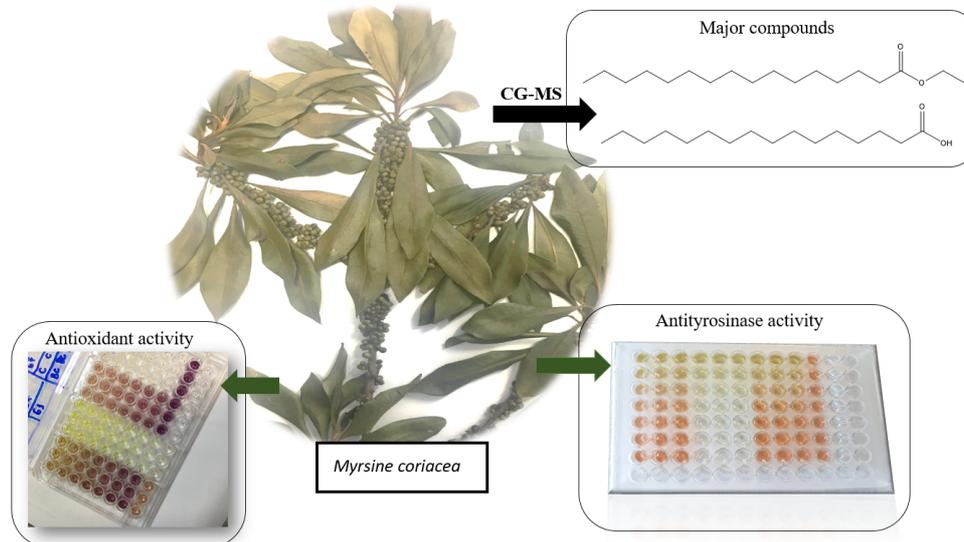


Graphical Abstract



Evaluation of antioxidant and antityrosinase activity of *Myrsine coriacea*

ATIVIDADE ANTITIROSinASE E ANTIOXIDANTE DE *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (PRIMULACEAE)

Emanoella S. de Almeida^{1*}, Paulo Roberto H. Moreno^{2*}

¹ – Programa de Pós-Graduação de Fármaco e Medicamentos - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
emanoellasalmeidai@usp.br

² – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
prmoreno@iq.usp.br

Resumo: *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (Primulaceae) conhecida popularmente como capororoquinha ou capororoca, se destaca das demais por ser a espécie mais encontrada no Brasil, trata-se de uma espécie nativa de fácil adaptação, encontrada nas regiões Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. Anteriormente foi evidenciado quanto à atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, como também a identificação de ácidos mirsinóicos em cascas de seus caules, ramos e folhas, além de seus derivados semi-sintéticos. Vale ressaltar que são escassos de estudos sobre o perfil fitoquímico e as propriedades farmacológicas na literatura da espécie. Atualmente a indústria cosmética tem uma demanda de novos ativos naturais para o tratamento da hiperpigmentação. Assim, este trabalho teve como objetivos avaliar o potencial antityrosinase e antioxidante de extratos e frações de *M. coriacea* e identificar os possíveis compostos responsáveis por essas atividades. As partes aéreas da espécie vegetal foram coletadas em Osasco/SP. Os extratos brutos de folhas, frutos e caules foram preparados por maceração, durante 72 horas, em solução hidro-etanólica 70% seguido de turbólise. O solvente foi eliminado em rota-evaporador à vácuo e a umidade remanescente eliminada em chapa aquecida a 60°C. Os extratos brutos foram particionados por extração sólido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila). A composição química das frações foi determinada por CG-EM. A determinação da capacidade antioxidante foi feita pelo método de sequestro do radical DPPH. A inibição da enzima tirosinase foi determinada pela oxidação de *L*-DOPA para dopacromo. Através da análise por CG-EM foi possível identificar 34 compostos nas frações das diferentes partes de *M. coriacea*. O hexadecanoato de etila e o ácido hexadecanoico foram os compostos majoritários. A atividade antioxidante das amostras variou entre 16,56 e 198,15 µg/mL, a maior atividade foi encontrada no extrato bruto dos frutos com CI₅₀ de 16,56 ± 1,2 µg/mL. A capacidade de inibição da atividade tirosinase variou entre 40,94–10,21% para a concentração de 1 mg/mL de extratos e frações, o extrato bruto dos frutos foi o mais potente na inibição da enzima (40,94%), seguido da fração de acetato de etila do caule (38,83%) e da fração de clorofórmio do caule (34,93%). Das amostras testadas, o extrato bruto dos frutos, fração de acetato de etila e clorofórmio dos caules apresentaram um bom potencial antioxidante e inibidor da tirosinase, essas

amostras serão analisadas criteriosamente nas etapas seguintes desse estudo, com uma análise dos compostos químicos presentes nessas amostras, o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, em seguida será feito um ensaio *in silico* de acoplamento molecular, para direcionar os compostos bioativos que possivelmente serão considerados como candidatos a novos ativos contra a hiperpigmentação da pele.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Inibidores da tirosinase; *Myrsine coriacea*.

ANTITYROSINASE AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (PRIMULACEAE)

Abstract: *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult. (Primulaceae) popularly known as capororoquinha or capororooca, stands out from the others for being the most found species in Brazil, it is a native species of easy adaptation, found in the Northeast, Midwest, Southeast and South regions of Brazil. Previously, it was evidenced regarding its anti-inflammatory, antimicrobial activity, as well as the identification of myrsinoic acids in the bark of its stems, branches and leaves, in addition to its semi-synthetic derivatives. It is noteworthy that there are few studies on the phytochemical profile and pharmacological properties in the literature of the species. Currently, the cosmetic industry has a demand for new natural actives for the treatment of hyperpigmentation. Thus, this work aimed to evaluate the antityrosinase and antioxidant potential of extracts and fractions of *M. coriacea* and identify the possible compounds responsible for these activities. The aerial parts of the plant species were collected in Osasco/SP. The crude extracts of leaves, fruits and stems were prepared by maceration, for 72 hours, in a 70% hydro-ethanolic solution followed by turbolysis. The solvent was eliminated in a vacuum rota-evaporator and the remaining moisture eliminated in a plate heated to 60°C. The crude extracts were partitioned by solid-liquid extraction with increasing polarity solvents (hexane, chloroform and ethyl acetate). The chemical composition of the fractions was determined by GC-MS. The determination of the antioxidant capacity was made by the DPPH radical scavenging method. Inhibition of the tyrosinase enzyme was determined by the oxidation of L-DOPA to dopachrome. Through GC-MS analysis it was possible to identify 34 compounds in the fractions of different parts of *M. coriacea*. Ethyl hexadecanoate and hexadecanoic acid were the major compounds. The antioxidant activity of the samples ranged between 16.56 - 198.15 µg/mL, the highest activity was found in the crude extract of fruits with IC₅₀ of 16.56 ± 1.2 µg/mL. The capacity to inhibit tyrosinase activity varied between 40.94–10.21% for the concentration of 1 mg/mL of extracts and fractions, the crude fruit extract was the most potent in inhibiting the enzyme (40.94%), followed by the stem ethyl acetate fraction (38.83%) and the stem chloroform fraction (34.93%). Of the tested samples, the crude extract of the fruits, ethyl acetate fraction and the chloroform of the stems showed a good antioxidant and tyrosinase inhibitory potential, these samples will be carefully analyzed in the following steps of this study, with an analysis of the chemical compounds present in these samples, the content of phenolic compounds and total flavonoids, then an *in silico* molecular coupling assay will be performed, to target the bioactive compounds that will possibly be considered as candidates for new actives against skin hyperpigmentation.

Keywords: Antioxidant activity; Tyrosinase inhibitors; *Myrsine coriacea*.

Introdução

A riqueza da genética vegetal que o Brasil apresenta é algo fascinante, tornando-o o país com a maior diversidade de plantas do mundo, com alta predominância de espécies endêmicas¹. A respeito disso, fica evidente o quão o país pode aplicar esses dados na busca de novos compostos bioativos, no combate das inúmeras patologias que necessitam de tratamentos seguros, eficazes e com qualidade, para as distintas enfermidades². Neste sentido, vale ressaltar que pouco se sabe sobre as espécies pertencentes a Primulaceae encontradas no Brasil, uma família que representa interesse medicinal, por acumular derivados de benzoquinona³. *Myrsine* L. encontra-se dentro dessa família, conhecidas popularmente como capororoquinha ou capororooca. Conforme os dados da literatura, benzilisoquinonas e triterpenoides são componentes conhecidos neste gênero^{4,5}. Dentre as espécies do gênero, *Myrsine coriacea* (Sw.) R. Br. ex Roem. & Schult.) se destaca das demais por ser a espécie mais encontrada no Brasil⁶, trata-se de uma espécie nativa de fácil adaptação, encontrada nas regiões

Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul do Brasil^{4,5}. Foi avaliada anteriormente, quanto à atividade antiinflamatória^{4,5}, antimicrobiana⁷, como também a identificação de ácidos mirsinóicos em cascas de seus caules⁸, ramos e folhas⁹, além de seus derivados semissintéticos. Vale ressaltar que são escassos de estudos sobre o perfil fitoquímico e as propriedades farmacológicas na literatura. O emprego dos produtos naturais, abrange várias formas de administração farmacêutica, o que desperta o interesse das indústrias de cosméticos nesse ramo. A área de cosméticos apresenta um vasto crescimento exponencial, em paralelo, a busca constante de novos compostos para dar origem a produtos de alta qualidade e benefícios ao paciente. Dentre os produtos de interesse, destacam-se os produtos cosméticos de grau 2, cujas formulações apresentam princípios ativos capazes de proporcionar o tratamento de distúrbios fisiológicos da pele, como o melasma, eczema, acne, sinais de idade, combate dos radicais livres e outros¹⁰. Sendo os distúrbios pigmentares o terceiro transtorno dermatológico mais comum no mundo, além disso, as alternativas de tratamentos existentes tornam o quadro mais preocupante, por não existir alternativas de tratamento medicamentoso para as referidas patologias¹¹.

Tendo em vista a busca de novos fármacos para o tratamento da hiperpigmentação, esse trabalho tem como objetivos avaliar o potencial antitirozinase e antioxidante de extratos e frações de *M. coriacea* e identificar os possíveis compostos responsáveis por essa atividade.

Experimental

Coleta e identificação

A espécie vegetal foi coletada em Osasco estado de São Paulo. Posteriormente foi encaminhada para identificação botânica, pela Dra. Inês Cordeiro, tendo as exsiccatas (MORENO 604) depositadas no Herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo.

Preparo dos extratos brutos e frações

O material foi seco em uma estufa de ar circulante na temperatura de 40°C, depois foi colocado em um moinho de facas, para obter o pó. Posteriormente, o pó foi submetido à extração por maceração durante 72 horas, seguido de turbólise utilizando solução hidro-etanólica 70% como solvente. O solvente foi eliminado em rota- evaporador à vácuo e a umidade remanescente eliminada em chapa aquecida a 60°C. Os extratos brutos foram particionados por extração sólido-líquido com solventes de polaridades crescentes (hexano, clorofórmio e acetato de etila).

Análises por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

A análise da composição química foi realizada em um CG-EM Agilent® (série 6890) acoplado a espectrômetro de massas, com sistema quadrupolo (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector). A coluna capilar utilizada foi DB-5 (30m x 0,25mm de diâmetro interno, 0,25µm), o gás de arraste utilizado foi Hélio, com fluxo contínuo de 1 mL/min; a energia de ionização empregada foi de 70 eV e o volume de injeção de amostra, cuja concentração era de aproximadamente 0,1 mg/mL, foi igual a 2,0µL. A identificação dos compostos foi baseada na comparação dos espectros de massas obtidos e índices de retenção linear calculados por comparação com uma série homóloga de *n*-alcanos dos espectros de massas encontrados em dados da literatura e na biblioteca do equipamento¹².

Determinação da atividade antioxidante

A determinação da atividade antioxidante e de concentração inibitória 50% do oxidante (CI₅₀) com o método colorimétrico em microplaca, utilizando o ácido 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)¹³. A quercetina di-hidratada (98%) foi utilizada como controle positivo. O controle do branco foi o metanol. A leitura das microplacas foi em λ de 520nm.

Determinação da atividade inibitória de tirosinase

A capacidade de inibição da ação catalítica da tirosinase na oxidação de L-DOPA para dopacromo foi determinada através de método enzimático em microplaca¹⁴. O ácido kójico foi utilizado como controle positivo. A leitura da absorbância foi em λ de 475nm.

Resultados e Discussão

Foram analisadas 9 amostras por CG-EM onde foi possível identificar 34 compostos nas frações das diferentes partes de *M. coriacea*. O hexadecanoato de etila (Figura 1a) e o ácido hexadecanóico (Figura 1b) foram os compostos majoritários, tendo o hexadecanoato de etila presente em todas as amostras, sendo a maior quantidade encontrada na fração de hexano dos frutos (53,24%). Adicionalmente, em todas as amostras dos frutos este composto foi um dos majoritários. A maior quantidade do ácido hexadecanóico esteve presente na amostra da fração de clorofórmio do caule (28,51%). Vale ressaltar a presença do composto octadeca-9,12-dienoato de etila na fração de hexano dos frutos com 27,33% da composição desta amostra, diferente do hexadecanoato de etila e o ácido hexadecanóico, o octadeca-9,12-dienoato de etila possui uma cadeia insaturada.

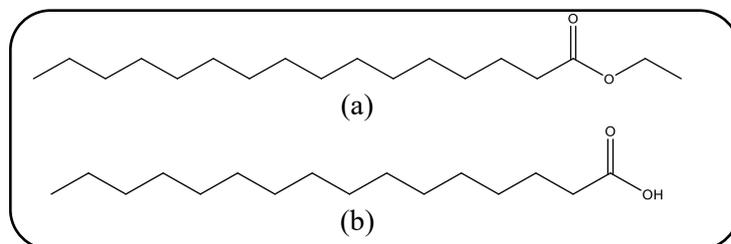


Figura 1 – Compostos majoritários (a) hexadecanoato de etila e (b) ácido hexadecanóico.

A atividade antioxidante dos extratos brutos e frações resultou no total de 12 amostras avaliadas, dessas a melhor atividade antioxidante foi do extrato bruto dos frutos com CI₅₀ de $16,56 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$, seguindo da fração de clorofórmio do caule (CI₅₀ $23,4 \pm 2,8 \mu\text{g/mL}$), sendo que as amostras das frações com hexano tiveram as menores atividades antioxidantes, a menor delas foi a amostra das folhas com CI₅₀ $198,15 \pm 2,5 \mu\text{g/mL}$. Os resultados da atividade antioxidante estão dispostos na Tabela 1.

A capacidade de inibição da atividade tirosinase variou entre 40,94–10,21% (Tabela 2) para a concentração de 1mg/mL de extratos e frações, o extrato bruto dos frutos foi o mais potente na inibição da enzima (40,94%), seguido da fração de acetato de etila do caule (38,83%) e da fração de clorofórmio do caule (34,93%).

Tabela 1– Valores de CI_{50} do sequestro do radical livre DPPH expressos em $\mu\text{g/mL}$.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
	CI_{50} $\mu\text{g/mL}$
EB CAULES	25,57 \pm 1,39
EB FOLHAS	24,30 \pm 0,49
EB FRUTOS	16,56 \pm 1,17
Fr Hexano CAULES	134,87 \pm 6,90
Fr Hexano FOLHAS	198,15 \pm 2,54
Fr Hexano FRUTOS	170,17 \pm 10,53
Fr Clorofórmio CAULES	23,40 \pm 2,76
Fr Clorofórmio FOLHAS	153,00 \pm 9,45
Fr Clorofórmio FRUTOS	48,17 \pm 8,39
Fr Acetato de etila CAULE	36,00 \pm 1,95
Fr Acetato de etila FOLHAS	31,88 \pm 1,11
Fr Acetato de etila FRUTOS	43,34 \pm 0,90
Quercetina	2,98 \pm 0,20

EB – Extrato Bruto; Fr – Fração.

Tabela 2 – Valores da atividade antitirosinase das amostras de *M. coriacea*.

AMOSTRAS	ATIVIDADE ANTITIROSinASE
	(%)
EB CAULES	34,60 \pm 5,56
EB FOLHAS	19,87 \pm 2,45
EB FRUTOS	40,94 \pm 5,12
Fr Hexano CAULES	18,81 \pm 6,78
Fr Hexano FOLHAS	10,21 \pm 2,51
Fr Hexano FRUTOS	18,85 \pm 2,27
Fr Clorofórmio CAULES	34,93 \pm 1,81
Fr Clorofórmio FOLHAS	31,10 \pm 3,85
Fr Clorofórmio FRUTAS	21,72 \pm 8,74
Fr Acetato de etila CAULES	38,83 \pm 4,24
Fr Acetato de etila FOLHAS	27,00 \pm 3,23
Fr Acetato de etila FRUTOS	22,43 \pm 5,79

EB – Extrato Bruto; Fr – Fração.

Conclusões

O extrato bruto dos frutos obteve um bom potencial antioxidante como também foi capaz de inibir da tirosinase *in vitro*, além dessa amostra a fração de acetato de etila e clorofórmio dos caules resultaram em um bom percentual de inibição da enzima, como também as duas amostras apresentaram uma boa atividade antioxidante. Essas três amostras mostraram-se promissoras para as atividades farmacológicas nesta pesquisa, sendo elas, analisadas criteriosamente nas etapas seguintes desse

estudo, serão analisados os compostos químicos presentes nessas amostras, o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais, em seguida será feito um ensaio *in silico* de acoplamento molecular, para direcionar os compostos bioativos que possivelmente possa ser considerados como candidatos a novos ativos contra a hiperpigmentação da pele.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da CAPES.

Referências

1. Maia, L. C. et al.; *Rodriguesia* **2015**, 66(4), 1033-1045.
2. Ramos, M. F. D. S.; Vaucher, A. C.; *Revista Fitos* **2018**, 12(3).
3. Luna, B. N. et al.; *Botany* **2014**, 92(10), 757–766.
4. Dal Mas, J. et al. *Int. J. Nanomed.* **2016**, 11, 4495–4507.
5. Hess, S. et al. *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, 33, 209–215.
6. Freitas, M. F.; Kinoshita, L. S.; *Rodriguesia* **2015**, 66(1), 167–189.
7. Burger, M.C. et al. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2015**, 25, 451-454.
8. Baccarin, T. et al. *Talanta* **2011**, 85, 1221–1224.
9. Zermiane, T. et al. *Arab. J. Chem.* **2016**, 9, 872-881.
10. Hubert, J. et al.; *Planta Medica* **2016**, 82, 1351-1358.
11. Sofer, B. et al.; *Skin Therapy Letter* **2016**, 21(1), 1-7.
12. Assis, C. M. et al.; *Rev. Bras. Farmacogn.* **2009**, 19(2B), 626-631.
13. Brand-Williams, W. et al.; *Lebensm Wiss Technology* **1995**, 28, 25-30.
14. Macrini, D. J. et al.; *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **2009**, 45(2), 715-721.