

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS EM  
ATIVIDADES PIGMENTARES**

**NATHÁLIA LUANA CECCHET**

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS EM  
ATIVIDADES PIGMENTARES**

**NATHÁLIA LUANA CECCHET**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Latino-  
Americano de Ciências da Vida e da  
Natureza da Universidade Federal da  
Integração Latino-Americana, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo  
Zambrano Passarini

Coorientador: Prof. Dr. Arthur da Silveira  
Prudente

NATHALIA LUANA CECCHET

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE FUNGOS MARINHOS EM  
ATIVIDADES PIGMENTARES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Latino-  
Americano de Ciências da Vida e da  
Natureza da Universidade Federal da  
Integração Latino-Americana, como  
requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
UNILA

---

Prof. Dr. Arthur da Silveira Prudente  
University of Cincinnati

---

Prof. Dr. Kelvinson Fernandes Viana  
UNILA

Foz do Iguaçu, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## TERMO DE SUBMISSÃO DE TRABALHOS ACADÊMICOS

Nome completo do autor(a): Nathália Luana CecchetCurso: Biotecnologia

Tipo de Documento	
(x) graduação	(.....) artigo
(.....) especialização	(x) trabalho de conclusão de curso
(.....) mestrado	(.....) monografia
(.....) doutorado	(.....) dissertação
	(.....) tese
	(.....) CD/DVD – obras audiovisuais
	(.....) _____

Título do trabalho acadêmico: Potencial Biotecnológico de Fungos Marinhos em Atividades PigmentaresNome do orientador(a): Michel Rodrigo Zambrano PassariniData da Defesa: 18/12/2020**Licença não-exclusiva de Distribuição**

O referido autor(a):

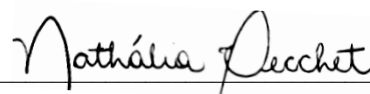
a) Declara que o documento entregue é seu trabalho original, e que o detém o direito de conceder os direitos contidos nesta licença. Declara também que a entrega do documento não infringe, tanto quanto lhe é possível saber, os direitos de qualquer outra pessoa ou entidade.

b) Se o documento entregue contém material do qual não detém os direitos de autor, declara que obteve autorização do detentor dos direitos de autor para conceder à UNILA – Universidade Federal da Integração Latino-Americana os direitos requeridos por esta licença, e que esse material cujos direitos são de terceiros está claramente identificado e reconhecido no texto ou conteúdo do documento entregue.

Se o documento entregue é baseado em trabalho financiado ou apoiado por outra instituição que não a Universidade Federal da Integração Latino-Americana, declara que cumpriu quaisquer obrigações exigidas pelo respectivo contrato ou acordo.

Na qualidade de titular dos direitos do conteúdo supracitado, o autor autoriza a Biblioteca Latino-Americana – BIUNILA a disponibilizar a obra, gratuitamente e de acordo com a licença pública *Creative Commons* **Licença 3.0 Unported**.

Foz do Iguaçu, 18 de janeiro de 2021.



Assinatura do Responsável

Dedico este trabalho às minhas avós, minhas segundas mães, que sempre cuidaram de mim, mesmo à distância, com um carinho infinito e um amor incondicional.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à Deus e minha família, por serem minha base, minha força e meus exemplos. Obrigada pai e mãe, pela minha educação, por acreditarem em mim e por sempre me incentivarem a correr atrás dos meus sonhos. Também deixo um agradecimento especial aos meus filhos caninos, mesmo os que já se foram, pelo amor mais puro e incondicional que já conheci.

A todos os professores que contribuíram com a minha formação e foram também grandes amigos. Em especial, gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Arthur da Silveira Prudente, por ter aceitado me orientar e me apresentar esse mundo maravilhoso da pesquisa nessa área com a qual me identifiquei tanto. Obrigada por sempre estar presente, por nunca poupar esforços para me ajudar, por ter sido tão atencioso e paciente. Ao meu coorientador, Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini, por ter me oferecido minhas primeiras oportunidades. Obrigada pelos 3 anos de orientação e muito esforço que foram essenciais para o meu crescimento pessoal e profissional.

A minha colega de laboratório e uma das minhas melhores amigas, Hellen Carriel, por ter me acompanhado nessa jornada, pela ajuda com tantos experimentos, pela paciência, colo e apoio incondicional nos momentos mais difíceis. Obrigada por ser tanta luz na minha vida.

As minhas amigas Julia Yumi e Rafaela Favato, por serem as melhores irmãs que Deus colocou no meu caminho. Obrigada por todos os melhores momentos compartilhados da minha jornada acadêmica, que com certeza vão ficar gravados para sempre na memória. Vocês foram minha família, meu ponto de apoio nos momentos mais difíceis, o motivo das minhas melhores risadas.

Às minhas amigas Patrícia e Nathalia, que me acompanham desde o primeiro dia de aula, por tornarem os meus dias mais leves e alegres. Obrigada por sempre me motivarem e acreditarem em mim. Vocês me ensinaram o que é uma amizade verdadeira, o que é companheirismo e me mostraram que os estudos podem ser divertidos quando estamos com as pessoas certas.

Agradeço à Universidade Federal da Integração Latino Americana por ter me possibilitado cursar o que sempre sonhei.

E por fim, um agradecimento à turma de Biotecnologia de 2015, por ter sido a melhor turma que a UNILA já teve.

“O próprio Senhor irá à sua frente e estará com você; ele  
nunca o deixará, nunca o abandonará. Não tenha medo!  
Não desanime!”  
**Deuteronômio 31:8**

CECCHET, Nathália Luana. **Potencial biotecnológico de fungos marinhos em atividades pigmentares**. 2020. 40. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

## RESUMO

O ecossistema marinho oferece uma ampla diversidade de compostos que permanecem inexplorados e que apresentam grande potencial como agentes clarificantes, antioxidantes, anti-inflamatórios, imunomodulatórios e antimicrobianos. Os microrganismos são importantes fontes de compostos ativos e os fungos e seus produtos metabólicos são muito estudados para tratamento de distúrbios pigmentares da pele. Assim, neste trabalho é avaliado o potencial de fungos marinhos como sintetizadores de biomoléculas com propriedades pigmentantes ou despigmentantes da melanina a partir da obtenção de extratos fúngicos. Dos seis fungos testados, apenas um apresentou resultados significativos. Ensaio de atividade de tirosinase de cogumelo foram conduzidos para verificar o efeito do extrato sobre a enzima. Para determinar o modo de inibição da enzima na tirosinase, a análise cinética do extrato foi realizada com substratos de L-tirosina e L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA). Os resultados demonstraram que o extrato inibiu significativamente a atividade da tirosinase, através da inibição competitiva com o substrato. Pode-se concluir então que fungos marinhos apresentam potencial como inibidores da melanogênese, podendo ser utilizados em aplicações clínicas e cosméticas de clareamento da pele.

**Palavras-chave:** fungo, marinho, melanina, pigmentares



CECCHET, Nathália Luana. **Biotechnological potential of marine fungi in pigmentary activities**. 2020. 40. Undergraduate thesis (Biotechnology Graduation) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2020.

### **ABSTRACT**

The marine ecosystem offers a wide variety of compounds that remain untapped and that have great potential as clarifying, antioxidant, anti-inflammatory, immunomodulatory and antimicrobial agents. Microorganisms are important sources of active compounds and fungi and their metabolic products are widely studied for the treatment of skin pigment disorders. Thus, in this work, the potential of marine fungi as synthesizers of biomolecules with pigmenting or depigmenting properties of melanin from the obtaining of fungal extracts is evaluated. Of the six fungi tested, only one showed significant results. Mushroom tyrosinase activity tests were conducted to verify the effect of the extract on the enzyme. To determine the mode of inhibition of the enzyme in tyrosinase, the kinetic analysis of the extract was performed with substrates of L-tyrosine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA). The results showed that the extract significantly inhibited tyrosinase activity, through competitive inhibition with the substrate. It can then be concluded that marine fungi have potential as inhibitors of melanogenesis and can be used in clinical and cosmetic applications for skin whitening.

**Key-words:** fungi, marine, melanin, pigmentary

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Esquematização da conexão entre melanócitos e queratinócitos.....	16
<b>Figura 2</b> – Síntese de eumelanina e feomelanina catalisada pela TYR.....	17
<b>Figura 3</b> – Três principais vias de sinalização responsáveis pela regulação da melanogênese.....	18
<b>Figura 4</b> – Triagem dos extratos marinhos.....	29
<b>Figura 5</b> – Análise do efeito da variação da concentração do extrato FM17-43.....	30
<b>Figura 6</b> – Efeito da variação de tempo.....	31
<b>Figura 7</b> – Padrão da inibição da tirosinase.....	32

## **LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1</b> - Compostos mais utilizados no tratamento de distúrbios pigmentares.....	21
--	----

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACES

Abs	Absorbância
AC	Adenilil ciclase
ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
AMPc	3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico
ASP	Proteína Sinalizadora Agouti
b-FGF	Fator Básico de Crescimento de Fibroblastos
CREB	Proteína de Ligao ao Elemento de Resposta cAMP
DAG	Diacilglicerol
DHI	Di-hidroxi-indole
DHICA	Di-hidroxiindole-2-carboxílico
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DQ	Dopaquinona
EDN-1	Endotelina-1
EDNBR	Receptor de Endotelina B
IFN $\gamma$	Interferon gama
IL13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IP3	Inositol
L-DOPA	L-di-hidroxifenilalanina
MC1R	Receptor de Melanocortina 1
mDO	Mili densidade tica
MIF	Fator Inibitório de Migrao de Macrófagos
MITF	Fator de Transcrio Associado  Microftalmia
MRP	Proteína Relacionada  Melanogênese
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NO	xido Ntrico
PAR-2	Receptor Ativado por Protease 2
PBS	Soluo Salina Tamponada com Fosfato
PDB	Caldo de Batata Dextrose

PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
Pmel17	Proteína da Matriz Melanosomal
PPO	Polifenol Oxidase
RNA	Ácido Ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
SCF	Fatores de células-tronco
SFB	Soro Fetal Bovino
TRP-1	Proteína 1 Relacionada à Tirosinase
TRP-2	Proteína 2 Relacionada à Tirosinase
TYR	Tirosinase de Taxa Limitante de Oxigenase
UV	Ultravioleta
$\alpha$ -MSH	Hormônio Estimulador de $\alpha$ -melanócito

## SUMÁRIO

<b>1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>15</b>
1.1. Pele .....	15
1.2. Melanogênese .....	16
1.3. Compostos usados para tratamento de distúrbios pigmentares .....	20
1.4. Potencial biotecnológico de fungos em aplicações cosméticas .....	21
<b>2. HIPÓTESE .....</b>	<b>24</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Objetivos Gerais .....	25
3.2. Objetivos Específicos .....	25
<b>4. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>26</b>
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
5.1. Triagem de fungos .....	27
5.2. Preparo do extrato fúngico .....	27
5.3. Preparo da solução de substrato .....	27
5.4. Preparo de solução da tirosinase .....	27
5.5. Ensaio de atividade da tirosinase de cogumelo .....	27
5.6. Estudos cinéticos .....	28
5.7. Análises estatísticas .....	28
<b>6. RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
6.1. Efeito dos extratos marinhos sobre a atividade da tirosinase .....	29
6.2. Efeito inibitório do extrato FM17-43 sobre a tirosinase .....	29
6.3. Efeito da variação do tempo sobre a atividade da tirosinase .....	30
6.4. Padrão de inibição de tirosinase de cogumelo pelo extrato FM17-43 .....	31
<b>7. DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>8. CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>38</b>

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1. Pele

A pele humana é um órgão sensorial que apresenta diversas funções importantes ao organismo. Sua flexibilidade permite o movimento e ela também oferece uma barreira física que protege o corpo contra a radiação ultravioleta solar (UV), infravermelha e de luz visível, poluição ambiental e química bem como lesões e perda de água. Além disso, ela garante um controle da temperatura corporal e está relacionada a regulação imunológica (SERRE et al., 2018).

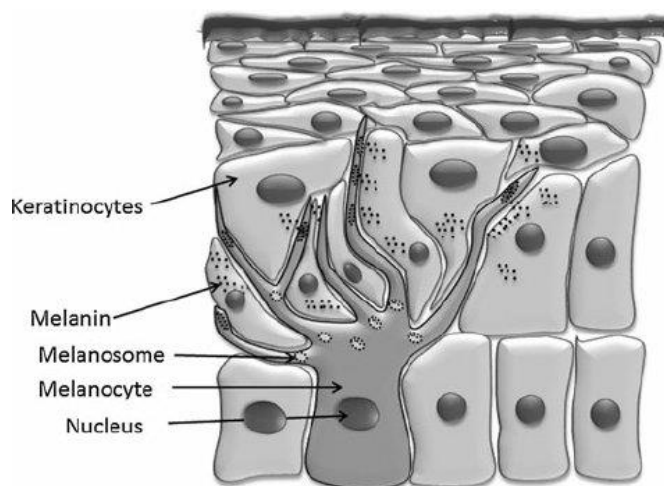
A pele utiliza um mecanismo de pigmentação para se proteger da irradiação solar, que depende de níveis geneticamente determinados de produção de melanina e de diversos fatores intrínsecos e extrínsecos (SERRE et al., 2018). A pigmentação da pele é regulada intrinsecamente principalmente por melanócitos na epiderme, que sintetizam a melanina, e os queratinócitos, que a distribuem. Outros fatores intrínsecos incluem os fibroblastos na derme, fatores endócrinos, fatores neurais e fatores relacionados à inflamação. O principal fator extrínseco que afeta a pigmentação é a exposição à radiação UV (YAMAGUCHI e HEARING, 2009).

Os melanócitos são células dendríticas derivadas da crista neural durante a embriogênese, que migram como melanoblastos para a epiderme e folículos capilares. Eles são conectados por seus dendritos a aproximadamente 36 queratinócitos, formando a unidade epidérmica de melanina (figura 1) (D'MELLO et al., 2016; DEL BINO et al., 2018). Os melanócitos contêm organelas chamadas de melanossomos, semelhantes a lisossomos, que armazenam os pigmentos de melanina para posterior transferência aos queratinócitos. Quatro mecanismos são mais conhecidos nesse processo: (1) citofagocitose da ponta do dendrito de melanócitos por queratinócitos; (2) fusão das membranas plasmáticas dos queratinócitos e melanócitos; (3) derramamento de estruturas ricas em melanossomas que são fagocitadas por queratinócitos; e (4) endocitose ou exocitose do melanocore no espaço extracelular e consequente internalização pelo queratinócito (COSTIN e HEARING, 2007).

A melanina é um polímero que absorve luz em um amplo espectro de comprimentos de onda, produzindo a grande variedade observada na cor da pele e cabelo humanos (MERGHOUB et al., 2008). É sintetizada e distribuída pelos melanócitos da camada basal da epiderme, em um processo denominado melanogênese, e está associada principalmente a função de fotoproteção, termorregulação, ação dissipadora de radicais livres, quelantes de

cátions e antibióticos. Duas classes de melanina são conhecidas: a eumelanina (responsável pela pigmentação marrom-preto) e a feomelanina (responsável pela pigmentação laranja-vermelho). Nos mamíferos, a eumelanina é mais onipresente, sendo encontrada na pele, cabelos, olhos, ouvido interno e cérebro (MOHORČIČ et al., 2007).

Figura 1: Esquematização da conexão entre melanócitos e queratinócitos



Fonte: (GUPTA et al., 2013)

## 1.2. Melanogênese

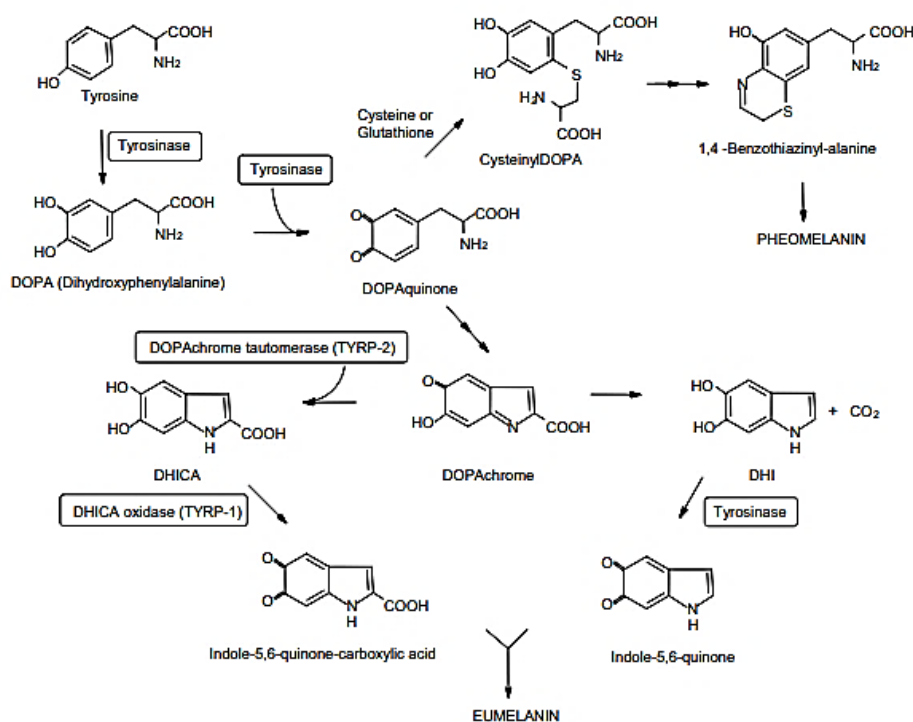
A tirosinase, também conhecida como polifenol oxidase (PPO), é a enzima chave na melanogênese, pois catalisa a oxidação da tirosina, dando início à biossíntese de melanina (HSU et al., 2016). As tirosinases são famílias de metaloenzimas encontradas em diversos domínios da vida. Quando a melanina é depositada de forma anormal, pode acarretar uma série de distúrbios de pigmentação, classificados como hipo ou hiperpigmentação, como vitiligo, melasma, sardas, efélides e lentigos senis (UCHIDA et al., 2014).

Três enzimas principais estão envolvidas na via da melanogênese: TYR (tirosinase de taxa limitante de oxigenase), TRP-1 (proteína 1 relacionada à tirosinase) e TRP-2 (proteína 2 relacionada à tirosinase), sendo apenas a primeira essencial para o processo (PILLAIYAR et al., 2017). A TYR é uma proteína de cobre do tipo 3 ligada à membrana do melanosoma, a qual é produzida apenas por melanócitos. Sua atividade catalítica se deve a sua estrutura de dois íons de cobre, cada um envolvido por três histidinas. Os átomos de cobre são responsáveis pela hidroxilação de monofenóis a difenóis e oxidação de o-difenóis em o-quinonas (NIU e AISA, 2017). Uma deficiência de cobre pode levar a despigmentação cutânea difusa (BOLOGNIA et al., 2015).



A síntese de melanina (figura 2) é catalisada pela TYR e iniciada com a hidroxilação de L-tirosina a L-di-hidroxfenilalanina (L-DOPA), que é então oxidada a DOPAquinona (DQ). A DQ é utilizada como substrato para a produção de eumelanina e feomelanina. Na presença de cisteína, a DQ reage e forma DOPAs de 3 ou 5-cisteinil que oxidam, formando intermediários benzotizínicos, e polimerizam, originando feomelaninas (PILLAIYAR et al., 2017). Por outro lado, a DQ pode também ser ciclizada intracelularmente, produzindo um leucodofacromo (ciclodopa) que interage com DQ em uma reação redox e origina dopacromo e DOPA. O DOPA pode ser oxidado novamente para DQ, enquanto que o dopacromo é decomposto para formar di-hidroxi-indole (DHI) e o ácido di-hidroxiindole-2-carboxílico (DHICA), em uma reação catalisada pela TRP-2. Os dois produtos da reação são então oxidados à eumelanina, catalisados por TRP-1 (PILLAIYAR et al., 2016). A reação de oxidação sequencial catalisada por TYR pode prosseguir espontaneamente em pH fisiológico.

Figura 2: Síntese de eumelanina e feomelanina catalisada pela TYR.

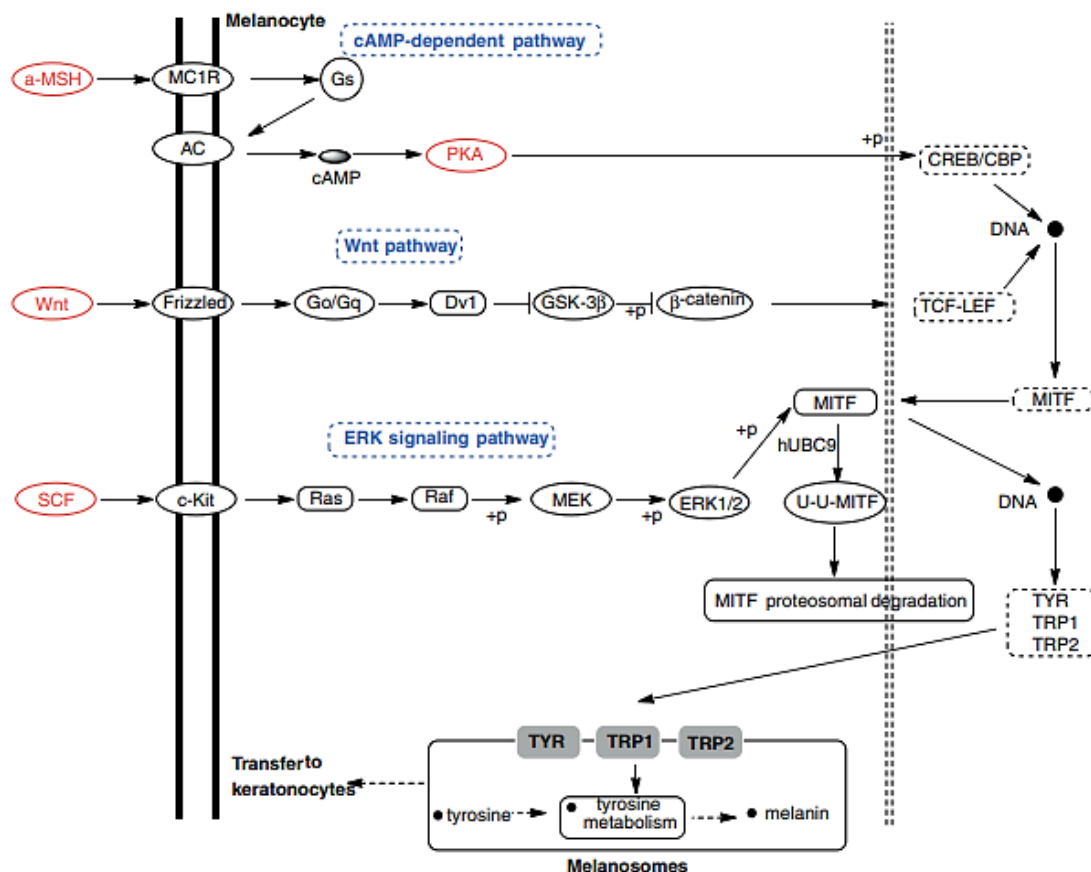


Fonte: (EBANKS et al., 2009)

A melanogênese é regulada intracelularmente por uma cascata de sinalização (figura 3) dependente principalmente de TYR, TRP-1 e TRP-2 (PILLAIYAR et al., 2015). O aumento da melanogênese induzido por radiação ultravioleta B (UVB) inclui três etapas importantes:

proliferação dos melanócitos, síntese de melanina e transferência dos melanossomas para os queratinócitos. Quando expostos à radiação UVB, os queratinócitos secretam fatores conhecidos como mitógenos para melanócitos humanos, que incluem: hormônio estimulador de  $\alpha$ -melanócito ( $\alpha$ -MSH) e seu receptor, receptor de melanocortina 1 (MC1R), endotelina-1 (EDN-1) e seu receptor, receptor de endotelina B (EDN -BR), interleucina2 (IL-2), fator básico de crescimento de fibroblastos (b-FGF), fatores de células-tronco (SCF), óxido nítrico (NO), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), prostaglandinas, leucotrienos, dinucleotídeo timidina e histamina (PILLAIYAR et al., 2017). O fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) é o principal regulador da melanogênese, agindo por ligação à sequências da caixa M de uma região promotora, regulando assim a expressão dos genes relacionados a TYR, TRP-1 e TRP-2 (PILLAIYAR et al., 2015).

Figura 3: Três principais vias de sinalização responsáveis pela regulação da melanogênese



Fonte: (PILLAIYAR et al., 2015)

A produção de melanina nos melanócitos é controlada principalmente pelo receptor da melanocortina 1 (MC1R), regulado pelos agonistas: hormônio estimulador de melanócitos ( $\alpha$ -

MSH) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), e antagonista: proteína sinalizadora Agouti (ASP) (YAMAGUCHI et al., 2007). O MC1R é um dos principais receptores relacionados à regulação da cor da pele e cabelo em mamíferos. Ao se ligar ao MC1R, o  $\alpha$ -MSH ativa a adenilil ciclase (AC) e resulta na produção de 3'5'-adenosina-monofosfato-cíclico (AMPc), que promove a ativação da proteína quinase A (PKA). Esta, por sua vez, ativa a expressão de MITF, por meio da fosforilação da proteína do elemento de resposta AMPc (CREB), regulando então a transcrição de genes pigmentares importantes que codificam proteínas relacionadas à melanogênese (MRPs) por meio de sua ligação à caixas M e E das regiões promotoras de TYR, TYRP-1 e TYRP-2 (PILLAIYAR et al., 2015).

O MITF também é importante na regulação da expressão da proteína Rab27a, envolvida no transporte do melanossoma e proteína da matriz melanossomal (Pmel17) (PILLAIYAR et al., 2017). Ele também regula a nível transcricional as vias de interleucina-6 (IL-6) e Wnt (EBANKS et al., 2009).

A via de sinalização Wnt ocorre por meio da ligação de lipoglicoproteínas WNT a um receptor acoplado à proteína G, chamado Frizzled. A ligação desencadeia uma cascata intracelular de eventos que pode envolver sua forma canônica ou não canônica (SERRE et al., 2018). Na via canônica ocorre a inativação da glicogênio sintase quinase-3b e um subsequente acúmulo de  $\beta$ -catenina. Esta é então transportada para o núcleo e forma um complexo de dois fatores, fator potenciador linfoide e fator de células T, que aumenta a expressão do gene MITF, estimulando a melanogênese (PILLAIYAR et al., 2015).

O fator de células-tronco (SCF) é uma citocina parácrina produzida por queratinócitos, fibroblastos e células endoteliais (LI et al., 2018), em resposta a diversos estímulos, incluindo o envelhecimento, e está envolvida no ciclo de vida dos melanócitos humanos, além da regulação da sua diferenciação e proliferação. Sua expressão depende de diversos fatores, entre eles, fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), receptor ativado por protease 2 (PAR-2) e EDNs. O MIF é conhecido como L-dopacromo isomerase, tautomerização do dopacromo ao ácido 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico, e é um importante indutor da expressão do receptor PAR-2 (PILLAIYAR et al., 2017).

O PAR-2 pertence a famílias de receptores acoplados a proteína G ativados na clivagem por uma serina-protease e está envolvido na regulação da transferência de melanossomos via fagocitose por queratinócitos. As endotelinas (EDNs) interagem com seu receptor acoplado à proteína G, o receptor EDNRB. A EDN-1 induz a melanogênese através de sua ligação ao receptor e promoção da hidrólise do polifosfinositida pela fosfolipase  $C\gamma$ , formando inositol (IP3) e diacilglicerol (DAG) e ativando a PKC. A PKC então fosforila o RAF ou RAF-1, a

proteína inibidora que ativa o Raf-1, e este leva à ativação da cascata MAPK via fosforilação (PILLAIYAR et al., 2017).

As citocinas e mediadores inflamatórios produzidos por células da pele também são importantes reguladores da melanogênese. A exposição à radiação UV induz uma resposta inflamatória que envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias. Estudos desenvolvidos por Choi et al. (2012) descreveram o papel de interferon gama ( $\text{IFN}\gamma$ ), IL-4 e IL-17A na melanogênese. Eles demonstraram que a IL-4 inibe a melanogênese através da via de sinalização JAK2-STAT6, enquanto  $\text{IFN}\gamma$  e IL-17A aumentam a síntese de uma citocina IL-6 antimelanogênica. Semelhantemente, foi demonstrado que a IL-13 reduziu significativamente a expressão do RNA e a quantidade de proteínas TYR e TRP-2, diminuindo então a produção de melanina (CHOI et al., 2012; PILLAIYAR et al., 2017).

### 1.3. Compostos usados para tratamento de distúrbios pigmentares

Alguns dos compostos mais comumente utilizados em produtos para tratamento de distúrbios pigmentares hiperpigmentantes incluem a hidroquinona, retinóides, sais de mercúrio, ácido kójico, corticosteroides, entre outros (BURGER et al., 2016). Entretanto, existem diversas complicações cutâneas resultantes de seu uso. A hidroquinona, um dos compostos clareadores mais populares, pode causar dermatite de contato, descoloração das unhas, pigmentação conjuntival, melnose, degeneração corneana, neuropatia periférica, redução da elasticidade da pele e problemas na cicatrização de feridas. Há também relatos de associação da hidroquinona com o câncer de pele (LADIZINSKI et al., 2011). Estudos em animais utilizando o ácido kójico, um dos compostos mais conhecidos produzidos por fungos e muito utilizado em associação à hidroquinona, mostrou que esse composto pode promover a inibição irreversível da captação de iodo pela glândula tireoide, podendo resultar na hiperplasia tireoidiana e carcinogênese (GALAPPATTHY e RATHNAYAKE, 2018).

Para o tratamento de distúrbios pigmentares hipopigmentantes, como o vitiligo, as opções são mais limitadas. Entre os compostos que se destacam estão principalmente os das famílias químicas das purinas, piperidinas, flavonoides, cumarinas e esteroides (HERINIAINA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013). De acordo com Niu & Aisa (2017), o reino vegetal tem apresentado uma grande variedade de estruturas químicas com potencial atividade pigmentante. Entretanto, o alvo terapêutico preciso do vitiligo ainda não foi bem estabelecido e, portanto, a maioria dos agentes estimulantes da melanogênese têm como alvo a TYR, promovendo a produção de dopaquinonas. Em excesso, as dopaquinonas podem ocasionar a morte celular e dano neuronal, estando associada a distúrbios degenerativos como a doença de Parkinson. Além

disso, os estudos com a maioria dos estimuladores da melanogênese ainda estão em fase inicial (NIU e AISA, 2017).

Tabela 1: Compostos mais utilizados no tratamento de distúrbios pigmentares.

Composto	Ação	Referências
Ácido kójico	Despigmentante	PEYRAT et al., 2019; GALAPPATTHY e RATHNAYAKE, 2018
Hidroquinona	Despigmentante	BURGER et al., 2016; LADIZINSKI et al., 2011
Retinóides	Despigmentante	SATO et al., 2008
Ácido ascórbico	Despigmentante	PANICH et al., 2011; Tedesco et al. 2017
Flavonóides	Despigmentantes e Pigmentantes	CHEN e KUBO, 2002; HERINIAINA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013
Purinas	Pigmentantes	HERINIAINA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2013
Piperinas	Pigmentantes	MIHAILA et al., 2018

Fonte: Autor

#### 1.4. Potencial biotecnológico de fungos em aplicações cosméticas

Há uma grande busca atualmente por biomoléculas que possam interferir na síntese de melanina. Os microrganismos têm atraído atenção como produtores de compostos com potencial para aplicação em cosméticos ou cosmecêuticos. Eles são ingredientes ativos aplicados como antioxidantes, protetores contra a radiação UV, clareadores da pele, agentes corantes, aromatizantes, estabilizantes e antibacterianos (PEYRAT et al., 2019). Os fungos, especialmente os cogumelos e seus produtos metabólicos, são considerados ingredientes altamente ativos para formulação de produtos cosméticos (HYDE et al., 2010). Entre eles, alguns dos gêneros mais recentemente estudados são: *Ganoderma* spp., *Pleurotus* spp., *Inonotus* spp., *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., *Beauveria* spp. e *Cladosporium* spp.

Os fungos são divididos filogeneticamente nos filos: Chytridiomycota, Blastocladiomycota, Neocallimastigomycota, Microsporidia, Glomeromycota, Ascomycota e

Basidiomycota. Alguns autores ainda não reconhecem o grupo dos Zygomycota e os separam em quatro subfilos: Mucoromycotina, Kickxellomycotina, Zoopagomycotina e Entomophthoromycotina (FORZZA et al., 2010). Os zygomycota são divididos em duas classes e 11 ordens, sendo que apenas dois apresentam espécies de interesse clínico: o Entomophthorales e os Mucorales (GUARRO et al., 1999). Os Zygomycota são caracterizados por um micélio haplóide e cenonítico, um talo haplóide e hifas cuja parede celular é constituída de quitina e quitosana. São fungos geralmente saprófitos ou patógenos fracos (GOULD, 2009).

Diversos compostos extraídos de fungos já foram explorados. O ácido kójico, composto mais conhecido, é produzido por fungos como *Penicillium* sp. e *Aspergillus flavus*, e é composto por 2 grupos -OH que atuam na eliminação de radicais livres e tirosinase. A ação despigmentante do ácido kójico é resultante da falha na conversão da O-quinona em DL-DOPA e dopamina (PEYRAT et al., 2019).

Isolados fúngicos selvagens, como *Sporotrichum pruinosum* e *Aspergillus fumigatus*, também podem ser uma fonte potencial de enzimas que podem ser aplicadas no clareamento da pele. Foi relatado que extratos de *Aspergillus fumigatus* produtores de enzimas degradantes da melanina apresentavam duas vezes mais eficácia do que o ácido kójico no clareamento da pele (PEYRAT et al., 2019).

Um estudo de Falade et al. (2016) explorou a aplicação de enzimas potentes produzidas extracelularmente por uma ampla variedade de fungos basidiomicetos, as ligninas peroxidases (LiP). De acordo com os autores, a lignina peroxidase bruta de *Phanerochaete chrysosporium* demonstrou ser capaz de descolorir a melanina sintética. Além deste, *Sporotrichum pruinosum* e *Ceriporiopsis* sp., degradaram a melanina da pele humana. A eficácia dessas enzimas já foi avaliada em um estudo conduzido por Mauricio et al. (2011) e foi demonstrado que a lignina peroxidase apresentou um efeito clareador da pele muito mais rápido e observável do que o creme constituído de hidroquinona, sem apresentar qualquer efeito adverso (FALADE et al., 2017).

Hsu et al. (2016) descreveram a ação inibitória do extrato de micélios de *Ganoderma formosanum* sobre a tirosinase. A espécie recebeu atenção por apresentar ação como eliminadora de radicais livres e antienvelhecimento, tendo sido também muito utilizada na China na prevenção de doenças. O estudo foi conduzido in vitro com células B16-F10 e in vivo com o modelo animal zebrafish. No modelo in vitro, o extrato de *Ganoderma formosanum* foi capaz de reduzir a síntese de melanina de maneira dose-dependente por suprimir a atividade da tirosinase. O tratamento utilizando o modelo animal mostrou que houve redução significativa do conteúdo de melanina em comparação com os grupos controle, e o extrato testado diminuiu

consideravelmente a atividade da tirosinase com menor dosagem do que o ácido kójico, sem apresentar efeitos adversos significativos (HSU et al., 2016).

Enquanto os demais fungos tratados apresentavam atividade despigmentante, *Pleurotus ostreatus* foi descrito em diversos trabalhos por sua ação pigmentante. A busca por agentes pigmentantes é importante para tratar doenças como o vitiligo. O gênero *Pleurotus* inclui cogumelos comestíveis de alto valor nutricional e medicinal, por apresentarem propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, imunomodulatórias e antimicrobianas (TAOFIQ et al., 2016).

Em estudos de Zaidi e colaboradores (2017), foi demonstrado que os extratos de *Pleurotus ostreatus*, aumentaram significativamente a atividade da tirosinase no citoplasma de células de melanoma B16F10. Conforme constatado por fluorescência, as células tratadas apresentaram grandes dendritos, importantes no transporte de melanosomos aos queratinócitos, e grânulos pigmentados densos (ZAIDI et al., 2017). Semelhantemente, o estudo de Meng et al. (2012) utilizou a espécie *Pleurotus citrinopileatus* para explorar sua atividade pigmentante. A partir do extrato de metanol de *P. citrinopileatus* em células de melanoma B16, foram observados efeitos estimulantes na formação de melanina em várias concentrações. Através da separação por cromatografia dos compostos presentes no extrato, foi determinado que os dois principais compostos envolvidos nesse processo são o mio-inositol e o D-manitol. Acredita-se que sua ação esteja relacionada com a sinalização AMPc (MENG et al., 2012).

A natureza apresenta uma grande variedade de biomoléculas que apresentam potencial para produção de novos produtos farmacêuticos, nutracêuticos e cosmeceuticos. O ambiente marinho ocupa cerca de 70% da superfície da Terra e sua diversidade de organismos representa aproximadamente metade de toda a biodiversidade do planeta. Esse ambiente é relativamente inexplorado para aplicações cosméticas, especialmente devido a restrição a locais mais remotos, como águas profundas (AGRAWAL et al., 2018). Os fungos são membros importantes desse ecossistema e fontes potenciais de moléculas bioativas (CORINALDESI et al., 2017). Diversos extratos de fungos apresentam propriedades clareadoras da pele. Esse conceito vem do princípio de que os fungos podem branquear a madeira e, portanto, também degradar a melanina (MOHORČIČ et al., 2007).

A indústria tem explorado intensamente novos agentes inibidores e estimuladores da tirosinase que possam ser aplicados em tratamentos cosméticos. Atualmente, os inibidores da tirosinase mais conhecidos são o ácido kójico, arbutina e as hidroquinonas. Entretanto, ainda há algumas preocupações relacionadas ao seu uso que devem ser superadas, como efeitos adversos e eficácia a longo prazo (HSU et al., 2016).

## **2. HIPÓTESE**

Fungos marinhos são fontes potenciais de biomoléculas que podem ser aplicadas biotecnologicamente na formulação de produtos cosméticos com atividade estimuladora ou inibidora da tirosinase, afetando o processo de melanogênese.



### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivos Gerais**

Avaliar o potencial biotecnológico de fungos marinhos na geração de compostos que podem ser aplicados na pigmentação e despigmentação de melanócitos.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar se fungos marinhos produzem biomoléculas com potencial para aplicação como cosméticos;
- Determinar se compostos produzidos por fungos marinhos podem estimular a melanogênese para tratamento de distúrbios despigmentantes;
- Determinar se compostos produzidos por fungos marinhos apresentam atividade inibidora da melanogênese para tratamento de distúrbios hiperpigmentantes;
- Analisar os mecanismos de inibição e estímulo da melanogênese.

#### 4. JUSTIFICATIVA

A indústria cosmética representa um dos ramos de maior investimento no mundo. Nos últimos 20 anos, o mercado cresceu aproximadamente 4,5% ao ano, demonstrando uma notável estabilidade. Essa demanda crescente aumentou as preocupações relacionadas à segurança e toxicidade nas formulações (AHSAN, 2019). Assim, o mercado cosmecêutico tem demonstrado grande interesse em desenvolver novos produtos à base de compostos bioativos derivados de recursos naturais (KIM, Se Kwon, 2014).

Aproximadamente três quartos do planeta é coberto por mares e oceanos. Nesse contexto, o ambiente marinho já demonstrou apresentar uma rica diversidade de compostos biologicamente ativos mais seguros e baratos que podem ser produzidos por uma variedade de organismos com metabolismo diferenciado (SALEEM et al., 2007).

Os fungos e seus produtos metabólicos são fontes potenciais de biomoléculas que podem ser aplicadas para tratamento de desordens pigmentares, inibindo ou estimulando a melanogênese. Entretanto, o ambiente marinho permanece pouco explorado (AGRAWAL et al., 2018).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Triagem de fungos

Foram cultivados 6 fungos filamentosos isolados de amostras de algas e de crustáceos, devidamente coletadas no litoral do Paraná, em 2017. Os isolados foram submetidos a ensaios para testar sua habilidade em produzir compostos capazes de realizar pigmentação ou despigmentação da melanina. Para tanto, os isolados preservados foram inicialmente reativados em meio ágar batata dextrose (BDA) (caldo de batata, dextrose, ágar) em estufa à 28 °C. Após 5 dias, as culturas foram transferidas para tubos com meio de caldo de batata dextrose (PDB) (caldo de batata, dextrose) e incubados em shaker à 28 °C e agitação de 150 rpm por 7 dias (DUARTE et al., 2012).

### 5.2. Preparo do extrato fúngico

As células do fungo foram primeiramente maceradas mecanicamente para liberar o conteúdo intracelular. O meio foi então filtrado com uma bomba à vácuo, a fim de separar a massa celular do meio contendo as enzimas, e centrifugado à 20.000 rpm por 10 minutos três vezes para remoção dos restos celulares. Em seguida, o meio foi coletado com auxílio de uma seringa estéril e passado através de um filtro de membrana de 0,22 micrômetros. Os extratos foram conservados no freezer à – 80 °C até seu uso.

### 5.3. Preparo da solução de substrato

Cada poço da placa de 96 poços contém 170 µL do mix substrato. A cada 170 µL foi adicionado 56,6 µL da solução de L-tirosina ou L-DOPA (Sigma-Aldrich) 1mM (preparada a partir de 2,3 mg de L-tirosina e 2,5 mg de L-DOPA diluídos em 12,5 mL de tampão fosfato de potássio), 56,6 µL de tampão fosfato de potássio 50mM (pH=6,5) e 52,2 µL de água destilada (CAMPOS et al., 2015).

### 5.4. Preparo de solução da tirosinase

A tirosinase de cogumelo (25000 U mg<sup>-1</sup>) foi adquirida na Sigma-Aldrich. A enzima foi diluída em tampão fosfato sódico 50 mM e pH = 6,5 para obtenção de uma solução de 500 U mL<sup>-1</sup> (CAMPOS et al., 2015).

### 5.5. Ensaio de atividade da tirosinase de cogumelo

Para determinar a influência dos extratos sobre a atividade da tirosinase de cogumelo,

foram realizados 2 ensaios: triagem e variação da concentração de extrato. A triagem teve como objetivo testar 6 extratos (FM17-43, FM17-12, FM17-17, FM17-11, FM17-5 e FM17-22) na diluição de 1:4 para testar o efeito sobre a tirosinase. Tendo definido o melhor extrato, sua concentração foi então variada (1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16) para definir a concentração ótima de reação. Para tanto, foi adicionado à placa de 96 poços: 10  $\mu\text{L}$  do extrato FM17-43, 20  $\mu\text{L}$  de tirosinase de cogumelo ( $500 \text{ U mL}^{-1}$  em tampão fosfato de sódio, pH 6,5) e 170  $\mu\text{L}$  da mistura contendo os substratos (L-Tirosina ou L-DOPA 1 mM). A microplaca de L-tirosina foi incubada à 37 °C por 40 minutos, enquanto a microplaca de L-DOPA foi lida imediatamente. A quantidade de dopacromo resultante da reação foi determinada utilizando um leitor de microplaca à 492 nm (POLARIS) (CAMPOS et al., 2015).

#### 5.6. Estudos cinéticos

Os experimentos foram realizados utilizando o mesmo protocolo descrito anteriormente, exceto para alterações nas concentrações dos substratos L-tirosina e L-DOPA (0 mM, 0,01 mM, 0,1 mM, 1 mM, 10 mM e 100 mM). Foram semeados em placas de 96 poços: 10  $\mu\text{L}$  do extrato FM17-43, 20  $\mu\text{L}$  de tirosinase de cogumelo ( $500 \text{ U mL}^{-1}$  em tampão fosfato, pH 6,5) e 170  $\mu\text{L}$  da mistura contendo os substratos (L-Tirosina ou L-DOPA 1 mM). As leituras da placa de L-DOPA foram feitas em 0, 1, 2, 3, 4, 5 e 6 minutos. As leituras da placa de L-tirosina foram feitas em 0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 minutos. A taxa inicial de formação de dopacromo na mistura de reação foi determinada pelo aumento da absorbância a 492 nm por min ( $\Delta\text{mDO } 492 \text{ min}^{-1}$ ). A constante de Michaelis ( $K_m$ ) e a velocidade máxima ( $V_{\text{max}}$ ) da atividade da tirosinase foram determinadas por gráficos de Michaelis-Menten. A regressão não linear usando o software GraphPad Prism 9.0 foi usada para determinar esses parâmetros (CAMPOS et al., 2015).

#### 5.7. Análises estatísticas

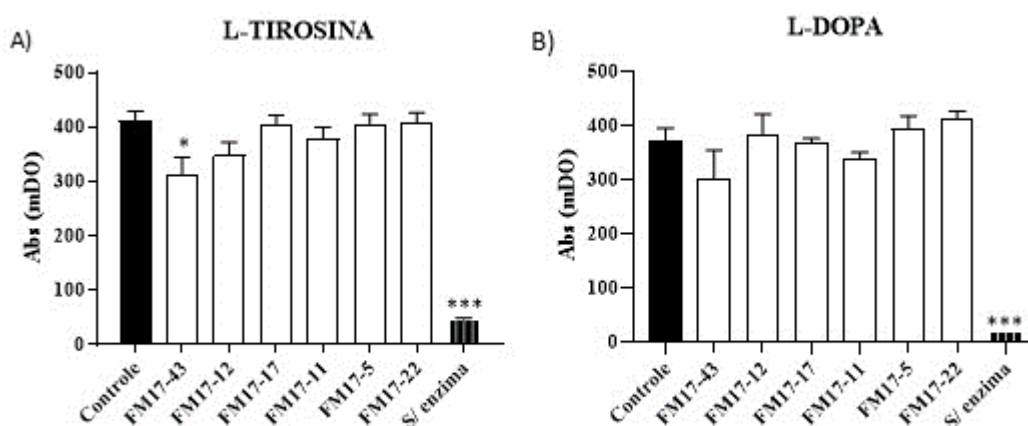
Os experimentos que utilizaram como substrato a L-DOPA foram realizados em triplicata e os que utilizaram a L-tirosina em quintuplicata. Todos os dados foram apresentados como média S.E.M. A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA), por teste paramétrico One-Way ANOVA e Two-Way ANOVA complementada pelo teste post hoc de Sidak. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor P era inferior a 0,05 (CAMPOS et al., 2015).

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efeito dos extratos marinhos sobre a atividade da tirosinase

Sendo a tirosinase a enzima chave no processo de melanogênese, o objetivo do trabalho foi determinar o efeito dos extratos marinhos sobre a atividade da tirosinase em um ensaio *in vitro* usando tirosinase de cogumelo, com a L-tirosina e L-DOPA como substratos para a reação.

A figura 4 apresenta os resultados dos extratos testados sobre a atividade da tirosinase. Verificou-se que na presença de L-tirosina (figura 4-A), o extrato FM17-43 foi o único tratamento que apresentou resultado com diferença significativa, com  $p < 0,05$  (\*) e  $F(7,22) = 26,33$ , alcançando uma inibição máxima de  $23,96 \pm 7,69\%$  em relação ao controle. Em comparação, na presença de L-DOPA (figura 4-B), nenhum dos extratos apresentou redução ou estimulação significativa da formação de dopacromo.



**Figura 4:** Triagem dos extratos marinhos. O eixo X mostra os diferentes extratos testados, enquanto o eixo Y mostra a absorbância (mDO). Em (A), para o substrato L-tirosina, observa-se que o extrato FM17-43 apresentou efeito inibidor da tirosinase, com diferença significativa em relação ao controle, onde o \* denota o  $p < 0,05$ . Em (B), para o substrato L-DOPA não foi observada diferença estatística significativa.

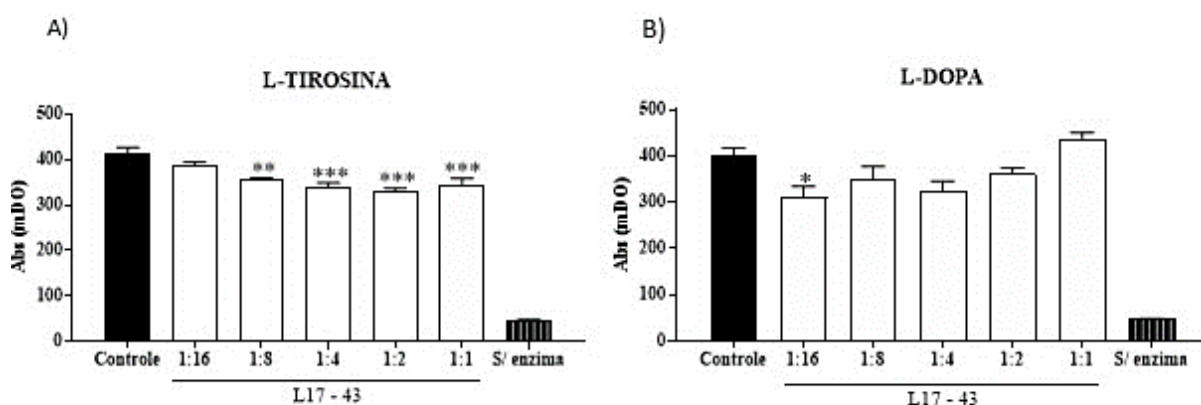
### 6.2. Efeito inibitório do extrato FM17-43 sobre a tirosinase

Para determinar qual concentração apresentou o melhor efeito sobre a tirosinase, a concentração de extrato FM17-43 foi variada entre 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16 (água:extrato). Como o extrato FM17-43 apresentou o melhor resultado no teste de triagem, o mesmo foi selecionado para seguir com os demais ensaios.

Para o substrato L-tirosina (figura 5-A), verificou-se diferença significativa para as

concentrações de 1:8 ( $p<0,001$ ), 1:4 ( $p<0,0001$ ), 1:2 ( $p<0,0001$ ), 1:1 ( $p<0,0001$ ), com  $F(6, 20) = 120,5$ . O extrato demonstrou reduzir a atividade da melanogênese, inibindo a formação de dopacromo e alcançando uma inibição máxima de  $13,94 \pm 1,22\%$ ,  $17,40 \pm 2,07\%$ ,  $20,25 \pm 2,22\%$  e  $16,31 \pm 3,42\%$  para as concentrações de 1:8, 1:4, 1:2 e 1:1, respectivamente.

Por outro lado, para o substrato L-DOPA (figura 5-B), o extrato FM17-43 só apresentou inibição significativa da tirosinase na concentração de 1:16, com  $p<0,05$  e  $F(6,20) = 33,05$ . O extrato alcançou uma inibição máxima de  $23,09 \pm 6,09\%$  em relação ao controle.



**Figura 5:** Análise do efeito da variação da concentração do extrato FM17-43. O eixo X mostra as diferentes concentrações de extrato, enquanto o eixo Y mostra a absorbância (mDO). Em (A), para o substrato L-tirosina, observa-se que as concentrações de 1:1, 1:2, 1:4 e 1:8 apresentaram diferença significativa na despigmentação quando em comparação com o grupo controle. Em (B), para o substrato L-DOPA, observa-se que a concentração de 1:16 apresentou diferença significativa em relação ao grupo controle, onde \*, \*\* e \*\*\* denotam  $p<0,05$ ;  $p<0,01$  e  $p<0,001$  respectivamente.

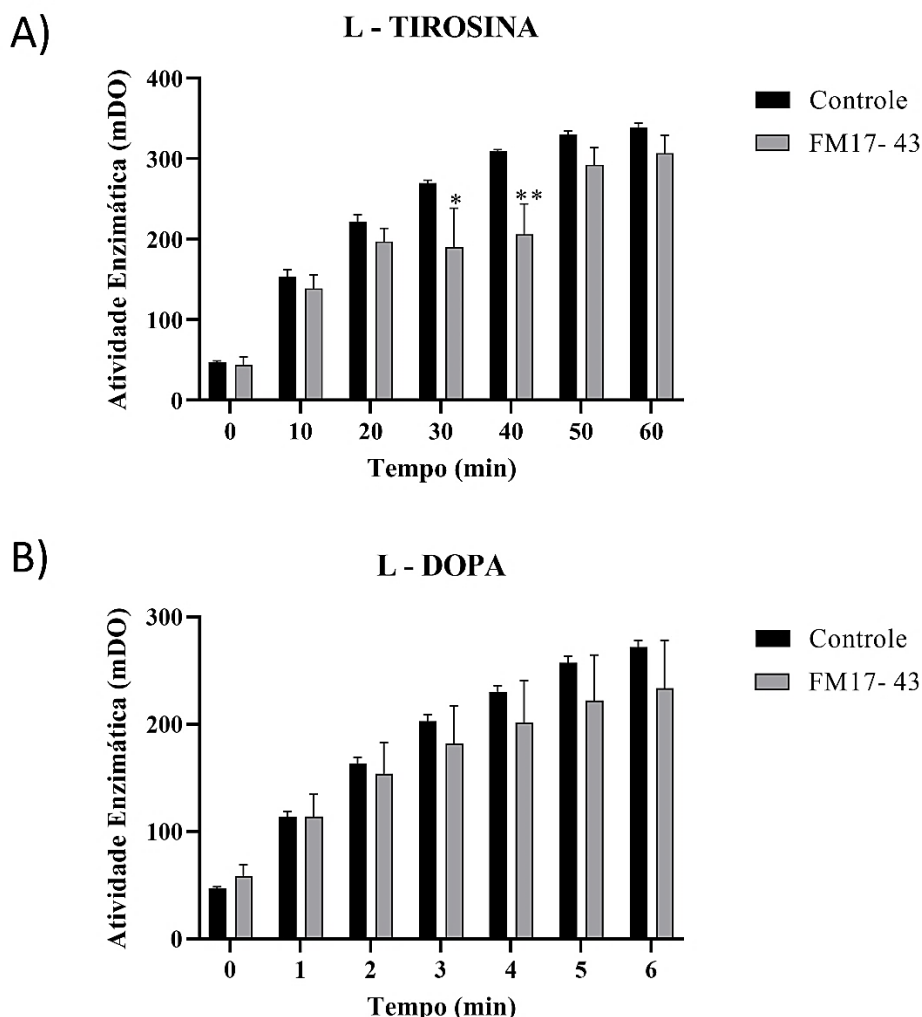
### 6.3. Efeito da variação do tempo sobre a atividade da tirosinase

Para determinar o efeito da variação do tempo, a concentração do extrato FM17-43 foi fixada em 1:4 e a concentração dos substratos L-tirosina e L-DOPA em 1 mM. Para a L-DOPA foram realizadas leituras de 1 em 1 minuto por 6 minutos após a aplicação da enzima. Para a L-tirosina foram feitas leituras no intervalo de 10 em 10 minutos por 60 min após a aplicação da enzima.

Na presença de L-tirosina (figura 6-A), verificou-se que os tempos de 30 e 40 minutos apresentaram diferença significativa em relação ao controle, com  $F(6,37) = 1,891$  e  $p<0,05$  e  $p<0,001$ , respectivamente. Após 30 minutos, a inibição alcançou  $29,56 \pm 18,00\%$ , e após 40

minutos  $33,33 \pm 12,19\%$ .

Já para o substrato L-DOPA (figura 6-B), observou-se que o tempo não influenciou na produção de dopacromo, não tendo apresentado nenhuma diferença significativa em relação ao controle.



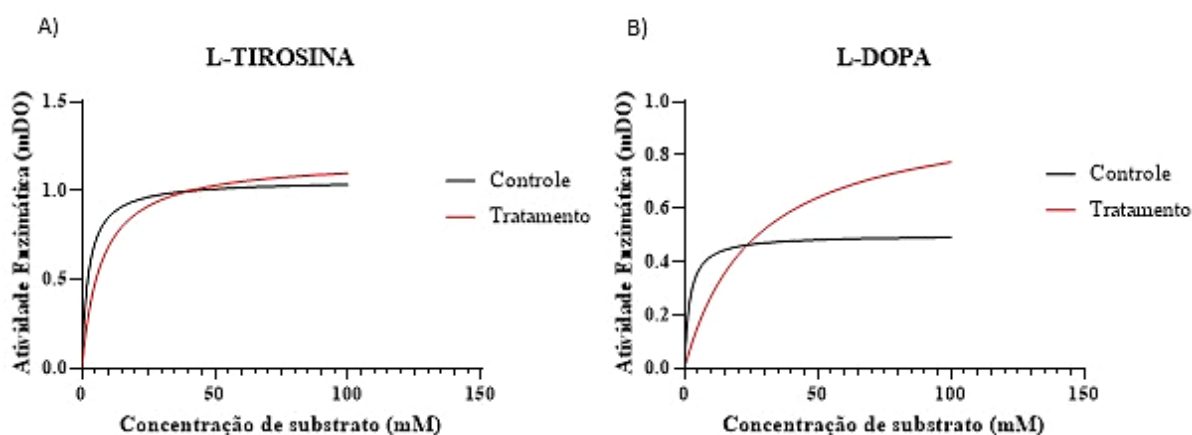
**Figura 6:** Efeito da variação de tempo. O eixo X representa o tempo, enquanto o eixo Y mostra a absorbância (mDO). Em (A), para o substrato L-tirosina, observa-se que o tempo apresentou diferença significativa na atividade da tirosinase em 30 e 40 minutos. Em (B), para o substrato L-DOPA, observa-se que o tempo não apresentou diferença significativa em nenhum dos tempos testados. \* e \*\* denotam  $p < 0,05$  e  $p < 0,001$  respectivamente.

#### 6.4. Padrão de inibição de tirosinase de cogumelo pelo extrato FM17-43

Para determinar o modo de inibição do extrato FM17-43, os resultados experimentais foram analisados por regressão não linear (Michaelis-Menten). O padrão de inibição da enzima foi analisado para os dois substratos: L-tirosina e L-DOPA. Com base nos dados cinéticos, para a L-tirosina (figura 7-A) ocorreu inibição da tirosinase, impedindo sua hidroxilação à L-DOPA.

Foi observado um aumento acentuado nos valores de  $K_m$ , com 2,474 e 7,224 para o controle e o tratamento com o extrato FM17-43 (1:4), respectivamente. O valor de  $V_{max}$ , por outro lado, sofreu pouca variação, se mantendo em 1,059 no controle e 1,177 no tratamento. Dessa forma, pode-se concluir que o extrato FM17-43 apresentou um perfil de inibição competitiva para a L-tirosina.

Para a L-DOPA (figura 7-B), com base nos dados cinéticos, a inibição da tirosinase também foi comprovada, interferindo na oxidação da L-DOPA à dopaquinona. Também foi observado um aumento acentuado nos valores de  $K_m$  e  $V_{max}$ . Enquanto o controle apresentou  $K_m = 1,927$  e  $V_{max} = 0,5000$ , o tratamento com o extrato FM17-43, logo após a aplicação da enzima, apresentou valores de  $K_m=26,17$  e  $V_{max} = 0,9755$ .



**Figura 7:** Padrão da inibição da tirosinase. O eixo X representa as diferentes concentrações dos substratos (L-Tirosina/L-DOPA) em milimolar, enquanto o eixo Y mostra a atividade enzimática medida em mili densidade ótica (mDO). Em (A) e em (B) verifica-se que o extrato FM17-43 apresenta um modo de inibição competitiva.



## 7. DISCUSSÃO

A regulação da pigmentação da pele é alvo de extensos estudos na aplicação cosmética e farmacêutica. Ela está relacionada à aparência estética, posição social, e proteção contra o câncer e envelhecimento (YAMAGUCHI et al., 2007).

A redução da atividade da enzima tirosinase é um eficiente método aplicado na verificação da inibição da melanogênese. A tirosinase é a enzima chave na via melanogênica e um dos maiores alvos de estudo para agentes terapêuticos no tratamento da hiperpigmentação cutânea. Assim, há uma grande demanda por inibidores potentes da tirosinase e uma grande preocupação acerca de sua eficácia e segurança. Por essa razão, agentes de fontes naturais têm sido cada vez mais explorados (BALBOA et al., 2015; EBANKS et al., 2009).

A tirosinase é uma enzima altamente dependente de cobre, que catalisa a hidroxilação de monofenóis em o-difenóis (atividade de cresolase) e oxidação de o-difenóis à o-quinonas (atividade de catecolase) (KIM, 2005). Seu sítio ativo binuclear possui dois íons de cobre, cada um coordenado por três histidinas, e se apresenta em três formas: oxi, met e desoxi. As primeiras apresentam atividade difenolase, enquanto a última apresenta atividade monofenolase (GASPARETTI et al., 2012).

De acordo com Kim et al. (2005), o escurecimento enzimático está relacionado à oxidação de compostos fenólicos. Assim, os autores sugerem que um bom inibidor da tirosinase deve apresentar um grupo hidroxílico e um grupo doador de elétrons na posição *para*, para que ocorra a reação.

Os inibidores da tirosinase podem ser classificados como quelantes de cobre, que competem com o oxigênio no local de ligação, ou como análogos de substrato, que competem com o substrato monofenólico ou difenólico da enzima. Eles também podem ser divididos em inativadores específicos da tirosinase, quando se ligam covalentemente de forma irreversível à tirosinase e a inativam, e os inibidores específicos, que se ligam de forma reversível à enzima, reduzindo sua capacidade catalítica (GASPARETTI et al., 2012).

De acordo com Gasparetti (2012), os monofenóis ligam-se ao sítio CuA da tirosinase, enquanto que os difenóis ligam-se ao CuB. Dessa forma, seguindo a presunção proposta por Campos et al. (2015) de que a L-tirosina se liga ao sítio do cobre A e a L-DOPA se liga a ambos, o estudo da análise cinética da tirosinase foi realizado com dois substratos, L-tirosina e L-DOPA.

Para avaliar a ação de novas biomoléculas sobre a via da melanogênese, neste trabalho foram testadas amostras de fungos derivados do ambiente marinho. Através de ensaios

enzimáticos, foi possível verificar que os fungos apresentam grande potencial na despigmentação, conforme demonstrado pela regulação negativa da tirosinase, consequente do tratamento com a amostra FM17-43 (figura 4).

Os testes com diferentes concentrações do extrato demonstraram uma inibição da melanogênese na faixa de 20%, que aumentou em função do tempo para a L-tirosina, obtendo o melhor resultado em 40 minutos (figura 6). De acordo com os estudos de Teixeira et al. (2012), embora o ácido kójico apresente uma taxa de inibição mais alta, ele perde consideravelmente seu potencial de inibição na primeira hora. Dessa forma, o extrato marinho pode apresentar uma alternativa com maior potencial, embora testes com um intervalo maior de tempo sejam necessários (TEIXEIRA et al., 2012).

Pudemos observar que para o substrato L-tirosina, concentrações mais altas de extrato obtiveram resultados melhores na despigmentação, provavelmente decorrente da utilização do extrato bruto (figura 5). De forma contrária, para a L-DOPA, concentrações mais baixas apresentaram resultados melhores. Supomos que isso pode ser devido ao menor número de etapas de conversão à dopacromo, já que o número de compostos intermediários é maior para a L-tirosina. Essa relação também pode ser evidenciada pelo efeito do tempo sobre os substratos. A L-tirosina apresentou resultados melhores em 30 e 40 minutos.

Foi demonstrado que o extrato FM17-43 competiu com o sítio ativo da tirosinase, o que significa que ele pode se ligar à uma enzima e evitar a ligação do substrato no sítio ativo (PANZELLA e NAPOLITANO, 2019). Esse perfil pode ser observado nas linhas cruzadas do gráfico de regressão não linear (dados não mostrados), presentes em ambos os substratos.

Em um trabalho semelhante a este, Jiménez et al. (2001) conduziram testes cinéticos com 7 derivados de benzaldeído nos mesmos substratos (L-tirosina e L-DOPA). Ao testar a atividade difenolase da tirosina com a L-DOPA, foi observado que a reação atingiu um estado estacionário mais rápido em relação à L-tirosina, que apresentou uma fase lag mais acentuada, característica da atividade da monofenolase. Foi demonstrado que o cinamaldeído, composto testado com melhor eficácia, é um inibidor competitivo para ambos os substratos (JIMENEZ et al., 2001). Esses resultados estão de acordo com nosso trabalho, que apresentou perfil de resposta semelhante.

O trabalho de Chen e Kubo (2002) também apresentou resultados semelhantes. Os autores testaram a quercetina, um flavonoide encontrado em frutas e vegetais, e demonstraram que a mesma apresenta um perfil de inibição competitiva reversível, já que as linhas do gráfico gerado passaram pela origem. Essa inibição se deve a fração pirona, responsável pela quelação do cobre na enzima (CHEN e KUBO, 2002).

Há poucos relatos de compostos novos e conhecidos com atividade inibitória da tirosinase em fungos derivados do mar. Em um estudo de Fernandes et al. (2017), foi demonstrado que foram isolados fungos da espécie *Alternaria sp.* encontrados em algas marinhas verdes, que produziam compostos como o ácido kójico, éter dimetílico do ácido kójico e éter monometílico do ácido kójico, bem como o phomaligol A. Da mesma forma, os compostos 6-n-pentil- $\alpha$ pirona e mirotenona A foram identificados a partir em fungos *Myrothecium sp.* derivados do mar (FERNANDES e KERKAR, 2017).

Handayani et al. (2019) testaram o extrato de acetila de um fungo derivado da esponja marinha *Haliclona fascigera*, utilizando a L-DOPA como substrato, e compararam os resultados com o ácido kójico. Quatro dos vinte compostos testados apresentaram atividade inibitória da tirosinase mais alta do que com o ácido kójico, resultante da ação de compostos fenólicos. Assim, substituintes hidroxí (OH) desempenham papel importante como inibidores da tirosinase (HANDAYANI et al., 2019).

Alguns dos compostos mais amplamente empregados em produtos cosméticos despigmentantes no mercado, descritos por Tedesco et al. (2017), incluem: ácido ascórbico (vitamina C), hidroquinona e extrato de uva-ursi (Melfade®). Eles podem apresentar diferentes mecanismos de ação, mas o principal é a inibição da tirosinase. O ácido ascórbico é um exemplo de compostos que podem ser produzidos por fungos (entre eles, *Aspergillus niger*). Um estudo de Panich et al. (2011), demonstrou que o ácido ascórbico inibiu a atividade da tirosinase de maneira dose-dependente, em concentrações mais baixas que o ácido kójico e com taxa de inibição maior.

Embora o extrato FM17-43 tenha apresentado uma inibição promissora da tirosinase, novos estudos poderiam ser realizados para determinar a que família e gênero o fungo pertence, e que componentes estão presentes no extrato bruto, para assim analisa-los isoladamente e determinar qual é responsável pela inibição enzimática. Entretanto, de acordo com Teixeira et al. (2012), é muito comum que produtos naturais apresentem efeito pela sinergia entre vários compostos.

Mais estudos precisam ser conduzidos para avaliar quais compostos são responsáveis pelo efeito inibidor do extrato FM17-43, para assim determinar seu mecanismo de ação e o modo de inibição. Esses estudos são importantes para prever qual o modo de ação nas células, o nível de atividade do inibidor e diferenças no mecanismo de reação (CAMPOS et al., 2015).

Estudos prévios determinaram que o extrato FM17-43 pertence ao filo Zygomycota. Não foram encontrados outros estudos sobre atividade a despigmentante desses fungos. Sendo assim, esse trabalho pode apresentar um potencial inovador no tratamento da hiperpigmentação

por inibição da tirosinase a partir de biomoléculas.

## 8. CONCLUSÃO

A partir dos dados expostos, é possível concluir que o extrato do fungo filamentoso recuperado do ambiente marinho FM17-43 apresentou um efeito inibidor da melanogênese através da inibição competitiva da tirosinase. Embora sua composição exata ainda não seja conhecida, pode-se presumir que apresenta compostos com grupos hidroxílicos que se ligam a ambos os sítios de cobre da tirosinase (CuA e CuB), pois demonstrou efeitos significativos de inibição para ambos os substratos: L-tirosina e L-DOPA.

Embora sejam necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* para determinar a eficácia e segurança do extrato, a procedência orgânica do extrato pode ser favorável à implementação comercial, uma vez que pode provocar menos reações adversas do que as observadas com substâncias sintéticas e pode ainda contribuir em processos antioxidantes. Estudos adicionais podem revelar o gênero e espécie do fungo testado, além do isolamento de seus princípios ativos, sendo promissor aplicações cosméticas e clínicas no clareamento da pele.

O ambiente marinho pode ser considerado um habitat promissor na recuperação de compostos bioativos os quais podem ser utilizados em aplicações industriais, incluindo aplicações farmacêuticas cosméticas.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRAWAL, Shivankar et al. **Marine fungi: An untapped bioresource for future cosmeceuticals**. *Phytochemistry Letters*, v. 23, n. May 2017, p. 15–20, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2017.11.003>>.
- AHSAN, Haseeb. **The biomolecules of beauty: biochemical pharmacology and immunotoxicology of cosmeceuticals**. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, v. 40, n. 1, p. 91–108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/15321819.2018.1555766>>.
- BALBOA, Elena M et al. **Cosmetics fro**. *Application of marice biotechnology*, v. 44, n. *Cosmetics from marine sources*, p. 1015–1042, 2015.
- BOLOGNIA, Jean L. e JORIZZO, Joseph L. e SCHAFFER, Julie V. **Dermatologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- BURGER, Pauline et al. **Skin whitening cosmetics: Feedback and challenges in the development of natural skin lighteners**. *Cosmetics*, v. 3, n. 4, 2016.
- CAMPOS, Patrícia Mazureki et al. **Inhibitory effect of GB-2a (I3-naringenin-II8-eriodictyol) on melanogenesis**. *Journal of Ethnopharmacology*, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.08.015>>.
- CHEN, Qing Xi e KUBO, Isao. **Kinetics of mushroom tyrosinase inhibition by quercetin**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 14, p. 4108–4112, 2002.
- CHOI, Hyun et al. **IL-4 Inhibits the Melanogenesis of Normal Human Melanocytes through the JAK2 – STAT6 Signaling Pathway**. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 133, n. 2, p. 528–536, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/jid.2012.331>>.
- CORINALDESI, Cinzia et al. **Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products**. *Marine Drugs*, v. 15, n. 4, p. 1–21, 2017.
- COSTIN, Gertrude E. e HEARING, Vincent J. **Human skin pigmentation: Melanocytes modulate skin color in response to stress**. *FASEB Journal*, v. 21, n. 4, p. 976–994, 2007.
- D'MELLO, Stacey A.N. et al. **Signaling pathways in melanogenesis**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 7, p. 1–18, 2016.
- DEL BINO, Sandra e DUVAL, Christine e BERNERD, Françoise. **Clinical and biological characterization of skin pigmentation diversity and its consequences on UV impact**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 9, 2018.
- DUARTE, Livia Teixeira et al. **Production and characterization of tyrosinase activity in**. v. 55, p. 21–29, 2012.
- EBANKS, Jody P. e WICKETT, R. Randall e BOISSY, Raymond E. **Mechanisms regulating skin pigmentation: The rise and fall of complexion coloration**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, n. 9, p. 4066–4087, 2009.
- FALADE, Ayodeji O. et al. **Lignin peroxidase functionalities and prospective applications**. *MicrobiologyOpen*, v. 6, n. 1, p. 1–14, 2017.
- FERNANDES, Michelle S e KERKAR, Savita. **Microorganisms as a source of tyrosinase inhibitors : a review**. 2017.
- FORZZA, Rafaela Campostrini et al. **Os fungos do Brasil**. *Catálogo de plantas e fungos do Brasil - Vol. 1*, p. 43–48, 2010.
- GALAPPATTHY, Priyadarshani e RATHNAYAKE, Deepani. **Depigmenting Agents**. *Clinical Dermatology*, p. 261–280, 2018.
- GASPARETTI, Chiara et al. **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 - Proteins and Proteomics*, v. 1824, n. 4, p. 598–607, 2012.
- GOULD, A. B. **Fungi : Plant Pathogenic**. 2009.

- GUARRO, Josep e GENÉ, Josepa e STCHIGEL, Alberto M. **Developments in fungal taxonomy**. [S.l: s.n.], 1999. v. 12.
- GUPTA, Asheesh et al. **Ultraviolet Radiation in Wound Care: Sterilization and Stimulation**. *Advances in Wound Care*, v. 2, n. 8, p. 422–437, 2013.
- HANDAYANI, N.Akbar et al. **Tyrosinase Inhibitory Activity of Ethyl Acetate Extracts from Marine Sponge-Derived Fungi *Haliclona fascigera***. *Bioscience Research*, v. 16, n. 2, p. 2369–2373, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30116-X>.
- HERINIAINA, Rakotomalala Manda et al. **Effects of six compounds with different chemical structures on melanogenesis**. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 16, n. 10, p. 766–773, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(18)30116-X>.
- HSU, Kai Di et al. **Extract of ganoderma formosanum mycelium as a highly potent tyrosinase inhibitor**. *Scientific Reports*, v. 6, n. March, p. 1–9, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/srep32854>.
- HYDE, K. D. e BAHKALI, A. H. e MOSLEM, M. A. **Fungi - An unusual source for cosmetics**. *Fungal Diversity*, v. 43, n. September 2015, p. 1–9, 2010.
- JIMENEZ, Mercedes et al. **Competitive Inhibition of Mushroom Tyrosinase by 4-Substituted Benzaldehydes**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, p. 4060–4063, 2001.
- KIM, Se Kwon. **Marine cosmeceuticals**. *Journal of Cosmetic Dermatology*, v. 13, n. 1, p. 56–67, 2014.
- KIM, You Jung et al. **4,4'-Dihydroxybiphenyl As a New Potent Tyrosinase Inhibitor**. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 28, n. 2, p. 323–327, 2005.
- LADIZINSKI, Barry e MISTRY, Nisha e KUNDU, Roopal V. **Widespread use of toxic skin lightening compounds: Medical and psychosocial aspects**. *Dermatologic Clinics*, v. 29, n. 1, p. 111–123, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2010.08.010>.
- LI, Pin Hui et al. **Silencing stem cell factor gene in fibroblasts to regulate paracrine factor productions and enhance c-Kit expression in melanocytes on melanogenesis**. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 19, n. 5, 2018.
- MENG, Tian-Xiao et al. **The Melanin Biosynthesis Stimulating Compounds Isolated from the Fruiting Bodies of *Pleurotus citrinopileatus***. *Journal of Cosmetics, Dermatological Sciences and Applications*, v. 02, n. 03, p. 151–157, 2012.
- MERGHOU, Taha e POLSKY, David e HOUGHTON, Alan N. **Molecular Biology of Melanoma**. Elsevier, v. 3, p. 463–470, 2008.
- MOHORČIČ, Martina et al. **Production of melanin bleaching enzyme of fungal origin and its application in cosmetics**. *Infor*, v. 12, n. 3, p. 200–206, 2007.
- NIU, Chao e AISA, Haji A. **Upregulation of Melanogenesis and Tyrosinase Activity: Potential Agents for Vitiligo**. *Molecules*, v. 22, n. 8, 2017.
- OLIVEIRA, Karina B. et al. **Influence of rosmarinic acid and *Salvia officinalis* extracts on melanogenesis of B16f10 cells**. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 23, n. 2, p. 249–258, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000135>.
- PANICH, Uraivan et al. **Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system**. *Inhibition of UVA-mediated Melanogenesis by Ascorbic Acid through Modulation of Antioxidant Defense and Nitric Oxide System*. n. May, 2011.
- PANZELLA, Lucia e NAPOLITANO, Alessandra. **Natural and bioinspired phenolic compounds as tyrosinase inhibitors for the treatment of skin hyperpigmentation: Recent advances**. *Cosmetics*, v. 6, n. 4, 2019.
- PEYRAT, Laure Anne et al. **Terrestrial microorganisms: Cell factories of bioactive molecules with skin protecting applications**. *Molecules*, v. 24, n. 9, 2019.
- PILLAIYAR, Thanigaimalai e MANICKAM, Manoj e JUNG, Sang Hun. **Downregulation of**

- melanogenesis: drug discovery and therapeutic options.** Drug Discovery Today, v. 22, n. 2, p. 282–298, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.016>>.
- PILLAIYAR, Thanigaimalai e MANICKAM, Manoj e JUNG, Sang Hun. **Inhibitors of melanogenesis: A patent review (2009-2014).** Expert Opinion on Therapeutic Patents, v. 25, n. 7, p. 775–788, 2015.
- PILLAIYAR, Thanigaimalai e MANICKAM, Manoj e JUNG, Sang Hun. **Recent development of signaling pathways inhibitors of melanogenesis.** Cellular Signalling, v. 40, n. March, p. 99–115, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.09.004>>.
- SALEEM, Muhammad et al. **Marine natural products of fungal origin.** Natural Product Reports, v. 24, n. 5, p. 1142–1152, 2007.
- SERRE, C. e BUSUTTIL, V. e BOTTO, J. M. **Intrinsic and extrinsic regulation of human skin melanogenesis and pigmentation.** International Journal of Cosmetic Science, v. 40, n. 4, p. 328–347, 2018.
- TAOFIQ, Oludemi et al. **Mushrooms extracts and compounds in cosmetics, cosmeceuticals and nutricosmetics-A review.** Industrial Crops and Products, v. 90, p. 38–48, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.06.012>>.
- TEDESCO, Ionice Remião e ADRIANO, Jerusa e SILVA, Daniela Da. **Produtos Cosméticos Despigmentantes Nacionais disponíveis no mercado.** 2017.
- TEIXEIRA, Silva et al. **Mushroom tyrosinase inhibitory activity and major fatty acid constituents of Amazonian native flora oils.** v. 48, 2012.
- UCHIDA, Ryuji e ISHIKAWA, Seiko e TOMODA, Hiroshi. **Inhibition of tyrosinase activity and melanine pigmentation by 2-hydroxytyrosol.** Acta Pharmaceutica Sinica B, v. 4, n. 2, p. 141–145, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2013.12.008>>.
- YAMAGUCHI, Yuji e BRENNER, Michaela e HEARING, Vincent J. **The regulation of skin pigmentation.** Journal of Biological Chemistry, v. 282, n. 38, p. 27557–27561, 2007.
- YAMAGUCHI, Yuji e HEARING, Vincent J. **Physiological factors that regulate skin pigmentation.** BioFactors, v. 35, n. 2, p. 193–199, 2009.
- ZAIDI, KamalU e ALI, ShariqueA e ALI, AyeshaS. **Melanogenic effect of purified mushroom tyrosinase on B16F10 Melanocytes: A Phase Contrast and Immunofluorescence Microscopic Study.** Journal of Microscopy and Ultrastructure, v. 5, n. 2, p. 82–89, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmau.2016.07.002>>.