

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase do extrato etanólico das folhas e galhos da *Schinus molle* L.

Lucas Martins Medeiros

Monografia apresentada à Coordenação de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Junho - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase do extrato etanólico das folhas e galhos da *Schinus molle* L.

Lucas Martins Medeiros

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Monografia apresentada à Coordenação de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia – MG

Junho - 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase do extrato etanólico das folhas e galhos da *Schinus molle* L.

Lucas Martins Medeiros

Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola

Instituto de Biotecnologia (IBTEC)

Homologado pela coordenação do curso de
biotecnologia em __/__/__

Nilson Nicolau

Uberlândia – MG

Junho – 2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

CURSO BIOTECNOLOGIA

Análise fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante e de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase do extrato etanólico das folhas e galhos da *Schinus molle* L.

Lucas Martins Medeiros

Aprovado pela banca examinadora em: __/__/__ Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora:

Uberlândia – MG

Junho – 2023

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, que através de seu espírito de amor, soprou no silêncio de meu peito as direções que eu devia tomar para realização de mim mesmo, enquanto tua obra no mundo. Esse trabalho é um importante passo para que, utilizando das ferramentas da ciência, eu possa dar minha pequena contribuição à obra de todos que suaram e sangraram para trazer esperança e dignidade à vida na terra.

Gostaria de agradecer a minha mãe, por sempre ter enxergado meu potencial, me incentivando a ir atrás de meus sonhos. Gostaria de agradecer meu pai por ser meu referencial de retidão e força. Sem o amor e o acolhimento dos dois, eu nunca conseguiria chegar onde estou. A luz de suas virtudes são meu tesouro.

Gostaria de agradecer meus amigos, Paulo Vicktor, Waleska, Daniel, Henrique, Pedro, Augustine e Jorge, por me trazerem a leveza e alegria de se estar vivo, mesmo nos dias mais difíceis.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, por sua gentileza na forma que me acolheu e me ensinou desde o primeiro dia que o procurei. Gostaria de agradecer por toda equipe do LABIBI, que com paciência e boa intenção, me ensinaram e tiraram todas minhas dúvidas. Cada um teve sua contribuição única para elaboração desse trabalho. Gostaria de agradecer em especial meu colega Vinicius Bittar, que através de suas ações, muito me ensinou sobre companheirismo e trabalho em equipe.

Resumo

Aroeira salsa (*Schinus molle* L) é uma planta nativa da América do Sul da família Anacardiaceae, com ampla dispersão e diversas aplicações. A planta possui propriedades medicinais, como antiespasmódicas, antirreumáticas, emenagogas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, sendo alvo de nosso estudo para análise fitoquímica, potencial antioxidante e avaliação de suas propriedades de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase. No presente estudo foi realizado a coleta das folhas e galhos da *S.molle* L no município de Uberlândia, Minas Gerais, para obtenção do extrato etanólico (EE) e a quantificação do teor total de fênois, flavonoides e taninos condensados foi realizada. Para avaliar o potencial antioxidante utilizou-se os métodos DPPH e FRAP. Também foi realizado ensaios de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase, que são relacionadas ao diabetes mellitus e ao melasma, respectivamente. De maneira geral, o EE dos galhos demonstrou grande potencial antioxidante ($34,01 \pm 0,02 \mu\text{mol trolox eq/g}$), com baixo valor de EC_{50} ($3,58 \pm 1,37 \mu\text{g/mL}$) e com alta atividade inibitória das enzimas α -amilase ($EC_{50} = 1,67 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$) e tirosinase ($73,02 \pm 0,37\%$), enquanto o EE das folhas não apresentou potencial satisfatório em nenhum dos testes. Estas atividades provavelmente estão associadas ao maior conteúdo dos compostos fenólicos no extrato dos galhos e serão alvos de estudos futuro para melhor elucidar estas aplicações terapêuticas.

Palavras Chaves.: *Schinus molle*, antioxidante, compostos fenólicos, inibição da enzima α -amilase, inibição da enzima tirosinase, diabetes mellitus, melasma.

SÚMARIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Uso de plantas medicinais.....	01
1.2. <i>Schinus molle</i> e seu potencial medicinal.....	01
1.3. Espécies reativas e sistema antioxidante.....	03
1.4. Composição fitoquímica e atividade antioxidante.....	05
1.5. Diabetes mellitus, o controle da hiperglicemia pós-prandial e do estresse oxidativo.....	06
1.6. Enzima α -amilase.....	08
1.7. Melasma, inibição da enzima tirosinase e o estresse oxidativo.....	10
2. OBJETIVO	12
2.1. Objetivo geral.....	12
2.2. Objetivos específicos.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1. Coleta e identificação amostras.....	12
3.2. Preparação das amostras.....	13
3.3. Maceração.....	13
3.4. Separação Extrato Etanólico.....	14
3.5. Prospecção Fitoquímica.....	14
3.5.1. <i>Determinação de Fenóis Totais</i>	14
3.5.2. <i>Determinação de Taninos Condensados</i>	15
3.5.3. <i>Determinação de Flavonoides</i>	15
3.6. Testes Antioxidantes.....	15
3.6.1. <i>Ensaio de eliminação de radicais livres de 2,2 –difetil-1-picril-hidrazila (DPPH)</i>	16
3.6.2. <i>Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)</i>	17
3.7. Teste de inibição da enzima α -amilase.....	18
3.8. Teste de Inibição da tirosinase.....	19

3.9.	Análises estatísticas.....	19
4.	RESULTADOS.....	20
4.1.	Rendimento da produção dos EE.....	20
4.2.	Prospecção Fitoquímica.....	20
4.3.	DPPH.....	21
4.4.	FRAP.....	22
4.5.	Inibição da enzima α -amilase.....	23
4.6.	Inibição da enzima tirosinase.....	24
5.	DISCUSSÃO.....	24
6.	CONCLUSÃO.....	28
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	29

1. INTRODUÇÃO

1.1. Uso de Plantas Medicinais

O uso de plantas, com fins profiláticos ou terapêuticos, está presente desde os tempos antigos na civilização humana, servindo como importante fonte de compostos bioativos (ANDRADE et al., 2007). Nos primórdios, seu uso era instintivo, através de experiências empíricas. Com o passar do tempo as razões para o uso específico de certas plantas medicinais para determinada doença, tornou-se fundamentada em fatos explicativos (PETROVSKA, 2012).

Até os dias de hoje, as plantas medicinais têm sido utilizadas por uma parcela considerável da população brasileira, bem como por mais de 2/3 da população mundial com a finalidade terapêutica. No entanto, é evidente, que os usos populares e mesmo tradicionais não são suficientes para validar a eficácia e segurança do uso medicinal das plantas (ARGENTA, 2011).

Dessa forma, as pesquisas científicas com as plantas medicinais, por sua vez, suprem essa necessidade, tendo como base a identificação e comprovação da espécie botânica; composição química; obtenção, identificação, análise de princípios ativos; ação farmacológica e toxicidade (DEVIENNE; RADDI; POZETTI, 2004).

Hoje em dia há um interesse renovado nas plantas medicinais, por apresentarem menores efeitos nocivos na saúde humana a longo prazo e a natureza. Quando comparados às drogas sintética, suas vantagens são sua acessibilidade econômica, sua fácil disponibilidade e um menor ou nenhum efeito colateral (CHANDA, 2014).,

1.2. *Schinus molle* e seu potencial medicinal

A *Schinus molle* (S.M), popularmente conhecida como aroeira salsa é uma espécie nativa da América do Sul, pertencente a família Anacardiaceae. Devido sua grande dispersão, apresenta diversas aplicações, como: a extração de taninos a partir da madeira, paisagismo, ou uso medicinal, apresentando propriedades antiespasmódica, antirreumática, emenagoga, anti-inflamatória e cicatrizante (SANTOS, 2008).

A espécie ocorre naturalmente no norte e nordeste da Argentina, Bolívia, Chile, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru e no Uruguai. Essa espécie foi introduzida e naturalizada no Egito, México, América Central e no sul dos Estados Unidos. No Brasil ela ocorre nos Estados de Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. (CARVALHO, 2014).

A aroeira salsa tem um amplo uso na medicina popular: das folhas se prepara um extrato para preparações farmacêuticas com ação antibacteriana (CARVALHO, 2014). O decoto das folhas serve para dissolver a secreção purulenta dos olhos (HOLDRIDGE et al., 1975). A infusão das folhas, normalmente misturada com folhas de eucalipto, é usada em inalações para aliviar afecções brônquias. A casca é usada internamente como adstringente, tônica, emenagoga, diurética e antidiarréica (LOPES, 1986), e externamente como anti-séptica, cicatrizante e antiinflamatória (SIMÕES et al., 1998). O extrato preparado dos frutos causa direta dilatação dos vasos sanguíneos e depressão do miocárdio, causando queda da pressão arterial (FLEIG, 1979). As folhas e flores são utilizadas em cataplasmas quentes contra dores musculares e o reumatismo (MOLLE, 1990).

As pesquisas sobre suas propriedades antioxidantes são recentes e pouco numerosas. Estudos de Herrera-Calderon (2022), demonstraram que os óleos essenciais

das folhas não apresentaram uma boa atividade antioxidante. Porém um estudo realizado por Garzoli (2019), foi identificado no extrato de etér de petróleo das folhas, a presença de terpenos, como β -tujeno, que tem sido identificado na literatura por seu poder antioxidante. Testes realizados por Salazar-Aranda (2011), detectaram uma boa atividade antioxidante do extrato metanólico bruto das cascas, enquanto que o extrato metanólico bruto das flores apresentaram uma baixa atividade.

A partir de uma prospecção fitoquímica dos frutos e cascas de S.M foi possível identificar a presença de vários flavonoides como quercetina-3-O-glucuronídeo e catequina, assim como a presença de taninos hidrolisáveis (BVENURA, 2022). Em muitas frutas, esses grupos de compostos são capazes de capturar radicais livres causadores de estresse oxidativo, reduzindo a probabilidade de aparecimento de doenças crônicas (ZAPATA, 2013). O único estudo disponível na literatura que avaliou o potencial antioxidante presente especificamente nos galhos de S.M foi o de Salem (2016), que apontaram resultados promissores.

Dessa forma, se faz necessário mais estudos sobre o potencial antioxidante da S.M, elucidando quais partes específicas apresentam essa atividade, qual método de extração podemos obtê-la, abrindo um leque de possibilidade para tratamento de doenças cujo estresse oxidativo tenha um papel central.

1.3. Espécies reativas e sistema antioxidante

O termo radical livre refere-se ao átomo ou molécula altamente reativo, que contém número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica. É este não-emparelhamento de elétrons da última camada que confere alta reatividade a esses átomos ou moléculas, que podem inativar enzimas e provocar danos à membranas celulares, provocando uma série de processos inflamatórios no organismo (FERREIRA, 1997).

A fosforilação oxidativa é a etapa final do metabolismo em organismos aeróbios, onde a energia gerada pela oxidação de moléculas como carboidratos, gorduras e lipídeos vão promover a síntese de adenosina trifosfato (ATP). Essa etapa pode promover a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), os chamados radicais livres. Diversas etapas da fosforilação oxidativa na mitocôndria tem a capacidade de reduzir a molécula de oxigênio e produzir radicais livres altamente reativos (NELSON e COX, 2013).

ERO é um termo coletivo que inclui tanto os radicais de oxigênio, como os radicais superóxido ($O_2\cdot^-$), hidroxila ($OH\cdot$), peroxila ($RO_2\cdot$) e hidroperoxila ($HO_2\cdot$), quanto certos agentes oxidantes não radicais como: peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e ozônio (O_3), que podem ser facilmente convertidos em radicais. (BAYR, 2005). Níveis excessivos de ERO no organismo geram modificações de estruturas e funções proteicas e lipídicas à nível celular, levando a disfunções no metabolismo energético, no sistema de sinalização celular, no controle do ciclo celular, nos mecanismos de transporte celular e uma atividade biológica disfuncional de maneira geral, levando a ativação imune e processos inflamatórios (NEWSHOLME, 2016).

Cerca de 95% dos átomos de oxigênio advindos da respiração são neutralizados pela cadeia respiratória celular, terminando seu ciclo em água. Porém, os 5% restantes são transformados em radicais livres, cujo excesso é prejudicial ao organismo. A oxidação acontece quando um átomo está a procura de um elétron para preencher a perda anterior (OLIVEIRA et al., 2016).

Além das mitocôndrias, várias enzimas, incluindo a fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo fosfato oxidase (NOX), xantina oxidase, óxido nítrico sintase e constituintes peroxissomais geram ERO. As espécies reativas também são geradas no

retículo endoplasmático durante o processo de dobramento de proteína e formação de ligação dissulfeto (WINTERBOURN, 2008).

ERO são produzidas durante o funcionamento normal do metabolismo, sendo envolvidas em reações enzimáticas, transporte de elétrons mitocondriais, sinalização de transdução, ativação de fatores de transcrição celular, expressão gênica e ação antimicrobiana dos neutrófilos e macrófagos (BAYR, 2005).

Organismos aeróbicos possuem sistemas antioxidantes integrados que incluem processos enzimáticos e não enzimáticos, que geralmente são eficazes no bloqueio dos efeitos nocivos de ERO. As principais enzimas antioxidantes são as superóxido desmutases (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GSH-Px). Além delas tem-se a oxigenase-1 e proteínas redox como as tioredoxinas, peroxiredoxinas e as glutaredoxinas. No sistema antioxidante não enzimático, tem-se: vitamina C e E, glutathione, polifenóis e carotenoides (BIRDEN, 2012). Nosso sistema de defesa antioxidante endógeno é incompleto sem a presença de compostos redutores de origem exógena (BOUAYED, 2010). Quando há um desequilíbrio nesse sistema, no qual há uma maior produção de oxidantes e uma sobrecarga no sistema antioxidante, tem-se uma condição chamada estresse oxidativo, que contribui para muitas condições patológicas, como o câncer, distúrbios neurológicos, aterosclerose, hipertensão, isquemia, diabetes, síndrome do desconforto respiratório agudo, fibrose pulmonar idiopática, doença pulmonar obstrutiva crônica e a asma (BIRDEN, 2012).

1.4. Composição fitoquímica e atividade antioxidante

É bem estabelecido na literatura o poder antioxidante presente em frutas, vegetais, grãos e plantas medicinais, agindo na prevenção de doenças crônicas. Esse papel protetor

é conferido principalmente aos fitoquímicos neles presentes, que são compostos bioativos não nutritivos (ZHANG, 2015).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes na dieta humana e sua atividade de eliminação de radicais livres está relacionada com a substituição do grupo hidroxila nos anéis aromáticos fenólicos. Eles podem ser classificados em 5 classes: flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos e cumarinas. Vários estudos demonstram uma relação direta entre o teor fenólico total e o poder antioxidante de um alimento ou planta. (ZHANG, 2015). Dessa forma, a quantificação desses compostos é uma etapa importante para se traçar um perfil antioxidante de uma determinada planta medicinal.

Diversos estudos de nosso laboratório têm demonstrado esse potencial com espécies da biodiversidade brasileira ou adaptadas ao nosso bioma Cerrado. Entre estes destacam-se os estudos com plantas medicinais com indicação etnofarmacológica para tratamento do diabetes (FRANCO et al. 2018) e com frutos do bioma Cerrado (JUSTINO et al. 2019).

1.5. Diabetes mellitus, o controle da hiperglicemia pós-prandial e do estresse oxidativo

O diabetes mellitus (DM) é uma doença metabólica crônica caracterizada pela falta relativa ou absoluta de insulina, resultando em hiperglicemia. Uma variedade de complicações surge da hiperglicemia crônica, como neuropatia, nefropatia, retinopatia e aumento do risco de doenças cardiovasculares (AL-AWAR, 2016).

Os dois tipos mais comuns de DM são do tipo 1 e do tipo 2. Geralmente, o tipo 1 é associada a um fator autoimune direto ou indireto que causa a destruição das células β do pâncreas, produtoras de insulina. Ocorre geralmente em crianças e jovens adultos (AL-AWAR, 2016). O DM do tipo 2 é responsável por 90% de todos os casos de diabetes, sendo mais comumente visto em pessoas acima de 45 anos, porém está cada vez mais

recorrente em crianças, adolescentes e jovens adultos, devido ao aumento dos níveis de obesidade, sedentarismo e dietas com alta densidade energética (GOYAL, 2018). O DM tipo 2 é caracterizado por uma deficiência relativa na produção de insulina, resistência à insulina envolvendo miócitos e adipócitos e resistência hepática à insulina (BEDEKAR et al., 2010).

É crescente a prevalência global de DM, resultado do envelhecimento da população, da urbanização e mudança de estilo de vida associada. O número de pessoas com diabetes mellitus em todo mundo mais que dobrou nas últimas três décadas. Em 2010, cerca de 285 milhões de pessoas em todo mundo tinham DM. A projeção é que até 2030 o número de diabéticos aumentará para 439 milhões, o que representa 7,7% da população adulta total do mundo com idade entre 20 e 79 anos. (CHEN et al., 2012).

A patogênese de DM e seu tratamento via oral pela administração de agentes hipoglicemiantes têm despertado grande interesse nos últimos anos. O controle da hiperglicemia pode ser alcançado por diferentes mecanismos: pelo aumento na secreção de insulina; pela diminuição na ingestão de nutrientes; pelo aumento periférico na captação de glicose ou pela diminuição na produção hepática de glicose. Além dos fármacos já disponíveis no mercado, vários extratos de plantas estão sendo usados como opção terapêutica ao DM, por apresentarem atividade hipoglicemiante, antiobesidade e propriedades antioxidantes (BEDEKAR et al., 2010).

Estudos de nosso laboratório utilizando modelo de Diabetes induzido por estreptozotocina revelaram um potencial insulina mimético do extrato aquoso da *Vochysia rufa* (GOUVEIA et al. 2017) e de reduzir o estresse oxidativo no fígado de ratos diabéticos tratados com a fração rica em polifenóis da casca do fruto da *Annona crassiflora* (JUSTINO et al. 2017).

Embora tenha sido demonstrado que a produção de espécies reativas é aumentada em células expostas a altas concentrações de glicose em vários tecidos cardiovasculares originários de estados diabéticos e resistentes a insulina, ainda é relativamente desconhecido o quão significativo é o papel que o estresse oxidativo desempenha na patogênese da diabetes (SCOTT et al., 2004). No que diz respeito a progressão do DM tipo 2, é bem elucidado o papel central do estresse oxidativo em disfunções à nível celular, como as ilhotas pancreáticas, músculos, tecido adiposo e fígado (NEWSHOLME, 2016).

A duração e a gravidade da hiperglicemia são os principais fatores causadores de danos aos órgãos. A incidência média de nefropatia diabética é alta (3% ao ano) durante os primeiros 10 a 20 anos após o início do DM. Normalmente levam 15 anos para pequenos vasos sanguíneos em órgãos como rins, olhos e nervos serem afetados. Estima-se que 20 a 40% dos pacientes diabéticos desenvolverão nefropatia diabética. (SULAIMAN, 2019). Várias evidências demonstram que a superprodução de ERO como fator em comum que liga as vias metabólicas alteradas nos rins com a hemodinâmica renal interrompida, associada a nefropatia diabética. Essas vias acabam levando a inflamação, fibrose e disfunção endotelial. (JHA, 2016).

1.6. Enzima α -amilase

A enzima α -amilase é o principal produto de secreção das glândulas salivares e do pâncreas. É uma proteína monomérica cálcio dependente, responsável pela catálise da hidrólise inicial de amido em oligossacarídeos mais curtos através da clivagem de ligações α -D-(1-4) glicosídicas do amido, amilopectina, amilose, glicogênio e numerosas maltodextrinas (JUSTINO, 2016; AGAWAL et al, 2016).

As moléculas grandes, como o amido, não conseguem atravessar a barreira hematoencefálica. Para que a glicose possa chegar ao cérebro, a α -amilase cliva as grandes moléculas de amido em fragmentos menores de açúcares, aumentando o nível de açúcar no sangue, fazendo com que a insulina entre em ação, ordenando que as células metabolizem o excesso de açúcar e armazenem como fonte de energia. Esse ciclo está acontecendo incessantemente em uma pessoa saudável. Em pessoas diabéticas ou que esta enzima esteja ativada em excesso, o aumento de glicose no sangue resultará em hiperglicemia (AGAWAL et al, 2016).

Uma abordagem terapêutica para o tratamento do DM tipo 2 é diminuir os níveis de glicose pós-prandial. Enzimas como a α -amilase, presentes no intestino delgado, são responsáveis pela quebra de oligossacarídeos e dissacarídeos em monossacarídeos adequados para absorção. Com a inibição dessas enzimas, há o retardamento na digestão de carboidratos, causando uma redução na taxa de absorção de glicose, atenuando a glicemia pós-prandial. Logo, inibidores de α -amilase demonstram ser uma estratégia promissora para o tratamento de diabetes e suas complicações (SALES et al, 2012; RIOS et al, 2015).

Estudos do nosso laboratório com enfoque na inibição das enzimas hidrolases digestivas de carboidratos, α -amilase e α -glicosidase, revelaram o rico potencial de algumas plantas estudadas para serem exploradas com esse objetivo. Desataca-se entre estas, o extrato de *Kielmeyera coriacea* Mart (JUSTINO et al., 2021) na inibição da α -amilase e o extrato da *Eugenia dysenterica* na inibição da α -glicosidase, a enzima que completa a digestão de carboidratos (JUSTINO et al., 2022).

A maioria dos inibidores de α -amilase disponíveis no mercado são de origem microbiana. Por retardar a quebra de amidos, o uso dessas drogas pode gerar a

fermentação de açúcares não absorvidos no intestino, causando efeitos colaterais como diarreia e flatulência. Inibidores de menor peso molecular tem gerado grande interesse, por apresentarem melhor absorção do intestino para a corrente sanguínea (ALAGESAN, 2012).

Fibras dietéticas, flavonoides, alcaloides, saponinas, aminoácidos e peptídeos isolados de plantas medicinais têm sido relatados por apresentarem atividade hipoglicemiante, por estimular a liberação de insulina pelas células β -pancreáticas, inibir a absorção de glicose no intestino ou melhorar o aproveitamento de glicose pelo organismo. No entanto o foco das pesquisas tem sido nas flavonas e triterpenóides, por apresentarem baixo peso molecular (ALAGESAN, 2012). Assim, o estudo de inibidores de α -amilase presentes em plantas medicinais encontradas no Brasil, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias para auxiliar no tratamento de pacientes diabéticos e contribuir com a saúde pública do país.

1.7. Melasma, inibição da enzima tirosinase e o estresse oxidativo

Melasma é uma doença crônica de pele que causa hipermelanose de áreas expostas ao sol, especialmente na face (BABBUSH, 2020). Distúrbios pigmentares tem um impacto significativo na qualidade de vida do paciente, sendo uma causa comum de procura por ajuda dermatológica (BABBUSH, 2021).

A patogênese do melasma é multifatorial e pouco compreendida, o que representa um desafio para o tratamento da doença. Fatores que desempenham uma influência da doença são: exposição à luz ultravioleta, que induz a formação de ERO, a vasculatura cutânea alterada, histórico familiar e influências hormonais. Há também evidências de aumento

da atividade das enzimas melanogênicas na pele e aumento da deposição de melanina na epiderme e na derme (BABBUSH, 2020).

Há muitas terapias já em uso, como hidroquinona, tretioína, ácido azelaico, ácido retinóico, ácido glicólico, ácido kójico, ácido ascórbico, corticoides tópicos, tazaroteno, adapaleno, crioterapia, peeling químico e tratamento a laser são utilizados isoladamente ou em combinação, visto que não há um tratamento universalmente eficaz. Os antioxidantes são também uma opção complementar, visto que o estresse oxidativo está ligado ao envelhecimento da pele e distúrbios de pigmentação (BABBUSH, 2020).

A irradiação UV causa estresse oxidativo e atua como fator chave para muitos problemas de pele. A hiperpigmentação pode ser dependente do aumento do número de melanócitos ou atividade da enzima tirosinase melanogênica (GEORGIEV, 2013). A via biossintética para formação da melanina é iniciada com a etapa da oxidação da tirosina para dopaquinona, catalisada pela enzima tirosinase. Esta é uma etapa limitante na síntese de melanina, pois a partir dela o restante das reações acontecem espontaneamente em pH fisiológico (CHANG, 2009). Assim, compostos naturais com a capacidade antioxidante e de inibição da enzima tirosinase possuem alto potencial para servirem de opção terapêutica para o tratamento de melasma e outras disfunções de pele ligadas ao estresse oxidativo.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Produzir extratos etanólicos brutos das folhas e dos galhos da planta, com o intuito de comparar os perfis entre as duas amostras. Para isso foi realizado a prospecção fitoquímica e análise da capacidade antioxidante, bem como a atividade inibitória das enzimas α -amilase e tirosinase.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar maceração, produzir e quantificar o rendimento dos extratos etanólico bruto das folhas e dos galhos da *Schinus molle L.*
- Determinar o teor de fênois totais, flavonoides, taninos condensados (proantocianinas) e comparar entre os dois extratos.
- Avaliar a capacidade antioxidante dos extratos brutos pelos métodos DPPH (sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e FRAP (capacidade de redução do ferro).
- Avaliar a atividade de inibição das enzimas α -amilase e tirosinase dos extratos brutos.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e identificação amostras

Foi realizada a coleta de amostras de folhas, em diferentes etapas de amadurecimento, e galhos novos, que ainda não havia formação de ritidoma (porções mais velhas do súber que se destacando da superfície dos troncos) da espécie *Schinus*

molle L. As amostras foram coletadas de diferentes espécimes localizados nos bairros: Umuarama; Tibery; Santa Mônica; Custódio Pereira; em Uberlândia-Minas Gerais. Foi realizado a exsicata das folhas, juntamente com suas flores e frutos, e identificadas no Herbarium Uberlandese, sob o código de registro: 82689.

3.2. Preparação das amostras

A água fornece meio que possibilita reações enzimáticas que podem decompor os metabólitos durante a preparação das amostras (KIM; VERPOORTE, 2010). Em razão disso, as folhas juntamente com os galhos, passaram pelo processo de secagem em ambiente ventilado e abrigado da luz, durante 22 dias. Após esse período, os galhos foram serrados em finos fragmentos, para que pudessem ser macerados.

3.3. Maceração

O processo geral de maceração em pequena escala consiste em colocar o material vegetal adequadamente triturado em um recipiente fechado e adicionar um solvente selecionado. O sistema é deixado em repouso por 7 dias, com eventuais agitações. O líquido então é filtrado. Como o sistema é estático, exceto pelas agitações ocasionais, a extração ocorre através de difusão celular (SINGH, 2008). Portanto, esse foi o sistema extrativo escolhido para obtenção dos extratos brutos de interesse neste trabalho, no qual foram selecionados 200 gramas de folhas desidratadas e trituradas em um recipiente de vidro, devidamente lacrado e protegido dos raios solares juntamente com 1 litro de etanol 95% (solvente). O mesmo processo foi feito para com os galhos.

3.4. Separação extrato etanólico (EE)

Após os 7 dias de maceração, a solução foi filtrada e submetida ao processo de rotaevaporação, a fim de remover parcialmente o solvente. Em seguida, essa solução concentrada foi deixada em uma capela de exaustão de gases. Após 7 dias, o material remanescente (extrato etanólico ou bruto sólido) foi recuperado através de raspagem, a quantidade foi pesada (para cálculos de rendimento) e encaminhada para um processo de liofilização durante 24 horas, para remoção completa do solvente e obtenção dos EEs das folhas e dos galhos.

3.5. Prospecção fitoquímica

3.5.1 *Determinação de Fenóis Totais*

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 5µL dos EEs (1mg/mL) (em triplicata para cada extrato). Em seguida, adicionou-se 25µL de reagente Folin-Ciocalteu e 195µL de água ultrapura em todos os poços com pipeta multicanal e, a placa foi incubada por 6 min à 25°C. Após a incubação, adicionou-se 75µL solução de carbonato de sódio Na₂CO₃ (7%) e incubou-se no escuro por 2h à 25°C. Dado esse tempo, a placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 760nm.

A curva padrão foi preparada com ácido gálico nas concentrações de 7,5; 15,62; 31, 25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. O branco foi feito com etanol, substituindo o volume dos extratos testados. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de material vegetal (mg GAE/g). O teor de fenóis foi dado pela equação da reta da curva feita em GAE.

3.5.2 Determinação de Taninos Condensados

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 10 μL dos EEs (1mg/ml, em triplicata para cada extrato). Em seguida, adicionou-se 200 μL de solução 4% vanilina (em metanol) e 100 μL de ácido clorídrico (HCl) concentrado em todos os poços com pipeta multicanal e foi incubado por 15 min à 25°C.

A curva padrão foi preparada com catequina nas concentrações de 7,5; 15,62; 31, 25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 $\mu\text{g/mL}$. O branco foi feito com etanol, substituindo o volume dos extratos testados. Os resultados foram expressos como miligramas de equivalentes de catequina por grama de material vegetal (mg CE/g). O teor de taninos condensados será dado pela equação da reta da curva feita em CE.

3.5.3 Determinação de Flavonoides

É possível definir o teor de flavonoides utilizando cloreto de alumínio. Neste método, o Al^{3+} forma complexos estáveis com os flavonoides presentes na amostra, de forma a apresentar uma absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado, permitindo sua quantificação (WOISKY; SALATINO, 1998).

Em uma microplaca de 96 poços, foi adicionado 30 μL de EEs (1mg/mL, em triplicata para cada extrato). Sequencialmente, adicionou-se 180 μL de água ultrapura e 10 μL de solução 5% de NaNO_2 (em água ultrapura) em todos os poços com pipeta multicanal e foi incubado por 6 minutos à 25°C. Posteriormente, foi adicionado 20 μL de solução de AlCl_3 à 10% (em água ultrapura) e foi deixado em repouso durante 6 minutos, depois foi adicionado à mistura 60 μL de solução a 4% de hidróxido de sódio (NaOH) (em água ultrapura) e incubado durante mais 15 min. Em seguida, a placa foi lida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425nm.

A curva padrão foi preparada com quercetina nas concentrações de 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL. O branco foi feito com etanol, substituindo o volume dos extratos testados. As medidas foram expressas como miligramas de equivalentes de quercetina por grama de material vegetal (mg QE / g). O teor de flavonoides foi dado pela equação da reta da curva feita com QE.

3.6. Testes Antioxidantes

3.6.1. Ensaio de eliminação de radicais livres de 2,2 –difênil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A metodologia DPPH tem por objetivo quantificar a capacidade antioxidante de uma determinada amostra através de sua capacidade em sequestrar o radical estável DPPH, reduzindo-o a hidrazina (ALVES e colab., 2010). Inicialmente a solução de DPPH é de cor roxa e desvanece para cor amarela da difenilpicril hidrazina quando componentes antioxidantes doam radicais de hidrogênio. (JUSTINO e colab, 2016).

Preparou-se o radical DPPH numa concentração de 0,10144mmol/L, solubilizado em metanol e adicionou-se em seus respectivos poços na microplaca das amostras em duplicata na seguinte ordem: Branco do DPPH em metanol, Mistura da reação das amostras: 75 uL do EE+ 225 uL de solução de DPPH. O controle foi realizado substituindo o EE por metanol. O branco do ensaio foi realizado através da substituição da solução de DPPH por etanol. Quercetina foi utilizada como controle positivo.

A mistura de reação adicionada na microplaca foi agitada pela colocação da microplaca num incubador/agitador a 30°C por 30 minutos. A redução da absorbância da mistura é medida em 517nm. Sequestro de radicais DPPH pela amostra foi calculado através da equação 1:

Percentual de inibição (E%) = [(Abs controle – (Abs amostra- Abs branco) /Abs controle] x100,

Equação 1

Onde: E% é a capacidade de eliminação de radicais é expressa como efeito em percentual, Abs amostra é a absorbância da mistura (DPPH + EE), Abs branco é a absorbância da amostra em etanol.

Para realização do teste, o EE das folhas e dos galhos foram diluídos em etanol, em triplicatas, nas concentrações de: 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 µg/mL; para determinar o valor de concentração de amostra que induz metade do efeito máximo (EC₅₀).

3.6.2. *Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)*

Nesse método é possível determinar a capacidade antioxidante de uma amostra por meio do potencial antioxidante redutor férrico. Os compostos antioxidantes presentes nas amostras reduzem Fe³⁺ em Fe²⁺, o qual é quelado pela 2,4,6-tri (2 piridil)-s-triazina (TPTZ) para formar o complexo Fe²⁺- TPTZ, de coloração azul intensa (BENZIE; STRAIN, 1996).

Inicialmente, foi diluído os extratos brutos em etanol na concentração de 1000 µg/mL. Para preparação das microplacas, utilizou-se: 250 µL do reagente de FRAP (10 vol. Tampão Acetato + 1 vol. TPTZ +1 vol. de Fe³⁺) em 10 µL de cada amostra e adição de 25 µL de água ultrapura. A microplaca foi incubada por 6 minutos a 37°C antes da realização da leitura. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593nm e a atividade antioxidante foi determinada utilizando uma curva analítica a partir de 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox). O resultado foi expresso em equivalente de Trolox, conforme a Equação 2:

$$TE (\mu\text{mol TE/g}) = \text{Trolox } (\mu\text{mol/L}) / \text{ amostra (g/L)}] \times 100, \quad \text{Equação 2}$$

Onde: TE é equivalente de trolox.

3.7. Teste de inibição da enzima alfa amilase

O método quantifica a inibição da enzima α -amilase com o uso de 2-cloro-4-nitrofenil-4-b-Dgalactopiranosilmaltosídeo (GalG2CNP) como substrato e uma fração de saliva enriquecida com α -amilase (HSA-f).

Os extratos brutos foram preparados em soluções de etanol, em triplicatas, nas concentrações de: 78,125; 156,25; 312,5; 625; 1250; 2500; 5000; 10000 $\mu\text{g/mL}$.

Primeiramente foi preparado o tampão de ácido 2-morfolinoetanossulfônico monoidratado (MES) de pH 6,2 e concentração de 50mM, diluindo MES (50mM), cloreto de sódio (NaCl) (300mM), (cloreto de cálcio) CaCl_2 (5mM), Tiocinato de Potássio (140mM) em água milli-Q. Em seguida diluiu-se GalG02CNP 12mM em tampão MES, solução esta que ficou em repouso por 10 minutos em exposição UV. Foi diluído 1 μL de HSA-f para 59 μL de tampão MES. Para produção do mix, foi incubado 5 μL do extrato com 45 μL da solução de α -amilase por 10 minutos a 37°C. Em seguida, foi colocado em cada poço da microplaca 8 μL do mix + 300 μL do substrato GAL para leitura no espectrofotômetro a 407nm. A leitura foi feita de forma cinética de 1 em 1 minuto, durante 3 minutos.

3.8. Teste de Inibição da enzima tirosinase

Para iniciar o teste, foi preparado um tampão a partir de fosfato de sódio monobásico, diluído em água ultrapura, com o pH de 6,5 e concentração de 50mM. Em seguida foi preparado uma solução de L-DOPA 8mM, a partir da diluição de L-DOPA no tampão de sódio monobásico 50mM. Também foi preparado uma solução de ácido Kójico

em concentração 10 mM (1,4mg/mL), a partir da diluição do ácido no tampão de fosfato de sódio. A solução de ácido Kójico servirá como controle positivo de inibição. Os extratos brutos foram preparados em soluções de etanol, em triplicatas, na concentração de 1,25 mg/mL.

Em uma microplaca transparente de 96 poços, foi adicionado 20 µL de tirosinase e 20 µL dos EE e foi incubado durante 5 minutos a 37°C na ausência de luz. Em seguida foi adicionado 160 µL de L-DOPA e foi iniciado a leitura imediatamente a 490 nm, com leituras de 2 em 2 minutos durante 20 minutos. O branco foi realizado substituindo os EE por etanol. Para o controle positivo, os EE foram substituídos por ácido Kójico.

3.9. Análises Estatísticas

As análises estatísticas e os histogramas foram realizados com auxílio do software GraphPad Prism versão 7.0. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média e a análise da variância foi realizada pelo teste One-Way ANOVA com pós teste de Tukey para comparações múltiplas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. Rendimento da produção dos EE

Foram realizadas duas extrações etanólicas por maceração para cada uma das amostras: folhas e galhos de S.M. As tabelas 1 e 2 mostram quantitativamente o

rendimento obtido. As folhas apresentaram um maior rendimento quando comparadas aos galhos.

Tabela 1. Rendimento do processo de extração etanólica por maceração à temperatura ambiente das folhas de S.M.

Extração	Massa seca (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
1	200	14,05	7,03
2	200	12,78	6,39
Média ± desvio padrão	200	13,42 ± 0,64	6,71 ± 0,32

Tabela 2. Rendimento do processo de extração etanólica por maceração à temperatura ambiente dos galhos de S.M.

Extração	Massa seca (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
1	200	4,08	2,04
2	200	8	4
Média ± desvio padrão	200	6,04 ± 1,96	3,02 ± 0,98

4.2. Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica do EE das folhas, apresentou os valores de $4,18 \pm 0,29$ mg GAE/g; $202,66 \pm 0,27$ mg QE/g e 0mg CE/g, para fenóis totais, flavonoides e taninos condensados, respectivamente. No EE dos galhos, foi detectado $224,35 \pm 0,03$ mg GAE/g; $428,03 \pm 0,04$ mg QE/g e $205,85 \pm 0,01$ mg CE/g de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados, respectivamente. Os dados estão apresentados de forma esquemática na tabela 3.

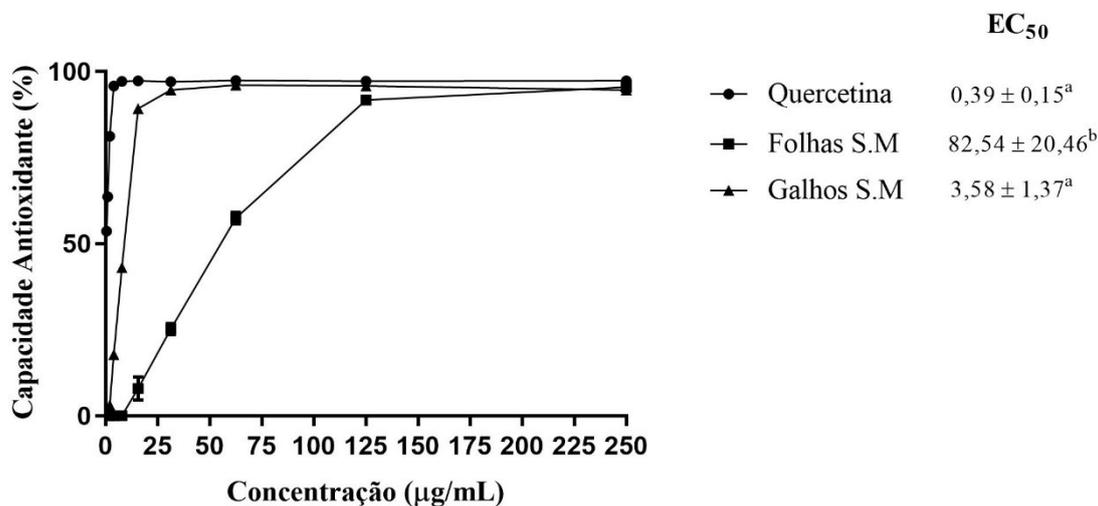
Tabela 3. Teor de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados dos extratos brutos das folhas e dos galhos de S.M. Valores expressos como média \pm erro padrão.

Amostras	Total fenóis (mg GAE/g)	Flavonoides (mg QE/g)	Taninos condensados (mg CE/g)
E.E Folhas S.M	4,18 \pm 0,29	202,66 \pm 0,27	0
E.E Galhos S.M	224,35 \pm 0,03	428,03 \pm 0,04	205,85 \pm 0,01

4.3. DPPH

Na Figura 1 é possível observar que o maior valor de EC_{50} foram do EE das folhas de S.M (82,54 \pm 20,46 μ g/mL) seguidos dos valores do EE dos galhos (3,58 \pm 1,37 μ g/mL) e quercetina (0,39 \pm 0,15 μ g/mL) ($p < 0,05$).

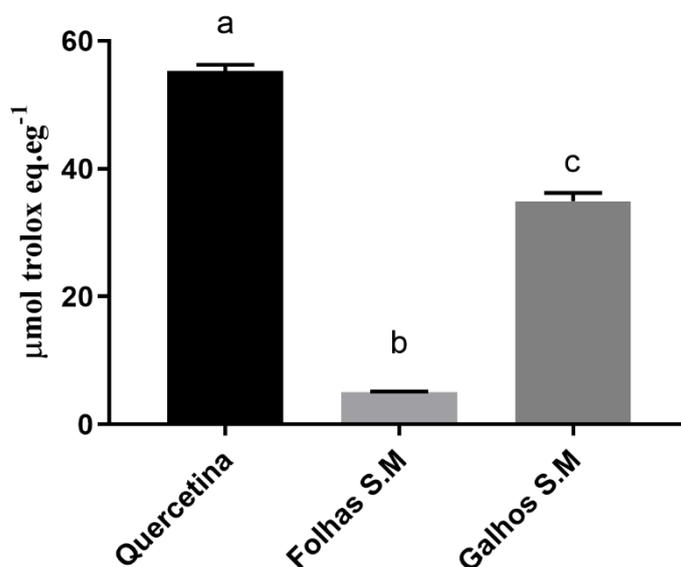
Figura 1. Gráfico comparativo da capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) em diferentes concentrações de quercetina e dos extratos brutos dos galhos e das folhas de S.M. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0,05$).



4.4. FRAP

Na Figura 2 é possível visualizar que os maiores valores de TE foram observados na QE ($55,99 \pm 0,02 \mu\text{mol trolox eq/g}$), no EE dos galhos ($34,01 \pm 0,02 \mu\text{mol trolox eq/g}$) e no EE das folhas ($5,13 \pm 0,002 \mu\text{mol trolox eq/g}$) ($p < 0,05$), respectivamente.

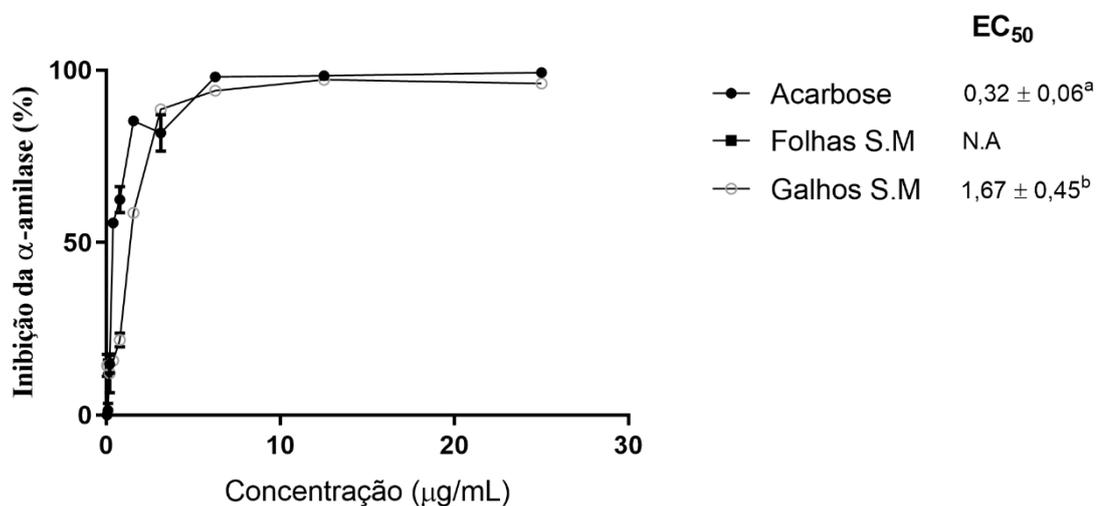
Figura 2. Histograma comparativo da capacidade de redução de Fe^{3+} em Fe^{2+} entre quercetina (controle positivo) e os EE dos galhos e das folhas de S.M a $35 \mu\text{g/mL}$, considerando o fator de diluição das placas. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).



4.5. Inibição da enzima alfa-amilase

Na Figura 3 encontra-se os resultados do teste de inibição da enzima alfa-amilase, expressos pelos valores de EC_{50} . O maior valor foi do EE dos galhos ($1,67 \pm 0,45 \mu\text{g/mL}$), seguido pela acarbose ($0,32 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$). Não foi possível determinar o valor de EC_{50} do EE das folhas.

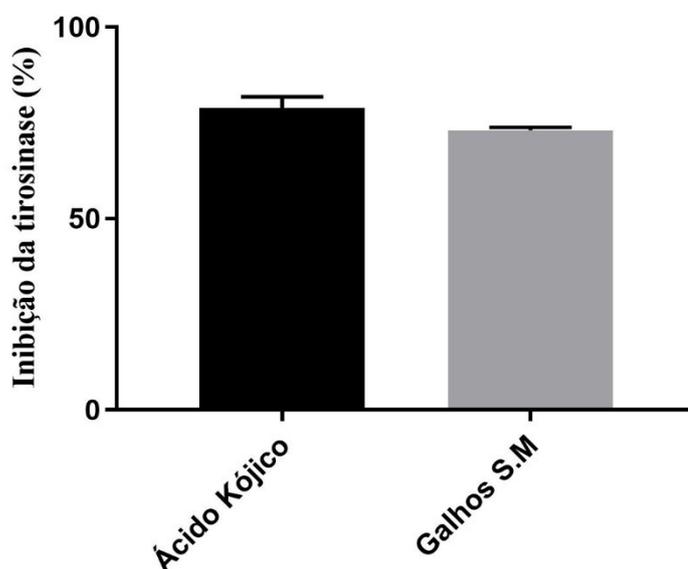
Figura 3. Gráfico comparativo da capacidade de inibição da enzima alfa-amilase entre acarbose (controle positivo) e os extratos brutos dos galhos e das folhas de S.M. Valores expressos em porcentagem de inibição enzimática e concentração capaz de inibir 50% da atividade da enzima (IC50). As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).



4.6. Inibição da enzima tirosinase

O histograma da Figura 5 mostra a capacidade de inibição da enzima tirosinase em porcentagem. O EE dos galhos apresentou um valor de inibição de $73,02 \pm 0,37\%$, enquanto o ácido kójico apresentou um valor de $78,83 \pm 1,50\%$.

Figura 4. Histograma comparativo da capacidade de inibição da enzima tirosinase entre ácido kójico a 140µg/mL (controle positivo) e os extrato bruto dos galhos de S.M a 125µg/mL, considerando o fator de diluição nas placas. As letras iguais correspondem as amostras que não apresentaram diferença estatística significativa entre si. A análise estatística foi realizada com confecção de Anova e pelo pós teste de Tukey ($p < 0.05$).



5. DISCUSSÃO

A partir dos resultados obtidos na prospecção fitoquímica, representados na Tabela 3, foi possível observar uma diferença significativa entre a concentração do teor de fenóis totais, flavonoides e taninos condensados do extrato etanólico (EE) das folhas quando comparadas ao EE dos galhos, sendo que este último apresentou melhores resultados, o que possibilita inferir que resultados heterogêneos podem ser encontrados, ou seja, a depender da parte da planta estudada. Este estudo corrobora com os achados de Hmed (2020), que referiram que a quantidade total de fenóis, flavonoides e taninos condensados variava de acordo com a parte da S.M analisada. Em seus testes, os resultados apontaram que o extrato aquoso das folhas de S.M apresentaram um baixo resultado quando comparadas ao extrato aquoso das raízes, apresentando um padrão

similar aos resultados encontrados na comparação entre os galhos e as folhas. No entanto, este estudo apresenta um diferencial, quando comparado ao estudo supracitado, no que concerne ao fato do extrato estudado ser o etanólico, por apresentar a possibilidade de abranger maiores grupos de compostos orgânicos (polares e apolares). Além disso, estudos de Khedher (2020) apontaram que a quantidade de polifénóis totais presentes no EE das folhas de S.M foram inferiores a 15 mg GAE/g, reforçando assim, os resultados apresentados neste trabalho ($4,18 \pm 0,29$ mg GAE/g).

No que diz respeito aos testes de potencial antioxidante das amostras, os resultados da metodologia DPPH (Figura 2) demonstraram um maior potencial antioxidante do EE dos galhos, quando comparado as folhas, que apresentou um alto valor de EC_{50} , logo uma baixa capacidade antioxidante. Nos resultados obtidos por Do Rosário Martins (2014), utilizando o mesmo método, o EE das folhas de S.M também apresentaram uma atividade muito inferior ao composto antioxidante de referência utilizado como controle positivo.

O EE dos galhos expressou um alto potencial antioxidante, não tendo apresentado diferença estatística significativa comparadas à quercetina, que é um flavonoide dietético com potencial de neutralização de radicais livres bem conhecidas, sendo frequentemente utilizada como composto referência em testes antioxidantes. (SAK, 2014). Nos estudos realizados por Salem (2016), também utilizando o método DPPH, foi observado que esse potencial antioxidante contido nos galhos de S.M é ainda maior por outros métodos de extração, como a hidrodestilação dos óleos essenciais e a extração aquosa, o que demonstra que o método extrativo pode influenciar o carreamento de compostos bioativos com ação antioxidante. Porém, neste trabalho optou-se pelo uso do etanol por ser um solvente de amplo espectro e por se tratar de boa alternativa para ensaios preliminares.

Analisando os resultados obtidos pelo método FRAP, é possível identificar consistência nesse padrão comparativo: o EE dos galhos ($34,01 \pm 0,02 \mu\text{mol trolox eq/g EE}$) apresentou uma maior capacidade antioxidante quando comparadas às folhas ($5,13 \pm 0,002 \mu\text{mol trolox eq/g EE}$). Apesar do EE dos galhos ter apresentado um menor resultado, com diferença estatística significativa ($p < 0,05$) com relação ao controle positivo, fica evidente a presença de moléculas com alta capacidade antioxidante, visto que essas moléculas não estavam isoladas, como no caso da quercetina. Nos resultados obtidos por Hmed (2020), utilizando o mesmo método, foi observado que o extrato aquoso das folhas apresentou um maior valor de EC_{50} , logo uma menor capacidade antioxidante quando comparadas ao extrato aquoso das raízes e frutos, corroborando ao padrão inferido.

Referente à capacidade de inibição da enzima alfa-amilase, o EE das folhas apresentou uma baixa capacidade inibitória, não tendo sido possível definir seu valor de EC_{50} . Por sua vez, o EE dos galhos apresentou baixos níveis de EC_{50} , o que demonstra uma ação inibitória de alfa amilase maior que as folhas (Figura 4), diferindo apenas do controle positivo. Tal fato demonstra que essa ação é promissora por se tratar de moléculas não isoladas e por não ser tão difundido na literatura científica, no que tange aos extratos de galhos e folhas, objeto de estudo deste trabalho. Nesse contexto, Ranilla (2010) demonstrou uma baixa capacidade de inibição pelo extrato aquoso do fruto e Feriani (2021) apresentou uma alta capacidade inibitória pelo extrato metanólico do fruto. Além disso, evidências apontam que antes de descartar o potencial antioxidante de uma determinada planta, é necessário se estudar separadamente cada parte dessa planta e seus diferentes métodos de extração, visto que o rendimento do extrato e sua atividade

antioxidante é fortemente dependente da natureza do solvente de extração (SULTANA, 2009).

Os resultados obtidos pelo ensaio preliminar de inibição da enzima tirosinase reforça o padrão observado até então: o EE das folhas não apresentou ação inibitória dessa enzima, enquanto o EE dos galhos apresentou um alto potencial de inibição, não diferindo do controle positivo (ácido kójico). O ácido kójico atua como um agente inibidor da tirosinase, enzima responsável pela produção de melanina, o pigmento que confere cor à nossa pele, cabelo e olhos. Isso é especialmente relevante no tratamento do melasma, uma condição de hiperpigmentação da pele, pois o ácido kojico pode ajudar a clarear as áreas afetadas, diminuindo a hiperprodução de melanina nessas regiões específicas. Porém por apresentar citotoxicidade e uma instabilidade de armazenagem, há uma busca do mercado de cosméticos por novos inibidores (NOH, 2009). Considerando que o EE dos galhos foi testado em uma menor concentração (125 µg/mL), comparado ao ácido kójico (140 µg/mL), e que suas moléculas com atividade inibitória não estavam isoladas, esse foi um resultado promissor. Até o então, não há disponível nenhum trabalho na literatura que tenha sido testado a capacidade de inibição da enzima tirosinase pela S.M.

Ao analisar todas essas informações em conjunto, pode-se observar um maior poder antioxidante presente no EE dos galhos, quando comparadas à das folhas, evidenciando uma relação direta do teor de substâncias fenólicas com a inibição do dano oxidativo resultante do estresse oxidativo (FERGUSON, 2001). Com a manutenção desse padrão durante os testes, foi possível perceber uma relação entre o teor fenólico, potencial antioxidante; capacidade de inibição das enzimas alfa-amilase e tirosinase, sendo que o EE dos galhos apresentou consistentemente os melhores resultados em todos os testes, comparado às folhas.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados pode-se concluir que o EE dos galhos de S.M contém uma alta capacidade antioxidante e uma alta capacidade de inibição das enzimas alfa-amilase e tirosinase, sendo uma matéria prima promissora para o desenvolvimento de estudos no tratamento de DM e de melasma, assim como tantas outras disfunções cujo o estresse oxidativo seja um fator de risco. Por outro lado, o EE das folhas não apresentou nenhum resultado satisfatório no que diz respeito à capacidade antioxidante e inibição das enzimas alfa-amilase e tirosinase. Este trabalho apresentou como limitação o fato de os extratos estudados serem apenas os extratos brutos etanólicos. Sugere-se, portanto, que estudos complementares (estudos com as frações ou com solventes extratores diferenciados, por exemplo) a este sejam realizados novos estudo com o objetivo de maior conhecimento das capacidades antioxidantes e inibitória para enzimas α -amilase e tirosinase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, Prashant; GUPTA, Ritika. Alpha-amylase inhibition can treat diabetes mellitus. **Res Rev J Med Health Sci**, v. 5, n. 4, p. 1-8, 2016.

ALVES, Clayton Q. Et al. Methods for determination of in vitro antioxidante activity for extracts and organic compounds. **Química Nova**, v. 33,n. 10,p. 2202-2210, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>

ALAGESAN, Kathirvel; RAGHUPATHI, Prem Krishnanan; SANKARNARAYANAN, Sadasivam. Amylase inhibitors: potential source of anti-diabetic drug discovery from medicinal plants. **Int J Pharm Life Sci**, v. 3, n. 2, p. 1407-1412, 2012.

AL-AWAR, Amin et al. Experimental diabetes mellitus in different animal models. **Journal of diabetes research**, v. 2016, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/9051426>

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.08.023>

ARGENTA, Scheila Crestanello et al. Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. **Vivências**, v. 7, n. 12, p. 51-60, 2011.

BABBUSH, Kayla M.; BABBUSH, Remy A.; KHACHEMOUNE, Amor. The therapeutic use of antioxidants for melasma. **J Drugs Dermatol**, v. 19, n. 8, p. 788-792, 2020.

<https://doi.org/10.36849/JDD.2020.5079>

BABBUSH, Kayla M.; BABBUSH, Remy A.; KHACHEMOUNE, Amor. Treatment of melasma: a review of less commonly used antioxidants. **International Journal of Dermatology**, v. 60, n. 2, p. 166-173, 2021.

<https://doi.org/10.1111/ijd.15133>

BAYR, Hülya. Reactive oxygen species. **Critical care medicine**, v. 33, n. 12, p. S498-S501, 2005.

<https://doi.org/10.1097/01.CCM.0000186787.64500.12>

BEDEKAR, Amruta; SHAH, Karan; KOFFAS, Mattheos. Natural products for type II diabetes treatment. **Advances in applied microbiology**, v. 71, p. 21-73, 2010.

[https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71002-9)

BENZIE, I. F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, v. 239, n. 1, p.70-76, 1996.

<https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World allergy organization journal**, v. 5, p. 9-19, 2012.

<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

BOUAYED, Jaouad; BOHN, Torsten. Exogenous antioxidants—double-edged swords in cellular redox state: health beneficial effects at physiologic doses versus deleterious effects at high doses. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 3, n. 4, p. 228-237, 2010.

<https://doi.org/10.4161/oxim.3.4.12858>

BRZOSOWSKI, A. Marek; DAVIES, Gideon J. Structure of the *Aspergillus oryzae* α -amylase complexed with the inhibitor acarbose at 2.0 Å resolution. **Biochemistry**, v. 36, n. 36, p. 10837-10845, 1997.

<https://doi.org/10.1021/bi970539i>

BVENURA, Callistus; KAMBIZI, Learnmore. Composition of Phenolic Compounds in South African *Schinus molle* L. Berries. **Foods**, v. 11, n. 10, p. 1376, 2022.

<https://doi.org/10.3390/foods11101376>

CARVALHO, Paulo Ernani Ramalho. *Espécies arbóreas brasileiras*. 2014.

CHANG, Te-Sheng. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International journal of molecular sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440-2475, 2009.

<https://doi.org/10.3390/ijms10062440>

CHEN, Lei; MAGLIANO, Dianna J.; ZIMMET, Paul Z. The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. **Nature reviews endocrinology**, v. 8, n. 4, p. 228-236, 2012.

<https://doi.org/10.1038/nrendo.2011.183>

CHANDA, Sumitra. Importance of pharmacognostic study of medicinal plants: An overview. **Journal of pharmacognosy and phytochemistry**, v. 2, n. 5, p. 69-73, 2014.

DE GOUVEIA, Neire M. et al. Phytochemical characterization of the *Vochysia rufa* (Vochysiaceae) extract and its effects on oxidative stress in the pancreata of streptozotocin-induced diabetic rats. *Plos one*, v. 12, n. 10, p. e0184807, 2017.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184807>

DEVIENNE, Karina Ferrazzoli; RADDI, G.; POZETTI, Gilberto Luiz. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, p. 11-14, 2004.

DO ROSÁRIO MARTINS, Maria et al. Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of Schinus molle L. essential oils. **Journal of ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 485-492, 2014.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.063>

FERGUSON, L. R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat Res**, v.475, n. 1-2, p. 89-111, 2001.

[https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(01\)00073-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(01)00073-2)

FERIANI, Anouar et al. HPLC–ESI–QTOF–MS/MS profiling and therapeutic effects of Schinus terebinthifolius and Schinus molle fruits: investigation of their antioxidant, antidiabetic, anti-inflammatory and antinociceptive properties. **Inflammopharmacology**, v. 29, p. 467-481, 2021.

<https://doi.org/10.1007/s10787-021-00791-1>

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. Rev. Assoc. Med. Bras., 1997 43(1), jan. 1997.

<https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

FLEIG, M. Estudo taxonômico da família Anacardiaceae no Rio Grande do Sul, Brasil. 1979. 163 f. **Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, RS.

FRANCO, Rodrigo Rodrigues et al. Antioxidant and anti-glycation capacities of some medicinal plants and their potential inhibitory against digestive enzymes related to type 2 diabetes mellitus. **Journal of ethnopharmacology**, v. 215, p. 140-146, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.12.032>

GARZOLI, Stefania et al. Chemical investigation of a biologically active Schinus molle L. leaf extract. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2019, 2019.

<https://doi.org/10.1155/2019/8391263>

GEORGIEV, Lyubomir et al. Anti-tyrosinase, antioxidant and antimicrobial activities of hydroxycinnamoylamides. **Medicinal Chemistry Research**, v. 22, p. 4173-4182, 2013.

GOYAL, Rajeev; JIALAL, Ishwarlal. Diabetes mellitus type 2. 2018.

<https://doi.org/10.1007/s00044-012-0419-x>

HERRERA-CALDERON, Oscar et al. GC-MS Profile, Antioxidant Activity, and In Silico Study of the Essential Oil from Schinus molle L. Leaves in the Presence of Mosquito Juvenile Hormone-Binding Protein (MJHBP) from Aedes Aegypti. **BioMed Research International**, v. 2022.

<https://doi.org/10.1155/2022/5601531>

HMED, M. Ben et al. Phytochemical and antioxidant activities of *Schinus molle* L. extract. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 65, n. 2, p. 173-178, 2020.

<https://doi.org/10.33224/rch/2020.65.2.06>

HOLDRIDGE, L. R.; POVEDA, L. S. Arboles de Costa Rica. **San José: Centro Científico Tropical**, 1975. 546 p.

JHA, Jay C. et al. Diabetes and kidney disease: role of oxidative stress. **Antioxidants & redox signaling**, v. 25, n. 12, p. 657-684, 2016.

<https://doi.org/10.1089/ars.2016.6664>

JUSTINO, Allisson Benatti et al. Antioxidant compounds of *Kielmeyera coriacea* Mart. with α -amylase, lipase and advanced glycation end-product inhibitory activities. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 206, p. 114387, 2021.

<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114387>

JUSTINO, Allisson Benatti et al. Casca do araticum (*Annona crassiflora* Mart.) como fonte de compostos antioxidantes com atividade de inibição de α -amilase, α -glicosidase e glicação não enzimática. 2016.

JUSTINO, Allisson Benatti et al. Flavonoids and proanthocyanidins-rich fractions from *Eugenia dysenterica* fruits and leaves inhibit the formation of advanced glycation end-products and the activities of α -amylase and α -glucosidase. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 285, p. 114902, 2022.

<https://doi.org/10.1016/j.jep.2021.114902>

JUSTINO, Allisson Benatti et al. Hepatoprotective properties of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* Mart. fruit peel against diabetes-induced oxidative and nitrosative stress. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, 2017.

<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01355>

JUSTINO, Allisson B. et al. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 19183, 2019.

<https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

KHEDHER, Olfá et al. Optimization of polyphenols recovery from *Schinus molle* L. peel using response surface methodology (RSM). **Chemistry Africa**, v. 3, p. 813-820, 2020.

<https://doi.org/10.1007/s42250-020-00170-3>

KIM, Hye Kyong; VERPOORTE, Rob. Sample preparation for plant metabolomics. **Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques**, v. 21, n. 1, p. 4-13, 2010.

<https://doi.org/10.1002/pca.1188>

LOPES, E. A. Plantas medicinais. In: BONONI, V.L.; MACEDO, A. C. de. Aproveitamento racional de florestas nativas. São Paulo: Instituto de Botânica, 1986. p. 23-25.

MOLLE: orden: *Shinus molle* Lineo, familia: Anacardiaceas. Flora, Fauna y Areas Silvestres, Santiago, v. 4, n. 12, p. 41, 1990.

NELSON, David L e COX, Michael M. **Lehninger**. [S.l: s.n.], 2013.

NEWSHOLME, Philip et al. Molecular mechanisms of ROS production and oxidative stress in diabetes. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 24, p. 4527-4550, 2016.

<https://doi.org/10.1042/BCJ20160503C>

NOH, Jin-Mi et al. Kojic acid–amino acid conjugates as tyrosinase inhibitors. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 19, n. 19, p. 5586-5589, 2009.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.041>

RANILLA, Lena Galvez et al. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource technology**, v. 101, n. 12, p. 4676-4689, 2010.

<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.01.093>

RÍOS, José Luis; FRANCINI, Flavio; SCHINELLA, Guillermo R. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Planta medica**, v. 81, n. 12/13, p. 975-994, 2015.

<https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>

SAK, Katrin. Dependence of DPPH radical scavenging activity of dietary flavonoid quercetin on reaction environment. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 14, n. 6, p. 494-504, 2014.

<https://doi.org/10.2174/1389557514666140622204037>

SALES, Paloma Michelle et al. α -Amylase inhibitors: a review of raw material and isolated compounds from plant source. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 15, n. 1, p. 141-183, 2012.

<https://doi.org/10.18433/J35S3K>

SALEM, Mohamed ZM et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of extracts from *Schinus molle* wood branch growing in Egypt. **Journal of wood science**, v. 62, n. 6, p. 548-561, 2016.

<https://doi.org/10.1007/s10086-016-1583-2>

SANTOS, Ana C. et al. Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 154-159, 2010.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2010000200003>

SCOTT, Joshua A.; KING, George L. Oxidative stress and antioxidant treatment in diabetes. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1031, n. 1, p. 204-213, 2004.

<https://doi.org/10.1196/annals.1331.020>

SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: Ed. Universidade : UFRGS, 1998. 173 p

SINGH, J. Maceration, percolation and infusion techniques for the extraction of medicinal and aromatic plants. **Extraction technologies for medicinal and aromatic plants**, v. 67, p. 70-71, 2008.

SULAIMAN, Mahaboob Khan. Diabetic nephropathy: recent advances in pathophysiology and challenges in dietary management. **Diabetology & metabolic syndrome**, v. 11, p. 1-5, 2019.

<https://doi.org/10.1186/s13098-019-0403-4>

SULTANA, Bushra; ANWAR, Farooq; ASHRAF, Muhammad. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2167-2180, 2009.

<https://doi.org/10.3390/molecules14062167>

PETROVSKA, Biljana Bauer. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

<https://doi.org/10.4103/0973-7847.95849>

WINTERBOURN, Christine C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nature chemical biology**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.

<https://doi.org/10.1038/nchembio.85>

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research*, v. 37, n.2, p. 99-105, 1998.

<https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

ZHANG, Yu-Jie et al. Antioxidant phytochemicals for the prevention and treatment of chronic diseases. *Molecules*, v. 20, n. 12, p. 21138-21156, 2015.

<https://doi.org/10.3390/molecules201219753>

ZAPATA, Karol; CORTES, Farid B.; ROJANO, Benjamín A. Polifenoles y actividad antioxidante del fruto de guayaba agria (*Psidium araca*). *Información tecnológica*, v. 24, n. 5, p. 103-112, 2013.

<https://doi.org/10.4067/S0718-07642013000500012>