

**Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia**



**Potenciais Agentes Inibidores da Enzima
Tirosinase
Exemplos e Aplicações**

Guilherme Santos Freire Almeida Calçada

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Eduarda Mendes,
Professora Auxiliar na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

2024

Universidade de Lisboa
Faculdade de Farmácia



Potenciais Agentes Inibidores da Enzima
Tirosinase
Exemplos e Aplicações

Guilherme Santos Freire Almeida Calçada

Trabalho Final de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
apresentado à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia

Monografia orientada pela Professora Doutora Maria Eduarda Mendes,
Professora Auxiliar na Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa

2024

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha família por todo o tempo e conselhos que me deram. À minha mãe e ao meu pai um especial agradecimento por todos os esforços efetuados para que não me faltasse nada e pudesse ter a melhor experiência e apoio possível. À minha irmã por todas as noites de estudo e horas que me ofereceu da sua vida para me ajudar a ser um melhor aluno e profissional, é e será sempre o meu maior exemplo. Ao meu cunhado, João, pela sua disponibilidade para me ajudar sempre que lhe pedi essa mesma ajuda. Aos meus avós um agradecimento não chega por nunca terem duvidado de mim e das minhas capacidades.

À Beatriz, mil obrigados, por seres a minha fonte de força, inspiração e esperança. Sem ti Beatriz, todo o meu percurso teria menos sentido e seria sem dúvida nenhuma um percurso muito mais difícil.

Ao Vítor e à Faty, obrigado por todo o conhecimento transmitido e por todo o tempo das vossas vidas que utilizaram para me ajudar.

Aos meus amigos, obrigado por todas as memórias e momentos que passamos juntos, sem dúvida que são pessoas que tornaram toda esta jornada muito mais bela e repleta de significado.

À minha orientadora, Professora Maria Eduarda Mendes, sei que não sou um aluno fácil de ensinar nem de trabalhar com, mas quero agradecer-lhe por toda a sua disponibilidade e ajuda ao longo deste difícil processo. Espero que não tenha sido muito difícil para si e espero que um dia os nossos caminhos se voltem a cruzar.

A todos aqueles com que me cruzei ao longo dos anos, mas que não referenciei, obrigado por de uma maneira ou de outra terem estado presentes neste percurso.

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Conduta e de Boas Práticas da Universidade de Lisboa. Mais concretamente, afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude académica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo na íntegra as responsabilidades da autoria.

Resumo

Este estudo investiga os agentes potencialmente inibidores da enzima tirosinase, concentrando-se principalmente nos mecanismos de ação, eficácia e aplicações clínicas na área da cosmética. A tirosinase é uma enzima envolvida na biossíntese da melanina, que é o pigmento que dá a cor à pele, cabelo e olhos. O aumento da atividade da tirosinase pode causar distúrbios de hiperpigmentação como melasma e manchas senis, assim como o aparecimento do melanoma, um tipo de cancro de pele muito agressivo. Por estes motivos, a inibição dessa enzima é um assunto de grande interesse quer no campo da dermatologia e cosmética quer no campo da medicina.

Ao longo dos últimos anos diversas substâncias têm sido estudadas e testadas para inibir a tirosinase. Por exemplo, a hidroquinona que é muito usada para tratar a hiperpigmentação, mas o seu uso está associado a possíveis efeitos colaterais graves. O ácido kójico, um produto proveniente de fungos, é outro inibidor eficaz que funciona ao quelar íons de cobre no local ativo da tirosinase. O ácido ascórbico para além das suas propriedades antioxidantes, também tem ação sobre a tirosinase, protegendo os melanócitos do “stress” oxidativo, diminuindo a produção de melanina. Outro exemplo, o ácido azelaico, é usado para tratar acne, rosácea e hiperpigmentação porque combina a inibição da tirosinase com efeitos anti-inflamatórios.

Devido à sua capacidade de controlar a produção de melanina e proteger as células contra danos celulares, estes inibidores têm um elevado potencial terapêutico no tratamento do melanoma e também de doenças neurodegenerativas. O seu potencial terapêutico na doença de Parkinson está a ser investigado, uma vez que a inibição da tirosinase pode reduzir a produção de neuromelanina diminuindo o stress oxidativo nos neurónios dopaminérgicos. No entanto, a segurança e a estabilidade a longo prazo destes inibidores ainda são um objeto de pesquisa contínua.

Ao longo desta monografia vão ser abordados vários riscos e tópicos como benefícios, efeitos secundários e possíveis inovações no tratamento de distúrbios de pigmentação e além disso é feita uma referência breve ao seu uso nas terapias anticancerígenas.

Palavras-chave: Hiperpigmentação; Inibidor; Melanina; Melanoma; Tirosinase.

Abstract

This study investigates agents that potentially inhibit the enzyme tyrosinase, focusing mainly on the mechanisms of action, efficacy and clinical applications in the cosmetics field. Tyrosinase is an enzyme involved in the biosynthesis of melanin, which is the pigment that gives skin, hair and eyes their color. Increased tyrosinase activity can cause hyperpigmentation disorders such as melasma and age spots, as well as the appearance of melanoma, a very aggressive type of skin cancer. For these reasons, the inhibition of this enzyme is a subject of great interest both in the field of dermatology and cosmetics and in the field of medicine.

Over the last few years, various substances have been studied and tested to inhibit tyrosinase. For example, hydroquinone, which is widely used to treat hyperpigmentation, but its use is associated with possible serious side effects. Kojic acid, a fungal product, is another effective inhibitor that works by chelating copper ions at the active site of tyrosinase. In addition to its antioxidant properties, ascorbic acid also acts on tyrosinase, protecting melanocytes from oxidative stress and reducing melanin production. Another example, azelaic acid, is used to treat acne, rosacea and hyperpigmentation because it combines tyrosinase inhibition with anti-inflammatory effects.

Due to their ability to control melanin production and protect cells from cell damage, these inhibitors have a high therapeutic potential in the treatment of melanoma and also neurodegenerative diseases. Their therapeutic potential in Parkinson's disease is being investigated, since tyrosinase inhibition can reduce neuromelanin production by decreasing oxidative stress in dopaminergic neurons. However, the safety and long-term stability of these inhibitors is still the subject of ongoing research.

Throughout this monograph, various risks and topics such as benefits, side effects and possible innovations in the treatment of pigmentation disorders will be addressed, and there will also be a brief reference to their use in anti-cancer therapies.

Keywords: Hyperpigmentation; Inhibitor; Melanin; Melanoma; Tyrosinase.

Abreviaturas

ACTH - Hormona adrenocorticotrófica

DHA - Dehidroascorbato

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DOPA - Dihidroxifenilalanina

ERO - Espécies Reativas de Oxigénio

L-DOPA - Levodopa

MC1R - Recetor de Melanocortina 1

MSH - Hormona Estimuladora de Melanócitos

RNA - Ácido Ribonucleico

SOD - Superóxido Dismutase

TRP1 - Proteína 1 Relacionada com a Tirosinase

TRP2 - Proteína 2 Relacionada com a Tirosinase

UV - Ultravioleta

Índice

1	Introdução	11
2	Melanina e Melanogénese.....	12
2.1	Fatores que Influenciam a Produção de Melanina	12
2.2	Melanogénese	13
2.3	Controlo da Melanogénese	14
3	Tirosinase.....	15
3.1	Mecanismo de Ação.....	15
3.2	Danos Oxidativos	17
3.2.1	Produção de ERO e sua Influência na Tirosinase	17
3.2.2	Mecanismo de Ação de ERO na Melanogénese	18
3.2.3	Defesa Antioxidante e Regulação da Tirosinase	18
3.2.4	Danos Oxidativos e Desordens Pigmentares	19
3.2.5	Inibição dos Danos Oxidativos como Terapia para a Hiperpigmentação	19
4	Inibidores da Tirosinase	20
4.1	Hidroquinona	20
4.1.1	Mecanismo de Ação.....	20
4.1.2	Hidroquinona vs Outros Agentes Clareadores.....	21
4.1.3	Segurança e Toxicidade	22
4.2	Arbutina	22
4.2.1	Mecanismo de Ação.....	23
4.2.2	Eficácia e Aplicações	24
4.2.3	Segurança e Toxicidade	24
4.2.4	Inovações	25
4.3	Vitamina C / Ácido Ascórbico.....	25
4.3.1	Mecanismo de Ação.....	25
4.3.2	Potencial Terapêutico no Tratamento do Melanoma	27
4.4	Ácido Kójico	27
4.4.1	Mecanismo de Ação.....	28
4.4.2	Segurança e Toxicidade	29
4.5	Ácido Azelaico.....	29
4.5.1	Mecanismo de Ação.....	30
4.5.2	Segurança e Prevenção	32
4.5.3	Inovação: Tecnologia Lipossomal	32
4.6	Resveratrol	33
4.6.1	Mecanismo de Ação.....	35
4.6.1.1	Competição pelo Sítio Ativo da Tirosinase	35
4.6.1.2	Inibição Não-Competitiva após Metabolização.....	35
4.6.1.3	Efeitos sobre Espécies Reativas de Oxigénio (ERO)	35
4.6.1.4	Importância Estrutural dos Grupos Hidroxilo.....	36
4.6.2	Aplicações Terapêuticas e Cosméticas	36
4.6.3	Segurança e Toxicidade	37
5	Conclusão.....	38
	Referências Bibliográficas	40

Índice de Figuras

Figura 1 - Os Três Estados Distintos da Tirosinase	16
Figura 2 - Síntese da Feomelanina e da Eumelanina	17
Figura 3 - Hidroquinona.....	20
Figura 4 - α -Arbutina.....	23
Figura 5 - β -Arbutina	23
Figura 6 - Ácido Ascórbico.....	25
Figura 7 - Ácido Kójico	28
Figura 8 - Mecanismo de Ação do Ácido Kójico	29
Figura 9 - Ácido Azelaico	30
Figura 10 - Mecanismo de Ação do Ácido Azelaico	32
Figura 11 - tras-Resveratrol	34
Figura 12 - cis-Resveratrol.....	34

1 Introdução

Fruto dos desenvolvimentos vividos nas últimas épocas, as doenças dermatológicas assumem hoje um papel de destaque na sociedade. A sua prevalência é crescente e a diversidade dentro deste grupo é notória, desde doenças alérgicas a doenças imunológicas e oncológicas, onde o melanoma assume um papel de destaque.

Em consequência, o estudo das mesmas e de possíveis terapêuticas tem sido privilegiado sendo a investigação sobre os inibidores da tirosinase e os seus possíveis efeitos muito importantes. As terapêuticas para tratar a hiperpigmentação e prevenir o envelhecimento cutâneo surgem então como uma oportunidade de elevada relevância.

A enzima tirosinase (EC 1.14.18.1) assume um papel de destaque na biossíntese de melanina, pigmento responsável pela cor da pele, cabelo e olhos nos mamíferos já que é uma enzima responsável no seu processo de produção. Deste modo, a tirosinase está associada a diversas patologias, nomeadamente distúrbios de pigmentação e cancros de pele onde os seus valores podem aparecer elevados como é o caso do melanoma.

Ao longo desta pesquisa foram abordados inibidores que sobressaem pela sua eficácia ou pela sua segurança tendo-se destacado a hidroquinona, o ácido kójico, o ácido ascórbico, o ácido azelaico, o resveratrol, entre outros (1,2). Estes inibidores podem reduzir significativamente a atividade da tirosinase, tornando-se componentes importantes em formulações cosméticas e dermatológicas.

O propósito desta monografia é fornecer uma visão geral dos últimos avanços no desenvolvimento de inibidores da tirosinase e o seu impacto na saúde, apresentando os seus mecanismos de ação, a sua eficácia, segurança e aplicações clínicas e cosméticas existentes.

2 Melanina e Melanogénese

A melanina enquanto pigmento biológico, tem como função primária a fotoproteção, protegendo os mamíferos contra a radiação ultravioleta, atua em vários processos biológicos, nomeadamente de proteção contra danos oxidativos e de regulação de temperatura (3). Este pigmento é produzido pelos melanócitos, que estão nos folículos pilosos, na camada basal da epiderme e pode ser dividida em 3 subtipos: **eumelanina**, **feomelanina** e **neuromelanina**.

A **feomelanina** contribui para os tons amarelos e avermelhados, enquanto a **eumelanina** é responsável pelos tons pretos e castanhos. A proporção desses dois tipos de melanina determina a cor da pele e do cabelo de uma pessoa. Devido à sua capacidade superior de absorção de luz e neutralização de radicais livres, a **eumelanina** é geralmente considerada a proteção mais eficaz contra os danos causados pelos raios ultravioleta (4).

A **neuromelanina**, sendo a menos estudada dos três tipos de melanina, é encontrada principalmente no cérebro e acredita-se que esteja envolvida na proteção de neurónios contra danos oxidativos (5).

A melanina absorve uma ampla gama de radiações UV e dissipa até 90% da energia absorvida sob a forma de calor, protegendo as células da pele contra danos no DNA causados pela radiação solar. No entanto, embora a melanina ofereça essa proteção, também pode apresentar efeitos adversos sob certas condições. A absorção excessiva de radiação pode gerar radicais livres, que induzem o estado excitado da melanina, tornando-a mais reativa e potencialmente perigosa para as células circundantes. Isso explica a associação de desordens pigmentares nomeadamente o cancro de pele, como o melanoma, em casos de exposição prolongada ao sol (6,7).

2.1 Fatores que Influenciam a Produção de Melanina

Vários fatores afetam a produção de melanina, um deles é a exposição à radiação ultravioleta, que estimula a síntese de melanina como uma forma de defesa contra danos ao DNA. Factores genéticos, hormonais e ambientais também são significativos.

A exposição a hormonas como a hormona estimuladora dos melanócitos (α - MSH) e mudanças no gene responsável pela resistência à colistina que codifica o recetor de melanocortina 1, podem mudar a quantidade e o tipo de melanina produzida. Isso afeta a coloração da pele e a probabilidade de desenvolver melanoma (8).

2.2 Melanogénese

A melanogénese ocorre em melanossomas, organelos especializados formados por endossomas multivesiculares. Antes de estarem prontos para a síntese de melanina, esses melanossomas passam por várias fases de maturação. Ao longo dessas etapas, a tirosinase e outras enzimas melanogénicas, incluindo proteína 1 relacionada com a tirosinase (TRP1) e a proteína 2 relacionada com a tirosinase, (TRP2) são transportadas para o interior dos melanossomas, onde desempenham as suas funções catalíticas (8).

A melanogénese é um processo enzimático complexo, regulado por diferentes fatores internos e externos que ocorre em diferentes fases:

Início da Síntese: A síntese de melanina começa com o aminoácido tirosina obtido pela dieta ou sintetizado a partir da fenilalanina, que é convertido em levodopa (L-DOPA) pela enzima chave da melanogénese, a tirosinase. Em seguida, a L-DOPA é oxidada em dopaquinona pela tirosinase, que pode seguir duas rotas diferentes dependendo dos agentes presentes:

- 1- Para formar eumelanina, a dopaquinona passa por várias reações que envolvem as enzimas TRP1 e TRP2;
- 2- Para formar feomelanina, a dopaquinona reage com cisteína.

Maturação dos Melanossomas: Os melanossomas são organelos responsáveis pela síntese e armazenamento da melanina. Eles passam por quatro estágios de maturação, onde a melanina vai sendo progressivamente sintetizada e armazenada. Os pré-melanossomas (estádios I e II) não contêm melanina, mas, à medida que a melanina é depositada, tornam-se melanossomas maduros (estádios III e IV), prontos para serem transportados para os queratinócitos.

Transferência para Queratinócitos: Uma vez completa a síntese, os melanossomas são transferidos para os queratinócitos, células da epiderme que distribuem a melanina

para formar um "escudo" protetor em torno do núcleo celular. Esse mecanismo protege o DNA contra os danos causados pela radiação UV, prevenindo mutações e outros efeitos adversos.

2.3 Controle da Melanogénese

A melanogénese é um processo altamente regulado, controlado por uma série de fatores autócrinos e parácrinos, que respondem a estímulos internos e externos. Alguns desses fatores são as hormonas (como a hormona estimuladora de melanócitos, α -MSH) e os fatores genéticos (9).

A exposição à radiação ultravioleta é o principal fator externo que desencadeia a síntese de melanina. Ela ativa a via de sinalização do recetor de melanocortina 1 (MC1R), que aumenta a expressão da tirosinase e outras enzimas relacionadas com a melanogénese, fazendo aumentar a produção de melanina (9). A radiação aumenta também a produção de espécies reativas de oxigénio (ERO) e outros mediadores, como o fator α -MSH, que ativa a tirosinase e inicia o processo de melanogénese. O microambiente dos melanócitos, que inclui as suas interações com queratinócitos e fibroblastos, também afeta a produção de melanina.

Fatores Genéticos e Hormonais: Um papel importante na regulação da expressão das enzimas melanogénicas é desempenhado por genes, como o fator de transcrição associado à microftalmia. Além disso, hormonas como α -MSH, hormona adrenocorticotrófica (ACTH) e estrogénios têm a capacidade de alterar a atividade dos melanócitos, o que tem um impacto direto na melanogénese (9).

Existem exemplos opostos que resultam de distúrbios na produção de melanina. O albinismo, por exemplo, que é caracterizado pela ausência ou redução significativa da melanina, e o melasma, que é caracterizado pela hiperpigmentação na pele. A melanogénese desregulada está também relacionada com melanoma, onde altos níveis de melanina podem ser observados (10).

3 Tirosinase

A tirosinase, que pertence à classe das oxidorreductases, tem cobre no seu local ativo. Isso ajuda na condução de processos cruciais que resultam na conversão da L-tirosina em melanina (11).

Estes dois íons de cobre, demonstram ser essenciais para a atividade catalítica da tirosinase, interagindo com o oxigênio molecular para hidroxilar monofenóis (como a L-tirosina) e oxidar difenóis (como a L-DOPA) em quinonas, que são os precursores imediatos da melanina (11).

Na indústria cosmética utilizam-se os inibidores da tirosinase para tratar condições onde exista uma produção excessiva de melanina. Os inibidores que atuam na atividade da tirosinase diminuem a síntese de melanina, como a arbutina, a hidroquinona e o ácido kójico, resveratrol, entre outros (12).

Os estudos destes inibidores podem trazer vários avanços quer em aplicações clínicas quer em aplicações na indústria alimentar uma vez que estes podem ser utilizados para prevenir o escurecimento de alimentos. Para criar novos medicamentos e produtos destinados à regulação da pigmentação e ao tratamento de condições relacionadas ao melanoma, é necessário compreender profundamente esta enzima (2).

3.1 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação da tirosinase envolve a transição entre três estados distintos: met-tirosinase, deoxi-tirosinase e oxi-tirosinase, que estão relacionados ao estado de oxidação dos íons de cobre:

- 1- **Met-Tirosinase:** Nesta forma de tirosinase, estão combinados os átomos de nitrogênio da histidina com os dois íons de cobre. A enzima não é ativa contra monofenóis nesta forma, mas pode oxidar catecóis em quinonas (Figura 1) (13);
- 2- **Deoxi-Tirosinase:** É composta por íons de cobre na forma reduzida (Cu^{1+}) e tem a capacidade de se combinar com o oxigênio molecular para formar a oxi-tirosinase (Figura 1) (13);

- 3- **Oxi-Tirosinase:** É a forma ativa da enzima, onde o oxigênio molecular é ligado de forma peroxi aos íons de cobre, permitindo que os monofenóis sejam hidroxilados em difenóis e depois oxidados em quinonas (Figura 1) (13).

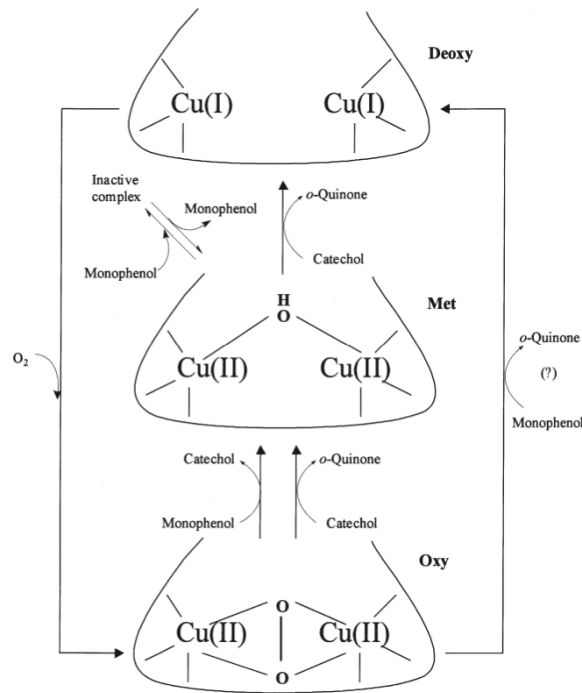


Figura 1 - Os Três Estados Distintos da Tirosinase

Fonte: (14)

O ciclo catalítico da tirosinase inicia-se com a oxidação da L-tirosina em L-DOPA, que uma vez transformada em dopaquinona pode seguir dois caminhos diferentes. Caminhos estes que com a presença da cisteína podem levar à formação da cisteinildopa e por consequência à feomelanina, ou sem a presença de cisteína que leva então à presença de ciclodopa que por sua vez se irá transformar em dopacromo. Posteriormente o dopacromo na presença de tirosina ligada à proteína 1 e 2 irá converter-se em eumelanina (Figura 2) (11,15).

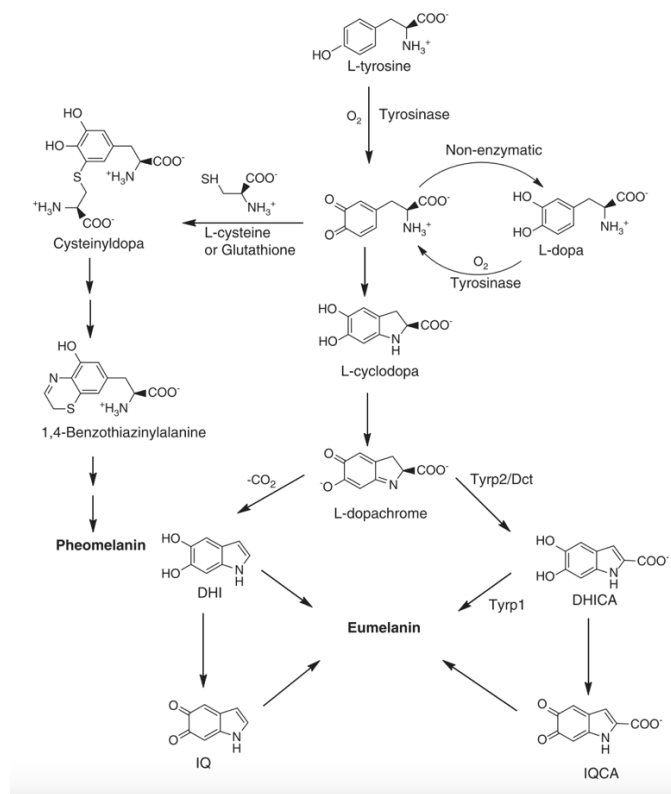


Figura 2 - Síntese da Feomelanina e da Eumelanina

Fonte: (11)

3.2 Danos Oxidativos

Os danos oxidativos desempenham um papel crucial na ativação e regulação da tirosinase. As ERO estão diretamente relacionadas com a regulação de processos fisiológicos e patológicos, incluindo o envelhecimento da pele, cânceres de pele e desordens pigmentares como melasma e hiperpigmentação. Deste modo, os danos oxidativos influenciam a função da tirosinase e os mecanismos envolvidos na sua ação:

3.2.1 Produção de ERO e sua Influência na Tirosinase

Os radicais livres, ou espécies reativas de oxigênio (ERO), são subprodutos do metabolismo celular, gerados principalmente em mitocôndrias durante a respiração celular. Entre as principais ERO estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e o radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Estas espécies reativas podem danificar componentes celulares, como proteínas, lipídios e DNA. Na pele, a exposição à

radiação ultravioleta (UV), poluentes ambientais e toxinas químicas acelera a produção de ERO (9,16).

A tirosinase, sendo uma enzima rica em cobre, é sensível às mudanças no ambiente oxidativo. A exposição a ERO tanto pode aumentar a atividade da tirosinase quanto afetar a sua estrutura. O peróxido de hidrogénio (H_2O_2), um dos principais ERO gerados pela exposição aos raios UV, é conhecido por ativar a tirosinase, o que leva a um aumento da síntese de melanina. Isso ocorre porque os ERO podem causar oxidação de substratos como a L-DOPA, promovendo a produção de melanina (16).

3.2.2 Mecanismo de Ação de ERO na Melanogénese

A melanogénese é fortemente influenciada pelos níveis de ERO na célula. A tirosinase catalisa duas reações essenciais na produção de melanina e em condições de “stress” oxidativo, o excesso de ERO aumenta a oxidação da L-DOPA, o que acelera a melanogénese. Assim, altos níveis de ERO na pele, seja por fatores ambientais como radiação UV ou envelhecimento, podem causar uma superprodução de melanina, resultando em condições de hiperpigmentação (9).

3.2.3 Defesa Antioxidante e Regulação da Tirosinase

O corpo possui mecanismos de defesa antioxidante para neutralizar os efeitos das ERO, entre eles estão as enzimas como superóxido dismutase (SOD), catalase e glutathione peroxidase. Estas enzimas trabalham em conjunto para desintoxicar o organismo de ERO, prevenindo danos celulares e modulando a atividade da tirosinase (16).

Superóxido dismutase (SOD): A SOD converte o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), gerado durante a atividade da tirosinase, em peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que é menos prejudicial. Essa transformação inicial reduz a toxicidade das ERO.

Catalase: A catalase, por sua vez, converte o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio, neutralizando a sua reatividade. Isto é particularmente importante, pois o peróxido de hidrogénio pode ser convertido em radicais hidroxilo, que são extremamente prejudiciais às células.

Glutationa peroxidase: Atua na redução de peróxidos, como o H_2O_2 , e na regeneração da glutationa, que é um antioxidante intracelular essencial para a proteção contra o “stress” oxidativo.

3.2.4 Danos Oxidativos e Desordens Pigmentares

Condições de hiperpigmentação são exacerbadas pela exposição prolongada à radiação UV, que aumenta a produção de ERO na pele. Em resposta a essa agressão oxidativa, a tirosinase é ativada, resultando em uma produção descontrolada de melanina. Isso explica por que desordens pigmentares são frequentemente associadas ao envelhecimento e à exposição solar. Além disso, os ERO podem causar mutações no DNA das células da pele, levando à formação de melanomas (9).

3.2.5 Inibição dos Danos Oxidativos como Terapia para a Hiperpigmentação

Para tratar condições relacionadas com a hiperpigmentação, a inibição dos danos oxidativos é uma estratégia eficaz.

Uma das estratégias é através de antioxidantes, uma vez que estes desempenham um papel crucial na proteção das células contra os efeitos nocivos das ERO. A inibição dos danos oxidativos pode ocorrer de várias maneiras(1,12):

Neutralização direta das ERO: Antioxidantes, como a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (tocoferol) e compostos fenólicos, atuam diretamente neutralizando os radicais livres e o peróxido de hidrogénio. Ao doar elétrons para essas espécies reativas, eles estabilizam as ERO e previnem a formação de danos às células cutâneas e aos melanócitos.

Vitamina C: Além de seu papel antioxidante, o ácido ascórbico também tem a capacidade de reduzir os íons de cobre, inativando a tirosinase temporariamente e impedindo a oxidação da tirosina. Esse mecanismo reduz tanto a síntese de melanina quanto a geração de ERO.

Vitamina E: Por ser lipossolúvel, a vitamina E protege as membranas celulares da peroxidação lipídica, um tipo de dano oxidativo que afeta as camadas lipídicas da célula. Ao prevenir a oxidação dos lipídios da membrana dos melanócitos, a vitamina E garante a integridade celular e reduz a inflamação.

4 Inibidores da Tirosinase

Os inibidores da tirosinase podem ser de origem natural ou sintéticos sendo que cada um apresenta vantagens, mas também limitações em relação à sua eficácia e segurança. Em seguida são apresentados alguns exemplos de inibidores que têm obtido maior destaque.

4.1 Hidroquinona

A hidroquinona é um composto orgânico (Figura 3) frequentemente utilizado na área dermatológica para tratar distúrbios de hiperpigmentação, como o melasma, sardas e a hiperpigmentação pós-inflamatória. Ao longo das últimas décadas, a hidroquinona tem sido o inibidor da tirosinase mais utilizado para terapias clareadoras devido à sua eficácia na redução da pigmentação da pele. No entanto, o uso prolongado e a possibilidade de toxicidade da hidroquinona tem criado algumas preocupações, o que tem levado a regulamentações mais rígidas em vários países (17).

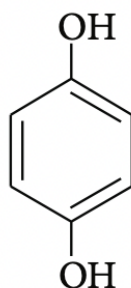


Figura 3 - Hidroquinona

Fonte: (18)

4.1.1 Mecanismo de Ação

A hidroquinona é um composto fenólico que tem como principal função ser um **inibidor da enzima tirosinase**, mas apresenta também outros mecanismos de ação.

Inibidor Competitivo da Tirosinase

Como referido anteriormente, a ação principal da hidroquinona é **inibir competitivamente a tirosinase**. Ela atua ligando-se ao sítio ativo da tirosinase, onde

normalmente a tirosina se ligaria. Isso evita que a tirosinase atue sobre a tirosina, bloqueando assim a síntese de melanina.

Além disso, a hidroquinona, quando oxidada pela tirosinase, produz radicais livres que podem ser tóxicos para os melanócitos. Esses radicais induzem danos oxidativos, que interferem no metabolismo dos melanócitos, alterando a morfologia das células e impedindo a síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA), o que pode resultar numa menor atividade melanogénica e menor pigmentação (19).

Redução da Síntese de Melanina

A hidroquinona também reduz a síntese de melanina ao diminuir a quantidade de melanossomas, os organelos responsáveis pelo armazenamento e transporte de melanina dentro dos melanócitos. O inibidor interfere na maturação e transferência dos melanossomas para os queratinócitos, as células epiteliais onde a melanina é distribuída na pele (17).

Ao bloquear a tirosinase e reduzir a produção de melanina, a hidroquinona atua gradualmente, com os queratinócitos contendo melanina sendo naturalmente eliminados através do “turnover” celular, levando ao clareamento da pele ao longo do tempo.

Capacidade Antioxidante

Além do seu efeito direto na tirosinase, a hidroquinona também atua como um antioxidante, neutralizando espécies reativas de oxigénio (ERO). Isso pode ajudar a proteger os melanócitos de danos adicionais que poderiam exacerbar a hiperpigmentação, ao mesmo tempo que potencializa a redução da melanogénese.

4.1.2 Hidroquinona vs Outros Agentes Clareadores

São bastante frequentes as comparações entre a hidroquinona e outros agentes clareadores, como arbutina, ácido ascórbico e ácido kójico. Ainda que a hidroquinona tenha um efeito mais rápido, os seus efeitos colaterais podem ser mais graves em comparação com outros agentes, deste modo por vezes é evitada a sua utilização. Estudos mostraram que a adição de ácido retinoico ou corticosteroides a uma hidroquinona pode melhorar sua eficácia, mas também aumentar o risco de efeitos colaterais (20).

4.1.3 Segurança e Toxicidade

Embora toda a sua eficácia a hidroquinona tem efeitos colaterais, como dermatite de contacto, hiperpigmentação pós-inflamatória e, em casos raros, ocronose exógena, uma condição que causa manchas azuladas ou negras na pele.

Relativamente à sua citotoxicidade, em altas concentrações ou com uso prolongado, a hidroquinona pode induzir efeitos citotóxicos nos melanócitos. Ela interfere nos processos celulares fundamentais, como a síntese de DNA e RNA, o que pode resultar em destruição celular parcial ou total, contribuindo ainda mais para a redução da pigmentação da pele (17).

Devido a esses perigos, muitos países restringiram ou baniram a hidroquinona em produtos de venda livre e recomendam o seu uso apenas sob supervisão médica. Além disso, estudos em animais mostraram que a hidroquinona pode causar danos renais e hepáticos, o que levanta dúvidas sobre sua segurança a longo prazo. A carcinogenicidade potencial da hidroquinona também tem sido discutida, embora a evidência em humanos ainda não tenha sido concluída (21).

4.2 Arbutina

A arbutina é um composto fenólico que é principalmente derivado das plantas do género *Arctostaphylos*, que inclui a uva-ursi. Este inibidor é frequentemente utilizado em produtos cosméticos e farmacêuticos devido às suas propriedades de clareamento da pele. O principal mecanismo pelo qual a arbutina é eficaz na redução da pigmentação da pele é sua capacidade de inibir a tirosinase (22).

A arbutina pode existir sobre a natureza de dois isómeros do composto, sendo que o isómero usado determina a eficácia da arbutina como inibidor da tirosinase. A arbutina **alfa (α)** (Figura 4) e a **beta (β)** (Figura 5) são os dois isómeros existentes. A alfa-arbutina é considerada mais eficaz e estável do que a beta-arbutina quando a glicose está ligada de forma diferente. A configuração alfa permite uma interação mais eficaz com o sítio ativo da tirosinase, resultando numa inibição mais eficaz da síntese de melanina (23).

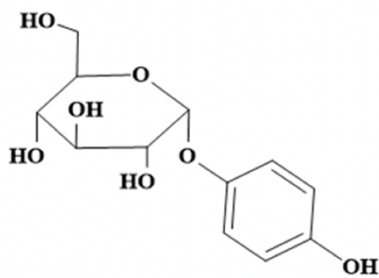


Figura 4 - α -Arbutina

Fonte: (24)

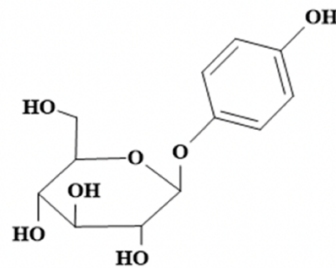


Figura 5 - β -Arbutina

Fonte: (24)

4.2.1 Mecanismo de Ação

A arbutina funciona como um inibidor competitivo da enzima tirosinase.

Sendo a arbutina, um glicosídeo de hidroquinona, tem uma ligação β -glicosídica entre as moléculas de glicose e a hidroquinona. Esta pode funcionar como um substrato análogo competitivo para a tirosinase devido a esta estrutura. A ação inibitória deste composto centra-se principalmente na sua ligação ao cobre no sítio ativo da tirosinase (25).

A arbutina liga-se então ao sítio ativo da tirosinase ao competir com a L-tirosina, impedindo que a L-tirosina se transforme em L-DOPA. Como resultado, a síntese de melanina é significativamente reduzida, o que resulta numa pele menos pigmentada (25).

Um aspeto importante a ter em conta no mecanismo de ação da arbutina é que, uma vez dentro do corpo, ela é metabolizada para hidroquinona, um potente inibidor da melanogénese. Isso ocorre por meio da quebra da ligação glicosídica da arbutina, libertando hidroquinona que atua diretamente na inibição da tirosinase.

A capacidade de libertar hidroquinona de forma lenta e controlada é uma característica importante. Embora a hidroquinona seja um forte inibidor da tirosinase, o seu uso direto está associado a riscos significativos de efeitos colaterais, incluindo ocrinose exógena, como foi falado atrás. Ao libertar pequenas quantidades de hidroquinona na pele durante a metabolização, a arbutina inibe eficazmente a tirosinase com os riscos de efeitos prejudiciais graves mais reduzidos e controlados (26).

A arbutina não só inibe a tirosinase, como também pode reduzir a dopaquinona, um intermediário reativo na via da melanogénese, aumentando a concentração do precursor menos reativo dihidroxifenilalanina (DOPA). Este processo de redução é significativo porque a dopaquinona, quando acumulada, pode levar à produção de espécies reativas de oxigénio e outros radicais livres, que não só contribuem para a produção de melanina, mas também causam danos oxidativos às células da pele (27).

A libertação de hidroquinona pela arbutina é controlada, o que minimiza os efeitos adversos típicos da aplicação direta de hidroquinona pura, tornando a arbutina uma opção mais segura para o clareamento da pele.

4.2.2 Eficácia e Aplicações

Devido à sua capacidade de diminuir a síntese de melanina sem causar os efeitos colaterais da hidroquinona, como citotoxicidade e potencial carcinogenicidade, a arbutina tem sido amplamente utilizada em produtos de clareamento de pele. Estudos clínicos demonstraram que a arbutina tópica pode reduzir significativamente a hiperpigmentação em condições como lentiginas solares e melasma.

Quando a arbutina é usada em conjunto com outros agentes clareadores, como o ácido kójico, a vitamina C e o ácido elágico, ela pode melhorar a redução da pigmentação da pele de forma sinérgica.

4.2.3 Segurança e Toxicidade

A arbutina é normalmente considerada segura para uso em cosméticos, mas há preocupações sobre como ela se transforma em hidroquinona, principalmente em certas condições de armazenamento ou quando exposta à radiação ultravioleta.

Existem evidências que a arbutina pode produzir hidroquinona em quantidades pequenas durante a aplicação tópica; portanto, há dúvidas sobre a segurança a longo prazo do uso de produtos contendo arbutina. Mas, independentemente da libertação de hidroquinona, a arbutina tem propriedades intrínsecas que impedem a melanogénese e a atividade da tirosinase (25).

4.2.4 Inovações

O principal desafio no uso da arbutina é maximizar sua eficácia enquanto minimiza o risco de efeitos adversos. As investigações nesta área procuram explorar novas formas de arbutina e combinações com outros ingredientes para melhorar sua estabilidade e eficácia.

A encapsulação em lipossomas, por exemplo, é uma estratégia promissora para aumentar a penetração da arbutina na pele e prolongar a sua libertação, potencializando os efeitos clareadores e reduzindo a irritação (23).

4.3 Vitamina C / Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, vulgarmente conhecido como Vitamina C, é uma molécula hidrossolúvel conhecida pelas suas propriedades antioxidantes e pelo seu papel importante em vários processos biológicos (Figura 6). Além de ser importante para a síntese de colagénio e para manter a saúde imunológica, o ácido ascórbico regula a melanogénese por meio da inibição da atividade da tirosinase (5,28).

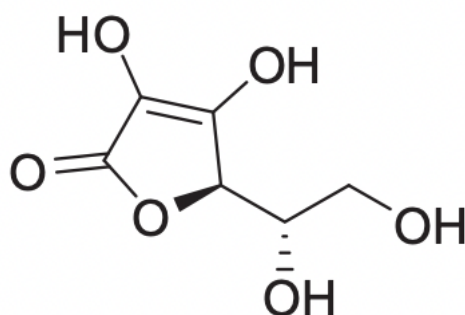


Figura 6 - Ácido Ascórbico

Fonte: (5)

4.3.1 Mecanismo de Ação

O ácido ascórbico impede a atividade da tirosinase de várias maneiras. Para começar sendo uma substância antioxidante, ele protege os melanócitos do “stress” oxidativo, o que pode inibir a tirosinase e diminuir a produção de melanina. Além disso, o ácido ascórbico tem o potencial de reduzir a dopaquinona, impedindo a produção de

melanina. O processo reduz a quantidade de melanina sintetizada, o que é especialmente útil para tratar a hiperpigmentação (28). Existem então várias formas de mecanismo de ação:

Inibição da Tirosinase por Redução de Iões de Cobre

O ácido ascórbico atua diretamente reduzindo os iões de cobre do estado Cu^{2+} para o estado Cu^{+} , o que inativa a enzima tirosinase e impede que ela catalise as reações de oxidação da tirosina para L-DOPA e de L-DOPA para dopaquinona. Dessa forma, o ácido ascórbico bloqueia as primeiras etapas da melanogénese, resultando na redução da produção de melanina (16,28).

Redução de Radicais Livres

O ácido ascórbico também age como um potente antioxidante, neutralizando as espécies reativas de oxigénio (ERO) que podem aumentar a atividade da tirosinase. Ao neutralizar essas, o ácido ascórbico protege os melanócitos e evita a ativação da tirosinase por processos oxidativos, contribuindo assim para a redução da produção de melanina (28).

Inibição da Síntese de Melanina e Clareamento da Pele

Além de inibir diretamente a tirosinase, o ácido ascórbico atua sobre a dopaquinona. Ele converte a dopaquinona de volta à sua forma reduzida (L-DOPA), desviando a reação de síntese da melanina. Esse efeito não só interrompe a produção de melanina, mas também promove a degradação dos pigmentos já formados, resultando no clareamento da pele (28).

Reciclagem de Dehidroascorbato e Regeneração de Antioxidantes

Quando o ácido ascórbico é oxidado durante suas reações de neutralização de ERO ou de inibição da tirosinase, ele converte-se em dehidroascorbato (DHA). A regeneração do ácido ascórbico a partir do DHA é um processo importante, mediado pela enzima glutatona redutase, que envolve a participação do sistema glutatona. Esse ciclo antioxidante mantém o ácido ascórbico disponível para continuar a exercer a sua função inibitória sobre a tirosinase e antioxidante nas células (16,28).

Outro mecanismo de grande relevância é a capacidade do ácido ascórbico conseguir quelar os iões metálicos, como o cobre. Ao ligar-se a esses iões, o ácido ascórbico impede a tirosinase de catalisar a oxidação da L-tirosina em L-DOPA. Essa inibição da

tirosinase resulta numa diminuição significativa na produção de melanina, o que é útil em tratamentos de clareamento da pele (29).

4.3.2 Potencial Terapêutico no Tratamento do Melanoma

O ácido ascórbico tem sido investigado devido ao seu potencial em tratamentos oncológicos, incluindo o melanoma (28).

Estudos mostram que o ácido ascórbico, em altas concentrações, pode ter um efeito pró-oxidante, gerando espécies reativas de oxigênio que danificam seletivamente as células cancerígenas, enquanto protege as células normais devido às suas características antioxidantes (29).

Contudo, mesmo com todos os benefícios comprovados do ácido ascórbico no tratamento da hiperpigmentação e no envelhecimento da pele, a sua eficácia pode ser alterada e limitada por outros fatores, como por exemplo a instabilidade da molécula (que é sensível à luz), o calor e o oxigênio. Com vista a superar estas adversidades foram desenvolvidas formas mais estáveis do ácido ascórbico, como o ascorbato de magnésio, que se mostraram mais eficazes nas formulações cosméticas (16).

4.4 Ácido Kójico

O ácido kójico é um produto de origem natural proveniente de várias espécies de fungos, nas quais estão incluídas a *Acetobacter*, a *Penicillium* e a *Aspergillus oryzae*. Este tem vindo a ganhar bastante utilidade na indústria farmacêutica e cosmética desde a sua descoberta, principalmente devido às suas características anti-melanogénica (Figura 7) (30).

O ácido kójico é utilizado no tratamento de muitos distúrbios de hiperpigmentação, uma vez que funciona como um inibidor da tirosinase bastante eficaz (31).

Este inibidor é um ácido orgânico classificado como uma pirona, com uma estrutura química que lhe permite quelar iões metálicos, como o cobre.

Essa capacidade de quelar metais é essencial para sua função como inibidor da tirosinase, uma vez que já foi referido que o cobre desempenha uma função muito importante como cofator necessário para a atividade enzimática da tirosinase. Para além

disso, o ácido kójico possui nas suas propriedades características antioxidantes que contribuem para uma maior eficácia na prevenção do fotoenvelhecimento e na proteção contra os danos induzidos por radicais livres (31).

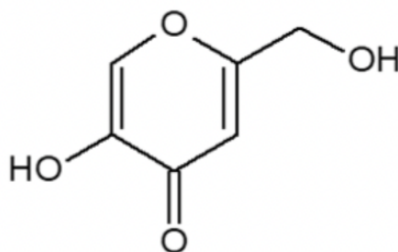


Figura 7 - Ácido Kójico

Fonte: (32)

4.4.1 Mecanismo de Ação

No seu mecanismo de ação, o ácido kójico tem duas maneiras principais de inibição da tirosinase (31):

Inibição Competitiva: O ácido kójico compete com o substrato natural da tirosinase, a L-tirosina, pelo sítio ativo da enzima. Esta competição impede assim que a L-tirosina se converta em L-DOPA. Ao bloquear essa reação, o ácido kójico reduz a produção geral de melanina, o que resulta em menos pigmentação na pele (Figura 8).

O ácido kójico também apresenta uma inibição mista: ele inibe competitivamente a atividade da monofenolase (etapa inicial da melanogênese) e exibe um efeito inibidor não competitivo sobre a difenolase, outra atividade enzimática essencial da tirosinase. Esse comportamento misto amplia sua eficácia na redução da síntese de melanina.

Quelação dos Iões de Cobre: O ácido kójico liga-se aos íons de cobre, desativando assim a enzima e impedindo a formação da melanina. Essa propriedade de quelante de metais é uma das razões pelas quais o ácido kójico é eficaz na inibição da tirosinase (Figura 8).

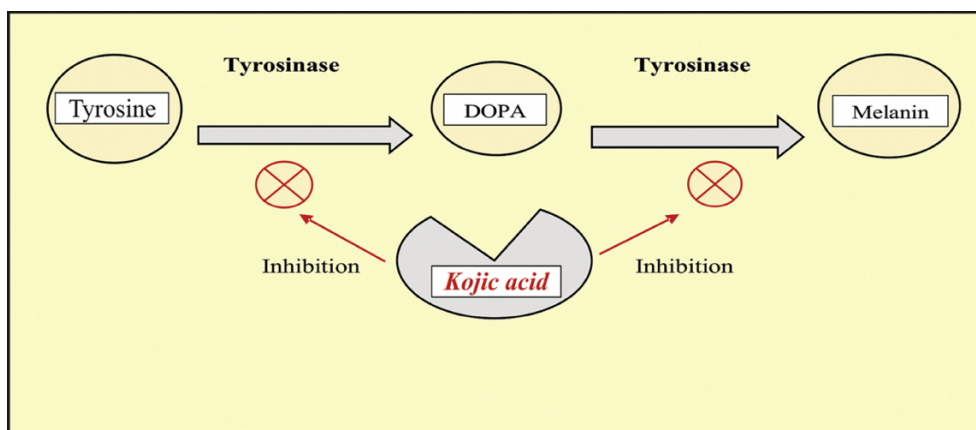


Figura 8 - Mecanismo de Ação do Ácido Kójico

Fonte: (33)

4.4.2 Segurança e Toxicidade

Independentemente de todo o valor e eficácia que são reconhecidos ao ácido kójico, existem alguns problemas aquando da sua utilização.

Os aspetos mais importantes a salientar são sua estabilidade e possível citotoxicidade. É comum que o ácido kójico fique instável em condições de armazenamento inadequadas, como a exposição à luz e ao ar, o que pode reduzir sua eficácia. Para além disso o ácido kójico pode ainda causar algum tipo de irritação na pele e tem sido associado a risco de sensibilização quando presente em concentrações elevadas (34).

Com vista a combater estes problemas aquando da utilização do ácido kójico surgiram novas formas derivadas do ácido kójico, como péptidos conjugados e derivados mais estáveis, que estão a ser desenvolvidas para ultrapassar estes problemas (Figura 10).

Estas descobertas visam aumentar a estabilidade do ácido kójico, diminuir sua citotoxicidade e aumentar a sua eficácia como agente anti-melanogénico (31).

4.5 Ácido Azelaico

O ácido azelaico é um ácido dicarboxílico (Figura 9) que está naturalmente presente em grãos como trigo, centeio e cevada ou em alguns fungos, como *Malassezia spp.*, que também o produzem (35).

Devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas, bem como pela sua capacidade de inibição da tirosinase, é amplamente utilizado na dermatologia.

O ácido azelaico é principalmente usado para tratar condições de hiperpigmentação, como melasma, mas também trata acne e rosácea (35).

O ácido azelaico, como referido anteriormente, é um composto dicarboxílico com nove átomos de carbono. Ele interage com vários alvos biológicos, como a tirosinase, graças à sua estrutura especial. É um forte inibidor da tirosinase devido à sua capacidade de quelar íons metálicos, como o cobre, que são necessários para a atividade da enzima. Além disso, as propriedades antioxidantes do ácido azelaico aumentam a sua eficácia no tratamento de doenças inflamatórias da pele (36).

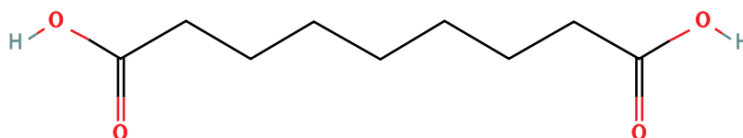


Figura 9 - Ácido Azelaico

Fonte: (37)

4.5.1 Mecanismo de Ação

Entre os diversos tipos de mecanismos de ação que o ácido azelaico tem, destaca-se a inibição da tirosinase através de uma **inibição competitiva**. Ele liga-se ao local ativo da enzima, onde a L-tirosina e outros substratos normalmente se ligam, impedindo assim que a L-tirosina se transforme em L-DOPA (Figura 10).

Além disso, o ácido azelaico tem a capacidade de alterar o **sistema redox** intracelular, (35):

Interfere no sistema redox celular, inibindo a enzima tioredoxina redutase, que desempenha um papel na regeneração do estado reduzido da tioredoxina, um cofator essencial para a atividade da tirosinase. Ao inibir a tioredoxina redutase, o ácido azelaico reduz a capacidade da tirosinase de oxidar tirosina e L-DOPA, afetando diretamente a produção de melanina (37).

O ácido azelaico apresenta ainda **propriedades citostáticas**, ou seja, inibe a proliferação de melanócitos anormais, que podem estar presentes em áreas de hiperpigmentação, como o melasma. Esse efeito citostático é importante não só para a redução da pigmentação, mas também como uma abordagem preventiva para evitar a expansão de melanócitos ativos em áreas hiperpigmentadas (37,38).

Este inibidor também é conhecido pelas suas propriedades antioxidantes importantes que complementam sua capacidade de inibir a tirosinase. Ele atua neutralizando espécies reativas de oxigênio (ERO).

Embora o foco principal do uso do ácido azelaico no contexto da tirosinase seja a sua capacidade de inibir a produção de melanina, ele também possui efeitos anti-inflamatórios e antimicrobianos, o que o torna útil no tratamento de várias condições dermatológicas, como rosácea e acne. Essas propriedades contribuem para a sua eficácia em desordens de hiperpigmentação (39).

Por último, um dos aspectos mais interessantes do ácido azelaico é que ele parece atuar preferencialmente em melanócitos anormais ou hiperativos, o que o torna eficaz no tratamento de condições de hiperpigmentação, sem afetar a pele normal circundante. Essa seletividade significa que o ácido azelaico pode tratar áreas hiperpigmentadas sem causar efeitos despigmentantes em regiões da pele que apresentam níveis normais de melanina (35).

Assim sendo o ácido azelaico é uma opção eficaz para o tratamento de distúrbios de hiperpigmentação uma vez que inibe a tirosinase, reduzindo significativamente a síntese de melanina nas células da pele, ocorrendo isto sem despigmentar as áreas saudáveis da pele circundante (36).

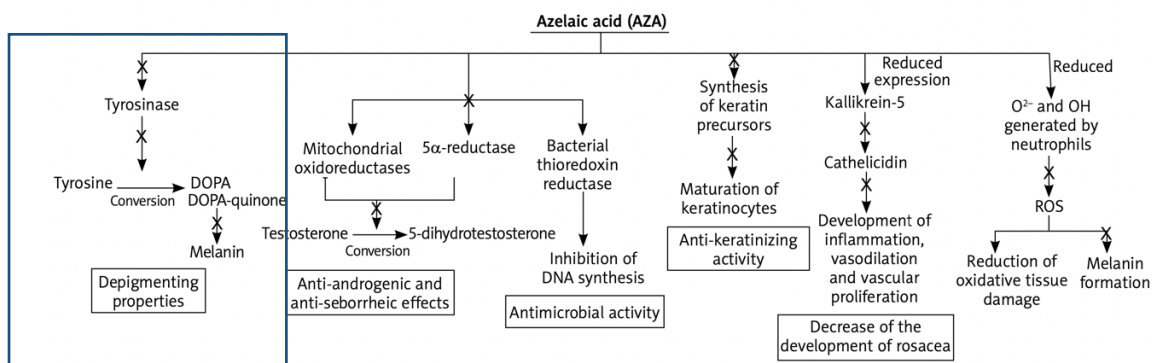


Figura 10 - Mecanismo de Ação do Ácido Azelaico

Fonte: Adaptado de (37)

4.5.2 Segurança e Prevenção

Há evidências preliminares de que o ácido azelaico pode ter efeitos anti proliferativos nas células de melanoma, embora o seu uso no tratamento do melanoma ainda esteja a ser estudado. Pode inibir a tirosinase e outros processos metabólicos importantes nas células cancerígenas, o que o coloca como uma terapia complementar para o tratamento e prevenção do melanoma (39).

Como dito anteriormente, ao contrário de outros agentes clareadores, como a hidroquinona, o ácido azelaico não está associado a efeitos colaterais graves como a ocronose exógena, tornando-o uma alternativa segura para uso prolongado (39).

Apesar de ser bem tolerado e ter efeitos colaterais menos frequentemente do que outros inibidores da tirosinase, esses efeitos continuam a existir sendo os mais vulgares a irritação leve e transitória da pele, como ardor ou prurido, que tendem a diminuir com o uso continuado (40).

4.5.3 Inovação: Tecnologia Lipossomal

Nos últimos tempos têm surgido novos desenvolvimentos de formulações lipossomais de ácido azelaico que demonstram um aumento significativo da biodisponibilidade e eficácia (35).

A tecnologia lipossomal permite que o ácido azelaico penetre mais profundamente nas camadas da pele, garantindo assim uma liberação mais consistente e um aumento da

concentração da substância ativa na pele. Isso pode melhorar os resultados terapêuticos, particularmente para doenças como acne e melasma, e diminuir a necessidade de reaplicações frequentes (38,41).

4.6 Resveratrol

O resveratrol (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) é um polifenol de origem natural que pertence à classe dos estilbenos. Este composto apresenta na sua estrutura dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de etileno, com grupos hidroxilo que desempenham um papel crucial na sua atividade biológica, incluindo a inibição da tirosinase. Este composto foi identificado pela primeira vez na casca da raiz da planta *Veratrum grandiflorum* em 1940, mas ganhou notoriedade ao ser encontrado em grandes quantidades na casca de uvas, especialmente as utilizadas na produção de vinho tinto. Nas últimas décadas, o resveratrol tem atraído atenção significativa devido às suas potenciais propriedades benéficas para a saúde, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, cardioprotetores e anticancerígenos.

Estudos sugerem que a capacidade do resveratrol de inibir a tirosinase está diretamente relacionada com a presença desses grupos hidroxilo na sua estrutura. A inibição ocorre principalmente por um mecanismo competitivo, onde o resveratrol compete com a L-DOPA pelo sítio ativo da enzima. A interação entre os grupos hidroxilo do resveratrol e os átomos de cobre presentes no centro catalítico da tirosinase é um fator determinante para sua eficácia inibitória (41,42).

O resveratrol apresenta isomeria geométrica, ou seja, ele pode existir em duas formas estruturais distintas. Estes isómeros são definidos pela disposição dos átomos em torno da ligação dupla de carbono (C=C) que liga os dois anéis aromáticos presentes na molécula.

Relativamente à estrutura dos isómeros eles podem existir das seguintes formas:

Trans-resveratrol: Na forma trans (Figura 11), os dois anéis aromáticos estão localizados em lados opostos em relação à ligação dupla C=C. Essa configuração é a forma mais estável e a mais abundante na natureza, especialmente nas uvas e no vinho tinto. O trans-resveratrol é mais estável devido à menor repulsão estereoa entre os grupos atômicos nos anéis aromáticos (43).

Cis-resveratrol: Na forma cis (Figura 12), os anéis aromáticos estão dispostos do mesmo lado da ligação dupla C=C. Esta configuração é menos estável do que a forma trans e é menos comum na natureza. O cis-resveratrol pode ser formado a partir do trans-resveratrol quando este é exposto à luz ultravioleta ou a condições de aquecimento (43).

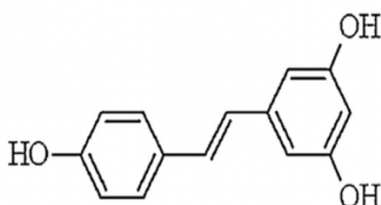


Figura 11 - trans-Resveratrol

Fonte: (43)

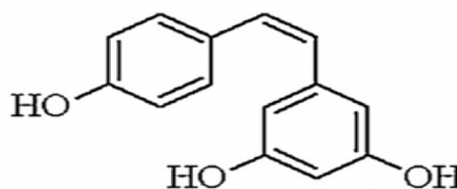


Figura 12 - cis-Resveratrol

Fonte:(43)

O trans-resveratrol é a forma biologicamente ativa e mais estável sob condições normais. Ele é mais resistente à degradação e pode manter as suas propriedades antioxidantes e inibitórias da tirosinase por mais tempo. Em contraste, o cis-resveratrol é pouco estável e pode sofrer rápida degradação quando exposto ao ambiente, o que limita a sua presença aplicações farmacêuticas e cosméticas (44).

Ao nível da conversão o trans-resveratrol pode formar a forma cis ocorrendo principalmente sob exposição à luz ultravioleta (UV) ou a altas temperaturas. Isto representa um problema significativo no armazenamento de produtos que contenham resveratrol, pois a luz pode induzir essa isomerização e reduzir a atividade biológica do composto. Por essa razão, muitos produtos que utilizam resveratrol são formulados em embalagens opacas ou com aditivos que previnem a exposição à luz (42).

Estudos indicam que o trans-resveratrol é o isômero mais eficaz na modulação de vias moleculares associadas à redução do “stress” oxidativo, inflamação, e até na prevenção do cancro.

Na inibição da tirosinase o trans-resveratrol tem mostrado ser um inibidor competitivo eficaz da tirosinase, ligado à sua capacidade de se coordenar com os íons de cobre presentes no centro ativo da enzima. Já o cis-resveratrol, por sua vez, não tem sido tão amplamente estudado nesse contexto, mas a maioria dos estudos sugerem que ele tem uma atividade significativamente menor. Devido a esta sua maior estabilidade e eficácia o trans-resveratrol é o isômero preferido em formulações cosméticas e farmacêuticas.

Os produtos que contêm trans-resveratrol podem ser mais eficazes em tratamentos tópicos para hiperpigmentação e envelhecimento da pele (42).

4.6.1 Mecanismo de Ação

O mecanismo de ação do resveratrol como inibidor da tirosinase envolve interações diretas com o centro ativo da enzima, afetando o seu funcionamento na biossíntese da melanina. Deste modo o resveratrol atua de diversas maneiras com o propósito de inibir a tirosinase:

4.6.1.1 Competição pelo Sítio Ativo da Tirosinase

Como já foi referido o resveratrol age predominantemente como um inibidor competitivo, competindo com os substratos naturais da tirosinase, como a L-DOPA, pelos sítios ativos da enzima. Esses sítios ativos contêm átomos de cobre (CuA e CuB). Quando o resveratrol se liga ao sítio ativo, ele impede que o substrato (L-DOPA) se ligue à enzima, bloqueando assim a conversão da L-DOPA em dopaquinona, interrompendo a síntese de melanina (41,42).

4.6.1.2 Inibição Não-Competitiva após Metabolização

Além da inibição competitiva, o resveratrol pode atuar também como um inibidor não-competitivo, após passar por processos de metabolização. Os metabolitos do resveratrol podem ligar-se a regiões diferentes do sítio ativo da tirosinase, alterando a conformação da enzima e diminuindo a velocidade da reação catalítica, sem competir diretamente com o substrato (42).

4.6.1.3 Efeitos sobre Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Outro aspeto a ter em conta no mecanismo de ação do resveratrol é a sua potente ação antioxidante. A tirosinase, durante o processo de síntese de melanina, gera espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem aumentar a atividade da enzima e intensificar a formação de melanina. O resveratrol, ao neutralizar essas espécies reativas de

oxigênio, reduz indiretamente a atividade da tirosinase, diminuindo a oxidação da L-DOPA em dopaquinona (41).

4.6.1.4 Importância Estrutural dos Grupos Hidroxilo

A eficácia do resveratrol como inibidor da tirosinase está diretamente ligada à presença de grupos hidroxilo (-OH) na sua estrutura. Esses grupos desempenham um papel crítico ao facilitar as interações com o centro ativo da enzima. A disposição dos grupos hidroxilo nos anéis aromáticos do resveratrol é determinante para sua capacidade de inibir a tirosinase, e variações nessa estrutura podem alterar significativamente sua eficácia inibitória (45).

A estrutura do resveratrol consiste em dois anéis aromáticos ligados por uma ponte etilênica. Os grupos hidroxilo estão localizados nas posições 3, 5 e 4' dos anéis aromáticos, e a disposição espacial desses grupos é crucial para a interação com a tirosinase:

Grupo hidroxilo na posição 4': Este grupo, localizado no anel B da estrutura do resveratrol, tem sido destacado em estudos como a principal função responsável pela inibição da tirosinase. A presença de um grupo hidroxilo nessa posição favorece a interação com o centro catalítico da tirosinase, aumentando a afinidade do resveratrol pela enzima e, conseqüentemente, a sua capacidade inibitória (42,45).

Grupos hidroxilo nas posições 3 e 5: Esses grupos, localizados no anel A do resveratrol, também contribuem para a estabilização da interação com a tirosinase, porém com menor impacto que o grupo hidroxilo na posição 4'. A sua presença adiciona mais pontos de interação com a enzima, o que pode aumentar a eficácia inibitória. Além disso, estes grupos hidroxilo podem participar na formação de complexos com os íons de cobre no centro ativo da tirosinase, potencializando o efeito inibidor (41,45).

4.6.2 Aplicações Terapêuticas e Cosméticas

O uso de inibidores da tirosinase como o resveratrol é amplamente explorado em tratamentos de desordens de pigmentação da pele. Devido à sua capacidade de inibir a tirosinase, o resveratrol tem sido incorporado em formulações cosméticas destinadas ao

clareamento da pele, auxiliando no tratamento de condições como hiperpigmentação pós-inflamatória e melasma. No entanto, estudos apontam que o resveratrol por si só pode não ser suficiente para alcançar resultados clínicos expressivos em tratamentos de clareamento da pele, sendo mais eficaz quando utilizado em combinação com outros compostos.

Além de seu uso em cosméticos, a inibição da tirosinase pelo resveratrol também tem aplicações potenciais em outras áreas.

Na indústria alimentar, o escurecimento enzimático de frutas e vegetais ocorre quando os tecidos vegetais são danificados durante o manuseio, processamento ou armazenamento (46). Além de afetar a aparência dos alimentos, esse escurecimento afeta a sua qualidade nutricional, pois os produtos resultantes da oxidação podem ligar-se às proteínas, diminuindo a sua digestibilidade.

Este inibidor, em particular, pode ser utilizado para retardar o processo de escurecimento, prolongando a vida útil dos alimentos.

4.6.3 Segurança e Toxicidade

Embora o resveratrol seja amplamente utilizado em produtos cosméticos, ainda são necessários mais estudos clínicos para avaliar sua eficácia e segurança a longo prazo, especialmente em altas concentrações. Alguns estudos demonstram que o resveratrol é seguro para uso tópico, não apresentando efeitos colaterais significativos em doses moderadas. No entanto, como em muitos outros inibidores da tirosinase, a combinação com outros agentes pode ser necessária para aumentar sua eficácia e minimizar potenciais efeitos adversos.

5 Conclusão

A tirosinase é essencial para a síntese de melanina, uma vez que está no processo de produção da mesma, desempenhando um papel fulcral na regulação da melanogénese. No entanto, uma atividade excessiva ou desregulada desta enzima pode provocar várias condições como distúrbios de hiperpigmentação como melasma, lentigos solares e hiperpigmentação pós-inflamatória, além de estar ligada ao desenvolvimento do melanoma.

A hidroquinona, o ácido kójico, o ácido ascórbico, o ácido azelaico e o resveratrol são alguns dos vários inibidores da tirosinase e cada um desses inibidores tem mecanismos de ação diferentes, mas todos eles afetam diretamente a capacidade da tirosinase de induzir a síntese de melanina. Por exemplo, a hidroquinona inibe competitivamente a tirosinase e afeta a função dos melanócitos. Por outro lado, o ácido kójico atua ao quelar os íons de cobre, que são necessários para a atividade enzimática. O ácido azelaico, por sua vez, inibe a tirosinase e evita que a dopaquinona seja oxidada, enquanto o ácido ascórbico tem uma ação antioxidante e em doses elevadas uma ação pró-oxidante podendo neste caso vir a ser útil no tratamento do cancro de pele. Contudo é necessária mais investigação neste campo.

As aplicações destes inibidores são amplas, abrangendo tanto o campo cosmético quanto o terapêutico. No âmbito cosmético, estes compostos são amplamente utilizados para tratar e prevenir a hiperpigmentação, uniformizar o tom da pele e retardar os sinais de envelhecimento cutâneo. No campo terapêutico, inibidores como o ácido azelaico mostram potencial não apenas no tratamento de hiperpigmentação, mas também em condições como acne e rosácea, devido às suas propriedades anti-inflamatórias e antimicrobianas. É ainda de salientar o uso de inibidores da tirosinase no tratamento do melanoma, destacando a importância dessa enzima como um alvo terapêutico oncológico.

Apesar das vantagens, o uso de inibidores da tirosinase apresenta alguns riscos. Embora apresente uma eficácia elevada, a hidroquinona tem sido associada a muitos efeitos prejudiciais, incluindo o cronose exógena, o que levou vários países a aumentar o controlo sobre o seu uso.

O ácido kójico, por outro lado, é menos tóxico, mas tem problemas de estabilidade e pode causar sensibilização cutânea. Essas dificuldades enfatizam a necessidade de prosseguir com a investigação nesta área de modo a descobrir novos inibidores da tirosinase mais eficazes, seguros e estáveis.

Nos estudos mais recentes apareceram vantagens no campo dos inibidores da tirosinase, como o desenvolvimento de formulações lipossomais e a investigação de novos materiais de origem natural e sintéticos, que mostram um futuro promissor nesta área. Essas inovações não tornam apenas os tratamentos atuais mais eficazes e seguros, mas também abrem portas a novas abordagens terapêuticas.

Em suma, os inibidores da tirosinase são uma solução vital na dermatologia e na cosmética. Visam criar tratamentos mais seguros e eficazes que atendam às necessidades dos pacientes e consumidores, onde é fundamental ter uma compreensão completa dos mecanismos de ação, vantagens e desvantagens desses componentes. A investigação nesta área promete melhorar os tratamentos atuais e abrir novas fronteiras na prevenção e tratamento do melanoma e das doenças de pigmentação.

Referências Bibliográficas

1. Baber MA, Crist CM, Devolve NL, Patrone JD. Tyrosinase Inhibitors: A Perspective. Vol. 28, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2023.
2. Zolghadri S, Bahrami A, Hassan Khan MT, Munoz-Munoz J, Garcia-Molina F, Garcia-Canovas F, et al. A comprehensive review on tyrosinase inhibitors. Vol. 34, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Taylor and Francis Ltd; 2019. p. 279–309.
3. Ferreira I, Videira S, Lima Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis * Mecanismos reguladores da melanogênese. Vol. 88, *An Bras Dermatol*. 2013.
4. Solano F. Melanins: Skin Pigments and Much More—Types, Structural Models, Biological Functions, and Formation Routes. *New J Sci*. 2014 Mar 18;2014:1–28.
5. Pillaiyar T, Manickam M, Namasivayam V. Skin whitening agents: Medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. Vol. 32, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. Taylor and Francis Ltd; 2017. p. 403–25.
6. Slominski RM, Sarna T, Płonka PM, Raman C, Brożyna AA, Slominski AT. Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. Vol. 12, *Frontiers in Oncology*. Frontiers Media S.A.; 2022.
7. Slominski A, Wortsman J, Carlson AJ, Matsuoka LY, Balch CM, Mihm MC. Special Article Malignant Melanoma An Update. Vol. 125, *Arch Pathol Lab Med*. 2001.
8. Snyman M, Walsdorf RE, Wix SN, Gill JG. The metabolism of melanin synthesis—From melanocytes to melanoma. Vol. 37, *Pigment Cell and Melanoma Research*. John Wiley and Sons Inc; 2024. p. 438–52.
9. Kumari S, Thng STG, Verma NK, Gautam HK. Melanogenesis inhibitors. Vol. 98, *Acta Dermato-Venereologica*. Medical Journals/Acta D-V; 2018. p. 924–31.
10. Li C, Kuai L, Cui R, Miao X. Melanogenesis and the Targeted Therapy of Melanoma. Vol. 12, *Biomolecules*. MDPI; 2022.

11. Mendes E, Perry MDJ, Francisco AP. Design and discovery of mushroom tyrosinase inhibitors and their therapeutic applications. Vol. 9, *Expert Opinion on Drug Discovery*. Informa Healthcare; 2014. p. 533–54.
12. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. Vol. 17, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2002. p. 207–18.
13. D’Mello SAN, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
14. Rescigno A, Sollai F, Pisu B, Rinaldi A, Sanjust E. Tyrosinase inhibition: General and applied aspects. Vol. 17, *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 2002. p. 207–18.
15. Chang TS. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. Vol. 5, *Materials*. 2012. p. 1661–85.
16. Conklin PL, Foyer CH, Hancock RD, Ishikawa T, Smirnoff N. Ascorbic acid metabolism and functions. *J Exp Bot*. 2024 May 3;75(9):2599–603.
17. Fabian IM, Sinnathamby ES, Flanagan CJ, Lindberg A, Tynes B, Kelkar RA, et al. Topical Hydroquinone for Hyperpigmentation: A Narrative Review. *Cureus*. 2023 Nov 15;
18. Enguita FJ, Leitão AL. Hydroquinone: Environmental pollution, toxicity, and microbial answers. Vol. 2013, *BioMed Research International*. 2013.
19. Kwon SH, Hwang YJ, Lee SK, Park KC. Heterogeneous pathology of Melasma and its clinical implications. Vol. 17, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2016.
20. Chandra M, Levitt J, Pensabene CA. Hydroquinone therapy for post-inflammatory hyperpigmentation secondary to acne: Not just prescribable by dermatologists. Vol. 92, *Acta Dermato-Venereologica*. 2012. p. 232–5.
21. Bhattarai N, Hytti M, Reinisalo M, Kaarniranta K, Mysore Y, Kauppinen A. Hydroquinone predisposes for retinal pigment epithelial (RPE) cell degeneration in inflammatory conditions. *Immunol Res*. 2022 Oct 1;70(5):678–87.

22. Boo YC. Arbutin as a skin depigmenting agent with antimelanogenic and antioxidant properties. Vol. 10, *Antioxidants*. MDPI; 2021.
23. Hassan M, Shahzadi S, Kloczkowski A. Tyrosinase Inhibitors Naturally Present in Plants and Synthetic Modifications of These Natural Products as Anti-Melanogenic Agents: A Review. Vol. 28, *Molecules*. MDPI; 2023.
24. Garcia-Jimenez A, Teruel-Puche JA, Berna J, Rodriguez-Lopez JN, Tudela J, Garcia-Canovas F. Action of tyrosinase on alpha and betaarbutin: A kinetic study. *PLoS One*. 2017 May 1;12(5).
25. Mann T, Gerwat W, Batzer J, Eggers K, Scherner C, Wenck H, et al. Inhibition of Human Tyrosinase Requires Molecular Motifs Distinctively Different from Mushroom Tyrosinase. *Journal of Investigative Dermatology*. 2018 Jul 1;138(7):1601–8.
26. Kwon SH, Na JI, Choi JY, Park KC. Melasma: Updates and perspectives. Vol. 28, *Experimental Dermatology*. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 704–8.
27. Jelic MD, Mandic AD, Maricic SM, Srdjenovic BU. Oxidative stress and its role in cancer. Vol. 17, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2021. p. 22–8.
28. Guo D, Liao Y, Na J, Wu L, Yin Y, Mi Z, et al. The Involvement of Ascorbic Acid in Cancer Treatment. Vol. 29, *Molecules*. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI); 2024.
29. Pullar JM, Carr AC, Vissers MCM. The roles of vitamin C in skin health. Vol. 9, *Nutrients*. MDPI AG; 2017.
30. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. Vol. 110, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 582–93.
31. Singh BK, Park SH, Lee HB, Goo YA, Kim HS, Cho SH, et al. Kojic acid peptide: A new compound with anti-tyrosinase potential. *Ann Dermatol*. 2016 Oct 1;28(5):555–61.
32. Saeedi M, Eslamifar M, Khezri K. Kojic acid applications in cosmetic and pharmaceutical preparations. Vol. 110, *Biomedicine and Pharmacotherapy*. Elsevier Masson SAS; 2019. p. 582–93.

33. Singh BK, Park SH, Lee HB, Goo YA, Kim HS, Cho SH, et al. Kojic acid peptide: A new compound with anti-tyrosinase potential. *Ann Dermatol.* 2016 Oct 1;28(5):555–61.
34. Yuan Z, Guo W, Yang J, Li L, Wang M, Lei Y, et al. PNAS-4, an early DNA damage response gene, induces S phase arrest and apoptosis by activating checkpoint kinases in lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry.* 2015 Jun 12;290(24):14927–44.
35. Sauer N, Oślizło M, Brzostek M, Wolska J, Lubaszka K, Karłowicz-Bodalska K. The multiple uses of azelaic acid in dermatology: mechanism of action, preparations, and potential therapeutic applications. Vol. 40, *Postepy Dermatologii i Alergologii.* Termedia Publishing House Ltd.; 2023. p. 716–24.
36. Ismail M, Hassan MHA, Mohamed EIA, Azmy AF, Moawad A, Mohammed R, et al. New insights into the anti-inflammatory and anti-melanoma mechanisms of action of azelaic acid and other *Fusarium solani* metabolites via in vitro and in silico studies. *Sci Rep.* 2024 Dec 1;14(1).
37. Sauer N, Oślizło M, Brzostek M, Wolska J, Lubaszka K, Karłowicz-Bodalska K. The multiple uses of azelaic acid in dermatology: mechanism of action, preparations, and potential therapeutic applications. Vol. 40, *Postepy Dermatologii i Alergologii.* Termedia Publishing House Ltd.; 2023. p. 716–24.
38. Albzea W, AlRashidi R, Alkandari D, Sadan M, Alkandari A, Alkanderi JJ, et al. Azelaic Acid Versus Hydroquinone for Managing Patients With Melasma: Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Cureus.* 2023 Jul 13;
39. Arshad T, Shoaib Khan HM, Akhtar N, Hanan H, Hussain MD, Kazi M. Structural elucidation and development of azelaic acid loaded mesoporous silica nanoparticles infused gel: Revolutionizing nanodrug delivery for cosmetics and pharmaceuticals. *Heliyon.* 2024 Apr 30;10(8).
40. van Zuuren EJ, Fedorowicz Z, Carter B, van der Linden MMD, Charland L. Interventions for rosacea. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews.* John Wiley and Sons Ltd; 2015.

41. Fais A, Corda M, Era B, Fadda MB, Matos MJ, Quezada E, et al. Tyrosinase inhibitor activity of coumarin-resveratrol hybrids. *Molecules*. 2009 Jul 1;14(7):2514–20.
42. Zimmermann Franco DC, De Carvalho GSG, Rocha PR, Da Silva Teixeira R, Da Silva AD, Barbosa Raposo NR. Inhibitory effects of resveratrol analogs on mushroom tyrosinase activity. *Molecules*. 2012 Oct;17(10):11816–25.
43. Salehi B, Mishra AP, Nigam M, Sener B, Kilic M, Sharifi-Rad M, et al. Resveratrol: A double-edged sword in health benefits. Vol. 6, *Biomedicines*. MDPI AG; 2018.
44. Na JI, Shin JW, Choi HR, Kwon SH, Park KC. Resveratrol as a multifunctional topical hypopigmenting agent. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
45. Boo YC. Human skin lightening efficacy of resveratrol and its analogs: From in vitro studies to cosmetic applications. *Antioxidants*. 2019 Sep 1;8(9).
46. Kim YJ, Uyama H. Tyrosinase inhibitors from natural and synthetic sources: Structure, inhibition mechanism and perspective for the future. Vol. 62, *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2005. p. 1707–23.