, M. T.; CHOUDHARY, M. I.; OKSUZ, S. Potent tyrosinase inhibitors from *Trifolium balansae*. **Natural Product Research**. 20: 665-670, 2006.

SAEWAN, N.; KOYSOMBOON, S.; CHANTRAPROMMA, K. Anti-tyrosinase and anti-cancer activities of flavonoids from *Blumea balsamifere* DC. **Journal of Medicinal Plants Research**. 5 (6): 1018-1025, 2011.

SAGHAIE, M.; POURFARZAM, M.; FASSIHI, A.; SARTIPPOUR, B. Synthesis and tyrosinase inhibitory properties of some novel derivatives of kojic acid. **Research in Pharmaceutical Sciences**.8 (4): 233-242, 2013.

SCHALLREUTER, K. U; KOTHARI, S.; CHAVAN, B.; SPENCER, J. D. Regulation of melanogenesis - controversies and new concepts. **Experimental Dermatology**. 17: 395-404, 2008.

SCHERER, D.; KUMAR, R. Genetics of pigmentation in skin cancer – A review. **Mutation research**. 700: 141-153, 2010.

SCHURINK , M.; VAN BERKEL, W. J. H.; WICHERS, H. J.; BOERIU, C. G. Novel peptides with tyrosinase inhibitory activity. **Peptides**. 28: 485-495, 2007.

SENDOVSKI, M. M.; KANTEEV, V. S.; BEN-YOSEF, N.; ADIR E A. Fishman First Structures of an Active Bacterial Tyrosinase Reveal Copper Plasticity. **Journal of Molecular Biology**. 405 (1): 227-237, 2011.

SIMON, D. J.; PELES, D.; WAKAMATSU, K.; ITO, S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology and function. **Pigment Cell & Melanoma Research**. 22: 563-579, 2009.

SLOMINSKI, A. T.; ZMIJEWSKI, A. M.; SKOBOWIAT, C.; ZBYTEK, B.; SLOMINSKI, M. R.; STEKETEE, D. J. Sensing the environment: Regulation of local and global homeostasis by the skin neuroendocrine system. **Advances in Anatomy, Embryology, Cell Biology**. 212: 115, 2012.

SLOMINSKI, A.; WORTSMAN, J. Neuroendocrinology of the skin. **Endocrine Reviews**. 21: 457-87, 2000.

SLOMINSKI, A.; TOBIN, D. J.; SHIBAHARA, S.; WORTSMAN, J. Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. **Physiological Reviews**. 84: 1155-1228, 2004.

STECK, M. B. The Role of Melanocortin 1 Receptor in Cutaneous Malignant Melanoma: Along the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway. **Biological Research for Nursing**. 1-8, 2014.

STURM, R. A. A golden age of human pigmentation genetics**. Trends in genetics**. 22(09): 464-468, 2006.

SULAIMON, S. S.; KITCHELL, B. E. The biology of melanocytes. **Veterinary Dermatology**. 14: 57-65, 2003.

TACHIBANA, M. Cochlear melanocytes and MITF signaling. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**. 6: 95–98, 2001.

TAMURA, T.; MITSUMORI, K.; TOTSUKA, Y.; WAKABAYASHI, K.; KIDO, R.; KASAI, H.; NASU, M.; HIROSE, M. Absence of in vivo genotoxic potential and tumor initiation activity of kojic acid in the rat thyroid. **Toxicology**. 222: 213–224, 2006.

THOMPSON, K. H.; BARTA, C. A.; ORVIG, C. Metal complexes of maltol and close analogues in medicinal inorganic chemistry. **Chemical Society Reviews**. 35: 545-556, 2006.

TSATMALI, M.; ANCANS, J.;THODY, A. J. Melanocyte function and its control by melanocortin peptides**. Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 50: 125-133, 2002.

VIDEIRA, I. F. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis**. Anais Brasileiros de Dermatologia**. 88 (1): 76-83, 2013.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.

WAKAMATSU, K.; KAVANAGH, R.; KADEKARO, A. L.; TERZIEVA, S.; STURM, R. A.; LEACHMAN, S.; ABDEL-MALEK, Z.; ITO, S. Diversity of pigmentation in cultured human melanocytes is due to differences in the type as well as quantity of melanin. **Pigment Cell & Melanoma Research**.19: 154–162, 2006.

WAN, P.; HU, Y.; HE, L. Regulation of melanocyte pivotal transcription factor MITF by some other transcription factors. **Molecular and cellular biochemistry**. 354: 241–246, 2011.

YAMAGUCHI, Y.; BRENNER, M.; HEARING, V. J. The regulations of skin pigmentation. **Journal of Biological Chemistry**. 13: 1-11, 2007.

YUE-XIU, S.; SHANG-JUN, Y.; SANGHO, O.; ZHI-JIANG, W.; SEN, Y.; LI, Y.; JUN-MO, Y.; YONG-DOO, P.; JINHYUK, L.; GUO-YING, Q. An Integrated Study of Tyrosinase Inhibition by Rutin: progress using a Computational Simulation. **Journal of Biomolecular Structure & Dinamics**. 29: 0999- 1012, 2012.

ZBYTEK, B.; PEACOCK, D. L.; SEAGROVES, T. N.; SLOMINSKI, A. Putative role of HIF transcriptional activity in melanocytes and melanoma biology. **Dermato-Endocrinology**. 5(01): 239–251; 2013.

ZECCA, L.; TAMPELLINI, D.; GATTI, A.; CRIPPA, R.; EISNER, M.; SULZER, D.; ITO, S.; FARIELLO, R.; GALLORINI, M. The neuromelanin of human substantia nigra and its interaction with metals. **Journal of Neural Transmission**. 109: 663–672, 2002.

ZECCA, L.; ZUCCA, F. A.; WILMS, H.; SULZER, D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. **Trends Neurosciences**. 26 (11): 578–580, 2003.