



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

MARIA BEATRIZ MACEDO GONÇALVES

**OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Morus*
nigra FRENTE À ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE L-TIROSINASE**

Brasília

2025

MARIA BEATRIZ MACEDO GONÇALVES

OTIMIZAÇÃO DA OBTENÇÃO DE EXTRATOS HIDROETANÓLICOS DE *Morus nigra* FRENTE À ATIVIDADE DE INIBIÇÃO DE L-TIROSINASE

Trabalho de conclusão de curso
apresentado à Faculdade de Ciências em
Saúde da Universidade de Brasília, com o
requisito para o título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof^o Dr^o Samuel Leite Cardoso
Coorientador: Prof^a. Dr^a. Pérola de Oliveira Magalhães

BRASÍLIA
2025

“Compreendi que na perfeição havia muitos graus e que cada alma era livre no responder às solicitações do Senhor, no fazer muito ou pouco por Ele, numa palavra, no escolher entre os sacrifícios que exige.”

Santa Teresa do Menino Jesus e da Sagrada Face

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, que, durante toda a graduação, juntamente com a intercessão amorosa da Santíssima Sempre Virgem Maria e de seu glorioso esposo, São José, esteve presente, guiando-me pelo caminho mais fiel e seguro para cumprir plenamente a Sua vontade.

Agradeço e dedico este trabalho à minha família, especialmente aos meus pais, Francisco e Francisca, por estarem sempre ao meu lado, apoiando-me em todos os meus sonhos e decisões. Sem vocês, com certeza, não teria chegado onde estou hoje. Amo vocês de todo o coração. À minha irmã, Ana Clara, e ao meu cunhado, Arthur, por serem verdadeiros amigos e inspirações na busca por uma vida espiritual e profissional sólida e fecunda. Aos meus avós, Ana Alves, Francisco Gonçalves (em memória) e Francisco Macedo (em memória), por serem exemplos de amor, fraternidade e companheirismo. Aos meus sobrinhos, Ágatha (em memória), Cecília e Antônio, por me motivarem a ir além e a buscar ser a melhor profissional da saúde que eu possa ser. Vocês são verdadeiras luzes em minha vida.

Ao meu amado namorado, Pedro Henrique, agradeço e dedico também esta monografia. Obrigada por estar sempre ao meu lado, apoiando-me e incentivando-me a buscar sempre mais na vida profissional e espiritual. Você é um verdadeiro exemplo para mim, amo-te de todo o coração. Aos meus sogros, Pedro e Célia, por me acolherem sempre com carinho e ternura, especialmente neste período. Vocês são muito especiais para mim.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Pérola, e ao meu coorientador, Prof^o Dr^o Samuel, por me guiarem nessa jornada com tanta sabedoria e cuidado. Os ensinamentos que aprendi durante este período levarei para toda a vida. Agradeço também a todos os professores, alunos e funcionários que trabalham no Laboratório de Produtos Naturais, em especial à Patrícia, pelo apoio durante os experimentos, e à Prof^a Dr^a Dâmaris, por emprestar generosamente o Infuzion 420® e por ter aceitado participar da banca avaliadora.

Agradeço, por fim, a esta instituição de ensino, aos professores do departamento de Farmácia e à equipe administrativa, que promovem um espaço educacional enriquecedor, favorecendo tanto o aprendizado quanto a realização de pesquisas.

RESUMO:

A *Morus nigra*, também conhecida popularmente como amoreira ou amoreira negra, apresenta diversos efeitos terapêuticos, já demonstrados em estudos, como por exemplo, a ação anti-inflamatória, antihiperlipidêmica e, de maneira mais notável, a potencial ação despigmentante, por meio da inibição da L-tirosinase, enzima que catalisa a síntese de melanina. Por apresentarem grande potencial de ação, inclusive terapêutico, as indústrias estão utilizando, cada vez mais, extratos vegetais para extrair componentes capazes de auxiliarem diversos ramos, desde a indústria alimentícia até a farmacêutica, por isso se faz necessário a otimização do processo extrativo, com o intuito de gastar menos recursos, como tempo e dinheiro. Dentro esses contextos expostos, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de obtenção do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*, por meio da variação da concentração de etanol, tempo e método de extração, testados por meio de ensaios enzimáticos de inibição da L-tirosinase e comparados com um padrão positivo e analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD), para avaliar os compostos extraídos em cada extrato. Neste estudo foi possível inferir que os flavonoides isolados, isoquercetina e ácido clorogênico, não atuam de maneira direta na inibição da enzima, porém a diminuição da concentração do etanol no extrato pode ser viável para otimizar e substituir o extrato padrão, além de economizar recursos. Outro fator importante é o tempo de extração, pois os que foram extraídos em 2 horas por maceração ativa obtiveram valores altos de IC₅₀ em comparação aos demais.

Palavras-chave: *Morus nigra*; otimização extrativa; L-tirosinase; inibição; extrato hidroetanólico;

ABSTRACT:

Morus nigra, also popularly known as black mulberry, exhibits various therapeutic effects that have been demonstrated in studies, such as anti-inflammatory and antihyperlipidemic actions, and most notably, its potential depigmenting effect through the inhibition of L-tyrosinase, an enzyme that catalyzes melanin synthesis. Due to their significant potential, including therapeutic applications, industries are increasingly using plant extracts to obtain components capable of assisting various sectors, from the food industry to pharmaceuticals. Therefore, optimizing the extraction process is necessary to reduce resource consumption, such as time and money. Given these contexts, the present study aimed to optimize the process of obtaining the hydroethanolic extract from *Morus nigra* leaves by varying ethanol concentration, extraction time, and method. These variables were tested through enzymatic assays for L-tyrosinase inhibition and compared with a positive standard, followed by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD) analysis to evaluate the compounds extracted in each sample. This study allowed us to infer that the isolated flavonoids, isoquercetin and chlorogenic acid, do not directly inhibit the enzyme. However, reducing the ethanol concentration in the extract may be a viable approach to optimize and replace the standard extract while also saving resources. Another important factor is the extraction time, as extracts obtained in 2 hours through active maceration showed high IC₅₀ values compared to the others.

Keywords: *Morus nigra*; extraction optimization; L-tyrosinase; inhibition; hydroethanolic extract;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1. <i>Morus nigra</i>	12
2.2. L-tirosinase.....	13
2.3. Otimização da extração vegetal.....	15
3. OBJETIVOS	16
4. MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1. Obtenção do material vegetal.....	17
4.2. Obtenção dos extratos.....	18
4.3. Teor de sólidos totais	19
4.4. Rendimentos extrativos.....	19
4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)	19
4.6. Inibição de tirosinase	20
4.7. Análise estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1. Rendimento	22
5.2. Porcentagem dos sólidos totais	22
5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD).....	23
5.4. Avaliação da inibição da enzima L-tirosinase.....	32
.....	36
6. CONCLUSÃO.....	37
7. REFERÊNCIAS.....	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Morus nigra</i> , popularmente conhecida no Brasil como amoreira. Imagem disponível pelo site do Laboratório Sistemático de Plantas da Universidade de São Paulo (Amoreira – <i>Morus nigra</i> – Laboratório de Sistemática de Plantas, [s. d.]).	12
Figura 2: Esquema enzimático da melanogênese, que tem como objetivo a produção dos dois tipos de melanina, a feomelanina e eumelaninas, Imagem adaptada e traduzida (Ferreira dos Santos Videira; Lima Moura; Magina, 2013).	14
Figura 3: Folha de <i>Morus nigra</i> coletada no dia 13 de dezembro de 2023 e utilizada para a elaboração dos extratos. Imagem própria.	17
Figura 4: Valor médio e desvio padrão da porcentagem de sólidos totais de cada extrato filtrado de <i>Morus nigra</i> em comparação ao padrão também realizado por maceração passiva.	23
Figura 5: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 280 nm.	24
Figura 6: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 330 nm.	25
Figura 7: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 354 nm.	26
Figura 8: Os extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) apresentaram tempos de retenção entre 17,873 e 17,947 minutos, com alta similaridade ($\geq 0,9989$) em relação ao pico padrão de ácido clorogênico.	28
Figura 9: Comparação dos cromatogramas do extrato padrão (preto), E80.10 (verde) e Ea.80 (azul) que demonstra a diferença dos tempos de retenção e das áreas dos picos.	29
Figura 10: Comparação dos picos cromatográficos a 354 nm - os extratos E60.5 (A) e E60.10 (B) apresentaram tempos de retenção em torno de 17,2 minutos, enquanto E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) mostraram tempos próximos a 33,24 minutos. As similaridades com o pico padrão de isoquercetina variaram entre 0,9901 e 0,9999.	31
Figura 11: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do Extrato Padrão (E.P), já realizado na rotina do laboratório.	33
Figura 12: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do Extrato E80.5, que apresenta um valor de IC ₅₀ muito próximo ao extrato padrão, se tornando uma possibilidade de otimização.	34

Figura 13: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E60.5, que apresenta um valor médio de IC ₅₀ muito alto em relação ao AK.....	34
Figura 14: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E80.10 que apresenta um IC ₅₀ bem inferior aos anteriormente testados.	35
Figura 15: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E60.10 que apresenta um IC ₅₀ do extrato elaborado muito similar ao do Extrato Padrão.....	35
Figura 16: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico, padrão positivo, e o potencial de inibição do Ea.60 que apresenta um IC ₅₀ muito acima do que os demais extratos, apresentando um potencial de inibição bem inferior aos demais.	36
Figura 17: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico e o potencial de inibição do Ea.80, demonstrando que seu potencial de inibição é bem inferior ao padrão e aos demais estratos elaborados e testar, apresentando um IC ₅₀ mais elevado que os demais.....	36

ÍNDICE DE TABELA

Tabela 1: Extratos obtidos a partir das folhas de <i>Morus nigra</i> com variação da porcentagem de solvente, tempo de extração e método extrativo.....	18
Tabela 2: Gradiente de eluição para a análise por CLAE-DAD na detecção de flavonoides, utilizado nesse trabalho, retirado de Leite <i>et al.</i> , 2014 e adaptado por De Freitas <i>et al.</i> , 2016.	20
Tabela 3: Rendimento calculado para os extratos obtidos, a partir do peso final.....	22
Tabela 4: Relação entre os tempos de retenção dos extratos, pureza do pico, média das áreas dos picos e similaridade de cada padrão obtido por meio de cromatogramas com leitura à 280nm.....	27
Tabela 5: Relação entre os tempos de retenção dos extratos, pureza do pico, áreas dos picos e as melhores similaridades obtidas com o padrão de isoquercetina, observados nos cromatogramas com leitura à 354nm.	29
Tabela 6: Resultados dos valores de IC ₅₀ calculados pelo GraphPad Prism 5.0® a partir dos dados obtidos das leituras das placas de inibição da L-tirosinase.	32

1. INTRODUÇÃO

Os extratos vegetais estão cada dia mais sendo investigados pela ciência com o intuito de melhorarem a produção de diversos bens de consumo e até mesmo uma alternativa terapêutica, logo servem como matérias primas para diversas indústrias ao redor do mundo (Bolouri *et al.*, 2022). Porém, para o processo de extração é necessário a utilização de solventes orgânicos, que se mostram mais poluentes para o meio ambiente, sendo capazes de atingir a atmosfera em áreas mais industriais por serem compostos orgânicos voláteis (Vallecillos *et al.*, 2019).

Além disso, os solventes orgânicos também apresentam um risco para os trabalhadores das indústrias que os utilizam, pois podem causar, entre outras diversas condições, hepatotoxicidade e o risco maior de nascimento de bebês pequenos para idade gestacional se a mãe for exposta de maneira ocupacional à esses solventes (Brauner *et al.*, 2020; Enderle *et al.*, 2023). Uma das estratégias para aprimorar o processo de extração e diminuir a poluição e a exposição a esses compostos orgânicos é a otimização extrativa.

A otimização extrativa consiste em variar algumas etapas de um processo padrão, como o método, o solvente, a concentração de matéria vegetal, entre outros, com o objetivo de melhorar, em pelo menos um aspecto, todo o processo (Ferreira *et al.*, 2020). Logo, essa prática pode auxiliar as indústrias a diminuir a poluição ou, até mesmo, o tempo de produção de alguns insumos farmacêuticos.

Os efeitos terapêuticos da *Morus nigra* L., comumente conhecida como amoreira ou até amoreira negra, estão sendo cada vez mais pesquisados e se mostram como uma potencial alternativa para o desenvolvimento de novos medicamentos. Alguns efeitos clínicos observados na planta em estudos foram os e anti-inflamatórios, antihiperlipidêmicos e de controle da glicemia (Lim; Choi, 2019). Ademais uma ação significativa do extrato vegetal das folhas da amoreira foi o de agente despigmentante da pele, por meio da inibição da enzima L-tirosinase (De Freitas *et al.*, 2016), o que pode ser de grande relevância para as indústrias cosmética e farmacêutica.

Portanto, observando o contexto do processo da extração de plantas, o uso excessivo de solventes orgânicos, bem como o impacto disso no meio ambiente e no tempo de produção de indústria, este trabalho visa obter um extrato hidraetanólico de *Morus nigra* otimizado com maiores atividades de inibição de tirosinase.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Morus nigra* L.

A espécie *Morus nigra* L. (Figura 1) pertence à família *Moraceae* que apresenta 1400 espécies (Watson; Dallwitz, 1992). A amoreira negra é bastante difundida pelo mundo, sendo amplamente cultivada nos países europeus, asiáticos, sul e norte americanos e apresenta grande valor econômico, pois, além de produzir frutos presentes na alimentação desses povos, a planta é usada na produção da seda, porque é o único alimento da espécie *Bombyx mori*, também conhecida como bicho da seda (Awasthi *et al.*, 2004).



Figura 1: *Morus nigra*, popularmente conhecida no Brasil como amoreira. Imagem disponível pelo site do Laboratório Sistemático de Plantas da Universidade de São Paulo (Amoreira – *Morus nigra* – Laboratório de Sistemática de Plantas, [s. d.]).

A amoreira preta é uma árvore de porte médio, que em tamanho pode variar entre 4 a 5 metros, seu tronco apresenta textura rugosa e cor escura. Já as folhas tem suas margens serrilhadas, ponta delgada e base arredondada, além disso suas flores são pequenas e de

cor branca-amarelada e seus frutos de cor escura, assim como o seu miolo (Oliveira *et al.*, 2018).

De acordo com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, a amoreira é originária do continente asiático, mas foi introduzida em nosso país ainda no período colonial e difundiu-se por todo o Brasil, com o fruto amplamente consumido e cobrindo uma área aproximadamente de 38000 ha (de Almeida; Canto Fonseca, 2000). Segundo estudos recentes, a *M. nigra*, apresenta diversos efeitos terapêuticos no corpo humano, incluindo atividades antiinflamatórias, anti-hiperlipidêmicas e antidiabéticas (Lim; Choi, 2019), especificamente as folhas da amoreira negra, que pesquisadas em modelo in vivo foram demonstradas que o extrato vegetal dessa espécie de planta exerce efeitos anti-inflamatórias em ratos, por conta da presença de terpenóides e esteróides presentes nas folhas (Padilha *et al.*, 2010).

Outra potencial ação presente no extrato vegetal das folhas da *Morus nigra* seria a de agente despigmentante da pele, pois foi comprovado em estudos que a planta apresenta uma capacidade significante na inibição da enzima L-tirosinase, enzima presente na série de reações responsáveis pela síntese de melanina (De Freitas *et al.*, 2016).

2.2. L-tirosinase

A enzima L-tirosinase tem como principal função a catalização das reações de síntese da melanina, a melanogênese (Figura 2), e é encontrada em diferentes seres vivos, como plantas, mamíferos e insetos (Lerner *et al.*, 1949). Essa enzima, também denominada de EC 1.14.18.1, tem a capacidade de transformar a tirosina em dopaquinona, produto final da reação catalisada pela tirosina, precursora da melanina, pigmento presente em diversas espécies, desde bactérias até os seres humanos (Lai *et al.*, 2018).

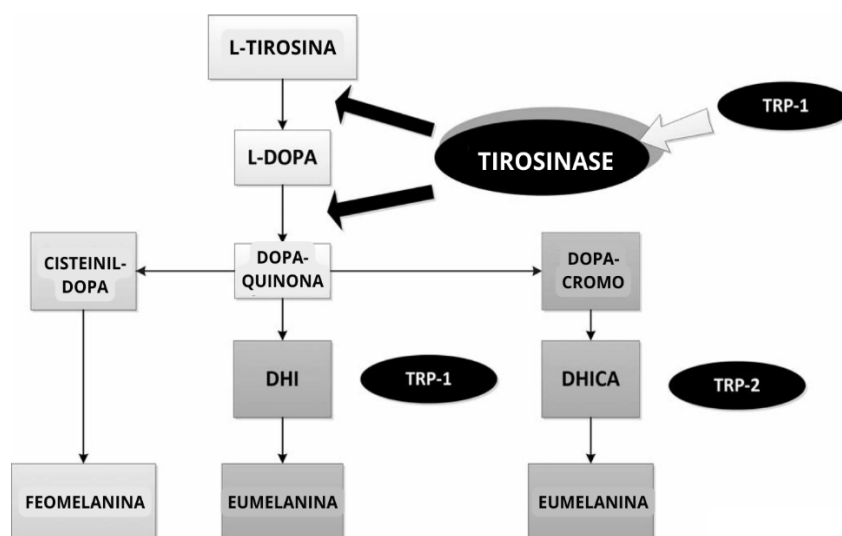


Figura 2: Esquema enzimático da melanogênese, que tem como objetivo a produção dos dois tipos de melanina, a feomelanina e eumelaninas, Imagem adaptada e traduzida (Ferreira dos Santos Videira; Lima Moura; Magina, 2013).

Para a realização de experimentos laboratoriais é comumente utilizada a L-tirosinase isolada do cogumelo *Agaricus bisporus*, que se apresenta na forma de uma proteína heterotetramérica de massa molecular total de 120 kDa (Lai *et al.*, 2016). A utilização da enzima advinda do cogumelo foi considerada estável e confiável para ensaios relacionando a síntese de melanina (Morosanova *et al.*, 2020).

A melanina é um pigmento responsável por dar cor aos cabelos, olhos e pele humanos e a tirosinase é limitante no processo da melanogênese, tendo em vista que a sua regulação negativa leva a inibição das reações de síntese (Pillaiyar; Manickam; Namasivayam, 2017). Os agentes inibidores dessa enzima tem sido um grande foco da indústria cosmética, pois podem ser utilizados, dentre outras funções, como despigmentantes da pele e utilizados em tratamentos de condições como melasma e vitiligo (Parvez *et al.*, 2006).

Algumas plantas já vem sendo estudadas como agentes inibidores da tirosinase como a soja (Bodurlar; Caliskan, 2022), o extrato aquoso de arroz fermentado vermelho (Wu *et al.*, 2003), os extratos vegetais de *Chenopodium album*, *Aloe ferox*, *Plantago lanceolata* (Thibane *et al.*, 2019), inclusive extrato brutos de plantas do cerrado brasileiro, como por exemplo a cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), barbatimão-verdadeiro (*Stryphnodendron adstringens*) (Souza *et al.*, 2012) e a amoreira negra (*Morus nigra*)

(De Freitas *et al.*, 2016). Tendo em vista os potenciais farmacológicos e cosméticos desses extratos é necessário otimizar o processo de extração para que sejam apresentados como uma alternativa terapêutica a ser produzida pela indústria farmacêutica.

2.3. Otimização da extração vegetal

A utilização de extratos vegetais ocorre amplamente em indústrias de diversos tipos de atuação como na de alimentos, para preservação de carnes e prevenir a formação de compostos não saudáveis em frituras (Bolouri *et al.*, 2022; Li *et al.*, 2023), na indústria cosmética, por conta das ações anti-inflamatórias e antioxidantes dos extratos (Bolouri *et al.*, 2022), e na indústria farmacêutica, para preparar medicamentos à base de plantas (Bolouri *et al.*, 2022). Logo, por serem utilizados de maneira tão difundida, a otimização da extração deve ser realizada, para diminuir custos e impactos ao meio ambiente.

Diversos estudos já foram realizados com o objetivo de otimizar a extração vegetal com diversas finalidades, como a otimização do extrato de *Millettia pulchra* utilizado para o tratamento de dores nas articulações entre outras condições (Vo *et al.*, 2021) e também no caso do extrato vegetal de Pau-ferro que tem, dentre diversas funções, atividade antifúngica e analgésica (Ferreira *et al.*, 2020). Para aprimorar a extração é necessário variar padrões já existentes no extrato padrão, como a quantidade de material vegetal, de solvente, método ou tempo de extração, assim como observamos nos estudos já realizados (Ferreira *et al.*, 2020; Vo *et al.*, 2021).

A melhoria da eficiência do processo extrativo é benéfica, porque pode aumentar o valor industrial do produto, pois a indústria tem a capacidade de economizar recursos como matéria prima, solvente e tempo (Kaur *et al.*, 2020; Pandey *et al.*, 2018).

3. OBJETIVOS

O estudo tem como objetivo principal otimizar a obtenção do extrato hidroetanólico de *Morus nigra* em comparação ao padrão realizado na rotina do Laboratório de Produtos Naturais (LaProNat), localizado na Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Para isso foram traçados os seguintes objetivos secundários:

1. Coletar as folhas da *Morus nigra* L., secar e pulverizar como o fim de obter a quantidade suficiente de material vegetal para a produção dos extratos;
2. Obter quatro diferentes tipos de extratos por meio da variação dos recursos tempo de extração e concentração de solvente;
3. Obter dois extratos por meio da variação de concentração de solvente e pelo método da maceração ativa utilizando o equipamento Infuzion 420®;
4. Comparar, por meio de análises cromatográficas utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a atividade de inibição de L-tirosinase, os seis extratos produzido com o padrão produzido comumente no LaProNat;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção do material vegetal

As folhas da espécie vegetal *Morus nigra* L. (Figura 3) foram coletadas no dia 14 de dezembro de 2023 de 10h às 11h, na Área Octogonal Sul 8 (-15.80156; -47.94357), localizada em Brasília- DF. Durante esse período foi registrado, na região temperatura ambiente variou de 23 a 25 °C e a umidade relativa estava a 75%, segundo dados obtidos através do Instituto Nacional de Meteorologia.



Figura 3: Folha de *Morus nigra* coletada no dia 13 de dezembro de 2023 e utilizada para a elaboração dos extratos. Imagem própria.

Logo em seguida o material botânico foi preparado no Laboratório de Produtos Naturais, localizado na Faculdade de Ciências da Saúde, e colocado na estufa à 40°C por 4 dias para retirar toda a umidade. Depois das folhas estarem totalmente secas, foi realizado o teste de teor de umidade das folhas em triplicata com amostras com média de 1,24 gramas utilizando um analisador de umidade com infra vermelho. Todo o material coletado foi pulverizado e armazenado em um recipiente de vidro sob abrigo da luz e da umidade.

O material botânico foi devidamente identificado conforme voucher da espécie (Fagg CW 2302) depositado no Herbário da Universidade de Brasília, pelo Prof. Christopher W. Fagg do Instituto de Biologia da Universidade de Brasília.

4.2. Obtenção dos extratos

Os seis extratos foram preparados no Laboratório de Produtos Naturais, com variações nos parâmetros utilizados no extrato realizado na rotina do laboratório e descrito por De Freitas *et al.*, 2016, incluindo concentração de solvente, método de maceração e tempo (Tabela 1). Quatro extratos foram obtidos por maceração passiva, ou seja, o material biológico em contato com o solvente. Dois desses foram preparados com um solvente de 60% de etanol e os outros dois com a solução de etanol a 80%. Em todos foram utilizados 100 g de folha pulverizada e 500 mL de solução solvente, em uma proporção de 1:5, variando a concentração de etanol.

Tabela 1: Extratos obtidos a partir das folhas de *Morus nigra* com variação da porcentagem de solvente, tempo de extração e método extrativo.

Extrato	Porcentagem de Etanol	Tempo de Extração	Método de Extração
E60.5	60%	5 dias	Maceração passiva
E80.5	80%	5 dias	Maceração passiva
E60.10	60%	10 dias	Maceração passiva
E80.10	80%	10 dias	Maceração passiva
Ea.60	60%	2 horas	Maceração ativa
Ea.80	80%	2 horas	Maceração ativa

Após 5 dias, foram realizadas a filtração à vácuo, rotaevaporação e teor de sólidos totais de uma amostra com o solvente a 60% (E60.5) e outra com o solvente a 80% (E80.5), com 10 dias os outros dois extratos (E60.10 e E80.10) passaram pelos mesmos processos dos anteriores, todos foram armazenados no congelador à -20 °C para depois serem utilizados nos demais ensaios.

Para a obtenção dos extratos de produzidos por maceração ativa, foi utilizado o equipamento Infuzion 420®, programado no modo de extração “Do it yourself (DIY)”, que, de acordo com o manual de uso, é possível a personalização dos ciclos de extração.

Logo para cada ciclo, Ea.60 e Ea.80, foram adicionados 50g de folhas mais 500 mL de solução solvente hidroetanólico, um com a concentração de 60% de etanol e o outro com 80%, em um ciclo de 2 horas à 25°C (77°F indicado pelo Infuzion 420®). Nos dois primeiros minutos de cada extração se inicia 5 pequenos ciclos de 20 segundos de rotação da lâmina com 5 segundos dela parada, para homogeneizar a planta com o solvente, em seguida o equipamento fases de 5 segundos em agitação com a lâmina e 45 segundos parada, até finalizar o tempo de extração. Assim como os de maceração passiva, eles foram filtrados à vácuo, rotaevaporados e armazenados à -20°C para a realização dos ensaios.

4.3. Teor de sólidos totais

Os teores de umidade e sólidos totais dos extratos hidraetanólicos filtrados foram obtidos por meio do analisador de umidade por infravermelho (Gehaka modelo IV200) em triplicata com amostras de cerca de 1mL para cada um dos seis extratos elaborados por maceração passiva (E60.5, E80.5, E60.10 e E80.10). O equipamento foi pré-aquecido a 100°C e configurado na função auto-dry.

4.4. Rendimentos extrativos

Para o calcular a porcentagem dos rendimentos extrativos da *Morus nigra*, após a rotaevaporação, relacionando o peso final dos extratos e a massa de folha utilizada no processo, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Peso final do extrato (g)}}{\text{Quantidade em gramas da folha pulverizada utilizada}} \times 100\%$$

Quantidade de folha utilizada: 100 g.

4.5. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

As análises de cromatografia líquida de alta eficiência foram realizadas no equipamento (Hitachi) com coluna (LiChroCART 150-4,6 Purospher STAR RP-18e -5 µm) e pré-coluna (LichroCART 4-4,6 Purospher STAR RP 18e - 5 µm) mantidas a 25°C com fluxo de 0,6 mL por minuto e tempo de análise de 55 minutos. Os eluentes usados foram: solução a 1% de ácido fosfórico (Tédia) na bomba A e acetonitrila

(Tédia) na bomba B em sistema de eluição por gradiente (Tabela 2). Com intervalo de análise de 230 a 400 nm e dados extraídos em 280 e 354 nm

Tabela 2: Gradiente de eluição para a análise por CLAE-DAD na detecção de flavonoides, utilizado nesse trabalho, retirado de Leite *et al.*, 2014 e adaptado por De Freitas *et al.*, 2016.

Tempo em minutos	(%) Solução de ácido fosfórico a 1%	(%) Acetonitrila	Fluxo em mL/minuto
0	90	10	0,6
40	70	30	0,6
51	90	10	0,6
55	90	10	0,6

Para o preparo da amostra foram pesados 6 mg dos extratos elaborados em balança analítica e solubilizados em 1 mL de Metanol grau HPLC. Todas as soluções obtidas foram filtradas com unidades de filtração Millex a 0,45 µm (Merck Millipore).

Os teores dos padrões ácido clorogênico e isoquercetina encontrados nos extratos das folhas de *M. nigra* foram comparados utilizando os valores das áreas dos picos que correspondem ao tempo de retenção dos marcadores que estão presentes na biblioteca do equipamento. Todos os cromatogramas correram em triplicata.

4.6. Inibição de tirosinase

Os ensaios de inibição de tirosinase foram realizados de acordo com os trabalhos anteriores do grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais. No estudo (Souza *et al.*, 2012) foi anteriormente testados os extratos aquoso, etanólico e hexânico de *M. nigra* para a inibição enzimática da tirosinase e somente o etanólico apresentou uma inibição significativa em relação aos demais, por isso o solvente extrator escolhido foi o etanol.

Para realizar os testes de inibição de tirosinase, todos os extratos foram anteriormente diluídos de maneira seriada com tampão fosfato de sódio a 50 mM pH 6,5, atingindo as seguintes concentrações: 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL, 125 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15,62 µg/mL, 7,1 µg/mL, 3,9 µg/mL, 1,96 µg/mL, 0,97 µg/mL e 0,49 µg/mL.

Todos os seis extratos (E60.5, E80.5, E60.10, E80.10, Ea.80 e Ea.60) foram testados em triplicata numa placa de 96 poços utilizando 60 µL de tampão de fosfato de sódio a 200mM e pH 6.5, junto com 10 µL das diluições dos extratos e 50 µL de tirosinase a 250 U/mL (Sigma Aldrich, T382), então esperou 5 minutos à 25°C, protegido da luz. Após esse tempo, foi adicionado mais 100 µL de L-tirosina 100 mM em cada um dos poços em seguida a placa foi incubada por 20 minutos, à 25°C, também ao abrigo da luz.

Para o branco, necessário para descontar nos valores das leituras, adicionou-se 100 uL do tampão fosfato de sódio a 50 mM e pH 6,5, para substituir a L-tirosina de uma linha da placa. Já para o controle positivo foi feito, em triplicada, a adição de soluções ácido kójico (Merck - K3125) nas mesmas concentrações dos extratos de *Morus nigra*. Além dos extratos elaborados, foi testado também o extrato padrão realizado pelo laboratório e descrito em De Freitas *et al.*, 2016 (extrato padrão), nas mesmas concentrações da diluição seriada citada anteriormente.

Após 20 minutos, efetuou-se a leitura da placa em um leitor de microplaca (Beckman Coulter, modelo DTX 800, Lagerhausstrasse - Austria) à 450nm. Assim, possibilitou-se o cálculo da inibição pela fórmula:

$$\text{Inibição de tirosinase (\%)} = 100 - \frac{[(C - A) \times 100]}{C}$$

Em que C corresponde à absorbância do controle positivo da enzima, feito com ácido kójico e A a absorbância das concentrações dos extratos testado subtraído do branco.

4.7. Análise estatística

A partir dos valores obtidos da CLAE-DAD e da absorbância do ensaio de inibição da tirosinase foi possível a construção de curvas, de área de picos de retenção e outro de inibição para cada um dos extratos e o controle positivo dado por porcentagem de inibição versus o logaritmo da concentração dos extratos vegetais. Utilizando o software GraphPad Prism 5.0®, sendo possível prever uma possível concentração dos flavonoides e também deduzir o IC₅₀ de cada preparação feita a partir da *Morus nigra*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Rendimento

Após os procedimentos para a obtenção dos extratos e rotaevaporados, o rendimento obtido nos seis extratos foi calculado e demonstrando na Tabela 3.

Tabela 3: Rendimento calculado para os extratos obtidos, a partir do peso final.

Extrato	Peso Final	Rendimento
E60.5	6,033g	6,0%
E80.5	5,019 g	5,0%
E60.10	6,250 g	6,2%
E80.10	4,880 g	4,8%
Ea.60	8,53 g	8,5%
Ea.80	7,02 g	7,02%

Levando em consideração os valores encontrados pode-se afirmar que a maceração ativa apresentou um maior rendimento em consideração aos demais. Contudo, mesmo com essa diferença entre os métodos e o que foi obtido de extrato, não é possível afirmar se eles extraíram ou não mais metabólitos, principalmente os relacionados à inibição da L-tirosinase, logo são precisos dos outros ensaios para ter desfechos mais detalhados.

Em Chen *et al.*, 2022 que compara a efetividade da maturidade da extração de frutos e folhas com a diferentes solventes, é possível observar que a extração com 60% de etanol em folhas maduras de *Morus alba*, que equivale ao elaborado, obteve um dos melhores rendimentos, igual a 6,28 % (Chen *et al.*, 2022) muito similar aos obtidos nos ensaios.

5.2. Porcentagem dos sólidos totais

O teor de sólidos totais dos extratos hidraetanólicos filtrados foram obtidos para cada um dos extratos elaborados por maceração passiva, em triplicada, por meio por meio do analisador de umidade por infravermelho (Gehaka® modelo IV200). Os valores médios dos resultados e seus respectivos desvios padrão estão demonstrados no gráfico presente na Figura 4 em comparação ao extrato feito na rotina do LaProNat (Extrato padrão).

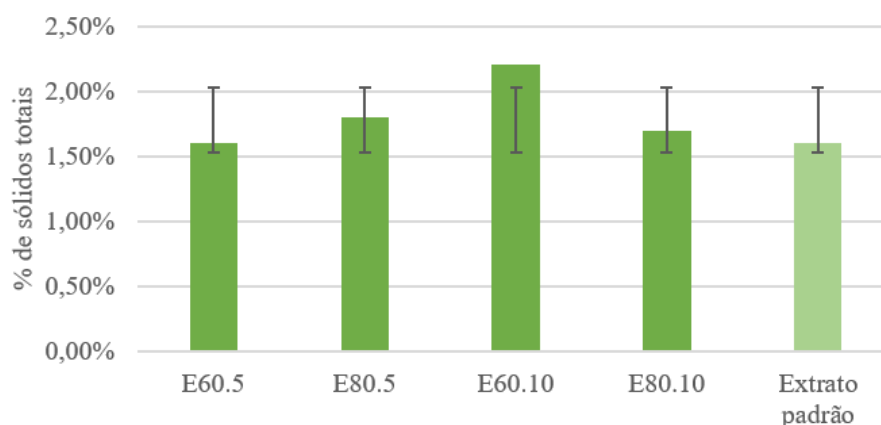


Figura 4: Valor médio e desvio padrão da porcentagem de sólidos totais de cada extrato filtrado de *Morus nigra* em comparação ao padrão também realizado por maceração passiva.

Para cada um dos extratos tivemos um valor de médio para o E60.5 igual a 1,60%, para o E80.5 de 1,80%, já para o E60.10 igual a 2,20% e o E80.10 de 1,70% e para o padrão de 1,60%. Considerando que o extrato padrão necessita de 95% de etanol na solução hidroetanólica e 10 dias para ser realizado, conseguimos, em termos de sólidos totais, resultados próximos em extratos utilizando quantidades significativamente menores de etanol e em menor tempo.

Analisando o trabalho realizado por De Freitas *et al.* em 2016, que baseou-se para a elaboração do extrato padrão, apresentou a porcentagem de sólidos totais média de 1,63%, resultado similar que obtivemos no extrato elaborado de acordo com a rotina do laboratório e os otimizados. Isso pode indicar que todos os extratos otimizados, tanto em relação a mudança da concentração de solvente quanto a alteração do tempo de extração, tiveram capacidades similares de extração de componentes da folha da *Morus nigra* capazes de inibir a L-tirosinase.

5.3. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo (CLAE-DAD)

Após a elaboração de todos os seis extratos foram realizadas corridas no Cromatograma, com diluições de 6 mg/mL, analisadas em diferentes comprimentos de onda, 280 nm (figura 5), 330 nm (figura 6) e 354 nm (figura 7).

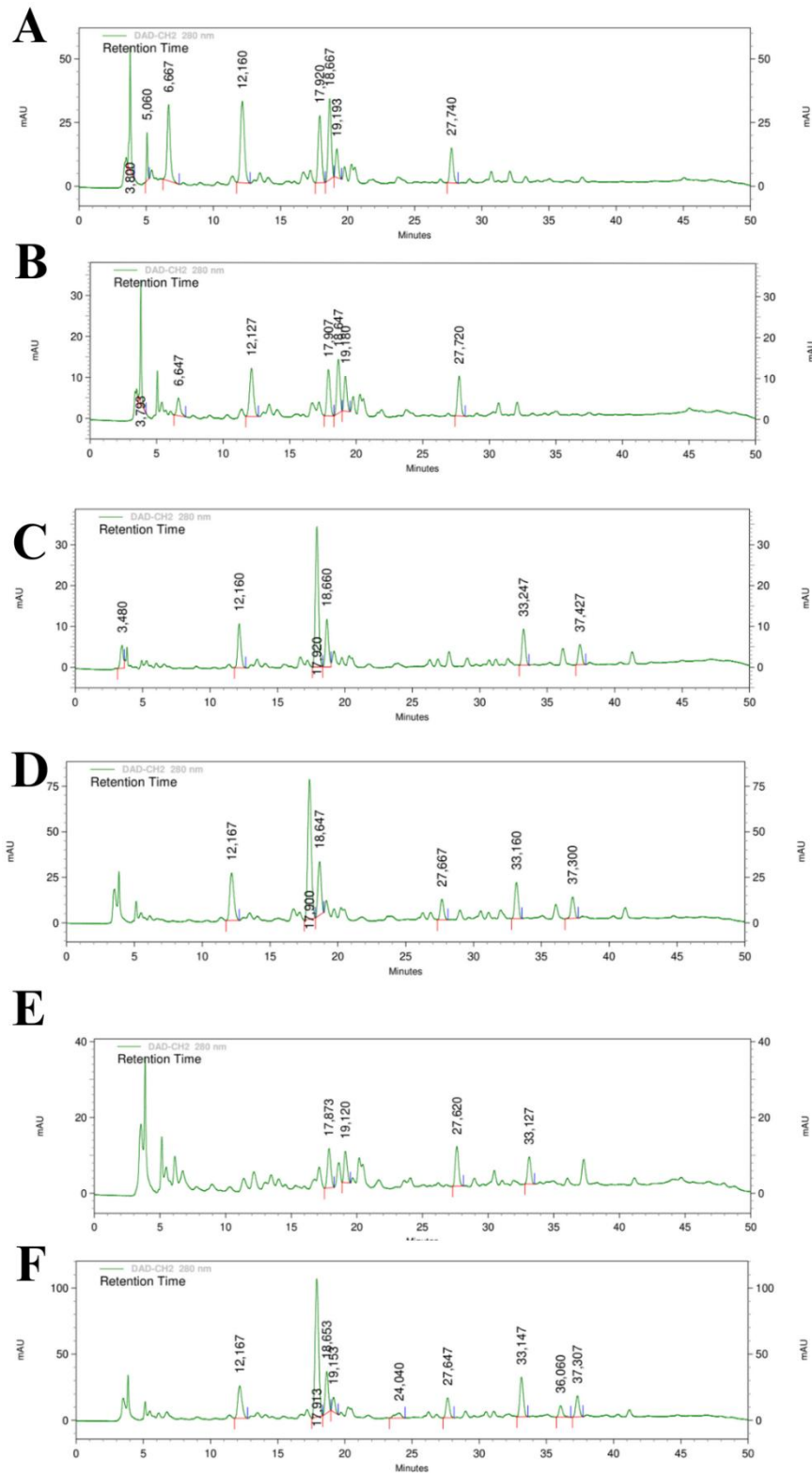


Figura 5: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 280 nm

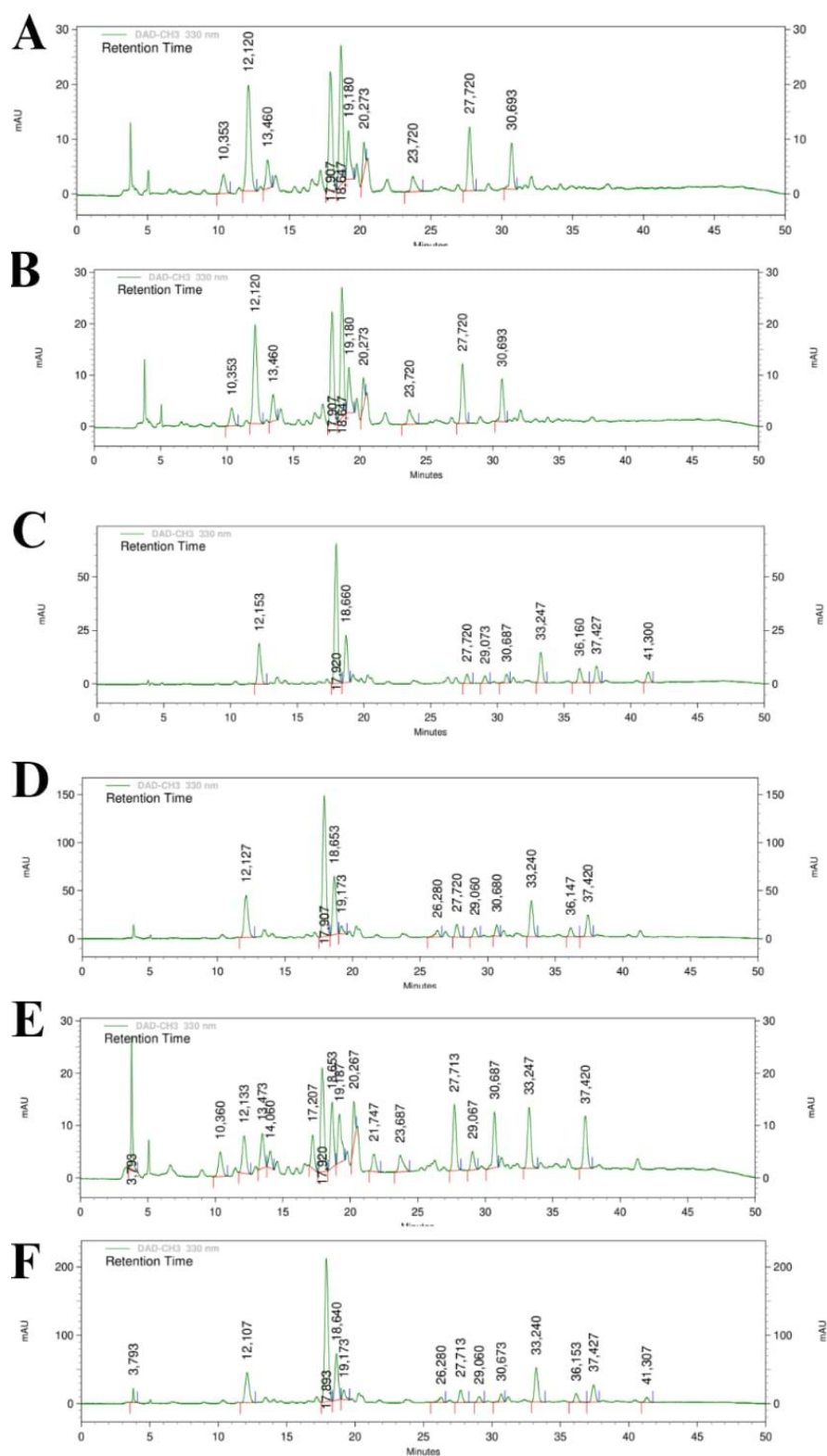


Figura 6: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 330 nm

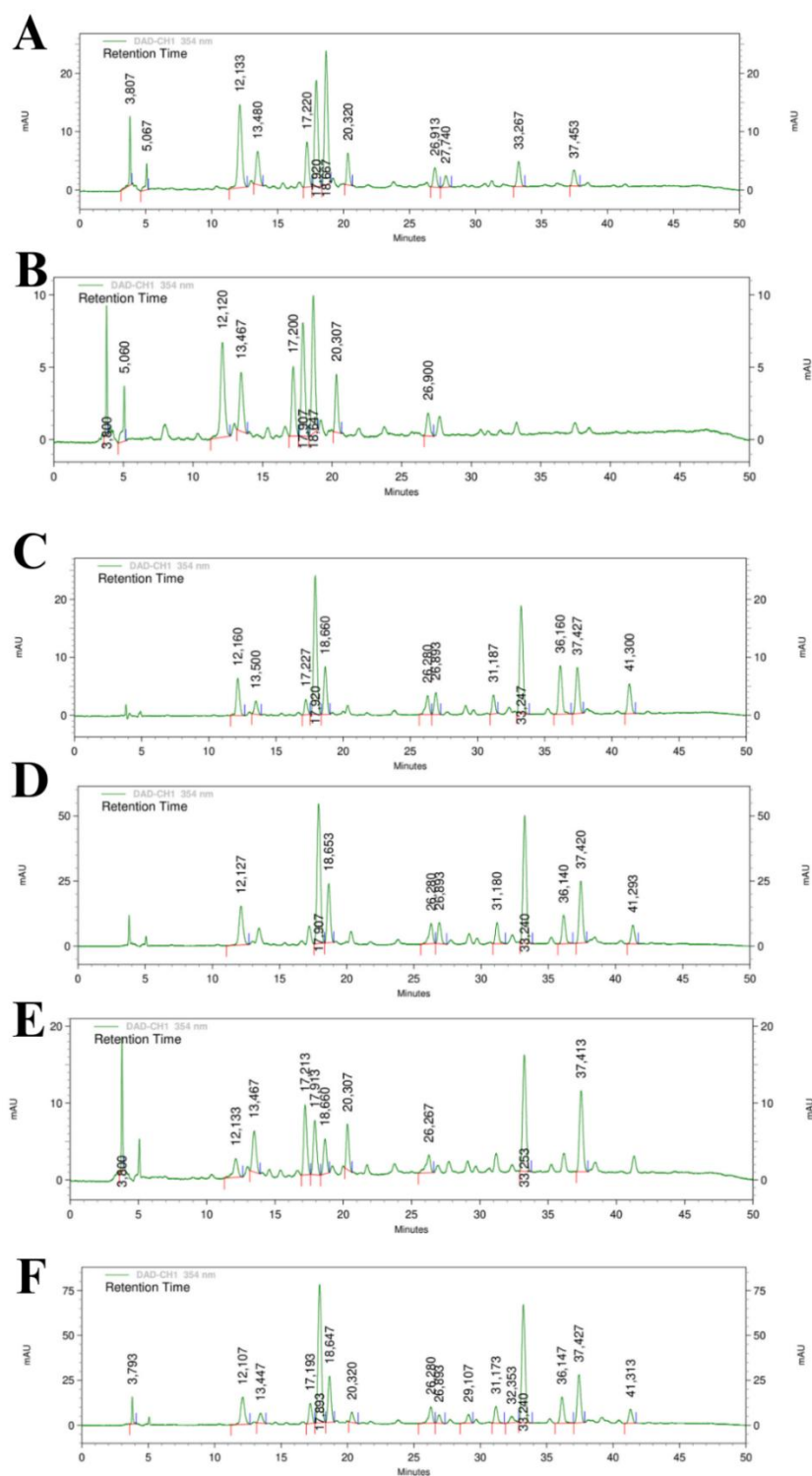


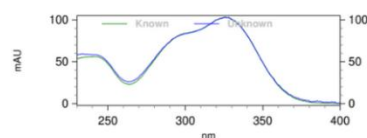
Figura 7: Cromatogramas dos extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) a 354 nm

Todos os perfis gerados foram comparados aos padrões de Ácido Clorogênico e Isoquercetina assim como em De Freitas *et al.*, 2016. Observando os cromatogramas realizados com a leitura a 280nm (Figura 5) e os tempos de retenção em torno de 17 minutos é possível

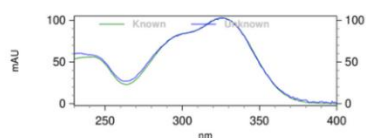
observar bem as áreas de pico de ácido clorogênico de cada extrato, o que pode nos sugerir uma concentração do composto, de acordo com a área do pico, a porcentagem de similaridade com o padrão, demonstrado na Tabela 4 e Figura 8.

Tabela 4: Relação entre os tempos de retenção dos extratos, pureza do pico, média das áreas dos picos e similaridade de cada padrão obtido por meio de cromatogramas com leitura à 280nm.

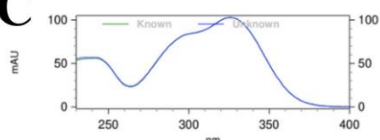
Extrato	Tempo de retenção (minutos)	Pureza do pico	Média das áreas (mAU*min)	Porcentagem de similaridade com o padrão de ácido clorogênico
Extrato Padrão	17,127	0,96	3.425.211	99,98 %
E60.5	17,920	1,000000	1.648.322	99,98 %
E60.10	17,907	1,000000	1.055.805	99,96 %
E80.5	17,920	1,000000	6.157.704	100 %
E80.10	17,947	1,000000	5.405.794	100 %
Ea.60	17,873	1,000000	754.655	99,89 %
Ea.80	17,913	1,000000	8.420.908	100 %

A

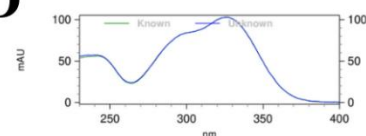
Hit #: 2
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 0,9998

B

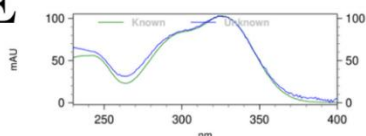
Hit #: 2
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 0,9996

C

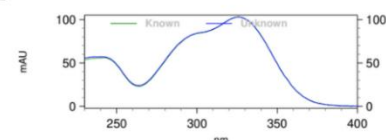
Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 1,0000

D

Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 1,0000

E

Hit #: 3
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 0,9989

F

Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\Ácido Clorogênico_Met Morus
 18112024.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Artur\Data\18112024\AcClo
 ro40-Rep1.dat
 Component: Spectrum @ 17,68 Min
 Retention Time: 17,6800 Min
 Similarity: 1,0000

Figura 8: Os extratos E60.5 (A), E60.10 (B), E80.5 (C), E80.10 (D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) apresentaram tempos de retenção entre 17,873 e 17,947 minutos, com alta similaridade ($\geq 0,9989$) em relação ao pico padrão de ácido clorogênico.

Ao comparar os cromatogramas do extrato padrão com os E80.10 e o Ea.80 (Figura 9), observa-se pelos picos que, além de uma leve diferença no tempo de retenção, que os picos dos extratos otimizados apresentam uma área maior, o que se pode inferir que foi extraído uma concentração maior de ácido clorogênico.

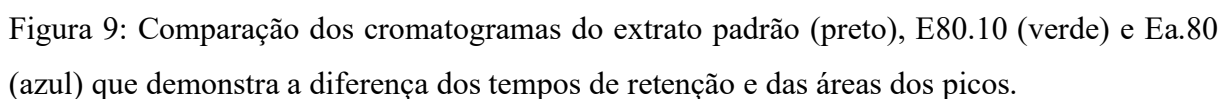
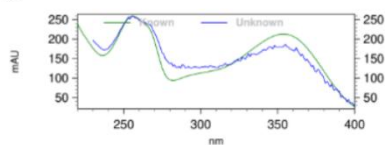
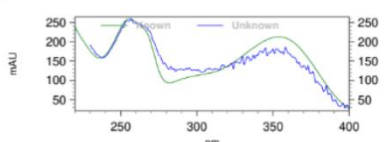


Tabela 5: Relação entre os tempos de retenção dos extratos, pureza do pico, áreas dos picos e as melhores similaridades obtidas com o padrão de isoquercetina, observados nos cromatogramas com leitura à 354nm.

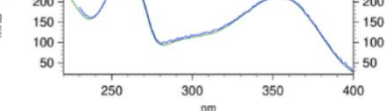
Extrato	Tempo de retenção (minutos)	Pureza do pico	Áreas (mAU*min)	Porcentagem de similaridade com o padrão de isoquercetina
Extrato padrão	32,290	0,996900	1.809.379	99,94 %
E60.5	17,220	0,877574	497.708	99,12 %
E60.10	17,200	0,829578	313.985	99,01 %
E80.5	33,247	1,000000	1.259.306	99,99 %
E80.10	33,240	1,000000	3.376.238	99,98 %
Ea.60	33,253	0,991586	1.045.093	99,81 %
Ea.80	33,240	1,000000	4.536.987	99,98 %

A

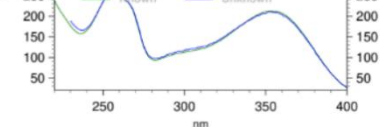
Hit #: 3
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9912

B

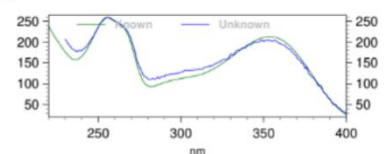
Hit #: 3
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9901

C

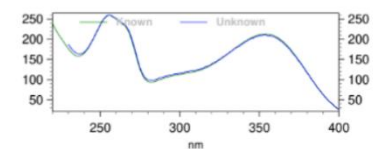
Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9999

D

Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9998

E

Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9981

F

Hit #: 1
 Library: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Biblioteca de
 padrões\isoquercitrina 100 µg_mL.lib
 Source: C:\EZChrom
 Elite\Enterprise\Projects\Patricia\08052015\isoquerci
 trina 100 ug_mL-Rep3.dat
 Component: isoquercitrina 100 ug_mL
 Retention Time: 28,6800 Min
 Similarity: 0,9998

Figura 10: Comparação dos picos cromatográficos a 354 nm - os extratos E60.5 (A) e E60.10 (B) apresentaram tempos de retenção em torno de 17,2 minutos, enquanto E80.5 (C), E80.10

(D), Ea.60 (E) e Ea.80 (F) mostraram tempos próximos a 33,24 minutos. As similaridades com o pico padrão de isoquercetina variaram entre 0,9901 e 0,9999.

O tempo de retenção do padrão de isoquercetina comparado com os picos dos extratos analisados equivale a 28,6800 minutos. Os extratos elaborados com menos etanol obtiveram um tempo de retenção muito menor, pureza do pico, área e porcentagem de similaridade inferiores aos demais testados, porém os demais tiveram atividades significantes. Analisando os extratos com 80 % de etanol podem-se inferir que o isoquercetina também apresenta uma afinidade melhor com etanol do que com água e que o tempo pode interferir diretamente na extração do flavonoide, além de a maceração ativa apresentar uma grande capacidade extrativa do componente.

5.4. Avaliação da inibição da enzima L-tirosinase

Com o objetivo de analisar a capacidade de inibição da L-tirosinase dos extratos otimizados, todos os seis elaborados em laboratório e o padrão foram testados e comparados ao controle de ácido kójico (AK) (Merck - K3125), já conhecido como um potente inibidor da enzima. Os valores de IC_{50} foram determinados a partir da construção de uma curva de dose-resposta das diluições seriadas realizadas dos extratos e do padrão, construídas através do software GraphPad Prism 5.0® e podem ser observados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados dos valores de IC_{50} calculados pelo GraphPad Prism 5.0® a partir dos dados obtidos das leituras das placas de inibição da L-tirosinase.

Extrato	IC_{50} em $\mu\text{g/mL}$
Ácido Kójico	9,592
Extrato Padrão	70,70
E60.5	294,1
E60.10	72,19
E80.5	71,01
E80.10	33,42
Ea.60	190,5
Ea.80	513,2

O IC₅₀, ou também $\frac{1}{2}V_{m\acute{a}x}$ como é referido no livro Princípios de bioquímica de Lehninger (NELSON; COX, 2018), consiste na concentração de inibidor necessária para inibir 50% da ação da enzima, possível observar nesse ensaio pois a não inibição leva a oxidação da L-Dopa pela enzima que produz dopaquinona, que apresenta um tom alaranjado. Na figura 11 pode-se observar as curvas de inibição do ácido kójico e do extrato padrão realizado na rotina do LaProNat, para o padrão positivo foi obtido um IC₅₀ médio de 9,592 µg/mL, já para o extrato de *M. nigra* um valor médio de 70,70 µg/mL, um valor muito alto em comparação ao AK, porém de acordo com estudos já realizados esse resultado já era esperado e não tira a relevância do potencial inibitório do extrato vegetal (De Freitas *et al.*, 2016).

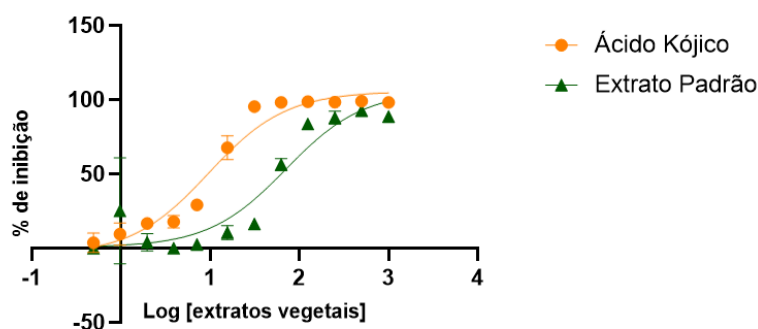


Figura 11: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do Extrato Padrão (E.P), já realizado na rotina do laboratório.

Ao observar as curvas elaboradas com as porcentagens de inibição dos extratos feitos por maceração passiva, porém com uma menor concentração de solvente e em 5 dias, em comparação aos valores de AK (Figuras 12 e 13), pode-se concluir que o valor de IC₅₀ médio do E80.05 é de 71,01 µg/mL, este muito similar ao atingido pelo extrato padrão, porém utilizando menos recursos, logo pode ser uma ótima alternativa para a economia de solvente. Já para o E60.5 apresentou um valor médio de 294,9 µg/mL, com uma relevância extremamente baixa, pois para esse extrato é necessária uma concentração muito alta para inibir 50 % da L-tirosinase em comparação ao padrão positivo.

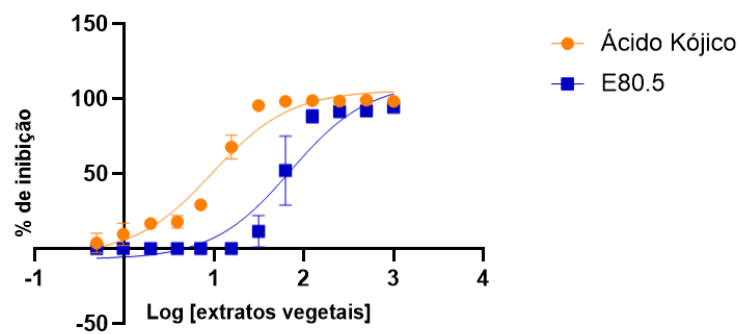


Figura 12: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do Extrato E80.5, que apresenta um valor de IC_{50} muito próximo ao extrato padrão, se tornando uma possibilidade de otimização.

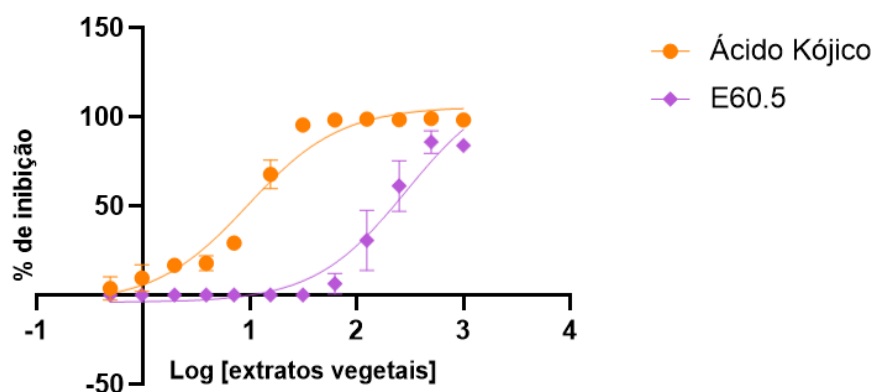


Figura 13: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E60.5, que apresenta um valor médio de IC_{50} muito alto em relação ao AK.

Já as curvas de inibição dos extratos elaborados com menos etanol, porém na mesma quantidade de dias do padrão (E60.10 e E80.10) em comparação ao padrão positivo (Figuras 14 e 15) apresentaram um valor médio de IC_{50} utilizando 80 % de etanol igual a 33,42 $\mu\text{g/mL}$, refletindo que na mesma quantidade de dias, mas com 15 % a menos de concentração de solvente, pode-se ter a capacidade de extração de componentes inibitórios mais efetivos. Contudo, utilizando menos 35 % de etanol, caso do E60.10, foi atingido um IC_{50} de 72,19 $\mu\text{g/mL}$, valor muito similar ao mesmo parâmetro do extrato padrão, mas utilizando uma quantidade significativa menor de solvente orgânico, podendo ser uma alternativa melhor para o meio ambiente e mais barata.

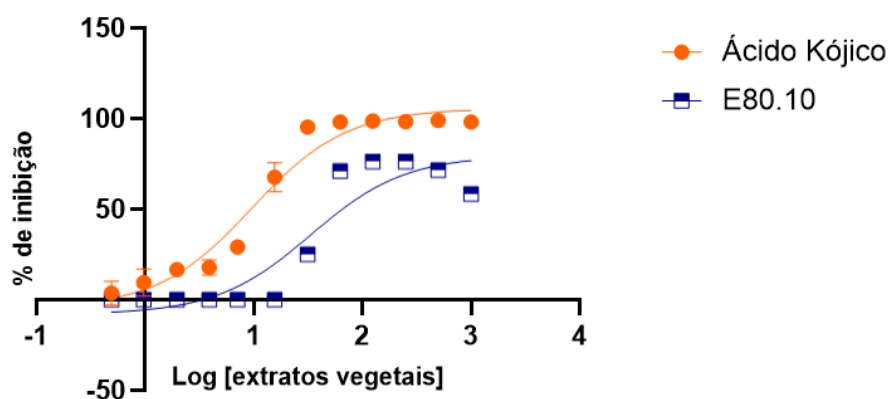


Figura 14: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E80.10 que apresenta um IC₅₀ bem inferior aos anteriormente testados.

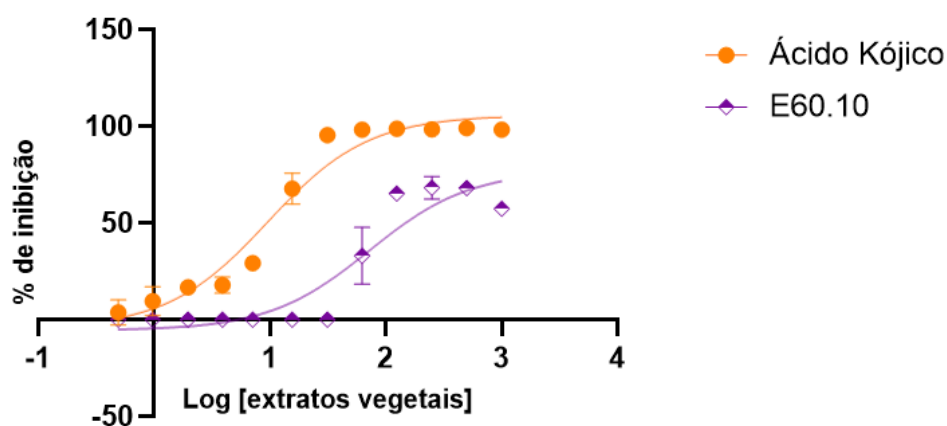


Figura 15: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico (AK), padrão positivo, e o potencial de inibição do E60.10 que apresenta um IC₅₀ do extrato elaborado muito similar ao do Extrato Padrão.

Analisando as curvas de porcentagem de inibição construídas a partir dos valores obtidos pelos extratos elaborados por maceração ativa (figura 16 e 17), com a utilização do Infuzion 420®, os valores de IC₅₀ são mais altos comparados ao controle positivo e aos demais extratos, sendo o IC₅₀ médio do Ea.60 igual a 190,5 µg/mL e o do Ea.80 equivalente a 513,2 µg/mL. Pode-se associar a obtenção de valores tão altos o curto tempo do ciclo de extração realizados, 2 horas, em comparação ao tempo de extração de todos os demais.

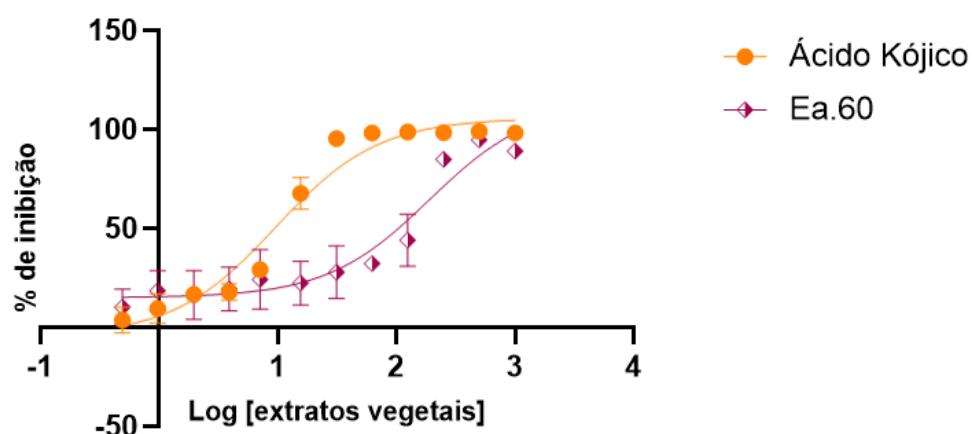


Figura 16: Curva de inibição de L-tirosinase construída pelo software GraphPad Prism 5.0®, que compara o potencial de inibição do ácido kójico, padrão positivo, e o potencial de inibição do Ea.60 que apresenta um IC₅₀ muito acima do que os demais extratos, apresentando um potencial de inibição bem inferior aos demais.

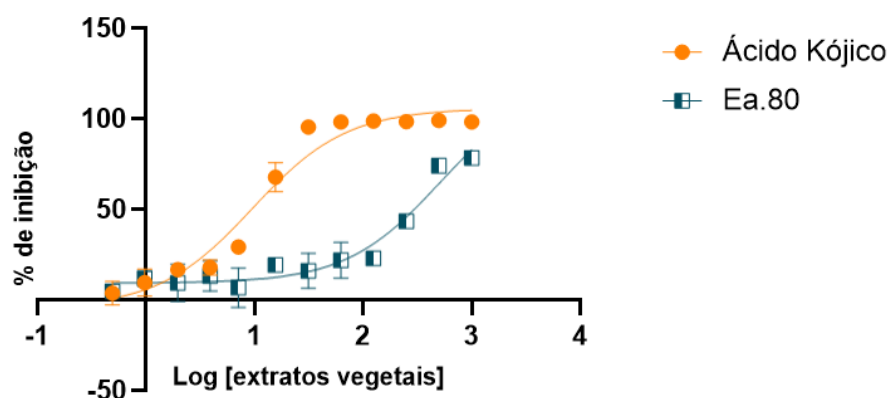


Figura 17: Curva de inibição de L-tirosinase que compara o potencial de inibição do ácido kójico e o potencial de inibição do Ea.80, demonstrando que seu potencial de inibição é bem inferior ao padrão e aos demais estratos elaborados e testar, apresentando um IC₅₀ mais elevado que os demais.

Em Jeon; Choi, 2019, foram realizados extratos com as folhas de *M. alba* utilizando metanol e foi particionado em éter (Et₂O), acetato de etila (EtOAc) e n-butanol (n-BuOH) que também foram testados frente a inibição de L-tirosinase. O IC₅₀ da inibição de tirosinase com o extrato bruto foi igual a 130.93±1.32 µg/mL, superior aos anteriormente testados nesse trabalho, entre eles o extrato padrão, o E60.5, o E80.5, o E60.10 e E80.10. Já as frações testadas apresentaram valores menores, porém similares aos dos extratos hidraetanólicos testados, com

exceção ao Et₂O em que o IC₅₀ para inibição da tirosinase foi igual a 20.73±0.83 µg/mL (Jeon; Choi, 2019).

Já em Koirala *et al.*, 2018, é demonstrado que os compostos fenólicos presentes nos extratos vegetais de *Morus* sp, incluindo a *Morus nigra*, que potencialmente apresentam a ação inibitória da L-tirosinase. Entre esses compostos estão Kuwanon G e Mulberrofuran G, isolados de extrato da raiz de *Morus alba*, que apresentaram um IC₅₀ frente a inibição de tirosinase de 67,6 ± 2,11 µM/mL (29,65±0,92 µg/mL) e 6,35 ± 0,45 µM/ml (2,26±0,16 µg/mL), respectivamente (Koirala *et al.*, 2018).

Portanto diversos estudos nos demonstram que o gênero *Morus* sp. apresentam diversos compostos fitoquímicos capazes de inibir a ação da tirosinase, o que pode levar ao clareamento de regiões hiperpigmentadas. Foi observado que compostos isolados do extrato da raiz de *Morus alba*, como os fenólicos, apresentam um IC₅₀ bem inferior em comparação aos extratos brutos (Koirala *et al.*, 2018), porém bem similar ao E80.10, de IC₅₀ igual a 33,42 µg/mL, demonstrando ser uma alternativa viável ao Extrato padrão, principalmente para a economia de solventes orgânicos. Nota-se também na literatura a viabilidade da utilização de outros compostos orgânicos, como o metanol, para a extração (Jeon; Choi, 2019), contudo, analisando suas partições, é observado uma ação similar e até superior nos extratos elaborados com etanol e testados.

6. CONCLUSÃO

Tendo em vista todos os resultados discutidos, pode-se inferir que os flavonoides de maneira isolada, isoquercetina e ácido clorogênico, não atuam diretamente para a inibição da L-tirosinase, visto no extrato Ea.80, que obteve no cromatograma, uma área de pico maior que o extrato padrão e um IC₅₀ muito elevado comparado ao padrão e ao ácido kójico. Porém, é importante ressaltar que a alteração de alguns parâmetros pode melhorar o desempenho do extrato frente ao padrão no ensaio enzimático, como a diminuição da concentração de etanol de 95% para 80%, diminuindo custo e impactos ao meio ambiente.

Outro fator observado, comparando os IC₅₀ de todos os extratos otimizados com o padrão e AK, que teve significância é o tempo de extração, pois os de maceração ativa, realizada em 2 horas, tiveram valores altos em relação aos que extraíram em 5 ou 10 dias.

Por enquanto, na literatura ainda não existem muitos estudos atuais acerca de extratos hidraetanólico de folhas de *Morus nigra* e sua ação antitirosinase, quanto menos as análises de

quais compostos são responsáveis por essa ação. Todavia, já há na literatura estudos sobre essa ação utilizando outras espécies *Morus sp.* e também sobre extratos de outras porções da planta.

7. REFERÊNCIAS

AMOREIRA – MORUS NIGRA – LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA DE PLANTAS. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://sites.usp.br/jardimdabotanicausprp/amoreira-morus-nigra/>. Acesso em: 13 dez. 2024.

AWASTHI, Arvind K. *et al.* Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **BMC genetics**, [s. l.], v. 5, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14715088/>. Acesso em: 19 set. 2024.

BODURLAR, Yildiz; CALISKAN, Mahmut. Inhibitory activity of soybean (*Glycine max* L. Merr.) Cell Culture Extract on tyrosinase activity and melanin formation in alpha-melanocyte stimulating Hormone-Induced B16-F10 melanoma cells. **Molecular Biology Reports**, [s. l.], 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35733058/>.

BOLOURI, Parisa *et al.* Applications of Essential Oils and Plant Extracts in Different Industries. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 27, n. 24, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36558132/>. Acesso em: 19 nov. 2024.

BRAUNER, Cristiano *et al.* Exposure to organic solvents and hepatotoxicity. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, [s. l.], v. 55, n. 10, p. 1173–1178, 2020. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934529.2020.1779532>. Acesso em: 28 nov. 2024.

CHEN, Centhya *et al.* The Effect of Maturity and Extraction Solvents on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Mulberry (*Morus alba*) Fruits and Leaves. **Molecules**, [s. l.], v. 27, n. 8, p. 2406, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9029729/>. Acesso em: 25 jan. 2025.

DE ALMEIDA, José Eduardo; CANTO FONSECA, Tamara. Mulberry germplasm and cultivation in Brazil. **FAO Animal Production And Health Paper**, [s. l.], 2000. Disponível em: <https://www.fao.org/4/X9895E/x9895e06.htm>.

DE FREITAS, Marcela Medeiros *et al.* Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 9, p. e0163130, 2016. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0163130>. Acesso em: 29 ago. 2024.

ENDERLE, Isabelle *et al.* Maternal occupational exposure to organic solvents and intrauterine growth in the ELFE cohort. **Environmental Research**, [s. l.], v. 224, 2023. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935122025142?via%3Dihub>.

FERREIRA, Magda R.A. *et al.* EXTRACTION OF MONOMERS OF HYDROLYSABLE TANNINS FROM PODS OF *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. QUEIROZ: EFFECTS OF SOLVENT AND AMOUNT OF DRUG USING RESPONSE-SURFACE METHODOLOGY AND *DESIRABILITY* PROFILE. **Química Nova**, [s. l.], v. 43, n. 6, p. 738–746, 2020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/pndDBRTnTr6gGPY65HBbdXz/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 22 nov. 2024.

FERREIRA DOS SANTOS VIDEIRA, Inês; LIMA MOURA, Daniel Filipe; MAGINA, Sofia. Mechanisms regulating melanogenesis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s. l.], v. 88(1), p. 76–83, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962013000100009>.

JEON, Young Hee; CHOI, Sang Won. Isolation, Identification, and Quantification of Tyrosinase and α -Glucosidase Inhibitors from UVC-Irradiated Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves. **Preventive nutrition and food science**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 84–94, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31008101/>. Acesso em: 27 jan. 2025.

KAUR, Anudeep *et al.* Optimization of extraction conditions of Angelica archangelica extract and activity evaluation in experimental fibromyalgia. **Journal of food science**, [s. l.], v. 85, n. 11, p. 3700–3710, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33047814/>. Acesso em: 22 nov. 2024.

KOIRALA, Prashamsa *et al.* Structure–Activity Relationship of the Tyrosinase Inhibitors Kuwanon G, Mulberrofuran G, and Albanol B from *Morus* Species: A Kinetics and Molecular Docking Study. **Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry**, [s. l.], v. 23, n. 6, p. 1413, 2018. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6099663/>. Acesso em: 27 jan. 2025.

LAI, Xuelei *et al.* Crystal structure of recombinant tyrosinase-binding protein MtaL at 1.35 Å resolution. **Acta Crystallographica. Section F, Structural Biology Communications**, [s. l.], v. 72, n. Pt 3, p. 244, 2016. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4774885/>. Acesso em: 28 dez. 2024.

LAI, Xuelei *et al.* Structure and Function of Human Tyrosinase and Tyrosinase-Related

Proteins. **Chemistry – A European Journal**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 47–55, 2018. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.201704410>. Acesso em: 22 out. 2024.

LEITE, Caio Fernandes Monteiro *et al.* Determination of rutin in *Erythroxylum suberosum* extract by liquid chromatography: applicability in standardization of herbs and stability studies. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, [s. l.], v. 13(2), p. 135–143, 2014. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85631009002.pdf>.

LERNER, A B *et al.* Mammalian tyrosinase; preparation and properties. **Biol Chem**, [s. l.], 1949. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18112101/>.

LI, Cuicui *et al.* Utilization of plant extracts to control the safety and quality of fried foods-A review. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 2310–2345, 2023. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37010776/>. Acesso em: 19 nov. 2024.

LIM, Sung Ho; CHOI, Chang-Ik. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. [s. l.], 2019. Disponível em: www.mdpi.com/journal/nutrients. Acesso em: 12 out. 2024.

MOROSANOVA, Maria A. *et al.* *Agaricus bisporus* Crude Extract: Characterization and Analytical Application. **Molecules (Basel, Switzerland)**, [s. l.], v. 25, n. 24, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33352884/>. Acesso em: 28 dez. 2024.

NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. PRINCÍPIOS DE BIOQUÍMICA DE LEHNINGER - martinsfontespaulista. [s. l.], v. 1, p. 1312, 2018.

OLIVEIRA, Tatiane Nelí Ferreira Lima de *et al.* *Morus nigra* L.: revisão sistematizada das propriedades botânicas, fitoquímicas e farmacológicas. **Arch Health Invest**, [s. l.], v. 7, p. 450–454, 2018. Disponível em: <https://www.archhealthinvestigation.com.br/ArcHI/article/view/3023>.

PADILHA, Marina M. *et al.* Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy research : PTR**, [s. l.], v. 24, n. 10, p. 1496–1500, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20878700/>. Acesso em: 19 set. 2024.

PANDEY, Aseesh *et al.* Optimization of ultrasonic-assisted extraction (UAE) of phenolics and antioxidant compounds from rhizomes of *Rheum moorcroftianum* using response surface methodology (RSM). **Industrial Crops and Products**, [s. l.], v. 119, p. 218–225, 2018.

PARVEZ, Shoukat *et al.* Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents. **Phytotherapy Research**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. 921–934, 2006. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ptr.1954>. Acesso em: 23 out. 2024.

PILLAIYAR, Thanigaimalai; MANICKAM, Manoj; NAMASIVAYAM, Vigneshwaran. Skin whitening agents: medicinal chemistry perspective of tyrosinase inhibitors. **JOURNAL OF ENZYME INHIBITION AND MEDICINAL CHEMISTRY**, [s. l.], 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28097901/>.

SOUZA, Paula Monteiro *et al.* Plants from Brazilian Cerrado with potent tyrosinase inhibitory activity. **PloS one**, [s. l.], v. 7, n. 11, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23173036/>. Acesso em: 23 out. 2024.

THIBANE, V. S. *et al.* The cosmetic potential of plants from the Eastern Cape Province traditionally used for skincare and beauty. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 122, p. 475–483, 2019.

VALLECILLOS, Laura *et al.* Passive sampling of volatile organic compounds in industrial atmospheres: Uptake rate determinations and application. **The Science of the total environment**, [s. l.], v. 666, p. 235–244, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30798234/>. Acesso em: 28 nov. 2024.

VO, Thanh Hoa *et al.* Quantification and Optimization of Ethanolic Extract Containing the Bioactive Flavonoids from *Millettia pulchra* Radix. **Molecules**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 3641, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8232251/>. Acesso em: 22 nov. 2024.

WATSON, L.; DALLWITZ, M.J. **The families of flowering plants: descriptions, illustrations, identification, and information retrieval**. [S. l.], 1992. Disponível em: <https://www.delta-intkey.com/angio/www/moraceae.htm>. .

WU, Li-Chen *et al.* Inhibitory effect of red koji extracts on mushroom tyrosinase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12848491/>.