

Kojinska kiselina i derivati: priprava i biološka aktivnost

Mijoković, Dragana

Undergraduate thesis / Završni rad

2024

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:836010>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-02**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju
Prijediplomski studij Kemija

Dragana Mijoković

**KOJINSKA KISELINA I DERIVATI:
PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST**

Završni rad

Mentorica: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredna voditeljica: dr.sc. Marija Paurević

Osijek, 2024.

Naziv sveučilišta: Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku – Odjel za kemiju

Naziv studija: Sveučilišni prijediplomski studij Kemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Znanstvena grana: Anorganska kemija / Biokemija

KOJINSKA KISELINA I DERIVATI: PRIPRAVA I BIOLOŠKA AKTIVNOST

DRAGANA MIJOKOVIĆ

Rad je izrađen na: Sveučilištu u Osijeku – Odjel za kemiju

Mentor: izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

Neposredni voditelj: dr.sc. Marija Paurević

Sažetak:

Hidroksipiranoni pripadaju skupini heterocikličkih spojeva koji sadržavaju aromatski šesteročlani prsten s endocikličkim kisikovim atomom. Na prstenu su, kao supstituenti, najčešće vezane karbonilna i hidroksilna skupina. Kojinska kiselina jedan je od važnijih predstavnika ove skupine spojeva, koja osim navedenih supstituenata, na atomu C-2 sadrži vezanu hidroksimetilnu skupinu, koja je ujedno i najreaktivniji dio spomenute molekule. Zbog mogućnosti strukturne modifikacije, danas je poznat velik broj derivata kojinske kiseline, koji svoju primjenu najvećim dijelom pronalaze u medicini, kao potencijalni agensi za supresiju rasta tumorskih staničnih linija te kao depigmentacijska sredstva. U ovom radu predstavljeni su značajni rezultati iz novije literature u kojima je vidljiva raznovrsnost pripreme derivata kojinske kiseline kao i njihove biološke primjene.

Ključne riječi: *biološka aktivnost, depigmentacija, derivati, hidroksipiranoni, kojinska kiselina*

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Završni rad obuhvaća: 40 stranica, 12 slika, 6 tablica, 88 literaturnih navoda

Rad prihvaćen: 10.9.2024.

Stručno povjerenstvo za ocjenu rada:

1. izv. prof. dr. sc. Elvira Kovač-Andrić

2. izv. prof. dr. sc. Martina Šrajer Gajdošik

3. izv. prof. dr. sc. Vlatka Gvozdić

Rad je pohranjen: Knjižnica Odjela za kemiju, Kuhačeva 20, 31000 Osijek, Repozitorij Odjela za kemiju, Osijek

University Name: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek – Department of Chemistry**

Name of study programme: **University Undergraduate study programme in Chemistry**

Scientific area: Natural sciences

Scientific field: Chemistry

Scientific branch: Inorganic chemistry / Biochemistry

KOJIC ACID AND DERIVATIVES: PREPARATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY

DRAGANA MIJOKOVIĆ

The paper was created on: Department of Chemistry

Supervisor: Martina Šrajer Gajdošik, Ph.D. Associate Professor

Assistant supervisor: Marija Paurević, Ph.D. Research Assistant

Abstract:

Hydroxypyranones are a group of heterocyclic compounds containing an aromatic six-membered ring with one endocyclic oxygen atom per atom. As a rule, carbonyl and hydroxyl groups are attached to the ring. One of the most important representatives of this group is kojic acid, which contains a bound hydroxymethyl group in addition to the substituents mentioned on the C-2 atom, which also represents the most reactive part of the molecule mentioned. Due to the possibility of structurally modifying the molecules, a large number of kojic acid derivatives are known today, most of which are used in medicine as potential agents to suppress the growth of tumor cell lines and as depigmenting agents. This paper presents the most important findings from the recent literature, emphasizing the diversity in the production of kojic acid derivatives and their biological evaluation.

Keywords: *biological activity, depigmentation, derivatives, hydroxypyranones, kojic acid*

Original language: Croatian language

Thesis includes: 40 pages, 12 figures, 6 tables, 88 references

Thesis accepted: 10.9.2024.

Reviewers:

1. Assoc. Prof.dr.sc. Elvira Kovač-Andrić
2. Assoc. Prof.dr.sc. Martina Šrajer Gajodišik
3. Assoc. Prof.dr.sc. Vlatka Gvozdić

Thesis deposited in: Library of the Department of Chemistry, Ulica Franje Kuhača 20, Osijek Repository of the Department of Chemistry, Osijek

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Hidroksipiranoni – općenite značajke i dobivanje	2
2.2. Metode pripreve i izolacije kojinske kiseline.....	6
2.3. Karakteristične reakcije kojinske kiseline.....	7
2.3.1. Jonesova oksidacija.....	8
2.4. Derivati kojinske kiseline.....	9
2.4.1. Priprava i fizikalno-kemijska svojstva derivata kojinske kiseline	9
2.5. Biološka ispitivanja – protutumorska i antibakterijska	10
2.5.1. Dvodimenzijski (2D) stanični modeli	11
2.5.2. Antibakterijska ispitivanja	12
2.6. Biološka aktivnost kojinske kiseline i derivata	13
2.6.1. Biološka ispitivanja kojinske kiseline i derivata na gljivičnoj (AbTYR) i ljudskoj tirozinazi (hTYR)	16
2.6.2. Antimikrobna aktivnost.....	18
2.6.3. Antioksidacijska aktivnost	21
2.6.4. Protuupalna i imunomodulatorna aktivnost	23
2.6.5. Protutumorska aktivnost	24
2.7. Pregled ostalih bioloških aktivnosti kojinske kiseline i derivata	25
3. ZAKLJUČAK	27
4. POPIS KRATICA I SIMBOLA	28
5. LITERATURA	29

1. UVOD

Kojinska kiselina (5-hidroksi-2-hidroksimetil-4-piron, $C_6H_6O_4$) je organski spoj koji pripada skupini hidroksipiranona. Hidroksipiranoni su heterociklički spojevi koji unutar prstena sadrže atom kisika, a uz kojinsku kiselinu, maltol je jedan od njihovih najznačajnijih predstavnika [1]. Kojinska kiselina je slaba organska kiselina koja se najčešće dobiva fermentacijom ugljikohidrata pomoću gljivica iz roda *Aspergillus*, *Acetobacter* i *Penicillium*, a pri sobnoj temperaturi nalazi se u obliku bijelih do svijetložutih igličastih kristala [2]. Budući da molekule hidroksipiranona podliježu brojnim strukturnim modifikacijama postoji značajan broj njihovih derivata, a kao najznačajniji derivati kojinske kiseline izdvajaju se: dipalmitat kojinske kiseline, monooleat kojinske kiseline i klorkojinska kiselina. Biološka aktivnost derivata kojinske kiseline, u većini je slučajeva, značajnija nego biološka aktivnost slobodne kojinske kiseline, a čemu je jedan od mogućih razloga veća termodinamička stabilnost modificiranih molekula. Zbog svoje biološke aktivnosti, kako derivati, tako i slobodna kojinska kiselina značajnu primjenu nalaze u prehrambenoj industriji, medicini, farmaciji, kemijskoj industriji, ali i u kozmetičkoj industriji u proizvodima za izbjeljivanje kože i sredstvima za depigmentaciju [3,4].

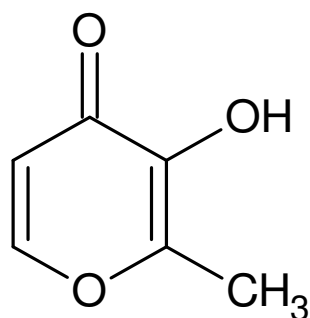
Cilj istraživanja je predstaviti najznačajnije rezultate, dostupne u relevantnoj literaturi, o pripravi i biološkim učincima slobodne kojinske kiseline i njenih derivata kao temelja za dizajn i istraživanje novih biološki aktivnih molekula.

2. LITERATURNI PREGLED

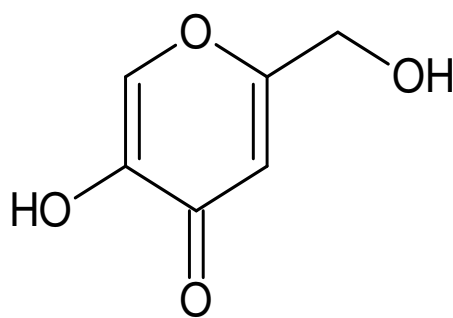
2.1. Hidroksipiranoni – općenite značajke i dobivanje

Hidroksipiranoni pripadaju grupi heterocikličkih spojeva koji sadrže atom kisika unutar strukture, a na prstenu, kao supstituente, najčešće imaju vezanu karbonilnu (C=O) i hidroksilnu (–OH) skupinu. Najvažniji predstavnici spomenute skupine spojeva su: 3-hidroksi-2-metilpiran-4-on, poznatiji kao maltol (**slika 1.a**) i 5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on, odnosno, kojinska kiselina (**slika 1.b**) [5].

a)

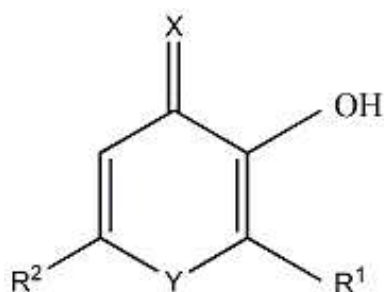


b)



Slika 1. **a)** Strukturna formula maltola (3-hidroksi-2-metilpiran-4-on) i **b)** kojinske kiseline (5-hidroksi-2-hidroksimetilpiran-4-on).

Hidroksipiranone je moguće dobiti iz prirodnih izvora (najčešće su to gljivice iz rodova *Aspergillus* i *Penicillium*). U laboratorijskim uvjetima najčešće se pripravljaju modifikacijom 3-hidroksi-4H-piridinona (heterociklički spojevi s dušikovim atomom unutar prstena). Hidroksipiranoni se vrlo lako modificiraju što omogućava velik broj strukturno različitih derivata [6]. Shematski prikaz mogućih reaktivnih centara kao potencijalnih mjesta za modifikaciju hidroksipiranona nalazi se na **slici 2**.

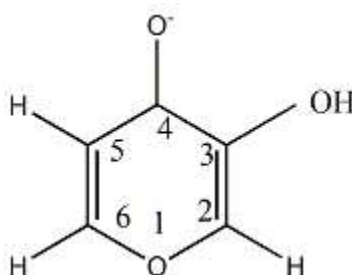


NAZIV SPOJA	X	Y	R ¹	R ²
Maltol	O	O	CH ₃	H
Etilmaltol	O	O	C ₂ H ₅	H
Alomaltol	O	O	H	CH ₃
Piromekonska kiselina	O	O	H	H
Kojinska kiselina	O	O	H	CH ₂ OH
Tiomaltol	S	O	CH ₃	H
Tioetilmaltol	S	O	H	CH ₃
Tiopiromekonska kiselina	S	O	H	H
Deferipron	O	NCH ₃	CH ₃	H

Slika 2. Shema: Potencijalna mjesta modifikacije i vezanja supstituenata za dobivanje 3-hidroksi-4(1*H*)-(tio)-pir(idin)ona (derivata hidroksipiranona). Preuzeto i prilagođeno: [6].

Najreaktivnije pozicije u strukturi hidroksipiranona pripadaju atomima C-2 i C-6 budući da su to pozicije na kojima se provodi aldolna kondenzacija i Mannichova reakcija. Još jedna važna reakcija za spomenutu grupu spojeva je i Suzukijeva reakcija koju karakterizira uvođenje aromatskih sustava na piranone [6]. U navedenoj reakciji arilborne kiseline reagiraju s 2-brom-3-hidroksipiran-4-onima uz prisutnost tetrakis(trifenilfosfin) paladija(0) (Pd(Ph)₄) koji ima ulogu katalizatora. Osim položaja C-2 i C-6, položaj C-5, također može poslužiti kao mjesto odvijanja reakcija koje dovode do strukturne modifikacije/transformacije molekula. Kada se radi o supstituiranom aromatskom sustavu (npr. ukoliko aromatski sustav na poziciji C-2 sadrži alifatski ogranak kao što je slučaj s maltolom (metilna skupina), iduće mjesto za odvijanje reakcije je pozicija C-5 i to je pogodno mjesto za Mannichovu reakciju [6] (**slika 3**). Hidroksipiranoni se mogu koristiti i za sintezu analognih hidroksipiridinona reakcijom s primarnim aminima ili amonijakom (kisikov

atom se zamjenjuje dušikovim atomom = konverzija hidroksipiranona u hidroksipiridinone). Primjer za navedeno je reakcija maltola s aromatskim aminima koja se odvija u autoklavu pri povišenoj temperaturi (između 100 °C i 200 °C) i tlaku od 1 do 15 bara uz kiseli ili bazični katalizator [7]. Opisane reakcije su problematične svojim prinosima i vremenom odvijanja, ali se mogu ubrzati dodatkom katalizatora. Najčešće se kao katalizator koristi *p*-toluensulfonska kiselina (C₇H₈O₃S) koja ubrzava reakciju i do 50 % [6].



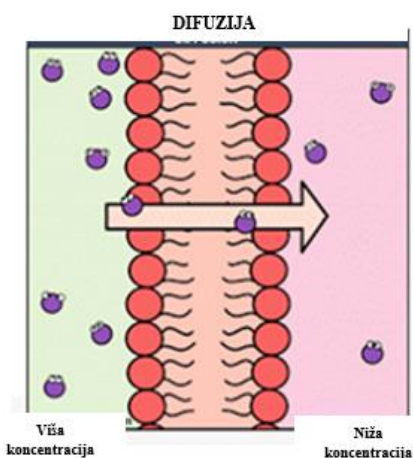
POZICIJA	VRSTA REAKCIJA
1	Priprava piridinona, koordinacija metalnih iona
2	Mannichova reakcija, aldolna kondenzacija, reakcija kopulacije ¹
3	Koordinacija metalnih iona
4	Koordinacija metalnih iona, tioniranje, seleniranje
5	Mannichova reakcija, reakcija kopulacije

Slika 3. Shema: Potencijalna mjesta za strukturne modifikacije 3-hidroksipiran-4-ona. Preuzeto i prilagođeno: [6].

Osim navedenih reakcija, kojinska kiselina ima sposobnost keliranja metalnih kationa (pozicije za koordinaciju: 1, 3, 4 – vidjeti **Sliku 3**). Kisikovi atomi kojinske kiseline mogu donirati po dva elektronska para i na taj način tvoriti vezu, najčešće, s dvovalentnim metalnim ionima kao što su Cu²⁺, Ni²⁺, Ca²⁺. Osim s dvovalentnim metalima, hidroksipiranoni mogu tvoriti i neutralne *tris*-kompleksne spojeve s trovalentnim metalima kao što su Fe³⁺ ili Al³⁺. Metalni kompleksi s hidroksipiranonima često služe za transport i otpuštanje metalnih iona u organizmu zbog slabijeg bidentantnog vezanja od spojeva sličnih struktura, npr. piridinona koji imaju veći afinitet prema

¹ Kopulacija – reakcija aromatskih diazonijevih soli s fenolima ili aromatskim aminima.

metalnim ionima zbog čega su, u pravilu, stabilniji. Danas je poznato mnogo spojeva s piranonima koji su svoju primjenu našli u medicini. Najčešće je riječ o kompleksima željezovih(III) iona s hidroksipiranonima. Kompleksi su najčešće neutralni pa putem pasivne difuzije prolaze kroz staničnu membranu kako bi došli do ciljane biološke mete. Pasivna difuzija proces je kretanja iona ili molekula kroz polupropusnu membranu niz koncentracijski gradijent (**slika 4**), odnosno prelazak molekula iz područja više koncentracije u područje niže koncentracije, sve dok se koncentracije međusobno ne izjednače. Opisani proces se odvija bez utroška energije, a sama brzina difuzije ovisi o veličini molekula, temperaturi, koncentraciji i propusnosti membrane [7,8].



Slika 4. Difuzija kroz polupropusnu membranu. Preuzeto i prilagođeno: [8].

2.1.2. Strukturne značajke kojinske kiseline

Kojinska kiselina je slaba organska kiselina koja nepotpuno disocira u vodi ($pK_a = 7,66$). Ono što kojinsku kiselinu strukturno izdvaja od drugih hidroksipirana jest posjedovanje dodatne hidroksimetilne skupine na položaju C-2 koja predstavlja još jedan reakcijski centar. Kao što je ranije navedeno, supstituenti na kojinskoj kiselini su najčešće hidroksilne $-OH$ ili karboksilne skupine $-COOH$. Uslijed prisustva lako disocirajućeg protona iz $-OH$ skupine, pogoduje im stvaranje neutralnih, termodinamički stabilnih kompleksa s metalnim ionima unutar fiziološkog pH (7,45 – 7,55) [8-13].

Razumijevanje strukturnih karakteristika spoja, ključno je za precizno utvrđivanje fizikalno-kemijskih svojstava u koje se ubraja i lipofilnost. Lipofilnost je sposobnost tvari da se otapaju u

nepolarnim (organskim) otapalima. Izražava se koeficijentom raspodjele ($\log P$) koji se definira kao mjera ravnoteže hidrofobnosti (lipofilnosti) i hidrofilnosti molekule, tj. predstavlja logaritam omjera koncentracije spoja u dvije faze koje se ne miješaju (najčešće korištene faze su: n-oktanol/voda). Kojinska kiselina ima nizak koeficijent raspodjele $\log P$ u iznosu od $-0,64$ što znači da je hidrofilna ($\log P < 1$ – hidrofilne molekule) i sklonija otapanju u vodenim sustavima [14]. Što se tiče topljivosti kojinske kiseline, dobro se otapa u vodi, etanolu, acetonu i djelomično benzenu. Polarna je molekula stoga prati princip otapanja sličnoga u sličnome.

2.2. Metode pripreme i izolacije kojinske kiseline

Kojinska kiselina se najčešće dobiva fermentacijom gljivica roda *Aspergillus*, posebice *Aspergillus oryzae* i *Penicillium* te biosintezom iz ugljikohidrata, najčešće glukoze [15]. Jedan od najranije poznatih oblika fermentacije na čvrstoj fazi (engl. *Solid-State Fermentation, SSF*) je „koji“ proces, ujedno i proces s pomoću kojega je prvi put izolirana kojinska kiselina. Prvi je kojinsku kiselinu ovim procesom izolirao K. Saito 1907. godine. Saito je postupak izolacije opisao po koracima. Prvo se odvija kultivacija riže kuhane na pari s *A. oryzae* te se u tome procesu masa počela pretvarati u kiselu tekućinu što je ispitano lakmus papirom. Njezina svojstva ispitana su vodenom otopinom željezova(III) klorida što je rezultiralo nastajanjem spoja crvene boje. Dobivena je tekućina ostavljena stajati te je nakon par tjedana boja iz crvene prešla u blago ružičastu. Tekućina se filtrirala i uparila do guste konzistencije. Uslijedila je ekstrakcija s eterom, a isparavanjem ekstrakta dobivena je određena količina kristala bijele boje i igličastog oblika kojima nije mogao odrediti talište zbog prisutnosti nečistoća [16]. Nečistoće koje su prisutne u uzorku kojem se određuje temperatura taljenja narušavaju kristalnu strukturu uzorka i daju netočne rezultate. Proučavajući dobivene rezultate Saito je zaključio da izolirana tvar nije do sada zabilježena, a istraživanje je nastavio Teijiro Yabata. Yabata je uspio izolirati kojinsku kiselinu uz ekstrakciju s eterom u Soxletovom aparatu i tretmanom s petroleterom. Nakon toga, kiselina je otopljena u vodi, uklonjeni su ioni željeza i dobiveni su kristali kojinske kiseline [16]. Danas se kojinska kiselina dobiva procesom fermentacije ugljikohidrata, najčešće glukoze, zbog strukturne sličnosti piranoznog prstena glukoze i piranonskog prstena kojinske kiseline. Mehanizam procesa još uvijek

nije razjašnjen u potpunosti, no na temelju istraživanja Bentleya i Arnesteina poznato je da se kojinska kiselina može sintetizirati izravno iz glukoze [16].

Postoje izvori koji tvrde da je moguća biosinteza i iz nekih drugih izvora ugljika (reducirajući šećeri i njihove kiseline, alkoholi i polisaharidi) u aerobnim uvjetima uz prisutnost mikroorganizama kao što su gljivice. Literaturno nisu opisane mnoge metode izolacije, ali se spominju metode određivanja koncentracije kojinske kiseline, kao što je dodatak alkalne otopine jodida u metaboličku otopinu glukoze (gljivica *A. parasiticus*) čime dolazi do oksidacije glukoze i oslobađanja mirisa jodoforma [16].

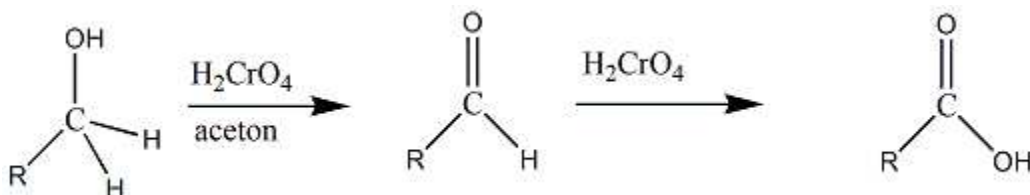
2.3. Karakteristične reakcije kojinske kiseline

Hidroksimetilna skupina kojinske kiseline (nalazi se na atomu C-2) sudjeluje u reakcijama karakterističnim za primarne alkohole. Posjeduje kiseli karakter, može tvoriti vodikove veze i reagirati s različitim elektrofilima. Kao produkti tih reakcija nastaju eteri i esteri. Koji produkt će nastati, ovisi o vrsti i količini reagenasa i korištene baze [17]. Sljedeća karakteristična reakcija je konverzija kojinske kiseline u klorkojinsku kiselinu u reakciji s tionil-kloridom (SOCl_2) ili koncentriranom klorovodičnom kiselinom (HCl) [17]. Osim spomenutih reakcija, kojinska kiselina je podložna reakcijama aldolne kondenzacije i Mannichove reakcije (u slučaju kada su položaji C-2 i C-5 supstituirani), Claissenove pregradnje, reakcijama cikloadicije, Wittigove reakcije i reakcije na karbonilnu skupinu [17]. Aldolna kondenzacija je reakcija kojom se stvara ugljik-ugljik veza adiranjem enola na karbonilnu skupinu. Mannichovom reakcijom također dolazi do stvaranja ugljik-ugljik veze uz nastanak sekundarnog amina [18]. Poprilično je lako izvediva i povoljna jer je omogućeno selektivno stvaranje novih veza. Slično ovim glavnim i najčešćim reakcijama kojinske kiseline, svim ostalim poznatim reakcijama se formiraju ugljik-ugljik veze čime se dobivaju derivati značajne biološke aktivnosti. Claissenova pregradnja, zvana još i Claissenova kondenzacija, reakcija je sinteze β -dikarbonilnih spojeva. Wittigova reakcija karakteristična po svojoj selektivnosti položaja formiranja dvostruke ugljik-ugljik veze [18]. Poznata je reakcija oksidacije spomenute skupine u karboksilnu skupinu pod nazivom Jonesova reakcija (odvija se pomoću Jonesovog reagensa).

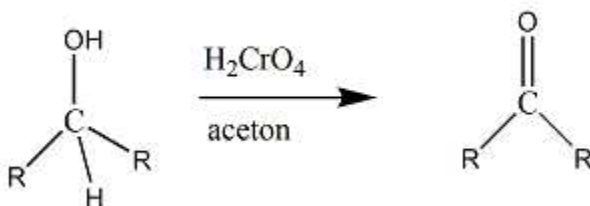
2.3.1. Jonesova oksidacija

Jonesova oksidacija naziv je dobila po znanstveniku koji je otkrio jako oksidacijsko sredstvo, Sir Ewart Rax Herbert Jones [6]. Otkriće ovoga oksidansa, Jonesovog reagensa, imalo je velik značaj za područje organske kemije jer je krom u ovome obliku učinkovitiji i selektivniji od do tada korištenih oblika kao što su kalijev permanganat (KMnO_4) i kromov(IV) oksid (Cr_2O_3). Jonesov reagens je po kemijskom sastavu otopina kromovog(VI) oksida kemijske formule CrO_3 , natrijeva ili kalijeva dikromata ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ili $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) u razrijeđenoj sumpornoj kiselini (H_2SO_4) [17]. Ono što je potaklo znanstvenike na istraživanje ovakvoga tipa oksidansa jest potreba za reagensom koji bi mogao oksidirati hidroksimetilnu skupinu 5-benzilkojinske kiseline sve do karboksilne skupine koja bi služila kao prekursor za sintezu derivata 3-hidroksi-4-piranona.

Kao oksidans zapravo djeluje kromna kiselina (H_2CrO_4) koja se oslobađa otapanjem kromova(VI) oksida. Nastala kromna kiselina reagira s primarnim alkoholom oksidirajući ga u aldehyd. Potom slijedi oksidacija aldehyda u karboksilnu kiselinu. Sa sekundarnim alkoholima, Jonesov reagens kao konačni produkt daje keton (**slike 5 i 6**). Reakcija je popraćena promjenom boje otopine iz narančaste (krom(VI)) u zelenu (krom(III)) [17].



Slika 5. Shema: Oksidacija primarnog alkohola Jonesovim reagensom. Preuzeto i prilagođeno: [19].



Slika 6. Shema: Oksidacija sekundarnog alkohola Jonesovim reagensom. Preuzeto i prilagođeno: [19].

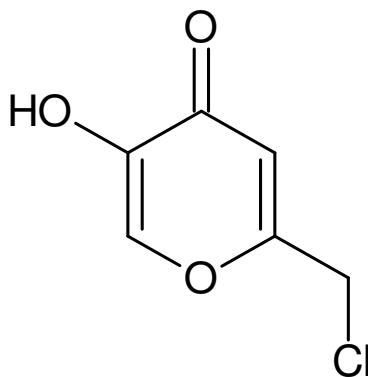
2.4. Derivati kojinske kiseline

Derivati kojinske kiseline dobivaju se modifikacijom reakcijskih centara ili drugih dijelova molekule kojinske kiseline s ciljem poboljšanja fizikalno-kemijskih svojstava, kao i biološke aktivnosti. Poznati su mnogi derivati kojinske kiseline, a jedan od najpoznatijih i najjednostavnijih je klorkojinska kiselina. Česti su i esterski derivati kojinske kiseline, a od poznatijih u literaturi se izdvajaju dipalmitat kojinske kiseline, monobutirat kojinske kiseline i oleat kojinske kiseline [20,21]. Svoju primjenu su dipalmitat kojinske kiseline i monobutirat kojinske kiseline pronašli u proizvodima za posvjetljivanje kože te se kao takvi koriste u tretmanima protiv hiperpigmentacije. U literaturi se spominje također i sol kojinske kiseline; fosfat, korišten u kozmetici za posvjetljivanje kože. Osnovni mehanizam depigmentacijske aktivnosti navedenih derivata kojinske kiseline, kao i slobodne kojinske kiseline, temelji se na inhibiciji tirozinaze – glavnog enzima u sintezi melanina. Melanin je pigment odgovoran za boju kože, očiju i kose. Tirozinaza kao supstrat koristi ione bakra(II) koji se nalaze u aktivnom mjestu enzima. Derivati kojinske kiseline imaju sposobnost keliranja iona bakra, što potiče tautomerizaciju dihidroksifenilalanina (DOPA), glavnog prekursora u sintezi melanina, u 5,6-dihidroksiindol-2-karboksilnu kiselinu. Na taj način se transformira glavni prekursor u sintezi melanina pri čemu dolazi do njegove inhibicije [22]. Uz navedeno, u literaturi se spominje i mehanizam depigmentacijskog djelovanja u kojem sudjeluju slobodni radikali. Slobodni radikali su bitni čimbenici u sintezi melanina, a kako derivati kojinske kiseline imaju jaku antioksidacijsku aktivnost, mogu neutralizirati slobodne radikale te tako smanjiti oksidativni stres i inhibirati sintezu melanina [22]. Osim toga, neki derivati kojinske kiseline mogu utjecati na ekspresiju gena za tirozinazu što dovodi do inhibicije sinteze tirozinaze, a posljedično i pigmenta melanina.

2.4.1. Priprava i fizikalno-kemijska svojstva derivata kojinske kiseline

Klorkojinska kiselina ($C_6H_5ClO_3$) dobiva se reakcijom kojinske kiseline s tionil-kloridom ili koncentriranom klorovodičnom kiselinom (**slika 9**). Dobivena klorkojinska kiselina reagira s nukleofilima kao što su amini, fenolati, tiolati, a klorid se lako supstituira amino ili tiocijanatnom skupinom. Podložna je strukturnim modifikacijama, kao i slobodna kojinska kiselina, što omogućava velik broj derivata. Naziv klorkojinske kiseline prema IUPAC-u je 2-klormetil-5-hidroksipiran-4-on, a molekulska masa iznosi 160,55 g/mol. Vrlo je korozivna i iritira kožu.

Derivati ove kiseline se lako prevode u kvarterne soli u reakcijama s tercijarnim alifatskim aminima, tioureom ili piridinom. Klorkojinska kiselina je dobar ligand kada su u pitanju reakcije nukleofilne i elektrofilne supstitucije. Poznata je po antibakterijskim svojstvima tj. inhibiciji rasta bakterija, a uz nju, takvu sposobnost pokazuju i Mannichove baze² [20,21].



Slika 7. Struktura klorkojinske kiseline (2-klormetil-5-hidroksipiran-4-on).

Dipalmitat kojinske kiseline je derivat koji se dobiva reakcijom kojinske kiseline s palmitinskom kiselinom ($C_{16}H_{32}O_2$). Stabilniji je od kojinske kiseline jer je otporniji na utjecaj svjetlosti i topline te manje podložan oksidaciji. Molekulska masa ovoga derivata iznosi 604,9 g/mol i lipofilan je. IUPAC naziv za ovaj spoj je (5-heksadekanoiloksi-4-oksopiran-2-il) heksadekanoat, a molekulska formula $C_{37}H_{64}O_6$. Kao treći najzastupljeniji derivat kojinske kiseline spominje se njezin monobutirat. Pripravlja se reakcijom kojinske kiseline s maslačnom (butiratnom) kiselinom. Stabilniji je i lipofilniji od prethodno spomenutog derivata što mu omogućava dublje prodiranje u kožu, a posljedično i značajniji biološki učinak [22,23].

2.5. Biološka ispitivanja – protutumorska i antibakterijska

Proces uzgajanja (kultivacije) stanica u strogo kontroliranim aseptičnim uvjetima naziva se stanična kultura. Stanične kulture skup su zasebnih stanica izoliranih iz tkiva i organa [24].

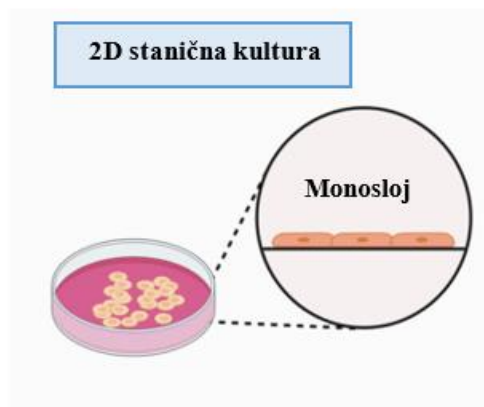
Kulturu stanica se može podijeliti u nekoliko kategorija:

² Mannichove baze – spojevi koji pripadaju β -aminoketonima, a nastaju kao krajnji produkt u Mannichovoj reakciji.

1. Primarne kulture koje predstavljaju stanice, tkiva ili organe izolirane iz organizma i stavljene u kulturu. Izvori tkiva primarne kulture mogu biti: normalno tkivo i tumorsko tkivo.
2. Stanične linije koje nastaju subkultivacijom primarnih kultura, a dijele se na:
 - a) Konačnu; raste određeni vremenski period dok ne ostari. Može se transformirati u kontinuiranu staničnu liniju spontano ili inducirano viralnim ili kemijskim putem, a sastoji se od jedne vrste stanica.
 - b) Kontinuiranu; može se uzgajati godinama jer ju karakterizira neograničeni broj dioba [25, 26, 27, 28].

2.5.1. Dvodimenzijski (2D) stanični modeli

Dvodimenzijski (2D) stanični model jedan je od najčešće primijenjenih bioloških modela u biomedicinskim istraživanjima. U 2D modelima stanice rastu u jednom sloju (monosloju), pričvršćene za ravnu podlogu načinjenu od plastike ili stakla koja može biti dodatno obrađena kako bi omogućila što bolje prianjanje stanica. U takvim uvjetima, stanice su okružene drugim istovrsnim stanicama (monokultura) i hranjivim medijem. Budući da rastu u monosloju, istovremeno im je svima omogućeno dobivanje jednake količine hranjivih tvari iz medija (**slika 8**). U ovom modelu, prilikom ispitivanja djelovanja spojeva, stanice su samo djelomično izložene djelovanju spoja budući da su pričvršćene za podlogu na kojoj rastu. Pri tome stanični odgovor koji se dobije nije u cijelosti istovjetan prirodnom okruženju stanica u uvjetima *in vivo* [29,30,31].



Slika 8. Dvodimenzijski stanični model (2D model). Preuzeto i prilagođeno iz: [32].

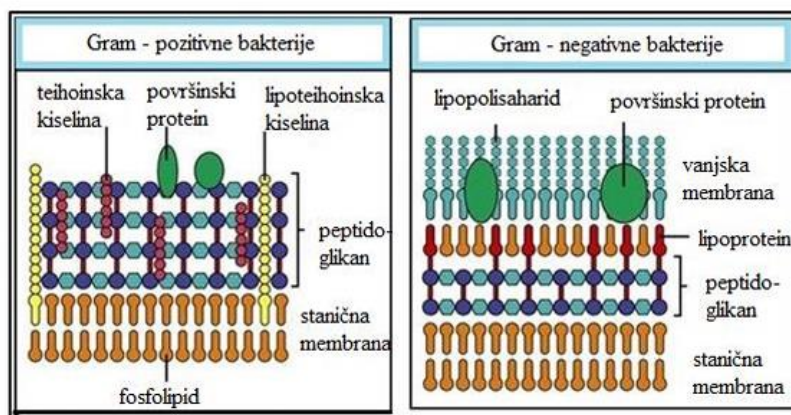
2.5.2. Antibakterijska ispitivanja

Bakterije su najbrojniji jednostanični organizmi koji imaju značajnu ulogu u održavanju prehrambenog lanca na Zemlji.

Dijele se s obzirom na:

- a) morfologiju (cilindrične, koki i bacili),
- b) metabolizam (autotrofne i heterotrofne)
- c) staničnu membranu (Gram-pozitivne i Gram-negativne) [33]

Podjelu na Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije ustanovio je Hans Christian Gram. Gram je klasificirao bakterije na osnovu reakcije staničnih membrana na određene kemikalije i boje [33,34]. Stanične membrane Gram-pozitivnih bakterija uglavnom se sastoje od peptidoglikana (mureina) i oboje se ljubičasto nakon Gram testa, dok se stanične membrane Gram-negativnih bakterija sastoje od tankog sloja peptidoglikana i lipopolisaharidne komponente na vanjskoj membrani. Gram-negativne bakterije se nakon Gram testa oboje crveno/ružičasto [35]. Najpoznatiji predstavnici Gram-pozitivnih bakterija su: *Streptococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus anthracis* i *Clostridium botulinum*, a neki od poznatijih predstavnika Gram-negativnih bakterija su: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Hemophilus influenzae*, *Neisseria* i *Bordetella pertussis* [33]. Na **slici 9** nalazi se prikaz razlika u građi staničnih membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

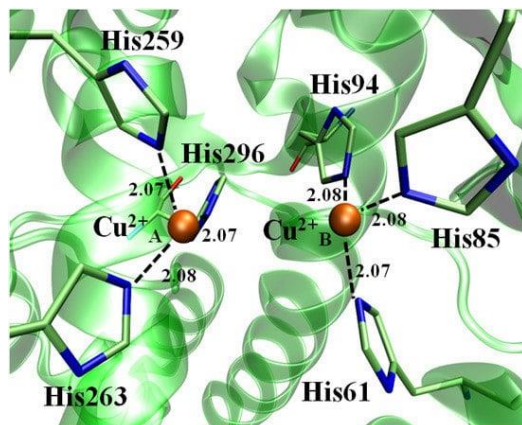


Slika 9. Razlike u građi staničnih membrana Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija.

Preuzeto i prilagođeno iz: [36].

2.6. Biološka aktivnost kojinske kiseline i derivata

Kojinska kiselina je svoju najširu primjenu pronašla u kozmetičkoj industriji zbog mogućnosti inhibicije tirozinaze (**slika 10**). Osim što je tirozinaza ključan enzim u sintezi melanina [37], zapažena je i njezina uloga u procesu zarastanja rana [38]. Tirozinaza je pripadnik obitelji bakrovih proteina tipa 3 koji u strukturi sadrži dva bakrova(II) iona. Svaki od dva bakrova(II) iona koordinacijskom vezom je vezan na tri različita histidinska ostatka u aktivnom mjestu. Ovaj je enzim osjetljiv na djelovanje inhibitora kao što su kojinska kiselina i njezini derivati. U istraživanju Limea i suradnika [38], ispitana je inhibicijska aktivnost kojinske kiseline i njezinih derivata: 2-etil-3-hidroksi-4H-piran-4-ona (INH1), 5-hidroksi-4-okso-4H-piran-2-karboksilne kiseline (INH2), 3-hidroksi-2-metil-4-piranona (INH3) i 3-hidroksi-1,2-dimetil-4(1H)-piridinona (INH4). Istraživanjima je ustanovljeno da su inhibitori INH2 i INH4 kompetitivni inhibitori tirozinaze što znači da se vežu u aktivno mjesto tirozinaze i na taj način sprječavaju vezanje supstrata (L-DOPA-L-3,4-dihroksifenilalanin $C_9H_{11}NO_4$). Povećanjem koncentracije L-DOPA moguće je nadjačati inhibicijski učinak navedenih derivata kojinske kiseline. Konstanta inhibicije (K_i – koncentracija inhibitora potrebna za inhibiciju 50 % reakcije) za inhibitor INH4 iznosila je 64 μM , a za INH2 145 μM . U ovome slučaju došlo je do interakcije karbamoilne skupine Asn260 (asparagin na položaju 260) s derivatima na udaljenosti od 2Å. Inhibitor INH1 pokazao je mješovitu vrstu inhibicije (kompetitivnu i nekompetitivnu) uz konstantu inhibicije 1mM i udaljenost veću od 2Å u odnosu na Asn260, dok INH3 nije pokazao inhibitorna svojstva [38]. Slobodna kojinska kiselina u spomenutom istraživanju pokazala je svojstva inhibicije slična INH2 i INH4, tj. ona se ponaša kao kompetitivni inhibitor uz interakciju s jednim od iona bakra(II) koji se nalaze u aktivnom mjestu tirozinaze.

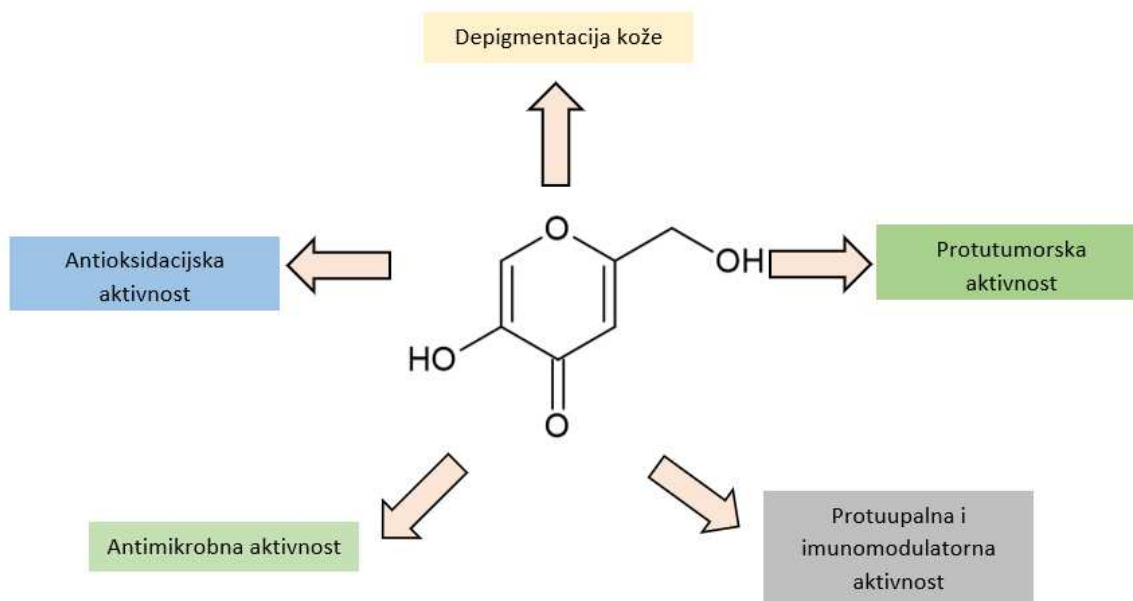


Slika 10. Vežanje kojinske kiseline u aktivno mjesto bakterijske tirozinaze. Preuzeto i prilagođeno iz: [38].

Osim u kozmetičkoj industriji, kojinska kiselina se koristi i za spektrofotometrijsko određivanje metala s kojima tvori obojene komplekse i za određivanje spojeva kao što su alifatske karboksilne kiseline i peroksikiseline koje daju hipohalite³ (u prisutnosti enzima). U tome procesu hipohaliti prevode kojinsku kiselinu u fluorescentni žuto-zeleni kompleksni spoj. Isti kompleks nastaje i reakcijom kojinske kiseline s peroksidazama pa je vrlo korisna i za detekciju gljivice *A. flavus* u zrnima kukuruza. U medicinske svrhe najviše se koristi činjenica da kojinska kiselina sa željezovim ionima stvara stabilne komplekse što koristi pri liječenju β -talasemije (oblik talasemije kojeg karakterizira odsustvo β lanaca hemoglobina) i anemije. Svoju je primjenu kojinska kiselina, kao i njezini derivati, pronašla u prehrambenoj industriji gdje se upotrebljava za sprječavanje tamnjenja voća i kao antimikrobno sredstvo (**slika 11**). Osim toga, pokazuje i antibakterijska, antileukemijska i antifungalna svojstva (**tablica 1**). Antibakterijska svojstva tvari izražavaju se i klasificiraju prema vrijednosti minimalne inhibitorne koncentracije, MIC (engl. *inimal Inhibitory Concetration*) koja predstavlja najnižu koncentraciju antimikrobnog sredstva potrebne za sprječavanje rasta mikroorganizama kao što su gljivice i bakterije. Antimikrobna aktivnost spoja može biti: izrazita ($MIC = 0,0 - 0,5$ mM), srednja ($MIC = 0,6 - 1,5$ mM) i slaba ($MIC > 1,5$ mM) [23]. Prema istraživanju Aytamera i suradnika [21] u kojemu je ispitana antibakterijska aktivnost 12 Mannichovih baza na Gram-pozitivnim i Gram-negativnim bakterijama MIC vrijednosti su iznosile između 8–64 $\mu\text{g/ml}$ za Gram-pozitivne bakterije (*S. aureus* *E. faecalis* *B. subtilis*) i 8–32 $\mu\text{g/ml}$ za Gram-negativne bakterije (*E. coli* *P. aeruginosa* *P. mirabilis* *K. pneumoniae* *A. baumannii*), što

³ Hipohaliti – oksianion u kojem se halogeni element nalazi u oksidacijskom stanju +1.

ukazuje na srednju antimikrobnu aktivnost derivata kojinske kiseline, s jačim učinkom na Gram-negativne bakterije.



Slika 11. Shema: Biološka aktivnost i primjena kojinske kiseline i derivata. Preuzeto i prilagođeno: [22].

Tablica 1. Biološka aktivnost, mogući mehanizam djelovanja i primjena kojinske kiseline i njezinih derivata.

BIOLOŠKA AKTIVNOST	MOGUĆI MEHANIZAM DJELOVANJA	PRIMJENA
Depigmentacija kože	Inhibicija tirozinaze; inhibicija sinteze melanina; modulacija leukocita; hvatanje slobodnih radikala	Kozmetička industrija
Protutumorska aktivnost	Aktivacija apoptotskih i neapoptotskih puteva	Medicina / protutumorski agensi
Protuupalna i imunomodulatorna aktivnost	Aktivacija makrofaga	Medicina

Antimikrobna aktivnost	Oštećenja u staničnoj membrani (istjecanje kalijevih iona i promjene molekule DNA)	Biomedicina
Antioksidacijska aktivnost	Hvatanje slobodnih radikala	Medicina, kozmetička industrija, prehrambena industrija

2.6.1. Biološka ispitivanja kojinske kiseline i derivata na gljivičnoj (AbTYR) i ljudskoj tirozinazi (hTYR)

Kojinska kiselina djeluje kao kompetitivni inhibitor enzima tirozinaze keliranjem iona bakra koji se nalazi u aktivnom mjestu enzima (detaljnije navedeno u *poglavlju 2.6.*) [39]. Ovakvo djelovanje najveću primjenu je pronašlo u kozmetičkoj industriji za proizvodnju kozmetičkih preparata za zaštitu od UV zračenja, za posvjetljivanje kože ili čak u svrhu liječenja dermatoloških problema čiji je uzrok hiperpigmentacija kože. Istraživanja koja su se provodila na ovu tematiku koristila su se tirozinazom iz gljiva i ljudskom tirozinazom. Ljudska (hTYR) i gljivična tirozinaza (AbTYR-tirozinaza iz gljive *Agaricus bisporus*) razlikuju se po nekim ključnim elementima, kao što su struktura i sekvenca (hTYR je protein od 529 aminokiselina s tri glikolizacijska mjesta i dva bakrova(II) iona u aktivnom mjestu, dok je AbTYR monomer ili dimer od 390–424 aminokiselina), enzimskoj aktivnosti (hTYR je aktivna pri pH specifičnom za ljudsku kožu (oko 7 ili blago kiseo), dok je AbTYR aktivna u širem spektru pH vrijednosti) i funkciji (hTYR je ključna za biosintezu melanina, a AbTYR je uglavnom zadužena za odgovore na ozljede i infekcije) [40].

Za potvrdu biološkog djelovanja agenasa koriste se vrijednosti poput 50 %-tne inhibitorne koncentracije, IC_{50} (engl. *Inhibitory Concentration*) koja predstavlja koncentraciju inhibitorne tvari koja je potrebna za supresiju staničnog rasta za 50 %. Klasifikacija citotoksičnosti tvari prikazana je u **tablici 2.**

Tablica 2. Klasifikacija citotoksičnosti tvari s obzirom na IC_{50} vrijednosti [41].

IC_{50} / μM	Citotoksičnost
<20 μM	Značajna (visoka)
20 – 200 μM	Umjerena
201 – 500 μM	Blaga
> 500 μM	Bez citotoksičnog efekta

Kai i suradnici istraživali su inhibiciju tirozinaze iz gljiva kojinskom kiselinom i pratili su sadržaj melanina u stanicama melanoma miša (B16-4A5) i stanicama melanoma čovjeka (HMV-II). IC_{50} vrijednost za kojinsku kiselinu na stanicama HMV-II iznosila je 223,8 μM za koncentracije 125-1000 μM [41-45]. Lajis i suradnici proveli su usporedna istraživanja s esterima kojinske kiseline i slobodnom kojinskom kiselinom koristeći tirozinazu iz gljiva i ribe roda *Muraena*. Istraživanje je provedeno na stanicama melanoma B16-F1 i rezultati istraživanja pokazali su da bolju inhibicijsku aktivnost imaju esteri kojinske kiseline. Osim B16-F1 stanica korištene su i B16-F10 stanice za određivanje količine melanina nakon primjene kojinske kiseline, liposoma (umjetno stvoren sferoid s najmanje jednim lipidnim dvoslojem) ispunjenih kojinskom kiselinom i liposoma obloženih i ispunjenih kojinskom kiselinom. Posljednja navedena vrsta liposoma nije pokazala toksična djelovanja i sama učinkovitost je bila veća zbog bržeg prodiranja kojinske kiseline u stanice [46,47]. Provedena su i istraživanja na ljudskim stanicama malignog melanoma (A375) s derivatima kojinske kiseline dobivenih Mannichovom reakcijom. Tim istraživanjima je potvrđena inhibicijska aktivnost tirozinaze aldehida kojinske kiseline [48]. Iz rezultata dostupnih u literaturi razvidno je da se strukturnim promjenama kojinske kiseline može poboljšati njezina depigmentacijska aktivnost. Derivati koji imaju dvije slobodne hidroksilne skupine pokazuju bolju aktivnost od derivata s jednom slobodnom hidroksilnom skupinom [49]. Osim mehanizma inhibicije tirozinaze, antioksidativna aktivnost kojinske kiseline i njezinih derivata također je značajno svojstvo jer joj daje mogućnost “hvatanja” slobodnih radikala i drugih reaktivnih vrsta koji potiču sintezu melanina.

Kojinska se kiselina u kozmetičkoj industriji koristi zbog snažne depigmentacijske aktivnosti. Često se koristi kao zamjena za hidrokinon jer hidrokinon može uzrokovati trajnu depigmentaciju. Hidrokinon ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$) je organski spoj koji na benzenskom prstenu ima vezane dvije hidroksilne

skupine u *para* položaju. Na svjetlu u prisutnosti zraka lako oksidira u kinone [50]. Esteri kojinske kiseline, kao i dipalmitat kojinske kiseline, nalaze se u većini kozmetičkih proizvoda za izbjeljivanje ili posvjetljivanje kože i to u koncentracijama do 3 %. Također, česta je primjena kombinirane terapije s kojinskom kiselinom i hidrokinonom ili arbutinom. Patentna studija iz 1987. godine pokazala je da kojinska kiselina i hidrokinon imaju sinergijski učinak, posebno za protuupalni učinak ili učinak depigmentacije [22]. Derivati kojinske kiseline, poput Mannichovih baza pokazale su antimikobakterijske, antitirozinazne i antioksidativne efekte koji mogu biti primjenjivi u kozmetičke svrhe depigmentacije kože. Općenito se preferira upotreba derivata kojinske kiseline nad slobodnom kojinskom kiselinom jer ona lako oksidira što može dovesti do promjene boje (a posljedično stabilnosti i aktivnosti proizvoda) u kozmetičkim proizvodima. Vidljivo je poboljšanje stabilnosti i aktivnosti kada je riječ o derivatima kojinske kiseline. Isto tako, upotreba derivata kojinske kiseline dovodi do smanjenja nuspojava kao što su crvenilo kože i iritacije.

2.6.2. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna aktivnost kojinske kiseline, koja obuhvaća antibakterijsku, antifungalnu, antivirusnu i larvicidnu aktivnost, druga je najzastupljenija aktivnost spomenuta u literaturi. Često je spomenuta antifungalna aktivnost kojinske kiseline za *Microsporium gypseum* (MIC 256 µg/mL) [51], *Microsporium canis* (MIC 128 µg/mL) [51], *Nannizzia cajetani* (MIC 512 µg/mL) [52], *Epidermophyton floccosum* (MIC 64 µg/mL) [53], *Arthroderma gypseum* (MIC 256 µg/mL) [51], *Trichophyton species* (MIC 32– 64 µg/mL) [54], *Candida albicans* (MIC 32– 64 µg/mL) [55], *Aspergillus fumigatus* (MIC 64– 128 µg/mL) [56], *Aspergillus terreus* (MIC 128 µg/mL) [56], i *Mucor* (MIC 512 µg/mL) [53]. Ezzat i suradnici su istraživanjima dokazali da kojinska kiselina pokazuje značajnu antibakterijsku aktivnost na Gram-negativnim i Gram-pozitivnim bakterijama u koje se ubraja ispitivana MRSA (meticilin-rezistentna *Staphylococcus aureus*) uz MIC vrijednost 6 mg/ml [54]. Antifungalna aktivnost kojinske kiseline testirana je u istraživanjima provedenim od strane Bracarense-a te Nurunnabi-a i suradnika pomoću ekstrakta gljive *Aspergillus parasiticus* koji sadrži kojinsku kiselinu na gljivicama *Candida albicans* i *Aspergillus flavus*. Dobivene su MIC vrijednosti 0,5 mg/ml za *C. albicans* i 128 µg/mL za *A. flavus*. [55-56]. Veća antifungalna aktivnost uočena je kod ekstrakta koji sadrži kojinsku kiselinu, nego djelovanjem slobodne

kojinske kiseline. Istraživanje je pokazalo da i pri nižim apliciranim koncentracijama kojinske kiseline u ekstraktima dolazi do visoke inhibicije razvijanja mikroorganizama [57]. Provedeno je i istraživanje na kliničkim izolatima koje je potvrdilo da kojinska kiselina (u kombinaciji s EDTA – etildiamintetraocetna kiselina $C_{10}H_{16}N_2O_8$) dovodi do znatnog smanjenja stvaranja biofilma bakterija [58]. Biofilm se sastoji od mikroorganizama kao što su bakterije, gljivice i ekstracelularnog matriksa koji sadrži polisaharide, DNA, lipide, a glavna mu je uloga preživljavanje bakterija u teškim životnim uvjetima [59-61]. Azhar i suradnici u svom istraživanju koristili su nanoemulziju estera kojinske kiseline koja je dala bolje rezultate aktivnosti od estera kojinske kiseline protiv kožnog patogena *Staphylococcus aureus*. Istraživanje provedeno od strane Rajamanikyama i suradnika uspoređivalo je antibakterijsku i antifungalnu aktivnost maltola i kojinske kiseline te su ustanovili da maltol pokazuje bolja navedena svojstva od kojinske kiseline. Rezultati istraživanja prikazani su u **tablici 3** [62].

Tablica 3. Usporedba biološke aktivnosti maltola i kojinske kiseline. Preuzeto i prilagođeno: [62].

BIOLOŠKA AKTIVNOST	MALTOL	KOJINSKA KISELINA
Antibakterijska aktivnost (MIC u μM)		
Gram-pozitivne bakterije	37,14 – 146,83	65,52 – 131,12
Gram-negativne bakterije	74,36 – 97,94	65,52 – 262,24
Protugljivična aktivnost (MIC u μM)	79,65 – 119,05	407,75 – 1056,3
Larvicidalna aktivnost (LC ₅₀ u μM)	446,59	407,75

Jedan od mogućih mehanizama antibakterijskog djelovanja kojinske kiseline zasniva se na njezinom prodiranju kroz staničnu membranu uz oštećenja na istoj, što dovodi do istjecanja intracelularnih enzima. Isto tako, dolazi do poremećaja u metabolizmu kalijevih iona i delokalizacije protona. Kojinska kiselina je uz sve dosad navedeno ispitivana i protiv virusne bolesti “denga groznice” koju izazivaju komarci roda *Aedes*. Siddhardha i suradnici su potvrdili larvicidno djelovanje kojinske kiseline na *Aedes aegypti* u trećem i četvrtom stupnju ličinki [63]. Na njihovo istraživanje nastavilo se istraživanje Rajamanikyama i suradnika koje je pokazalo da kojinska kiselina može biti ekološki prihvatljivo i povoljno larvicidno sredstvo protiv patogena

denge [62]. U **tablici 4** nalazi se prikaz rezultata antifungalnog i antibakterijskog djelovanja kojinske kiseline i njenih derivata.

Tablica 4. Prikaz rezultata antifungalnog i antibakterijskog djelovanja kojinske kiseline i njezinih derivata.

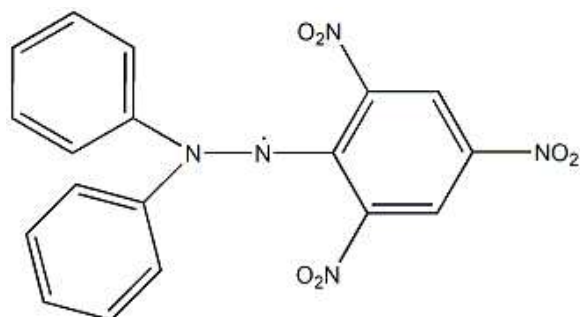
ZNANSTVENICI	VRSTA BAKTERIJE	VRSTA GLJIVICE	BIOLOŠKA AKTIVNOST	ISPITIVANA TVARI
Ezzat i suradnici	MRSA (meticilin-rezistenta <i>Staphylococcus aureus</i>)		Opažena aktivnost protiv rezistentne bakterije	Kojinska kiselina
Nurunnabi i suradnici		<i>Candida albicus</i> i <i>Aspergillus flavus</i>	Veća antifungalna aktivnost kojinske kiseline u kombinaciji s ekstraktom gljiva u odnosu na slobodnu kojinsku kiselinu	Kojinska kiselina, ekstrakt gljiva <i>Aspergillus parasiticus</i> koji sadrži kojinsku kiselinu
Çevik K, Ulusoy S.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Kojinska kiselina inhibira stvaranje biofilma, bez inhibicije rasta bakterija	Kojinska kiselina
Ali i suradnici	23 klinička izolata		Kojinska kiselina smanjuje učinak EDTA	EDTA, kojinska kiselina
Wang i suradnici	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Dokazan dugotrajni učinak na Gram-negativne i Gram-pozitivne bakterije	Kojinska kiselina s Zn-Ti dihidriksidom

Azhar i suradnici	<i>Staphylococcus aureus</i>		Nanoemulzija estera kojinske kiseline pokazuje veću aktivnost od samog estera kojinske kiseline	Nanoemulzija estera kojinske kiseline, ester kojinske kiseline
Rajamanikyam i suradnici	<i>Bacillus subtilis,</i> <i>Staphylococcus aureus,</i> <i>Staphylococcus epidermidis,</i> <i>Pseudomonas aeruginosa,</i> <i>Escherichia coli,</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Aspergillus niger,</i> <i>Aspergillus flavus,</i> <i>Candida albicans,</i> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Maltol pokazao bolja antibakterijska i antifungalna svojstva od slobodne kojinske kiseline	Maltol i kojinska kiselina
Siddhardha i suradnici			Kojinska kiselina pokazuje larvicidnu aktivnost na larve <i>Aedes aegypti</i> , u trećem stadiju više nego u četvrtom	Kojinska kiselina
Rajamanikyam i suradnici			Kojinska kiselina pokazala se kao dobro i ekološki prihvatljivo larvicidno sredstvo za patogene denga groznice	Kojinska kiselina i maltol

2.6.3. Antioksidacijska aktivnost

Antioksidacijska aktivnost kojinske kiseline i derivata najviše se koristi u kozmetičkoj industriji za proizvode protiv starenja kože. Za ispitivanje antioksidacijske aktivnosti kojinske kiseline i

derivata korištene su metode poput 2,2-difenil-1-pikrildrazil, DPPH; $C_{18}H_{12}N_5O_6$) testa “hvatanja” slobodnih radikala i testa “hvatanja” vodikovog peroksida. DPPH je stabilan slobodni radikal čija je struktura prikazana na **slici 12**.



Slika 12. Strukturna formula DPPH (2,2-difenil-1-pikrildrazil) radikala

DPPH test je kolorimetrijski test koji se zasniva na promjeni boje otopine iz ljubičaste (koja potječe od radikala) u žutu (indikator neutralizacije radikala) kada antioksidansi stupe u reakciju sa slobodnim radikalima [64]. Test “hvatanja” vodikovog peroksida je također jedan od važnijih testova antioksidacijske aktivnosti tvari koji se bazira na sposobnosti ispitivane tvari da neutralizira vodikov peroksid (H_2O_2). Gonçalez i suradnici za svoja istraživanja koristili su emulzije dipalmitata kojinske kiseline i neinkapsulirani dipalmitat te je istraživanje dokazalo antioksidacijsku aktivnost obje ispitivane tvari [65-67]. U **tablici 5** nalazi se prikaz antioksidacijske aktivnosti derivata kojinske kiseline.

Tablica 5. Antioksidacijska aktivnost derivata kojinske kiseline.

ZNANSTVENICI	ANTIOKSIDACIJSKA AKTIVNOST	ISPITIVANA TVAR
Gonçalez i suradnici	Višestruke emulzije dipalmitata kojinske kiseline su pokazale značajniju antioksidacijsku aktivnost od neinkapsuliranog dipalmitata kojinske kiseline	Višestruke emulzije dipalmitata kojinske kiseline, neinkapsulirani dipalmitat kojinske kiseline
Lobato i suradnici	Metilirana kojinska kiselina pokazala je najveću antioksidacijsku aktivnost	Metilirana kojinska kiselina, maltol, aluminirani maltol

Chen i suradnici	Derivati imaju bolju antioksidacijsku aktivnost od slobodne kojinske kiseline	Fenilhidrazon kojinske kiseline, izonikotinoilhidrazon kojinske kiseline i slobodna kojinska kiselina
-------------------------	---	---

2.6.4. Protuupalna i imunomodulatorna aktivnost

Protuupalna aktivnost najviše je vezana za mehanizam aktivacije makrofaga. Makrofagi su vrsta bijelih krvnih zrnaca čija je zadaća fagocitoza (poseban oblik endocitoze, procesa kojim stanice, u ovom slučaju makrofagi, gutaju i probavljaju bakterije i ostala strana tijela), a osim toga, makrofagi izlučuju citokine koji moduliraju upalni odgovor [68]. Rodrigues i suradnici su u svome radu objavili da kojinska kiselina može potaknuti aktivaciju makrofaga i opisali mehanizam djelovanja. Mehanizam se temelji na pojačanoj proliferaciji makrofaga što im omogućava morfološke i fiziološke promjene. Kao posljedica aktivacije makrofaga javljaju se reaktivne kisikove vrste [69]. Isti je autor u drugome istraživanju dokazao da kojinska kiselina potiče smanjenje proliferacije amastigote, tj. staničnih parazita za 79 %. Smrt parazita izazivaju reaktivne kisikove vrste proizvedene u procesu aktivacije makrofaga [70]. Kojinska kiselina ima sposobnost potaknuti diferencijaciju monocita u makrofage, što se odvija uz lučenje Interleukin-6 (IL-6), ali ne i izlučivanje tumorskog faktora nekroze alfa (TNF- α) (protuupalni citokinon kojeg luče makrofagi kao odgovor na oštećenje stanica ili infekcije). IL-6 je citokin koji je uključen u akutnu fazu upalnog odgovora, sudjeluje u proizvodnji antitijela i stimulira proizvodnju krvnih stanica. Izlučuju ga makrofagi, endotelne stanice i mišićne stanice [71–74]. Istraživanje vezano za antioksidacijsku i protuupalnu aktivnost kojinske kiseline provedeno je osim *in vitro* i *in vivo* na miševima s Alzheimerovom bolesti. Prije tretmana, miševi su imali povišene koncentracije ROS-a i lipidne peroksidaze. Nakon tretmana spomenute povišene koncentracije su smanjene, što dokazuje da kojinska kiselina smanjuje oksidativni stres [75]. U **tablici 6** nalaze se sistematizirani rezultati protuupalne i imunomodulatorne aktivnosti kojinske kiseline i njezinih derivata.

Tablica 6. Prikaz rezultata protuupalne i imunomodulatorne aktivnosti kojinske kiseline i derivata [75].

ZNANSTVENICI	BIOLOŠKO DJELOVANJE	ISPITIVANA TVAR
Rodrigues i suradnici	Kojinska kiselina potiče aktivaciju makrofaga, što za posljedicu ima nastajanje ROS-a	Kojinska kiselina
Rho i suradnici	Sulfidne veze i hidrofobni dijelovi molekule odgovorni su za značajniju inhibitornu aktivnost derivata kojinske kiseline u sintezi dušikova oksida	Tioeterski, sulfoksidni i sulfonski derivati kojinske kiseline
Da Costa i suradnici	Kojinska kiselina ima mogućnost induciranja diferencijacije monocita u makrofage	Kojinska kiselina
Montazeri i suradnici	Kojinska kiselina povećava izlučivanje TNF-alfa sekreta	Kojinska kiselina
Dung i suradnici	Dokazana protuupalna aktivnost inhibicijom tirozin-kinaze i transkripcijskog faktora NF- κ B	[5-hidroksi-4-okso-4H-piran-2-il]metil-6-hidroksinaftalen-2-karboksilat
Khan i suradnici	Kojinska kiselina znatno smanjuje oksidativni stres i pomaže kod medijatornih upala	Kojinska kiselina

2.6.5. Protutumorska aktivnost

Protutumorska aktivnost kojinske kiseline i derivata ispitana je na stanicama raka debelog crijeva (Caco-2- IC_{50} $50,2 \pm 0,28 \mu\text{M}$) [77], raka dojke (MCF-7; MDA-MB-231), raka jajnika (OVCAR-3) i hepatocelularnog karcinoma (Hep G2). Provedena istraživanja su pokazala veću protutumorsku aktivnost derivata kojinske kiseline od slobodne kojinske kiseline zbog veće stabilnosti modificiranih molekula. Derivati kojinske kiseline osim pojačanog protutumorskog učinka pokazali su se i kao dobri usmjerivači do specifične mete u organizmu. Istraživanje koje je provedeno na staničnim linijama ljudskog malignog melanoma A375 (IC_{50} : $11,26\text{--}68,58 \mu\text{M}$) pokazalo je da su derivati kojinske kiseline za njih citotoksični i da imaju veliki potencijal za daljnje

istraživanje [78]. Istraživanje u kojem su korištene stanice hepatocelularnog karcinoma Hep G2 pokazalo je da su derivati kojinske kiseline potaknuli p53 apoptotski put povećanjem intracelularne koncentracije kisikovih reaktivnih vrsta [79]. Apoptotski putovi su oni koji reguliraju staničnu smrt [80]. Isto istraživanje pokazalo je IC_{50} vrijednosti za slobodnu kojinsku kiselinu veće od 100 μ M, dok su IC_{50} vrijednosti za derivate iznosile manje od 100 μ M [80]. Ispitana je protutumorska aktivnost derivata kojinske kiseline i na dvije stanične linije raka dojke- MCF-7 i MDA-MB-231 ($IC_{50} < 100 \mu$ M) [81]. Za istraživanje su se koristili lipofilni derivati kojinske kiseline koji su pasivnim putem prolazili kroz membranu tumorskih stanica i uzrokovali smrt stanice. Kod stanične linije MDA-MB-231, do nekroze je došlo povećanjem oksidativnog stresa, a kod stanične linije MCF-7 staničnu smrt uzrokovali su derivati kojinske kiseline koji su aktivirali kaspazu 8 i 9 i doveli do prevelike ekspresije preapoptičkog gena p53.

2.7. Pregled ostalih bioloških aktivnosti kojinske kiseline i derivata

Osim već spomenutih aktivnosti koje su svoju primjenu pronašle u širokom spektru industrija, kojinska kiselina i njezini derivati odlikuju se još nekim svojstvima i aktivnostima, kao što je radioprotektivna aktivnost. Kojinska kiselina djeluje kao zaštita od radijacije na način da štiti crvena krvna zrnca, hemoglobin i bijela krvna zrnca [82,83]. Provedeno je istraživanje u kojima su miševе podvrgnuli gama-zračenju. Došlo je do pada hematoloških parametara u C57BL/6 muških miševa. Hematološki parametri pružaju uvid u krvnu sliku C57BL/6 miševa, a u spomenuti parametar uvrštavaju se broj eritrocita, koncentracija hemoglobin u krvi, broj leukocita i trombocita i prosječan volumen eritrocita. Poznavanje ovih parametara omogućava procjenu općeg zdravlja miševa, dijagnozu bolesti ili razvoj modela bolesti. Isti C57BL/6 miševi su liječeni jednom dozom kojinske kiseline (jedna grupa miševa s 75 mg/kg, a druga s 300 mg/kg) što je dovelo do promjene hematoloških parametara u normalne, standardne vrijednosti te je time dokazano da kojinska kiselina može spriječiti anemiju izazvanu gama-zračenjem [83]. Za kojinsku je kiselinu zabilježena i mogućnost usporavanja starenja endotelnih i epitelnih stanica rožnice, što omogućava njezinu primjenu u liječenju rožnice. Mehanizam djelovanja kojinske kiseline na endotelne stanice odvija se preko NF- κ B transkripcijskog faktora i p-21 signalnog puta uz regulaciju proteina galektina-8 (protein koji modulira funkciju imunoloških stanica i povezan je s razvojem tumora) i laminina (glikoproteina izvanstaničnog matriksa) [84,85]. Mehanizam se temelji na smanjenju regulacije

proteina galektina-8, ki67 (marker proliferacije koji se koristi u onkologiji za procjenu malignosti tumora) i p-21 (regulator staničnog ciklusa i inhibitor ciklinskih kinaza – na taj način zaustavlja stanični ciklus) ekspresije i povećane regulacije p-38 signalizacije (odgovor na stres – ima bitnu ulogu u regulaciji proliferacije i apoptoze stanica). Uz navedeno, ispitana je i antikonvulzivna aktivnost derivata kojinske kiseline, *in vivo* modelom na miševima. Ispitano je 12 Mannichovih baza kojinske kiseline [86]. Miševima muškog spola napadaji su izazvani elektrošokovima ili Metrazolom. Metrazol/Pentilentetrazol ($C_6H_8N_4$) je stimulans središnjeg živčanog sustava čiji se mehanizam djelovanja temelji na inhibiciji gama-aminomaslačne kiseline [87]. Miševi tretirani derivatima kojinske kiseline pokazali su smanjeni broj napadaja [86]. Već je spomenuto kako kojinska kiselina ima sposobnost keliranja metalnih kationa, što je korisno kod trovanja metalima i terapijama kontrole koncentracije metala u organizmu. Derivati kojinske kiseline u istraživanju Nurchia i suradnika pokazali su visok afinitet vezanja željezovih iona (Fe^{2+} , Fe^{3+}), viši afinitet čak i od same kojinske kiseline [88].

3. ZAKLJUČAK

Hidroksipiranoni su heterociklički spojevi koji sadrže šesteročlani prsten kao jezgru. U strukturi aromatskog prstena nalazi se kisikov atom. Na prsten su obično vezane karbonilna i hidroksilna skupina. Glavni predstavnici skupine hidroksipiranona su maltol i kojinska kiselina. Kojinska kiselina je organska tvar, prvi put dobivena procesom “koji” početkom 20. stoljeća, po kome je i dobila ime. Slaba je organska kiselina koja podliježe velikom broju reakcija. Derivati kojinske kiseline dobiveni su modulacijama molekule kojinske kiseline koji se odlikuju povećanom stabilnošću i biološkom aktivnošću, uz manje štetne učinke na organizam. Značajni derivati, kao što su dipalmitat kojinske kiseline ili monooleat kojinske kiseline, sintetiziraju se reakcijama kojinske kiseline s odabranim zasićenim masnim kiselinama. Zahvaljujući svojim svojstvima, kojinska kiselina ima široku upotrebu, kao i njezini derivati. U dostupnoj literaturi najčešće je opisana upotreba kojinske kiseline u kozmetičkoj industriji. Kojinska kiselina i derivati upotrebljavaju se u proizvodima protiv hiperpigmentacije kože, za zaštitu od UV-zračenja. Mehanizam depigmentacijskog djelovanja kojinske kiseline temelji se na inhibiciji tirozinaze, ključnog enzima u sintezi melanina. Osim depigmentacijske aktivnosti, u literaturi se spominju i antioksidacijska aktivnost, antimikrobna aktivnost, protuupalna i imunomodulatorna aktivnost te protutumorska aktivnost. Spoznaje koje su nastale kao pregled rezultata novijih istraživanja svakako imaju potencijal doprinijeti novim modulacijama kojinske kiseline i dizajnu većeg broja derivata koji će biti biološki aktivni i primjenjivi.

4. POPIS KRATICA I SIMBOLA

2D stanični model – dvodimenzionalna stanični model

ABTS+ test – 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfonska kiselina)+ test

ATCC – engl. *American Type Cell Culture*- američki tip stanične kulture

DNA – engl. *deoxyribonucleic acid*- deoksiribonukleinska kiselina

DOPA – dihidroksifenilalanin

DPPH test – engl. *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl test* -2,2-difenil-1-pikrildrazil test

ECACC – engl. *European Collection of Animal Cell Culture* – europska zbirka culture životinjskih stanica

IC₅₀ – engl. *Half Maximal Inhibitory Concentration* – polovica maksimalne inhibitorne koncentracije)

IUPAC – engl. *International Union of Pure and Applied Chemistry* – Međunarodna unija za čistu i primjenjenu kemiju

K_i – konstanta inhibicije

MIC – engl. *Minimal Inhibitory Concentration* – minimalna inhibitorna koncentracija

logP – engl. *Partition coefficient* - koeficijentom rasodjele

ROS – engl. *Reactive Oxygen Species* – reaktivne kisikove vrste

SSF – engl. *Solid-State Fermentation* – fermentacija na čvrstoj fazi

UV zračenje – engl. *Ultraviolet radiation* – ultraljubičasto zračenje

5. LITERATURA

1. A. Jahan Zaub, M. Hanfi, Hydroxypyronone derivatives in drug discovery: from chelation therapy to rational design of metalloenzyme inhibitors. *RSC Med Chem.* **2022**, *13*, 1127–1149.
2. L. Toso, G. Crisponi, V. M. Nurchi, M. Crespo-Alonso i suradnici, A family of hydroxypyronone ligands designed and synthesized as iron chelators. *J. Inorg. Biochem.* **2013**, *127*, 220–231.
3. D. StC Black, J. Cossy, C. V. Stevens. *Comprehensive Heterocyclic Chemistry IV*, Vol. 7. **2022**, Str. 329–490.
4. A.F. Lajis, M. Hami, A.B. Ariff. Depigmenting effect of Kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *J Biomed Biotechnol.* **2012**, *2012*, 1–9.
5. N. Filipović, Priprava, strukturna karakterizacija i biološka aktivnost neutralnih kompleksa prijelaznih metala na 3D staničnim modelima in vitro, Doktorska disertacija **2024**, Str. 4.
6. L. Ozdanovac, Priprava 1,2,3-triazolnih derivata piran-4-ona iz meta i para-nitrofenilazida i njihov biološki učinak, Diplomski rad, **2018**, Str. 4–8.
7. R. Singh., P. Kumar., P. Sharma, Reactivity of Maltol with Various Amines: An Experimental Study. *J. Org. Chem.*, **2016**, *81(22)*, 11234–11242.
8. BYJU'S. URL: <https://byjus.com/biology/passive-transport/> (15.8.2024.)
9. B.L. Rivas, S. Villegas, B. Ruf, I.M. Peric, Synthesis and characterization of polymers with applications in separation science. *J. Chil. Chem. Soc.*, **2007**, *52*, 1164–1168
10. H.E. Morton, W. Kocholaty, R. Junowicz-Kocholaty, A. Kelner. Toxicity and antibiotic activity of kojic acid produced by *Aspergillus luteovirens*. *J. Bacteriol.*, **1945**, *50(5)*, 579–588.
11. Macmillan Cancer Support. URL: [Cisplatin \(chemotherapy drug\) - treatment and side effects | Macmillan Cancer Support](#), 1.7.2024.
12. . I.A. El-Kady, A.N. Zohri, S.R. Hamed. Kojic acid production from agro-industrial by-products using fungi. *Biotechnol Res Int*, **2014**, *2014*, 642385.
13. A.M. Rasmey, A. Basha. Isolation and screening of kojic acid producing isolate of *Aspergillus oryzae* potentially applicable for production from sugarcane molasses. *Int J Biol Res*, **2016**, *4(2)*, 119.

14. PubChem. URL: [Kojic acid | C6H6O4 | CID 3840 - PubChem \(nih.gov\)](#) (15.6.2024.)
15. G. Zhang, Y. Ma, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhou, *Food Chem.* **2012**, *133*, 264–270. G. Zhang, Y. Ma, L. Wang, Y. Zhang, J. Zhou. Multispectroscopic studies on the interaction of maltol, a food additive, with bovine serum albumin. *Food Chem.* **2012**, *133*(2), 264–270.
16. R. Bentley. From miso, saké and shoyu to cosmetics: a century of science for kojic acid. *Nat. Prod. Rep.* **2006.**, *23*(6), 1046–1062.
17. M. Matišić, Priprava novih meta i para supstituiranih piridinonskih alfa-manozida i njihov antiadhezijski učinak, Diplomski rad, **2018** , Str. 8.
18. J. Gorzynski Smith: Organic chemistry, Vol 3., USA **2011.**, 792–797.
19. K. Meglič, Priprava adamantilnih i manoznih derivata novih N-aril supstituiranih 3-hidroksipiridin-4-ona dobivenih iz kojične kiseline, Diplomski rad, **2016**, Str. 7–13.
20. X. Liu, W. Xia, Q. Jiang, Y. Xu, P. Yu. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Kojic Acid Grafted Chitosan Oligosaccharide. *J. Agric. Food Chem.*, **2013**, *62*, 297–303.
21. M.D. Aytemir, B. Ozcelik. Synthesis and biological activities of new Mannich bases of chlorokojic acid derivatives. *Med. Chem.* **2011**, *20*, 443–452.
22. J.C. Zilles, F.L. dos Santos, I.C. Kulkamp Guerreiro, R.V. Contri. Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. *Exp. Dermatol.*, **2022**, *31*, 1500–1521.
23. A. Ahmed, A Study On Antibacterial Activities Of Essential Oils From Most Commonly Used Spices In Zanzibar Against Milk Spoilage Bacteria, Doktorska disertacija, **2015**.
24. K. Elumalai, S. Srinivasan, A. Shanmugam, Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. *Biomed. Technol.*, **2024**, *5*, 109–122.
25. UPM Biomedicals. URL: [2D vs 3D cell culture | Learning Center | UPM Biomedicals](#) (13.8.2024.)
26. AAT Bioquest URL: <https://www.aatbio.com/resources/faq-frequently-asked-questions/What-are-the-types-of-cell-culture> (13.8.2024.)
27. Differkinome. URL: <https://hr.differkinome.com/articles/science--nature/difference-between-finite-and-continuous-cell-lines-2.html> (13.8.2024.)
28. I.F. Radaeva, M.P. Bogryantseva, E.A. Nechaeva, Banks of cell cultures for

- biotechnology, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **2012**, *153*, 581–585.
29. V. Chunduri, S. Maddi. Role of in vitro two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culture systems for ADME-Tox screening in drug discovery and development: A comprehensive review. *ADMET DMPK*. **2022**, *11*, 1–32.
 30. Promega. URL: <https://worldwide.promega.com/resources/guides/cell-biology/3d-cell-culture-guide/>. (13.3.2023.)
 31. N. Chaicharoenaudomrung, P. Kunhorm, P. Noisa, Three-dimensional cell culture systems as an in vitro platform for cancer and stem cell modeling. *World J. Stem Cells*, **2019.**, *11*(12), 1065–1083.
 32. G. Hassan, S.M. Afify, S. Kitano, M. Seno. Cancer stem cell microenvironment models with biomaterial scaffolds in vitro. *Processes*, **2020**, *9*(1), 45.
 33. C. Jiménez-Jiménez, V.M. Moreno, M. Vallet-Regí, Bacteria-Assisted Transport of Nanomaterials to Improve Drug Delivery in Cancer Therapy, *Nanomaterials*. **2022**, *12*, 288.
 34. BYJU'S. URL: <https://byjus.com/biology/difference-between-gram-positive-and-gram-negative-> (9. 5. 2024.)
 35. W. Gao, Y. Chen, Y. Zhang, Q. Zhang, L. Zhang. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2018**, *127*, 46–57.
 36. D. Delač, Određivanje sadržaja bakterijskih endotoksina u injekcijama azitromicina, diplomski rad, Prehrambeno-biotehnoški fakultet u Zagrebu, **2017.**, Str.4.
 37. V.J. Hearing. The expanding role and presence of neuromelanins in the human brain—why gray matter is gray. *Pigment Cell Melanoma Res.*, **2009**, *22*, 10–11.
 38. C.R. Lima, J.R.A. Silva, E. De Tássia Carvalho Cardoso, E.O. Silva, J. Lameira, J.L.M. Do Nascimento, D. Do Socorro Barros Brasil, C.N. Alves, Combined Kinetic Studies and Computational Analysis on Kojic Acid Analogs as Tyrosinase Inhibitors. *Molecules*, **2014**, *19*(7), 9591–9605.
 39. J.C. Zilles, F.L. dos Santos, I.C. Kulkamp Guerreiro, R.V. Contri, Biological activities and safety data of kojic acid and its derivatives: A review. *Exp. Dermatol.*, **2022**, *31*, 1500–1521.
 40. T. Oyama, Yoshimori A., Ogawa H., Shirai Y., Abe H., Kamiya T., Tanuma S., The structural differences between mushroom and human tyrosinase cleared by investigating

- the inhibitory activities of stilbenes. *J. Mol. Struct.*, **2023**, 1272, 134180.
41. T. Widiandani, T. Tandian, B. D. Zufar, A. Suryadi, B. T. Purwanto i suradnici, *In vitro* study of pinostrobin propionate and pinostrobin butyrate: Cytotoxic activity against breast cancer cell T47D and its selectivity indeks. *J Public Health Afr.* **2023**, 14, 2516.
 42. L. Kolbe, T. Mann, W. Gerwat, S. Yamaguchi, C. J. Villena, E. Schoelermann, et al. 4-n-butylresorcinol, a highly effective tyrosinase inhibitor for the topical treatment of hyperpigmentation. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, **2013**; 27(suppl 1): 19–23.
 43. K. Khezri, M. Saeedi, K. Morteza-Semnani, J. Akbari, A. Hedayatizadeh Omran. A promising and effective platform for delivering hydrophilic depigmenting agents in the treatment of cutaneous hyperpigmentation: kojic acid nanostructured lipid carrier. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, **2021**; 49, 38–47.
 44. M.A. Roselan, S.E. Ashari, N.H. Faujan, S.M. Mohd Faudzi, R. Mohamad, An improved nanoemulsion formulation containing kojic monooleate: optimization, characterization and in vitro studies. *Molecules*, **2020**; 25(11): 2616.
 45. H. Kai, K. Matsuno, Assessment of the effect of arbutin isomers and kojic acid on melanin production, tyrosinase activity, and tyrosinase expression in B16-4A5 and HMV-II melanoma cells. *Planta Med Lett*, **2015**; 2, 39–41.
 46. AFB. Lajis, M. Hamid, A.B. Ariff. Depigmenting effect of kojic acid esters in hyperpigmented B16F1 melanoma cells. *J Biomed Biotechnol*, **2012**; 2012: 1–9.
 47. Y.W. Wang, C.H. Jou, C.C Hung, M.C. Yang, Cellular fusion and whitening effect of a chitosan derivative coated liposome. *Colloids Surf. B Biointerfaces*, **2012**, 90, 169–176.
 48. G. Karakaya, A. Ercan, S. Oncul, M.D. Aytemir. Synthesis and cytotoxic evaluation of kojic acid derivatives with inhibitory activity on melanogenesis in human melanoma cells. *Anticancer Agents Med Chem*, **2018**, 18, 2137–2148.
 49. YM. Chen, W.C. Su, C. Li et al, Anti-melanogenesis of novel kojic acid derivatives in B16F10 cells and zebrafish. *Int J Biol Macromol*, **2019**; 123: 723–731.
 50. M.J. Kunes, J. Kvetina et al, Type and distribution of indomethacin-induced lesions in the gastrointestinal tract of rat. *Neuro Endocrinol Lett*, **2009**; 30, 96–100.
 51. A.K. Gupta, E.A. Cooper, Antifungal activity of kojic acid and its derivatives against dermatophytes. *Journal of Dermatological Treatment*, **2008**, 19, 79–83.
 52. J. Chen et al, Evaluation of antifungal properties of kojic acid and derivatives. *Mycoses*,

- 2018**; *61*, 459–466.
53. H.J. Ahn et al, Antifungal Activity of Kojic Acid Against Clinically Isolated Pathogenic Yeasts and Dermatophytes." *Mycobiology*, **2017**, *45*, 29–33.
54. H. Ezzat, M. Rady, R.M. Hathout, M. Abdel-Halim, S. Mansour, Enhanced anti-bacterial effect of kojic acid using gelatinized core liposomes: a potential approach to combat antibiotic resistance. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.*, **2021**, *64*, 102619.
55. A.P.P. Bracarense, J.A. Takahashi, Modulation of antimicrobial metabolites production by the fungus *Aspergillus parasiticus*. *Brazilian J Microbiol.* **2014**, *45*, 313–321.
56. T. Nurunnabi, S. Al-Majmaie, I. Nakouti et al. Antimicrobial activity of kojic acid from endophytic fungus *Colletotrichum gloeosporioides* isolated from *Sonneratia apetala*, a mangrove plant Sundarbans. *Asian Pac J Trop Med.* **2018**, *11*, 350–354.
57. K. Çevik, S. Ulusoy, Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation by 2,2'-bipyridyl, lipoic, kojic and picolinic acids. *Iran J Basic Med Sci.* **2015**; *18*, 758–763.
58. A.N.M. Ali, N.M. Elsheshtawy, N. Fouad, W. Ibrahim, In vitro activity of EDTA, kojic acid and their combination against biofilm forming microorganisms causing catheter associated urinary tract infections. *Egypt. J. Med. Microbiol.*, **2019**, *2019*, 28.
59. W. Wu, S. Cheng, H. Deng, J. Wu, K. Mao, M. Cao, Impact of Breast Cancer Subtype Defined by Immunohistochemistry Hormone Receptor and HER2 Status on the Incidence of Immediate Postmastectomy Reconstruction. *Medicine (Baltimore)*. **2016**, *95*, 2547.
60. S.N.A. Syed Azhar, S.E. Ashari, S. Ahmad, N. Salim, In vitro kinetic release study, antimicrobial activity and in vivo toxicity profile of a kojic acid ester-based nanoemulsion for topical application. *RSC Adv.* **2020**, *10*, 43894–43903.
61. M.D. Aytemir, B. Özelik, A study of cytotoxicity of novel chlorokojic acid derivatives with their antimicrobial and antiviral activities. *Eur J Med Chem.* **2010**, *45*, 4089–4095.
62. M. Rajamanikyam, S. Gade, V. Vadlapudi et al, Biophysical and biochemical characterization of active secondary metabolites from *Aspergillus allahabadii*. *Process Biochem.* **2017**, *56*, 45–56.
63. B. Siddhardha, U.S.N. Murty, M. Narasimhulu, Y. Venkateswarlu, Isolation, characterization and biological evaluation of secondary metabolite from *Aspergillus funiculosus*. *Indian J Microbiol.* **2010**, *50*, 225–228.

64. W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity, *LWT - Food Science and Technology*, **1995**, Vol. 28, Issue 1, 25–30.
65. M.L. Gonçalez, D.G. Marcussi, G.M.F. Calixto, M.A. Corrêa, M. Chorilli, Structural characterization and in vitro antioxidant activity of kojic dipalmitate loaded W/O/W multiple emulsions intended for skin disorders. *Biomed Res Int*. **2015**, 2015, 1–8.
66. C.C. Lobato, M.E. Ordoñez, R.L. Queiroz, C.B.R. Santos, R.S. Borges, A comparative study between kojic acid and its methylated derivatives as antioxidant related to maltol and alomaltol. *Chem Data Collect*. **2020**, 28, 100464.
67. Y.M. Chen, C. Li, W.J. Zhang et al, Kinetic and computational molecular docking simulation study of novel kojic acid derivatives as anti-tyrosinase and antioxidant agents. *J Enzyme Inhib Med Chem*. **2019**, 34, 990–998.
68. S. Chen, A.F. Saeed, Q. Liu et al. Macrophages in immunoregulation and therapeutics. *Sig Transduct Target Ther*, **2023**, 8, 1–3.
69. A.D.P. Rodrigues, A.S.C. Carvalho, A.S. Santos, C.N. Alves, J.L.M. do Nascimento, E.O. Silva, Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus* sp., acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biol Int*. **2011**, 35, 335–343.
70. Rho HS, Ahn SM, Yoo DS, Kim MK, Cho DH, Cho JY. Kojyl thioether derivatives having both tyrosinase inhibitory and anti-inflammatory properties. *Bioorganic Med Chem Lett*. **2010**, 20, 6569–6571.
71. K. Popko, E. Gorska, A. Stelmaszczyk-Emmel, R. Plywaczewski, A. Stoklosa, D. Gorecka, B. Pyrzak, U. Demkow, Proinflammatory cytokines Il-6 and TNF- α and the development of inflammation in obese subjects. *Eur J Med Res*. **2010**, 15, 120–122.
72. J.P. Da Costa, A.P.D. Rodrigues, L.H.S Farias et al, Biological effects of kojic acid on human monocytes in vitro. *Biomed Pharmacother*. **2018**, 101, 100–106.
73. M. Montazeri, S. Emami, H. Asgarian-Omran et al, In vitro and in vivo evaluation of kojic acid against toxoplasma gondii in experimental models of acute toxoplasmosis. *Exp Parasitol*. **2019**, 200, 7–12.
74. T.T.M. Dung, S.C. Kim, B.C. Yoo et al, (5-Hydroxy-4-oxo-4H-pyran-2-yl)methyl-6-hydroxynaphthalene-2-carboxylate, a kojic acid derivative, inhibits inflammatory mediator production via the suppression of Syk/Src and NF- κ B activation. *Int Immunopharmacol*. **2014**, 20, 37–45.

75. A. Khan, T.J. Park, M. Ikram et al, Antioxidative and anti-inflammatory effects of kojic acid in A β -induced mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* **2021**, 58, 5127-5140.
76. D. Selgrad, *In vitro* probir novih derivata fenantrena na tumorskim staničnim linijama, Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, **2020**, Str. 1–2 .
77. C.H.K. Momo, A.D.K. Mboussaah, N. François Zambou, M.A. Shaiq, New pyran derivative with antioxidant and anticancer properties isolated from the probiotic lactobacillus plantarum H24 strain. *Nat Prod Res.* **2020**, 36, 909–917.
78. G. Karakaya, A. Ercan, S. Oncul, M.D. Aytemir, Synthesis and cytotoxic evaluation of kojic acid derivatives with inhibitory activity on melanogenesis in human melanoma cells. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2018**, 18(15), 2137–2148.
79. S. Oncul, G. Karakaya, M. Dilsiz Aytemir, A. Ercan, A kojic acid derivative promotes intrinsic apoptotic pathway of hepatocellular carcinoma cells without incurring drug resistance. *Chem Biol Drug des.* **2019**, 94, 2084–2093.
80. G.M. Cooper, R.E. Hausman, *The Cell: A Molecular Approach*, Vol 6., **2013**, Str. 682.
81. A. Ercan, S. Oncul, G. Karakaya, M. Aytemir, An allomaltol derivative triggers distinct death pathways in luminal a and triplenegative breast cancer subtypes. *Bioorg Chem.* **2020**, 105, 104403.
82. T.M. Allen, P.R. Cullis, Liposomal drug delivery systems: from concept to clinical applications. *Adv Drug Deliv Rev.* **2013**, 65, 36–48.
83. K. Wang, C. Liu, C-J. Di et al, Kojic acid protects C57BL/6 mice from gamma-irradiation induced damage. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2014**, 15, 52.
84. S.M. El-Korany, O.M. Helmy, A.M. El-Halawany, Y.E.M. Ragab, H.H. Zedan, Kojic acid repurposing as a pancreatic lipase inhibitor and the optimization of its production from a 31 local *Aspergillus oryzae* soil isolate. *BMC Biotechnol.* **2020**, 20, 52.
85. X. Wei, L. Du, L. Sun et al, Kojic acid enhances the proliferation of human corneal epithelial cells via p38 and p21 signaling pathways. *Eur J Ophthalmol.* **2020**, 31, 2287–2293.
86. M.D. Aytemir, Ü Çalis, Anticonvulsant and neurotoxicity evaluation of some novel kojic acids and allomaltol derivatives. *Arch Pharm (Weinheim).* **2010**, 343, 173–181.

87. C.M. Tsai, S.F. Chang, H. Chang, Transcranial photobiomodulation add-on therapy to valproic acid for pentylenetetrazole-induced seizures in peripubertal rats. *BMC Complement Med Ther.* **2022**, *22(1)*, 81.
88. V.M. Nurchi, G. Crisponi, M. Arca et al, A new bis-3-hydroxy-4- pyrone as a potential therapeutic iron chelating agent. Effect of connecting and side chains on the complex structures and metal ion selectivity. *J Inorg Biochem.* **2014**, *141*, 132–143.