

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS – PPGCF**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DERIVADOS DO ÁCIDO**  
**KÓJICO SOBRE A MELANOGÊNESE E O**  
**ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

**TATIANA DO NASCIMENTO PEDROSA**

**MANAUS**

**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FARMACÊUTICAS – PPGCF**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DERIVADOS DO ÁCIDO**  
**KÓJICO SOBRE A MELANOGÊNESE E O**  
**ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Mestranda: Tatiana do Nascimento Pedrosa**  
**Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos**  
**Co-Orientador: Emerson Silva Lima**

**MANAUS**

**2013**

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Pedrosa, Tatiana do Nascimento

P372a Avaliação do potencial de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e o envelhecimento cutâneo / Tatiana do Nascimento Pedrosa. - Manaus: UFAM, 2013.  
115 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) —  
Universidade Federal do Amazonas, 2013.

Orientadora: Marne Carvalho de Vasconcellos  
Co-orientador: Emerson Silva Lima

1. Rejuvenescimento cutâneo 2. Antioxidantes 3. Fungos I.  
Vasconcellos, Marne Carvalho de (Orient.) II. Lima, Emerson Silva  
(Co-orient.) III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

CDU 577.1(043.3)

**TATIANA DO NASCIMENTO PEDROSA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DOS DERIVADOS DO ÁCIDO  
KÓJICO SOBRE A MELANOGÊNESE E O  
ENVELHECIMENTO CUTÂNEO**

**Dissertação aprovada em 25 de fevereiro de 2013**

**BANCA EXAMINADORA**

---

**Profa. Dra. Marne Carvalho de Vasconcellos**  
**Orientadora**  
**Universidade Federal do Amazonas**

---

**Profa. Dra. Raquel Carvalho Montenegro**  
**Membro**  
**Universidade Federal do Pará**

---

**Profa. Dra. Maria de Meneses Pereira**  
**Membro**  
**Universidade Federal do Amazonas**

## **DEDICATÓRIA**

**“Dedico este trabalho a  
Beatriz Siqueira (*in memoriam*),  
aos meus pais e irmãos.”**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por seu amor e fidelidade, por me dar saúde, ânimo, uma boa família e bons amigos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Marne Vasconcellos, pelos ensinamentos, confiança, oportunidade e amizade. Agradeço a convivência e todo o conhecimento a mim repassado;

Ao meu co-orientador, professor Dr. Emerson Silva Lima, pela confiança, exigência e ensinamentos sempre presentes no decorrer da concretização deste trabalho;

Aos meus pais, Lázaro e Maria, aos irmãos de sangue e coração, Denise, Cristiana e Eduardo, aos padrinhos, tios, especialmente Joilgon e Isabel, e familiares que de alguma forma me conduziram até aqui, pela presença imprescindível em todos os momentos de minha vida, com muito amor;

Aos parceiros de laboratório, Gleyce, Jéssica, Zanair, Ana Carolina, Ellen, Daniele, Rafaela, Arleilson, Patrícia, Lucas, Luana, Iara, Vítor e Nívea, por toda ajuda direta ou indireta para a realização deste trabalho. Gleyce, Dani e Zanair, gostaria de agradecê-los todo o apoio, incentivo e amizade. Edson, meu grande amigo, seu incentivo, sua amizade e tudo o que fez por mim... Eu só tenho a agradecer. Nat, fico muito feliz por nossa amizade ter se fortalecido nesses últimos anos, obrigada por me apoiar sempre;

A Profa. Raquel Montenegro por auxiliar em meu treinamento na cultura de células, pelas células doadas, pela amizade;

À Ana Claudia, Suellen, Castelo e a Tiane, pela amizade eterna, pelo ombro amigo;

Aos meus amigos do Sistema Complemento e amigos feitos durante a graduação e escola que levo sempre em meu peito, pela amizade e incentivo, afinal precisamos desse apoio fora para não enlouquecermos (risos);

À professora Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler pela oportunidade de estágio e convívio no laboratório de patologia da USP. Agradeço a orientação, as células, as técnicas cedidas, a hospitalidade e o incentivo;

À técnica Camila Marinho, a mestranda Fernanda Branco Fillipin e a Doutoranda Andréa C. Fruet, pelas células e técnicas cedidas para a realização deste estudo, os ensinamentos a mim repassados, a companhia agradável, a amizade e principalmente pela hospitalidade com a qual fui recebida no laboratório de Patologia da Universidade de São Paulo –USP;

A todos os funcionários da USP (principalmente a Renatinha, por sempre “me salvar” quando não havia fluxo disponível, e, a Rose, por sempre me avisar do gelo seco, risos), mestrandos, doutorandos e pós-doutorandos do laboratório de Patologia da USP (Manu, Silvana, Kelly, Diogo, Thalita, Bianca, Paula, Débora, Renato, Raquel) por terem de forma direta ou indireta me auxiliado durante o período em que estive nas dependências da universidade.

À Profa. Dra. Marília Smith, por ter me possibilitado a convivência no laboratório de genética da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e por sua hospitalidade;

À pós-doutoranda (UNIFESP), Profa. Dra. Danielle Calcagno, pelos ensinamentos, amizade e por ter tornado a minha estadia em São Paulo muito mais agradável;

Ao Prof. Dr. Alberdan Santos e Prof. Dr. Antônio Carvalho da Universidade Federal do Pará (UFPA) pela síntese e doação dos derivados utilizados neste trabalho;

Aos amigos da república na vila indiana e amigos conquistados em São Paulo, Marilu, Miluska, Duílio, Alexandre, Elaine, Bob, Natália e Hermínio, por deixarem minha estadia em São Paulo mais agradável o que foi de extrema importância para superar o desconforto e a saudade;

À super dupla da secretaria, Luciana e Giane, agradeço pelos milhares de “galhos quebrados”, pela eficiência, pela amizade.

À Cléo, por quebrar vários galhos sempre, por sua dedicação, eficiência e bom humor;

Aos funcionários da FCF, os quais eu tanto perturbei, faltam-me palavras para expressar o meu respeito e carinho;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pelos ensinamentos repassados.

À Universidade Federal do Amazonas pelo espaço cedido e aos colegas da universidade que colaboraram para a realização desse trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, por proporcionar essa possibilidade de crescimento profissional.

À FAPEAM pela concessão da bolsa de estudos.

A CAPES por proporcionar-me imenso crescimento profissional e pessoal através do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD).

À CAPES, FAPEAM e CNPq, pelo suporte financeiro.

A todos que de alguma forma me ajudaram nesses dois anos, para a realização deste trabalho, que colaboraram para o meu crescimento intelectual, pessoal, espiritual e profissional. Que Deus os abençoe ricamente.



## RESUMO

A exposição solar contínua é um dos principais fatores causadores de estresse oxidativo, manchas e envelhecimento da pele. O crescimento do mercado de cosméticos no mundo, o interesse cada vez maior das pessoas por uma pele jovem, isenta de rugas e manchas, tem estimulado os pesquisadores na busca por novos ativos com este fim. O ácido kójico é um conhecido e bastante utilizado despigmentante, produzido principalmente por fungos do gênero *Aspergillus* que tem sido relatado também como antioxidante e rejuvenescedor. Entretanto, o ácido kójico apresenta desvantagens como baixa estabilidade e inibição insatisfatória em baixas concentrações o que estimula os pesquisadores na busca por compostos mais ativos ou modificações na molécula visando a busca de derivados mais ativos, estáveis e seguros. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo estudar o potencial de nove derivados do ácido kójico sintetizados por pesquisadores da Universidade Federal do Pará – UFPA, visando obter compostos com atividades despigmentantes, antioxidantes e rejuvenescedoras superiores às relatadas para o ácido kójico. No presente estudo foram realizados ensaios de citotoxicidade, avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, inibição enzimática *in vitro* das enzimas elastase, tirosinase, colagenase e hialuronidase, inibição da atividade da tirosinase e da produção de melanina em células B16F10 e expressão gênica da tirosinase (Tyr). Dos nove derivados estudados, apenas três, kojato de zinco, kojato de cobre (Cu-AK) e oleikojato de cobre (Cu-Ok), apresentaram atividade inibitória *in vitro* sobre a tirosinase de cogumelo e foram selecionados para continuação deste trabalho. A inibição da tirosinase *in vitro* do kojato de zinco ( $CI_{50} - 30,4 \pm 0,89 \mu M$ ) foi superior a apresentada pelo ácido kójico ( $CI_{50} - 60,2 \pm 1,83 \mu M$ ) e seus outros derivados Cu-AK ( $CI_{50} - 133,3 \pm 6,59 \mu M$ ) e Cu-Ok ( $CI_{50} - 77,6 \pm 4,31 \mu M$ ). Estes compostos não foram citotóxicos em células B16F10 e fibroblastos de derme humana na concentração de  $100 \mu M$  e não apresentaram potencial hemolítico em concentrações superiores a  $250 \mu M$ . O Ácido kójico (AK) e os derivados, Cu-AK e Cu-Ok, foram selecionados para avaliação da ação sobre a melanogênese e enzimas que atuam no envelhecimento cutâneo, além da atividade antioxidante. AK, Cu-AK e Cu-OK, apresentaram atividade antioxidante inferior a 50 % no ensaio do DPPH a  $50 \mu g/mL$ , no entanto, mostraram-se potentes agentes quelante de metais. Na concentração estudada,  $50 \mu g/mL$ , Cu-OK ( $76,0 \pm 5,7 \%$ ) apresentou atividade quelante levemente superior a do AK ( $58,9 \pm 5,63 \%$ ) e Cu-AK ( $57,4 \pm 5,24$ ). A atividade da tirosinase em B16F10 foi fortemente inibida por Cu-AK (86,7 %) e Cu-OK (92,5 %) a produção de melanina diminuiu em cerca de 60,2% e 61,6% respectivamente. Não houve alterações nos níveis de expressão gênica de tirosinase e não foi observada inibição significativa das demais enzimas estudadas. Nossos resultados sugerem que a ação sobre a melanogênese observada para Cu-AK e Cu-OK ocorre através da inibição da tirosinase associada a um mecanismo antioxidante. Os compostos estudados apresentam grande potencial para uso cosmético como agentes despigmentantes.

**Palavras-chave:** Melanina, rejuvenescimento cutâneo e antioxidantes.

## ABSTRACT

The continuous sun exposure is a major factor causing oxidative stress, stains and aging skin. The growth of the cosmetics market in the world, the growing interest of people for youthful skin, free of wrinkles and spots, has stimulated researchers to search for new assets for this purpose. Kojic acid is a well known and widely used depigmenting, mainly produced by fungi of the genus *Aspergillus* which has also been reported as an antioxidant and rejuvenating. However, kojic acid has disadvantages such as low stability and poor inhibition at low concentrations which encourages researchers to search for more active compounds or changes in the molecule in order to seek more active derivatives, stable and secure. Thus, this work aimed at studying the potential of nine Kojic acid derivatives synthesized by researchers at the Federal University of Pará - UFPA in order to obtain compounds with depigmenting activity, antioxidants and rejuvenating superior to those reported kojic acid. In this study we performed cytotoxicity assays, evaluation of antioxidant activity *in vitro* and enzyme *in vitro* inhibition of elastase, tyrosinase, collagenase and hyaluronidase. We evaluated the inhibition of tyrosinase activity and melanin production in B16F10 and alterations on tyrosinase gene expression. Of the nine derivatives studied, only three of them, kojato zinc, kojato copper (Cu-AK) and oleikojato copper (Cu-Ok), showed *in vitro* inhibitory activity on mushroom tyrosinase and were selected for the present study. The inhibition of tyrosinase *in vitro* kojato zinc ( $IC_{50} - 30.4 \pm 0.89\mu M$ ) was higher than that presented by the kojic acid ( $IC_{50} - 60.2 \pm 1.83\mu M$ ) and its other derivatives Cu-AK ( $IC_{50} - 133.3 \pm 6.59\mu M$ ) and Cu-Ok ( $IC_{50} - 77.6 \pm 4.31\mu M$ ). These compounds were not cytotoxic to B16F10 cells and human dermal fibroblasts at 100  $\mu M$  and showed no hemolytic potential at the concentration of 250  $\mu M$ . The Kojic acid and derivatives, Cu-AK and Cu-Ok, were selected to evaluate the action on melanogenesis and enzymes that act on skin aging, as well as antioxidant activity. AK, AK-Cu and Cu-OK, apresenaram low antioxidant activity in the DPPH assay at 50  $\mu g/mL$ , however, proved to be powerful metal chelating agents. In the studied concentration, 50  $\mu g/mL$ , OK-Cu ( $76.0 \pm 5.7\%$ ) showed chelating activity slightly higher than the AK ( $58.9 \pm 5.63\%$ ) and AK-Cu ( $57.4 \pm 5.24$ ). The tyrosinase activity in B16F10 was strongly inhibited by Cu-AK (86.7%) and Cu-OK (92.5%), melanin production decreased by approximately 60.2% and 61.6% respectively. There were no changes in levels of gene expression of tyrosinase and there was no significant inhibition of other enzymes studied. Our results suggest that the action on melanogenesis observed for Cu-OK and Cu-AK occurs through inhibition of tyrosinase associated with an antioxidant mechanism. The compounds studied have great potential for use as cosmetic depigmenting agents.

**Keywords:** Melanin, skin rejuvenation and antioxidants

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da pele humana. EC – estrato córneo; EG – estrato granuloso; Ee – estrato espinhoso; EB – estrato basal; MB – membrana basal. ....	19
Figura 2 – Estruturas da Eumelanina e Feomelanina. ....	21
Figura 3 – Diagrama esquemático de uma porção do melanócito e dendrito apresentando os estágios de maturação dos melanossomos nos melanócitos em estágios I, II, III, IV e outras organelas relevantes. ....	23
Figura 4 – Biossíntese de Melanina. TYR – Tirosinase; TRP-1 – Proteína 1 relacionada com a tirosinase; TRP-2 – Proteína 2 relacionada com a tirosinase; GSH – Glutationa; DHI – 5,6-Diidroxiindol; IQ – Indol-5,6-quinona; DHICA – 5,6- Dihidroxiindol-2-ácido carboxílico; ICAQ – Indol-5,6- quinona ácido carboxílico; HBTA: 5-hidroxi-1,4- benzotiazinilalanina. ....	25
Figura 5 – Diferenças na estrutura e conteúdo na pele jovem, pele no envelhecimento intrínseco e pele no envelhecimento extrínseco. ....	33
Figura 6– Representação da Radiação na UV aumentando a expressão de metaloproteinases e a degradação do colágeno na membrana extracelular. ....	37
Figura 7 – Papel do estresse oxidativo no envelhecimento e na resposta UV. A irradiação UV e o envelhecimento levam a um aumento na produção de ROS, que alteram a estrutura e função de genes e proteínas. Como resultado, há a desregulação da homeostase intracelular e extracelular que pode modificar o comportamento celular e interações célula-matriz, conduzindo assim à uma disfunção da pele. ....	42
Figura 8 – Estresse oxidativo induzido por radiação UV e alteração na pigmentação. ....	42
Figura 9– Estrutura do Ácido kójico e de seus derivados, Kojato de cobre, Kojato de zinco e Oleikojato de cobre, escolhidos após triagem. ....	44
Figura 10– Estratégia experimental. ....	46

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Classificação das Metaloproteinases de matriz de acordo com sua estrutura organizacional e substrato. ....	36
Quadro 2 – Inibidores da atividade da Hialuronidase .....	39

## LISTA DE SIGLAS

AAAPVN – *N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilido  
ABIPEHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos  
AH – Ácido hialurônico  
AK – Ácido kójico (5-hidroxi-2-hidroximetil-4-piranona)  
AMPc – 3',5'-Adenosina monofosfato cíclico  
ATP – Adenosina trifosfato  
B16F10 – Linhagem celular de melanoma murino  
c – kit – Receptor para citoquina  
cAMP-PKA – Via de sinalização para a síntese de melanina (3',5'-Adenosina monofosfatocíclico/proteína quinase A).  
CAT – catalase  
CE<sub>50</sub> – Concentração de eficiência mediana  
CI<sub>50</sub> – Concentração inibitória mediana  
DCT – Dopacromo tautomerase  
DHI – 5-6-dihidroxiindol  
DHICA – 5-6-dihidroxiindol-2-ácido carboxílico  
DMAB – *r*-dimetilaminobenzaldeído  
DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium (meio Eagle modificado por Dulbecco)  
DNA – Ácido desoxirribonucléico  
DOPA – 3,4-dihidroxifenilalanina  
DPPH – 2,2'-difetil-1-picril-hidrazila  
EC – Estrato córneo  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
EE – Envelhecimento extrínseco  
EI – Envelhecimento intrínseco  
EO – Estresse oxidativo  
EP – Envelhecimento da pele  
ERKs – Quinases reguladas por sinal extracelular  
GAGs – Glicosaminoglicanos  
GPx – glutationa peroxidase  
GR – glutationa redutase  
GSH – Glutationa  
HBTA – 5-hidroxi-1,4- benzotiazinilalanina  
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência “High Performance Liquid Chromatography”  
Hyal – Hialuronidase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio  
HO· – radicais hidroxila  
ICAQ – Indol-5,6- quinona ácido carboxílico  
IQ – Indol-5,6-quinona  
L-DOPA – L-3,4-dihidroxifenilalanina  
LPS – Lipopolissacarídeo  
LS – Lentigos solares  
MITF – Fator de transcrição associado a microftalmia ou Fator de Transcrição de Tirosinase  
MC1R – Receptor de melanocortina – 1  
MMP – Metaloproteinases de matriz

MMP1 – Colagenase  
MMP3 – Estromelina  
NIH 3T3 – Fibroblasto murino  
O<sub>2</sub>- - superóxido  
pH – Potencial hidrogeniônico  
PKA – Proteína quinase A  
PKC – Proteína quinase C  
Pmel 17 – glicoproteína melanócito – específica  
POMC – peptídeo proópiomelanocortina  
PI3K/AKT – via de sinalização para a síntese de melanina(fosfatidilinositol-3-quinase/proteína quinase b)  
RNAm – ácido ribonucléico mensageiro  
ROS – Espécies reativas de oxigênio  
SFB – soro fetal bovino  
SOD – superóxido dismutase  
TIMPs – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz  
TIMP1 – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz 1  
TIMP3 – Inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz 3  
TRP –1 – proteína relacionada à tirosinase – 1  
TRP – 2 – proteína relacionada à tirosinase – 2  
TYR – tirosinase  
UV – radiação ultravioleta  
UVA – radiação ultravioleta tipo A  
α – MSH – alfa – hormônio estimulante de melanócito

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 Pele.....	18
2.2 Melanina.....	21
2.2.1 Melanogênese.....	22
2.2.2 Tirosinase.....	24
2.2.3 Regulação da Melanogênese.....	25
2.2.4 Desordens pigmentares.....	27
2.2.5 Inibidores de tirosinase.....	30
2.3 Envelhecimento Cutâneo.....	32
2.3.1 Metaloproteinases de matriz.....	35
2.3.2 Ácido hialurônico e envelhecimento cutâneo.....	37
2.4 Antioxidantes: Potencial para uso cosmético.....	40
2.5 Derivados do ácido kójico.....	43
3 Objetivos.....	45
3.1 Objetivo geral.....	45
3.2 Objetivos específicos.....	45
4 Metodologia.....	46
4.1 Estratégia Experimental.....	46
4.2 Derivados do Ácido Kójico.....	46
4.2.1 Síntese dos derivados do Ácido kójico.....	47
4.3 Células.....	48
4.3.1 Manutenção das células.....	48
4.4 Avaliação da citotoxicidade celular.....	48
4.4.1 Exclusão por Azul de Tripan.....	48
4.4.2 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue.....	49
4.4.3 Atividade hemolítica em sangue de camundongo.....	50
4.5 Testes de inibição enzimática e em cultura de células.....	51
4.5.1 Teste de inibição da tirosinase <i>in vitro</i> .....	51
4.5.2 Efeito sobre a produção de melanina e atividade da tirosinase em B16F10.....	52
4.5.3 Avaliação da expressão de tirosinase.....	53
4.5.4 Análise da inibição <i>in vitro</i> de Metaloproteinase de matriz-2 (MMP2) através de <i>zimografia in vitro</i> .....	54
4.5.5 Ensaio de inibição da elastase <i>in vitro</i> .....	55

4.5.6 Ensaio de inibição da hialuronidase <i>in vitro</i> .....	55
4.6 Avaliação do Potencial Antioxidante .....	56
4.6.1 Teste do 2,2'-difênil-1-picril-hidrazila (DPPH).....	56
4.6.2 Avaliação da atividade quelante de ferro .....	57
4.7 Análise dos resultados .....	57
ARTIGO – Effect of kojic acid derivatives on pigmentation and skin age-related enzymes .....	58
8 REFERÊNCIAS .....	77
APÊNDICE .....	91
1 – ARTIGO – Preparation and Characterization of Coordination Complex by Iron (III) and Copper (II) from Chelating Kojic–Lipid Conjugates 5–hydroxy–7–oleyl–4(1H)–pyrona and 5–hydroxy–7–lauroyl–4(1H)–pyrona: New perspectives enhanced cell permeability prodrugs with metal complex .....	91
2 – Cronograma de Execução.....	112
3 – Equipe Científica .....	113
4 – Recursos financeiros.....	114



## 1 INTRODUÇÃO

A pele é um tecido altamente complexo composto por três camadas principais, epiderme, derme e tecido adiposo subcutâneo. Na epiderme, a melanina é sintetizada e protege a pele dos danos causados pela radiação ultravioleta. No entanto, a superprodução e o acúmulo de melanina podem induzir na epiderme distúrbios de pigmentação, incluindo melasma e sardas (KO et al., 2011). A exposição solar contínua, leva à produção de espécies reativas de oxigênio na pele, promovendo o estresse oxidativo e as respostas inflamatórias na camada dérmica ou epidérmica, resultando em envelhecimento, danos às membranas celulares, lipídios, proteínas e DNA (NEMA et al., 2011).

O envelhecimento cutâneo resultante da exposição à radiação UV é um processo cumulativo com base no grau de exposição à luz solar que é caracterizado pelo ressecamento, aspereza, flacidez, discromia, telangiectasias, rugas e pigmentação irregular da pele (RYOO et al., 2010; ZHONG et al., 2011). Estudos têm demonstrando que essas alterações inestéticas têm impactos significativos na saúde física e mental do paciente (ZHONG et al, 2011; SORI et al, 2011). Embora existam muitos tratamentos para o fotoenvelhecimento como a utilização de agentes tópicos, dermoabrasão, terapia óptica, injeções de citocinas ou fibroblastos, estas são medidas restringidas pelo risco de efeitos colaterais significativos ou inatividade prolongada ou eficácia transitória, o que os tornam insatisfatórios (ZHONG et al, 2011).

O Brasil ocupa a quinta posição em produção de produtos cosméticos para a pele e segundo dados da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIPHEC) o país demonstrou um crescimento bem mais vigoroso nesse setor que no restante da indústria, apresentando um crescimento de R\$ 4,9 bilhões em 1996 para R\$ 29,4 bilhões em 2011 (ABIPHEC, 2012).

É cada vez maior o interesse das pessoas por uma pele jovem, isenta de rugas e manchas, o que tem estimulado os pesquisadores da área cosmética na busca de se conhecer os mecanismos responsáveis, bem como as principais alterações morfo-histológicas causadas durante o processo de envelhecimento cutâneo (BATISTELA et al., 2007). Nesse sentido, a busca de novos ativos para uso dermocosmético proveniente de recursos naturais torna-se de grande interesse (NEMA et al, 2011).

O ácido kójico (AK), 5-hidroxi-2-hidroximetil-4-piranona, é uma substância natural produzida por diversos microorganismos, especialmente por fungos *Aspergillus*, *Acetobacter* e *Penicillium*, atualmente aplicado como um agente de clareamento da pele em cosméticos e como aditivo alimentar para evitar escurecimento enzimático (FICKOVA et al., 2008; NOH et al., 2009). Outras atividades foram descritas, tais como, bacteriostático fraco, anti-inflamatório, inseticida, citotóxico e antitumoral, aumento da fagocitose e indução de apoptose (FICKOVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011). No entanto, AK não apresenta inibição da atividade da tirosinase suficiente em baixa concentração ou oferece estabilidade a longo prazo. Portanto, muitos derivados de AK têm sido desenvolvidos para melhorar as propriedades através de modificação do grupo C-7 em ésteres hidroxila, hidroxifenil éteres, tioéteres, ésteres de ácido acrílico, glicosídeos amida e derivados (KWAK et al., 2011).

Nesse contexto, esse trabalho visa avaliar os efeitos de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e rejuvenescimento cutâneo, investigando se esses derivados possuem atividade antioxidante, se são capazes de inibir a tirosinase e diminuir a formação de melanina em melanócitos que são hiperpigmentados, bem como inibir as enzimas que atuam no envelhecimento cutâneo, elastase, hialuronidase e collagenase.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Pele

A pele é um tecido constituído por vários tipos de células interdependentes responsáveis pela manutenção da sua estrutura normal. Estruturalmente, é composta por várias camadas anatomicamente distintas, sendo protegida principalmente pelo estrato córneo (Fig. 1). A região superficial do tecido, que é de apenas 10-20mm de espessura, proporciona a principal barreira à absorção percutânea de compostos, bem como a perda de água. Logo após a camada córnea tem-se a epiderme viável (50-100mm de espessura), que é responsável pela produção do estrato córneo. A derme (1-2mm de espessura) é diretamente adjacente à epiderme e fornece o suporte mecânico para a pele. Cada camada é definida pela posição, forma, morfologia e estado de diferenciação dos queratinócitos (BOUWSTRA et al., 2003; HIRATA, 2004).

O estrato córneo (EC), a camada mais externa da pele, é crucial por ser uma barreira física constantemente renovável que protege o corpo da perda excessiva de água. O EC é também um biossensor que facilita outras estratégias de proteção biológicas através de uma sinalização entre o EC, a epiderme e as camadas mais profundas da pele, bem como por alterações de permeabilidade do EC em resposta a alterações de umidade e percepção de estímulos externos (RAWLINGS et al., 2008).

O estrato córneo é a principal barreira percutânea contra micróbios e produtos químicos capaz de resistir a forças mecânicas. É composto por células chamadas de corneócitos, produto final da diferenciação das células produzidas na epiderme viável (PROKSCH et al., 2008), nele encontramos a queratina, substância que confere

resistência química e física ao tecido além de conferir plasticidade à pele tornando a função barreira menos vulnerável a estresse mecânico (FORSLIND, 1994).

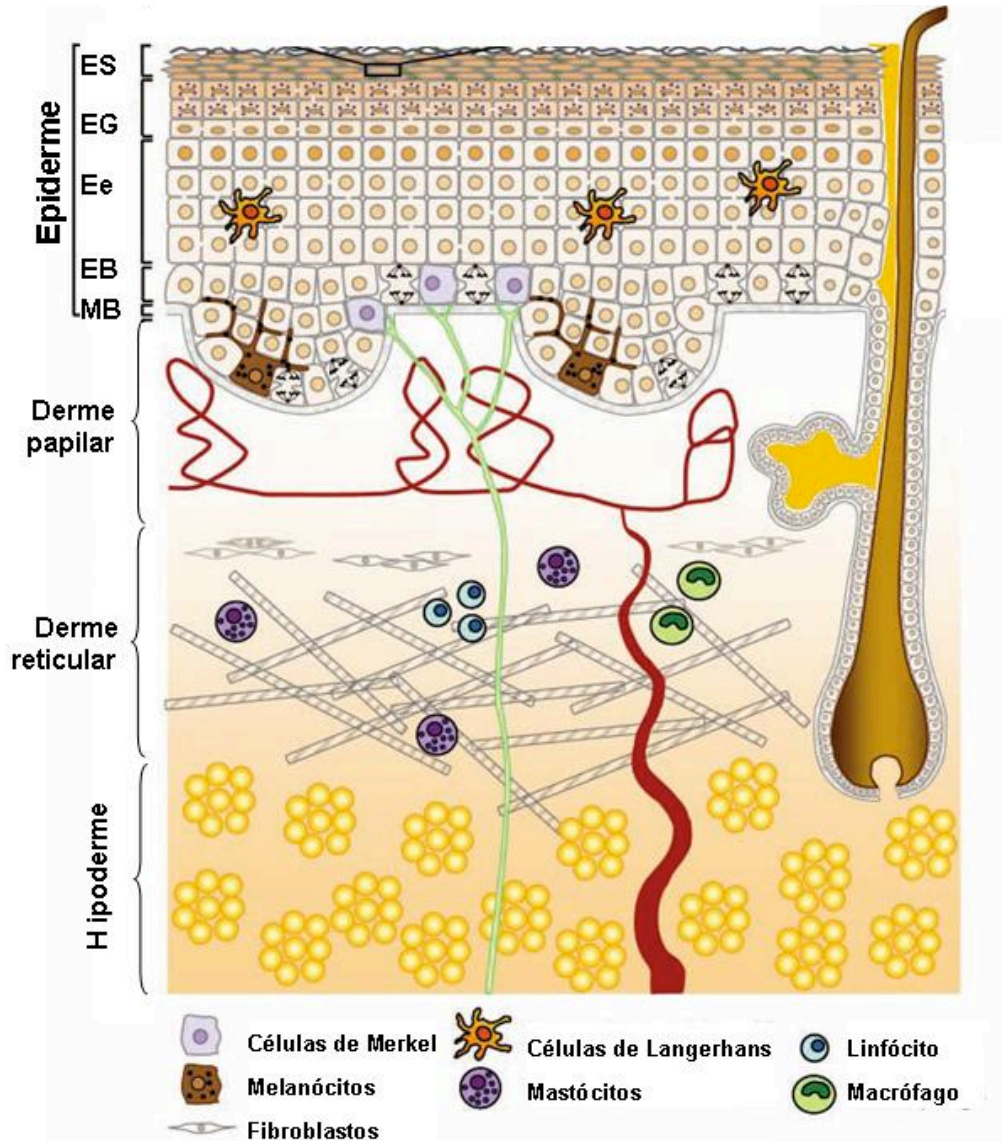


Figura 1 – Estrutura da pele humana. EC – estrato córneo; EG – estrato granuloso; Ee – estrato espinhoso; EB – estrato basal; MB – membrana basal.

Fonte: Adaptado de Wolk et al. (2010)

A epiderme é um epitélio estratificado escamoso, autorrenovável, que funciona como a interface entre o corpo humano e o ambiente externo. É um epitélio composto predominantemente por queratinócitos e tem como função a proteção contra ataques mecânicos, químicos e microbianos, funcionando como uma barreira, impedido a perda de água pela derme (QUINN, 2004; TSURUTA et al., 2002). A epiderme é desprovida de vasos

sanguíneos, recebendo todos os seus nutrientes e eliminando seus resíduos, por troca difusional com a derme (DOWNING, 1992).

A epiderme é composta por cinco camadas (camada basal, camada espinhosa, camada granulosa, camada lúcida e camada córnea). A camada mais profunda e mais importante é o estrato germinativo, pois nele estão contidas células capazes de divisão mitótica, responsáveis pela regeneração da epiderme. No estrato germinativo estão situados os melanócitos, células que formam a melanina, pigmento que dá cor à pele (KEDE & SABATOWICK, 2004).

Localizada logo abaixo da epiderme encontramos a derme que é constituída por tecido conjuntivo (fibras colágenas e elásticas envoltas por substância fundamental), fibras protéicas, vasos sanguíneos, terminações nervosas, órgãos sensoriais e glândulas (BEMVINDO, 2006). A derme é altamente vascularizada e permeável, sendo composta predominantemente de uma malha de colágeno fibroso que é pouco povoada com as células (DOWNING, 1992). As fibras colágenas conferem a capacidade de distensão à pele (BEMVINDO, 2006).

A derme é responsável por boa parte da força mecânica e das sensações da pele. As principais células da derme são os fibroblastos, responsáveis pela produção de fibras e de uma substância gelatinosa, a substância amorfa, na qual os elementos dérmicos estão mergulhados. Sob a pele, há uma camada de tecido conjuntivo frouxo, o tecido subcutâneo, rico em fibras e em células que armazenam gordura (células adiposas ou adipócitos). A camada subcutânea, denominada hipoderme, atua como isolante térmico, reserva energética e na proteção contra choques mecânicos (CAMARGO, 2008).

## 2.2 Melanina

Melaninas são biopolímeros únicos, pigmentados, sintetizados por células especializadas conhecidas como melanócitos, que existem na pele, cabelo, olhos e outros locais (OH et al., 2010). São responsáveis por determinarem a cor da pele e por serem fatores importantes para manutenção da homeostasia do órgão. Classificam-se em dois tipos: eumelanina (marrom a negra) e feomelanina (amarela a vermelha) (Figura 2) (ITO; WAKAMATSU, 2008).

A distribuição de pigmento de melanina é uma das características fenotípicas mais evidentes na cor da pele e dos cabelos de mamíferos. Este pigmento é produzido através do processo de melanogênese o qual ocorre dentro dos melanossomas, organelas intracelulares específicas nos melanócitos (HUANG et al., 2012).

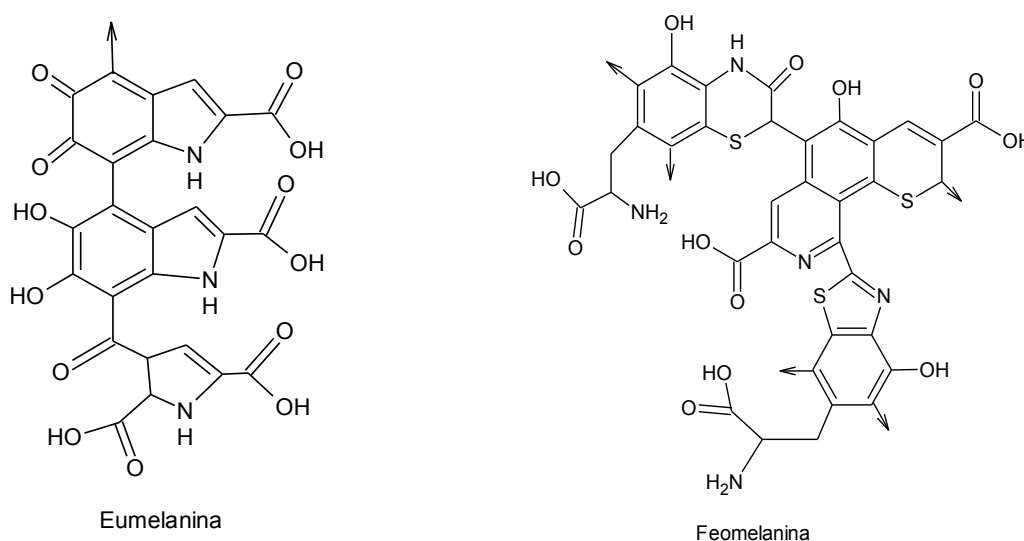


Figura 2 – Estruturas da Eumelanina e Feomelanina.  
Fonte: Adaptado de Simon et al., 2009

A eumelanina é um polímero marrom, alcalino e insolúvel e a feomelanina é um pigmento alcalino, solúvel e amarelado. Outros pigmentos semelhantes à feomelanina podem ser estruturalmente, derivados da eumelanina, e esta pode resultar em um pigmento solúvel e mais claro quando oxidada, na presença de íons metálicos. Um pigmento sulfurado que pode

ser encontrado em pequenas quantidades nos cabelos humanos vermelhos, o tricromo, é um derivado da feomelanina (MIOT et al., 2009).

Todas as unidades básicas das melaninas provêm da tirosina, a eumelanina é um biopolímero heterogêneo formado principalmente por diferentes estados oxidativos de 5,6-dihidroxi-indol (DHI), di-hidroxi-indol-2-acido carboxílico (DHICA) e unidades pirrólicas derivadas da clivagem oxidativa dos mesmos. A feomelanina é formada por benzotiazinas, benzotiazóis e benzoquinolonas (SIMON et al., 2009).

A melanina tem como função proteger a pele contra danos induzidos pela radiação ultravioleta (UV) através das suas propriedades ópticas e de filtragem química e, eliminar eficazmente espécies reativas de oxigênio (ROS), radicais livres tóxicos e íons metálicos (VILLAREAL et al., 2010). Porém, a exposição excessiva à radiação UV pode causar rugas, hiperpigmentação, melasma e câncer de pele (PARKA et al., 2011).

### **2.2.1 Melanogênese**

A melanogênese é um processo complexo regulado por vários fatores intrínsecos e extrínsecos (HUANG et al., 2012). Ocorre dentro de melanosomos nos melanócitos e pode ser estimulada por stress, incluindo a radiação UV, inflamação, e hormônios (HUANG et al., 2011).

Nos melanosomos, a síntese de melanina é regulada por enzimas melanogênicas que incluem a tirosinase (Tyr), a proteína 1 relacionada com a tirosinase (TRP-1) e a proteína 2 relacionada com a tirosinase (TRP-2), as quais são consideradas a família de genes da tirosinase e são essenciais para a produção geral de melanina (VILLAREAL et al., 2010).

Melanosomos são organelas altamente organizadas de forma elíptica, delimitadas por membrana, os quais sintetizam melanina e podem ser de dois tipos: eumelanosomos ou

feomelanossomos. Dividem-se em quatro estágios de maturação (I, II, III, IV) determinados pela sua estrutura, quantidade, qualidade e arranjo de melanina produzida (KUSHIMOTO et al.,2001). No estágio I, os melanossomos nascentes estão arranjados na região perinuclear próximo ao complexo de Golgi, são esféricos sem a atividade da tirosinase (TYR) e nenhum componente estrutural interno. No estágio II, já pode-se detectar a tirosinase e a proteína estrutural Pmel17 nos melanossomos. Pmel17 determina a transformação do estágio I de melanossomos para organelas fibrilares alongadas, melanossomos estágio II, que já exibem um pequeno depósito de melanina (KUSHIMOTO et al.,2001; BERSON et al., 2001). Após o início da síntese de melanina e o depósito uniforme do pigmento nas fibrilas internas, os melanossomos passam para o estágio III de maturação. No último estágio (IV) as vesículas são em forma elíptica, altamente pigmentadas e eletrodensas, devido à completa melanização com mínima atividade de tirosinase (COSTIN; HEARING, V.J., 2007). Os estágios encontram-se esquematizados na figura 3.

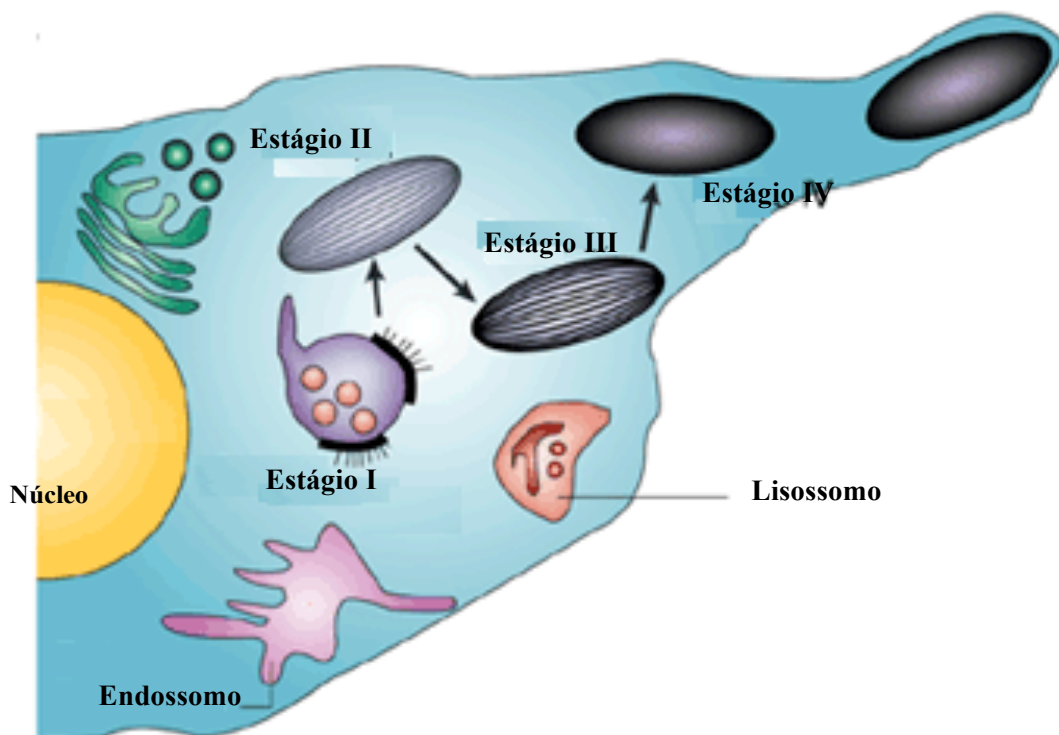


Figura 3 – Diagrama esquemático de uma porção do melanócito e dendrito apresentando os estágios de maturação dos melanossomos nos melanócitos em estágios I, II, III, IV e outras organelas relevantes.

Fonte: Adaptado de Marks e Seabra (2001).



### 2.2.2 Tirosinase

A tirosinase é uma oxidase de função mista com diferentes sítios ativos envolvendo estruturas binucleares com átomos de cobre. Ela catalisa a síntese de melanina através da hidroxilação de um monofenol com a subsequente oxidação quinonas (atividade monofenolase) e da oxidação de *o*-difenois em *o*-quinonas (atividade difenolase), que então polimerizam para formar pigmentos castanhos e pretos (WU et al., 2009; GASPARETTI et al., 2012).

A tirosinase é uma enzima bifuncional que desempenha um papel significativo na regulação da produção de melanina; primeiramente, catalisa a hidroxilação de tirosina para 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), e segundo, catalisa a oxidação de DOPA para DOPA-quinona (PARKA et al., 2011). A DOPA-quinona, então, entra em duas vias separadas, levando à síntese de eumelanina ou feomelanina. A TRP-2, também conhecida como DOPA-cromo tautomerase ou Dct, juntamente com a proteína-1 relacionada com a tirosinase (TRP-1) contribui mais para a síntese de eumelanina do que a de feomelanina (figura 4) (VILLAREAL et al., 2010).

Na ausência de resíduos sulfidrílicos, a dopaquinona sofre uma adição intramolecular de um grupo amino para produzir leucodopacroma, também conhecido como ciclodopa. Uma reação redox entre leucodopacroma e dopaquinona forma L-DOPA e dopacroma. Dopacroma é um intermediário relativamente estável, laranja-vermelho, precursor de eumelaninas. Na presença de resíduos sulfidrílicos, isto é, um resíduo de cisteína ou glutathione, o grupo tiol realiza um ataque nucleofílico a dopaquinona e, a cistenildopa ou glutathionildopa, são formadas. Cistenildopa e glutathionildopa são os precursores das feomelaninas avermelhadas (GASPARETTI et al., 2012).

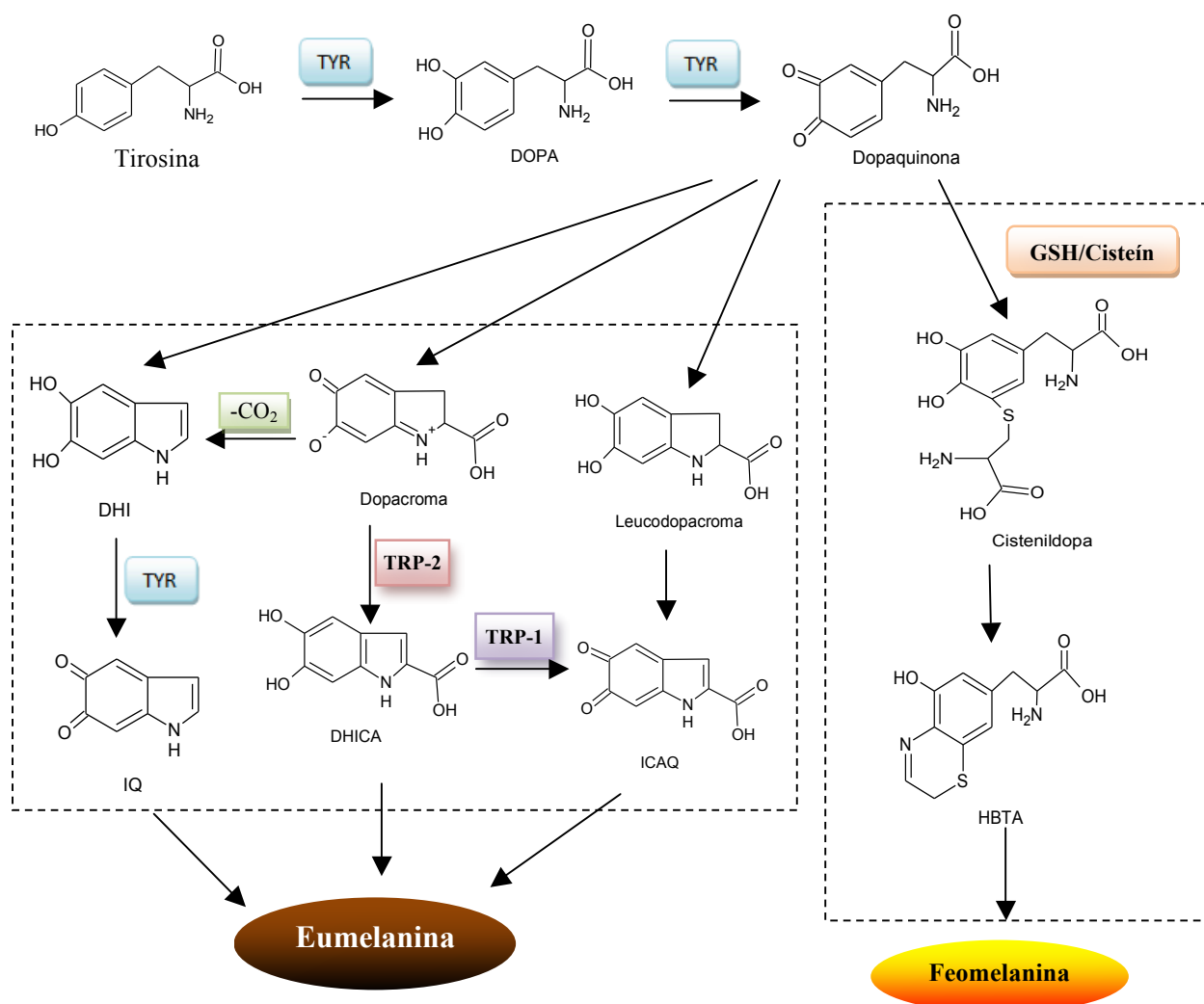


Figura 4 – Biossíntese de Melanina. TYR – Tirosinase; TRP-1 – Proteína 1 relacionada com a tirosinase; TRP-2 – Proteína 2 relacionada com a tirosinase; GSH – Glutaciona; DHI – 5,6-Diidroxiindol; IQ – Indol-5,6-quinona; DHICA – 5,6- Dihidroxiindol-2-ácido carboxílico; ICAQ – Indol-5,6- quinona ácido carboxílico; HBTA: 5-hidroxi-1,4- benzotiazinilalanina.  
Fonte: Adaptado de Panich (2011).

### 2.2.3 Regulação da Melanogênese

A radiação ultravioleta (UV) é um dos fatores ambientais implicados na alteração da síntese de melanina. A produção excessiva de melanina em resposta aos seus efeitos fotoprotetor ou propriedades fototóxicas geram efeitos nocivos à pele, aumentando por exemplo, o risco de melanoma maligno, especialmente em indivíduos de pele clara. Relata-se que a radiação UVA (400-315nm) desencadeia a melanogênese em associação com o estresse

oxidativo causado por produção excessiva de oxidantes e / ou deterioração da rede de defesa antioxidante em melanócitos e / ou células de melanoma (LIU et al., 2012). A exposição aos raios ultravioleta estimula nos melanócitos a expressão de pró-opiomelanocortina (POMC), receptor de melanocortina 1 (*MC1R*), receptor de tirosinase, proteína-1 relacionada com a tirosinase (*TRP-1*), DOPA-cromo tautomerase (*DCT*) e outros fatores de sinalização (OH et al., 2010).

A produção de melanina é controlada por hormônio alfa-melanócito estimulador ( $\alpha$ -MSH), que se liga a receptores fisiológicos de melanocortina-1 (*MC1R*). Quando *MC1R* é estimulado por  $\alpha$ -MSH, ocorre a ativação de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) que conduz à fosforilação de proteína quinase A (PKA), que induz a expressão de fator de Transcrição Microftalmia-associada, também conhecido por Fator de Transcrição de Tirosinase (MITF). MITF, por sua vez, desempenha um papel-chave na expressão do gene da tirosinase (HAN et al., 2012)

Ao nível genético, uma elevada taxa de melanogênese é atribuída principalmente a um aumento na expressão de MITF que é responsável por regular a transcrição da família de genes de tirosinase (VILLAREAL et al., 2010). MITF se liga e ativa os promotores de enzimas melanogênicas, tirosinase, TRP-1 e Dct (OH et al., 2010). Como um fator de transcrição melanócito-específico essencial para o crescimento e diferenciação dos melanócitos, o MITF tem sido o foco de estudos sobre os mecanismos de melanogênese (JIAN et al., 2011).

MITF é também um fator de transcrição chave para a proteína quinase C (PKC). A via de PKC-dependente há muito tem sido estabelecida como um segundo caminho intracelular que regula a melanogênese. PKC ativa a tirosinase por fosforilar diretamente resíduos de serina das enzimas (VILLAREAL et al., 2010). Quinases reguladas por sinal extracelular (ERKs) e fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K)/proteína quinase b (Akt) (PI3K/AKT) também

tem sido relatados como envolvidos na regulação da melanogênese. A ativação de ERK e sinalização PI3K/Akt fosforila MITF e promove a sua degradação, levando a uma inibição da melanogênese (OH et al., 2010).

Um certo número de agentes, incluindo  $\alpha$ -MSH, forskolino e lipopolissacarídeo (LPS), têm sido relatados como reguladores da expressão de MITF, com a subsequente indução da expressão de tirosinase, em células de melanoma e melanócitos. Este efeito pode ser mediado pela via cAMP-PKA, uma via de sinalização chave para a síntese de melanina. Pesquisas anteriores descobriram que a estimulação do AMPc resultou em elevação dos níveis de proteína MITF e subsequente ativação de TYR, TRP-1 e TRP-2 (JIAN et al., 2011). Apesar de mais de 150 genes identificados afetarem a pigmentação da pele, cabelo, e/ou olhos, o MITF é um dos fatores mais importantes para a regulação da função dos melanócitos (LIU & FISHER, 2010).

#### **2.2.4 Desordens pigmentares**

A maioria das desordens pigmentares raramente são associadas com doenças sistêmicas, no entanto por vezes podem significar doenças graves. Portanto, o clínico deve ser capaz de reconhecer as situações em que uma alteração pigmentar sugere doenças graves, tais como malignidade subjacente. Além disso, embora possam ser apenas cosméticas, estas desordens também podem ser uma fonte de desconforto e grande estresse emocional para os pacientes (ROSE, 2009). Dentre os diversos tipos de manchas pigmentadas formadas na pele humana, sardas, lentigos solares e melasma são as mais comumente observadas (IRIYAMA et al., 2011).

O melasma é uma afecção da pele que afeta comumente mulheres no segundo ou terceiro trimestre da gravidez geralmente regredindo após o parto e podendo aumentar em

gestações subsequentes. Homens também podem ser afetados e estima-se que eles talvez representem 10% dos casos (ROSE, 2009). O melasma caracteriza-se pela presença de hiperpigmentação simétrica com coloração que vai do marrom claro ao escuro, máculas castanhas lamacento e manchas na face, especialmente a testa, áreas malares e queixo. Muitas vezes também é referido como cloasma ou máscara de gravidez. A predisposição genética, exposição à luz ultravioleta, gravidez e hormônios exógenos (ou seja, contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal) são relatados como fatores de risco (SHETH & PANDYA, 2011). Histologicamente, a pele afetada apresenta uma deposição aumentada de melanina na epiderme, aumento dos melanócitos e do número de melanosomas (KANG & ORTONNE, 2009).

A patogênese do melasma permanece desconhecida e o tratamento ainda é um desafio (KANG & ORTONNE, 2009). A estratégia de tratamento clínico para o melasma visa retardar a proliferação de melanócitos, inibir a formação de melanosomas e promover a degradação destes. Assim, recomenda-se o uso de filtro solar e agentes clareantes que inibem a tirosinase tais como, hidroquinona ou ácido kójico podendo incluir agentes queratinolíticos como tretinoína, ácido glicólico (OLIVEIRA, 2011).

Diferente do melasma, lentigos solares (LS) são observadas quase que igualmente em homens e mulheres (IRIYAMA et al., 2011). Lentigos solares também conhecidos como “manchas senis” ou “lentigos senis” (LIN et al., 2010), são manchas marrons que ocorrem em áreas da pele expostas ao sol, mais frequentemente na face, dorso das mãos, parte superior das costas e ombros. Ocorrem com mais frequência em pessoas de meia-idade ou mais, e são considerados como uma característica da pele envelhecida (IRIYAMA et al., 2011).

Histologicamente, LS são retratados por um imenso acúmulo de pigmento na camada basal da epiderme, e cumes alongados epiteliais que formam botões e cordões. Sardas são

vistas como um sinal precoce de envelhecimento e são tratadas com crioterapia, laser, luz pulsada, *peelings* químicos e agentes despigmentantes tópicos (LIN et al., 2010).

Sardas ou efélides ocorrem com mais frequência na pele exposta ao sol. Surgem na infância ou adolescência e são mais comuns em pessoas com cabelos loiros ou ruivos (SPENCERI, 2003). Histologicamente, as efélides mostram um aumento da melanina na epiderme, sem a proliferação melanocítica ou alongamento epidérmico observado nos lentigos. Não estão presentes ao nascimento, mas surgem na infância ou na primeira infância, principalmente na pele exposta ao sol. Tendem a surgir no verão e a desaparecer no inverno, indicando a necessidade de exposição solar e tornando-se menos perceptíveis na vida adulta. Sardas normalmente são máculas bem circunscritas, vermelho-acastanhadas, que ocorrem mais comumente na face, costas e ombros superiores, poupando as membranas mucosas (TAÏEB & BORALEVI, 2007).

A hiperpigmentação pós-inflamatória é um processo secundário que pode ocorrer em quase todo estado inflamatório. Sua distribuição é variável, contudo, dependente do processo inflamatório inicial. Exemplos dessa desordem incluem o eczema, psoríase, as lesões traumáticas e dermatite de contato alérgica. A etiologia parece ser a estimulação dos melanócitos secundária a mediadores inflamatórios no processo primário (SPENCERI, 2003).

Manchas resultantes de processo inflamatório tendem a se resolver, mesmo sem intervenção, mas isso pode levar muitos meses. O processo inflamatório primário deve ser adequadamente tratado e o uso de protetor solar pode acelerar a resolução da hiperpigmentação (SPENCERI, 2003).

### 2.2.5 Inibidores de tirosinase

A modulação da melanogênese é uma estratégia amplamente utilizada para tratar a pigmentação anormal da pele por meio de medicamentos e cosméticos (HA et al., 2012). Devido ao seu papel central na melanogênese, a tirosinase é um alvo importante para a triagem e a descoberta de novos inibidores (LIANG et al., 2012).

A tirosinase é uma enzima chave na síntese de melanina, ela catalisa a hidroxilação de L-tirosina para L-dopa e oxidação adicional de L-DOPA para dopaquinona (SATOOKA & KUBO, 2012). A etapa de oxidação enzimática de L-tirosina para a melanina é de considerável importância, pois a melanina tem muitas funções, e alterações na sua síntese ocorrem em muitas doenças. Com isso, os inibidores da tirosinase tornam-se cada vez mais importantes na indústria de alimentos, bem como em produtos medicinais e cosméticos (CHO et al., 2006).

Inibidores da tirosinase têm sido utilizados como agentes despigmentantes para o tratamento ou prevenção de desordens envolvendo hiperpigmentação. A tirosinase obtida a partir do cogumelo *Agaricus bisporus* tem homologia elevada com a de mamíferos e é adequada como um modelo para o estudo de vias da tirosinase e melanogênese (MATOS et al., 2011).

Nas últimas décadas, vários inibidores da tirosinase tais como compostos fenólicos têm sido estudados (HA et al., 2012) e esta grande quantidade de pesquisas realizadas, resultaram na descoberta de diversos tipos de inibidores incluindo arbutina, ácido kójico e hidroquinona (HA et al., 2012; YANG et al., 2012). Porém, a utilização de agentes existentes é bastante limitada e isso acontece devido a baixa estabilidade, atividade insuficiente, efeitos secundários (YANG et al., 2012), toxicidade elevada, e capacidade de penetração insuficiente (NERYA et al., 2004). O ácido kójico, por exemplo, tem sido relatado com um agente

sensibilizante para a pele gerando casos de dermatite de contato (JONES et al., 2002) e a hidroquinona, um agente amplamente utilizado, é considerada citotóxica para melanócitos (NERYA et al., 2004). Tais desvantagens estimulam os pesquisadores para prosseguir o desenvolvimento de inibidores de tirosinase de alta qualidade tanto para fim alimentício (como aditivo evitando o escurecimento enzimático de alimentos) quanto cosmético (como agente clareador) (YANG et al., 2012).

Nerya et al. (2004) sugerem ainda que uma maneira de diminuir as limitações com os agentes despigmentantes seria a utilização de uma combinação de compostos, em uma mistura, que poderia atuar como agentes de branqueamento através de diferentes mecanismos e de uma maneira complementar, tal como uma combinação eficiente de inibidores da tirosinase com antioxidantes, em conjunto com antiperoxidasas.

Muitos esforços têm sido despendidos na busca de agentes inibidores da tirosinase viáveis e eficazes (HAN et al., 2008) e, diversos agentes que ocorrem naturalmente têm sido descritos, a maioria consistindo de uma estrutura de fenol ou de agentes quelantes de metais (NERYA et al., 2004). Embora um grande número desses agentes tenham sido relatados, algumas das suas atividades individuais não são suficientemente potentes para que possam ter seu uso posto em prática (HAN et al., 2008).

Por outro lado, o progresso obtido no conhecimento da biologia dos melanócitos e dos processos de síntese de melanina tem aberto novos caminhos na abordagem farmacológica para o tratamento de hiperpigmentação cutânea. Eles incluem além da inibição da atividade catalítica da tirosinase, aspectos como por exemplo, a inibição da transcrição de mRNA da tirosinase e a aceleração da degradação da tirosinase. Assim, um grande número de despigmentantes ou agentes de clareamento desenvolvidos por essas abordagens alternativas foram identificados com sucesso (CHANG et al., 2009).



### 2.3 Envelhecimento Cutâneo

O estudo do envelhecimento da pele (EP) tem atraído pesquisadores por décadas, não só pela possibilidade de evitar a formação de rugas mas também porque a pele representa um excelente e acessível modelo para estudo de fatores extrínsecos que coordenadamente contribuem para o complexo fenômeno do envelhecimento. Acredita-se que os princípios básicos que norteiam o envelhecimento da pele possuem relevância geral para doenças degenerativas comuns do tecido conjuntivo como a osteoporose, osteoartrite e arteriosclerose (SCHARFFETTER–KOCHANNEK et al., 2000).

O processo de EP é um fenômeno biológico complexo e pode ser dividido em envelhecimento intrínseco (EI) e extrínseco (EE). O EE também denominado fotoenvelhecimento ocorre devido à exposição ambiental, principalmente a radiação UV. O EI (envelhecimento cronológico) afeta a pele de uma maneira semelhante a outros órgãos, por uma degeneração lenta e parcialmente reversível do tecido conjuntivo. Ambos processos têm, pelo menos, parcialmente sobrepostos, mecanismos biológicos, bioquímicos e moleculares (TZAPHLIDOU, 2004).

Várias mudanças estruturais e funcionais têm sido atribuídas (Figura 5) à pele envelhecida tais como a diminuição da produção de suor e sebo e, dentro da derme, um declínio da espessura, redução no fluxo sanguíneo e achatamento da junção dermo/epidérmica (BLAAGA et al., 2011) decorrendo deste achatamento uma diminuição progressiva da taxa de renovação de células epidérmicas, melanócitos e células de Langerhans. Na derme, há ainda uma diminuição no número de fibroblastos e da síntese de colágeno e elastina, resultando em perda de elasticidade e enrugamento da pele (YOUM et al., 2008).

A espessura da epiderme também diminui com a idade, principalmente na pele fotoenvelhecida, além disso, a redução no volume da epiderme reflete uma diminuição

dependente da idade na taxa de reparação epidérmica após danos menores, e o aumento dependente da idade, na irritabilidade da pele. A espessura do estrato córneo (EC) permanece inalterada, porém verifica-se um aumento do pH, redução do conteúdo lipídico intercelular e da hidratação (BLAAGA et al., 2011). Queratinócitos, fibroblastos e melanócitos, todos mostram um decréscimo associado à idade em duplicações cumulativas da população de células (JENKINS, 2002).

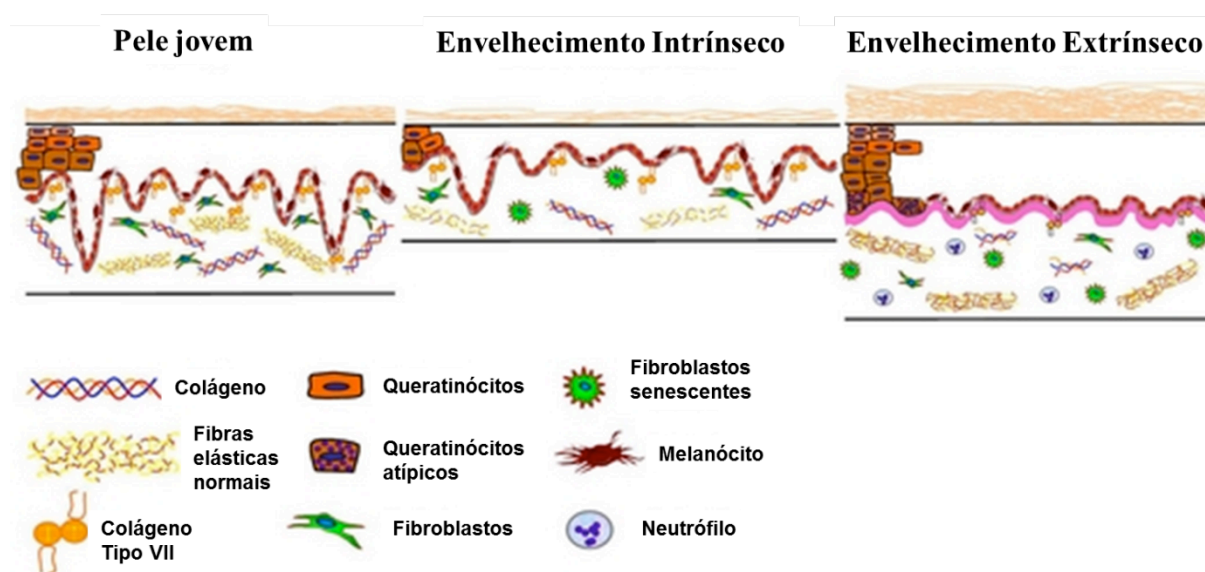


Figura 5 – Diferenças na estrutura e conteúdo na pele jovem, pele no envelhecimento intrínseco e pele no envelhecimento extrínseco.

Fonte: Adaptado de [http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv\\_2008/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/00426/index.html](http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv_2008/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/00426/index.html)

Clinicamente a pele fotoenvelhecida difere da pele naturalmente envelhecida. Enquanto a primeira se caracteriza por rugas grossas, pigmentação mosqueada e textura áspera, a segunda é fina, lisa, seca, pálida e finamente enrugada. Estudos histológicos e ultraestruturais em pele envelhecida demonstraram que alterações importantes são localizadas no tecido conjuntivo dérmico (KIM et al., 2005). Alterações no colágeno, principal componente estrutural da pele, têm sido observadas em ambos os envelhecimentos e tem sido consideradas uma causa de rugas na pele (LEE et al., 2012).

Ao longo da vida, a pele da face, pescoço, mãos e face dorsal da parte inferior do braço são essencialmente expostas à luz UV, enquanto que as faces internas da parte superior do braço e da coxa bem como a nádega refletem o envelhecimento cronológico da epiderme (BLAAGA et al., 2011).

Fibras colágenas, fibras elásticas e glicosaminoglicanos são os principais componentes afetados na pele fotodanificada. O colágeno é o componente extracelular mais abundante e fornece as propriedades de tensão fortes para a derme, compreende 80% do peso seco da pele. A rede de fibras elásticas responsáveis por 2-4% da matriz extracelular proporciona elasticidade à pele, enquanto que as macromoléculas glicosaminoglicanos/proteoglicanos desempenham um papel na hidratação da pele e na sinalização biológica, compreendendo apenas 0,1-0,3% do peso seco da pele (JENKINS, 2002).

No processo de envelhecimento, a pele cronologicamente envelhecida apresenta uma diminuição da síntese de colágeno e aumento da expressão de metaloproteinases de matriz (MMP). A irradiação ultravioleta (UV) causa na pele humana uma perda significativa da síntese de pró-colágeno e indução da expressão de MMPs (KIM et al., 2005).

Os mecanismos moleculares implícitos no envelhecimento cronológico são descritos por dois processos: a senescência celular, que inclui a parada do crescimento irreversível e da resistência das células da pele a apoptose, diminuição da síntese de matriz na derme e a regulação positiva de enzimas que degradam a matriz colagenosa; e o estresse oxidativo que diz respeito à contribuição feita por dano oxidativo cumulativo (CHOI et al., 2005).

A literatura relata que células senescentes tendem a acumular-se na pele e que a expressão de metaloproteinases é alterada no envelhecimento, por exemplo, em fibroblastos dérmicos pré-senescentes é relativamente baixa a atividade e a expressão de metaloproteinases, colagenase (MMP1) e estromelina (MMP3), enzimas dérmicas chave na degradação da matriz extracelular, e os níveis de inibidores teciduais de metaloproteinases de

matriz 1 (TIMP1) e 3 (TIMP3) são elevados, reduzindo a capacidade de degradação adicional; em contraste, em fibroblastos senescentes esta relação é invertida, havendo um aumento na expressão de metaloproteinases de matriz e uma redução na expressão de inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMP), além dessas alterações há a diminuição da biossíntese de colágeno (JENKINS, 2002).

Uma hipótese alternativa ao envelhecimento devido à senescência celular é a teoria do envelhecimento devido ao estresse oxidativo. Ela sugere que o envelhecimento é fortemente influenciado pelo estresse oxidativo externo que influencia o programa genético através da modulação de genes redox sensíveis (JENKINS, 2002).

### **2.3.1 Metaloproteinases de matriz**

Inúmeras evidências apoiam a afirmação de que o equilíbrio entre síntese e degradação da matriz é prejudicado durante o envelhecimento cutâneo (EC). Como discutido anteriormente, diversas são as alterações ocorridas no EC, dentre elas, alterações visíveis em derivados de componentes fibrilares da matriz dérmica, ou seja, colágeno e elastina. A colagenólise ou elastólise são processos atribuídos à ação combinada de vários membros da família de metaloproteinases de matriz (MMP) (HORNEBECK, 2003).

As MMP são uma família de endopeptidases  $Zn^{2+}$  dependentes caracterizadas por sua capacidade para digerir componentes da matriz extracelular (MEC), tais como o colágeno (RIBEIRO et al., 2008; FANG et al., 2009). São produzidas por diversos tipos celulares tais como, fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, células endoteliais, mastócitos e eosinófilos (STANIFORTH et al., 2011) e, classificadas de acordo com a estrutura de domínio em colagenases, gelatinases, estromelinas, matrilisinas, MMP de membrana do tipo I e outros (Quadro 1) (TZELLOS et al., 2001).

As metaloproteinases de matriz (MMP) desempenham papéis importantes numa variedade de processos biológicos e o desequilíbrio da sua atividade e expressão é muitas vezes a base de doenças como câncer, neurodegeneração, inflamação, artrite e doenças cardiovasculares (SBARDELLA et al., 2012). A atividade e a expressão gênica de MMP podem ser influenciadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) envolvidas no estresse oxidativo (FANG et al., 2009) e estão aumentadas na pele fotodanificada (Figura 6) (STANIFORTH et al., 2011).

A atividade catalítica das MMP é inibida principalmente através de inibidores endógenos, os inibidores teciduais de metaloproteinases de matriz (TIMPs) (RIBEIRO et al., 2008; BREW & NAGASE, 2010) os quais são reguladores importantes da MEC e, conseqüentemente do *turnover*, comportamento e remodelação do tecido celular. Além da atividade de inibição de MMP, TIMPs têm outras várias atividades biológicas tais como a promoção da proliferação celular e anti-angiogênese (BREW & NAGASE, 2010).

Quadro 1 – Classificação das Metaloproteinases de matriz de acordo com sua estrutura organizacional e substrato.

<b>Classificação</b>	<b>Metaloproteinase</b>	<b>Substrato/Função</b>
Colagenases	MMP – 1	Capazes de clivar preferencialmente colágeno fibrilar (tipos I, II, III, VII, VIII, X)
	MMP – 8	
	MMP – 13	
Gelatinases	MMP – 2	Capazes de processar enzimaticamente vários substratos da MEC, tais como colágeno I e IV.
	MMP – 9	
Estromelisinases	MMP – 3	Capazes de hidrolisar o colágeno IV, mas não clivam colágeno I
	MMP – 10	
	MMP – 11	
Matrilisinases	MMP – 7	Capazes de processar colágeno IV, mas não colágeno I
	MMP – 26	
MMP de Membrana do tipo I	MMP – 14	Contêm na posição C-terminal um domínio adicional, representado por uma região intermembranar, completado por uma pequena cauda citoplasmática. Apenas MMP-14 e MMP-16 são capazes de clivar colágeno I
	MMP – 15	
	MMP – 16	
	MMP – 17	
	MMP – 24	
	MMP – 25	
Metaloelastase	MMP – 12	Degrada elastase

Fonte: Adaptado de Sbardella et al., 2012.

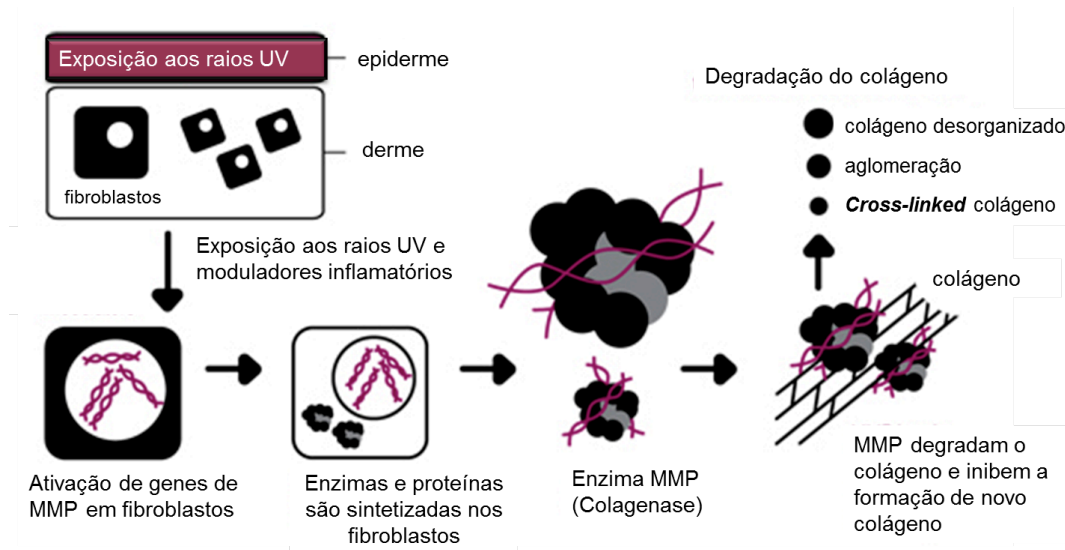


Figura 6 – Representação da Radiação na UV aumentando a expressão de metaloproteinases e a degradação do colágeno na membrana extracelular.

Fonte: [http://www.dermalinstitute.com/uk/library/23\\_article\\_What\\_Causes\\_Skin\\_Aging\\_.html](http://www.dermalinstitute.com/uk/library/23_article_What_Causes_Skin_Aging_.html)

Como já discutido, MMPs estão envolvidas em vários processos patológicos, nesse sentido, o desenvolvimento de inibidores potentes e seletivos pode representar uma estratégia terapêutica importante, o que é especialmente relevante parapor exemplo, a terapia do câncer (SBARDELLA et al., 2012).

### 2.3.2 Ácido hialurônico e envelhecimento cutâneo

O enrugamento da pele é um processo complexo e inevitável que envolve o declínio idade-dependente da função das células da pele. Inúmeras evidências científicas relacionam o enrugamento da pele à degradação da MEC, que está significativamente associado com o aumento da atividade enzimática dérmica (hialuronidase, elastase, MMP-1 etc) (MAITY et al., 2011).

Diversos estudos tem relatado alterações intrínsecas ao envelhecimento e fotoenvelhecimento dependentes de mudanças de conteúdo de glicosaminoglicanos (GAGs)

na derme e epiderme (OH et al., 2011). Glicosaminoglicanos (GAGs) são longas cadeias de polissacarídeos lineares consistindo de 10 a vários milhares de repetições de unidades de dissacarídeos específicas (OH et al., 2011), sendo estes os principais componentes da MEC (ANILKUMAR et al., 2011). GAGs possuem alta carga negativa resultante da presença de grupos carboxílicos e sulfato, o que lhes confere a capacidade de retenção de água significativa e contribuem para a manutenção do teor de água da pele. Seis tipos de GAGs estão envolvidos em várias funções estruturais, de preenchimento de espaços e regulação de processos fisiológicos, são eles: sulfato de condroitina (CS), sulfato de dermatano (DS), sulfato de queratano, sulfato de heparano, heparina e ácido hialurônico (HA) (OH et al., 2011).

O ácido hialurônico (AH), um dos objetos de estudo deste trabalho, é um GAG de alta massa molecular, linear, com uma estrutura composta pela repetição de unidades de ácido dissacarídeo de *N*-acetil-*D*-glucosamina e *D*-glucurônico. É um dos principais componentes da MEC na pele (HSU & CHIANG, 2009).

O AH desempenha importantes funções biológicas na pele, como a manutenção da umidade, mantendo a arquitetura e elasticidade dos tecidos, facilitando a troca de nutrientes e resíduos de produtos. Sua síntese é realizada principalmente por fibroblastos e queratinócitos, e encontram-se distribuídos no tecido conjuntivo da derme e no espaço intercelular da epiderme (HSU & CHIANG, 2009).

A diminuição de AH dependente da idade tem sido identificada como um dos principais fatores responsáveis pela aparência física da pele envelhecida, incluindo a formação de rugas e da perda da elasticidade da pele (HSU & CHIANG, 2009; ANILKUMAR et al., 2011). Os agentes farmacológicos como, estrógeno, ácido retinóico, fatores de crescimento e citocinas são conhecidos por estimular a síntese de AH e evitar a atrofia, secura, e enrugamento da pele em idosos (HSU & CHIANG, 2009). Em contraste, a

exposição à radiação UV, diminui a quantidade de HA na derme humana devido a indução de expressão dérmica de hialuronidase (Hyal) (OH et al., 2011). AH também pode ser naturalmente degradado no organismo por espécies reativas de oxigênio (ROS). O mecanismo de degradação de AH difere de acordo com a ROS envolvida (SCHANTÉ et al., 2011).

Hialuronidases estão presentes em vários tecidos de mamíferos e passaram a ter interesse biológico particular a partir da demonstração de que elas estão envolvidos na patofisiologia de muitas desordens humanas, tais como o câncer e a artrite reumatóide. Nesse sentido, devido a sua importância fisiológica, dispor de métodos rápidos e sensíveis para avaliação de sua atividade tornaram-se cada vez mais necessários. Assim, uma variedade de métodos são utilizados como por exemplo, métodos clássicos: turbidimétrico, viscosimétrico e colorimétricos; e novos métodos, tais como espectrofotométrico, fluorogênico, radiométrico, baseado em placa de agarose, HPLC, zimografia etc. O método colorimétrico, baseado na reação de Morgan-Elson modificada por Reissig et al. (1965), é o mais prático destes ensaios, no entanto, é insensível para a detecção de uma pequena quantidade. Esta metodologia tem sido amplamente utilizada (TAKAHASHI et al., 2003). De acordo com Mio et al.,(2000) estudos relacionados à inibição enzimática da hialuronidase foram quase que ignorados por cerca de 40 anos. O quadro 2 traz alguns inibidores conhecidos da atividade da hialuronidase.

Quadro 2 – Inibidores da atividade da Hialuronidase

<b>Inibidor</b>	<b>Referência</b>
Íon magnésio Mg <sup>2+</sup>	Mio e Stern, 2002; Mio et al., 2000
6- <i>O</i> -hexadecanoato	Spickenreither et al., 2006
intra- $\alpha$ -inibidores	Mio e Stern, 2002; Mio et al., 2000
<i>Withania somnifera</i>	Machiah et al., 2006
<i>Schisandra</i>	Choi et al., 2006



## 2.4 Antioxidantes: Potencial para uso cosmético

Nos últimos anos, os antioxidantes ganharam muita importância devido ao seu potencial como agentes profiláticos e terapêuticos em muitas doenças. A descoberta do papel dos antioxidantes no câncer, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e outras doenças tem levado a mudança de paradigmas nos cuidados de saúde, uma revolução promissora na medicina. Estes agentes tem tido aplicações na indústria, na pesquisa e nos cosméticos (RATNAM et al., 2006).

Espécies reativas de oxigênio (ROS), incluindo o superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radicais hidroxila ( $HO^\cdot$ ) são produzidos em células de tecidos como subprodutos do metabolismo aeróbico. ROS em baixas concentrações podem servir como moléculas de sinalização na regulação da proliferação celular e outras funções celulares, no entanto, em concentrações elevadas podem danificar os componentes celulares, incluindo DNA, RNA, proteínas e lipídeos (MA et al., 2009).

Visando manter os níveis de ROS e evitar o estresse oxidativo, as células de mamíferos têm desenvolvido um sistema de defesa sofisticado constituído de moléculas antioxidantes de baixa massa molecular e diversas enzimas, tais como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e glutathione redutase (GR). No entanto, este sistema de defesa pode ser alterado por fatores intrínsecos e extrínsecos, tais como o envelhecimento, de modo que uma fração de ROS possa escapar da destruição e se transformar em  $HO^\cdot$  muito mais reativas e deletérias (MA et al., 2009).

A pele é um dos tecidos mais frequentemente expostos ao estresse oxidativo (EO) a partir de fontes exógenas (poluentes do ar, toxinas, radiações ionizantes e não ionizantes, bactérias e vírus exógenos) e endógenas (ROS produzidos a partir de neutrófilos ativados, fagócitos e enzimas) (KOHENA et al., 2004). As células da pele também são providas com

um sistema elaborado de substâncias e enzimas antioxidantes que mantém o equilíbrio entre o estresse oxidativo e defesa antioxidante, e mantém as células longe de danos causados pelo estresse oxidativo (LIU et al., 2011). Acredita-se que a atividade antioxidante seja diferente entre as várias camadas da pele. Na epiderme por exemplo, encontra-se um nível mais elevado de moléculas antioxidantes, indicando a sua susceptibilidade ao stress oxidativo (KOHENA et al., 2004). SOD e CAT são as principais enzimas antioxidantes que protegem a epiderme. SOD converte o superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), enquanto CAT degrada  $H_2O_2$  em água (PERES et al., 2011).

Diversos estudos têm sido realizados visando comprovar a relação entre estresse oxidativo (EO) e envelhecimento. Atualmente, sabe-se que o EO é a maior causa de degradação de colágeno por indução de metaloproteinase-1 (MMP1) (SCHROEDER, et al., 2008; FISHER et al., 2009) e que as medidas de estresse oxidativo e danos ao DNA mitocondrial em larga escala aumentam com a idade cronológica, sobretudo após 60 anos (LU et al., 1999). Allerhand et al. (2011), em estudo com idosos observaram que o envelhecimento da pele, e características específicas relacionadas a ele, como manchas pigmentadas e fatores de flacidez, estavam associados com maiores níveis de estresse oxidativo (Figura 7).

Portanto, levando-se em consideração que radicais livres e ROS como o óxido nítrico, o peróxido e os superóxidos atuam como estimuladores da melanogênese (Figura 8) por diversos mecanismos, substâncias antioxidantes que removam essas moléculas podem também inibir a síntese de melanina (OLIVEIRA, 2011).

Como discutido no decorrer deste trabalho a radiação UV tem um forte componente oxidativo e o estresse foto-oxidativo tem sido intensamente relacionado a uma pele fotodanificada. Nesse sentido, a ingestão regular ou tratamentos de pele com produtos contendo agentes antioxidantes podem ser estratégias úteis para a prevenção de danos induzidos por UV (HEO et al., 2009).

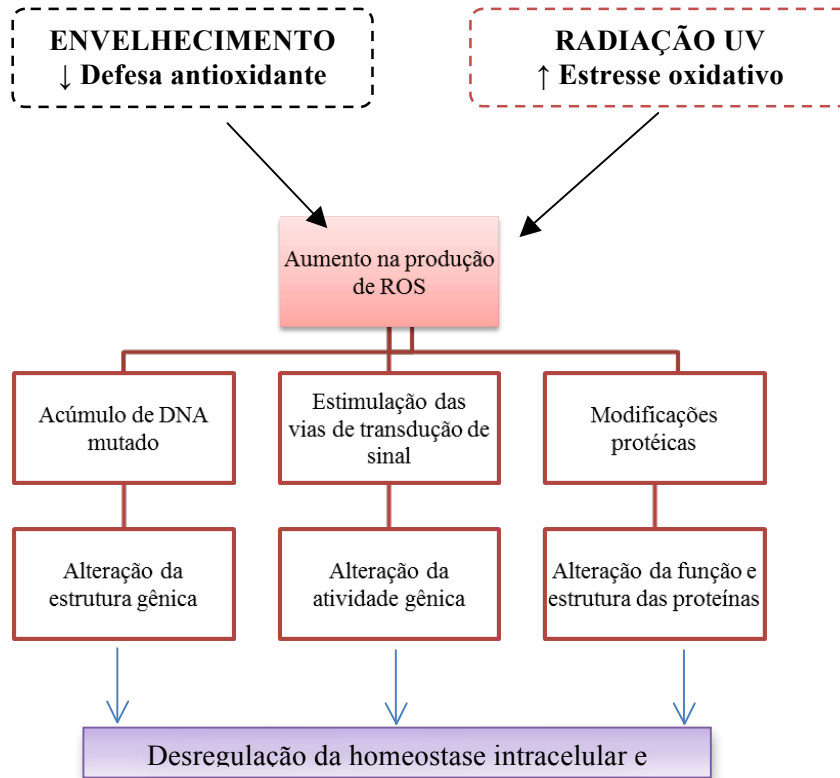


Figura 7 – Papel do estresse oxidativo no envelhecimento e na resposta UV. A irradiação UV e o envelhecimento levam a um aumento na produção de ROS, que alteram a estrutura e função de genes e proteínas. Como resultado, há a desregulação da homeostase intracelular e extracelular que pode modificar o comportamento celular e interações célula-matriz, conduzindo assim à uma disfunção da pele.

FONTE: Adaptado de RITTIÉ & FISHER, 2002.

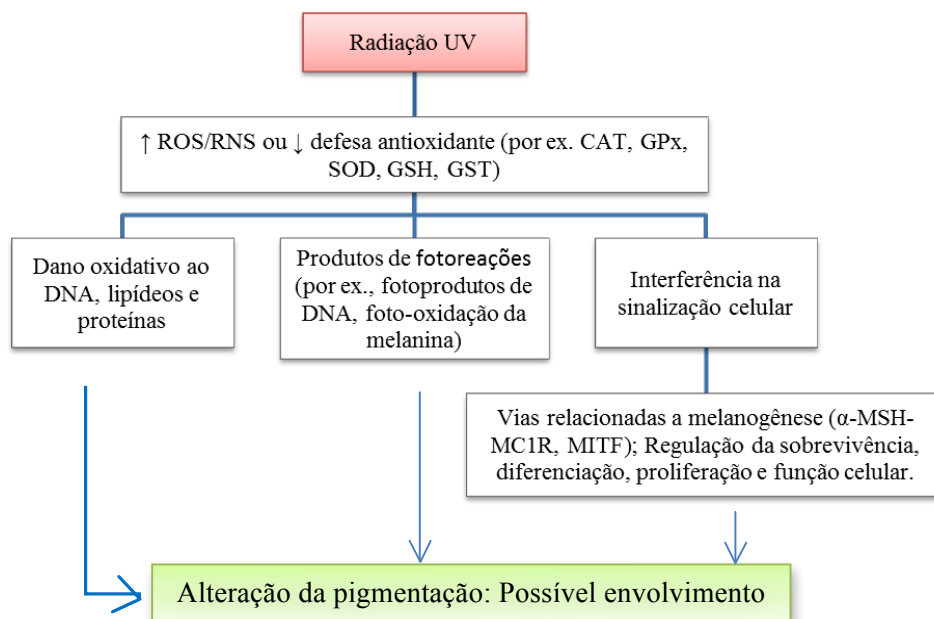


Figura 8 – Estresse oxidativo induzido por radiação UV e alteração na pigmentação.

Fonte: Adaptado de Panich, 2011.

## 2.5 Derivados do ácido kójico

Como discutido anteriormente, diversos inibidores da tirosinase de ocorrência natural e sintéticos já foram estudados. No entanto, a maioria deles não apresenta potência suficiente ou segurança para uso cosmético. Somado a isso, a necessidade de um agente que possa evitar os danos a pele neutralizando o estresse oxidativo causado pela radiação UV, aumenta a demanda por um agente que reúna atividades antioxidantes e anti-tirosinase (AHN et al., 2011).

O ácido kójico (AK), 5-hidroxi-2-(hidroximetil)-4*H*-piran-4-ona, é um metabólito fungico natural, extensivamente estudado como um ativo cosmético para clareamento da pele e como um aditivo alimentar para prevenção do escurecimento enzimático porque atua como quelante de metais e é uma potente eliminador de radicais livres (KWAK et al., 2010). O AK atua através da inibição da tirosinase nos melanócitos. Sua atividade inibitória deve-se a ação quelante de íons cobre na enzima (CHO et al., 2012). Outras atividades foram descritas, tais como, bacteriostático fraco, anti-inflamatório, inseticida, citotóxica e antitumoral, aumento da fagocitose, indução de apoptose (FICKOVA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2011) e prevenção de fotoenvelhecimento (AHN et al., 2011). Em relação a inibição da tirosinase o AK não apresenta inibição suficiente em baixa concentração ou oferece estabilidade a longo prazo (KWAK et al., 2011).

Diversos inibidores tem sido desenvolvidos como ativos para branqueamento da pele, no entanto, ainda há a necessidade do desenvolvimento de ativos mais eficazes (CHO et al., 2012). Nesse contexto, muitos derivados de AK têm sido desenvolvidos para melhorar as propriedades através de modificação do grupo C-7 em ésteres hidroxila, hidroxifenil éteres, tioéteres, os ésteres de ácido acrílico, glicosídeos amida e derivados (KWAK et al., 2011). Uma das maneiras de aumentar a atividade inibitória é a adição de grupos hidrofóbico, tais

como ésteres de ácidos alifáticos, amidas, éteres, sulfuretos e derivados de aminoácidos na posição 2 do ácido kójico (CHO et al., 2012).

Neste trabalho, foram utilizados nove derivados do ácido kójico sintetizados pelo grupo do Prof. Alberdan dos Santos da Universidade Federal do Pará (UFPA), a partir de reações de complexação e de esterificação, dos quais três foram escolhidos após apresentarem inibição da tirosinase *in vitro*, são eles: kojato de zinco (Zn-AK); kojato de cobre (Cu-AK) e oleilkojato de cobre (éster graxo de AK) (Figura 9).

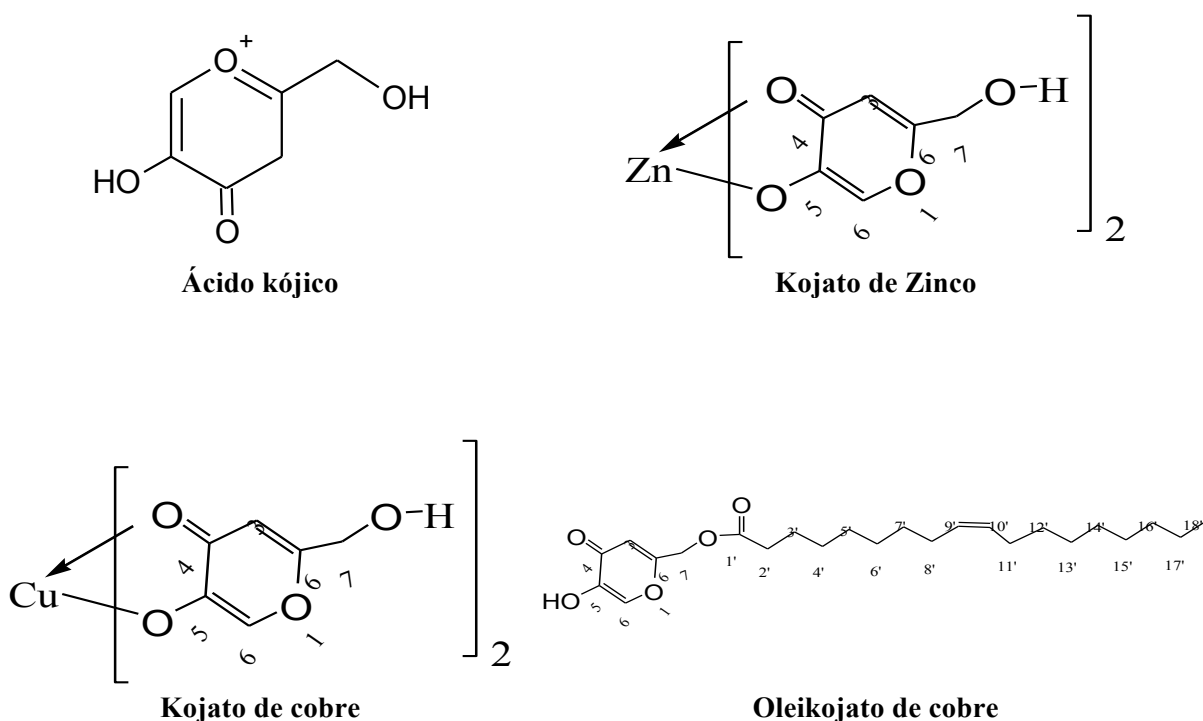


Figura 9– Estrutura do Ácido kójico e de seus derivados, Kojato de cobre, Kojato de zinco e Oleilkojato de cobre, escolhidos após triagem.

Diante do exposto e, baseando-se nas atividades de inibição sobre a tirosinase, quelante de metais e de prevenção do fotoenvelhecimento relacionadas para o ácido kojico este trabalho visa avaliar o potencial de derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e enzimas que atuam no envelhecimento cutâneo.

### **3 Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Avaliar o potencial dos derivados do ácido kójico sobre a melanogênese e enzimas que atuam no envelhecimento cutâneo.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Estudar o efeito inibitório dos derivados do ácido kójico sobre as enzimas tirosinase, elastase, colagenase e hialuronidase;
- Determinar o potencial antioxidante dos derivados do ácido kójico;
- Avaliar a citotoxicidade dos derivados sobre fibroblastos e melanoma murino;
- Conhecer o efeito dos derivados do ácido kójico sobre a atividade da tirosinase em células de melanoma murino;
- Conhecer o efeito dos derivados do ácido kójico sobre a produção de melanina em células de melanoma murino;
- Avaliar a ação dos derivados sobre a expressão gênica de tirosinase.

## 4 Metodologia

### 4.1 Estratégia Experimental

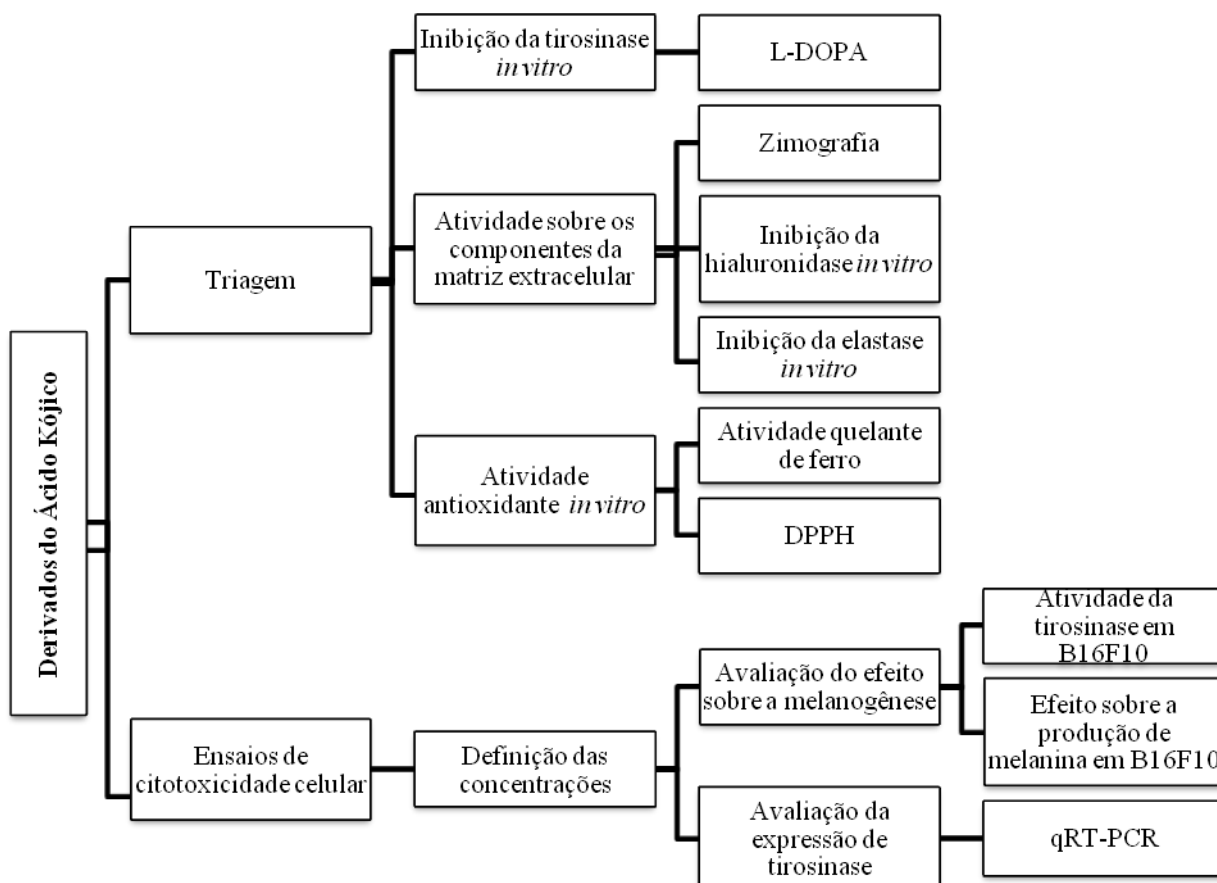


Figura 10– Estratégia experimental

### 4.2 Derivados do Ácido Kójico

Foram utilizados derivados do ácido kójico sintetizados pelo Doutorando Antônio Sérgio Costa Carvalho sob orientação do Prof. Alberdan Santos (UFPA). Foram recebidos ao todo, nove derivados, dos quais três foram selecionados após triagem, para a avaliação das atividades discutidas neste projeto.

#### 4.2.1 Síntese dos derivados do Ácido kójico

Os derivados do ácido kójico utilizados neste trabalho foram obtidos a partir de reações de complexação e de esterificação, são eles: kojato de zinco (Zn-AK); kojato de cobre (Cu-AK) e oleilkojato de cobre (éster graxo de AK). A síntese de cada substância está descrita abaixo:

- *Kojato de Zinco*: Uma solução contendo 3 mM de ácido kójico (AK) em 10 mL água/etanol (1:1) foi adicionada a 40 mL de uma solução 1,5 mM de acetato de zinco na mesma mistura de solvente. Após o meio reacional ser mantido sob agitação por 2 h, 25 °C, o precipitado da solução é filtrado e levado para avaliação biológica.

- *Kojato de cobre*: A 5 mL de uma solução de 1mM de  $\text{Cu}(\text{OAc})_2$  foram adicionados 10 mL de uma solução de 2mM (0,284 g) de AK. O pH foi ajustado para 6,5 com solução de NaOH 0,25 N. O precipitado foi completamente formado dentro de 1h a temperatura de 25°C. O produto final foi coletado por filtração e lavado com água destilada gelada para remover os sais e levado para avaliação biológica.

- *Oleilkojato de cobre* (Éster graxo de AK): Uma mistura de 20 mM de ácido oléico com 6mM de cloreto de zinco foi adicionada em um reator de 50 mL e aquecida em banho de óleo mineral mantido a 140 °C sob agitação, e foram acrescentados 3 mM de AK. Após 12 h em repouso a mistura foi lavada com água e os ésteres foram extraídos com éter. Foi utilizado sistema de Cromatografia em Camada Delgada, utilizando hexano:acetato de etila (6:4) como eluente. Na reação de complexação foram adicionados 3 mL de solução 0,2mM de acetato de cobre em um frasco contendo 0,4mM do produto S3. O precipitado formado é extraído com hexano e levado para avaliação biológica.



### **4.3 Células**

Foram utilizadas células B16F10 (melanoma murino) e fibroblastos de derme humana obtidos a partir de cultura primária gentilmente doadas pela Profa. Dra. Silvyta Stuchi Maria-Engler da Universidade de São Paulo (USP).

#### **4.3.1 Manutenção das células**

As células foram cultivadas em DMEM acrescido de 10 % de SFB, 1 % de penicilina e 1 % de estreptomicina. Todas as células foram incubadas a 37 °C e atmosfera úmida com 5% CO<sub>2</sub>.

#### **4.4 Avaliação da citotoxicidade celular**

##### **4.4.1 Exclusão por Azul de Tripán**

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de exclusão por corante Azul de Tripán 0,4 % em PBS (FRESHNEY, 1987), no qual as células foram consideradas não viáveis quando, ao se analisar por microscopia óptica, apresentaram a coloração azul em seu interior. Para a realização do ensaio, as células foram semeadas na densidade  $1,5 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. Decorridas 24 h, o meio foi retirado e, então adicionou-se meio com as amostras na concentração de 100 µM. O tratamento foi realizado por 24 h para fibroblastos de derme humana e 48 h para melanoma murino. Posterior a essa etapa, para leituras de tempos distintos o meio e as células, coletadas através de tripsinização, foram passados para microtubos de 2 mL e contados em câmara de Newbauer.

#### 4.4.2 Citotoxicidade pelo ensaio do Alamar Blue

O teste do Alamar Blue foi realizado conforme metodologia descrita por Ahmed e colaboradores (1994) com o intuito de se analisar a viabilidade celular de células da linhagem B16F10 após exposição por 48 h ao ácido kójico e seus derivados. Em placa de 96 poços, células B16F10 foram semeadas na concentração de  $1 \times 10^4$  células por poço. Após 24 horas de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com diferentes concentrações das amostras (0-25  $\mu\text{g/mL}$ ).

Passado o tempo de tratamento pretendido (48 horas) foram adicionados 10 $\mu\text{L}$  da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura sem soro fetal bovino) de resazurina na respectiva triplicata de tratamento. Como branco da reação foram lidos os poços com célula e amostra sem resazurina. O grupo controle recebeu no poço a mesma quantidade de DMSO da maior concentração das amostras. Após o tempo de metabolização da resazurina padronizado para cada tipo celular (3 h para B16F10) realizou-se a leitura da fluorescência. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula abaixo:

$$\%inibição = \frac{\Delta Ft}{\Delta Fc} \times 100$$

Onde:  $\Delta Ft$  = (fluorescência da célula + meio + amostra + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + amostra)

$\Delta Fc$  = (fluorescência da célula + meio + DMSO + resazurina) - (fluorescência da célula + meio + DMSO)

#### 4.4.3 Atividade hemolítica em sangue de camundongo

A avaliação do potencial hemolítico dos derivados do ácido kójico foi realizada segundo metodologia proposta por Malpezzi (1993). Foram utilizadas solução salina (NaCl 0,85 % + CaCl 10 mM) e solução de hemácias 2 % (obtidas a partir de sangue de camundongo *Mus musculus Swiss* coletado por via intracardíaca em tubo de heparina). Para o preparo da solução de hemácias foram adicionados 2 mL de solução salina a 200 µL de sangue em tubo falcon de 15 mL que em seguida, foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos, descartando-se o sobrenadante e repetindo-se o procedimento por mais duas vezes. Ao término da última centrifugação, o pellet foi ressuspensionado em 10 mL de solução salina. Para o ensaio, 10 µL das soluções teste (concentração final no poço: 250 µM) e 90 µL de solução salina foram plaqueados em placas de 96 poços. DMSO foi utilizado como controle negativo e TritonX-100 como controle positivo (40 µL em 60 µL de solução salina). Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução de hemácias a 2 % em cada poço e a placa foi incubada a temperatura ambiente por 1 hora sob agitação constante. Para exclusão da interferência da coloração das soluções, estas foram plaqueadas juntamente com 100 µL de solução salina e sem solução de hemácias (Absorbância A1). Após o período de incubação a placa foi centrifugada a 1500 rpm por 10 min. e após o término da centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outra placa, a qual foi lida em leitor de Elisa DTX800 Beckman e Coulter a 450 nm (Absorbância A2).

## 4.5 Testes de inibição enzimática e em cultura de células

### 4.5.1 Teste de inibição da tirosinase *in vitro*

A inibição da tirosinase pelos derivados (0-500  $\mu$ M) foi avaliada segundo método descrito por Chan *et al.*, 2008. Para conhecer as absorbâncias dos brancos das reações de cada concentração dos derivados, 20  $\mu$ L de cada solução teste foram pipetados em triplicata a uma placa de 96 poços de fundo redondo aos quais foram previamente adicionados 80  $\mu$ L de solução de tirosinase. Mensurou-se a absorbância 1 (A1) em 475 nm. A placa foi incubada por 5 minutos a 37 °C e em seguida foram adicionados 100  $\mu$ L do substrato L-Dopa (diidroxifenilalanina) procedendo-se imediatamente a leitura em leitor de microplaca. A placa foi incubada a 37 °C e lida a cada 5 minutos durante 20 minutos, onde obteve-se a absorbância final (A2) mensurada no mesmo comprimento de onda da A1. Como controle positivo analisou-se o ácido kójico preparado da mesma forma que as amostras teste. A  $CI_{50}$  foi obtida por análise sigmoidal a partir de gráficos plotados utilizando o programa Origin 6.0. Os pontos plotados correspondem às porcentagens de inibição de cada triplicata analisada. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado abaixo, onde A2= absorbância 2 e A1= absorbância 1.

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1_{amostra})}{(A_2 - A_1_{controle})} \times 100$$

## **4.5.2 Efeito sobre a produção de melanina e atividade da tirosinase em B16F10**

### **4.5.2.1 Cultivo, estímulo da melanogênese e lise celular**

Em placas de petri 60 x 15 mm foram cultivadas células B16F10 na densidade de  $3 \times 10^4$  células/mL num total de 5 mL. Após 24 horas de incubação em estufa de CO<sub>2</sub>, trocou-se o meio de cultivo por meio contendo Isobutilmetilxantina (IBMX) 25 µM, para estímulo da melanogênese na linhagem por 24 h. Decorridas as 24 h de estímulo, o meio foi substituído por meio contendo as soluções dos derivados e ácido kójico. Após 48 h de tratamento, as células foram coletadas, separando para microtubos parte da suspensão de células contendo  $1 \times 10^6$  células, os quais foram separados para a dosagem de melanina. O restante da suspensão de células foi separado para lise e obtenção de proteínas para o teste de atividade da tirosinase. Em ambas as soluções os pellets obtidos foram lavados duas vezes com PBS e lisados com Triton-X 1 % contendo inibidor de proteases PMSF (Fenilmetilsulfonilflúor) 1 %, centrifugando em seguida a 4 °C, a 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante obtido foi separado para a avaliação da atividade da tirosinase.

### **4.5.2.2 Atividade da tirosinase em B16F10**

Após a lise celular e obtenção do sobrenadante, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford. Após a quantificação, as proteínas obtidas foram diluídas em placas de 96 poços para concentração final de 100 µg/mL. Mensurou-se a absorbância 1 (A1) em 475 nm. Em seguida foram adicionados 100 µL do reagente de cor L-DOPA (L-diidroxifenilalanina) a 3 mg/mL procedendo-se imediatamente a leitura em leitor de micro placa. A placa foi incubada a 37 °C e lida a cada 30 minutos durante 90 minutos, onde obteve-

se a absorbância final (A2) mensurada no mesmo comprimento de onda da A1. A porcentagem de inibição da atividade da tirosinase foi calculada conforme indicado abaixo, onde A2= absorbância 2 e A1= absorbância 1.

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1_{amostra})}{(A_2 - A_1_{controle})} \times 100$$

#### 4.5.2.2 Dosagem de melanina em B16F10

Os pellets de B16F10 obtidos a partir de  $1 \times 10^6$  células foram solubilizados em NaOH 1 N contendo 10 % de DMSO em banho seco a 95 °C durante 1 hora. A absorbância das soluções de melanina obtidas foi mensurada a 405 nm usando um leitor de placas de ELISA. A quantidade de teor de melanina foi calculada após comparação com uma curva padrão de melanina sintética (0 – 200 µg/mL).

#### 4.5.3 Avaliação da expressão de tirosinase

##### 4.5.3.1 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR)

Para avaliação da inibição da tirosinase a nível de transcrição realizou-se a análise por qRT-PCR utilizando-se a tecnologia de sondas *TaqMan* (Applied Biosystems, EUA). O RNA total foi extraído com auxílio de Kit Aprotech (Applied Biosystems, EUA) segundo instruções do fabricante. Em seguida, a concentração e a qualidade do RNA extraído em cada amostra foram determinadas através da leitura da absorbância (260/280 nm) em espectrofotômetro NanoDrop (Kisher, Alemanha). Posteriormente, o DNA complementar (c-DNA) foi sintetizado utilizando-se o kit “High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Applied Biosystems, Poland). Os primers e as sondas alvo *Taqman*, Tirosinase (Tyr:

Mm00495817\_m1) e GAPDH (Mm99999915\_g1). As amplificações foram realizadas no *ABI PRISM 7500 Sequence Detection System*. Os valores de expressão gênica foram calculados usando o método  $\Delta\Delta C_t$ .

#### **4.5.4 Análise da inibição *in vitro* de Metaloproteinase de matriz-2 (MMP2) através de zimografia *in vitro***

O ensaio foi realizado segundo metodologia de Snoek-Van Beurden & Von Den Hoff, 2005. Fibroblastos de derme humana obtidos a partir de cultura primária foram semeados em placas de 24 poços numa densidade de  $3 \times 10^4$  células por poço. Após 24 h, o meio foi substituído por meio de cultura isento de soro fetal bovino contendo os derivados e ácido fólico a 25  $\mu\text{M}$ . Decorrido o período de 24 h de tratamento esse meio foi coletado para tubos ependorfs e suas proteínas quantificadas pelo método de Lowry (1951). Em seguida, as proteínas (30  $\mu\text{g}$ /amostra) foram submetidas à eletroforese em gel de SDS-PAGE 1,0mm (sistema Mini-Protean III BioRad®), poliacrilamida (PAGE) 30 % contendo 10 % de dodecil sulfato de sódio (SDS), copolimerizado com 1,0 % de gelatina, inicialmente a 70 V por 30 minutos e posteriormente a 120 V por 1h30. Ao final da corrida o gel foi lavado duas vezes com Triton-X 2,5 % por 15 minutos para remoção do SDS e em seguida, incubado a 60°C *overnight* em tampão de incubação (Tris-HCl 0,05 M,  $\text{CaCl}_2$  5 mM,  $\text{ZnCl}_2$  5  $\mu\text{M}$ , pH 8,0). Após o período de incubação, os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue*® por 30 minutos à temperatura ambiente e descorados com uma solução contendo 10% de metanol e 10 % de ácido acético em água. O gel foi digitalizado (450 d.p.i.) e as intensidades das bandas e massas moleculares calculadas utilizando o programa ImageJ.

#### 4.5.5 Ensaio de inibição da elastase *in vitro*

O efeito dos derivados sobre a elastase também foi realizado por metodologia espectrofotométrica descrita por KIM et al. (2004) e modificada por THRING et al. (2009). Esse ensaio foi realizado em tampão Tris-HCl 60 mM (pH 7,5). A elastase pancreática suína (PE – E.C.3.4.21.36) foi dissolvida para obter 0,4 mg/mL de solução estoque em água estéril. O substrato AAPVN (*N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilido) foi dissolvido no tampão para 1,6 mM. Foram adicionados 10 µL das amostras (50 µg/mL), a 90 µL da enzima (0,4 mg/mL), e incubados por 15 minutos. Após esse período realizou-se uma leitura para eliminar a interferência da coloração das amostras (Branco) e em seguida foram adicionados 100 µL do substrato para o início da reação, realizando-se a primeira leitura imediatamente em leitor de elisa. Controles negativos foram realizados usando o diluente. Valores de absorbância entre 381 e 402 nm foram mensurados imediatamente seguindo a adição do substrato e então continuamente por 50 minutos usando um leitor de microplacas. A porcentagem de inibição da elastase pelas amostras foi calculada conforme a fórmula abaixo (THRING et al., 2009):

$$Inibição (\%) = \frac{(A_{controle} - A_{amostra})}{(A_{controle})} \times 100$$

#### 4.5.6 Ensaio de inibição da hialuronidase *in vitro*

A inibição da atividade de hialuronidase foi determinada conforme metodologia espectrofotométrica descrita por Reissig et al (1955) modificado por Marchesan et al. (2006). A mistura da reação consistiu de 30 µL das soluções testes (50 µg/mL), 125 µL do sal de potássio do ácido hialurônico em tampão acetato 0,1 M, pH 3,6 contendo 0,15 M de cloreto de sódio (NaCl) e 15 µL da enzima hialuronidase (Tipo IV-S: obtido de testículo bovino, Sigma Co), dissolvida no mesmo tampão; esta mistura da reação foi incubada a 37 °C por 40



minutos. Após a incubação, 40 µL de tetraborato de potássio 0,8 M foram adicionados à mistura de reação e novamente incubados em banho de ebulição por 3 minutos. Em seguida, foram adicionados 90 µL de *r*-dimetilaminobenzaldeído (DMAB) e a mistura incubada novamente a 37 °C por 20 minutos. Finalmente, a absorbância da mistura foi medida em leitor de Elisa DTX800 Beckman Coulter a 620 nm usando água como controle.

O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a equação:

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1 amostra)}{(A_2 - A_1 controle)} \times 100$$

#### 4.6 Avaliação do Potencial Antioxidante

##### 4.6.1 Teste do 2,2'-difetil-1-picril-hidrazila (DPPH)

Para avaliar o potencial antioxidante das amostras utilizou-se método descrito por Molyneux et al., 2004 adaptado para microplacas. Foram pesados 2 mg de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e dissolvidos em 12 mL de etanol absoluto e soluções teste dos derivados a 50 µg/mL. Para conhecer a absorbância dos brancos específicos (A1), em uma placa de 96 poços foram adicionados 30 µL das diluições dos derivados e 270 µL de álcool etílico. Para o teste, foram adicionados 30 µL das diluições dos derivados e 270 µL da solução de DPPH e a placa permaneceu incubada ao abrigo da luz por 30 minutos, decorridos os quais, realizou-se a segunda leitura (A2) e mensurou-se a redução do radical livre DPPH a 492 nm. Como controle negativo utilizou-se 30 µL de etanol e 270 µL de solução de DPPH. Os resultados foram expressos em porcentagem de captura do radical DPPH, calculado segundo a equação abaixo (onde A1= absorbância 1 e A2 = absorbância 2).

$$Atividade (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_1 amostra)}{(A_2 - A_1 controle)} \times 100$$

#### 4.6.2 Avaliação da atividade quelante de ferro

A atividade quelante de ferro pelos derivados do ácido kójico foi avaliada de acordo com metodologia espectrofotométrica proposta por Ebrahimzadeh et al (2008). Em uma placa de 96 poços foram adicionados 200 µL do padrão (EDTA) / amostra / controle negativo (diluyente) juntamente com 10 µL de solução de Cloreto Férrico (FeCl<sub>2</sub>) a 2 mM, incubando-se por 5 minutos à temperatura de 37 °C e em seguida realizada a primeira leitura (A1) em leitor de Elisa DTX 800 Beckmar Coulter. Após a leitura A1, foi adicionado 10µL de Hidroxilamina hidrocloreada 300 mM e 30 µL de Ferrozine 5 mM, incubando-se por 15 minutos temperatura de 37 °C, sendo realizada em seguida a segunda leitura (A2). O cálculo da porcentagem de inibição foi realizado de acordo com a equação:

$$Inibição (\%) = 100 - \frac{(A_2 - A_{1,amostra})}{(A_2 - A_{1,controle})} \times 100$$

#### 4.7 Análise dos resultados

Os valores foram expressos utilizando-se média e desvio-padrão. A determinação da CI<sub>50</sub> do efeito do ácido kójico e seus derivados sobre a atividade da tirosinase foi realizada pelo método de regressão linear simples, usando o programa Origin® (versão 8.0; micronal software, northampton, Massachussets, EUA). As demais análises foram realizadas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prisma (Intuitive Software for Science, San Diego, CA). A diferença significativa foi calculada pelo teste ANOVA, e valores *p* menores que 0,05 foram considerados significativos.

**ARTIGO – Effect of kojic acid derivatives on pigmentation and skin age-related enzymes**

PEDROSA, Tatiana do Nascimento<sup>1</sup>, CARVALHO, Antônio Sérgio Costa<sup>2</sup>, SANTOS, Alberdan Silva<sup>2</sup>, CALCAGNO, Danielle Queiroz<sup>4</sup>, SMITH, Marília de Arruda Cardoso<sup>4</sup>, LIMA, Emerson Silva<sup>1</sup>, MARIA-ENGLER, Silvy Stuchi<sup>3</sup>, VASCONCELLOS, Marne Carvalho<sup>1</sup>

<sup>a</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Amazonas;

<sup>b</sup>Federal University of Pará, Institute of Exact and Natural Sciences, Laboratory of Drug Development and Planning, Belém, Pará, Brazil;

<sup>c</sup>Department of Clinical Chemistry & Toxicology, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil;

<sup>d</sup>Discipline of Genetics, Department of Morphology and Genetics, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo-SP, Brazil.

\* Correspondence author: marne@ufam.edu.br

Telephone number: +55.92.33055000

Address: Alexandre Amorim street, 330

Zip Code: 69010-300

## ABSTRACT

The aging process is characterized by skin hyperpigmentation and degradation of extracellular matrix. Tyrosinase inhibitors such as kojic acid, are widely known and used as depigmenting agents, however limitations as stability problems and insufficient activity stimulate researchers to synthesize derivatives aiming improvements in their activities. This work aimed to evaluate the cytotoxicity and effects of kojic acid derivatives on the pigmentation and skin age-related enzymes. This study evaluated the cytotoxicity (tripan blue exclusion assay), antioxidant activity (DPPH and iron chelating activity assay), inhibitory activity of collagenase, elastase and hyaluronidase (spectrophotometric assays) and depigmentant activity (tyrosinase activity, melanin content and tyrosinase gene expression). The compounds showed no cytotoxicity at 100  $\mu$ M and low scavenger antioxidant activity. The iron chelating activity was better for Oleikojato cooper (Ok-Cu) ( $76,0 \pm 5,7$  %) than kojic acid (AK) ( $58,9 \pm 5,63$  %) and kojato cooper (Cu-Ak) ( $57,4 \pm 5,24$ ). The tyrosinase activity was strongly inhibited by Cu-Ak (86.7 %) and Ok-Cu (92.5 %) and the melanin content was reduced in 40.8 % and 38.4 %, respectively without tyrosinase gene expression alterations.

**Key words:** melanogenesis, tyrosinase, matrix metalloproteinases and antioxidant.

## 1. INTRODUCTION

Several tyrosinase inhibitors have been used as depigmenting agents for the treatment or prevention of disorders involving hyperpigmentation (Matos et al., 2011). However, the use of these agents is quite limited, this happens because of low stability, insufficient activity, side effects (Yang et al., 2012), high toxicity and insufficient penetration ability (Nerya et al., 2004).

Kojic acid (KA), 5-hydroxyl-2-(hydroxymethyl)-4H-pyran-4-one, is a fungal metabolite natural extensively studied as an active cosmetic for skin whitening and as a food additive for prevention of browning enzyme (Kwak et al., 2010). The AK acts by inhibiting tyrosinase action in melanocytes due to chelating of copper ions in the enzyme (Cho et al., 2012). Other activities have been described, such as weak bacteriostatic, anti-inflammatory, insecticidal, cytotoxic and antitumor, increase phagocytosis, induce apoptosis (Fickova et al., 2008; Rodrigues et al., 2011) and prevention of photoaging (Ahn et al., 2011). Regarding the inhibition of the tyrosinase KA does not provide sufficient inhibition at low concentration and provides long-term stability (Kwak et al., 2011). In this perspective, various kojic acid derivatives have been synthesized and exhibit inhibition of tyrosinase and depigmentantig activities of the greater than kojic acid due to increased lipophilic character (Cho et al., 2012; Rho et al., 2008).

Tyrosinase obtained from the mushroom *Agaricusbisporus* has high homology with mammalian and is adequate as a model to study pathways of melanogenesis and tyrosinase (Matos et al., 2011). However, the inhibition of tyrosinase activity and depigmenting action are not directly related (Cho et al., 2012), one explanation for this difference is discussed by Chan et al. (2011), which emphasizes that the mushroom tyrosinase is found in cytosol, while

tyrosinase in melanocytes is membrane bound and can therefore be expected an effect on these antimelanogenesis different tyrosinases.

The process of skin aging is divided into intrinsic aging and extrinsic aging and is characterized by wrinkles, hyperpigmentation and laxity. Aging skin from exposure to UV radiation is referred to extrinsic aging which is characterized by pigmentary changes, such as solar lentigo and mottled pigmentation on exposed areas such as the face, neck, and forearm (Chiang et al., 2012). The wrinkling of the skin is often linked to degradation of extracellular matrix (ECM), which is significantly associated with increased enzyme activity dermal (hyaluronidase, elastase, MMP-1) (Maity et al., 2011). Thus, inhibitors for these enzymes are useful cosmeceutical ingredients to possess anti-wrinkle and anti-aging skin (Chompoo et al., 2012).

Recently, we have synthesized kojic acid derivatives and reported the inhibitory effects of tree this kojic acid derivatives on tyrosinase inhibition (Carvalho et al. – Apêndice 1). Considering all these aspects, the present study was undertaken to evaluate depigmentating and inhibitory activities on skin age-related enzymes of kojic acid and their derivatives, kojato cooper and oleikojato cooper.

## **2. METHODS**

### **2.1 Kojic acid derivatives**

Kojic acid (KA) and kojic acid derivatives used in this work, Kojato copper (Cu-Ak) and Oleikojato copper (Cu-OK) (Fig. 1), were synthesized by Carvalho *et al.* (Apêndice 1), from Federal University of Pará.

**Insert Fig. 1.**

## **2.2 Cell Culture**

Murine B16F10 melanoma cell lines was purchased from the American Type Culture Collection (Manassas, VA) and primary cultures of skin cells (fibroblasts) were obtained from the foreskins of University Hospital (Hospital Universitário–HU-USP) patients. This project has undergone review and approval by the Ethics Committee of HU (HU no. CEP Case 943/09). The cells were grown in DMEM medium (GIBICO, USA) supplemented with 10 % Fetal bovine serum (GIBICO, USA), 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (GIBICO, USA) in a humidified atmosphere with 5 % CO<sub>2</sub> at 37 °C.

## **2.3 Measurement of cell viability**

For the measurement of cell viability,  $1,5 \times 10^4$  cells from each cell line were seeded on 24-well plates and after a 24 h attachment period they were treated with kojic acid, Kojato cooper and Oleikojato cooper (100 µM). Following a 24–48 h incubation period, cell viability was assessed by counting live versus dead cells on a hemocytometer using standard Trypan Blue (0.4% in phosphate-buffered saline, PBS) exclusion staining. The assay was done in triplicate (Brohem et al., 2009).

## **2.4 DPPH radical scavenging activity assay**

The free radical scavenging activity was evaluated as described by Lam et al. (2011) with few modifications. Thirty microliters of the different concentration of test samples were mixed with 270 µl of DPPH ethanol solution. After, the mixture was incubated in the dark at room temperature for 30 min, and then the absorbance was measured at 517 nm. Trolox® was used as a positive control, while water and ethanol were used as controls for calculation.

## 2.5 Metal chelating activity

The chelation of ferrous ions by samples was estimated by method of Ebrahimzadeh et al. (2008) adapted for 96-well plates. Briefly, 10  $\mu$ l of 2 mM FeCl<sub>2</sub> was added to 0,2 ml of the samples incubating for 5 min at 37 °C and then held at the first reading (A1) in Elisa reader (DTX 800 - Beckmar Coulter). After, 10  $\mu$ l of 300 mM Hydroxylamine Hydrochloride and 5 mMferrozine solution was added to the reaction. The mixture was stand at 37 °C for 15 min. The absorbance of the solution was there after measured at 562 nm. The percentage inhibition of ferrozine–Fe<sup>2+</sup> complex formation was calculated and Na<sub>2</sub>EDTA was used as positive control.

## 2.6 Gelatin zimography

The assay was performed according to the methodology of Snoek-Van Den Beurden and Von Hoff (2005). Normal human fibroblasts were seeded into 24 well plates at a density of 3 x 10<sup>4</sup> cells per well and treated with samples for 24 hours. After the treatment period, the medium was collected for microtubules and proteins quantified by the Lowry method (1951). Then, the proteins (30  $\mu$ g/sample) were subjected to electrophoresis on SDS-PAGE 1.0mm system (BioRad Mini-Protean® III), polyacrylamide (PAGE) 30% containing 10% sodium dodecyl sulfate (SDS), copolymerized with 1% gelatin, initially at 70 V for 30 minutes and then at 120 V for 90 minutes. At the end of the run the gel was washed twice with 2.5% Triton-X for 15 minutes to remove SDS and then incubated at 60 °C overnight in incubation buffer (0.05 M Tris-HCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, pH 8.0). After the incubation period, the gels were stained with Coomassie Brilliant Blue® for 30 minutes at room temperature and destained with a solution containing 10% methanol and 10% acetic acid in water. The gel was scanned (450 dpi) and the intensities of the bands and molecular weights calculated using the ImageJ software.



## 2.7 Elastase inhibition assay

Elastase inhibition was assayed using N-succinyl-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilide (AAPVN) as the substrate, monitoring the release of *p*-nitroaniline by the method described (Kim et al., 2004) with a few modifications. The inhibitory activity determined the intensity of color released during cleavage of AAPVN by the action of elastase. Briefly, 1 mM AAPVN was prepared in 0.1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0). The solutions were preincubated for 10 min at 25 °C with 10 µl of elastase from porcine pancreas (0.03 units/ml). After, and the absorbance was measured at 410 nm at 25 °C for 50 min.

## 2.8 Hyaluronidase inhibition assay

Hyaluronidase inhibitory assay was performed by the method described by Reissig et al. (1955) with few modifications. A test sample of 5 µl was pre-incubated with hyaluronidase from bovine test (1.50 units in 100 µL) for 10 min at 37 °C. Subsequently, the assay was initiated by adding hyaluronic acid sodium salt from roter comb 100 µL (0.03% in 300 mM sodium phosphate, pH 5.35) to the incubation mixture and incubated further for 45 min at 37 °C. After incubation, 40 µL of 0.8 M potassium tetraborate were added to the reaction mixture, leading to the boiling bath for 3 minutes. Then were added 90 µL of *r*-dimethylaminobenzaldehyde (DMAB) and the mixture was incubated again at 37 °C for 20 minutes. Finally, the absorbance of the mixture was measured in ELISA reader (DTX 800 - Beckman Coulter) at 560 nm using water as control. As a positive control, we used Rutin.

## 2.9 Tyrosinase activity and melanin content in B16F10

B16F10 cells were stimulate with IBMX (Isobutylmetilxantine) 25 µM for 24h and then treated with substances (AK 25 µM, Cu-AK 25 µM, Cu-OK 25 µM e PTU (phenylthiourea) 25 µM) for 48 h. After, the cells were colleted for two microtubes (one for melanin content with  $1 \times 10^6$  cells/microtube) and lised with Triton-X 100 in PBS with

1mMPMSF (phenylmethanesulfonylfluoride) and centrifuged at 10,000 rpm at 4 °C for 10 min, for obtain the supernatant for Tyrosinase activity and the pellet for melanin content.

Tyrosinase activity was estimated by measuring the rate of L-DOPA oxidation as reported (Tomita and Tagami, 1992) with slight modifications. Protein concentrations were determined by Bradford method. Using bovine serum albumin (BSA) as a standard. 100 µL of supernatant containing the same 100µg total proteins was added to each well in 96-well plate, and then mixed with 100 µL of L-DOPA 3 mg/mL. After incubation at 37 °C for 90 minutes, the dopachrome was monitored by measuring the absorbance at 475nm.

Melanin content was measured as described previously (Hosoi et al., 1985) with slight modifications. The pellets of B16F10 from density  $1 \times 10^6$  cells after the lysis process were solubilized with 250 µl of 1 N NaOH containing 10% DMSO for 1 h at 95 °C. The absorbance at 405 nm was measured using a microplate reader. The melanin content was determined from a standard curve prepared from an authentic standard of synthetic melanin (Sigma, USA).

## **2.10 Quantitative reverse transcriptase PCR real time (qRT-PCR)**

Total RNA was extracted with Tri-reagent (Applied Biosystems, USA) according to manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were determined using the NanoDrop spectrophotometer (Kisher, Germany) and 1 % agarose gels. Complementary DNA was synthesized using the kit High-Capacity cDNA Reverse Archive kit" (Applied Biosystems, Poland) following the manufacturer's instructions. Real-time qRT-PCR primers and Taqman probes targeting Tyr(Mm00495817\_m1) were purchased as Assays-on-demand Products for Gene Expression (Applied Biosystems, USA) following the manufacturer's instructions. GAPDH were selected as internal controls for RNA input and reverse transcription efficiency with the TaqMan Mouse Endogenous Control (Mm99999915\_g1)

(Applied Biosystems, USA). All real time qRT-PCR reactions for target gene and internal control were done in triplicate on the same plate. Gene expression values were calculated using  $\Delta\Delta C_t$  method, where for each sample was designated the non-treated sample correspondent as calibrator (Livak and Schmittgen, 2001).

### 2.11 Statistical analysis

All data is expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using Graph Pad InStat software (version 3.01 for WindowsXP, Graph Pad Software, San Diego, California). One-way ANOVA with a multiple comparison test (Tukey–Kramer Multiple Comparisons Test) was used for data analyses. Statistical significance was considered when  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  or  $p < 0.001$ .

## 3. RESULTS

This work conducted a study of depigmenting activity and inhibitory effect on skin age-related enzymes by derivatives of kojic acid. Among the findings, we highlight the inhibition of tyrosinase and decreased production of melanin in melanoma (B16F10).

The potential cytotoxicity of the active compounds on B16F10 cells and normal human fibroblasts (NHF) was verified by measuring cell viability compared to those exposed to kojic acid. The results indicated that Cu-AK and Cu-OK did not exhibit any appreciable cytotoxic activity at a dose of 100  $\mu$ M, as shown in Fig. 2.

### Insert Fig. 2.

The compounds showed very low DPPH scavenging activity at 50  $\mu$ g/mL displaying an  $IC_{50}$  higher than 100  $\mu$ M as shown in Table 1. All the compounds showed good iron

chelator activity at 50  $\mu\text{g/mL}$ . Cu-Ok showed a higher chelating activity than Cu-Ak and KA. Kojato cooper, oleikojato cooper and kojic acid showed no *in vitro* inhibition of the enzymes elastase and collagenase and showed very low inhibition of hyaluronidase at 50  $\mu\text{g/mL}$  with an  $\text{IC}_{50}$  higher than 100  $\mu\text{M}$  as shown in Table 1.

**Insert Table 1.**

The inhibitory effect of the active compounds on the tyrosinase activity of B16F10 cells treated with 25  $\mu\text{M}$  IBMX (Fig. 3A) was studied and found that treatment of these cells with Cu-Ak and Cu-Ok resulted in effective inhibition of tyrosinase activity compared with cells treated with IBMX alone. After 48 hours of treatment with Cu-Ak and Cu-Ok, tyrosinase activity decreased by 86.7% and 92.5% at 25  $\mu\text{M}$ , respectively, compared with 100% activity in cells treated with 25  $\mu\text{M}$  IBMX alone. Compared with the activity of KA (15% inhibition), derivatives showed capacity of tyrosinase activity inhibition much higher than KA (Fig. 3A). Melanin content of cultured B16F10 cells in the presence of the active compounds (at 25  $\mu\text{M}$ ) was measured and found that melanin synthesis was effectively inhibited (Fig. 3C and 3D). To determine if the activity of these samples is involved with the modulation of the expression of the tyrosinase gene we evaluated the changes in the levels of expression through RT-PCR. There was no alteration in the level of tyrosinase expression assigning it a post transcriptional control the melanogenesis by kojic acid derivatives as shown in Fig. 3B.

**Insert Fig. 3.**

#### 4. DISCUSSION

The inhibition of tyrosinase significantly affect melanogenesis process and melanin production, accordingly, many studies have targeted the inhibition of tyrosinase for the treatment of hyperpigmentation (Lajis et al., 2012 and Rho et al., 2008). Melanin plays an important role in protection against the damage induced in the skin due to UV radiation, however their increased synthesis is responsible for several dermatological disorders such as hyperpigmentation, postinflammatory pigmentation, melasma and skin aging (Lam et al., 2011 and Lajis et al., 2012).

The majority of kojic acid derivatives are not soluble and are unstable at high temperatures for a long storage time which prevents be incorporated into base oils and cosmetic products for skin care (Lajis et al. 2012). We synthesize an ester of fatty Ak, Cu-Ok, who showed great potential after cosmetic tests performed in this study.

Security is key issue in the use of compounds for the production of cosmetic industry (Liang et al. 2012). The safety of kojic acid is known (Ahn et al., 2011) however, changes in the molecule could make it unfeasible cytotoxic enough to use. Our results showed that the compounds were safe even at a high concentration reinforcing studies by Carvalho et al., 2013 (Apêndice 1).

Kojic acid is reported in many studies as an agent with antioxidant activity and free radical scavenging activity primarily for its metal chelator (Kwak et al., 2010). However, when our result were compared with studies by Lajis et al. (2012) and Ahn et al. (2011) showed that the DPPH scavenging activitie is very low when it was compared to standards such as ascorbic acid and trolox.

The antioxidant activity of most agents is by inactivation of ROS only after they have been formed, iron chelating agents are able to prevent their formation (Kaiserová et al.,

2007). The conversion of a compound of  $\text{Fe}^{3+}$ /ferricyanide to form ferrous serves as an index of the antioxidant capacity (Huang et al., 2012). Our results show good iron chelator activity for both kojic acid and derivatives which is in agreement with that reported for KA by Sudhir et al. (2005). Antioxidants can interact with the ferrous ions to form insoluble metal complexes and then inhibit the interaction between the metal and lipids (Huang et al., 2012).

Free radicals, such reactive oxygen species (ROS) stimulate melanin synthesis by various reactions and antioxidants can inhibit this process. Antioxidants may also have not melanogenesis limiting action by inhibiting the enzyme tyrosinase but by reducing the product of the reaction catalyzed by the enzyme to its precursor, hindering the formation of melanin (Changet al., 2009 and Schallreuter et al., 2007).

In photoaging there is an overproduction of ROS that collaborates to hyperpigmentation and increased expression of enzymes that degrade the extracellular matrix (Jenkins, 2002; Kim et al., 2005 and Lee et al., 2012). There are no reports in the literature and hyaluronidase inhibition of matrix metalloproteinases (collagenase and elastase) by kojic acid. Matrix metalloproteinases (MMPs) are enzymes that contain zinc in its active site (Fang et al., 2009), as AK is reported as metal chelator we expected inhibition of MMPs, which did not occur.

The inhibitory activity of the compounds on mushroom tyrosinase is smaller than kojic acid (Carvalho et al. – Apêndice 1), however, Cu-Ak and Cu-OK showed depigmenting activity greater than AK in our study. Studies by Cho et al. (2012), Ahn et al. (2011) and Kwak et al. (2011) show an unsatisfactory depigmenting activity by AK in B16F10 cells probably due to its poor cell-penetrating ability (Kwak et al., 2011). The compounds (Cu-Ak and Cu-OK) showed incredibly depigmenting activity than kojic acid. These results suggest a possible power increase in the permeability and stability of kojic acid after the complexation and esterification reactions performed.

When comparing the inhibition of tyrosinase and decreased of melanin content by the compounds (Fig. 3A and 3D), we find that they exhibit very similar profiles. These results combined with notorious tyrosinase inhibition presented, lead us to believe that the inhibition of melanogenesis by derivatives is due to the ability of the compounds suppressing tyrosinase. As shown in Figure 3B the compounds did not alter the expression of tyrosinase in addition suggesting a post-transcriptional control the possibility of inhibition of the enzyme by a similar activity attributed to the kojic acid, in other words, the activity chelating copper ions on the enzyme. However, more studies are needed to confirm the mechanism by which these compounds inhibit tyrosinase.

#### **4. CONCLUSIONS**

The effects of kojic acid and its derivatives, oleikojato cooper and kojato cooper, in melanogenesis in B16F10 cells and skin age-related enzymes were studied. Cu-Ok and Cu-Ak were able to decrease tyrosinase activity and melanin production, with a low free radical scavenging and higher iron chelating activities. The inhibition of melanogenesis occurs due to inhibition of tyrosinase coupled to an antioxidant mechanism. The compounds have great potential for use as cosmetic depigmenting or as additives in the food industry.

#### **Conflict of Interest**

The authors declare that there are no conflicts of interest

#### **Acknowledgments**

The authors would like to thank CNPq, CAPES and FAPEAM for financial support.

## References

- Ahn, S. M., Rho, H. S., Baek, H. S., Joo, Y. H., Hong, Y. D., Shin, S. S., Park, Y-H., Park, S. N. 2011. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. *Bioorg Med Chem Lett.* 21, 7466–7469.
- Brohem, C.A., Sawada, T.C.H., Massaro, R.R., Almeida, R.L., Rivelli, D.P., Ropke, C.D., da Silva, V.V., de Lima, T.M., Curi, R., Barros, S.B.M., Maria-Engler, S.S. 2009. Apoptosis induction by 4-nerolidylcatechol in melanoma cell lines. *Toxicol in Vitro* 23 (2009) 111–119.
- Chang, T.S. 2009. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *Int JMolSci.* 10, 2440-2475.
- Chan, Y.Y., Kim, K.H., Cheah, S. H. 2011. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *J. Ethnopharmacol.* 137, 1183–1188, 2011.
- Chiang, H-M., Chen, H-C., Lin, T-J., Shih, I-C., Wen, K-C. 2012. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Food Chem. Toxicol.* 50, 4260–4269.
- Cho, J-C., Rho, H. S., Baek, H. S., Ahn, S. M., Woo, B. Y., Hong, Y. D., Cheon, J. W., Heo, J. M., Shin, S. S., Park, Y-H., Suh, K-D. 2012. Depigmenting activity of new kojic acid derivative obtained as a side product in the synthesis of cinnamate of kojic acid. *Bioorg Med Chem Lett.* 22, 2004-2007.
- Chompoo, J., Upadhyay, A., Fukuta, M., Tawata, S. 2012. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complement. Altern. Med.* 12, 106.
- Ebrahimzadeh, M. A., Poumorad, F., Bekhradnia, A. R. 2008. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *Afr. J. Biotechnol.* 7, 3188-3192.
- Fang, L., Huber-Abel, F., Teuchert, M., Hendrich, C., Dorst, J., Schattauer, D., Zettlmeissel, H., Wlaschek, M., Scharffetter-Kochanek, K., Tumania, H., Ludolph, A. C., Brettschneider, J. 2009. Linking neuron and skin: Matrix metalloproteinases in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *J. Neurol. Sci.*, 285, 62-66.
- Fickova, M., Pravdova, E., Rondhal, L., Uher, M., Brtko, J. 2008. *In vitro* antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. *J Appl Toxicol.* 28, 554–559.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., Kuroki, T. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* 45, 1474–1478.
- Huang, H-C.; Wang, H-F., Yih, K-H., Chang, L-Z.; Chang, T-M. 2012. The Dual Antimelanogenic and Antioxidant Activities of the Essential Oil Extracted from the Leaves of *Acorus macrospadiceus* (Yamamoto) F. N. Wei et Y. K. Li. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2-10.
- Jenkins, G. 2002. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mech. Ageing Dev.* 123, 7, 801–810.
- Kaiserová, H., Šimůnek, T., Van Der Vijgh, W. J. F., Bast, A., Kvasničková, E. 2007. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: Role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. *Biochim Biophys Acta.* 1772, 1065-1074.



- Kwak, S-Y., Noh, J-M., Park, S-H., Byun, J-W., Choi, H-R., Park, K-C., Lee, Y-S. 2010. Enhanced cell permeability of kojic acid-phenylalanine amide with metal complex. *Bioorg Med Chem Lett.* 20, 738–741.
- Kim, Y., Uyama, H., Kobayashi, S. 2004. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 320, 1, 256-261.
- Kim, M-S., Lee, S. R., Ho, H. S., Kim, D. H., Chang, S., Chung, J. H. 2005. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin *in vivo*. *Clin. Chim. Acta.* 362, 161–169.
- Lam, U. D. P., Hoang, D. N., Lee, H-B., Kim, B., Lee, J-D., Shin, J-H., Kim, E-K. 2011. Depigmenting effect of *Sterculia lynchophora* on B16F10 melanoma and C57BL/6 melan-a cells. *Korean J. Chem. Eng.* 28, 4, 1074-1077.
- Lajis, A. F. B., Hamid, M., Ariff, A. B. 2012. Depigmenting Effect of Kojic Acid Esters in Hyperpigmented B16F1 Melanoma Cells. *J Biomed Biotechnol.* 2012, 1-9.
- Lee, S-J., Cho, S-W., Kwon, Y-Y., Kwon, H-S., Shin, W-C. 2012. Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from Nuruk on Oxidative Stress, Melanogenesis, and Photo-Aging. *Mycobiology.* 40, 2, 117-123.
- Liang, C.; Lim, J-H.; Kim, S-H.; Kim, D-S. 2012. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of *Smilax china*. *Food Chem.* 134, 2, 1146-8.
- Livak, K. J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25, 4, 402-8.
- Lorwy, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- Matos, M. J., Santana, L., Uriarte, E., Delogu, G., Corda, M., Fadda, M. B., Era, B., Fais, A. 2011. New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett.* 21, 3342–3345.
- Nerya, O., Musa, R., KHATIB, S., TAMIR, S., VAYA, J. 2004. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry.* 65, 1389–139.
- Reissig, J. L., Strominger, J. L., Leloir, L. F. 1955. A Modified Colorimetric Method For The Estimation of N-Acetylmino Sugars. *J Biol Chem.* 217, 2, 959-66.
- Rho, H. S., Baek, H. S., Ahn, S. M., Kim, D. H., Chang, I. S. 2008. Synthesis of New Anti-melanogenic Compounds Containing Two Molecules of Kojic Acid. *Bull. Korean Chem. Soc.* 29, 8.
- Rodrigues, A. P., Carvalho, A. S., Santos, A. S., Alves, C. N., do Nascimento, J. L. M., Silva, E. O. 2011. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biol. Int.* 35, 335–343.
- Schallreuter, K. U., Kothari, S., Chavan, B., Spencer, J. D. 2007. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Exp Dermatol.* 17, 395-404.
- Snoek-Van Beurden, P. A. M., Von Den Hoff, J. W. 2005. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques.* 38, 73-83.
- Tomita, Y. M. K., Tagami, H. 1992. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Res.* 357–361.
- Yang, Z., Zhang, Y., Sun, L., Wang, Y., Gao, X., Cheng, Y. 2012. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterizing tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Anal Chim Acta.* 719, 87–95.

**GRAPHICAL**

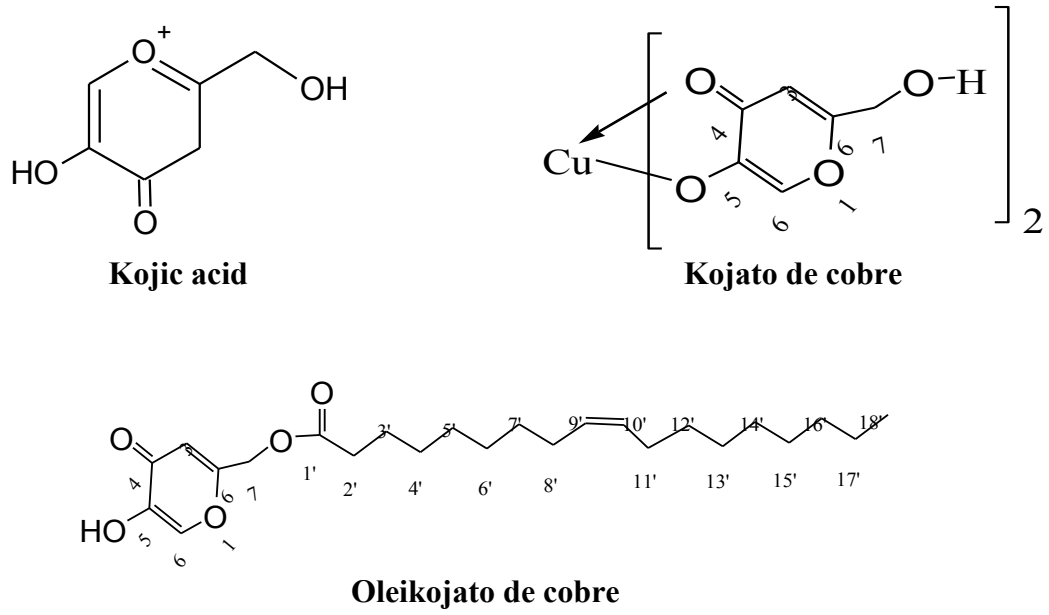


Fig. 1. Structure of Kojic acid and its derivatives, Kojato copper and Oleikojato copper.

Table 1. Antioxidant and inhibitory effects of KA, Cu-Ak and Cu-Ok, using DPPH. All samples were at a concentration of 50  $\mu\text{g/mL}$ . Data are expressed as % of control,  $n \geq 3$ .

Sample	Scavenging activity (%)	Quelanting activity (%)	Collagenase inhibition (%)	Elastase inhibition (%)	Hyaluronidase inhibition (%)
KA	13.0 $\pm$ 0.25	58.9 $\pm$ 5.63	NA	NA	12.2 $\pm$ 0.02
Cu-Ak	10.9 $\pm$ 1.07	57.4 $\pm$ 5.24	NA	NA	24.09 $\pm$ 1.35
Cu-Ok	1.2 $\pm$ 1.21	76.0 $\pm$ 5.7	NA	NA	5.1 $\pm$ 0.37
Trolox®	85.2 $\pm$ 0.10	-	-	-	-
EDTA	-	97.6 $\pm$ 3.71	-	-	-
Rutina	-	-	-	-	90.7 $\pm$ 0.28

NA – No activitie

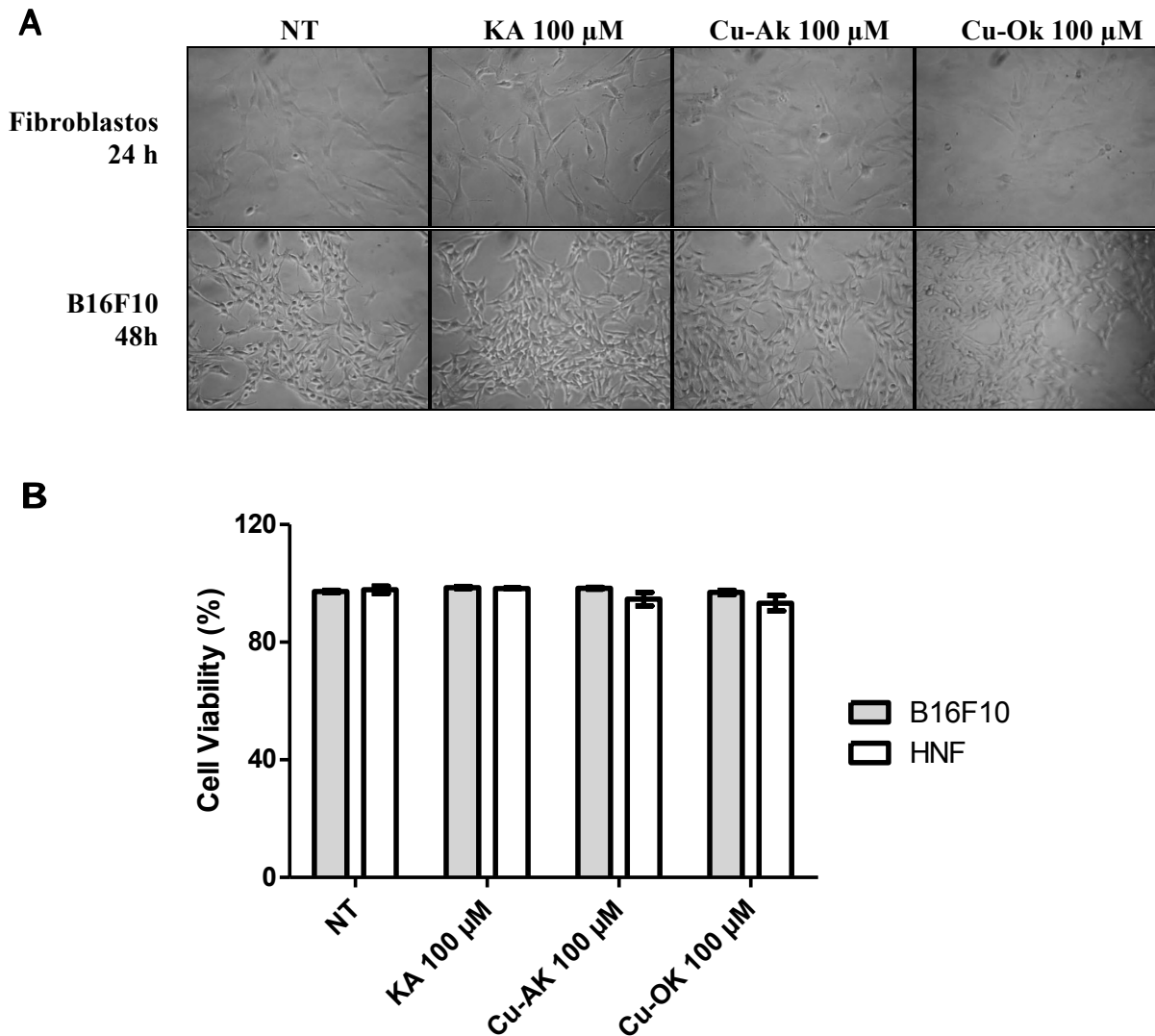


Fig. 2. Cell viability of kojic acid, Kojato cooper and Oleikojato cooper on melanoma murine (B16F10) and human normal fibroblasts (HNF). The photomicrographics (A) and graph (B) indicate viability of melanoma murine cell lines following incubation with samples for 48 h and viability of human normal fibroblasts cells following incubation with samples for 24 h as assessed by Trypan Blue staining. (A) 24 h and 48 h after incubation, cells photographs were taken, and the percentage of cell death was determined by Trypan blue staining. Human normal fibroblasts and melanoma murine are not showing morphological alterations with the treatments. (B) Each bar represents the mean  $\pm$  SEM of three separate experiments. There were not statically significant cell death difference between melanoma murine and fibroblast after sample exposure for 24 h ( $P > 0.05$ ) and 48 h ( $P > 0.05$ ).

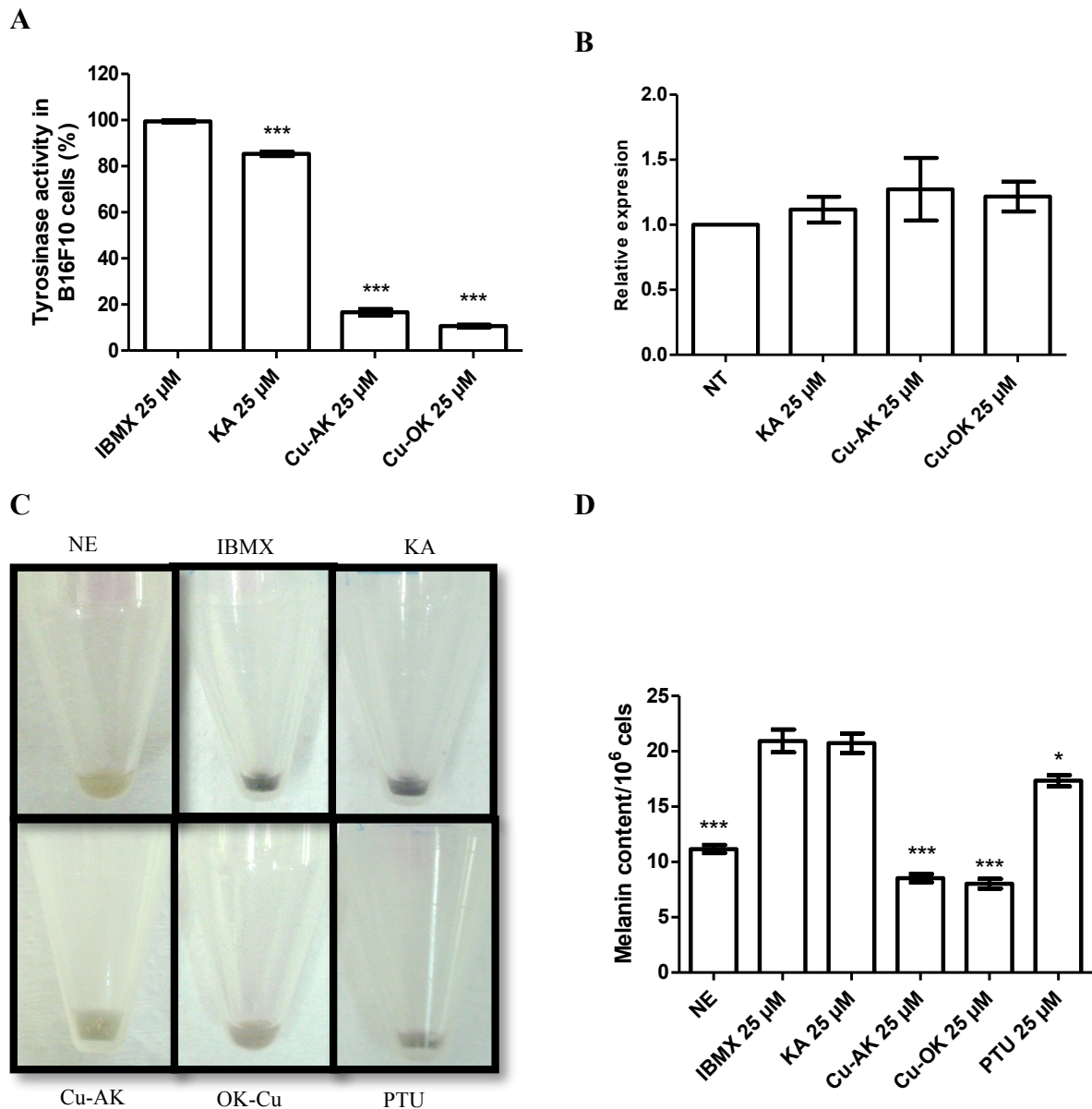


Fig. 3. (A) Inhibitory effect of active compounds on tyrosinase in B16F10 cells. Cells were stimulated in the presence of 25  $\mu$ M IBMX 24 h, after B16F10 cells were treated with 25  $\mu$ M of kojato cooper, 25  $\mu$ M of Oleikojato cooper, 25  $\mu$ M of kojic acid for 48h. Results are expressed as a percentage of control (IBMX), and each column represents the mean  $\pm$  SE of three determinations. \*\*\*  $p < 0.001$  compared to cells treated with 25  $\mu$ M IBMX. (B) The expression of tyrosinase was determined by RT-PCR using GAPDH as internal standard. Data were expressed at mean  $\pm$  SD from three different experiments. (C), (D) Effects of kojic acid and kojic acid derivatives on cellular melanin content. Melanin contents were determined in B16F10 cells treated with 25  $\mu$ M of Kojato de cooper, 25  $\mu$ M of Oleikojato cooper and 25  $\mu$ M of kojic acid for 48h after stimulation per 24 h with 25  $\mu$ M of IBMX. Melanin levels were measured at 405 nm. (C) Pellets of mouse B16F10 melanoma cells after cells were cultured in the presence of kojic acid derivatives, kojic acid and N-phenylthiourea. Arrows indicates cell pellets where melanogenesis was inhibited in B16F10 melanoma cells cultured. (D) Values represent mean  $\pm$  SD ( $n = 3$ ). \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$  compared to cells treated with 25  $\mu$ M IBMX.

## 8 REFERÊNCIAS

ABIPHEC. Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **Panorama do setor 2011**. 2012. Disponível em: <<http://www.abihpec.org.br/wp-content/uploads/2012/04/Panorama-do-setor-2011-2012-03-DEZ-2012.pdf>>. Acesso em: 28dez 2012 às 15h59.

AHMED, S.A.; GOGAL JR., R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AHN, S. M.; RHO, H. S.; BAEK, H. S.; JOO, Y. H.; HONG, Y. D.; SHIN, S. S.; PARK, Y-H.; PARK, S. N. Inhibitory activity of novel kojic acid derivative containing trolox moiety on melanogenesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, p. 7466–7469, 2011.

ALLERHAND, M.; OOI, E. T.; STARR, R..J.; ALCORN, M.; PENKE, L.; DROST, E.; MACNEE, W.; DEARY, I. J.; STARR, J. M. Skin ageing and oxidative stress in a narrow-age cohort of older adults. *European Geriatric Medicine*, v. 2, p. 140–144, 2011.

ANILKUMAR, T.V.; MUHAMED, J.; JOSE, A.; JYOTHI, A.; MOHANAN, P.V.; KRISHNAN, L. K. Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of acute wound. *Biologicals*, v. 39, p. 81-88, 2011.

BATISTELA, M. A.; CHORILLI, M.; LEONARDI, G. R. Abordagens no estudo do envelhecimento cutâneo em diferentes etnias. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 88, n. 2, p. 59-62, 2007.

BEMVINDO, C. S. **Estudo comparativo da liberação e penetração cutânea de nitrato de miconazol de emulsões tópicas comerciais**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

BLAAKA, J.; LÜTTJEB, D.; JOHNA, S. M.; SCHÜRERA, N. Y. Irritability of the skin barrier: A comparison of chronologically aged and photo-aged skin in elderly and young adults. *European Geriatric Medicine*, v. 2, p. 208–211, 2011.

BERSON, J. F.; HARPER, D. C.; TENZA, D.; RAPOSO, G., MARKS, M. S. Pmel17 initiates premelanosome morphogenesis within multivesicular bodies. *Molecular Biology of the Cell*, v.12, p. 3451–3464, 2001.

BOUWSTRA, J. A.; HONEYWELL-NGUYEN, L.; GOORIS, G. S.; PONEC, M. Review: Structure of the skin barrier and its modulation, by vesicular formulations. *Progress in Lipid Research*, v. 42, p.1–36, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. V. 72, p. 248-254, 1976.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, v. 1803, p. 55-71, 2010.

CAMARGO, M.F. P. **Desenvolvimento de nanoemulsões à base de óleo de maracujá (*Passiflora edulis*) e óleo essencial de lavanda (*Lavandula officinalis*) e avaliação da atividade antiinflamatória tópica.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Ribeirão Preto, SP, 99p.: Il., 2008.

CHAN, E.W.C.; LIM, Y.Y.; WONG, L.F.; LIANTO, F.S.; WONG, S.K.; LIM, K.K.; JOE, C.E. ; LIM, T.Y. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. *Food Chemistry*. v. 109, p. 477–483, 2008.

CHAN, Y.Y.; KIM, K.H.; CHEAH, S. H. Inhibitory effects of *Sargassum polycystum* on tyrosinase activity and melanin formation in B16F10 murine melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*. 137, 1183–1188, 2011.

CHANG, T.S. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Science*, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CHIANG, H-M.; CHEN, H-C.; LIN, T-J.; SHIH, I-C.; WEN, K-C. *Michelia alba* extract attenuates UVB-induced expression of matrix metalloproteinases via MAP kinase pathway in human dermal fibroblasts. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 4260–4269, 2012.

CHO, S. J.; ROH, J. S.; SUN, W. S.; KIM, S. H.; PARK, K. D. N-Benzylbenzamides: A new class of potent tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, p. 2682–2684, 2006.

CHO, J-C.; RHO, H. S.; BAEK, H. S.; AHN, S. M.; WOO, B. Y.; HONG, Y. D.; CHEON, J. W.; HEO, J. M.; SHIN, S. S.; PARK, Y-H.; SUH, K-D. Depigmenting activity of new kojic acid derivative obtained as a side product in the synthesis of cinnamate of kojic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, V. 22, P. 2004-2007, 2012.

CHOI, S. I.; PARK, S. R.; HEO T. R. Matrix Degradation Inhibitory Effect of *Schisandra Fructus* on Human Articular Cartilage and Chondrocytes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 106, n. 2, p. 279-284, 2006.

CHOI, K-C.; LEE, S.; KWAK, S. Y.; KIM, M-S.; CHOI, H. K.; KIM, K. H.; CHUNG, J. H.; PARKA, S. H.. Increased expression of 14-3-3 $\epsilon$  protein in intrinsically aged and photoaged human skin in vivo. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 126, p. 629–636, 2005.

CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; FUKUTA, M.; TAWATA, S. Effect of *Alpinia zerumbet* components on antioxidant and skin diseases-related enzymes. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 12, n. 106, 2012.

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

Disponível em:

<[http://www.dermalinstitute.com/uk/library/23\\_article\\_What\\_Causes\\_Skin\\_Aging\\_.html](http://www.dermalinstitute.com/uk/library/23_article_What_Causes_Skin_Aging_.html)>.

Acesso em: Mai 2012.

Disponível em: <[http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv\\_2008/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/00426/index.html](http://www.biopro.de/magazin/wissenschaft/archiv_2008/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/00426/index.html)>. Acesso em: Mai 2012.

DOWNING, D. T. Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. *Journal of Lipid Research*, v. 33, 1992.

EBRAHIMZADEH, M. A.; POUMORAD, F.; BEKHRADNIA, A. R. Iron chelating activity, phenol and flavonoid content of some medicinal plants from Iran. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, p. 3188-3192, 2008.

FANG, L.; HUBER-ABEL, F.; TEUCHERT, M.; HENDRICH, C.; DORST, J.; SCHATTAUER, D.; ZETTLMEISSEL, H.; WLASCHEK, M.; SCHARFFETTER-KOCHANKEB, K.; TUMANIA, H.; LUDOLPH, A. C.; BRETTSCHEIDERA, J. Linking neuron and skin: Matrix metalloproteinases in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Journal of the Neurological Sciences*, v. 285, p. 62-66, 2009.

FICKOVA, M.; PRAVDOVA, E.; RONDHAL, L.; UHER, M.; BRTKO, J. *In vitro* antiproliferative and cytotoxic activities of novel kojic acid derivatives: 5-benzyloxy-2-selenocyanatomethyl- and 5-methoxy-2-selenocyanatomethyl-4-pyranone. *Journal of Applied Toxicology*, n. 28, p. 554–559, 2008.



FISHER, G. J.; QUAN, T.; PUROHIT, T.; SHAO, Y.; CHO, M. K.; HE, T.; VARANI, J.; KANG, S.; VOORHEES, J.J. Collagen fragmentation promotes oxidative stress and elevates matrix metalloproteinase-1 in fibroblasts in aged human skin. *American Journal of Pathology*, v. 174, p. 101–114, 2009.

FORSLIND, B. A domain mosaic model of the skin barrier. *Acta Dermatologica Venereologica*, v. 74, p. 1-6, 1994.

FRESHNEY, R. **Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique**. P. 117, Allan R. Liss, Inc., New York. 1987.

GASPARETTI, C.; NORDLUND, E.; JÄNIS, J.; BUCHERT, J.; KRUUS, K. Extracellular tyrosinase from the fungus *Trichoderma reesei* shows product inhibition and different inhibition mechanism from the intracellular tyrosinase from *Agaricus bisporus*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1824, n. 4, p. 598-607, 2012.

HA, Y. M.; PARK, Y. J.; LEE, J. Y.; PARKA, D.; CHOI, Y. J.; LEE, E. K.; KIM, J. M.; KIM, J-A.; PARK, J. Y.; LEE, H. J.; MOON, H. R.; CHUNG, H. Y. Design, synthesis and biological evaluation of 2-(substituted phenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid derivatives as novel tyrosinase inhibitors. *Biochimie*, v. 94, p. 533–540, 2012.

HAN, P.; CHEN, C.-Q.; ZHANG, C-L.; SONG, K-K.; ZHOU, H-T.; HEN, Q-X. Inhibitory effects of 4-chlorosalicylic acid on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. *Food Chemistry*, v. 107, p. 797–803, 2008.

HAN, Y.K.; PARK, Y.J.; HA, Y.M.; PARK, D.; LEE, J. Y.; LEE, N.; YOON, J. H.; MOON, H. R.; CHUNG, H.Y. Characterization of a novel tyrosinase inhibitor, (2*RS*,4*R*)-2-(2,4-dihydroxyphenyl)thiazolidine-4-carboxylic acid (MHY384). *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1820, p. 542–549, 2012.

HEO, S-J.; KO, S-C; CHA, S-H.; KANG, D-H.; PARK, H-S.; CHOI, Y-U.; KIM, D.; JUNG, W-K.; JEON, Y-J. Effect of phlorotannins isolated from *Ecklonia cava* on melanogenesis and their protective effect against photo-oxidative stress induced by UV-B radiation. *Toxicology in Vitro*, v. 23, p. 1123–1130, 2009.

HIRATA, L. L.; SATO, M.E.O; SANTOS, C. A. M. Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v.23, p.418-24, 2004.

HORNEBECK, W. Down-regulation of tissue inhibitor of matrix metalloprotease-1 (TIMP-1) in aged human skin contributes to matrix degradation and impaired cell growth and survival. *Pathologie Biologie*, v. 51, p. 569-573, 2003.

HOSOI, J.; ABE, E.; SUDA, T.; KUROKI, T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research*, v. 45, p. 1474–1478, 1985.

HSU, M-F.; CHIANG, B-H. Stimulating effects of Bacillus subtilis natto-fermented Radix astragali on hyaluronic acid production in human skin cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 125, p. 474-481, 2009.

HUANG, Y-C.; YANG, C-H.; CHIOU, Y-L. Citrusflavanone naringenin enhances melanogenesis through the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signalling in mouse melanoma cells. *Phytomedicine*, v. 18, p. 1244–1249, 2011.

HUANG, Y-C.; LIU, K-C.; CHIOU, Y-L. Melanogenesis of murine melanoma cells induced by hesperetin, a Citrus hydrolysate-derived flavonoid. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 653–659, 2012.

IRIYAMA, S.; ONO, T.; AOKI, H.; AMANO, S. Hyperpigmentation in human solar lentigo is promoted by heparanase-induced loss of heparan sulfate chains at the dermal–epidermal junction. *Journal of Dermatological Science*, v. 64, p. 223–228, 2011.

ITO, S.; WAKAMATSU, K. Chemistry of mixed melanogenesis – Pivotal Roles of Dopaquinone. *Photochemistry and Photobiology*, v. 84, p. 582 – 592, 2008.

JENKINS, G. Molecular mechanisms of skin ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*, v. 123, p. 801–810, 2002.

JIAN, D.; JIANG, D.; SU, J.; CHEN, W.; HUD, X.; KUANG, Y.; XIE, H.; LI, J.; CHEN, X. Diethylstilbestrol enhances melanogenesis via cAMP-PKA-mediating up-regulation of tyrosinase and MITF in mouse B16 melanoma cells. *Steroids*, v. 76, p. 1297–1304, 2011.

JONES, K.; HUGHES, J.; HONG, M.; JIA, Q.; ORNDORF, S. Modulation of Melanogenesis by Aloesin: A Competitive Inhibitor of Tyrosinase. *Pigment Cell Research*, v. 15, p. 335–340, 2002.

KANG, H. Y.; ORTONNE, J-P. Melasma Update. *Actas Dermosifiliogr.*, v. 100, p. 110-112, 2009.

KEDE, M. P. V.; SABATOWICH. *Dermatologia Estética*. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004.

KIM, Y.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 320, p. 256-261, 2004.

KIM, M-S.; LEE, S. R.; HO, H. S.; KIM, D. H.; CHANG, S.; CHUNG, J. H. The effects of a novel synthetic retinoid, seletinoid G, on the expression of extracellular matrix proteins in aged human skin in vivo. *Clinica Chimica Acta*, v. 362, p. 161–169, 2005.

KO, R. K.; KIM, G-O.; HYUN, C-G.; JUNG, D. S.; LEE, N. H. Compounds with Tyrosinase Inhibition, Elastase Inhibition and DPPH Radical Scavenging Activities from the Branches of *Distylium racemosum* Sieb. et Zucc. *Phytotherapy Research*, n. 25, p. 1451–1456, 2011.

KOHENA, R.; ORONA, M.; ZELKOWICZA, A.; KANEVSKYA, E.; FARFOURIB, S.; WORMSERB, U. Low molecular weight antioxidants released from the skin's epidermal layers: an age dependent phenomenon in the rat. *Experimental Gerontology*, v. 39, p. 67–72, 2004.

KUSHIMOTO, T.; BASRUR, V.; VALENCIA, J.; MATSUNAGA, J.; VIEIRA, W. D.; FERRANS, V. J.; MULLER, J.; APPELLA, E., HEARING, V. J. A model for melanosome biogenesis based on the purification and analysis of early melanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 98, p. 10698–10703, 2001.

KWAK, S-Y.; CHOI, H-R.; PARK, K-C.; LEE, Y-S. Kojic acid–amino acid amide metal complexes and their melanogenesis inhibitory activities. *Journal of Peptide Science*, 2011.

KWAK, S-Y.; NOH, J-M.; PARK, S-H.; BYUN, J-W.; CHOI, H-R.; PARK, K-C.; LEE, Y-S. Enhanced cell permeability of kojic acid–phenylalanine amide with metal complex. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 20, p. 738–741, 2010.

LAM, U. D. P., HOANG, D. N., LEE, H-B., KIM, B., LEE, J-D., SHIN, J-H., KIM, E-K. Depigmenting effect of *Sterculia lynchophora* on B16F10 melanoma and C57BL/6 melan-a cells. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28, 4, 1074-1077, 2011.

LAJIS, A. F. B., HAMID, M., ARIFF, A. B. Depigmenting Effect of Kojic Acid Esters in Hyperpigmented B16F1 Melanoma Cells. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012.

LEE, S-A.; SON, Y-O; KOOK, S-H.; CHOI, K-C.; LEE, J-C. Ascorbic acid increases the activity and synthesis of tyrosinase in B16F10 cells through activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Archives of Dermatological Research*, v. 303, p. 669–678, 2011.

LEE, Y. M.; KANG, S. M.; CHUNG, J. H. The role of TRPV1 channel in aged human skin. *Journal of Dermatological Science*, v. 65, p. 81–85, 2012.

LEE, S-J., CHO, S-W., KWON, Y-Y., KWON, H-S., SHIN, W-C. Inhibitory Effects of Ethanol Extracts from Nuruk on Oxidative Stress, Melanogenesis, and Photo-Aging. *Mycobiology*, 40, 2, 117-123, 2012.

LIANG, C.; LIM, J-H.; KIM, S-H.; KIM, D-S. Dioscin: A synergistic tyrosinase inhibitor from the roots of Smilax china. *Food Chemistry*, 2012.

LIN, C. B.; HU, Y.; ROSSETTI, D.; CHEN, N.; DAVID, C.; SLOMINSKI, A.; SEIBERG, M. Immuno-histochemical evaluation of solar lentigines: The association of KGF/KGFR and other factors with lesion development. *Journal of Dermatological Science*, v. 59, p. 91–97, 2010.

LIVAK, K. J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 4, 402-8, 2001.

LIU, J. J.; FISHER, D. E. Lighting a path to pigmentation: mechanisms of MITF induction by UV. *Pigment Cell & Melanoma Research*, v. 23, p. 741–745, 2010.

LIU, G-S.; PESHAVARIYA, H.; HIGUCHI, M.; BREWER, A. C.; CHANG, C. W.T.; CHAN, E. C.; DUSTING, G. J. Microphthalmia-associated transcription factor modulates expression of NADPH oxidase type 4: A negative regulator of melanogenesis. *Free Radical Biology and Medicine*, In Press, Uncorrected Proof, 2012.

LIU, Y.; CHAN, F.; SUN, H.; YAN, J.; FAN, D.; ZHAO, D.; AN, J.; ZHOU, D. Resveratrol protects human keratinocytes HaCaT cells from UVA-induced oxidative stress damage by downregulating Keap1 expression. *European Journal of Pharmacology*, v. 650, p. 130–137, 2011.

LOWRY, O. H. ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265-275, 1951.

LU, C-Y.; LEE, H-C.; FAHN, H-J.; WEI, Y-H. Oxidative damage elicited by imbalance of free radical scavenging enzymes is associated with large-scale mtDNA deletions in aging human skin. *Mutation Research*, v.423, p. 11–21, 1999.

MA, Y-S.; WU, S-B.; LEE, W-Y.; CHENG, J-S.; WEI, Y-H. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1790, p. 1021–1029, 2009.

MACHIAH, D. K.; GIRISH, K. S.; GOWDA, T. V. A glycoprotein from a Folk Medicinal Plant, *Withania somnifera*, Inhibits Hyaluronidase Activity of Snake Venoms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 143, p. 158-161, 2006.

MAITY, N.; NEMA, N. K.; ABEDY, M. K.; SARKAR, B. K.; MUKHERJEE, P. K. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 137, p. 1300-1305, 2011.

MALPEZZI, E. I. L.A.; FREITAS, J. C.; MURAMOTO, K.; KAMIYA H. Characterization of peptides in sea anemone venom collected by a novel procedure. *Toxicon*, v. 31 n.7 p. 853-864, 1993.

MARCHESAN, E. D.; FERRONATO, R.; BEDNARSKI, F.; ALENCAR, S.M.; ONOFRE, S. B. Ação dos oleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae) sobre a atividade hialuronidase. *Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama*, v.10, n. 2, p.63-66, mai./ago, 2006.

MARKS, M. S.; SEABRA, M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 2, p. 738-748, 2001.

MATOS, M. J.; SANTANA, L.; URIARTE, E.; DELOGU, G.; CORDA, M.; FADDA, M. B.; ERA, B.; FAIS, A. New halogenated phenylcoumarins as tyrosinase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 21, p. 3342–3345, 2011.

MIO, K.; STERN, R. Inhibitors of the Hyaluronidases. *Matrix Biology*, v. 21, p. 31-37, 2002.

MIO, K.; CARRETTE, O.; MAIBACH, H. I.; STERN, R. Evidence That the Serum Inhibitor of the Hyaluronidases May Be a Member of the Inter- $\alpha$ - Inhibitor Famil. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 275, n. 42, p. 32413-32421, 2000.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarín Journal of Science and Technology*, v.26, p. 211-216, 2004.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. da; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 84, n. 6, 2009.

NARDIN, P.; GUTERRES, S.S. Alfa-Hidroxiácidos: Aplicações Cosméticas e Dermatológicas. *Caderno de Farmácia*, v. 15, n. 1, p. 7-14, 1999.

NAKAYAMA, G. R.; CATON, M. C.; NOVA, M. P.; PARANDOOSH, Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *Journal of Immunological Methods*, v. 204, p. 205–208, 1997.

NEMA, N. K.; MAITY, N.; SARKAR, B.; MUKHERJEE, P. K. *Cucumis sativus* fruit-potential antioxidant, anti-hyaluronidase, and anti-elastase agent. *Archives of Dermatological Research*, v. 303, p. 247–252, 2011.

NERYA, O.; MUSA, R.; KHATIB, S.; TAMIR, S.; VAYA, J. Chalcones as potent tyrosinase inhibitors: the effect of hydroxyl positions and numbers. *Phytochemistry*, v. 65, p. 1389–139, 2004.

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

OH, J-H.; KIM, Y. K.; JUNG, J-Y.; SHIN, J-E.; KIM, K. H.; CHO, K. H.; EUN, H. C.; CHUNG, J. H. Intrinsic aging- and photoaging-dependent level changes of glycosaminoglycans and their correlation with water content in human skin. *Journal of Dermatological Science*, v. 62, p. 192-201, 2011.

OH, E. Y.; JANG, J. Y.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. W.; CHOI, B. T. Inhibitory effects of 1-*O*-methyl-fructofuranose from *Schisandra chinensis* fruit on melanogenesis in B16F0 melanoma cells. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, n. 1, p. 219–224, 2010.

OLIVEIRA, N. S. M. **Avaliação da atividade antioxidante e efeito sobre a melanogênese de extratos das folhas de *Passiflora nitida* Kunth.** 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus- Am.

PANICH, U. Antioxidant Defense and UV-Induced Melanogenesis: Implications for Melanoma Prevention. In: CAO, M. Y. (Ed.). **Current Management of Malignant Melanoma**, InTech, 2011. Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/current-management-of-malignant-melanoma/antioxidant-defense-and-uv-induced-melanogenesis-implications-for-melanoma-prevention>>. Acesso em: 25 mar 12.

PARKA, K-T.; KIMB, J-K.; HWANGA, D.; YOOA, Y.; LIMA, Y-H. Inhibitory effect of mulberroside A and its derivatives on melanogenesis induced by ultraviolet B irradiation. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 12, p. 3038–3045, 2011.

PERES, P.S.; TERRA, V.A.; GUARNIER, F.A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L. Photoaging and chronological aging profile: Understanding oxidation of the skin. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 103, p. 93–97, 2011.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 2008.

QUINN, A. Biology of the skin and dermatological disease. **Medicine Basic Science**, v.32, n. 12, p. 1-3, 2004.

RATNAM, D. V.; ANKOLA, D. D.; BHARDWAJ, V.; SAHANA, D. K.; RAVI KUMAR, M. N. V. Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: A pharmaceutical perspective. **Journal of Controlled Release**, v. 113, p. 189–207, 2006.

RAWLINGS, A.V.; MATTS, P.J.; ANDERSON, C.D.; ROBERTS, M.S. Skin biology, xerosis, barrier repair and measurement. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 5, n. 2, 2008.

REISSIG, J. L.; STROMINGER, J. L.; LELOIR, L. F. A Modified Colorimetric Method For The Estimation of N-Acetylmino. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 217, p. 959-966, 1955.

RHO, H. S., BAEK, H. S., AHN, S. M., KIM, D. H., CHANG, I. S. Synthesis of New Anti-melanogenic Compounds Containing Two Molecules of Kojic Acid. **Bull. Korean Chem. Soc.** 29, 8, 2008.

RIBEIRO, R. I. M. A.; JÚNIOR, P. C. B.; CARDOSO, S. V.; CANDELORI, I.; ESPÍNDOLA, F. S.; CASSALI, G. D.; LOYOLA, A. M. Expressão de metaloproteinases de matriz e de seus inibidores teciduais em carcinomas basocelulares. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 44, n. 2, p. 115-121, 2008.

RITTIÉ, L.; FISHER, G. J. UV-light-induced signal cascades and skin aging. *Ageing Research Reviews*, v. 1, p. 705–720, 2002.

RYOO, I-J.; MOON, E-Y.; KIM, Y-H.; LEE, I-S.; CHOO, S-J.; BAE, K.; YOO, I-D. Anti-Skin Aging Effect of Syriacusins from *Hibiscus Syriacus* on Ultraviolet-Irradiated Human Dermal Fibroblast Cells. *Biomolecules & Therapeutics*, n. 18, v. 3, p. 300-307, 2010.

RODRIGUES, A. P. D.; CARVALHO, A. S. C.; SANTOS, A. S.; ALVES, C. N.; NASCIMENTO, J. L. M.; SILVA, E. O. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biology International*, n. 35, p. 335–343, 2011.

ROSE, P. T. Pigmentary Disorders. *Medical Clinics of North America*, v. 93, p. 1225–1239, 2009.

SATOOKA, H.; KUBO, I. Resveratrol as a kcat type inhibitor for tyrosinase: Potentiated melanogenesis inhibitor. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 20, p. 1090–1099, 2012.

SBARDELLA, D.; FASCIGLIONE, G. F.; GIOIA, M.; CIACCIO, C.; TUNDO, G. R.; MARINI, S.; COLETTA, M. Human matrix metalloproteinases: An ubiquitous class of enzymes involved in several pathological processes. *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, p. 119-208, 2012.

SCHANTÉ, C. E.; ZUBER, G.; HERLIN, C.; VANDAMME, T. F. Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 85, p. 469-489, 2011.

SCHARFFETTER-KOCHANÉK, K.; BRENNEISEN, P.; WENK, J.; HERRMANN, G.; MA, W.; KUHR, L.; MEEWES, C.; WLASCHEK, M. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. *Experimental Gerontology*, v.35, p. 307–316, 2000.

SCHALLREUTER, K. U.; KOTHARI, S.; CHAVAN, B.; SPENCER, J. D. Regulation of melanogenesis – controversies and new concepts. *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 395-404, 2007.

SCHROEDER, P.; GREMMEL, T.; BERNEBURG, M.; KRUTMANN, J. Partial deletion of mitochondrial DNA from human skin fibroblasts induces a gene expression profile reminiscent of photoaged skin. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 128, p. 2297–2303, 2008.



SHETH, V. M.; PANDYA, A. G. Melasma: A comprehensive update: Part I. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 65, p. 689–697, 2011.

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

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A. M; VON DEN HOFF, J. W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Bio Techniques*, v 38, p 73-83, 2005.

SORI, T.; NATH, A. K.; THAPPA, D. M.; JAISANKAR, T. J. Hypopigmentary disorders in children in south India. *Indian Journal of Dermatology*, v. 56, n. 5, p. 546–549, 2011.

SPENCERI, E. A. Disorders of pigmentation. *Facial Plastic Surgery Clinics of North America*, v. 11, p. 209-217, 2003.

SPICKENREITHER, M.; BRAUN, S.; BERNHARDT, G.; DOVE, S.; BUSCHAUER, A. Novel 6-O-Acylated Vitamin C Derivatives as Hyaluronidase Inhibitors with Selectivity for Bacterial Lyases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 16, n. 20, p. 5313-5316, 2006.

STANIFORTH, V.; HUANG, W-C.; ARAVINDARAMA, K.; YANG, N-S. Ferulic acid, a phenolic phytochemical, inhibits UVB-induced matrix metalloproteinases in mouse skin via posttranslational mechanisms. *The Journal of Nutritional Biochemistry, In Press*, 2011. Doi: 10.1016/j.jnutbio. 2011.01.009

TAÏEB, A.; BORALEVI, F. Hypermelanoses of the Newborn and of the Infant. *Dermatologic Clinics*, v. 25, p. 327-336, 2007.

TAKAHASHI, T.; IKEGAMI-KAWAI, M.; OKUDA, R.; SUZUKI, K. A fluorimetric Morgan–Elson assay method for hyaluronidase activity. *Analytical Biochemistry*, v. 322, p. 257–263, 2003.

THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 9, 2009.

TOMITA, Y. M. K.; TAGAMI, H. Melanocyte-stimulating properties of arachidonic acid metabolites: possible role in postinflammatory pigmentation. *Pigment Cell Research*, v. 5, p. 357–361, 1992.

TSURUTA, D.; GREEN, K. J.; GETSIOS, S.; JONES, J. C. R. The barrier function of skin: how to keep a tight lid on water loss. *TRENDS in Cell Biology*, v. 12, n. 8, 2002.

TZAPHLIDOU, M. The role of collagen and elastin in aged skin: an image processing approach. *Micron*, v. 35, n. 3, p. 173–177, 2004.

TZELLOS, T. G.; BATZIOS, S. P.; DIONYSSOPOULOS, A.; KARAKIULAKIS, G.; PAPAKONSTANTINOY, E. Differential expression of matrix metalloproteinases and proteoglycans in Juvenile Hyaline Fibromatosis. *Journal of Dermatological Science*, v. 61, p. 94-100, 2011.

VAN WART, H.E.; STEINBRINK, D.R. A continuous spectrophotometric assay for Clostridium histolyticum collagenase. *Anal Biochem*, 1981, 113:356-365 apud THRING, T. S. A.; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 9, 2009.

VILLAREAL, M. O.; HAN, J.; YAMADA, P.; SHIGEMORI, H.; ISODA, H. Hirseins inhibit melanogenesis by regulating the gene expressions of Mitf and melanogenesis enzymes. *Experimental Dermatology*, v. 19, p. 450–457, 2010.

WOLK, K.; WITTE, K.; SABAT, R. Interleukin-28 and Interleukin-29: Novel Regulators of Skin Biology. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v.30, n° 8, p. 617 – 628, 2010.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, n 22, 2007.

WU, L-C.; CHANG, L-H.; CHEN, S-H.; FAN, N-C.; HO, J-A. A. Antioxidant activity and melanogenesis inhibitory effect of the acetonc extract of Osmanthus fragrans: A potential natural and functional food flavor additive. *LWT - Food Science and Technology*, v. 42, p. 1513–1519, 2009.

YANG, Z.; ZHANG, Y.; SUN, L.; WANG, Y.; GAO, X.; CHENG, Y. An ultrafiltration high-performance liquid chromatography coupled with diode array detector and mass spectrometry approach for screening and characterising tyrosinase inhibitors from mulberry leaves. *Analytica Chimica Acta*, v. 719, p. 87–95, 2012.

YOUM, J-K.; JO, H.; HONG, J. H.; SHIN, D. M.; KWON, M. J.; JEONG, S. K.; PARK, B. D.; CHOI, E. H; LEE, S. H. K6PC-5, a sphingosine kinase activator, induces anti-aging effects in intrinsically aged skin through intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling. *Journal of Dermatological Science*, v. 51, p. 89-102, 2008

ZHONG, J.; HUA, N.; XIONG, X.; LEI, Q.; LI, L. A novel promising therapy for skin aging: Dermal multipotent stem cells against photoaged skin by activation of TGF- $\beta$ /Smad and p38 MAPK signaling pathway. *Medical Hypotheses*, v. 76, p. 343–346, 2011.

## APÊNDICE

### **1 – ARTIGO – Preparation and Characterization of Coordination Complex by Iron (III) and Copper (II) from Chelating Kojic–Lipid Conjugates 5–hydroxy–7–oleyl–4(1H)–pyrona and 5–hydroxy–7–lauroyl–4(1H)–pyrona: New perspectives enhanced cell permeability prodrugs with metal complex**

Antonio S.C. Carvalho <sup>a</sup>, Marcia Gleice Souza <sup>a</sup>, Fatima N. Nunes<sup>a</sup>, Eronildes A Dantas <sup>b-</sup>,

Alberdan S. Santos <sup>a, \*</sup>

Raquel C. Montenegro<sup>c</sup>.

Marne C. Vasconcellos<sup>d</sup>. Emerson Silva Lima<sup>d</sup> e Tatiana do Nascimento Pedrosa<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Laboratório de Investigação Sistemática e Biodiversidade Molecular. Av. Augusto Corrêa 01, 66075-110, Belém, PA, Brasil;

<sup>b</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Grupo de Espectrometria Analítica e Aplicada. Av. Augusto Corrêa 01, 66075-110, Belém, PA, Brasil.

<sup>c</sup> Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências Biológicas, Laboratório de Citogenética Humana. Av. Augusto Corrêa 01, 66075-110, Belém, PA, Brasil.

<sup>d</sup> Universidade Federal do Amazonas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Atividade Biológica. Rua Alexandre Amorim, 330, 69010-300, Manaus, AM, Brasil.

\* To whom correspondence should be addressed. E-mail: [alberdan@ufpa.br](mailto:alberdan@ufpa.br)

*FAX: +55 91 3201 1635*

**Abstract**

Kojic-Lipid Conjugates or lipidic prodrugs of kojic acid are molecules have the bioactive covalently bound to a lipid moiety such as a fatty acid. We report herein the convenient procedures for the obtaining of complex coordination from 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona and 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona with cooper and iron. The products were characterized by UV-Vis, FTIR,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy and ESIMS spectra. The Kojic-Lipid Conjugates and their new coordination derivatives were evaluated as antimicrobial activity using the disk diffusion method. The results confirmed the increased antimicrobial activity in relation to increased lipophilicity as described in the literature. Future studies on biological properties of derivatives and their coordination complexes may lead to the development of a new class of specific and effective pharmaceutical agents.

**Key words:** Kojic-lipid conjugates, Chelating, Complex Coordination, Iron, Copper, Antimicrobial Activity.

## Introduction

Kojic–Lipid Conjugates (KLC's) or lipidic prodrugs of kojic acid (5-hydroxy-2-hydroxymethyl-4H-pyran-4-one), are molecules have the bioactive covalently bound to a lipid moiety such as a fatty acid. Lipidic prodrugs have been prepared modifying pharmacokinetic behavior of the bioactive, in order to take advantage some physic–chemical and biochemistry characteristics similar to those of natural lipids [1,2]. However, KLC's has synthesized to improve the lipophilic and instability properties of kojic acid, present a suitable and excellent effects in whitening the skin, anti-suntan effect, excellent stability to pH, heat and light thus resulting in an excellent storability and oil solubility that can be more easily absorbed into the skin when it is incorporated in a cream [3–5]. Research to KLC's are attractive products, widely used as a skin whitening agent in cosmetic applications [5,6] and great potential of application in other technological areas.

Kojic acid is a bioactive metabolite produced from carbohydrate sources in an aerobic process by a variety of fungi, in general, species *Aspergillus* spp. and widely used as a food additive for preventing enzymatic browning of raw crabs and shrimps, and as a cosmetic agent for skin whitening, based on its excellent inhibitory on the polyphenol oxidase as *tyrosinase* [7]. On the other hand, kojic acid is studied extensively because it forms complexes with various metal ions. The synthesis and selective functionalization of kojic acid have been the focus of active research over the years, mainly, because it presents some biological functions such as antimicrobial activity [8,9], inhibitory activity toward tyrosinase [10] and development of inhibitors to modulate matrix metalloproteinases activity [11,12]. The ability to act as a bidentate ligand (**Scheme I**) can be explained by the zwitterionic pseudoaromatic character of the heterocyclic system and the metal ion is embedded in a 5-membered ring structure, known for its thermodynamic stability at

physiological pH values [13]. Several studies show the formation of coordination complexes by kojic acid and analogues (Table 1). On the other hand pyrone-based complexes can act as a metal ion source, due to their weaker bidentate binding, and have potential for the delivery and release of metals, fine-tunable by the substitution pattern of the pyrone backbone. The coordination complexes of kojic acid show some improvement in their biological properties such with copper (II) activity antifungal [8], iron (III) present photoprotection activity [29], with manganese ion neuroprotective activity [17] and radioprotective activity [30], and with vanadium anti-diabetic drugs [31]. This metabolite is produced in our laboratory in routine using *A.flavus* IOC3974 as biological agent in this process. Recently, was shown the possibility of using the kojic acid as an agent leishmanial [32].

#### **Insert Scheme I**

The hydroxyl group at the C-5 position of kojic acid is essential to the occurrence of radical scavenging activity. Chelating Kojic–Lipid Conjugates (CKLC's) is achieved through to esterify the hydroxyl group at the C-7 position of kojic acid by a chemical catalyst [33,34] or enzymes-catalyzed reactions [35,36]. These comprise higher intermediate stability, which inhibits immediate hydrolysis and the complexes are neutral which allows passive diffusion through lipophilic membranes; and the pyrone ligands themselves are not toxic. Literature reveals that chelating ability of metal ions of kojic acid and their analogues are widely used as *O,O*-chelating ligands due to their high affinity towards metal ions and the stability of the formed complexes has an important factor for antimicrobial activity in medicinal chemistry applied [11].

#### **Insert Table 1**

Fine control on hydrophilic/lipophilic balance can be achieved by simply introducing appropriate substituent on the fatty acid group without significantly changing its chelating

properties. Studies are rare or nonexistent in the literature demonstrating the potential of biological of CKLC's 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona and 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona, so also derivatives of coordination complexes. Improvement of our knowledge on biological processes involving interplay of reactive oxygen and nitric oxide species with complex coordination CKLC is essential for design and tuning of artificial systems for medical, industrial and environmental applications. In this context, the objective was to obtain and characterized by UV/Visible Spectrophotometry, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR),  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy of the complex coordination of prodrugs with iron and copper ions. The Kojic-Lipid Conjugates and their new coordination derivatives were evaluated as antimicrobial activity using the disk diffusion method.

## Experimental

### *General*

Within the scope of the present study an methodology summary used of the steps undertaken to obtain the substance is shown in **Scheme 2**. kojic acid was produced in Lab ISis Bio through biotechnological process according to methodology described by Ferreira et al. [37]. Two CLKC's of kojic acid substituted 4H-pyran-4-one in hydroxyl of C-7 derivatives were synthesized as oleyl and lauroyl chloride derivatives. CKLC's were obtained by chemical process with oleyl and lauroyl chlorides second method described in literature [33]. Has confirmed here about the esterification of the primary hydroxyl group at C-7 position of kojic acid through spectroscopic analysis (UV-Vis, FTIR,  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy and ESIMS spectra), and data were compared with other works of literature. The coordination complexes were obtained by reaction, at room temperature, between CKLC's and copper salts and iron. The structure characterized of complex coordination of CKLC's been



confirmed by the FTIR spectra. The Kojic-Lipid Conjugates and Their Coordination new derivatives were evaluated for antimicrobial activity using the disk diffusion method using the methodology described in the literature.

### Insert Scheme 2

#### *Physico-chemical measurement*

$^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  spectra were recorded in a Varian spectrometer model Mercury plus BB at 300 MHz and 75.5 MHz, respectively, with DMSO-*d*<sub>6</sub> as solvent and TMS as the internal standard. Electrospray ionization Mass spectra (EISMS) spectra were recorded in a Shimadzu . IR spectra were recorded on a model of Nicolet and Thermo Electron EZOMNC 32 computer system. UV-Vis spectra were recorded GENESYS 10 spectrophotometer. TLC plates (Merck silica gel 60-GF254) were developed with hexane and ethyl acetate (Merck, Darmstadt, Germany) as the mobile phase for 10X20 cm. The plates were visualized under UV light (254 nm) and under natural light after development. The plate was then developed with solvent hexane/ethyl acetate, 75:30, v v<sup>-1</sup>. Upon drying, the plate was sprayed with a 2% hydrochloric acid solution of ferric chloride, which permitted detection of the monoesters by color spots. Solvents were reagent grade and, in most cases, dried and distilled before use according to standard procedures.

#### *General procedure by obtention of kojic acid (1)*

The kojic acid was produced by *A. flavus* IOC3974 in a submerged cultivation in the Czapek modified with 12 % m/v of sucrose and carbon / nitrogen ratio of 200. The maximum yield obtained was 2.5% m/v of HMP in the culture at the fourteenth day<sup>20</sup>. After lyophilization, the extraction was performed with ethyl acetate: ethanol (1:1) and recrystallization with acetone and hexane (1:1), the product was purified by High performance preparative thin layer chromatography (HPPTLC) with 95% m/m of recovery.

*5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona (2)*

The esterification of the hydroxylat C7 of HMP(Fig. 1) was reach out by reaction with acyl chloride**21**. There action formation of reactive oleyl chloride was made by mixing 10 mmol of oleic acid with 3 mmol of an hydrous zinc chloride in a oil bath kept at reflux at 140 °C under stirring for 40 minutes. After the procedure 1.5 mmolof kojic acid was added and the reaction was kept under the same initial conditions for 2.5 hours. The extraction was made after 12 h of overnight, the mixture was washed with water and the ester swere extracted with ethyl ether. After neutralization with sodium bicarbonate, the product was recrystallized withethy lether. The formation of the reaction product was observed on plates of thin layer chromatography (TLC), silicagel GF254, developed in mixture of hexane/ethyl acetate (6:4) with standard reagents. The TLC plates were observed under ultraviolet radiation. The spots observed were: Rfequalto0.31. In this systemtheRf valuesobservedwerezero fortheHMP, 0.31forthe**3a**, 0.62 foroleicacid standardand 0.92 for triglyceride residues after revelation with iodine vapors, as shown in figure. Yield: 25%. 0.84–0.88 (3H, *t*, *J* = 10.6 Hz, CH<sub>3</sub>), 1.25–1.29 [22H, *m*, (CH<sub>2</sub>)*n*], 1.98–2.0 (4H, *m*, H<sub>2</sub>C=CCH<sub>2</sub>), 2.35–2.40 (2H, *t*, *J* = 12.4 Hz, COCH<sub>2</sub>), 4.91 (2H, *s*, α-CH<sub>2</sub>), 5.31–5.35 (2H, *m*, HC=CH), 6.46 (1H, *s*, 3-CH), 7.81 (1H, *s*, 6-CH).

*5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona(3)*

The compound 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona was obtained usingthe same procedure described forcompound **2**. After Thereactionformation ofreactive lauroyl chloride was added 1.5mmolof kojic acid and the mixture was washedwithwaterandtheesterswere extractedwithethylether. Yield: 27%. The recrystallized product was analyzed by <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>, TMS, 298 K): δ=0.88 (12'-Me, 3H, *t*, *J* = 6.7Hz); 1.26 (4'-11'-H, 16H,

m); 1.65 (3'-H, 2H, m), 2.40 (2'-H, 2H, t,  $J = 7.5\text{Hz}$ ); 4.93 (7-H, 2H, s); 6.50 (3-H, 1H, s); 7.85 (6-H, 1H, s).

The percentage yield of the synthesis was approximately 80% at 1–2 molar ratio of kojic acid to oleic acid. The maximum UV–vis absorbance peaks of the product in methanol were 251.50 and 212.0 nm.

FAB–MS found peak at 407, which was a molecular weight of  $\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{O}_5$  (cal. 406.57). The  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) information was  $\delta$ : 0.90 (3H, br), 1.26 (2H, d), 1.68 (2H, m), 2.01 (2H, br), 2.37 (2H, t), 4.91 (2H, s), 5.36 (2H, t), 6.47 (1H, s), 7.85 (1H, s).

The entrapment of kojic oleate in bilayer vesicles A. Manosroi [a,b,\\*](#), P. Wongtrakul [c](#), J.

Manosroi [a,b](#), U. Midorikawa [d](#), Y. Hanyu [d](#), M. Yuasa [d,e](#), F. Sugawara [d](#), H. Sakai [d,e](#), M.

Abe

#### *Coordination complex of 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona with copper (II)(2a)*

The organocopper(II) complex of 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona was obtained by mixing with aqueous solution copper acetate in 2:1 ligand-to-metal molar ratio amounts of refluxing and stirring for 30 minutes in hexane. The organic phase was washed with water to remove excess free ions and then dried *in vacuo*. Complexes **2a** forest-green color was obtained after evaporation of the residual hexane. Yield: 86%.

#### *Coordination complex of 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona with iron (III)(2b)*

The organoiron(III) complex of 5-hydroxy-7-oleyl-4(1H)-pyrona was obtained by mixing with aqueous solution iron (III) chloride in 3:1 ligand-to-metal molar ratio amounts of refluxing and stirring for 30 minutes in hexane. The organic phase was washed with water to remove excess free ions and then dried *in vacuo*. Complexes **2b** blood-red color was obtained after evaporation of the residual hexane. Yield: 72%.

*Coordination complex of 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona with copper (II)(3a)*

The organocopper(II) complex of 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona was obtained using the same procedure described for compound **2a**. Yield: 82%.

*Coordination complex of 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona with iron (III) (3b)*

The organoiron(III) complex of 5-hydroxy-7-lauroyl-4(1H)-pyrona was obtained using the same procedure described for compound **2b**. Yield: 70%.

## Biological Activities

### *Antimicrobial activity*

Antimicrobial activities of **two CKLC's prodrugs and Complex coordination** samples were investigated by the disc diffusion method. One microlitre were injected into sterilized discs of 6 mm in diameter. In addition, Sulphamethoxazole (23.75 µg)/Trimethoprim (1.25 µg), Sulbactam (10 g)/Ampicillin (10 µg), Amoxicillin (25 µg), Nalidixic acid (30 µg) and Nystatin (100U) were used as positive reference standards to determine the sensitivity of the tested strains. Samples esters and complex coordination were suspended into 0.1% bacteriological agar (Difco) in different concentrations and used for the disc diffusion test. 0.1% agar was used as negative control. The test bacteria were incubated at 35°C for 24 h in nutrient broth (Difco) and the yeasts were incubated in Sabouraud dextrose broth (Difco) for 24 h. One hundred microlitre of suspension containing 10<sup>6</sup> CFU/mL of bacteria and 10<sup>5</sup> CFU/mL of yeast were placed into sterile petri dishes (90 mm). Mueller Hinton agar (MHA) (Oxoid) and Sabouraud dextrose agar (SDA) sterilized in a flask and cooled to 45°C were distributed to petri dishes containing bacteria and yeasts respectively. Samples esters and complex coordination containing discs were located on the solid agar medium by pressing slightly. Plates were kept at 4°C for 2 h and then incubated at 35°C for 24 h for bacteria and

48 h for yeasts. The results were recorded by measuring the zones of growth inhibition surrounding the discs. All experiments were done in triplicate. Gram positive, gram negative bacteria and yeast like fungi were used for antimicrobial activity studies. Gram positive bacteria were *Staphylococcus aureus* (CCBH 4395), *Enterococcus faecalis* (CCBH 5069). Gram negative bacteria were *Stenotrophomonas maltophilia*(CCBH 4011), *Proteus mirabilis* (ATCC 15290), *Klebsiella pneumoniae* (CCBH 3858), *Burkholderia cepacia* (CCBH 4920), *Pseudomonas aeruginosa* (CCBH 3856) . Yeast like fungi used were *Candida albicans* (IOC 2585), *C. parapsilosis* (IOC 2882), *C. tropicalis* (IOC 3610) and *C. guilliermondi* (IOC 2882).

**Cytotoxicity against cancer cell lines.** Compounds (0.009 – 25 µg/mL) were tested for cytotoxic activity against two cancer cell lines: B16F10 (Murine Melanoma) and ACP-02. All cell lines were maintained in DMEM 1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. Each compound was dissolved with DMSO to obtain a concentration of 1mg/mL. The final concentration of DMSO in the culture medium was kept constant, below 0.1% (v/v). Compounds were incubated with the cells for 72 hours and the Alamar Blue™ assay was performed (Ahmed *et al.*, 1994). The negative control received the same amount of DMSO (0.001% in the highest concentration). Doxorubicin was used as a positive control. One hour before the end of the incubations, 20 µL of Alamar Blue™ was added to each well. The fluorescent signal was monitored using a multiplate reader using 530-560 nm excitation wavelength and 590 nm emission wavelength. The fluorescent signal generated from the assay was proportional to the number of living cells in the sample, according to manufacture.

**Cell Membrane Disruption.** The test was performed in 96-well plates using a 2% mouse erythrocyte suspension in 0.85% NaCl containing 10 mM CaCl<sub>2</sub>. The compounds diluted, as

mentioned above, were tested at 250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . DMSO was used as a negative control and Triton X-100 (1%) was used as positive control. After incubation at room temperature for 1h and centrifugation, the supernatant was removed and the liberated hemoglobin was measured spectrophotometrically at 540 nm.

***Tyrosinase inhibitory assay.*** Tyrosinase inhibitory activity was measured by the method described by Chan et al., 2008, using L-DOPA (dihydroxyphenilalanine) as substrate, with some modifications. Briefly, 50 $\mu\text{L}$  of the tested samples (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 0.175M phosphate buffer pH 6.8 of each compound and Kojic Acid) was mixed with 10 $\mu\text{L}$  of 0.175M phosphate buffer (pH6.8), 20 $\mu\text{L}$  of 110U/mL mushroom tyrosine, and 20 $\mu\text{L}$  of L-DOPA (5mM). The assay mixture was incubated at 25°C for 2 min. The amount of dopachrome in the reaction mixture was measure as the absorbance at 475 nm. The plate was incubated for 5 minutes at 37 ° C and were then added 100 mL of color reagent L-DOPA immediately proceeding the reading in microplate reader. The plate was incubated at 37 ° C and read every 5 minutes for 20 minutes, where we obtained the final absorbance (A<sub>2</sub>) measured on the same wavelength. As a positive control we analyzed the kojic acid prepared in the same way as test samples. The IC<sub>50</sub> was obid sigmoidal regression from graphs plotted using the Origin 6.0 program. The points plotted correspond to the percentages of inhibition of each triplicate analyzed (Hearind, 1987).

## Results and Discussion

### *Infrared spectra*

### *NMR spectra*

### *UV/Vis spectra*

### *ESIMS spectra*

### *Antimicrobial activity*

### *Citotoxicity assays*

In B16F10 cells (melanoma), ACP02 (gastric adenocarcinoma) and murine erythrocytes, the kojic acid derivatives did not cause cytotoxicity. In alamar blue assay the IC<sub>50</sub> were major that 25 µg/mL and hemolysis test the IC<sub>50</sub> were major that 250 µg/mL. These results demonstrated that the substances do not have cytotoxicity related to inhibition of cell proliferation and ability to induce lyses of mouse erythrocytes demonstrated that no membrane damage was found, data not show.

### *Tyrosinase inhibition*

To analyze the mechanism with kojic acid derivatives inhibited melanogenesis biosynthesis, we examined the inhibitory effect of derivatives on tyrosinase using mushroom-derived tyrosinase. Table 5 and Figure 5 clearly showed inhibitory effects on tyrosinase activity by derivatives.

## Conclusions

So strategies of structural modification of bioactive to improve membrane permeability, through passive transport, play an important role in the development of these molecules delivery systems based on their lipophilicity and resemblance to lipids in biological membranes applied in modern medicinal inorganic chemistry.

## Acknowledgements

The authors are grateful to FAPESPA, CAPES and CNPq for the financial support and the scholarship. Also are thankful to FIOCRUZ for the microorganism strains.

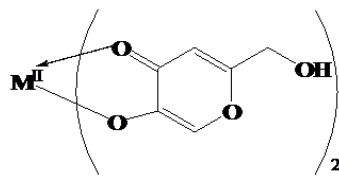
## References

- [1] D. M. Lambert, *Eur. J. Pharm. Sci.* 11(2) (2000) S15–S27.
- [2] V. J. Stella, K. W. Nti-Addae, *Adv. Drug Delivery Rev.* 59 (2007) 677–694
- [3] K. J. Liu, J. F. Shaw, *J. Am. Oil Chem. Soc.* 75 (1998) 1507–1511.
- [4] C-S. Chen, K-J.Liu, Y-H. Lou, C-J Shieh *J Scie Food Agric* (2002) 82 601-605
- [5] S. E. Ashari, R. Mohamad, A Ariff, M. Basri, A. B. Salleh, *J. Oleo Sci.* 58, (10) (2009) 503–510.
- [6] N. H. Kamarudin, M. Basri, G. Cheng Lian, A. B. Salleh, R. N. Z. Abdul Rahman, A. Ariff, R. Mohamad, *J. Oil Palm.* 20, (2008) 461–468.
- [7] R. Mohamad, M. S. Mohamed, N. Suhaili, M. M. Salleh, A. B. Ariff, *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.* 5 (2) (2010) 24 – 37
- [8] S. Balaz, M. Uher, J Brtko, M. Veverka, J. Bransova, J. Dobias, M. Podova, J. Buchvald, *Folia Microb.* 38 (5) (1993) 387–391
- [9] M. D. Aytemir, B. Özçelik *Eur. J. Med. Chem.* 45 (2010) 4089–4095
- [10] S-Y. Kwak, J-M. Noh, S-H. Park, J-W. Byun, H-R. Choi, K-C.Park, Y-S. Lee *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20 (2010) 738–741
- [11] Y-L. Yan, M. T. Miller, Y. Cao, S. M. Cohen *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 1970–1976
- [12] J. A. Jacobsen, J. L. Fullagar, M. T. Miller, S. M. Cohen *J. Med. Chem.* 2011, 54, 591–602
- [13] W. Kandioller, A. Kurzwernhart, M. Hanif, S. M. Meier, H. Henke, B. K. Keppler, C. G. Hartinger *J. Organomet Chem* xxx (2010) 1e12.
- [14] M. M. Finnegan, T. G. Lutz, W. O. Nelson, A. Smith, C. Orvig *Inorg. Chem Vol. 26, No. 13, 1987* 2171-2176
- [15] E. Malhotra, N. K. Kaushik, G. S. Sodhi *J. Therm. Anal. Cal., Vol. 65* (2001) 859.864
- [16] A. Synytsya, P. Blafková, A. Synytsya, J. Copíková, J. Speváček, M. Uher *Conjugation of kojic acid with chitosan Carbohydrate Polymers* 72 (2008) 21–31
- [17] O. Vajragupta, P. Boonchoong, Y. Sumanont, H. Watanabe, Y. Wongkrajang, N Kammasuda *Bioorg. Med. Chem.* 11 (2003) 2329–2337
- [18] S. S. Marwaha, J. Kaur, G. S. Sodhi *J. Inorg. Biochem.* 54,67-74 (1994)
- [19] M. Melchior, S. J. Rettig, B. D. Liboiron, K. H. Thompson, V. G. Yuen, J. H. McNeill, *C. Orvig Inorg. Chem.* 2001, 40, 4686-4690
- [20] C-M. Lee, C.-S. Hwang *J. Nano Bio. Tech.*, Vol 2, No 2, pp. 80-84 (2005)
- [21] M. C. Barret, M. F. Mahon, K. C. Molloy, J. W. Steed, P. Wright *Inorg. Chem.* 2001, 40, 4384-4388
- [22]. T. N. Aksamentova, N. N. Chipanina, M. G. Voronkov, E. A. Grebneva, A. I. Albanov, O. M. Trofimova, S. A. Mukha, and B. G. Sukhov *J Gener Chem*, 2009, Vol. 79, No. 1, pp. 98–103.

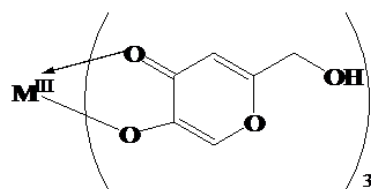


- [23] B. G. Sukhov, S. A. Mukha, I. A. Antipova, S. A. Medvedeva, L. I. Larina, Y. A. Grigorieva, A. I. Illarionov, A. A. Starchenko, F. Yu. Chuvashov, B. A. Trofimov, Mendeleev Commun., 2007, 17, 154–155
- [24] K. H. Thompson, J. Chiles, V. G. Yuen, J. Tse, J. H. McNeill, C. Orvig J. Inorg. Biochemistry 98 (2004) 683–690
- [25] S. Chaves, R. Jelic, C. Mendonça, M. Carrasco, Y. Yoshikawa, H. Sakurai, M. A. Santos Metallomics, 2010, 2, 220–227
- [26] V. G. Yuen, P. Caravan, L. Gelmini, N. Glover, J. H. McNeill, I. A. Setyawati, Y. Zbou, C. Orvig J. Inorg. Biochem. 1997 Nov 1;68(2):109–16.
- [27] J. L. Lamboy, A. Pasquale, A. L. Rheingold, E. Melendez Inorg. Chim. Acta 360 (2007) 2115–2120
- [28] F. E. Jacobsen, J. A. Lewis, K. J. Heroux, S. M. Cohen Inorg. Chim. Acta 360 (2007) 264–272
- [29] Sima, J.; Mikanova, J.; Veverka, M. *Monatsh Chem.* **1995**, 126, 149
- [30] Emami, S.; Hosseinimehr, S. J.; Taghdisi, S. M.; Akhlaghpour, S. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, 17, 45.
- [31] D'brooe W, Nikiforuk A, Kordowiak AM. *Pol J Pathol.* 2004;55:15–21.
- [32] Santos, A. S., Silva, E. O., Nascimento, J. L. M., Alves, C. N., Rodrigues, A. P. D., Carvalho, A. S. C. WO Patent 2010/017613/A1, 2010
- [33] I. Ichimoto, Y. Itaoka, C. Tatsumi, Agr. Biol. Chem. Tokyo 22, 841 (1965). S. Nagai, T. Izumi. United State Pat. 124115–124116 (1983).
- [34] A. Manosroi, P. Wongtrakul, J. Manosroi, U. Midorikawa, Y. Hanyu, M. Yuasa, F. Sugawara, H. Sakai, M. Abe, Inter. J. Pharm. 298 (2005) 13–25
- [35] T. Kobayashi, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, Biochem. Eng. J. 9 (2001) 85–89.
- [36] T. Raku, Y. Tokiwa *Biotechnology Letters* **25**: 969–974, 2003.
- [37] Ferreira, N. R.; Sarquis, M. I. M.; Alves, C. N.; Santos, A. S. *An. Acad. Bras. Cienc.* **2010**, 82, 569.
- [38] H. J. Zeringuea Jr, B. Y. Shiha, K. Maskosb, D. Grimm *Phytochemistry* 52 (1999) 1391±1397
- [39] C.A. Kingsbury, M. Clifton, J. H. Looker *J. Org. Chem., Vol. 41, No. 16, 1976* **2777**

## Scheme I.

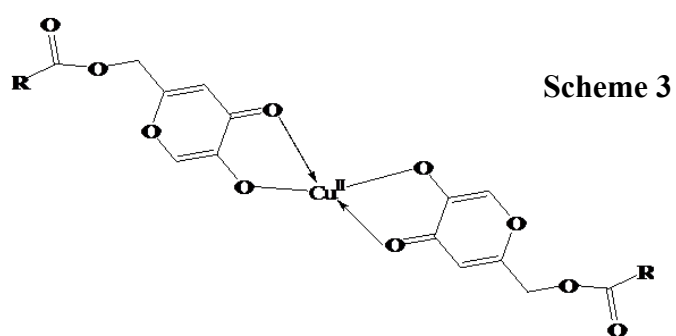
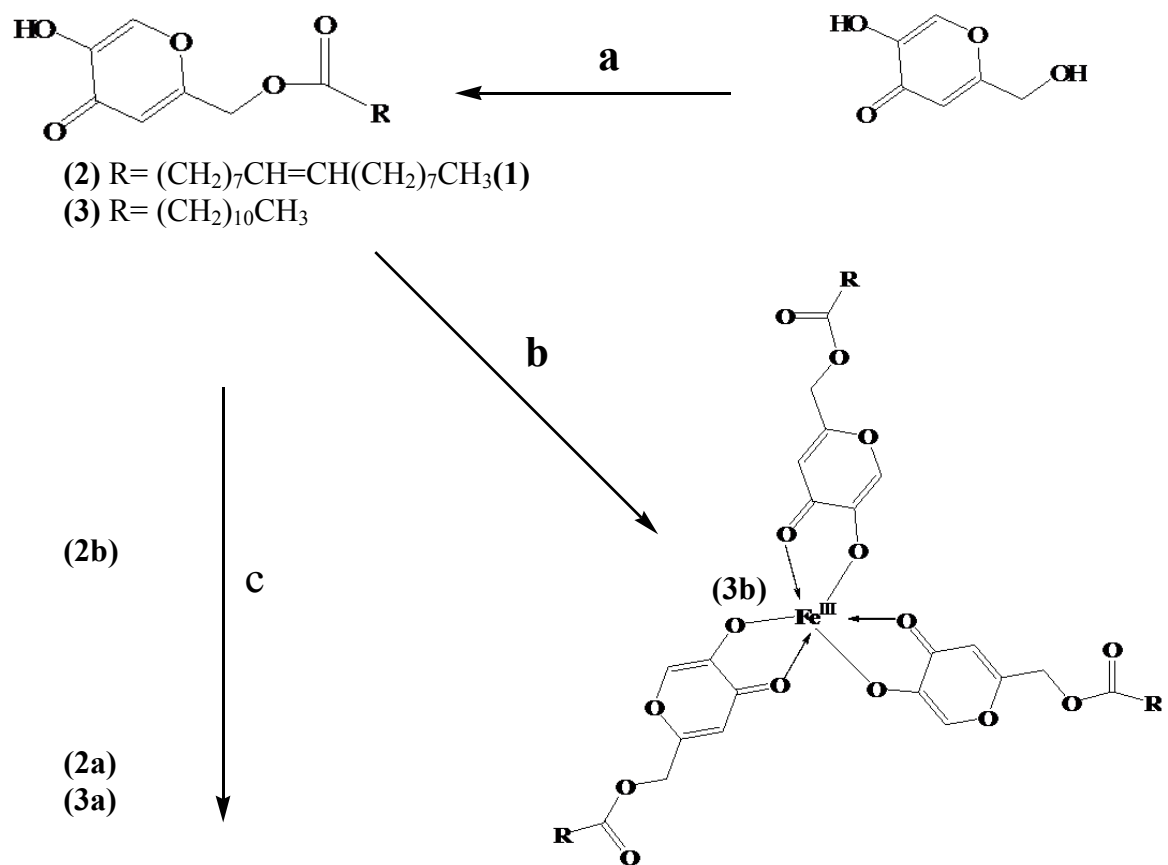


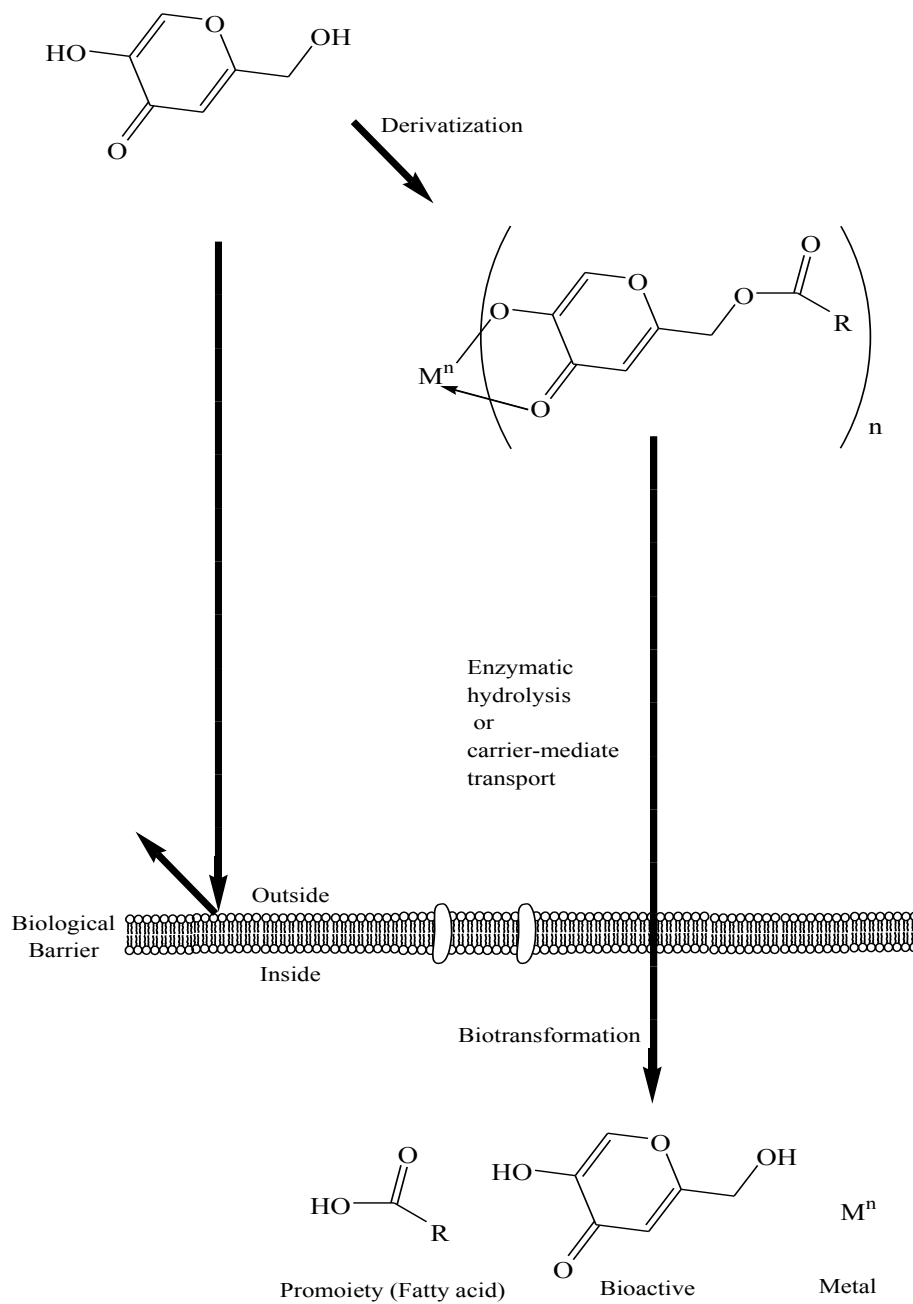
$M^I$  -Copper, Zinc, Manganese, Nickel, Tin, Cobalt, Oxovanadium



$M^{III}$  -Aluminum, Iron, Gallium

Scheme 2





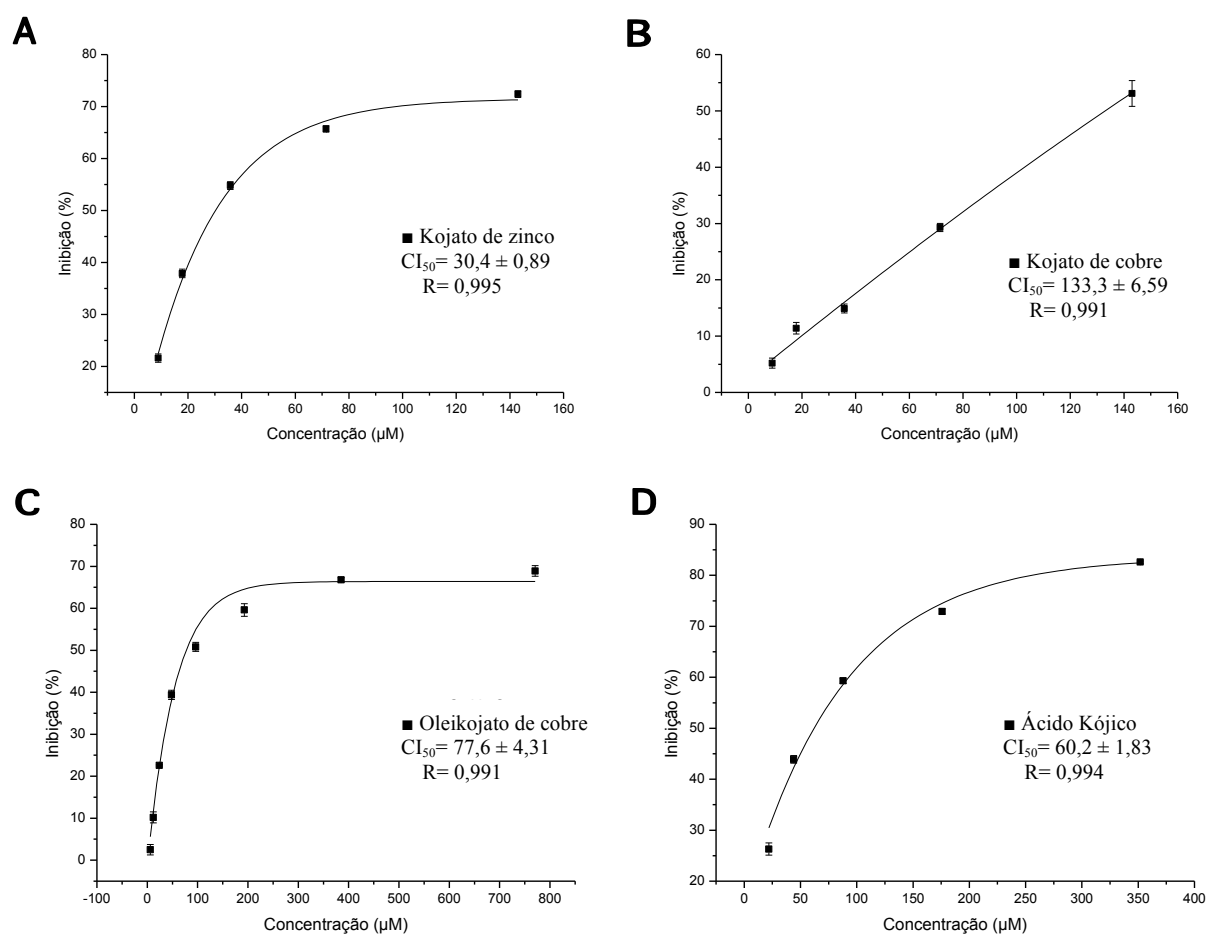
**Table 1.** Shift of (C=O) frequencies ( $\text{cm}^{-1}$ ) upon metal ion coordination *O,O*-chelating ligands group of Hydroxypyruone derivative.

Chelating	Metal (Nox)	Stretch $\gamma$ (C=O)		Reference
		Free ligand	Coordinated Ligand	
Kojic acid	Aluminium(III)	1.655, 1.610	1.615, 1.570	Finnegan et al.14
	Gallium(III)		1.615, 1.565	Finnegan et al.14
	Hafnium (IV)		1.530	Malhotra et al.15
	Iron(III)		1.556, 1.510	Synytsya et al.16
	Manganese(II)		1.627, 1.521	Vajragupta et al.17
	Mercury(II)		1.560	Marwaha et al.18
	Oxovanadium (IV)		1613, 1556	Melchior et al.19
	Oxovanadium (IV)		1610, 1550, 1500	Lee and Hwang20
	Tin(II)		1.572	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1.614, 1.578	Barret et al. 21
Chorokojic acid	Zinc(II)		1624, 1578	Lee and Hwang20
	Aluminium(III)	1.655, 1.625	1.575, 1.601	Finnegan et al.14
Kojic acid– phenylalanine amide	Gallium(III)		1.572, 1.615	Finnegan et al.14
	Copper(II)	1.678, 1.617	1.567, 1.513	Kwak et al.10
chitosan–kojic acid conjugates Maltol	Zinc(II)		1.581, 1.525	Kwak et al.10
	Iron(III)	1.650, 1.617	1.562, 1.512	Synytsya et al.16
	Aluminium(III)	1.650, 1.620	1.570, 1.610	Finnegan et al.14
	Aluminium(III)	1658, 1626	1.570	Aksamentova et al. 22
	Cadmium(II)		1610	Sukhov et al.23
	Calcium(II)		1615	Sukhov et al.23
	Chrome(III)		1.551	Thompson et al.24
	Cobalt(II)		1.602	Thompson et al.24
	Copper(II)		1.605, 1.569, 1509	Thompson et al.24
	Gallium(III)	1.650, 1.620	1.570, 1.610	Finnegan et al.14
Lead(II)		1600	Sukhov et al.23	

	Mercury(II)		1.560	Marwaha et al.18
	Molybdenum(II)		1616	Chaves et al.25
	Oxovanadium (IV)		1.610, 1.500	Yuen et al.26
	Oxovanadium (IV)		1606, 1571	Melchior et al.19
	Oxovanadium (IV)		1610, 1550	Lee and Hwang20
	Silicon(II)		1.558	Aksamentova et al. 22
	Tin(II)		1.570	Barret et al. 21
	Titanium (IV)		1620, 1586	Lambooy et al. 27
	Zinc(II)		1616	Chaves et al.25
	Zinc(II)		1.614, 1.578	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1614, 1578	Lee and Hwang20
Pyromeconic acid	Aluminium(III)	1.655, 1.620	1.560, 1.608	Finnegan et al.14
	Cobalt(II)		1544	Jacobsen et al.28
	Gallium(III)		1.550, 1.601	Finnegan et al.14
	Zinc(II)		1597	Jacobsen et al.28
Ethylmaltol	Oxovanadium (IV)		1600, 1567	Melchior et al.19
	Tin(II)		1.564	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1.595, 1.570	Barret et al. 21
Hinokitiol	Oxovanadium (IV)		1576	Lee and Hwang20
	Tin(II)		1.601	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1.595, 1.576	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1507, 1576	Lee and Hwang20
Tropolone	Cobalt(II)		1544	Jacobsen et al.28
	Oxovanadium (IV)		1500-600	Lee and Hwang20
	Tin(II)		1.593	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1.620, 1.582	Barret et al. 21
	Zinc(II)		1594	Jacobsen et al.28
	Zinc(II)		1595	Lee and Hwang20
3-hydroxy-2H- pyran-2-one	Zinc(II)		1543	Jacobsen et al.28
1,2-dimethyl-3- hydroxy-4- pyridinone	Molybdenum(II)		1.617	Chaves et al.25
	Oxovanadium (IV)		1606, 1550	Melchior et al.19
	Zinc(II)		1.605	Chaves et al.25

**Table 5.** Values of inhibition concentration in tyrosinase enzyme

<b>Substance</b>	<b>IC<sub>50</sub> [µg/mL]</b>
Kojato de Zinco	11.0 ± 0.98
Kojato de cobre	48.4 ± 2.09
S1C	< 100
S2A	< 100
S2B	< 100
S2X	< 100
S3A	< 100
Oleikojato de cobre	28.1 ± 0.88
S3B	< 100
Kojic acid	8.83 ± 0.22



**Figure 5.** Tyrosinase inhibitory activity in vitro of derivatives of kojic acid, A) Kojato Zinc B) Kojato copper C) Oleilkojato copper, and standard D) Kojic Acid. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation.



## 2 – Cronograma de Execução

ATIVIDADES	Março 2011	Abril 2011	Mai 2011	Junho 2011	Julho 2011	Agosto 2011	Setembro 2011	Outubro 2011	Novembro 2011	Dezembro 2011	Janeiro 2012	Fevereiro 2012	Março 2012	Abril 2012	Mai 2012	Junho 2012	Julho 2012	Agosto 2012	Setembro 2012	Outubro 2012	Novembro 2012	Dezembro 2012	Janeiro 2013	Fevereiro 2013
Revisão da literatura	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Aquisição de materias para testes							R	R					R	R	R						R			
Treinamento em cultura de células	R	R	R															R						
Triagem de substâncias			R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R											
Ensaio enzimáticos <i>in vitro</i>													R		R									
Ensaio de Atividade Antioxidante <i>in vitro</i>													R		R									
Avaliação da citotoxicidade dos derivados																		R	R	R				
Estágio Laboratório de Patologia - USP																		R	R	R	R	R		
Avaliação do efeito dos derivados sobre a melanogêse																			R	R				
Análise dos resultados												R	R				R	R	R	R	R	R	R	R
Aula de qualificação														R										
Elaboração da dissertação e artigo científico																							R	R
Defesa da dissertação																								R

R – Realizado;

### 3 – Equipe Científica

<b>Nome</b>	<b>Formação</b>	<b>Função no Projeto</b>
Tatiana do Nascimento Pedrosa	Farmacêutica (UFAM)	Executora
Marne Carvalho de Vasconcellos	Farmacêutica, Doutora em Farmacologia (UFC)	Orientadora
Emerson Silva Lima	Farmacêutico-Bioquímico, Doutor em Farmácia (USP)	Co-orientador
Alberdan Silva Santos	Engenheiro Químico, Doutor em Bioquímica (UFRJ)	Colaborador (UFPA)
Antônio Sérgio Costa Carvalho	Químico, Doutor em Química (UFPA)	Colaborador (UFPA)
Silvia Stuchi Maria-Engler	Bióloga, Doutora em Biologia Funcional e Molecular (UNICAMP), Livre-docência (USP)	Colaboradora (USP)
Marília de Arruda Cardoso Smith	Bióloga, Doutorado em Ciências Biológicas (USP), Livre-docência (UNIFESP)	Colaboradora (UNIFESP)
Danielle Queiroz Calcagno	Biomédica, Pós-doutoranda em Genética e Biologia Molecular (UNIFESP)	Colaboradora (UNIFESP)

#### **4 – Recursos financeiros**

- Esta dissertação foi realizada com recursos aprovados nos editais:
  - CNPq 2010 (Edital Universal);
  - FAPEAM 2009 (PPP 2009);
  - PROCAD – CNPq.