

ELABORAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA SOBRE A ENZIMA TIROSINASE DA ESPÉCIE VEGETAL *PSYCHOTRIA NUDA* (RUBIACEAE).

Keila Cristine Barbosa Silva Sardinha¹ & Márcia Cristina Campos de Oliveira².

1. Bolsista PIBIT, Discente do Curso de Química, ICE/ UFRRJ; 2. Professora do DEQUIM/ICE/UFRRJ.

Introdução

A enzima tirosinase, também conhecida como fenoloxidase, é amplamente distribuída em plantas, microorganismos e animais (SEO *et al.*, 2003), sendo considerada uma enzima essencial para a biossíntese de melanina, a qual é responsável pelo processo de melanização em animais e plantas (WU *et al.*, 2015). Nos mamíferos, ela está envolvida na transformação da L-tirosina para dopaquinona, que ocorre através de duas etapas: hidroxilação da L-tirosina, para L-3,4-dihidroxifenilalanina (L-DOPA), seguido da oxidação deste último para *orto*-quinona (dopaquinona). A dopaquinona será transformada posteriormente através de várias reações para produzir a melanina (SILVÉRIO; CASTRO; MIRANDA, 2013), pigmento responsável não apenas em definir importantes características fenotípicas humanas, como cor dos olhos, cabelo e pele, mas também na fotoproteção devido à sua capacidade de absorver radiação ultravioleta (VIDEIRA; MOURA; MAGINA, 2013). O objetivo desse trabalho foi analisar a capacidade inibitória do extrato hidroalcoólico de *Psychotria nuda* frente a enzima tirosinase.

Metodologia

A metodologia de pesquisa utilizada para o ensaio enzimático consiste em adicionar uma amostra em diferentes concentrações a uma solução contendo L-DOPA (0,17 mmol L⁻¹), EDTA (0,022 mmol L⁻¹), enzima tirosinase (50-100 unidades) e PBS (50 mmol L⁻¹, pH 8), cujo volume usado completa o volume total necessário para o teste, 1,5 mL. As soluções preparadas e uma amostra em branco, onde o inibidor não é adicionado, são lidas em espectrofotômetro de UV-VIS no comprimento de onda de 475 nm. São feitas duas leituras: uma no T₀, ou seja, no momento da adição da enzima à solução; e uma em T₃₀, 30 minutos após a adição da enzima, que é o tempo necessário para medir a absorção referente da formação de dopaquinona.

As absorvâncias obtidas foram convertidas em porcentagem de inibição (% inib) através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ inib} = \{[(B_{30} - B_0) - (Am_{30} - Am_0)] / (B_{30} - B_0)\} \times 100$$

onde B₀, B₃₀, Am₀, Am₃₀ representam respectivamente: absorvância do branco em T₀, absorvância do branco em T₃₀, absorvância da amostra em T₀ e absorvância da amostra em T₃₀.

O material estudado foi a espécie *Psychotria nuda*, a qual foi coletada na Mata Atlântica sendo separadas folhas e caules que foram triturados em liquidificador caseiro (120g) e submetidos a maceração em sistema de solvente MeOH:H₂O (20%). O extrato macerado foi concentrado em rotavapor, obtendo 10,0 g do extrato bruto seco. Submetemos 5,0 g deste extrato à partição líquido-líquido com MeOH:H₂O e solventes orgânicos. As frações foram concentradas pelo processo de destilação à pressão reduzida obtendo as frações em clorofórmio (16,8 g), acetato (2,5 g) e aquosa (4,3 g).

Resultados e discussão

O extrato hidrometanólico de *Psychotria nuda* foi testado com enzima tirosinase na concentração de 1mg/mL e inibiu 44% da capacidade oxidante da enzima. As frações clorofórmio, acetato de etila e aquosa, obtidas após a partição líquido-líquido, também foram testadas sobre a enzima tirosinase. Os resultados estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1: % inibição das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato hidrometanólico de *Psychotria nuda*.

Fração (concentração)	% inibição
Clorofórmio (1mg/mL)	17
Acetato (2mg/mL)	40
Aquosa (2mg/mL)	80

Como a fração aquosa apresentou maior porcentagem de inibição, foi fracionada em coluna cromatográfica de fase normal, obtendo treze frações. Todas foram secas e pesadas e as que forneceram maior quantidade em massa, passaram por um “screen” no teste frente a enzima tirosinase. As amostras testadas foram: 2 AcOEt:EtOH 60% (PNFAq 6); 3 e 5 AcOEt:EtOH 60% (PNFAq 7); 4 AcOEt:EtOH 60% (PNFAq 8); 6 AcOEt:EtOH 60% (PNFAq 9); 7-11 AcOEt:EtOH 60% e 1-8 AcOEt:EtOH 70% (PNFAq 10) e 9-10 AcOEt:EtOH 70% (PNFAq 11).

A amostra que apresentou melhor desempenho inibitório foi a PNFAq 9, que inibiu 70% na concentração máxima de 1 mg/mL e sua porcentagem de inibição na menor concentração testada (0,16mg/mL) foi de 48%. Esta fração deve ser melhor estudada pois deve conter metabolomas responsáveis por sua capacidade inibitória sobre a enzima tirosinase.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, a espécie vegetal *Psychotria nuda* se mostrou promissora para estudos de atividade antioxidante, sendo necessário outros estudos para identificar possíveis utilizações da mesma.

Referências Bibliográficas

SEO, S. Y.; SHARMA, V. K., SHARMA, N., Mushroom Tyrosinase: recent prospects. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003.

SILVÉRIO, M. D. O., CASTRO, C. F. S., MIRANDA, A. R., Avaliação da atividade antioxidante e inibitória da tirosinase das folhas de *Dipteryx alata* Vogel (Baru). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. n.1, v.15, p.59-65, 2013.

VIDEIA, I. F. S.; MOURA, D. F. L.; MAGINA, S. Mechanisms regulating melanogenesis. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2013.

WU, Y., WU, Z.-R., CHEN, P., YANG-LI, DENG, W.-R., WANG, Y.-Q., LI, H.-Y., Effect of the tyrosinase inhibitor (S)-N-trans-feruloyloctopamine from garlic skin on tyrosinase gene expression and melanine accumulation in melanoma cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015.