

ANA ALEXANDRA SANTOS LOPES

**INIBIDORES DE TIROSINASE E NOVAS TÉCNICAS
LABORATORIAIS DE SEPARAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS
BIOACTIVOS**

Orientadora: Prof.^a Doutora Marisa Helena Fonseca Nicolai

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE

Lisboa

2015

ANA ALEXANDRA SANTOS LOPES

**INIBIDORES DE TIROSINASE E NOVAS TÉCNICAS
LABORATORIAIS DE SEPARAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS
BIOACTIVOS**

Tese apresentada para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas no curso
de Mestrado Integrado em Ciências
Farmacêuticas conferido pela Universidade
Lusófona Humanidades e Tecnologias.

Orientadora: Professora Doutora Marisa
Helena Fonseca Nicolai

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS DA SAÚDE

Lisboa

2015

AGRADECIMENTOS

Uma palavra de apreço

No culminar destes anos de intenso trabalho e dedicação é com imensa satisfação e reconhecimento que aqui deixo uma palavra de sentido apreço a todos aqueles que me acompanharam e apoiaram na concretização deste trabalho.

Agradeço à Prof.^a Doutora Marisa Nicolai o empenho, a exigência e a dedicação que marcam de modo inquestionável a orientação deste projecto.

Agradeço também e especialmente à minha família e a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a progressão e conclusão deste meu objectivo.

A todos, com sinceridade expresso os meus agradecimentos.

MUITO OBRIGADO!

RESUMO

A hiperpigmentação da pele, que resulta da desregulação da actividade da tirosinase, enzima-chave da melanogénese, causa problemas estéticos e um impacto psicológico importante no indivíduo (Koo,2012; Yen, 2012).

A compreensão da regulação da melanogénese, em particular da actividade da tirosinase, é de grande interesse para indústria farmacêutica e cosmética. Desta forma, a pesquisa por novos inibidores da tirosinase, de origem natural e/ou sintética, que se revelem eficazes no tratamento da hiperpigmentação é de extrema relevância.

O objectivo deste trabalho visa sucintamente abordar as novas técnicas laboratoriais de separação de produtos naturais bioactivos, nomeadamente as técnicas hifenadas e de biocromatografia, potentes ferramentas analíticas na triagem e na identificação estrutural dos constituintes de matrizes de origem natural que possam vir a ser futuramente comercializados como inibidores de tirosinases.

Palavras-Chave: Tirosinase; Inibidores; Melasma; Hiperpigmentação.

ABSTRACT

The hiperpigmentation of the skin results from the deregulation of the activity of tyrosinase, the key enzyme of the melanogenesis, causes aesthetic problems and a significant psychological impact on the individual (Koo,2012; Yen,et al., 2012).

The understanding the regulation of melanogénese, particularly of the tyrosinase activity, is of great interest to the pharmaceutical and cosmetic industry. Thus, the research for new tyrosinase inhibitors, from natural and/or synthetic origin, which prove to be effective in the treatment of hyperpigmentation is extremely relevant.

The objective of this study aims to briefly address the new laboratory techniques of separation of bioactive natural products, including hyphenated techniques and the biochromatography, powerful analytical tools in the screening and structural identification of the natural products that may be in future prove to be commercialized as tyrosine inhibitors.

Keywords: Tyrosinase; Inhibitors; Melasma; Hiperpigmentation.

ABREVIATURAS, SIGLAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS

DOPA	Dihidroxifenilalanina
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
K _M	Constante de Michaelis-Menten
OMS	Organização Mundial da Saúde
V _{max}	Velocidade máxima da reacção enzimática
½ V _{max}	Metade da Velocidade máxima da reacção enzimática

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1. Enzimas	10
1.1.1. Tiosinases	15
1.1.2. Potencial impacto negativo na actividade de tiosinases	19
1.2. Inibição enzimática.....	20
1.2.1. Inibidores de tiosinases	21
1.2.1.1. Ácido kójico.....	23
1.2.1.2. Hidroquinona.....	24
1.2.1.3. Arbutina	25
1.2.1.4. Outros Inibidores de tiosinases	25
1.3. Novas técnicas laboratoriais de separação de inibidores da tiosinase.....	29
1.3.1. Extração de compostos bioactivos	30
1.3.2. Purificação/Isolamento de compostos bioactivos	32
1.4. A comercialização dos inibidores de tiosinases	36
2. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES	40
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema reaccional da formação de um produto (P), através da reacção enzimática que ocorre entre determinada enzima (E) e o seu substrato (S) (Stryer, 1995).	10
Figura 2: Modelo de Michaelis-Menten - Curva de saturação numa reacção enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato ([S]) e a velocidade da reacção (V) (Stryer, 1995).....	12
Figura 3: Gráfico de Lineweaver-Burk–Linearização do modelo de Michaelis-Menten (Stryer, 1995).	13
Figura 4: Inibição competitiva ilustrada pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Stryer, 1995).	14
Figura 5: Inibição não-competitiva ilustrada pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Stryer, 1995).	14
Figura 6: Exemplo de estrutura do centro ativo de uma tirosinase (Zaidi et al., 2014 ^a).	17
Figura 7: Processo de biossíntese da melanina nos melanossomas (Zaidi et al., 2014 ^a).	19
Figura 8: Mecanismo de acção de Inibição reversível (Chang, 2009).	21
Figura 9: Mecanismo de “inactivação suicida” da tirosinase por oxidação de um substrato o-difenólico (Chang, 2009).....	22
Figura 10: Estrutura química do ácido kójico (Souza et al., 2012).	23
Figura 11: Estrutura química da hidroquinona (Cho., 2008).	24
Figura 12: Estrutura química da arbutina (Uchida, Ishikawa & Tomoda, 2014).	25
Figura 13: Estruturas químicas de flavonóides, avaliados como inibidores da tirosinase (Chang, 2009).	27
Figura 14: Estruturas químicas de a) lípidos de cadeia longa e b) esteróides (Chang, 2009). .	29
Figura 15: Representação esquemática do reactor de enzima imobilizada por bicamada de brometo de hexadimetrina (Jiang et al., 2013).	35
Figura 16: Cosmecêuticos usados no tratamento da hiperpigmentação e classificados segundo o mecanismo de acção (Sarkar, Arora & Garg, 2013).	39

1. INTRODUÇÃO

As plantas, os animais, bem como os microrganismos representam uma fonte de produtos naturais. O reino *Plantae*, que representa um dos maiores grupos de seres vivos na Terra, oferece, em particular, uma variedade de espécies que ainda são utilizados como remédios para a cura de inúmeras doenças em diversas partes do mundo, tais como a Ásia, África e América do Sul.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os medicamentos tradicionais representam para o sistema de cuidados primários de saúde cerca de 60% da população mundial, sendo as plantas, com atividade biológica, as que permanecem largamente inexplorados. Assim, a biodiversidade representa uma fonte ilimitada de novas entidades químicas com grande potencialidade para se tornarem possíveis fármacos. Estas entidades químicas são habitualmente metabólitos secundários, sintetizados por plantas como defesa contra herbívoros ou atratores de agentes polinizadores, podendo ser agrupadas em três grandes famílias: alcalóides, terpenóides e compostos fenólicos (Brusottia et al., 2014).

A fitoquímica, baseada na etnofarmacologia, é considerada uma abordagem eficaz na descoberta de novas entidades químicas como potenciais fármacos. Tradicionalmente, as plantas, os extractos vegetais e as decocções são usados no tratamento de várias enfermidades, representando, desta forma, uma fonte de entidades químicas, contudo não existem muitas informações disponíveis sobre a sua natureza (Brusottia et al., 2014).

O principal objectivo deste trabalho visa retratar sucintamente algumas das novas técnicas laboratoriais de separação de produtos naturais bioactivos, nomeadamente os inibidores das tirosinases. Como tal, far-se-á uma revisão bibliográfica sobre as melhores metodologias, que incluem a combinação de ferramentas de extracção, preparação de amostras e de técnicas de análise (Brusottia et al., 2014), para o isolamento e caracterização de metabólitos secundários bioactivos que podem vir a tornar-se potenciais fármacos inibidores de tirosinases.

O trabalho será desenvolvido tendo em conta as diferentes etapas envolvidas na abordagem etnofarmacológico tais como a extracção, a preparação da amostra e rastreio biológico. Serão discutidas técnicas analíticas utilizadas no isolamento e identificação de compostos responsáveis pela inibição da atividade enzimática de tirosinases, tais como a separação, as espectroscópicas e as técnicas combinadas ou hifenadas (Brusottia et al., 2014).

Assim, o presente trabalho visa fazer uma revisão bibliográfica sobre a temática da inibição da tirosinase, procura identificar os pontos-chave deste tema e os problemas existentes, em particular aquele ou aqueles para cuja resposta este trabalho pretende contribuir. Com base na literatura científica consultada nas áreas de estudo far-se-á o ponto da situação dos temas abordados no presente trabalho. O primeiro capítulo, sob o título “Enzimas”, pretende fazer uma abordagem geral do tema em estudo, definindo estrutural e funcionalmente as enzimas e a respectiva cinética de actuação. O sub-capítulo seguinte, intitulado “Tirosinase”, pretende caracterizar a enzima em estudo neste trabalho do ponto de vista de estrutura, das funções que desempenha e das aplicações já conhecidas da sua actividade. “O potencial efeito negativo da actividade da tirosinase” é abordado no sub-capítulo subsequente, onde as desordens pigmentares, em particular a hiperpigmentação, sob a forma de melasmas, é identificada como o principal consequência da desregulação da actividade da tirosinase durante a melanogénese. O capítulo seguinte e respectivo sub-capítulo subordinados aos temas “Inibição da Tirosinase” e “Inibidores da Tirosinase”, respectivamente, abordam a temática da inibição da tirosinase, os tipos de inibição que a enzima sofre e os seus principais inibidores conhecidos. Os novos métodos de rastreio, com recurso a técnicas hifenadas e de biocromatografia usadas na identificação de potenciais inibidores da tirosinase são abordados no capítulo “Novas técnicas laboratoriais de separação de Inibidores da Tirosinase”, por último, trata-se da “Comercialização dos Inibidores da Tirosinase”, pretendendo identificar o que existe no mercado, os principais obstáculos e dificuldades

1.1. Enzimas

As enzimas são proteínas que regulam reacções químicas que ocorrem nos organismos vivos. Actuam como catalisadores, ou seja, substâncias que aumentam a velocidade das reacções químicas, por redução da energia de activação necessária para que a reacção ocorra (Jaeger & Eggert 2004; Stryer, 1995). Na essência, as enzimas catalisam reacções por estabilização dos estados de transição, as espécies de maior energia no processo reactivo (Stryer, 1995). As características fundamentais do desempenho enzimático são os elevados níveis de estereoespecificidade, regioselectividade e quimioselectividade que conferem às reacções que catalisam (Jaeger & Eggert, 2004; Stryer, 1995). Por isso, as enzimas são utilizadas em muitas aplicações industriais, nomeadamente na indústria farmacêutica, na indústria alimentar, entre outras (Khan & Alzohairy, 2010).

A nível estrutural quase todas as enzimas são proteínas globulares de estrutura terciária ou quaternária. A nível molecular, a enzima estabelece a ligação com o substrato para formar um complexo enzima-substrato (Stryer, 1995).

As reacções enzimáticas ocorrem enquanto o substrato está ligado à enzima, dando-se a conversão do substrato no novo produto, que é então libertado e a enzima fica, na maior parte dos casos, de novo livre para uma nova reacção, esquematicamente demonstrado pelo esquema de Briggs-Haldane (Carvalho et al., 2010; Stryer, 1995). Como catalisadores que são, as enzimas não são habitualmente destruídas e não alteram o equilíbrio químico da reacção que catalisam (Stryer, 1995).

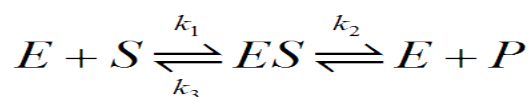


Figura 1: Esquema reaccional da formação de um produto (P), através da reacção enzimática que ocorre entre determinada enzima (E) e o seu substrato (S) (Stryer, 1995).

As ligações enzima-substrato são altamente específicas, devido ao arranjo dos átomos no sítio de ligação ao substrato, designado por centro activo, o que lhe confere uma forma exclusiva. Por este motivo, o complexo enzima-substrato formado assumiu durante muito tempo a designação de modelo chave-

fechadura, pois o centro activo da enzima e respectivo substrato são complementares em termos de forma, mas também o são no que se refere à carga e características hidrofílicas ou hidrofóbicas (Jaeger & Eggert 2004; Stryer, 1995).

No entanto, em meados do século passado foi sugerida uma modificação ao modelo de chave-fechadura. Esta alteração ao modelo postulado inicialmente teve por base o facto do centro activo da enzima alterar a sua forma de maneira continuada através de interacções com o substrato, enquanto esse mesmo substrato vai interagindo com a enzima. Ou seja, as cadeias laterais dos aminoácidos que formam o centro activo sofrem a reorientação necessária para existir complementaridade com o substrato, situação que se verifica apenas após a ligação do substrato à enzima. Este processo de reconhecimento dinâmico do substrato, que é acompanhado por ajustes conformacionais no centro activo foi designado por modelo de encaixe-induzido (Stryer, 1995; Koshland, 1958).

O modelo de Michaelis-Menten representa a cinética de algumas enzimas. Neste modelo, a velocidade de conversão do substrato em produto é função da concentração de substrato (Figura 2). A velocidade da reacção aumenta rapidamente até metade da enzima existente ficar ligada ao substrato ($\frac{1}{2}V_{\max}$) e a partir deste ponto, a velocidade da reacção tenderá para a estabilização, mesmo quando a concentração do substrato é aumentada. Quando a velocidade de reacção atinge um patamar, a velocidade máxima ($V_{\max}$) da reacção é atingida. A concentração de substrato que corresponde a metade da velocidade máxima assume a designação de constante de Michaelis-Menten (K_M). Quando esta concentração é atingida, metade das moléculas de enzima em solução estão ligadas ao substrato. Estes são os parâmetros bioquímicos utilizados para caracterização cinética e da afinidade da enzima para determinado substrato (Stryer, 1995).

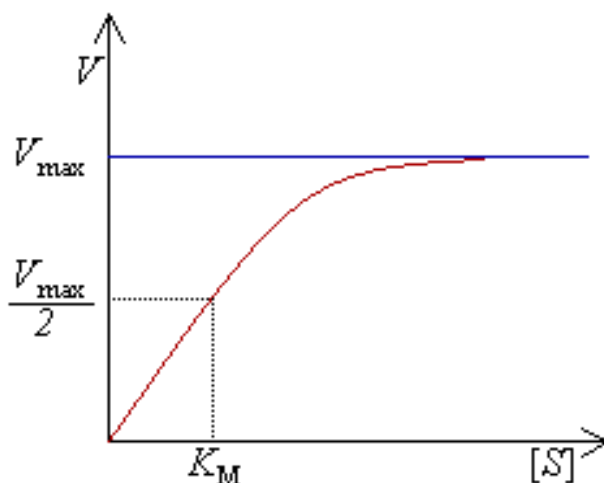


Figura 2: Modelo de Michaelis-Menten - Curva de saturação numa reacção enzimática, mostrando a relação entre a concentração de substrato ($[S]$) e a velocidade da reacção (V) (Stryer, 1995).

A linearização do modelo de Michaelis-Menten, com recurso à equação de duplo recíproco de Lineweaver-Burk, permite também a obtenção dos parâmetros cinéticos devolvidos pelo primeiro modelo mencionado. No entanto, esta é uma aproximação matematicamente menos rigorosa do que o ajuste não linear pelo método dos mínimos quadrados na determinação dos parâmetros caracterizadores da cinética enzimática. O gráfico de $1/V$ versus $1/[S]$ assim obtido, designado por Gráfico de Lineweaver-Burk, apresenta um declive de $K_M/V_{\max}$ e um coeficiente linear de $1/V_{\max}$. (Figura 3) (Carvalho et al., 2010; Stryer, 1995).

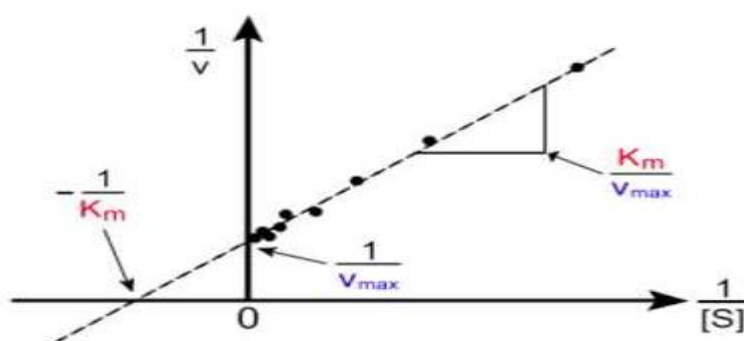


Figura 3: Gráfico de Lineweaver-Burk–Linearização do modelo de Michaelis-Menten (Stryer, 1995).

Cada enzima possui temperatura e pH óptimos para desempenhar as suas funções. A variação desses factores pode causar a desnaturação da proteína, com perda reversível ou irreversível da função. A alteração do pH faz variar as ligações entre enzima e substrato, podendo ou não aumentar a velocidade da reacção. A variação da temperatura pode fazer aumentar a energia cinética das moléculas, aumentando também a velocidade da reacção, no entanto também pode desnaturar ou inactivar as enzimas presentes nessa mesma reacção (Lehninger, 1985).

A actividade enzimática pode depender da presença de determinadas moléculas, quer sejam iões metálicos, como o ferro, ou moléculas orgânicas, como a vitamina B12, moléculas essas que genericamente são designadas por cofactores, os quais podem participar ou não directamente na reacção enzimática (Stryer, 1995).

A inibição da actividade enzimática é um processo importante, que serve como mecanismo de controlo dos sistemas biológicos, é levada a cabo por inibidores, substâncias que controlam o nível de actividade enzimático. A inibição pode ocorrer de duas formas: reversível e irreversível, sendo que o que as distingue é a facilidade de dissociação do complexo Enzima-Inibidor formado. Na forma reversível de inibição verifica-se a rápida dissociação do complexo enzima-inibidor, em contraste com o que se verifica na inibição irreversível, onde a dissociação do mesmo complexo ocorre de forma muito lenta (Stryer, 1995).

Na inibição competitiva, uma forma de inibição reversível, o inibidor e o substrato têm estruturas semelhantes pelo que competem pela ligação à enzima, que não ocorre em simultâneo. Assim, a velocidade máxima da reacção não é alterada, mas são requeridos níveis de concentração do substrato superiores para se atingir a mesma velocidade e consequente aumento do K_M (Stryer, 1995).

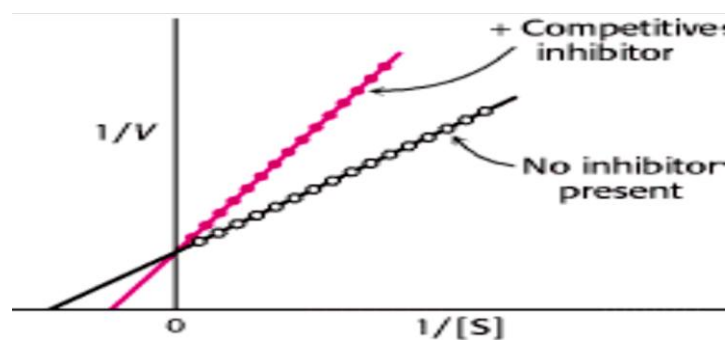


Figura 4: Inibição competitiva ilustrada pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Stryer, 1995).

Na inibição acompetitiva, o inibidor não se pode ligar à enzima no estado livre, mas somente ao complexo Enzima-Substrato. O complexo Enzima-Inibidor-Substrato assim formado, é enzimaticamente inativo. Este tipo de inibição é raro, mas pode ocorrer em enzima multiméricas (Stryer, 1995).

Os inibidores não-competitivos, fazem uma inibição de tipo reversível, podem ligar-se à enzima ao mesmo tempo que o substrato, ou seja, nunca se ligam ao sítio activo. Neste tipo de inibição o K_M não sofre alteração, mas o V_{max} surge alterado, uma vez que o aumento da concentração do substrato não induz a dissociação dos complexos Enzima-Inibidor ou Enzima-Inibidor-Substrato, consequência do facto da ligação do inibidor não acontecer no sítio activo da enzima (em contraste com o que acontece na inibição competitiva) (Stryer, 1995).

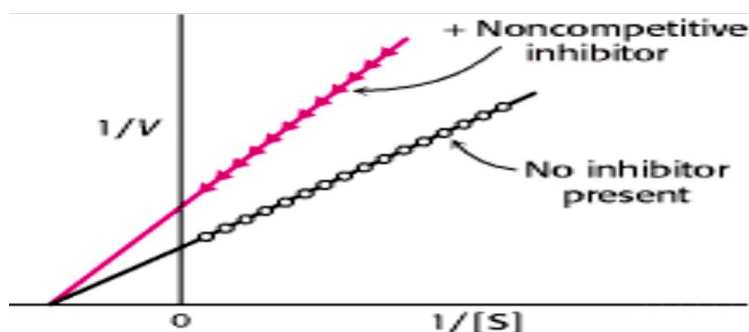


Figura 5: Inibição não-competitiva ilustrada pelo gráfico de Lineweaver-Burk (Stryer, 1995).

A inibição mista assemelha-se à inibição não-competitiva. Neste caso, o complexo Enzima-Inibidor-Substrato possui actividade enzimática residual. Este tipo de inibidor afecta tanto a ligação do substrato, como a capacidade de formação de produto. As enzimas sujeitas a este tipo de inibição são designadas por enzimas alostéricas e são na maioria dos casos multiméricas. Seguem uma cinética distinta da explicada pelo modelo de Michaelis-Menten, uma vez que a relação entre a velocidade e a concentração de substrato apresenta uma forma sigmóide, em vez da forma hiperbólica. (Stryer, 1995).

Quanto aos inibidores irreversíveis, estes formam ligações covalentes com o centro activo da enzima, inactivando-a por longo período (Stryer, 1995).

1.1.1. Tirosinases

A tirosinase (EC 1.14.18.41) é conhecida como a “enzima-chave” da biossíntese da melanina, pigmento que confere a cor ao cabelo, à pele e aos olhos e que exerce uma função fundamental na protecção da pele contra os raios UV (Zaidi et al., 2014^a; Park & Sung, 2011).

Alterações no nível de actividade da tirosinase conduzem a desordens pigmentares que são a terceira doença dermatológica mais comum (Sarkar, Arora & Garg, 2013). A despigmentação da pele e do cabelo é uma destas desordens e caracteriza-se por uma redução da produção de melanina, enquanto a hiperpigmentação da pele resulta da produção excessiva de melanina (Zaidi et al., 2014^a).

A hiperpigmentação da pele, na forma de melasmas (estado crónico, caracterizada por manchas irregulares e acastanhadas, que geralmente ocorrem de forma simétrica na testa, bochechas e nariz), sardas e/ou as designadas “manchas da idade”, resulta do aumento da actividade tirosinase, que se verifica em pacientes com diagnóstico de melanoma (cancro de pele) e também em indivíduos saudáveis, em função do grupo etário e também relacionadas com a exposição excessiva aos raios UV (Abdallah, 2014; Lee, 2014; Jennifer et al., 2012; Yen et al., 2012; Rossi & Renez, 2011).

Evidências epidemiológicas comprovam que os principais factores de predisposição ao surgimento de melasmas são a exposição aos raios UV, que assume o papel principal na indução e reincidência desta patologia, mas também a gravidez, os contraceptivos orais, a história familiar e os tipos de pele mais escuros (Abdallah, 2014; Lee, 2014). Nos Estados Unidos, os melasmas afetam aproximadamente cinco a seis milhões de indivíduos, com uma incidência estimada de 5 a 10% no género feminino. É mais comum entre os hispânicos, asiáticos, populações afro-americanas e do Médio Oriente e tende a persistir por mais tempo em pacientes com fotótipos mais escuros de pele. Os resultados de um estudo publicado revelaram que o melasma constitui cerca de 8% dos diagnósticos feitos em pacientes de origem latina em clínica privada (Rossi & Renez, 2011)

Dada a importância estética e psicológica da formação dos melasmas na qualidade de vida dos afetados, torna-se fundamental o controlo do seu aparecimento e/ou tratamento (Abdallah, 2014; Jennifer et al., 2012; Yen et al., 2012). Contudo, devido à patogénese complexa do melasma e à extrema sensibilidade desenvolvida pelos melanócitos destes doentes, o tratamento desta desordem pigmentar ainda é um desafio e as reincidências e a hiperpigmentação pós-inflamatória constituem o seu ponto de vulnerabilidade (Abdallah, 2014; Lee, 2014). A máxima de que “uma vez melasma, para sempre melasma” ainda hoje é aplicada aos portadores desta alteração pigmentar. Por isso, a descoberta de novos inibidores da tirosinase, com capacidade de regular a melanogénese assume especial interesse (Abdallah, 2014).

Dado o papel que a tirosinase desempenha um papel fundamental no processo de melanogénese é de todo o interesse a descrição das suas características. A tirosinase é uma enzima multifuncional, que se encontra amplamente distribuída na Natureza. As tirosinases melhor caracterizadas até à data são as oriundas da estirpe *Streptomyces glaucescens* e dos fungos *Neurospora crassa* e *Agaricus bisporus*, sendo que a enzima extraída deste último fungo é a que mais se assemelha à dos mamíferos (Zaidi et al., 2014^a).

A tirosinase diverge em termos das suas propriedades estruturais, da sua distribuição nos tecidos e da sua localização celular. Nos mamíferos, a tirosinase encontra-se no citosol dos melanócitos e células do melanoma. Esta enzima

frequentemente difere relativamente à sua estrutura primária, ao seu tamanho, ao seu modelo de glicosilação e às suas características de activação. Contudo, todas as tirosinases têm em comum um centro cúprico, com estado de oxidação III, composto por dois átomos de cobre, cada um coordenado com três resíduos de histidina e de natureza hidrofóbica. Os átomos de cobre presentes no seu centro activo ligam-se ao oxigénio atmosférico e catalisam duas diferentes reacções enzimáticas (I) *orto*-hidroxilação de monofenóis aos correspondentes *orto*-difenóis e a respectiva (II) oxidação destes às correspondentes *o*-quinonas (Zaidi et al., 2014^a; Chen et al., 2014; Chang et al., 2013; Zhang & Zhou, 2013; Park & Sung, 2011).

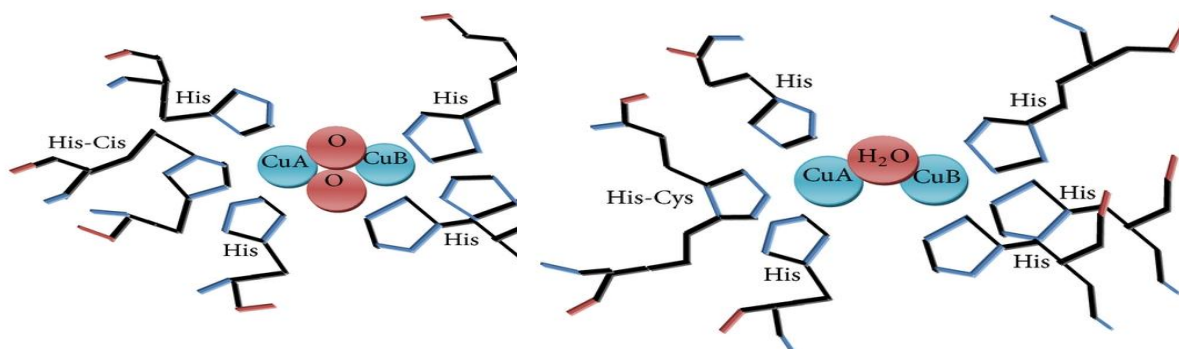


Figura 6: Exemplo de estrutura do centro ativo de uma tirosinase (Zaidi et al., 2014^a).

As actividades de monofenol-hidroxilase e de difenol-oxidase reveladas pela tirosinase são de reconhecido interesse a nível industrial, nomeadamente ambiental, onde é usada na desintoxicação de águas residuais e solos contaminados com fenol e ainda como biossensor para a detecção e monitorização de compostos fenólicos (Zaidi et al., 2014^a). Também na indústria farmacêutica assume particular interesse por causa da síntese de *o*-difenóis, como a dihidroxifenilalanina (DOPA) e a dopamina, indicados para o tratamento da Doença da Parkinson. Por outro lado, estudos têm sido levados a cabo com o intuito de testar a possibilidade da tirosinase se constituir como biomarcador do melanoma. Já na indústria cosmética, a procura de agentes correctores e

clareadores/branqueadores da pele conduziram a estudos sobre a inibição da tirosinase, em que a enzima extraída do fungo *Agaricus bisporus* serve de modelo. Na indústria alimentar, a tirosinase assume-se como importante enzima catalítica (Zaidi et al., 2014^a).

Dadas as características da sua actividade, nos vertebrados e fungos a tirosinase está envolvida na biossíntese da melanina (pigmento castanho, responsável por dar cor à pele e ao cabelo nos mamíferos e por promover a protecção contra a radiação), num processo designado por melanogénese (Zaidi et al., 2014^a; Chang et al., 2013).

No processo de síntese da melanina (Figura 7), a tirosinase catalisa a *orto*-hidroxilação do substrato, a tirosina (que se trata de um monofenol), a 3,4-hidrofenilalanina ou L-DOPA (que se trata de um *orto*-difeno) e numa fase posterior catalisa ainda a oxidação da L-DOPA a dopaquinona (que se trata de uma *orto*-quinona), que sofre depois uma série de reacções enzimáticas e outras não-enzimáticas que culminam com a formação da melanina (Zaidi et al., 2014^a; Chen et al., 2014; Chang et al., 2013; Zhang & Zhou, 2013; Park & Sung, 2011).

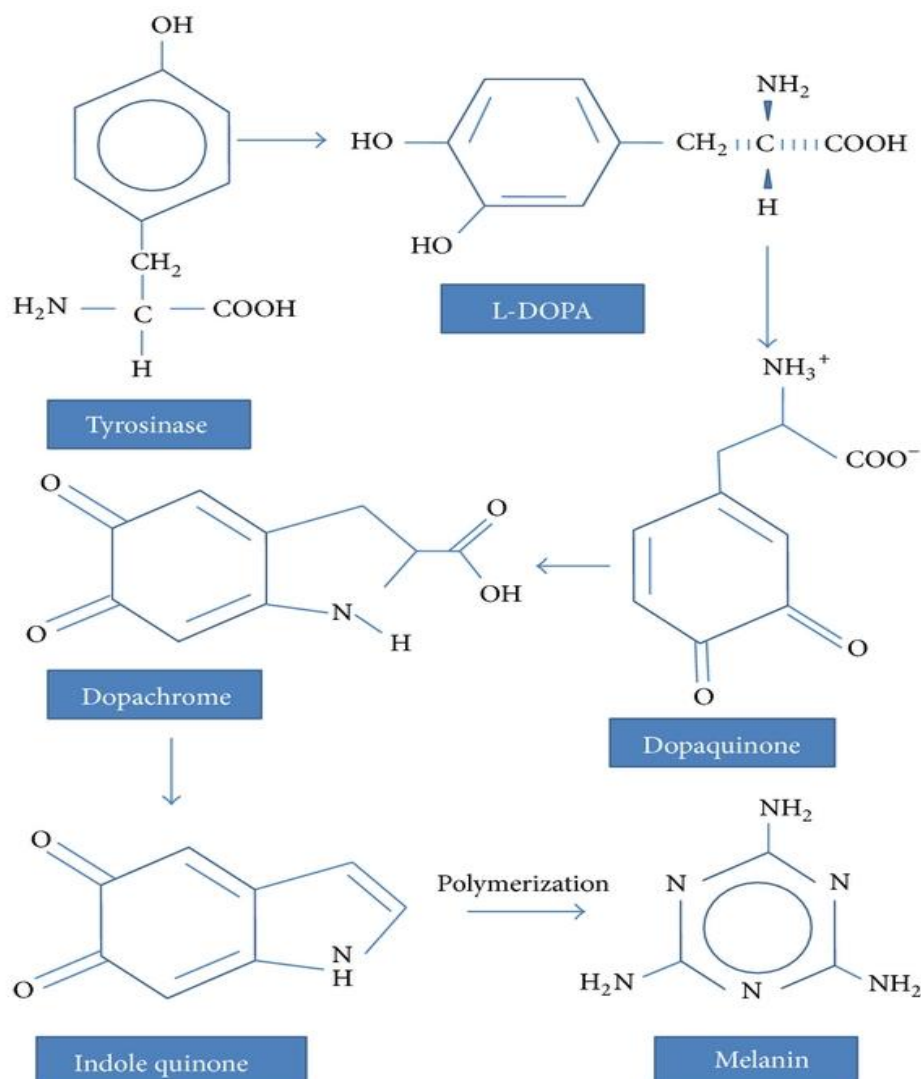


Figura 7: Processo de biossíntese da melanina nos melanossomas (Zaidi et al., 2014^a).

1.1.2. Potencial impacto negativo na actividade de tirosinases

A tirosinase foi primeiro caracterizada em mamíferos pelo seu papel no desenvolvimento de melanomas e como responsável por problemas de pigmentação da pele (Zaidi, Ali & Ali, 2014^b).

Efectivamente, a produção de excessiva de melanina catalisada pela tirosinase conduz a situações de hiperpigmentação da pele, sob a forma de melasmas, sardas, as denominadas “manchas da idade” e de melanomas malignos.

Alguns estudos revelaram que a actividade da tirosinase nos melanomas malignos, quando comparada com a de melanócitos saudáveis é muito superior (Abdallah, 2014; Zaidi et al., 2014^a; Chang et al., 2013, Zhang & Zhou, 2013; Jennifer et al., 2012; Yen et al., 2012; Chang, 2009; Jawaid et al., 2009). Enquanto outros estudos epidemiológicos mostram que diferenças na susceptibilidade ao melasma são identificadas entre raças, nomeadamente entre os caucasianos e os indivíduos de raça negra, devido ao ambiente ácido, que inactiva a tirosinase, e que se encontra nos melanosomas dos melanócitos dos caucasianos, o que resulta na supressão da produção da melanina nesta raça (Lee, 2014).

O potencial impacto negativo da sobre-actividade da tirosinase é tanto maior quanto maior for a gravidade da consequência. Mas, no mínimo haverá sempre um efeito negativo a nível estético, porque é geralmente a face que é afectada, e até mesmo psicológico, social e económico na vida do indivíduo, com consequente perda da qualidade de vida nos casos de maior gravidade (Abdallah, 2014; Lee, 2014; Jennifer et al., 2012; Yen et al., 2012). A descoberta e desenvolvimento de novos, seguros e efectivos inibidores da actividade da tirosinase ganha assim particular relevância.

1.2. Inibição enzimática

A inibição de enzimas pode envolver ligações reversíveis ou irreversíveis. A ligação reversível do inibidor à enzima pode ocorrer por ligação electrostática ou por interacção de *van der Waals*. Dependendo do sítio de ligação do inibidor à enzima e da presença ou ausência do substrato, os mecanismos de inibição enzimáticos podem ser divididos em quatro tipos (Chang, 2009):

- a) Inibição competitiva;
- b) Inibição não-competitiva;
- c) Inibição mista (inibição competitiva e não-competitiva);
- d) Inibição anti-competitiva.

Na inibição competitiva ocorre competição do inibidor e do substrato pelo centro activo da enzima. Em contraste, na inibição anti-competitiva é condição essencial para ligação do inibidor ao centro alostérico que haja a formação prévia do complexo enzima-substrato. Na inibição do tipo misto, pode ocorrer ligação do inibidor à enzima livre, como em complexo com o substrato, tendo, no entanto, constantes de equilíbrio diferentes. A inibição não-competitiva é um caso particular da inibição mista, uma vez que a constante de equilíbrio é a mesma para a ligação do inibidor à enzima livre ou à enzima conjugada com o substrato (Chang, 2009) (Figura 8).

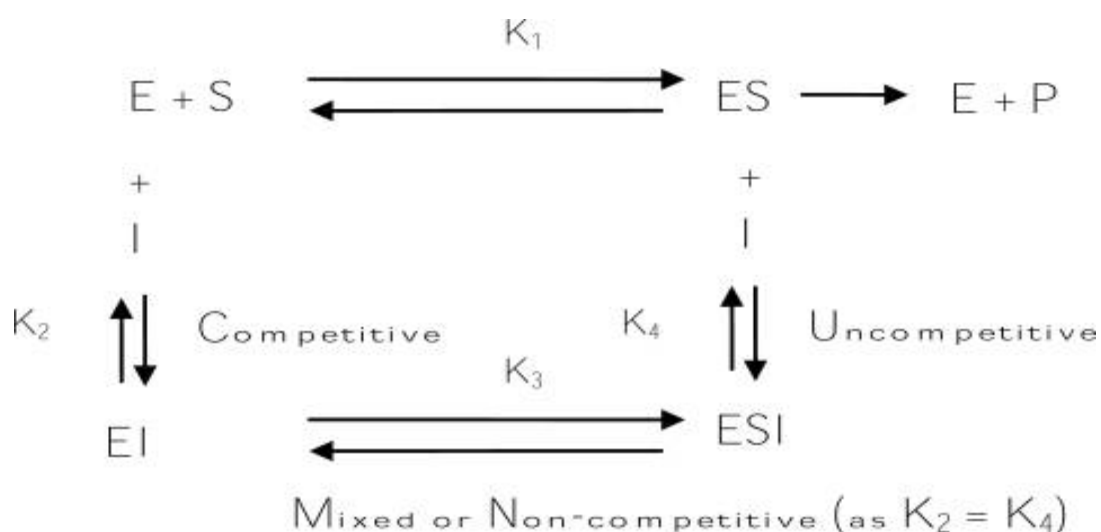


Figura 8: Mecanismo de acção de Inibição reversível (Chang, 2009).

1.2.1. Inibidores de tirosinases

Um elevado número de inibidores da tirosinase, quer de origem natural, quer de origem sintética tem sido identificados (Chang et al., 2013; Chang 2012; Chang, 2009). No entanto, a definição de “Inibidor da tirosinase” nem sempre é específica, porque alguns autores usam a mesma terminologia para se referirem a inibidores da melanogénese, sem que haja interacção directa tirosinase-inibidor. Os “verdadeiros” inibidores da tirosinase, ou seja, os que se ligam à enzima e inibem a sua actividade dividem-se em duas classes (Chang, 2009):

- a) Inactivadores específicos da tirosinase;

b) Inibidores específicos da tirosinase.

Os inactivadores específicos da tirosinase, também conhecidos por “substratos suicidas”, são catalisados pela tirosinase e formam uma ligação covalente com esta, inactivando-a irreversivelmente durante a reacção catalítica. A actividade da tirosinase é assim inibida através da catalisação de uma reacção designada por “reacção suicida” (Chang, 2009). Substratos *o*-difenólicos da tirosinase, como sejam a L-DOPA, e o catecol foram já identificados como “substratos suicidas”, quando processados pela actividade como cresolase, em vez o serem pela via de catecolase (Figura 9) (Chang, 2009).

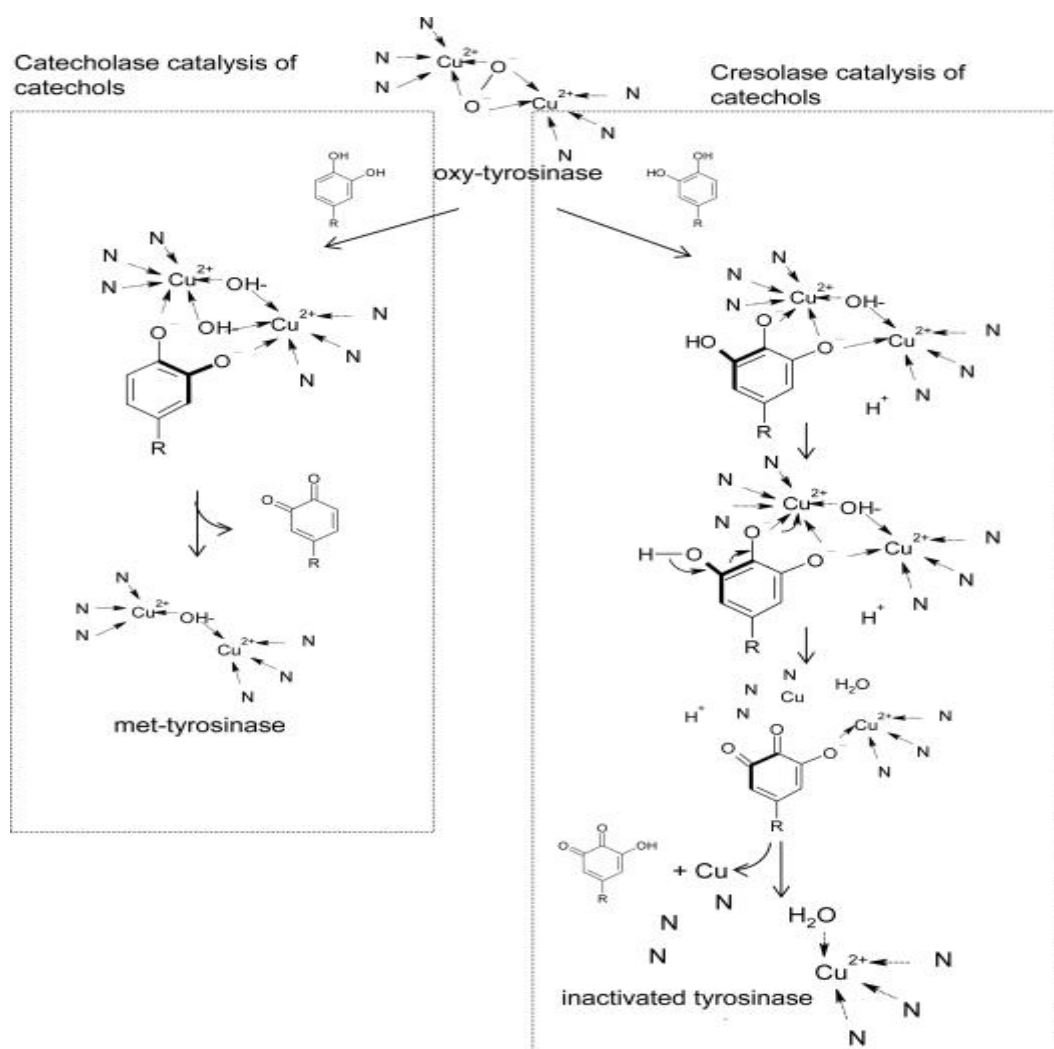


Figura 9: Mecanismo de “inactivação suicida” da tirosinase por oxidação de um substrato *o*-difenólico (Chang, 2009).

Os inibidores específicos da tirosinase são compostos que se ligam reversivelmente à enzima e que reduzem a sua capacidade catalítica (Chang, 2009).

Independentemente do tipo, a capacidade de determinado inibidor é avaliada pela concentração de inibidor necessária para reduzir para metade a actividade da enzima (IC_{50}), em particular da tirosinase. Contudo, os valores de IC_{50} encontrados na literatura são muito variados e incomparáveis devido às condições experimentais subjacentes a cada experiência, nomeadamente a concentração de substrato, o lote comercial e pureza da tirosinase, o tempo de incubação e o pH (Zhang & Zhou, 2013; Chang, 2009).

1.2.1.1. Ácido kójico

O ácido kójico (Figura 10) é o inibidor da tirosinase mais extensivamente estudado, por isso é diversas vezes usado como controlo positivo de experiências que procuram novos inibidores para a tirosinase. Este composto é um produto metabólico secundário produzido pelas espécies fúngicas *Aspergillus* e *Penicillium*. Dada a capacidade inibitória de tirosinases que possui tem sido amplamente usado na indústria da cosmética, como agente branqueador e corrector de manchas ou sardas e na indústria alimentar, como aditivo para prevenir o processo de oxidação de alimentos (Chang et al., 2013; Park & Sung, 2011; Chang, 2009).

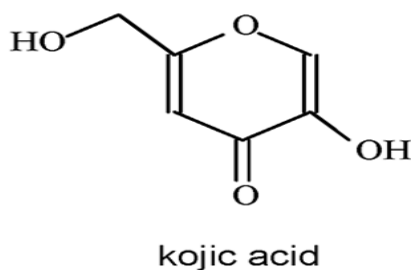


Figura 10: Estrutura química do ácido kójico (Souza et al., 2012).

A capacidade que o ácido kójico revela como quelante dos átomos de cobre do centro activo de tirosinases explica a inibição competitiva demonstrada em vários estudos (Chang et al., 2013; Chang, 2009), reduzindo a actividade como monofenolase da tirosinase. Este composto apresenta ainda uma capacidade inibitória do tipo misto sobre a actividade como difenolases (Chang, 2009).

1.2.1.2. Hidroquinona

A hidroquinona (Figura 11), é do ponto de vista químico um composto derivado do fenol, designado por 1,4-dihidroxibenzeno ou β -D-glucopiranosido (Draelos et al., 2010). A hidroquinona, conhecido agente despigmentante, inibe a oxidação da tirosina por se ligar covalentemente às histidinas ou por interagir com o átomo de cobre do centro activo de tirosinases num processo de inibição competitiva, impedindo a formação de melanina. Esta substância também é conhecida pela capacidade de inibir a síntese dos ácidos nucleicos e desta forma interferir com a formação de eventuais melanossomas (Monteiro et al., 2013; Chowdhury et al., 2012; Draelos et al., 2010). Dadas as suas características, a hidroquinona é utilizada há décadas no tratamento de desordens hiperpigmentares, em especial no tratamento do melasma (Monteiro et al., 2013; Chowdhury et al., 2012; Draelos et al., 2010).

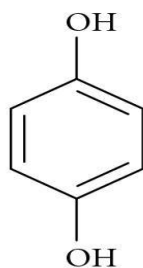


Figura 11: Estrutura química da hidroquinona (Cho., 2008).

1.2.1.3. Arbutina

A arbutina (4-hidroxifenil- β -D-glucopiranosido) (Figura 12) é um derivado da hidroquinona que ocorre naturalmente, em especial nas seguintes famílias de plantas: *Lamiaceae*, *Ericaceae*, *Saxifragaceae* e *Rosaceae* (Thongchai, Liawruangrath & Liawruangrath, 2007).

Ao inibir competitivamente a tirosinase através da interação com o átomo de cobre do centro activo da enzima, a arbutina é capaz de suprimir a biossíntese de melanina, sendo por isso usado como agente branqueador/clareador da pele em cosmética e no tratamento de situações de hiperpigmentação, como sejam o melasma e as sardas, entre outras. Contudo a utilização de formulações contendo este composto deve ser estritamente controlado, uma vez que da literatura se conhecem estudos em animais que revelaram efeitos tóxicos a nível hepático, renal, mutagénico e de carcinogénese (Rychlińska & Nowak, 2012).

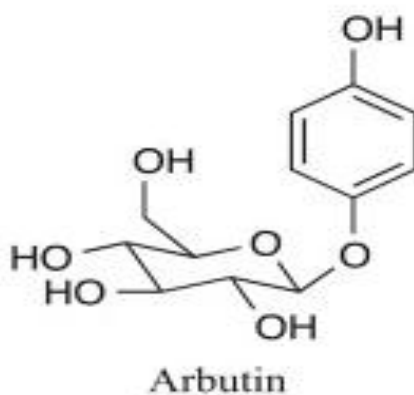


Figura 12: Estrutura química da arbutina (Uchida, Ishikawa & Tomoda, 2014).

1.2.1.4. Outros Inibidores de tirosinases

Os efeitos adversos revelados por alguns despigmentantes e/ou agentes branqueadores da pele utilizados e disponíveis comercialmente conduziram à procura de alternativas naturais mais seguras, efectivas e económicas (Jennifer et

al., 2012). Um grande número de novos potenciais inibidores da tirosinase têm surgido nos últimos anos documentados na literatura. Consoante a estrutura química apresentada classificam-se em quatro classes, que incluem (Gheibi et al, 2015; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Koo et al., 2012; Chang, 2009):

a) *Polifenóis*, tais como: a benzo- γ -pirona e os diversos flavonóides (Figura 13). Dada a semelhança química com a estrutura do substrato tirosina, grande parte dos polifenóis promovem uma inibição do tipo competitivo, concorrendo pelo centro activo da enzima e assim bloqueando a melanogénese. De entre os compostos polifenólicos, os flavonóides em particular, por serem um grupo de compostos que se encontra amplamente distribuído em plantas, dada a sua elevada bioactividade e reduzida toxicidade, têm sido estudados como potenciais compostos activos em formulações para uso cosmético, podendo ser subdivididos em sete principais categorias estruturalmente semelhantes, que incluem: a) as flavonas (exemplos: a norartocarpetina e a artocarpetina); b) os flavonóis (exemplos: a quercetina e a galangina); c) as flavanonas (exemplos: a estrepogenina, a curarinona e o curarinol); d) os flavanóis (exemplos: a dihidromorina e a taxifolina); e) os isoflavonóides (exemplos: a glabridina e seu derivado, o glabreno); f) as chalconas (exemplos: curaridina, curaridinol, licurasida, a isoliquiritina e licochalcona) e g) catequinas (exemplos: ácido gálico, ácido elágico e aloesina) (Gheibi et al., 2015; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Koo et al., 2012; Chang, 2009).

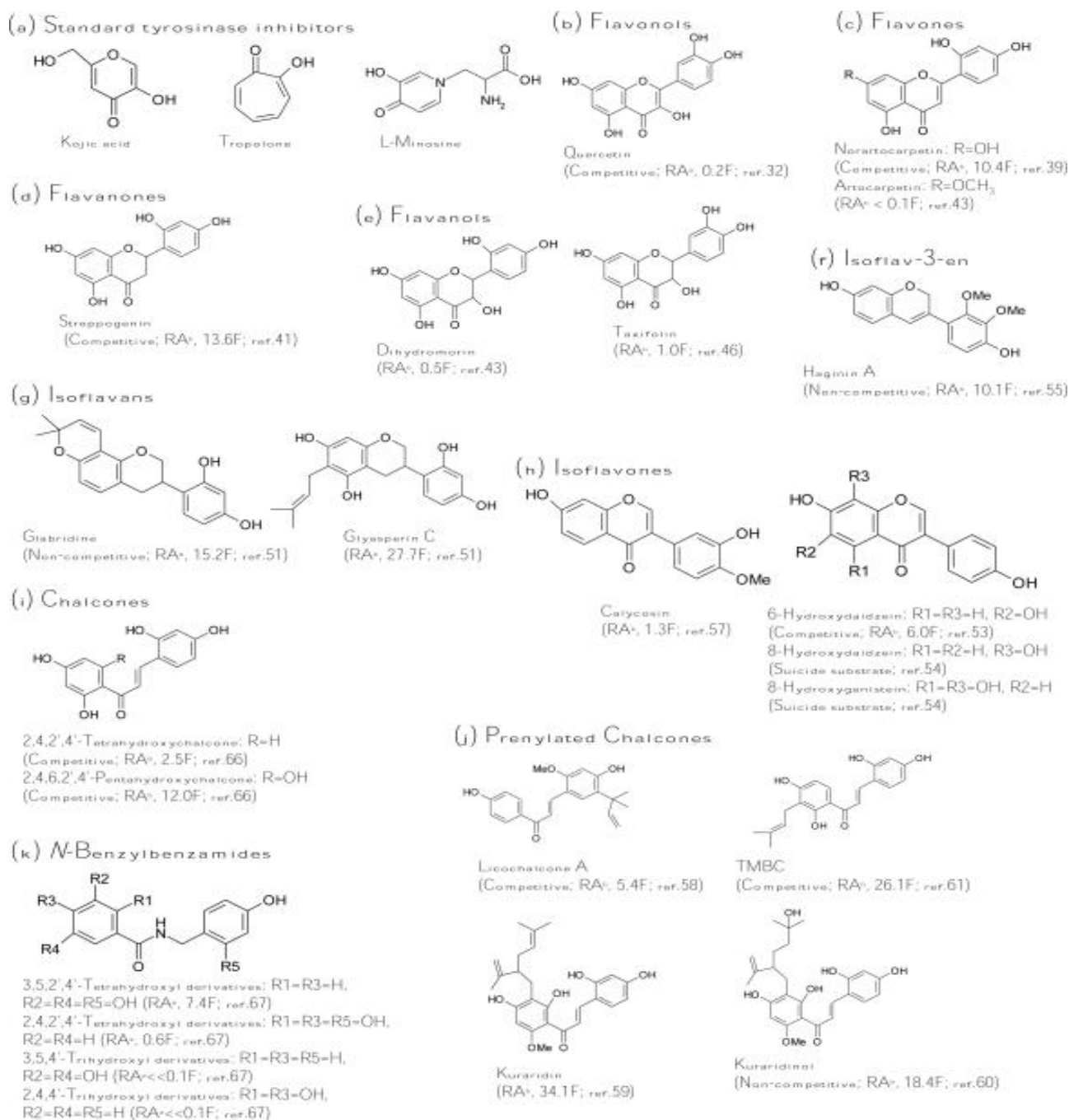


Figura 13: Estruturas químicas de flavonóides, avaliados como inibidores da tirosinase (Chang, 2009).

b) *Benzaldeído e derivados do benzoato.* O mecanismo inibitório do benzaldeído e análogos envolve a capacidade que apresentam para formar uma Bases de Schiff com os grupos amina primários de enzimas. Em contraste, o benzoato inibe a tirosinase por complexação ao átomo de cobre do centro activo..

Os efeitos inibitórios dos derivados do ácido benzóico (ácidos 2-aminobenzóico e 4-aminobenzóico) e da piridina (ácidos nicotínico e picolínico) foram estudados e a análise cinética efectuada explicitamente demonstrou que restringiam reversivelmente as actividades como monofenolase e difenolase da enzima. Os derivados do ácido benzóico inibiam a actividade como monofenolase de uma forma não-competitiva, enquanto os derivados da piridina restringiam competitivamente a mesma actividade. Similarmente os compostos estudados inibiam a actividade como difenolase de forma não-competitiva e competitiva, respectivamente. A capacidade inibitória dos compostos, expressa através de IC_{50} revela que os derivados do ácido benzóico têm significativamente maior poder inibitório sobre a enzima. Porém, quando a capacidade de inibição da classe é comparada com a do ácido kójico verifica-se que os compostos exercem apenas uma inibição fraca a moderada na actividade da tirosinase. Apesar da capacidade de inibição dos derivados da piridina ser inferior à dos derivados do ácido benzoico, estes apresentam uma característica muito importante, pois têm capacidade de induzir citotoxicidade em linhas celulares portadoras de melanomas. Concentrações crescentes destes compostos, até 8 mM, resultavam numa diminuição de cerca 80% nas células do melanoma. Os ácidos nicotínico e polínico são agentes anti-proliferativos e são potenciais inibidores usados no tratamento e prevenção do melasma (Gheibi et al., 2015; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Koo et al., 2012; Chang, 2009)..

c) *Lípidos de cadeia-longa* (Figura 14), tais como são exemplos o triacilglicerol e o trilinoleico, revelam um poder inibitório equivalente ao do ácido kójico para a inibição da actividade de difenolases. (Chang, 2009).

d) *Esteróides* (Figura 14) são essencialmente inibidores da actividade como difenolase de tirosinases, sendo maioritariamente mais potentes do que o ácido kójico. São exemplos desta classe de inibidores da tirosinase o ácido arjunílico e o 17 α -etilesteróide (Chang, 2009).

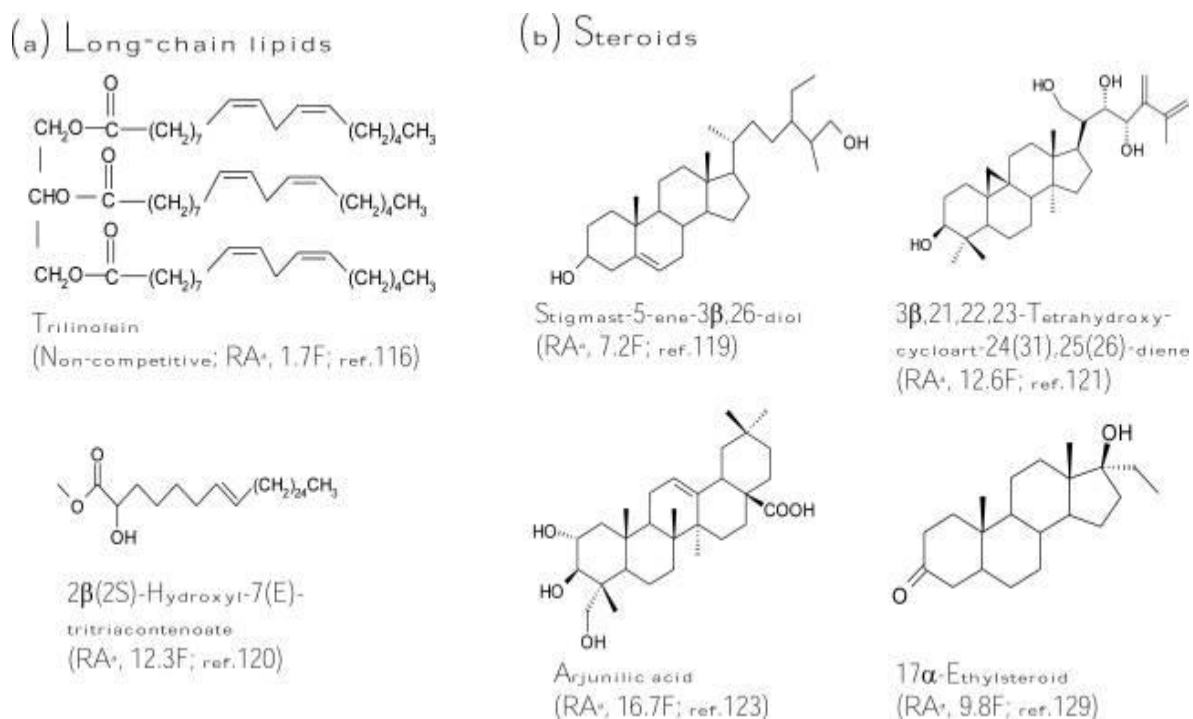


Figura 14: Estruturas químicas de a) lípidos de cadeia longa e b) esteróides (Chang, 2009).

1.3. Novas técnicas laboratoriais de separação de inibidores da tirosinase

O desenvolvimento de novos, fiáveis e rápidos métodos para o *screening* ou rastreio para identificação de compostos biologicamente activos em extratos naturais é um desafio.

Os extractos naturais oferecem uma diversidade molecular extremamente elevada, constituindo uma fonte essencial de compostos para a descoberta de novos inibidores da tirosinase (Jiang et al., 2013).

No entanto, os extractos naturais são muito complexos e os metabolitos de interesse encontram-se na maioria dos casos em níveis reduzidos ou mesmo vestigiais, sendo o isolamento, a purificação e a identificação estrutural processos essenciais para o sucesso de uma investigação (Brussoti et al., 2014).

O interesse no rastreio da composição molecular dos extractos naturais no âmbito da temática do presente trabalho tem resultado no desenvolvimento de novos métodos analíticos, que detectam níveis vestigiais de moléculas bioativas e

permitem o seu isolamento, quantificação e caracterização estrutural (Jiang et al., 2013).

1.3.1. Extracção de compostos bioactivos

A extracção é o procedimento de base a considerar quando se pretende isolar determinado composto de um extracto natural (Brusotti et al., 2014).

A escolha da técnica de extracção envolve a consideração de diversos factores, tais como a natureza do extracto de origem e do composto a isolar, mas também se se trata de um biocomposto conhecido ou não ou se se trata de um grupo de compostos estruturalmente relacionados ou ainda se se pretende a identificação de todos os metabolitos presentes no extracto original (Sarker, Latif & Gray, 2006).

O típico processo de extracção, especialmente quando o material de origem é um extracto de planta, envolve os seguintes passos (Sarker, Latif & Gray, 2006):

1. Secagem e pulverização do extracto ou homogenização de partes da planta fresca ou maceração da planta com um solvente (Sarker, Latif & Gray, 2006).
2. A escolha do solvente, função das características de polaridade do composto ou compostos a isolar (Sarker, Latif & Gray, 2006)).
3. A escolha do método de extracção Sarker, Latif & Gray, 2006).

As metodologias tradicionais de extracção são a maceração, a infusão, a decocção, a ebulição sob refluxo, a sublimação, a extracção por Soxhlet e ainda a destilação a vapor. A extracção por solventes orgânicos, para além de recorrer ao uso de solventes tóxicos, tinha um risco elevado de contaminação do produto da extracção, quer por resíduos do solvente usado na extracção, quer por ceras e/ou outros compostos de elevado peso molecular. (Brusotti et al., 2014; Chang et al., 2013; Sarker, Latif & Gray, 2006).

Entre as técnicas extractivas mais modernas pode incluir-se a extracção por microrondas, por ultrassons, por fluído supercrítico e a extracção líquido pressurizada. A extracção de fluído supercrítico em particular constitui uma alternativa válida para os processos extractivos mais antigos e acima mencionados.

A sua principal característica é a capacidade de operar a baixa temperatura e na ausência de oxigénio e luz, evitando fenómenos de degradação térmica e decomposição de compostos lábeis. A separação do extracto é fácil e o extracto mantém as características organolépticas do material de partida. Com efeito, o dióxido de carbono, além de ser seguro, não inflamável e barato, não é tóxico. No entanto, a principal desvantagem desta técnica é a baixa polaridade do dióxido de carbono, que pode ser ultrapassada pela adição de um co-solvente, por exemplo o etanol, para permitir a extracção de compostos polares. De facto a principal aplicação desta técnica é a extracção de monoterpenos e os sesquiterpenos de óleos essenciais de plantas (Brusotti et al., 2014; Chang et al., 2013; Marougin et al., 2007).

Mais recentemente foram introduzidos novos métodos extractivos com eficiências melhoradas: a extracção por microrondas de alta pressão, a extracção por microrondas em atmosfera inerte, sob azoto, a extracção por microrondas a pressão reduzida, sob vácuo, a extracção por microrondas por ultrassons, a extracção por microrondas e livre de solvente e por último a extracção dinâmica por microrondas. Este último método de extracção referido é particularmente interessante porque permite o acoplamento *on-line* com diferentes sistemas cromatográficos, o que rentabiliza a sua utilização, permitindo maior eficácia, rendimento e pureza num curto espaço de tempo, quando comparado com os outros métodos (Brusotti et al., 2014).

Embora cada técnica de extracção não-convencional apresente inegáveis vantagens em comparação com os métodos tradicionais, a escolha do método mais adequado depende das características do composto ou grupo de compostos que se pretende isolar. Se o desconhecimento sobre a composição de determinado extrato é total, a selecção do método de extracção mais apropriado deve ter em conta que em potencial toda a composição do extracto tem interesse biológico. Por este motivo, são eleitas técnicas de extração líquido-sólido convencionais, em que a maceração com água e/ou decocção representam a primeira escolha. Seguidamente, mais extracções com solventes polaridade crescente, tais como o n-hexano, o metanol, o acetato de etilo e o diclorometano são requeridas sequencialmente para

uma separação preliminar baseada nas propriedades hidro/lipofílicas dos compostos biologicamente activos (Brusotti et al., 2014).

1.3.2. Purificação/Isolamento de compostos bioactivos

Prévio à etapa de quantificação, um pré-tratamento do extracto é na maioria das vezes necessário, no sentido de remover possíveis interferentes ou pré-concentrar os metabolitos de interesse (Brusotti et al., 2014; Sarker, Latif & Gray, 2006).

Várias são as técnicas cromatográficas com detectores UV-visível ou diode-array utilizadas na purificação de fracções obtidas após a extracção. Por exemplo, a cromatografia em camada fina, entre as quais a versão preparativa e a de alta eficiência, a cromatografia de fase sólida, a cromatografia líquida de alta eficiência e as técnicas hifenadas, ou seja a aplicação sequencial de técnicas cromatográficas, tais como a cromatografia líquida, associadas a outras técnicas de detecção e quantificação, tais como a espectrometria de massa e/ou à ressonância magnética nuclear (Sarker, Latif & Gray, 2006).

Uma versão mais eficiente da cromatografia líquida de alta eficiência é a conhecida cromatografia líquida de ultra eficiência, que em comparação com outras abordagens analíticas, aumenta a velocidade de análise, permitindo maior eficiência de separação e resolução e sendo mais sensível e com um consumo máximo de solvente inferior quando comparada com outras técnicas cromatográficas (Brusotti et al., 2014).

No entanto, é mais difícil conceber um protocolo de isolamento de um extracto em bruto, onde os compostos presentes são totalmente desconhecidos. Nesta situação, é aconselhável uma purificação preliminar, que pode ser realizada tendo por base propriedades químicas, por exemplo a lipofilicidade e a hidrofiliabilidade, entre outras. A tradicional partição líquido-líquido, a extracção em fase sólida ou a filtração em gel podem ser utilizadas com a finalidade de remover interferentes (Brusotti et al., 2014).

A biocromatografia é a terminologia para definir um método de detecção bioquímico em linha, com base nas interacções biológicas entre os componentes

activos e alvos imobilizados (proteínas, enzimas, receptores, membranas celulares e membranas biomiméticas) acoplados com cromatografia convencional. A cromatografia de membrana celular, por exemplo, é uma técnica cromatográfica de afinidade biológica útil para o rastreio de componentes activos a partir de matrizes complexas. E uma versão mais recente desta técnica faz uso de sílica revestida com membranas celulares activas, que funcionou como fase estacionária numa cromatografia liquida bidimensional. Esta aproximação tem sido usada em sequência com outras técnicas separativas no *screening* de compostos oriundos de extractos naturais de plantas. Uma aplicação da fase estacionária enzimática foi reportada na literatura para fazer o isolamento de vinte e um derivados de cumarina. Este método permite a partir de uma matriz complexa, como os extractos de plantas, fazer o rastreamento dos compostos de interesse sem a necessidade do pré-fraccionamento (Brusotti et al., 2014).

A electroforese capilar, conhecida pela sua versatilidade, alta eficiência na separação, curtos tempos de análise e reduzido consumo de amostra, ao longo da última década, comprovou ser uma útil ferramenta no estudo das reações enzimáticas (Brusotti et al., 2014).

Estudos recentes têm combinado os doseamentos enzimáticos com a técnica de electroforese capilar, com recurso a um aparelho de electroforese capilar comum ou a um equipamento microfluidico. Estes doseamentos podem ser categorizados em três tipos, dependendo de onde a reacção enzimática ocorre: a) em pré-coluna, b) em coluna, ou c) em pós-coluna (Jiang et al., 2013).

A micronanálise mediada electroforeticamente, baseada na técnica de electroforese capilar em coluna, utiliza soluções de substrato e enzima que são introduzidas no capilar como distintos *plugs*. Sobre a aplicação de determinada voltagem, estas duas zonas, a da enzima e a do substrato, sobrepõem-se uma à outra, devido às suas diferentes mobilidades electroforéticas e a reacção ocorre. A micronanálise mediada electroforeticamente é uma útil ferramenta no doseamento de enzimas e estudos de inibição enzimática (Brusotti et al., 2014; Jiang et al., 2013).

O método de rastreio baseado na enzima imobilizada num suporte funciona como alternativa ao método de electroforese capilar em coluna. Neste método, a

enzima imobilizada pode ser reutilizada, o que se torna muito mais económico. Várias formas de imobilização da enzima têm sido descritas na literatura, contudo apresentam desvantagens, que se prendem com a morosidade dos processos e com a perda de actividade enzimática (Brusotti et al., 2014; Oliveira et al., 2014; Jiang et al., 2013).

Mais recentemente, uma nova abordagem foi proposta para a criação de reactores capilares com a enzima imobilizada por via de uma ligação iónica (Figura 15). Por esta via, a actividade da enzima é maximamente preservada, para além do que permite que seja reutilizada. Apresenta-se como uma solução altamente económica. Neste caso, a preparação da enzima como microreactor envolvia um tratamento da superfície interna do capilar de silica fundida, de forma a que a enzima não fosse absorvida pela superfície do mesmo, que se encontrava carregada negativamente a pH 7,4 (a tirosinase apresenta actividade máxima na gama de pH de 7,0 a 8,0). Por isso, foi necessário modificar a parede do capilar com um forte permutador catiónico, o brometo de hexadimetrina, disposto em bicamada e a enzima disposta no meio, em “sanduíche”. Os resultados eram avaliados pela área do pico de DOPA (produto da reacção), que apresentava um máximo de absorvância a 214nm (Jiang et al., 2013).

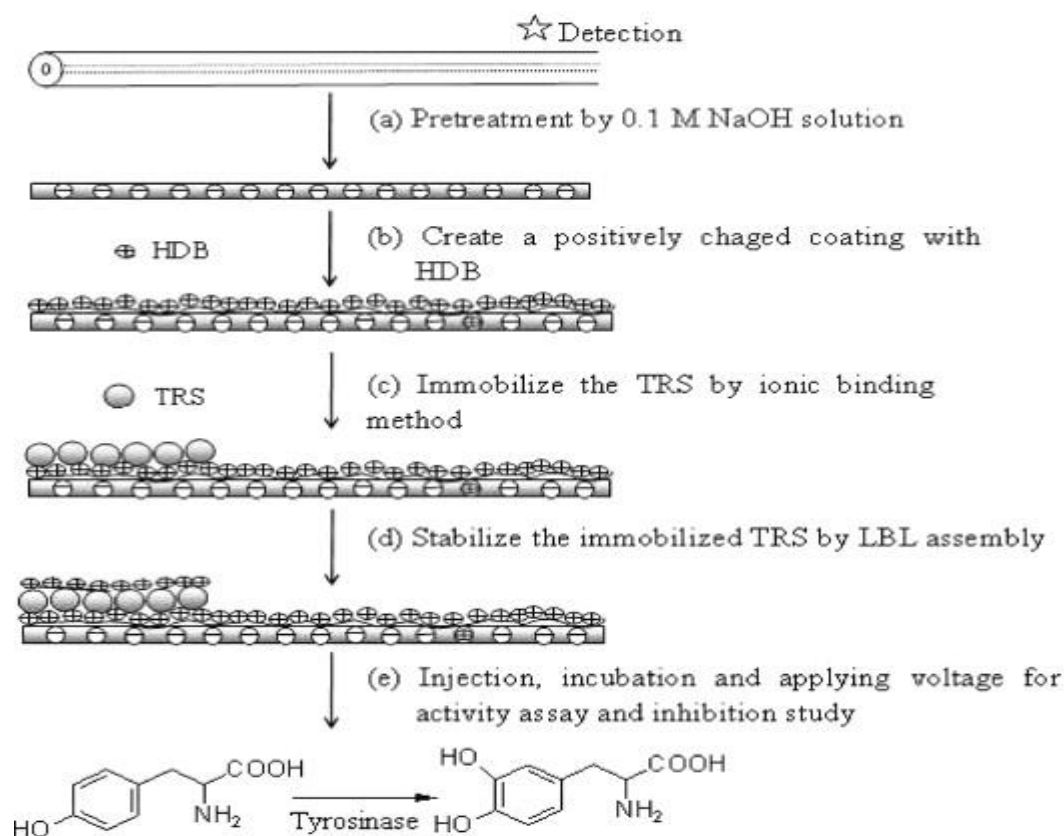


Figura 15: Representação esquemática do reactor de enzima imobilizada por bicamada de brometo de hexadimetrina (Jiang et al., 2013).

Outro variante da electroforese capilar como método de rastreio de inibidores da tirosinase é a electroforese capilar de permuta quiral, a qual permite a separação enantiomérica das moléculas. Nesta técnica os analitos potencialmente separáveis devem exibir a capacidade de complexar com o ião metálico, constituinte do selector quiral, na presença de β -ciclodextrina. Como selector quiral pode ser usado, por exemplo um complexo de Zn(II)-l-alanina ou de Zn(II)-l-leucina (Su, Mu & Qi, 2014; Sun et al., 2013).

Os parâmetros experimentais críticos para o sucesso deste método são: a) a selecção do ião metálico constituinte do selector quiral b) a gama de pH, c) a razão ligando-metal e /ou d) as concentrações de complexo e electrólitos (Su, Mu & Qi, 2014; Chen & Song, 2013; Sun et al., 2013).

Para além de apresentar baixo custo e flexibilidade, a electroforese capilar de permuta quiral tem demonstrado ser eficaz no rastreio dos inibidores da tirosinase (Chen & Song, 2013).

1.4. A comercialização dos inibidores de tirosinases

Apesar de nas últimas décadas os esforços desenvolvidos na pesquisa de novos inibidores de tirosinases terem sido um sucesso, facto é que existem algumas limitações no que concerne à utilização dessas novas moléculas no tratamento de desordens pigmentares da pele, causadas pela desregulação da actividade de tirosinases (Souza et al., 2012; Chang, 2009).

Um dos principais obstáculos à viabilidade e/ou utilidade das descobertas é o facto da maioria dos estudos realizados, com o intuito de encontrar novos inibidores de tirosinases, utilizar enzimas de origem fúngica, em particular a que é extraída do cogumelo *Agaricus bisporus*, disponível comercialmente. A tirosinase de origem fúngica é uma enzima citosólica, enquanto a tirosinase de origem humana encontra-se ligada à membrana dos melanócitos. Também em termos de estrutura são registadas diferenças.

A tirosinase do cogumelo é um tetrâmero, já a humana é um monómero, altamente glicosilada durante o seu processo de maturação. Associado a isto verifica-se ainda um reduzido número de ensaios clínicos efectuados com a enzima da espécie humana, pelo que poucos são os novos inibidores descobertos com aplicação na cosmética (Chang, 2009). Muitas das moléculas identificadas como inibidores da tirosinase apresentam problemas de toxicidade, baixo índice de estabilidade na formulação, de fraco poder de penetração na pele e até mesmo insuficiente ou nula actividade (Chen et al., 2015; Souza et al., 2012).

Para o tratamento de desordens pigmentares, em especial para a hiperpigmentação, existem no mercado os cosmecêuticos (Figura 16), uma classe híbrida entre um fármaco e um cosmético. Os cosmecêuticos são aplicados topicamente tal como os cosméticos, mas contêm princípios activos que melhoram a função biológica da pele. Estes constituem a ponte entre os produtos de cuidado

peçoal e os fármacos, podendo ser classificados quanto ao modo de acção em cinco grandes grupos: a) os inibidores da tirosinase; b) os inibidores da transferência da melanina; c) os que diminuem a oxidação da tirosina; d) os antioxidantes do cobre e inibidores da proliferação dos melanócitos; e e) os alfa-hidroxi ácidos e retinoides (Sarkar, Arora & Garg, 2013).

No entanto, também existem evidências documentadas de compostos comercializados elevada com capacidade inibitória da tirosinase, como é o caso do ácido kójico; da hidroquinona, , da arbutina, da aloesina, do ácido azeláico, da deoxiarbutina e dos corticosteróides, também dos inibidores não-competitivos, como o ácido elágico, a glabridina, a haginina A e o oxiresveratrol, que podem causar reacções adversas, algumas até irreversíveis, durante a sua utilização (Chen et al., 2015; Abdallah, 2014; Sarkar, Arora & Garg, 2013; Jennifer et al., 2012; Souza et al., 2012; Yen et al., 2012; Balakrishnan, 2011). Com excepção da deoxiarbutina e da glabridina, estes compostos suprimem a melanogénese entre 1 a 20%, a concentrações relativamente elevadas, (Nesterov et al., 2008).

A hidroquinona, conhecida como o “tratamento de ouro” da hiperpigmentação, pode ser aplicada isoladamente ou em combinação com outros compostos. A combinação clássica, designada por fórmula de Kligman, consiste na combinação do agente branqueador (hidroquinona 5%), com um agente exfoliante (tretinoína 0.1%) e um esteróide tópico (dexametasona). Outras combinações e modificações à fórmula original têm sido desenvolvidas nos últimos anos, usando diferentes ingredientes e/ou concentrações. A hidroquinona pode causar como efeitos secundários dermatite e irritação da pele em concentrações superiores a 2%, vitiligo, citotoxicidade dos melanócitos provocada por radicais livres de semiquinona, pigmentação pós-inflamatória, fotossensibilidade, ocronose (ou alcaptonúria) - o mais comum efeito secundário crónico da utilização a longo prazo - e cancro da pele (Abdallah, 2014; Sarkar, Arora & Garg, 2013; Souza et al., 2012). Por isso, o uso da hidroquinona como aditivo na cosmética e em produtos para cuidado da pele está proibido (Chen et al., 2015; Abdallah, 2014; Sarkar, Arora & Garg, 2013; Jennifer et al., 2012; Yen et al., 2012).

O mequinol (4-hydroxyanisole, 4-methoxyphenol) é um derivado da hidroquinona, que actua inibindo competitivamente a formação dos precursores da

melanina, mais efectivo que a hidroquinona e apresenta menos efeitos secundários. Está disponível em soluções de 2%, associado com o ácido retinóico a 0,01% (Chatterjee & Vasudevan, 2014).

A arbutina, derivado natural da hidroquinona, é um dos mais prescritos despigmentantes em todo o mundo. A arbutina é um composto natural obtido de folhas secas de uma variedade de espécies, como sejam, por exemplo, as plantas de uva-ursina. É um cosmecêutico que inibe competitivamente a tirosinase, mas fá-lo em concentrações não-citotóxicas e de forma dose-dependente em cultura de melanócitos. Vários estudos revelam que a arbutina é menos efectivo do que o ácido kójico no tratamento da hiperpigmentação e por outro lado apresenta menos efeitos adversos que a hidroquinona (Abdallah, 2014; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Sarkar, Arora & Garg, 2013).

Relativamente ao ácido kójico, é um produto de origem fúngica, que reduz a hiperpigmentação por inibição da tirosinase, em concentrações que variam entre 1% a 4% (Abdallah, 2014; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Sarkar, Arora & Garg, 2013). É geralmente preferido como terapia de segunda linha, quando outras não são bem toleradas. No entanto, o uso de formulações deste composto pode conduzir a dermatites de contacto e até mesmo a mutagénese, para além de ser menos eficaz *in vivo* do que a hidroquinona, motivos pelos quais tem pouca utilização em formulações de cosmecêuticos (Abdallah, 2014; Chatterjee & Vasudevan, 2014; Sarkar, Arora & Garg; Jennifer et al. ,2012; Nesterov et al. ,2008).

O N-acetyl-4-S-cisteaminilfenol é um composto fenólico, que actua como substracto para a tirosinase e assim inibe a sua actividade. É mais estável e menos irritante do que a hidroquinona e obtêm-se alguns resultados da sua aplicação ao fim de um período que pode variar entre duas a quatro semanas (Chatterjee & Vasudevan 2014).

O ácido ascórbico, além do seu efeito antioxidante, afecta a produção de melanina por conversão da dopaquinona na sua forma reduzida, a DOPA. O ácido ascórbico também actua por quelação dos iões de cobre do centro activo da tirosinase, bloqueando desta forma a atividade da mesma. A vantagem de preparações tópicas, com cerca de 5% de ácido ascórbico, é que são praticamente nulos os seus efeitos secundários (Chatterjee & Vasudevan 2014).

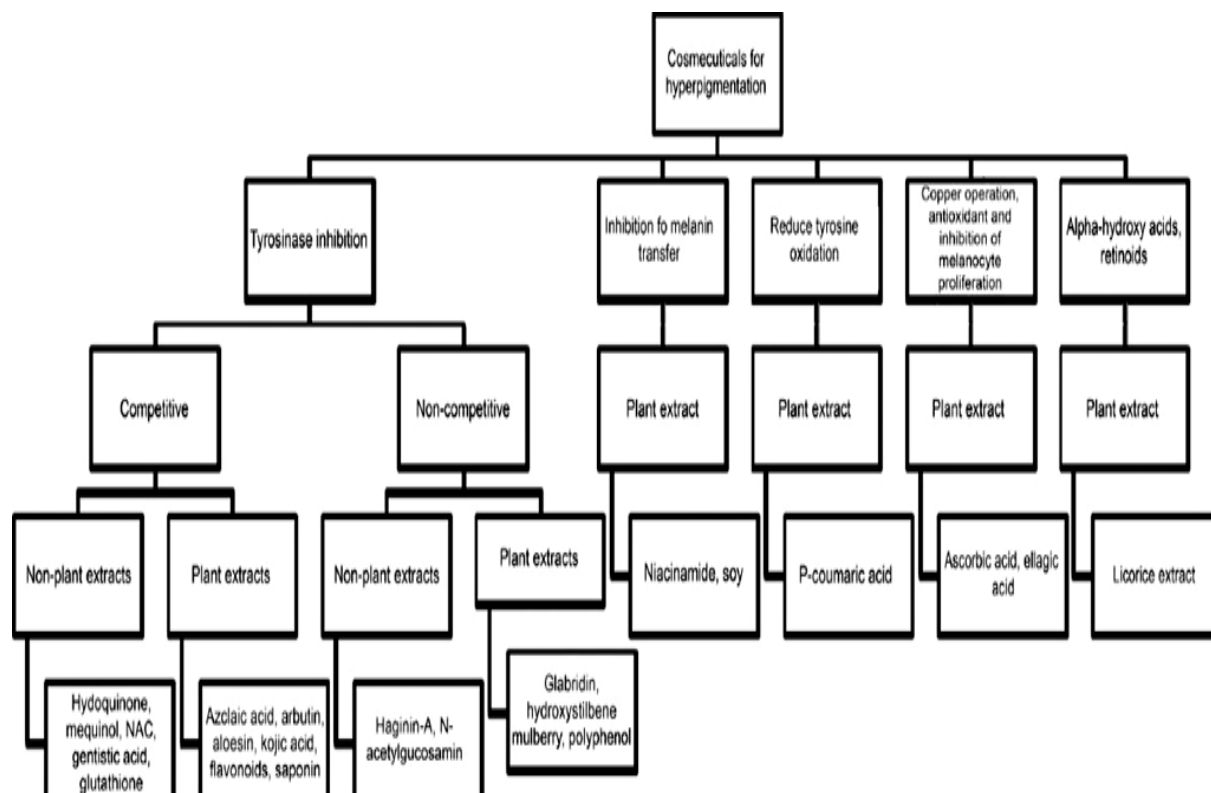


Figura 16: Cosmecêuticos usados no tratamento da hiperpigmentação e classificados segundo o mecanismo de acção (Sarkar, Arora & Garg, 2013).

Pelo anteriormente exposto há uma grande necessidade de desenvolver novos inibidores da tirosinase que provenham de diferentes origens e que possam ser comercializados. A este respeito, os produtos naturais têm surgido como uma alternativa para a indústria de cosméticos, devido ao melhor perfil de segurança que apresentam. Embora a realização de testes *in vivo* com compostos desta proveniência seja limitada, devido à necessidade de grande quantidade do inibidor a ser testado (Chen et al., 2015; Chang et al., 2013; Chang, 2009)

2. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Nas últimas décadas a procura incessante por novos inibidores para a actividade da tirosinase tem tido sucesso, que em parte se deve à disponibilidade comercial da enzima extraída do fungo *Agaricus bisporus*.

Apesar de diferentes tipos e origens de inibidores terem sido encontrados, facto é que os estudos publicados apresentam limitações, nomeadamente por não utilizarem a tirosinase humana nas experiências descritas, mas também pelos novos inibidores descobertos apresentarem elevada toxicidade, baixo nível de estabilidade, deficiente poder de penetração na pele e ainda insuficiente actividade como agentes branqueadores.

A falta de ensaios clínicos em humanos, por seu lado, limita o número de inibidores utilizáveis em formulações cosméticas ou cosmecêuticas, em especial os compostos de origem natural.

Para além do já referido, vários compostos bem conhecidos pela capacidade inibitória de tirosinases, e disponíveis comercialmente como dispigmentantes e branqueadores, exemplo da hidroquinona, do ácido kójico, da arbutina, entre outros, têm-se revelado potencialmente perigosos, causando possíveis reacções adversas, tais como dermatite e irritação da pele, vitiligo, citotoxicidade dos melanócitos, pigmentação pós-inflamatória, fotossensibilidade, ocronose, entre outros.

Pelo exposto anteriormente, é de todo o interesse a contínua procura de novos inibidores da tirosinase em ensaios *in vivo*, demonstrem eficácia satisfatória e garantam um perfil de segurança no tratamento de desordens da hiperpigmentação. Os extractos naturais de origem vegetal assumem-se como as principais fontes desses novos potenciais inibidores. A diversidade química e estrutural de tais metabolitos obriga ao recurso a vários processos de extracção, de purificação e de identificação estrutural, em que as técnicas hifenadas e de biocromatografia representam uma importante ferramenta de triagem rápida do extracto bruto.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdallah, M., 2014. “Melasma, novel treatment modalities”. *Pigmentary Disorders*, 1 (4): 1-9.
- Balakrishnan, K. P., 2011. “Tyrosinase inhibition and anti-oxidant properties of *Muntingia calabura* extracts: in vitro studies”. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 2 (1): 294-303.
- Brusotti, G., Cesari, I., Dentamaro, A., Caccialana, G., Massolini, G., 2014. “Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 87: 218-228.
- Carvalho, N. M. F., Pires, B. M., Antunes, O. A. C. Faria, R. B., Osório, R. E. H.B., Piovezan, C., Neves, A., 2010. “Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten”. *Química Nova*, 33 (7): 1607-1611.
- Chang, C-T., Chang, W-L., Hsu, J-C., Shih, Y., Chou, S-T., 2013. “Chemical composition and tyrosinase inhibitory activity of *Cinnamomum cassia* essential oil”. *Botanical Studies*, 54: 10-17.
- Chang, T-M., 2012. “Tyrosinase and tyrosinase inhibitors”. *Journal of Biocatalysis and Biotransformation*, 1:2.
- Chang, T-S., 2009. “An update review of tyrosinase inhibitors”. *International Journal of Molecular Sciences*, 10: 2440-2475.
- Chatterjee, M., Vasudevan, B., 2014. “Recent advances in melasma”. *Pigment International*, 1 (2): 70-80.
- Chen, W-C, Tseng, T-S, Hsiao, N-W., Lin, Y-L., Wen, Z-H., Tsai, C-C., Lu, Y-C., Lin, H-H., Tsai, K-C., 2015. “Discovery of highly potent tyrosinase inhibitor, T1, with significant anti-melanogenesis ability by zebrafish in vivo assay and computational molecular modelling”. *Scientific Reports*, 5: 7995 (article number).
- Chen, X-X., Shi, Y., Chai, W-M., Feng, H-L., Zhuang, J-X., Chen, Q-X., 2014. “Condensed tannins from *Ficus virens* as tyrosinase inhibitors: structure, inhibitory activity and molecular mechanism”. *PLoS ONE*, 9 (3): e91809: 12 pages, doi :10.1371/journal.pone.0091809 (Consultado a 22 de Março de 2015).
- Chen, Y., Song, L., 2013. “Enantioseparation by chiral ligand-exchange capillary electrophoresis”. *Methods in Molecular Biology*, 970: 393-407.
- Cho, J. Y., 2008, 2008. “Suppressive effect of hydroquinone, a benzene metabolite, on in vitro inflammatory responses mediated by macrophages,

- monocytes, and lymphocytes”. *Mediators of Inflammation*, Article ID 298010:11 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2008/298010> (Consultado a 30/04/2015)
- - Chowdhury, W. K., Wahab, M. A., Khondker, L., Anwar, M.H., Khan, M.S.I., 2012. “Efficacy and safety of hydroquinone, kojic acid and glycolic acid combination in the treatment of melasma”. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 11 (3): 191-196.
 - Draelos, Z. D., Yatskayer, M., Bhushan, P., Pillai, S., Oresajo, C., 2010. “Evaluation of a Kojic Acid, Emblica Extract, and Glycolic Acid Formulation Compared With Hydroquinone 4% for Skin Lightening”. *Therapeutics for the Clinician – Cutis: Cutaneous Medicine for the Practitioner*, 86: 153-158.
 - Gheibi, N., Taherkhani, N., Ahmadi, A., Haghbeen, K., Ilghari, D., 2015. “Characterization of inhibitory effects of the potential therapeutic inhibitors, benzoic acid and pyridine derivatives, on the monophenolase and diphenolase activities of tyrosinase.” *Iranian Journal Basic Medical Sciences*, 18: 122-129.
 - Jaeger K. E., Eggert, T., 2004. "Enantioselective biocatalysis optimized by directed evolution." *Current Opinion in Biotechnology*, 15 (4): 305–313.
 - Jawiad, S., Khan, T. H., Osbom, H. M. I., Williams, N. A. O., 2009. “Tyrosinase activated melanoma prodrug”. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9 (7): 717-727.
 - Jennifer, C., Stephanie, C. M., Abhishki, S. B., Shalini, B.V., 2012. “A review of skin whitening property of plant extracts”. *International Journal of Pharmaceutical Biological Sciences*, 3 (4): 332-347.
 - Jiang, T-F., Liang, T-T., Wang, Y-H., Zhang, W-H., 2013. “Immobilized capillary tyrosinase microreactor for inhibitor screening in natural extracts by capillary electrophoresis”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84: 36-40.
 - Khan, A. A., Alzohairy, M. A., 2010. “Recent advances and applications of immobilized enzyme technologies: a review”. *Research Journal of Biological Sciences*, 5 (8): 565-575.
 - Koo, J.H., Rhee, K.S., Koh, H.W., Jang, H.Y., Park, B.H., Park, J.W., 2012. “Guggulsterone inhibits melanogenesis in B16 murine melanoma cells by downregulating tyrosinase expression”. *International Journal of Molecular Medicine*, 30: 974-978.
 - Koshland D. E., 1958. "Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 44 (2): 98–104.
 - Lee, A-Y., 2014. “An update review of melasma pathogenesis”. *Dermatologica Sinica*, 32: 233-239.

- Lehninger, A. L., 1985. “Princípios de bioquímica”. São Paulo: Savier.
- Marougin, B., Piras, A., Procedda, S., Tuveri, E., Sanjust, E., Melli, M., Sollai, F., Zucca, P., Rescigno, A., 2007. “Supercritical CO₂ extract of *Cinnamomum zeylanicum*: Chemical characterization and antityrosinase activit”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1002-10027.
- Nesterov, A., Zhao, J., Minter, D., Hertel, C., Ma, W., Abeysinghe, P., Hong, M., Jia, Q., 2008. “1-(2,4-Dihydroxyphenyl)-3-(2,4-dimethoxy-3-methylphenyl) propane, a Novel Tyrosinase Inhibitor with Strong Depigmenting Effects”. *Chemical Paharmaceutical Bulletin*, 56 (9): 1292-1296.
- Oliveira, K. B., Mischiatti, K. L., Fontana, J. D., Oliveira, B. H., 2014. “Tyrosinase immobilized enzyme reactor: Development and evaluation”. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 945-946: 10-16.
- Park, J., Sung, N-D., 2011. “3D-QSAR analysis and molecular docking of thiosemicarbazone analogues as a potent tyrosinase inhibitor”. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32 (4): 1241-1248.
- Rychlińska, I., Nowak, S., 2012. “Quantitative Determination of Arbutin and Hydroquinone in Different Plant Materials by HPLC”. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 40 (2): 109-113.
- Rossi, A., Renez, M. I., 2011. “Cosmetic concerns in melasma, Part 1: Pathogenesis and clinical considerations”. *Cosmetic Dermatology*, 24 (11): 511-513.
- Sarkar, R., Arora, P., Garg, K. V., 2013. “Cosmeceuticals for hiperpigmentation: what is available?”. *Journal of Cutaneous and Aesthetic surgery*, 6 (1): 4-11.
- Sarker, S. D., Latif, Z., Gray, A. I., 2006. “Methods in Biotechnology – Natural Products Isolation”, 2nd Ed. Humana Press: 1-26.
- Souza, P. M., Elias, S. T., Simeoni, L. A., Paula, J. E., Gomes, S. M., Guerra, E. N. S., Fonsca, Y. M., Silva, E. C., Silveira, D., Magalhães, P. O., 2012. “Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity”. *PLoS ONE*, 7 (11): e48589: 7 pages, doi:10.1371/journal.pone.0048589 (Consultado a 22 de Março de 2015).
- Stryer, L., 1995. “Biochemistry”, 4th Ed., Chapter 8. W. H. Freeman and Company: 181-204.
- Su, Y., Mu, X., Qi, L., 2014. “A new chiral ligand exchange capillary electrophoresis system based on Zn (II)-L-leucine complexes coordinating with β -cyclodextrin and its applications in screening tyrosinase inhibitors”. *Royal Society of Chemistry Advances*, 4: 55280-55285.

- Sun, B., Mu, X., Qiao, J., Wang, M., 2013. “A chiral exchange CE system for monitoring inhibitory effect of kojic acid on tyrosinase”. *Talanta*, 116: 1121-1125.
- Thongchai, W., Liawruangrath, B., Liawruangrath, A., 2007. “High-performance liquid chromatographic determination of arbutin in skin-whitening creams and medicinal plant extracts”. *Journal of Cosmetic Science*, 58: 35-44.
- Uchida, R., Ishikawa, S., Tomoda, H., 2014. “Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol”. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 4 (2): 141-145.
- Yen, F. L., Wang, M. C., Liang, C. J., Ko, H. H., Lee, C.W., 2012. “Melanogenesis inhibitor(s) from *Phyllanthus nodiflorus* extract”. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Article ID 867494: 9 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/867494> (Consultado a 22 de Março de 2015).
- ^aZaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., Naaz, I., 2014. “Microbial tyrosinases: promising enzymes for pharmaceutical, food bioprocessing, and environmental industry”. *Biochemistry Research International*, Article ID 854687: 16 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/854687> (Consultado a 22 de Março de 2015).
- ^bZaidi, K. U., Ali, A. S., Ali, S. A., 2014. “Purification and characterization of melanogenic enzyme tyrosinase from button mushroom”. *Enzyme Research*, Article ID 120739: 6 pages, <http://dx.doi.org/10.1155/2014/120739> (Consultado a 03 de Abril de 2015).
- Zhang, H., Zhou, Q., 2013. “Tyrosinase inhibitory effects and antioxidative activities of saponins from *Xanthoceras sorbifolia* nutshell”. *PLoS ONE*, 8 (8): e70090: 6 pages, doi :10.1371/journal.pone.0070090 (Consultado a 22 de Março de 2015).