

# Graviola (*Annona muricata*) 잎 추출물의 항산화 및 미백 효과

조은희 · 김인혜 · 이재화<sup>†</sup>

신라대학교 의생명과학대학 제약공학과  
(2016년 12월 30일 접수, 2017년 1월 26일 심사, 2017년 2월 22일 채택)

## Antioxidant and Skin Whitening Effect of Graviola (*Annona muricata*) Leaf Extracts

Eun Hee Jo, In Hae Kim, and Jae Hwa Lee<sup>†</sup>

Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life Science, Silla University, Busan 46958, Korea  
(Received December 30, 2016; Revised January 26, 2017; Accepted February 22, 2017)

### 초 록

본 연구에서는 *Annona muricata* 잎 추출물(graviola leaf extracts, GLE)의 항산화(antioxidant), 항균(antibacterial), 미백(whitening) 및 주름 개선(anti-wrinkle) 효과 등을 조사하였으며, 항산화(antioxidant) 효과에 대한 활성은 전자공여능 분석을 통해 측정하였다. 그 결과 GLE는 농도 의존적으로 전자공여능이 증가하는 것으로 나타났다. GLE의 항균 활성은 paper disc법으로 측정하여 나타냈으며, 표준물질인 ampicillin과 비교하여 메티실린내성 황색포도상구균 CCARM3115에서 비교적 높은 항균 활성을 나타내었다. GLE에 대한 미백(whitening) 효과 역시 tyrosinase 저해 활성 측정을 통해 진행하였으며, 그 결과 GLE는 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성이 감소하는 것으로 나타났다. GLE 농도에 따른 L-tyrosine을 DOPA로 바꾸는 데 관여하는 hydroxylation 반응과 관련한 mushroom tyrosinase의 저해 활성은 표준물질인 arbutin에 비해 125~250 µg/mL 농도 범위에서 특히 높게 나타났다. B16-F10 cell에 대한 melanin 생합성 저해능은 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였으며, 100 µg/mL에서 76.7%를 나타냈다. 주름 생성과 관련하여서는 elastase 저해 활성 측정을 통해 진행하였으며, 그 결과 동일한 농도에서 GLE 및 ursolic acid는 10.5, 56.5%로 나타났다. 이러한 결과를 통해 *Annona muricata* 잎 추출물(Graviola Leaf Extracts, GLE)이 항산화 및 미백 활성에 상당한 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 미백 화장품 성분으로서 과색소침착 치료에 유용할 것으로 기대된다.

### Abstract

In this study, graviola leaf extracts (GLE) was investigated for the effect of antioxidant, antibacterial, whitening, anti-wrinkle. The antioxidant effect of GLE was measured by an electron donating ability assay. As a result, GLE increased the electron donating ability in a concentration-dependent manner. The antibacterial effect of GLE was found to show the higher antibacterial effect in Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CCARM3115 compared with that of ampicillin by a paper disc method. The whitening effect of GLE was also measured by tyrosinase inhibition assay, and it was found that the tyrosinase activity of GLE decreased as the concentration increased. The inhibition activity of tyrosinase involved in hydroxylation reaction which is related to converting L-tyrosine to (DOPA) was higher than that of arbutin's at the concentration ranging from 125 to 250 µg/mL. In addition, GLE reduced melanin contents of B16-F10 melanoma cells in a dose-dependant manner and decreased to about 76.7% at a concentration of 100 µg/mL. Regarding wrinkling formation of GLE, an elastase inhibition assay was performed. As a result, GLE and ursolic acid were 10.5% and 56.5%, respectively under the identical concentration. These results suggest that GLE has significant antioxidant and whitening activities, and also may be potentially used as a therapeutic agent for hyperpigmentation treatment as an ingredient of whitening cosmetics.

**Keywords:** *annona muricata*, *graviola*, whitening, tyrosinase

## 1. 서 론

화장품법 제2조 1항에 “인체를 청결·미화하여 매력을 더하고, 용

모를 밝게 변화시키거나 피부 모발의 건강을 유지 또는 증진시키기 위하여 인체에 사용되는 물질으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것”으로 화장을 정의하고 있다. 이처럼 화장품은 경제 성장에 따른 소득 수준의 향상과 여성의 사회 활동 증가로 그 사용 인구가 전 세계적으로 점차 증가하고 있다. 국내 화장품산업의 시장 규모는 2014년 74억 달러로 전 세계 시장의 29%를 차지하는 매우 방대한 시장을 형성하고 있으며, 총 생산 규모 또한 전년 대비 12.5% 증가하였으며 이는 최근 5년 연평균 증가율인 10.5%를 웃도는 것으로 비교적 높은 성장세를 유지하고 있다[1]. 이러한 화장품 분야는 과학의 발달에 따른 고

<sup>†</sup> Corresponding Author: Silla University,  
Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical and Life  
Science, Busan 46958, Korea  
Tel: +82-51-999-5831 e-mail: jhalee@silla.ac.kr

령화 사회 진입과 경제적 수준의 향상으로 인해 장기적인 관점에서의 대응이 필요한 상황이며 특히 높은 효능의 기능성 화장품 개발이 요구되고 있다.

화장품법 제2조 2항에 “피부의 미백에 도움을 주는 제품, 피부의 주름 개선에 도움을 주는 제품, 피부를 곱게 태워주거나 자외선으로부터 피부를 보호하는 데 도움을 주는 제품”으로 기능성 화장품을 정의하고 있다. 국내 기능성 화장품의 시장 규모는 최근 4년 간 연평균 19.9%씩 성장하였으며 2014년 기준 약 8조 1,778억 원으로, 최근 소비 트렌드 및 관련 연구 동향 등을 고려했을 때 아직도 성장 가능성이 높은 시장으로 보여진다[1,2]. 식품의약품 안전처의 기능성 화장품 고시 품목으로는 미백 기능성 화장품의 경우 나이아신아마이드, 닥나무 추출물, 아스코빌글루코사이드, 알부틴, 알파-비사보롤, 에칠아스코빌 에텔과 유용성 감초추출물이 있으며, 주름 개선 고시 품목으로는 레티놀, 레티날팔미테이트, 아테노신과 폴리에톡실레이티드레틴아마이드가 있다. 자외선차단 고시 품목으로는 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트 외 26종이 있다. 그러나 이러한 기존 기능성 화장품 소재의 경우 피부 자극을 유발하는 경우도 있고 피부 안정성 및 안전성에 문제가 되는 경우도 있다. 그 결과, 화장품 산업은 보다 기능적으로, 자연주의적인 제품을 선호하는 소비자의 요구에 부응하여 고도의 기술을 필요로 하는 첨단 산업으로 점차 자리매김하고 있으며, 이에 따라 새로운 원료개발의 요구도 높아지고 있다.

*Annona muricata*는 포도나무과에 속하며 브라질을 비롯한 아마존 일대와 남미, 인도, 필리핀, 인도네시아, 북미의 열대에 자생하고 있는 5~6 m 정도의 작은 상록수이다. 이들은 전통적으로 씨를 뺀 기생충을 없애는 데 사용하였다. 또한, 열을 낮추거나 출산 이후의 모유를 증가시키고 설사와 이질을 지혈하는 면역기능 개선보조나 면역 체계 강화를 위해 사용하였다. 특히 *Annona muricata* 잎은 항암, 진정제, 항경련제 그리고 저혈압제로 사용하였다[3-5]. 선행 연구에 따르면 여러 가지 *in vitro* model 상에서 *Annona muricata*의 항산화제로서의 잠재성을 확인하였으며 이는 *Annona muricata* 잎의 rutin과 hyperoside와 같은 플라보노이드 성분 및 항산화 활성물질이 풍부해 신체 내부의 산화성 손상을 최소화 하는 것으로 나타났다[6]. 또한 왁스 성질의 물질인 Annonaceae acetogenins는 항균, 항 기생충·곤충, 항종양 등의 작용을 하며 잎을 비롯한 *Graviola* 전반에 골고루 분포해 있는 것으로 나타났다[3]. 그러나 아직 항산화 및 미백 활성과 관련하여 화장품 소재로서의 *Annona muricata*에 대한 연구 보고는 부족하다.

따라서 본 연구에서는 *Annona muricata* 잎 추출물(*Graviola* Leaf Extracts, GLE)을 이용하여 화장품 소재로서의 가능성을 조사하고자 *in vitro* 상에서 항산화, 항균, 미백 및 주름 개선 효과 등을 분석하였으며, 더 나아가 *in vivo* 상에서 B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율 및 melanin 생합성 억제 효과를 조사하여 보고하고자 한다.

## 2. 실험

### 2.1. 시료 추출물 제작

본 연구에서 사용된 그라비올라(*Annona muricata*, Philippines)는 필리핀에서 수입하여 사용하였다. *Annona muricata* 잎 시료를 100 g씩 정량하여 각각 ethanol 추출물은 10배 용량의 ethanol을 가하여 3일 동안 침지하고, 열수 추출물은 10배 용량의 증류수를 가한 후 고온가압 추출로 추출물을 제조하였다. 고온가압추출은 유리병에 분쇄 시료와 증류수를 혼합한 후 autoclave (WAC 60, Wise Clave, Korea)를 이용하여 121 °C에서 4 h 동안 2회 반복 추출하였다. 각각의 추출액은 여

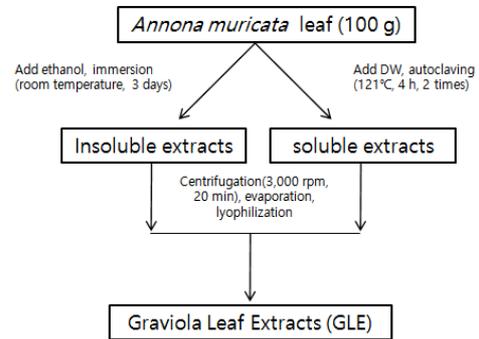


Figure 1. Summarization of *Graviola* Leaf Extracts (GLE) manufacturing procedure from the *Annona muricata* leaf.

과지(Whatman No.2, Whatman Ltd., Dent, UK)로 여과한 후 감압농축기(EYELA, Tokyo, Japan)로 농축하였다. 각 농축물은 동결 건조하여 분말화시킨 후 혼합하여 실험에 사용하였다. 혼합 시료는 4 °C에 보관하여 각 실험 단계별로 사용하였으며, 시료에 대한 명칭은 *Annona muricata* 잎 추출물(*Graviola* Leaf Extracts, GLE)로 명명하였다(Figure 1).

### 2.2. DPPH radical 소거능

Free radical scavenging activity를 측정하기 위하여 2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 방법을 사용하였다. DPPH 8 mg을 ethanol 100 mL에 녹여 0.2 mM DPPH 용액을 준비하고 농도별로 조제한 시료용액 50 µL에 DPPH stock 용액을 500 µL 넣어 total volume이 1 mL가 되도록 ethanol을 첨가하여 실온에서 30 min 간 반응시킨 후, 96 well plate에 넣어 ELISA Multiscan Reader (Thermo scientific, Finland)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준시료로는 L-Ascorbic acid (Sigma chemical Co., Louis, MO, USA)를 사용하였으며 시료의 최종농도는 1 mg/mL가 되도록 제조하였다. 각 시료의 항산화 활성은 시료 첨가구와 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다(식 (1)).

Radical Scavenging Activity (RSA, %) =

$$\frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100 \quad (1)$$

### 2.3. SOD 유사활성 측정

GLE의 superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정은 Marklund & Marklund (1975)를 응용한 SOD assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Inc., USA)를 이용하여 superoxide anion radical (O<sub>2</sub>)의 소거 활성률을 측정하였다[7]. 적정 농도별로 희석한 시료 20 µL와 WST working solution 200 µL를 첨가한 후, enzyme working solution을 20 µL 첨가하여 37 °C, 20 min 반응 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 kit의 계산법에 따라 SOD 활성을 측정하였다(식 (2)).

SOD-like activity (%) =

$$\frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}} \times 100 \quad (2)$$

### 2.4. 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu 방법[8]을 일부 변형하여 측정하였다. 시료(10 mg/mL) 100 µL에 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 2 mL를 첨가 후,

3 min 간 실온에 정지한 다음, 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 100  $\mu$ L를 첨가하여 30 min 반응시켰다. 이후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 gallic acid (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 검량곡선을 작성하고 그에 대한 당량으로 환산하였다.

총 플라보노이드 함량은 Davis 방법[9]을 일부 변형하여 측정하였다. 시료(10 mg/mL) 100  $\mu$ L에 diethylene glycol 용액 1 mL를 첨가 후, 1 N NaOH 100  $\mu$ L를 첨가하여 37  $^{\circ}$ C, 1 h 반응시킨 후, 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 naringin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 표준시약으로 검량곡선을 작성하고 그에 대한 당량으로 환산하였다.

## 2.5. 항균 측정

GLE의 항균력은 disc 확장법[10]으로 측정하였다. 측정에 사용한 균주는 다음과 같다. Gram-positive bacteria로는 *Bacillus subtilis* PM125을 항생제 내성 균주로는 Methicillin Resistance *Staphylococcus aureus* (MRSA) CCARM3561, CCARM3115, CCARM3089 균주를 항생제 내성 균주 은행(Culture Collection of Antimicrobial Resistant Microbes, CCARM)에서 분양받아 사용하였다. 각각의 *Bacillus subtilis* PM125, MRSA CCARM3089, MRSA CCARM3115 그리고 MRSA CCARM3561은 37  $^{\circ}$ C, Tryptic soy broth, TSB (Merck & Co. Inc., Darmstadt, Germany) 배지에서 mid-logarithmic phase (OD<sub>570</sub> = 0.1,  $5 \times 10^7$  CFU/mL)까지 배양하였다. 멸균된 TSA 배지에 각각의 *Bacillus subtilis* PM125, MRSA CCARM3089, MRSA CCARM3115 그리고 MRSA CCARM3561 배양액 100  $\mu$ L를 도말한 후, paper disc (직경 8 mm)를 plate에 놓고 500  $\mu$ g/disc의 농도로 disc에 50  $\mu$ L씩 흡수시키고 37  $^{\circ}$ C incubator에서 18 h 배양시켰다. 배양 후 disc 주변에 생성된 clear zone의 크기로 활성을 측정하였다.

## 2.6. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosine에 대한 *in vitro* tyrosinase 저해 시험은 다음과 같이 측정하였다[11]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 220  $\mu$ L, 시료 20  $\mu$ L, mushroom tyrosinase (1500~2000 U/mL)액 20  $\mu$ L를 순서대로 넣는다. 이 용액에 1.5 mM L-tyrosine 40  $\mu$ L를 혼합하여 37  $^{\circ}$ C에서 15 min 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase 저해 시험은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다(식 (3)). 시료 무첨가구는 시료 대신 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)를 넣었으며, 양성 대조군으로는 arbutin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 사용하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition ratio (\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (3)$$

DOPA에 대한 *in vitro* tyrosinase 저해 시험은 다음과 같이 측정하였다[12,13]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 850  $\mu$ L, 시료 50  $\mu$ L, mushroom tyrosinase (1500~2000 U/mL) 50  $\mu$ L를 순서대로 넣고 37  $^{\circ}$ C에서 6 min 반응시킨다. 이 용액에 0.06 mM L-DOPA 50  $\mu$ L를 넣은 다음 37  $^{\circ}$ C에서 1 min 반응시킨 후 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Tyrosinase inhibition ratio는 식 (3)으로부터 계산되었다.

## 2.7. 세포배양

B16-F10 mouse melanoma cell은 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였으며, 100 units/mL penicillin-streptomycin과 10% FBS가 함유된 DMEM (Gibco, USA) 배지에서 37  $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator로 배양하여 실험에 사용하였다.

## 2.8. 세포 독성 측정(CCK-8 assay)

GLE의 농도에 따른 B16-F10 mouse melanoma cell의 생존율을 측정하기 위해 cell viability assay를 실시하였다. 100  $\mu$ L (5,000 cells/well)의 세포 부유액을 96 well plate에 분주 후, CO<sub>2</sub> incubator 안에서 24 h 동안 전 배양(pre-incubation)을 한 후, 농도별로 희석한 시료 10  $\mu$ L를 처리한 후 12 h 동안 배양하였다. 배양 후 각 well에 10  $\mu$ L의 CCK-8 용액(Enzo Life Sciences, New York, USA)을 첨가하였다. 2 h 동안 CO<sub>2</sub> incubator 안에서 반응을 시킨 뒤 Microplate Reader를 사용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.9. 세포 내의 melanin 생성 저해

B16-F10 melanoma cell을 이용한 멜라닌 생합성 저해 효과를 측정하기 위하여 6 well plate에 세포를  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후 GLE를 농도별로 처리하고 1 h 후에 200 nM의  $\alpha$ -MSH를 각 세포에 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 배양된 세포는 PBS로 세척한 뒤 10% DMSO가 포함된 1 N NaOH (Sigma, St. Louis, USA) 용액을 처리하여 60  $^{\circ}$ C 항온수조에서 1 h 동안 반응시킨 후 multi-plate reader (BIOTEK, Vermont, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.10. Elastase 저해 활성 측정

Elastase inhibition assay는 Park 등[14]의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이 측정하였다. 기질 50 mM N-succinyl-(Ala)3-p-nitroanilide 200  $\mu$ L에 추출물 20  $\mu$ L와 2.5 unit elastase 20  $\mu$ L를 첨가하여 25  $^{\circ}$ C에서 15 min 동안 반응시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. Elastase inhibition ratio는 아래의 식으로부터 계산되었다(식 (4)).

$$\text{Elastase inhibition ratio(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100 \quad (4)$$

## 2.11. 통계 분석

본 연구의 모든 실험은 3회 반복하여 실시하였으며, 통계자료의 값은 mean  $\pm$  SD로 표시하였다. 통계적 유의성은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3.1. DPPH radical 소거능

유해 산소와 같은 자유전자기는 강력한 산화제로 화학적 안정성을 위해 타 물질과 결합하려는 성질이 있다. 이러한 자유전자기가 피부 내 세포조직과 무분별한 결합을 함으로써 피부의 노화를 촉진하는데 이러한 피부 노화의 주범인 자유전자기의 활동을 방해하는 것이 항산화제의 역할이다. 또한, 피부색소형성의 주요 원인인 자외선에 의해 발생한 활성산소가 피부색소 형성을 촉진한다는 메커니즘이 밝혀지면서 이들 활성산소를 소거하는 것이 melanin 색소 형성억제에 효과적

Table 1. Superoxide Dismutase (SOD) Like Activity of Graviola Leaf Extracts (GLE)

conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	8	40	200	500	1000
Graviola Leaf Extracts (GLE)	11.14 $\pm$ 1.11	30.11 $\pm$ 0.86	38.49 $\pm$ 1.49	42.48 $\pm$ 0.21	67.47 $\pm$ 0.10

\* Each value is expressed a means  $\pm$  SD. of triplicate determinations.

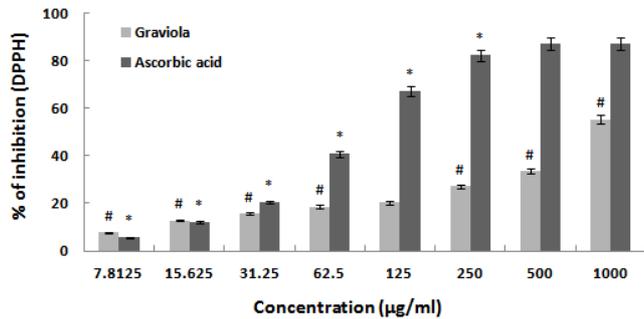


Figure 2. DPPH radical scavenging effect of Graviola Leaf Extracts (GLE). Results are expressed as mean  $\pm$  SD. of data obtained from three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

이라는 연구보고가 있다[15,16]. GLE의 전자공여능을 측정하기 위해 DPPH 라디칼 소거 활성 측정을 수행하였다. GLE의 라디칼 소거능은 농도 의존적으로 증가하였으며, 각각의 농도별 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 7.73, 12.78, 15.82, 20.3, 27.25, 33.7, 55.33%의 라디칼 소거능을 나타내었으며, 대조군인 Ascorbic acid의 1000  $\mu\text{g/mL}$ 의 87.19%보다는 낮았지만 Ascorbic acid의 5.56, 12.15% 보다는 높은 활성도를 나타내었다(Figure 2).

### 3.2. SOD 유사활성 측정

Gupta 등[17]의 연구에 따르면 Superoxide dismutase (SOD)는 생체 내에서 superoxide radical을 산소로 산화시킴으로써 활성산소를 안정한 물질로 전환시켜 신소상해로부터 생체를 보호하는 작용을 나타내는 효소이고 이러한 효소의 작용으로 인해 산화방지는 물론 노화억제와도 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다. 농도에 따른 GLE의 SOD 유사활성능을 측정한 결과, 각 추출물의 모든 농도에서 SOD 유사활성능이 있었으며 농도에 비례하여 높게 나타났다(Table 1). 8  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 11.14%, 40  $\mu\text{g/mL}$ 에서 30.11%, 200  $\mu\text{g/mL}$ 에서 38.49%, 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 42.48%, 그리고 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 67.47%의 순으로 나타났다. 이는 총 페놀 함량 및 항산화 효과에 대한 연구로서 Lim 등[18]의 SOD유사 활성에 관한 원추리 잎의 물, 에탄올 추출물 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 6.05  $\pm$  2.70, 12.98  $\pm$  2.00%인 것에 비해 각각 7, 3배 가량의 높은 SOD 유사활성도를 나타내었고, Choi 등[19]의 매꽃 잎 열수 추출물과 에탄올 추출물의 1000  $\mu\text{g/mL}$ 에서 12.66  $\pm$  1.37%, 18.88  $\pm$  1.26%로 또한 각각 5배, 3배 높은 SOD 유사활성도를 나타내었으며, Park 등[20]의 소리쟁이 잎 에탄올 추출물 및 Ascorbic acid 500  $\mu\text{g/mL}$ 에서 33.23, 52.93%의 활성을 보고하고 있으며 이와 비교하여 GLE는 1.3배 가량의 높은 SOD 활성과 표준물질인 Ascorbic acid와 비교하여 1.2배 정도 낮은 활성을 나타내었다. 이는 Kwon 등[21]과 Lee 등[22]이 발표한 폴리페놀의 함량이 높을수록 SOD 유사활성 또한 높다는 연구 결과와 일치한다. 그러므로 GLE는 SOD를 저해하는데 효과적인 천연 폴리페놀 항산화제를 포함한 화장품 기능성 소재로서 충분한 이용가치가 있다고 여겨진다.

Table 2. Concentration of Total Poly Phenol and Total Flavonoid in Graviola Leaf Extracts (GLE)

	Total poly phenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
Graviola Leaf Extracts (GLE)	117 $\pm$ 0.4	254 $\pm$ 1.3

\* mg/g, base on dry weight. Each value is expressed a means  $\pm$  SD. of triplicate determinations.

Table 3. Comparison of Inhibition Zone of Ampicillin and Graviola Leaf Extracts (GLE) Against *Bacillus subtilis* PM125, MRSA CCARM3089, MRSA CCARM3115 and MRSA CCARM3561

	Ampicillin	Graviola Leaf Extracts (GLE)
<i>Bacillus subtilis</i> PM125	37	20
MRSA CCARM3089	18	-
MRSA CCARM3115	36	30
MRSA CCARM3561	40	26

### 3.3. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 측정

식물은 강한 햇빛으로부터 자신을 보호하기 위해 자외선을 직접 받는 열매의 껍질이나 잎사귀 등에 보호막을 생성해낸다. 이러한 보호막은 강력한 항산화 물질로 이루어져 활성산소로 인한 파괴를 막아내는 역할을 하는데, 폴리페놀 성분이 이에 속한다[23]. Table 2에서와 같이 GLE에 함유된 총 폴리페놀 함량은 건조 시료 g당 gallic acid의 등량값(GAE)으로 나타낼 때 117  $\pm$  0.4 mg GAE/g로 나타났다. 이는 Kim 등[24]의 토마토 잎 추출물의 폴리페놀 함량이 30.6 mg GAE/g, Lim 등[25]의 아사이베리, 블루베리, 산수유, 오디 에탄올 추출물의 폴리페놀 함량이 각각 83.8  $\pm$  2.6 mg GAE/g, 12.1  $\pm$  0.8 mg GAE/g, 37.9  $\pm$  1.0 mg GAE/g, 19.2  $\pm$  3.5 mg GAE/g인 것과 비교하여 적게는 1.4배 많게는 9.7배 GLE의 페놀성 물질 함량이 높은 것으로 분석된다.

또한 플라보노이드는 폴리페놀에 속하는 수용성 식물색소로 역시 노화를 방지하는 항산화작용을 비롯한 여러 생리활성 기능이 있는 것으로 알려져 있다[26,27]. Table 2에서와 같이 GLE에 함유된 총 플라보노이드 함량은 naringin을 표준시료로 하여 등량값(GAE)으로 나타낼 때 254  $\pm$  1.3 mg로 나타났다. 이는 자생식물과 생약자원 추출물의 플라보노이드 함량에 관한 연구로서 Kim 등[28]의 비수리(90.15 mg/g), 비쭉(77.65 mg/g), 가귀리(71.60 mg/g), 각시등글레(65.56 mg/g), 개구리밥(63.27 mg/g) 등과 비교하여 매우 높은 것으로 분석되었다. 본 실험 결과에 따라 GLE의 폴리페놀 항산화 효능을 입증하는 것으로 천연 항산화제 화장품 소재로서 이용 가치가 있을 것으로 판단된다.

### 3.4. 항균 활성

표준물질인 ampicillin (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)과 GLE의 항균 활성을 paper disc법으로 측정하여 clear zone의 크기를 비교한 결과는 Table 3에 나타내었다. 그 결과를 살펴보면 Gram-positive인 *B.*

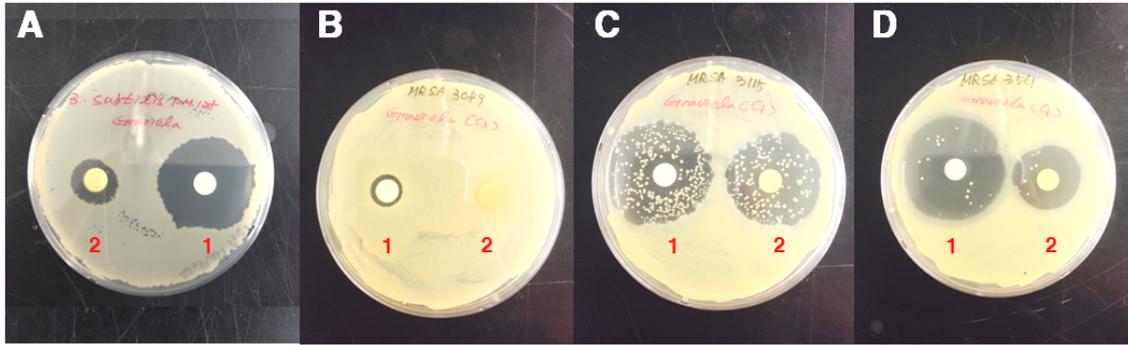


Figure 3. Comparison of inhibition zone of (1) ampicillin and (2) Graviola Leaf Extracts (GLE) against (A) *Bacillus subtilis* PM125 (B) MRSA CCARM3089, (C) MRSA CCARM3115 and (D) MRSA CCARM3561. A 50 µL aliquots of GLE was applied to filter paper and the paper placed on a streaked plate media. Sample concentration was 500 µg/mL.

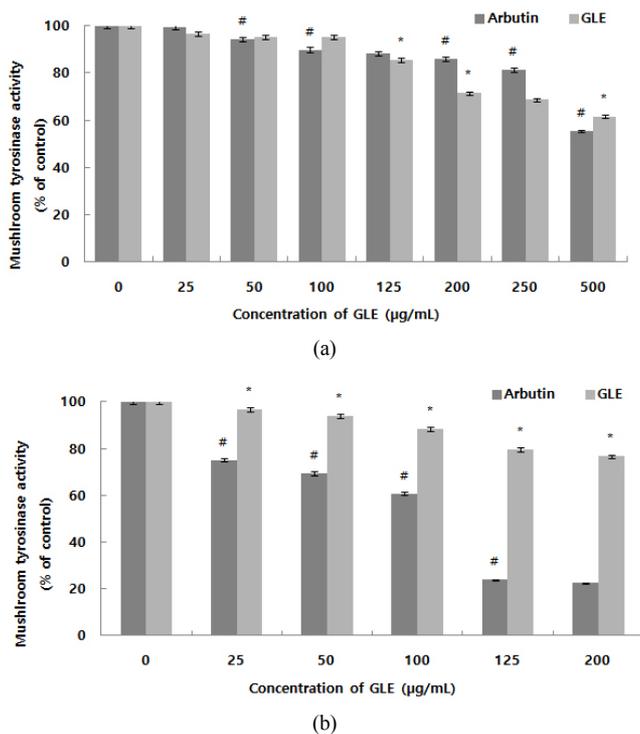


Figure 4. Inhibitory effect of Graviola Leaf Extracts (GLE) against mushroom tyrosinase activity. (a) The activity of mushroom tyrosinase which is involved hydroxylation reaction from L-tyrosine to DOPA was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of GLE. (b) The activity of mushroom tyrosinase which is involved oxylation reaction from DOPA to DOPA quinone was measured by the change in absorption at 490 nm after incubation with various concentration of GLE. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).

*subtilis* PM125에 대하여 항균 활성을 나타내었고 이들은 ampicillin에서 37 mm, GLE에서 20 mm clear zone을 나타내었다. 항생제 내성균 주인 MRSA CCARM3089에 대해서 GLE는 항균 활성을 보이지 않았으며, MRSA CCARM3115, CCARM3561에 대해서는 항균 활성을 나타내었다. 이들은 500 µg/mL의 GLE에서 각각 30, 26 mm의 clear zone을 나타내어 표준물질인 ampicillin과 비교하여 높은 항균 활성을

나타내었다. 따라서 clear zone의 크기는 MRSA CCARM3115 > MRSA CCARM3561 > *B. subtilis* PM125의 순으로 보여주었다(Figure 3).

이러한 결과는 *Annona muricata*의 잎, 줄기 그리고 씨앗 추출물이 수많은 병원균에 대해서 항균 작용을 한다는 연구 결과와 유사하며, 이는 Annonaceae acetogenins 성분에서 기인하는 것으로 알려져 있다 [3,29].

### 3.5. Tyrosinase 저해 활성 측정

GLE에 의한 tyrosinase inhibition 효과를 측정하기 위하여 mushroom tyrosinase에 의한 L-tyrosine의 산화 정도를 측정하였다. Melanin의 생성은 melanocyte로부터 melanosome의 형태로 세포로부터 분비되어 표피를 구성하는 주변의 각질 세포(keratinocyte)로 이동하여 들어가게 된다[30,31]. Melanin 생합성(melanogenesis)은 melanocyte의 특이적으로 발현되는 tyrosinase, TYRP1 (tyrosinase-related protein-1), TRP-2 (tyrosinase-related protein-2, dopachrome tautomerase)에 의해 조절되는 복잡한 생리적 작용을 통해 발생한다[32]. 이 중 tyrosinase는 L-tyrosine을 3,4-dihydroxy-phenylalanine (DOPA)로 바꾸는 hydroxylation 반응과 DOPA를 다시 DOPA quinone으로 바꾸는 oxylation 반응에서 작용한다[33].

실험 결과 L-tyrosine을 DOPA로 바꾸는 데 관여하는 tyrosinase의 활성에 해당하는 결과는 Figure 4(a)와 같다. GLE와 표준물질인 arbutin의 tyrosinase 저해 활성은 농도 의존적으로 활성을 억제하는 경향을 나타내었다. 농도별 tyrosinase 활성 결과는 GLE 100, 125, 200, 250 µg/mL에서 각각  $95.1 \pm 2.1\%$ ,  $85.5 \pm 1.1\%$ ,  $71.5 \pm 2.0\%$ ,  $68.7 \pm 1.4\%$ 의 효소활성을 나타내었다. 특히 GLE 125~250 µg/mL 농도에서의 효소 활성 억제는 대조군인 arbutin보다 더 큰 활성 억제를 나타냄을 확인할 수 있었다.

DOPA를 DOPA quinone으로 바꾸는 oxylation 반응에 관여하는 tyrosinase의 활성에 해당하는 결과는 Figure 4(b)와 같다. 농도별 결과는 GLE 100 µg/mL에서 11.5%, 200 µg/mL에서 23.4%로 나타내었고, 농도 의존적으로 활성을 억제하는 것을 확인하였다. 결과적으로 GLE는 기질로서 L-DOPA가 관여하는 반응보다 L-tyrosine 관여 반응에서 효소 활성 억제 능력을 더 크게 보여주었으며, 이는 melanin 생성에 있어 초기 속도결정 단계를 늦추는 것으로 알려져 있는 L-tyrosine을 DOPA로 바꾸는 반응에서 크게 작용함을 확인할 수 있었다.

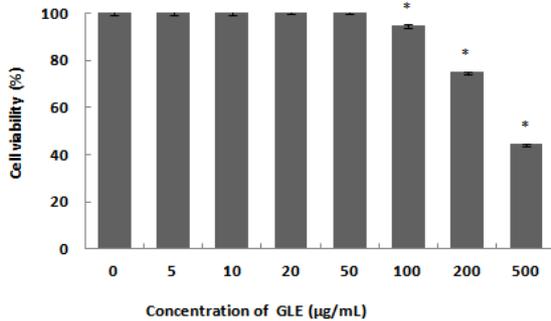


Figure 5. Effect of the Graviola Leaf Extracts (GLE) on cell viability of mouse B16-F10 melanoma cell. After incubation of B16-F10 melanoma cells with various concentration of the GLE in a 96 well plate for 24 h, cell viability was determined by WST assay. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. of data obtained from three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

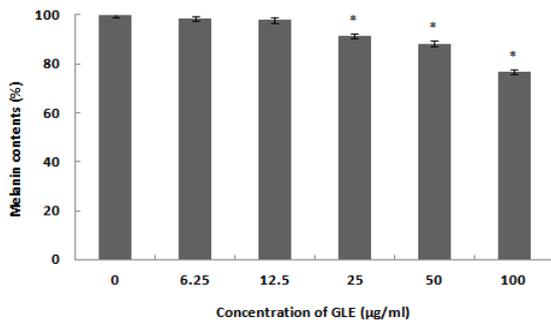


Figure 6. Inhibitory effect of Graviola Leaf Extracts (GLE) on  $\alpha$ -MSH-stimulated melanogenesis of mouse B16-F10 melanoma cells. Melanin content in GLE-treated B16-F10 cells at day 2. Cells were cultured at 37 °C for 48 h in DMEM supplemented with  $\alpha$ -MSH (200 nM) with the extract in a concentration dependent manner. Results are expressed as mean  $\pm$  SD. of data obtained from three independent experiments ( $p < 0.05$ ).

### 3.6. 세포 독성 측정(CCK-8 assay)

GLE의 B16-F10 melanoma cell에서의 세포 생존 능력을 발색측정으로 정량화하기 위해 WST [2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt] 분석을 통한 CCK-8 assay를 시행하였다. WST 분석은 tetrazolium 성분을 배양액에 첨가한 후 발색을 정량화하여 세포의 수, 증식 정도 등을 알 수 있는데, 이는 tetrazolium 성분이 세포 내의 미토콘드리아가 가진 탈수소효소에 의해 특정 색으로 변하게 되어 발색 정도에 따라서 세포 내의 미토콘드리아의 활성도를 알 수 있다[34].

GLE의 농도 변화에 따른 세포의 생존율을 확인한 결과, 100  $\mu$ g/mL의 농도까지는 94.7% 이상의 세포 생존율을 확인하였으나 그 이상의 농도에서 세포 독성을 보임을 확인하였다(Figure 5). 반면 200  $\mu$ g/mL의 농도에서 74.9%, 500  $\mu$ g/mL의 농도에서 44.5%까지 감소하여 세포에 독성을 보이므로, 세포를 이용한 이 후 추가 실험에서는 GLE가 독성을 보이지 않는 100  $\mu$ g/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하는 것이 옳은 것으로 사료된다.

### 3.7. 세포 내의 melanin 생성 저해

Tyrosinase 활성 억제 효과가 있는 GLE가 melanin 생성에 어떠한

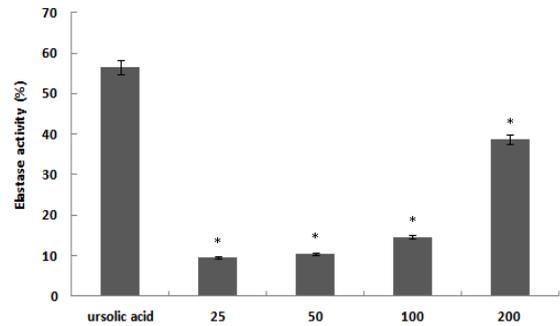


Figure 7. Inhibitory effect of Graviola Leaf Extracts (GLE) against elastase activity. Ursolic acid concentration was 50  $\mu$ g/mL. Results are expressed as percentages of control and data are presented as mean  $\pm$  SD. for independent triplicate experiments ( $p < 0.05$ ).

영향을 미치는가를 알아보기 위해, B16-F10 melanoma cell에 GLE 추출물을 0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도별로 48 h 처리한 후, 세포 내에 생성된 melanin의 함량을 측정하였다(Figure 6). 그 결과 GLE는 농도 의존적으로 melanin 생합성 억제 효과를 나타내었으며, 세포 독성을 보이지 않는 최고 농도 100  $\mu$ g/mL에서 76.7%의 melanin 억제 효과를 확인하였다.

### 3.8. Elastase 저해 활성 측정

피부는 자외선에 의해 노화가 진행되면 melanin 증식이 항시적으로 일어나게 되고 그 결과 기미를 생성한다[35]. 이러한 노화가 진행될수록 피부 구성 물질인 collagen, elastin 등의 구조 단백질을 생성하는 능력이 감소하고, type-1 collagenase의 생합성이 증가하면서 기질 단백질 분해를 유도하여 피부탄력 저하 및 주름생성을 야기한다[36]. GLE의 elastase 저해 효과를 살펴보면 200  $\mu$ g/mL의 농도에서  $38.8 \pm 1.1\%$ , 100  $\mu$ g/mL의 농도에서는  $14.6 \pm 1.36\%$ , 50  $\mu$ g/mL의 농도에서는  $10.5 \pm 1.87\%$  그리고 25  $\mu$ g/mL의 농도에서는  $9.5 \pm 0.99\%$ 의 활성을 나타내었다. 표준 시료인 ursolic acid는 50  $\mu$ g/mL의 농도에서 실험을 진행하였다(Figure 7). GLE와 표준시료인 ursolic acid 경우 같은 농도인 50  $\mu$ g/mL의 농도에서 각각  $10.5 \pm 1.87\%$ ,  $56.5 \pm 0.7\%$  저해 활성을 나타냈으며, 표준시료인 ursolic acid에 비해 비교적 낮은 저해 활성 결과를 나타냈지만, 미백과 함께 주름 개선 효과에 영향을 미치는 좋은 소재임을 확인할 수 있었다.

## 4. 결 론

본 연구에서는 *Annona muricata* 잎 추출물(Graviola Leaf Extracts, GLE)을 이용하여 화장품 소재로서의 가능성을 조사하고자 *in vitro* 상에서 항산화, 항균, 미백 및 주름 개선 효과 등을 실시하였으며, 더 나아가 *in vivo* 상에서 B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율 및 melanin 생합성 억제 효과를 조사하여 살펴보았다. 항산화 능력에 대한 측정은 DPPH 분석 및 SOD 유사활성 측정을 통해 나타냈으며, 그 결과 GLE는 DPPH 저해 활성 및 SOD 유사활성에 있어서 농도 의존적으로 활성이 증가하였으며 또한 총 페놀 및 플라보노이드 함량에서는 각각  $117 \pm 0.4$  mg,  $254 \pm 1.3$  mg로 나타났다. 이러한 결과를 바탕으로 기존의 다른 연구에서 제시된 물질들과의 비교를 통해 천연 항산화제를 포함한 기능성 소재로서 충분한 이용가치가 있음을 확인할 수 있었다.

표준물질인 ampicillin과 GLE의 항균 활성은 paper disc법으로 측정하여 나타냈으며, 이때 사용된 균주는 Gram-positive인 *B. subtilis* PM125, 항생제 내성균주인 MRSA CCARM3089, MRSA CCARM3115 그리고 MRSA CCARM3561과 같다. MRSA CCARM3089에 대해서는 항균 활성을 보이지 않았으며, 나머지에 대해서는 MRSA CCARM3115 > MRSA CCARM3561 > *B. subtilis* PM125의 순으로 활성을 나타내었다. 미백 효과 역시 tyrosinase 저해 활성 측정을 통해 진행하였으며, 그 결과 시료의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 시료의 농도에 따른 L-tyrosine을 DOPA로 바꾸는 데 관여하는 hydroxylation 반응과 관련한 mushroom tyrosinase의 저해 활성은 표준물질인 arbutin에 비해 125~250 µg/mL 농도 범위에서 특히 억제 효과를 높게 나타내었다. 주름 생성과 관련하여서는 elastase 저해 활성 측정을 통해 진행하였으며, 그 결과 동일한 농도에서 GLE 및 표준시료 ursolic acid는 10.5, 56.5%로 나타났다. 더 나아가 *in vivo* 상에서 B16-F10 mouse melanoma cell에 대한 세포 생존율을 조사한 결과, 200 µg/mL의 농도에서 74.9%, 500 µg/mL의 농도에서 44.5%로 세포 독성을 나타냈으며, 세포를 이용한 향후 추가 실험에서는 GLE가 독성을 보이지 않는 100 µg/mL 이하의 농도에서 실험을 진행하는 것이 적절하다고 판단하였다. Melanin 생합성 저해능은 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, 세포 독성을 보이지 않는 최대 농도인 100 µg/mL에서 76.7%의 저해능을 나타내었다. 이러한 실험 결과를 바탕으로 *Annona muricata* 잎 추출물(Graviola Leaf Extracts, GLE)이 항산화 및 미백 활성에 상당한 효과가 있음을 확인할 수 있었으며, 미백 화장품 성분으로서 과색소침착 치료에 유용할 것으로 기대된다.

## 감 사

이 논문은 2015년도 부산광역시의 재원으로 지원을 받아 수행된 Brain Busan 21 (BB21, 과제번호 : 2016-04-002) 사업의 연구비로 수행되었습니다.

## References

1. K. S. Seo, J. S. Park, M. Y. Go, S. W. Hwang, and J. E. Jang, 2015 *Cosmetics Industry Analysis Report*, 6-7, Hanhak Munhak, Seoul, Korea (2016).
2. E. H. Kim, A study of whitening cosmetics from natural products, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **4**, 195-203 (2006).
3. S. S. Yuan, H. L. Chang, H. W. Chen, Y. T. Yeh, Y. H. Kao, K. H. Lin, Y. C. Wu, and J. H. Su, Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway, *Life Sci.*, **72**, 2853-2861 (2003).
4. P. N'Gouemo, B. Koudogbo, H. Tchivounda, C. Nguema, and M. Etoua, Effects of ethanol extract of *Annona muricata* on pentylene-tetrazol-induced convulsive seizures in mice, *Phytother. Res.*, **11**, 243-245 (1997).
5. D. Carbajal, A. Casaco, L. Arruzazabala, R. Gonzalez, and V. Fuentes, Pharmacological screening of plant decoctions commonly used in Cuban folk medicine, *J. Ethnopharmacol.*, **33**, 21-24 (1991).
6. A. Shirwaikar, K. Rajendran, and C. Kumar, *In vitro* antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn leaves, *Indian J. Exp. Biol.*, **42**, 803-807 (2004).
7. S. Marklund and G. Marklund, Involvement of superoxide amino-radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase, *Eur. J. Biochem.*, **47**, 469-474 (1974).
8. V. L. Singleton and J. A. Rossi, Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, **16**, 144-158 (1965).
9. W. B. Davis, Determination of flavonones in citrus fruits, *Anal. Chem.*, **19**, 476-478 (1947).
10. I. H. Kim, D. G. Lee, S. H. Lee, J. M. Ha, B. J. Ha, S. K. Kim, and J. H. Lee, Antibacterial activity of *Ulva lactuca* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **12**, 579-582 (2007).
11. Y. Ishihara, M. Oka, M. Tsunakawa, K. Tomita, M. Hatori, H. Yamamoto, H. Kamei, T. Miyaki, M. Konishi, and T. Oki, Melanostatin, a new melanin synthesis inhibitor. Production, isolation, chemical properties, structure and biological activity, *J. Antibiot.*, **44**, 25-32 (1991).
12. K. H. Kong, S. Y. Park, M. P. Hong, and S. H. Cho, Expression and characterization of human tyrosinase from a bacterial expression system, *Comp. Biochem. Physiol. B*, **125**, 563-569 (2000).
13. S. S. Choi, H. S. Noh, S. H. Cho, and K. H. Kong, Screening of inhibitors against tyrosinase activity from natural products, *J. Pharm. Soc. Korea*, **45**, 522-528 (2001).
14. S. K. Park, S. K. Hong, H. J. Kim, B. Y. Kim, T. K. Kim, J. S. Kang, and D. U. Kim, Cosmetic effect of *Angelica gigas* Nakai root extracts, *Korean Chem. Eng. Res.*, **47**, 553-557 (2009).
15. D. Tobin and A. J. Thody, The superoxide anion may mediate short-but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis, *Exp. Dermatol.*, **3**, 99-105 (1994).
16. E. Bernadette, P. Marianne, and P. Bernhard, Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid (vitamin C) and d- $\alpha$ -tocopherol (vitamin E), *J. Am. Acad. Dermatol.*, **38**, 45-48 (1998).
17. A. S. Gupta, R. P. Webb, A. S. Holaday, and R. D. Allen, Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress, *Plant Physiol.*, **103**, 1067-1073 (1993).
18. J. A. Lim, T. Y. Chung, and E. J. Cho, Total phenol content and antioxidative activity of fractions from *Hemerocallis fulva* leaves, *Cancer Prev. Res.*, **17**, 257-263 (2012).
19. B. D. Choi, H. S. Jeon, Y. S. Lee, E. Y. Joo, and N. W. Kim, Analysis of the contents and physiological activity of *Calystegia japonica* leaf extracts, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **42**, 250-255 (2010).
20. J. A. Park, Antioxidant effects of *Rumex crispus* L. leaf extracts and protective effects on human HaCaT keratinocyte, *J. Korean Soc. Beauty Art*, **12**, 189-198 (2011).
21. T. D. Kwon, S. W. Choi, S. J. Lee, K. W. Chung, and S. C. Lee, Effects of polyphenol or vitamin C ingestion on antioxidative activity during exercise in rats, *Korean J. Physic. Educ.*, **3**, 891-899 (2001).
22. Y. S. Lee, E. Y. Joo, and N. W. Kim, Polyphenol contents and physiological activity of the *Lespeza bicolor* extracts, *Korean J. Food Preserv.*, **13**, 616-622 (2006).
23. The Korean Nutrition Society, *Phytonutrients to Save My Body*, 18-24, Dulnyouk Publisher, Seoul, Korea (2013).
24. H. J. Kim, K. J. Lee, K. H. Ma, Y. H. Cho, S. Y. Lee, D. J. Lee, and J. W. Chung, Effect of tomato leaf extracts on anti-in-

- flammatory and antioxidant activities, *Korean J. Int. Agric.*, **27**, 529-535 (2015).
25. H. J. Lim, H. J. Lee, and M. H. Lim, Antioxidant activity of acai-berry, blueberry, corni, and mulberry, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**, 445-452 (2015).
  26. J. Zhishen, T. Mengcheng, and W. Jianming, The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on super-oxide radicals, *Food Chem.*, **64**, 555-559 (1999).
  27. K. E. Heim, A. R. Tagliaferro, and D. J. Bobilya, Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism, and structure-activity relationships, *J. Nutr. Biochem.*, **13**, 572-584 (2002).
  28. E. J. Kim, J. Y. Choi, M. R. Yu, M. Y. Kim, S. H. Lee, and B. H. Lee, Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of Korean natural and medicinal plants, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**, 337-342 (2012).
  29. K. Sundarao, I. Burrows, M. Kuduk, Y. D. Yi, M. H. Chung, N. J. Suh, and I. M. Chang, Preliminary screening of antibacterial and antitumor activities of Papua New Guinean native medicinal plants, *Int. J. Pharmacogn.*, **31**, 3-6 (1993).
  30. R. A. Spritz and V. J. Hearing, Genetic disorders of pigmentation, *Adv. Hum. Genet.*, **22**, 1-45 (1994).
  31. J. Y. Lin and D. E. Fisher, Melanocyte biology and skin pigmentation, *Nature*, **445**, 843-850 (2007).
  32. G. Prota, Some new aspects of eumelanin chemistry, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **256**, 101-124 (1988).
  33. H. Nakajima, Y. Wakabayashi, K. Wakamatsu, and G. Imokawa, An extract of *Withania somnifera* attenuates endothelin-1-stimulated pigmentation in human epidermal equivalents through the interruption of PKC activity within melanocytes, *Phytother. Res.*, **25**, 1398-1411 (2011).
  34. S. K. Lee, H. K. Hong, S. J. Kim, Y. K. Kim, Y. S. Song, Y. Ha, D. W. Lee, and G. S. Khang, The comparison of sponges and PLGA scaffolds impregnated with DBP on growth behaviors of human intervertebral disc cells, *Polymer(Korea)*, **34**, 398-404 (2010).
  35. K. H. Wang, R. D. Lin, F. L. Hsu, Y. H. Huang, H. C. Chang, C. Y. Huang, and M. H. Lee, Cosmetic applications of selected traditional Chinese herbal medicines, *J. Ethnopharmacol.*, **106**, 353-359 (2006).
  36. P. Brenneisen, H. Sies, and K. Scharffetter-Kochanek, Ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **973**, 31-43 (2002).