

## AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-TIROSINASE E CITOTÓXICO DE EXTRATOS DE *PIMENTA PSEUDOCARYOPHYLLUS* (GOMES) LANDRUM

Rayane O. Mota<sup>1</sup>, Paulo R.H. Moreno<sup>2</sup>, Cynthia Murakami<sup>3</sup>, Maria C.M. Young<sup>3</sup>, Paola C. Branco<sup>4</sup>, Letícia V. Costa-Lotuf<sup>4</sup>, Fabiana L. Silva<sup>1,2\*</sup>

1 – Faculdade de Farmácia, Universidade Paulista (UNIP), Santana de Parnaíba, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

3 – Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt), São Paulo, SP

4 – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

[falimasilva@hotmail.com](mailto:falimasilva@hotmail.com)

**Resumo:** Substâncias fenólicas têm se mostrado como alternativas para o tratamento de transtornos não-malignos de hiperpigmentação. *Pimenta pseudocaryophyllus* é uma espécie nativa da Mata Atlântica que contém diversos compostos fenólicos e é reportada como ativa na redução de estresse oxidativo e inflamação induzida por radiação UV-B. No presente estudo, extratos de *P. pseudocaryophyllus* foram preparados e avaliados para atividades *in vitro*. O percentual de atividade antioxidante (em 100 µg/mL: 81-96%) e anti-tirosinase (em 5 mg/mL: 41-60%) foi próximo para todos os extratos, já a atividade citotóxica mais proeminente foi observada para o extrato clorofórmio (em 50 µg/mL: 94%). Através da análise por CG-EM pode-se identificar eugenol, metileugenol e chavibetol como componentes majoritários deste extrato. Para avaliar a atividade desses compostos sobre a enzima tirosinase foi utilizado modelo *in silico* de docagem molecular com tirosinase de cogumelo. Eugenol mostrou a melhor classificação como inibidor e interações por ligação de hidrogênio e ion-dipolo, favoráveis à atividade inibitória.

**Palavras-chave:** *Pimenta pseudocaryophyllus*, CG-EM, citotoxicidade, inibição da tirosinase, docagem molecular.

### *Evaluation of anti-tyrosinase and cytotoxic potential of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum extracts*

**Abstract:** Phenolic compounds have been shown to be alternatives for the treatment of non-malignant hyperpigmentation disorders. *Pimenta pseudocaryophyllus* is a native species of the Atlantic Forest that contains several phenolic compounds and it is reported to be active in reducing oxidative stress and inflammation induced by UV-B radiation. Extracts from *P. pseudocaryophyllus* were prepared and evaluated for *in vitro* activities. The percentage of antioxidant activity (in 100 µg/mL: 81-96%) and tyrosinase inhibition (in 5 mg/mL: 41-60%) was similar for all extracts, and the most potent cytotoxic activity was observed for the chloroform extract (in 50 µg/mL: 94%). Through GC-MS analysis it is possible to identify eugenol and its derivatives methyl eugenol and chavibetol as major components. To evaluate the activity of these compounds on the tyrosinase enzyme, an *in silico* molecular docking model with mushroom tyrosinase was used. Eugenol showed the best classification as inhibitor and hydrogen bond and ion-dipole interactions, favorable to inhibitory activity.

**Keywords:** *Pimenta pseudocaryophyllus*, GC-MS, antioxidant activity, cytotoxicity, tyrosinase inhibition, molecular docking.

### Introdução

Melanina é o pigmento responsável por proteger a pele de raios ultravioleta, formadores de espécies reativas de oxigênio (EROS), que podem causar câncer de pele. A sua superprodução resulta em hiperpigmentação, manchas ou melasma e o tratamento geralmente está associado ao uso de medicamentos ou cosméticos contendo agentes despigmentantes, que podem atuar por diferentes mecanismos de ação. A enzima tirosinase é uma metaloenzima que ocorre em vários organismos e participa de alguns estágios da melanogênese, por isso é um dos alvos mais investigados no bloqueio

à biossíntese de melanina. Dentre os inibidores de tirosinase utilizados atualmente, um grande número é derivado de fontes naturais, como hidroquinona e ácido kójico, entretanto eles apresentam limitações com relação à alta toxicidade, baixa estabilidade e penetração reduzida na pele. Uma das alternativas a esses agentes são extratos vegetais contendo polifenóis, capazes de modular o metabolismo de pigmentação da pele.<sup>1</sup> *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum (Myrtaceae) é a única espécie do gênero *Pimenta* Lindl. encontrada no Brasil. Ela é uma árvore de pequeno porte típica da Mata Atlântica. Apresenta três quimiotipos, determinados pelo predomínio de classe de metabólitos encontrados no óleo das folhas: citral (predomínio de monoterpenos), (*E*)-cariofileno (predomínio de sesquiterpenos) e (*E*)-metil isoeugenol (predomínio de fenilpropanoides). Extratos da folha de *P. pseudocaryophyllus* desses quimiotipos apresentaram atividades inibidora do estresse oxidativo e da inflamação induzida por radiação UV-B e antinociceptiva, mostrando substâncias fenólicas como principais constituintes.<sup>1</sup> Considerando a riqueza da biodiversidade da Mata Atlântica associada à promoção de ações sustentáveis, esse estudo visa avaliar o potencial antioxidante, inibidor da tirosinase de cogumelo e a citotoxicidade de extratos de *P. pseudocaryophyllus* com o intuito de aplicação em formulações antipigmentantes que possam agregar valor para essa espécie nativa de importância para a região sudeste.

## Experimental

### *Preparo dos extratos orgânicos*

Cerca de 55 g de extrato hidroetanólico de folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (coletada em: Vila Bonsucesso, Guarulhos - 23°23'21"S 46°25'31"W; identificada por: Profa. Dra. Sueli Nicolau, Instituto de Botânica do Estado de São Paulo; depositada em: Herbário IBt sob código OEA 604), obtido de maceração com etanol 96%, foi submetido a partição sólido-líquido com os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol, em ordem crescente de polaridade. A partição foi realizada três vezes com 200 mL de cada solvente e sistema em agitação constante por 15 min. Após filtração, cada extrato foi concentrado até a secura para obtenção do rendimento [extrato clorofórmio (E-1): 5,9%; extrato acetato de etila (E-2) : 5,8%; extrato metanol (E-3): 54.2%].

### *Triagem fitoquímica preliminar*

Triagem fitoquímica qualitativa de E-1, E-2 e E-3 foi realizada por CCD com reativos de visualização para terpenos [sistema de solvente (ss): hexano-acetato de etila, 97:3; revelador: anisaldeído sulfúrico], flavonoides (ss1: acetato de etila-metanol, 90:10; ss2: acetato de etila-ácido fórmico-ácido acético-água, 100:11:11:27; revelador: NP/PEG 1%) e triterpenos e saponinas (ss: clorofórmio-ácido acético-metanol-água, 64:32:12:8; revelador: Liebermann-Burchard).<sup>2</sup> Solução-padrão de cada extrato foi preparada na concentração de 20 mg/mL de metanol. Cinco microlitros de cada solução foram aplicados em cromatoplaça de sílica gel60 F<sub>254</sub> e desenvolvida em solvente adequado.

### *Cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM)*

E-1 foi analisado por CG-EM utilizando equipamento e método previamente reportado por nosso grupo.<sup>3</sup>

### *Ensaio biológicos in vitro*

As triagens antioxidante e citotóxica foram realizadas seguindo metodologias previamente publicadas por nosso grupo.<sup>3</sup> Para a atividade antioxidante, a concentração final no poço avaliada para cada

extrato foi de 100 µg/mL; o controle positivo foi quercetina. A citotoxicidade frente a linhagem celular de melanoma (SK-MEL-147) foi analisada nas concentrações de 50 e 5 µg/mL. O controle positivo foi doxorubicina. A capacidade dos componentes dos extratos em inibir a ação da tirosinase foi determinada através de método em microplaca descrito por Macrini *et al.*<sup>4</sup> As amostras foram dissolvidas em Tween 20®/DMSO (2:8) e em seguida diluídas em tampão PBS (50 mmol/L, pH 6,8) para obter as concentrações finais no poço de 5; 2,5 e 1,25 mg/mL. Ácido kójico foi utilizado como controle positivo.

### Docagem molecular

Para avaliar se eugenol e seus derivados podem se ligar diretamente no sítio ativo da tirosinase, simulação de docagem molecular foi realizada usando o programa GOLD 2020.3.0.<sup>5</sup> A estrutura cristalográfica de raio-X de tropolona em complexo com tirosinase de *Agaricus bisporus* foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB 2Y9X, resolução: 2,78 Å).<sup>5</sup> Para validação do protocolo foi utilizado o método de redocagem do ligante cristalográfico no sítio ativo, considerando bem-sucedida a solução com desvio da raiz média quadrática (RMSD) menor que 2 Å em relação à posse observada na estrutura inicial. O programa Avogadro foi usado para criar as estruturas 3D. As águas moleculares e o ligante co-cristalizado foram removidos e os hidrogênios foram adicionados. Os ligantes foram configurados no programa MarvinSketch,<sup>5</sup> e as estruturas foram criadas em 3D e minimizadas usando Avogadro.<sup>5</sup> O protocolo utilizou receptor rígido-ligante flexível, sítio de ligação com 10 Å de distância da tropolona, função ChemPLP com repontuação ASP e algoritmo genético muito flexível. As interações ligante-receptor foram visualizadas por Discovery Studio Visualizer.<sup>5</sup> Os parâmetros para comparar a capacidade inibitória dos compostos avaliados foram maior pontuação o tipo de interações intermoleculares observadas.

### Resultados e Discussão

O estudo fitoquímico dos extratos de *P. pseudocaryophyllus* revelou que E-1 é predominantemente constituído de terpenos. E-2 apresenta os três tipos de metabólitos investigados, enquanto E-3 tem flavonoides e triterpenos/saponinas como principais metabólitos (Tabela 1).

**Tabela 1-** Triagem fitoquímica de extratos de *P. pseudocaryophyllus*.

| Classes de metabólitos | Extratos de <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> (folha) |     |     |
|------------------------|---|-----|-----|
|                        | E-1   | E-2 | E-3 |
| Terpenos               | +   | +   | -   |
| Flavonoides            | -   | +   | +   |
| Triterpenos/saponinas  | -   | +   | +   |

E-1: extrato clorofórmio; E-2: extrato acetato de etila; E-3: extrato metanol; (+): Presença; (-): Ausência de compostos dessa classe de metabólitos.

E-1 também foi analisado por CG-EM, revelando a presença de 21 compostos, principalmente fenilpropanoides, como eugenol (2,08%), seus derivados chavibetol (10,87%) e metil eugenol (32,69%), além de elemicina (8,09%) (Tabela 2). O composto majoritário foi metil eugenol e este já foi descrito como majoritário para o quimiotipo coletado em Paranapiacaba – SP.<sup>6</sup>

Os resultados de triagem da atividade antioxidante pelo método de DPPH mostraram que E-2 foi o mais ativo, seguido de E-3 e E-1 (Tabela 3). E-2 e E-3 contêm flavonoides, compostos conhecidos

por essa atividade. Eugenol e metil eugenol, presentes em E-1, também são potentes antioxidantes.<sup>6</sup> A capacidade de compostos fenólicos em proteger contra o estresse oxidativo está relacionada à possibilidade de doar elétrons ou hidrogênios para radicais livres, transformando-os em compostos estáveis, e deslocar o elétron desemparelhado dentro de sua estrutura aromática.<sup>6</sup>

**Tabela 2-** Constituintes caracterizados no extrato clorofórmio de *P. pseudocariophyllus* usando CG-EM.

| No. | t <sub>R</sub><br>(min) | Composto             | Área do pico<br>(%) |
|-----|-------------------------|----------------------|---------------------|
| 1   | 5,88                    | eugenol              | 2,08                |
| 2   | 6,02                    | chavibetol           | 10,87               |
| 3   | 6,25                    | metil eugenol        | 32,69               |
| 4   | 7,03                    | (E)-metil isoeugenol | 0,76                |
| 5   | 7,43                    | elemicina            | 8,09                |
| 6   | 8,21                    | (Z)-asarone          | 0,64                |
| 7   | 8,29                    | veratrato de etila   | 1,19                |
| 8   | 8,45                    | β-eudesmol           | 1,24                |
| 9   | 9,66                    | criptomeridiol       | 1,11                |
| 10  | 10,18                   | palmitato de metila  | 4,34                |
| 11  | 10,45                   | ácido palmítico      | 4,30                |
| 12  | 10,65                   | palmitato de etila   | 7,91                |
| 13  | 11,29                   | heptanoato de etila  | 0,57                |
| 14  | 11,42                   | fitol                | 2,18                |
| 15  | 11,74                   | linolato de etila    | 1,16                |
| 16  | 11,77                   | oleato de etila      | 1,94                |
| 17  | 11,93                   | estearato de etila   | 0,79                |
| 18  | 13,05                   | oleamida             | 2,07                |
| 19  | 14,53                   | behenoato de etila   | 1,57                |
| 20  | 16,85                   | α-tocospiro A        | 3,48                |
| 21  | 17,14                   | α-tocospiro B        | 5,30                |

t<sub>R</sub>: tempo de retenção.

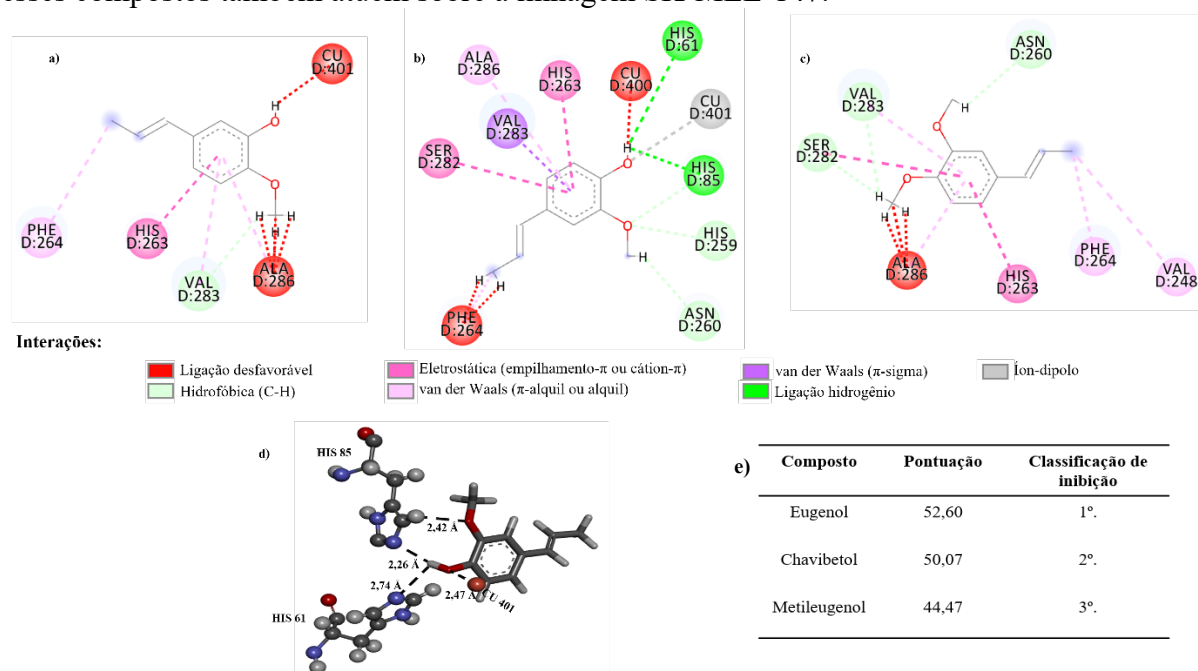
**Tabela 3** – Percentual de atividades antioxidante, anti-tirosinase e citotóxica para extratos de *P. pseudocaryophyllus*.

| Extratos e padrões         | Atividade antioxidante<br>(%, $\bar{X}$ )            |           |           |
|----------------------------|--|-----------|-----------|
|                            | 100 µg/mL  |           |           |
| E-1                        | 81,2   |           |           |
| E-2                        | 95,8   |           |           |
| E-3                        | 95,3   |           |           |
| Quercetina <sup>A</sup>    | 3,8*   |           |           |
|                            | Atividade anti-tirosinase<br>(%, $\bar{X}$ )         |           |           |
|                            | 1,2 mg/mL  | 2,5 mg/mL | 5,0 mg/mL |
| E-1                        | 17,3   | 27,1      | 43,5      |
| E-2                        | 17,3   | 31,3      | 41,1      |
| E-3                        | 1,9  | 4,7       | 59,8      |
| Ácido kójico <sup>B</sup>  | 11,8*  |           |           |
|                            | Atividade citotóxica<br>(SK-MEL-147) (%, $\bar{X}$ ) |           |           |
|                            | 5 µg/mL  | 50 µg/mL  |           |
| E-1                        | 34,8   | 94,2      |           |
| E-2                        | 12,4   | 51,7      |           |
| E-3                        | 6,4  | 24,0      |           |
| Doxorrubicina <sup>C</sup> | 2,7*   |           |           |

<sup>A</sup>Controle positivo para atividade antioxidante; <sup>B</sup>Controle positivo para atividade anti-tirosinase; <sup>C</sup>Controle positivo para atividade citotóxica; SK-MEL 147: linhagem celular de melanona humano; E-1: extrato clorofórmio; E-2: extrato acetato de etila; E-3: extrato metanol; \*Resultados de IC<sub>50</sub>, com valores em µg/mL.

Além disso, as substâncias fenólicas podem atuar na quelação de metais de transição. Como a tirosinase contém cobre, compostos que reduzam esse íon metálico podem ser considerados como inibidores da enzima.<sup>6</sup> Os resultados obtidos apontam E-3 como o extrato mais ativo, na maior concentração testada (5 mg/mL), entretanto, nas concentrações de 2,5 e 1,25 mg/mL, E-1 e E-2 mostraram atividades próximas e maiores que E-3 (Tabela 3). Dentre os compostos majoritários identificados em E-1, apenas eugenol foi estudado em modelo *in vitro* de inibição da tirosinase, apresentando IC<sub>50</sub> de 8,2 µg/mL.<sup>6</sup> Todavia, flavonoides, observados em E-2 e E-3, são conhecidos por essa atividade

A inibição da tirosinase e a ação sobre o estresse oxidativo são vias de interesse no tratamento da hiperpigmentação, pela redução/bloqueio do escurecimento da pele, porém a pigmentação excessiva já existente também precisa ser reduzida. Para isso, compostos devem atuar na degradação dos melanócitos e queratinócitos hiperpigmentados, células produtoras e armazenadoras de melanina, respectivamente.<sup>1</sup> Nesse estudo, células de melanoma foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade dos extratos de *P. pseudocaryophyllus* e a possibilidade de degradação de melanócitos. Pelos resultados, E-1 mostrou a maior citotoxicidade nas duas concentrações avaliadas, seguida de E-2 (Tabela 3). Eugenol e metil eugenol são citotóxicos frente a linhagens de melanoma,<sup>6</sup> sugerindo que esses compostos também atuem sobre a linhagem SK-MEL-147.



**Figura 2** – Modo de ligação predito representado em estrutura 2D para a) Chavibetol, b) Eugenol e c) Metil eugenol no sítio ativo de tirosinase de *Agaricus bisporus* (PDB: 2Y9X); d) Representação em estrutura 3D das ligações hidrogênio e ion-dipolo com eugenol; e) Pontuação de docagem e classificação de inibição para os ligantes testados.

O extrato E-1 apresentou atividades antioxidante, anti-tirosinase e citotóxica. Como eugenol e metileugenol são conhecidos por diferentes atividades, eles e chavibetol (outro composto majoritário e derivado de eugenol) foram selecionados para análise de docagem molecular, para entender suas atividades sobre a enzima tirosinase. O protocolo utilizado foi validado por redocagem, apresentando RMSD de 0,71 Å em relação à estrutura obtida por difração de raios X. O ligante de maior pontuação usando GOLD foi eugenol (Fig. 2e). Todos os ligantes testados apresentaram ligações desfavoráveis (Fig. 2a-c), o que pode afetar a estabilidade da atividade inibitória, já que esse tipo de ligação indica força de repulsão.<sup>7</sup> Entretanto, para eugenol foram identificadas duas ligações hidrogênio envolvendo os N da cadeia lateral de His 61 e His 85 e a hidroxila fenólica do ligante, o que contribui para o aumento do grau de afinidade deste composto para o sítio de ligação (Fig. 2d). O posicionamento da hidroxila fenólica de eugenol na cavidade de ligação também foi responsável por outra interação importante, íon-dipolo com Cu 401, o que pode potencializar a atividade inibitória (Fig. 2d).



## Conclusões

Os extratos de *P. pseudocaryophyllus* mostraram-se ativos nos testes antioxidante, anti-tirosinase e citotóxico *in vitro*. Baseando-se nos compostos caracterizados para o extrato clorofórmio, identificaram-se três compostos possivelmente ativos como inibidores da tirosinase. Os resultados das simulações de docagem identificaram eugenol como o mais promissor. Entretanto, trabalhos futuros devem ser desenvolvidos visando identificar e isolar outros compostos ativos desses extratos, aplicação em formulações antipigmentantes.

## Agradecimentos

Os autores agradecem o apoio financeiro e institucional da Vice-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa da Universidade Paulista (UNIP), Instituto de Química (USP), Instituto de Botânica do Estado de São Paulo (IBt) e Instituto de Ciências Biomédicas (USP).

## Referências

1. Solano, F.; Briganti, S.; Picardo, M.; Ghanem, G.; *Pigment Cell Research* **2006**, *19*, 550; D'Angelis, A.S.R.; Negrelle, R.R.B.; *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2014**, *16*.
2. Wagner, H.; Bladt, S.; *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*, 2<sup>nd</sup> ed.; Springer: Berlin, 2009.
3. Silva, F.L.; Silva, J.L.V.; Silva, J.M.; Marcolin, L.S.A.; Nouailhetas, V.L.A.; Yoshida, M.; Vendramini, P.H.; Eberlin, M.N.; Barbosa-Filho, J.M.; Moreno, P.R.H.; *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **2017**, *27*, 346; Silva, F.L.; Santo, A.E.; Branco, P.C.; Costa-Lotufo, L.V.; Young, C.M.Y.; Murakami, C.; Cordeiro, I.; Nicolau, S.A.; Ishibaru, L.M.; Moreno, P.R.H.; *Global Journal of Medical Research: B* **2019**, *19*.
4. Macrini, D.J.; Suffredini, I.B.; Varella, A.D.; Younes, R.N.; Ohana, M.T.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, *45*, 715.
5. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R.; *Journal of Molecular Biology* **1997**, *267*, 727; Ismaya, W.T.; Rozeboom, H.J.; Weijn, A.; Mes, J.J.; Fusetti, F.; Wichers, H.J.; Dijkstra, B.W.; *Biochemistry* **2011**, *50*, 5477; <https://www.chemaxon.com>, accessed in August 2021; Hanwell, M.D.; Curtis, D.E.; Lonie, D.C.; Vandermeersch, T.; Zurek, E.; Hutchison, G.R.; *Journal of Cheminformatics* **2012**, *4*; Dassault Systemes BIOVIA; *BIOVIA Discovery Studio Visualizer v16.1.0.15350*; Dassault Systemes, San Diego, CA, USA, 2015.
6. Lima, M.E.L.; Cordeiro, I.; Young, M.C.M.; Sobral, M.E.G.; Moreno, P.R.H.; *Pharmacologyonline* **2006**, *3*, 589; Gogoi, R.; Loying, R.; Sarma, N.; Begum, T.; Pandey, S.K.; Lal, M.; *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2020, *21*, 927; Fernandez-Panchon, M.S.; Villano, D.; Troncoso, A.M.; Garcia-Parrilla, M.C.; *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2008**, *48*, 649; Amin, E.; Saboury, A.A.; Mansuri-Torshizi, H.; Moosavi-Movahedi, A.A.; *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2010**, *25*, 272; Khunkitti, W.; Veerapan, P.; Hahnvajanawong, C.; *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **2012**, *4*, 556; Kim, D.; Park, J.; Kim, J.; Han, C.; Yoon, J.; Kim, N.; Seo, J.; Lee, C.; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 935; Arung, E.T.; Matsubara, E.; Kusuma, I.W.; Sukaton, E.; Shimizu, K.; Kondo, R.; *Fitoterapia* **2011**, *82*, 198.
7. Dhorajiwala, T.M.; Halder, S.T.; Samant, L.; *Journal of Applied Biotechnology Reports* **2019**, *6*, 101.