



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA PARA A AMAZÔNIA – CITA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DA
AMORA PRETA: *MORUS NIGRA* L. DA FAMÍLIA
*MORACEAE***

JOSENILSON DA SILVA COSTA

RIO BRANCO, AC
Agosto/2017

JOSENILSON DA SILVA COSTA

**PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DA
AMORA PRETA: *MORUS NIGRA* L. DA FAMÍLIA
*MORACEAE***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia, da Universidade Federal do Acre, como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências e Inovação Tecnológica**.

Orientador: ADRIANO ANTONIO SILVA

RIO BRANCO, AC

Agosto/2017

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

C837f Costa, Josenilson da Silva, 1992-
Perfil fitoquímico e avaliação de atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas da amora preta: *Morus Nigra L.* da família *Moraceae* / Josenilson da Silva Costa. – 2017.
88 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós-Graduação, Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia - CITA, Rio Branco, 2017.
Inclui referências bibliográficas e apêndices.
Orientador: Prof. Adriano Antonio Silva.

1. Plantas medicinais. 2. Amora preta. 3. Estudo fitoquímico. I. Título.

CDD: 633.88

Bibliotecária: Maria do Socorro de O. Cordeiro

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

PERFIL FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DA AMORA
PRETA: *MORUS NIGRA L.* DA FAMÍLIA *MORACEAE*

JOSENILSON DA SILVA COSTA

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 05/05/2017

Prof. Dr. Adriano Antonio Silva
Universidade Federal do Acre
(Orientador)

Prof. Dr. Rogério Antonio Sartori
Universidade Federal do Acre
(Membro interno)

Profa. Dra. Shirani Kaori Haraguchi
Universidade Federal do Acre
(Membro externo)

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, um Homem simples, mas com muito conhecimento de vida, o Senhor sempre me ensinou a importância de batalhar pelos meus sonhos, de nunca desistir sem ao menos tentar. Eu agradeço imensamente por todo o apoio e pela oportunidade que o Senhor me deu, a oportunidade de estudar.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **Adriano Antonio Silva**, pela confiança depositada e por aturar minhas constantes dúvidas quanto aos procedimentos analíticos que nortearam essa investigação. Muito obrigado pela forma paciente que o senhor conduziu toda esta pesquisa.

Ao Prof. Dr. **Ilmar Bernardo Graebner**, que cedeu de bom grado um espaço no laboratório para a realização desta pesquisa.

Aos Técnicos do laboratório de Química da UFAC, na pessoa de **Joelton Barata** e **Guaracy Maia**, muito obrigado pelo apoio quando necessitei de equipamentos e reagentes.

À banca composta pelos professores Dr. **Rogério Sartori** e Dra. **Shirani Haraguchi**, suas contribuições foram de suma importância para o aprimoramento das discussões aqui elaboradas.

Agradeço ao apoio técnico do Instituto de Análises Forense da Polícia Civil do Estado do Acre, especialmente na pessoa de **Giuliano Cezarotto**. Muito obrigado por toda a atenção e pelo tempo que foi reservado às minhas análises.

Agradeço imensamente à perita **Nathália Mai** da Polícia Federal do Estado do Acre, pelo acolhimento e por toda paciência que teve ao responder meus inúmeros e-mails. Muito obrigado mesmo! O mundo necessita de mais profissionais dedicados e humildes como você.

Agradeço aos “assistentes de plantão”, **Franklandy Miranda** e **Gabriel Mitsuro**, pela companhia e ajuda nos longos dias no laboratório. Suas conversas e histórias da conspiração, definitivamente fizeram as horas ficarem menos estressantes. Meu muito obrigado!!!

Agradeço imensamente aos meus amigos, em especial àqueles que vêm acompanhando minha carreira acadêmica, **Abimael, Eliane, Elias, Jorteline, Josina, Mareilse, Maria Helena, Matheus, Rayan, Tatiane, Willian**, eu sei que não nos vemos e tão pouco nos falamos com tanta frequência, infelizmente cada qual teve que seguir o seu rumo na vida, entretanto, vocês nunca sairão das minhas lembranças,

das minhas orações e principalmente, da minha vida. Muito obrigado a cada um de vocês. **Sucesso a todos!!!**

A minha **família** por SEMPRE apoiar-me nos estudos, especialmente meu **Pai** (Jonas) e minha **Avó** (Dalva), palavras são poucas para agradecer a proteção e carinho que eu recebi e ainda recebo de vocês ao longo desses anos. Também não posso esquecer da minha **Irmã** (Josi) que desde sempre esteve/está comigo, me apoiando e incentivando em todos os meus projetos da vida. **Amo vocês!!!**

Nunca poderei esquecer de agradecer ao meu porto seguro, Aquele que me levanta a cada queda, Aquele que me consola a cada decepção. **Obrigado Deus!!!**

Ao se falar em pesquisa, há uma corriqueira afirmação: “**Não podemos inventar a roda!**” Temos que partir daquilo que outros já fizeram e trazer outras contribuições.

Attico Chassot

RESUMO

A utilização de Plantas Medicinais é de grande importância para a Química dos produtos naturais, visto que os metabólitos secundários (compostos fitoquímicos) são cada vez mais estudados por consequência dos efeitos benéficos que apresentam no organismo animal. Por vezes, tais plantas medicinais são encontradas nas próprias residências domiciliares, como por exemplo, as árvores frutíferas, que é o caso da espécie estudada, *Morus nigra L* (vulgo amora preta) da família Moraceae. Este estudo foi impulsionado por meio de saberes populares (ou tradicionais), visto que na medicina popular, o chá das folhas da espécie estudada (*Morus nigra L*) serve para diversos tratamentos de doenças, como por exemplo, dores de cabeça, cólicas menstruais, insônia, além de relatos acerca de possível ação de reposição hormonal em mulheres na menopausa. Todavia, quando feito um levantamento bibliográfico da espécie, identificou-se estudos voltados à caracterização química e botânica bem como pesquisas relacionadas com o fruto da espécie, mas poucos relacionados às folhas em si. Isso motivou a investigação dessas possíveis ações bioativas presentes nas folhas da amora preta. O objetivo desta pesquisa foi verificar o perfil fitoquímico bem como as atividades antioxidante e antimicrobiana presentes no extrato bruto metanólico, obtidos por maceração de folhas amora preta e suas frações, produtos da partição líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol bem como da fração remanescente (fração aquosa). Após a realização da prospecção fitoquímica, foi possível concluir que existem flavonoides, taninos/fenóis, alcaloides bem como esteroides e triterpenos presentes em todas as frações do extrato metanólico das folhas da amora preta. Já as saponinas, estão presentes apenas na fração aquosa. A respeito da quantificação de compostos fenólicos bem como de flavonoides totais, foi possível identificar valores próximos a outros trabalhos com a espécie estudada. Com relação aos testes para avaliar as atividades biológicas, atividade antioxidante e antimicrobiana, foi verificado que, as folhas da espécie estudada apresentam uma significativa atividade antioxidante (comparado ao BHT), com exceção apenas da fração hexânica, não houve atividade antimicrobiana do extrato e frações para as bactérias testadas. A respeito da identificação dos compostos presentes, a análise no IV constatou a presença de grupos O-H, C-H (alcanos), C=O, CH₂, C-O e C-X (haletos de alquila), já a análise em CG-EM, foi possível identificar a presença de ácidos graxos (ácido esteárico, ácido láurico) e terpenos/esteroides (megastigmatrienona, β-sitosterol e Loliolida). Com o presente estudo, foi possível ratificar alguns saberes populares com relação à utilização das folhas da amora preta como chá em uso para fins medicinais, todavia, ressalta-se a necessidade de estudos mais aprofundados e com técnicas mais específicas, como por exemplo, testes *in vivo* para comprovar a eficácia dos compostos identificados quando do tratamento das doenças apontadas na literatura por meio dos mesmos.

Palavras-chave: Amora preta. Atividade antioxidante. *Morus nigra L*. Estudo fitoquímico. Fenóis totais. Flavonoides totais.

ABSTRACT

The use of Medicinal Plants is of great importance for the Chemistry of natural products, whereas the secondary metabolites (phytochemical compounds) are increasingly studied as a result of the beneficial effects that present in the animal organism. Sometimes, such medicinal plants are found in their own household residences, such as the fruit trees, which is the case of the species studied, *Morus nigra* L. (BlackBerry) of *Moraceae* family. This study was driven through from popular knowledge (or traditional), whereas in folk medicine, the tea from the leaves of the specie studied (*Morus nigra* L) serves for various disease treatments, as for example, headaches, menstrual cramps, insomnia, in addition to reports about possible action of hormone replacement in menopausal women. However, when a bibliographic survey was done of this specie, it was identified studies for chemical characterization and botany as well as research related to the fruit of the specie, but a few related to leaves itself. This motivated the investigation of these possible bioactive actions present in blackberry leaves. The objective of this research was to verify the phytochemical profile as well as antioxidant and antimicrobial activities present in the methanolic crude extract obtained by maceration of blackberry leaves and their fractions, liquid-liquid partition products with hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol as well as remaining fraction (aqueous fraction). After the completion of the phytochemical prospecting, it was possible to conclude that there are flavonoids/tannins, phenols, alkaloids as well as steroids and triterpenes that are present in all fractions of the methanolic crude extract of blackberry leaves. Already the saponins are present only in the aqueous fraction. Regarding the quantification of phenolic compounds and flavonoids, it was possible to identify values close to other works with the specie studied. With regard to the tests to assess the biological activity, antioxidant and antimicrobial activity, it was verified that, the leaves of the specie studied have a significant antioxidant activity (compared to BHT), with the exception only of the hexane fraction, there was no antimicrobial activity of the extract and fractions for the tested bacteria. Regarding the identification of the present compounds, the analysis in the IR verified the presence of groups O-H, C-H (alkanes), C = O, CH₂, C-O and C-X (alkyl halides), in the CG-MS analysis, it was possible to identify a presence of fatty acids (stearic acid, lauric acid) and terpenes/steroids (megastigmatrienone, β -sitosterol and Loliolide). With the present study, it was possible to ratify some popular knowledges regarding the use of blackberry leaves as tea in medicinal use, nevertheless, emphasizes the need to more in-depth studies and with more specific techniques, such as tests *in vivo* to prove the efficacy of the compounds identified in the treatment of the diseases reported in the literature therewith.

Keywords: Blackberry. *Morus nigra* L. Antioxidant activity. Phytochemistry. Total phenols. Total Flavonoids.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas químicas da bixina (1), genipina (2) e a andirobina (3). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 327)	19
Figura 2. Estrutura dos corantes brazilina (4), brazileína (5) e da morina (6). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 327).	20
Figura 3. Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900: Salicina (7); Ácido salicílico (8); AAS (9). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 328).	21
Figura 4. Núcleo fundamental dos flavonoides. Fonte: Adaptada de (SIMÕES et al., 1999, p.491).	23
Figura 5. Fluxograma de trabalho.....	27
Figura 6. Amoreira-preta. Fonte: (Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental)	30
Figura 7. Representação das folhas, flores e frutos da amora-preta. (TUTIN et al., 1996)	30
Figura 8. Estrutura do mornigrol E (1) e mornigrol F (2). Fonte: (WANG et al., 2009)	32
Figura 9. Estrutura química do Germanicol, Ácido betúlico e β -Sitosterol. Fonte: (PADILHA et al., 2009; 2010a; 2010b)	33
Figura 10. Fluxograma da obtenção do extrato bruto metanólico das folhas de <i>Morus nigra</i> L. por maceração exaustiva.	36
Figura 11. Fluxograma da partição do extrato bruto etanólico de folhas de <i>Morus nigra</i> L.	37
Figura 12. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteu. Fonte: (OLIVEIRA et al., 2009, p. 697).	43
Figura 13. Curva analítica de ácido gálico para determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	44
Figura 14. Curva analítica de quercetina para determinação de flavonoides totais por complexação com alumínio.	46
Figura 15. Espectrômetro modelo Frontier™ IR/NIR da PerkinElmer	47
Figura 16. Equipamento utilizado na CG-EM.	48
Figura 17. Espectros IV das frações das folhas da amora preta.	57

Figura 18. Cromatograma da FAcOEt obtido por CG-EM.	59
Figura 19. Cromatograma da FDicMet obtido por CG-EM.	60
Figura 20. Espectro de massas e estrutura do ácido esteárico.	62
Figura 21. Espectro de massas e estrutura do ácido láurico.	62
Figura 22. Fragmentação do ácido hexadecanóico por impacto de elétrons (a) e formação do fragmento m/z 60 por rearranjo de McLafferty (b). Fonte: Adaptado de Sánchez (2012) e Silverstein et al. (2007).	63
Figura 23. Espectro de massas e estrutura da megastigmatrienona.	63
Figura 24. Fragmentação da megastigmatrienona por impacto de elétrons. Fonte: Oliveira (2014).	64
Figura 25. Espectro de massas e estrutura do β -sitosterol.	65
Figura 26. Fragmentação do β -sitosterol por impacto de elétrons. Fonte: Oliveira (2010).	65
Figura 27. Espectro de massas e estrutura da Loliolida.	67
Figura 28. Fragmentação da Loliolida por impacto de elétrons.	67
Figura 29. Reação química entre o BHT e o radical DPPH \cdot . Fonte: (OLIVEIRA et al., 2009, p. 697).	68
Figura 30. Mudança da coloração púrpura para amarela resultante do processo de redução do DPPH \cdot pelas folhas da amora preta.	69
Figura 31. Representação esquemática do princípio de funcionamento do teste microbiano disco-difusão em ágar.	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Subclasses de Flavonoides e as principais características biológicas e farmacológica conhecidas (adaptada de SIMÕES et al., 1999, p. 492).	24
Tabela 2. Principais grupos químicos presentes nas frações do extrato metanólico das folhas da espécie <i>Morus nigra</i> L.....	51
Tabela 3. Determinação do teor de Fenóis Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.....	53
Tabela 4. Valores encontrados em outra pesquisa para a determinação do teor de Fenóis Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.....	54
Tabela 5. Determinação do teor de Flavonoides Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.	54
Tabela 6. Valores encontrados em outra pesquisa para a determinação do teor de Flavonoides Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta. ..	55
Tabela 7. Identificação de compostos propostos pela análise por CG-EM das frações FAcOEt e FDicMet.	61
Tabela 8. Resultados para a atividade antioxidante baseadas no IC ₅₀	69

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

EROs	Espécie Reativa de Oxigênio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
OMS	Organização Mundial da Saúde
UV	Ultravioleta
IV	Infravermelho
IAF	Instituto de Análises Forenses
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada com Espectrometria de Massa
MeOH	Álcool Metílico
EBMeOH	Extrato bruto metanólico
FHex	Fração hexânica
FDicMet	Fração metanólica
FBuOH	Fração butanólica
FAq	Fração aquosa
SE	Solução estoque
FT	Fenois totais
EqAG	Equivalentes de ácido gálico
FAcOEt	Fração acetato de etila
AA	Atividade antioxidante
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
IC ₅₀	Concentração inibitória capaz de suprimir 50 % da forma radicalar
BHT	(2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol)
ATR	Attenuated Total Reflectance
DP	Desvio padrão
BHA	butil-hidroxi-anisol
BHT	<i>terc</i> -butil-hidroxi-quinona
THBP	tri-hidroxi-butil-fenona
GP	galato de propila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Plantas Medicinais e a Química dos Produtos Naturais.....	17
1.1.1. Produtos Naturais no Brasil	18
1.1.2. O Desenvolvimento dos Fármacos a partir dos Produtos Naturais	20
1.2. Compostos Fenólicos e Flavonoides	21
1.2.1. Compostos Fenólicos	21
1.2.2. Flavonoides	22
1.3. Atividade Antioxidante e sua ação no organismo humano.....	24
1.4. Hipótese	26
1.5. Objetivos.....	26
1.5.1. Objetivo Geral.....	26
1.5.2. Objetivos Específicos	26
1.6. Justificativa	26
1.7. Fluxograma de trabalho.....	27
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	28
2.2. Gênero Morus.....	28
2.3. Espécie Morus nigra L.....	29
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	34
3.1. Material Vegetal.....	34
3.2. Reagentes utilizados.....	34
3.3. Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto das Folhas	35
3.3.1. Preparação do Extrato Bruto das Folhas	35
3.3.2. Fracionamento do Extrato Bruto das Folhas	36
3.4. Prospecção Fitoquímica.....	38
3.4.1. Solução Estoque.....	38
3.4.2. Pesquisa de Flavonoides.....	38

3.4.3.	Pesquisa de Taninos/Fenóis	39
3.4.4.	Pesquisa de Saponinas	39
3.4.5.	Pesquisa de Catequinas.....	39
3.4.6.	Pesquisa de Ácidos Orgânicos Livres	39
3.4.7.	Pesquisa de Polissacarídeos.....	40
3.4.8.	Pesquisa de Açúcares Redutores.....	40
3.4.9.	Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos	40
3.4.10.	Pesquisa de Proteínas.....	41
3.4.11.	Pesquisa de Antraquinonas.....	41
3.4.12.	Pesquisa de Carotenoides.....	41
3.4.13.	Pesquisa de Alcaloides.....	42
3.4.14.	Pesquisa de Depsídeos e Depsídonas.....	42
3.4.15.	Pesquisa de Esteroides e Triterpenos	42
3.5.	Determinação Quantitativa de Fenóis Totais por Espectroscopia na Região do UV-vis.....	43
3.6.	Determinação Quantitativa de Flavonoides Totais por Espectroscopia na Região do UV-vis	45
3.7.	Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV).....	46
3.8.	Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectro de Massa (CG-EM).....	47
3.9.	Avaliação da atividade antioxidante.....	49
3.10.	Avaliação da atividade antimicrobiana	50
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
4.1.	Prospecção Fitoquímica.....	51
4.2.	Análise Quantitativa de Fenóis Totais.....	53
4.3.	Análise Quantitativa de Flavonoides Totais	54
4.4.	Análises do Infravermelho	56
4.5.	Identificação de compostos via CG-EM	58
4.6.	Avaliação da Atividade Antioxidante.....	68

4.7. Avaliação da Atividade Antimicrobiana	71
CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS.....	75
APÊNDICES	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais e a Química dos Produtos Naturais

Por vezes, ao se falar em Ciência, nos vem à mente processos altamente sofisticados, como por exemplo, estudos em laboratórios e ensaios experimentais, e, nos esquecemos de processos mais rudimentares, que os quais, permitiram o avanço da Ciência tal como hoje conhecemos, como é o caso da etnociência. Segundo Pinheiro e Giordan (2010), a existência de práticas científicas, ou tradições científicas, e de atividades na vida diária da população com componentes científicos (citados anteriormente por processos rudimentares), que tendo ou não consciência de estar fazendo ciência, caracteriza-se como um *status* de etnociência, pois existe uma prática científica. A exemplo disto, temos a utilização de plantas medicinais em sociedades tradicionais¹ a fim de tratamento e cura das mais diversas enfermidades.

A utilização de Plantas Medicinais é de grande importância para a Química dos produtos naturais, visto que os metabólitos secundários (compostos fitoquímicos) são cada vez mais estudados por consequência dos efeitos benéficos que apresentam no organismo animal. Como aponta Beecher (2003), os compostos fitoquímicos apresentam atividades biológicas e, na maioria das vezes, promovem algumas alterações químicas e/ou enzimáticas bem como orgânicas, impactando desta forma, na forma de se conceber a saúde do organismo que ingere. Por vezes, tais plantas medicinais são encontradas nas próprias residências domiciliares, como por exemplo, as árvores frutíferas.

Mas onde tudo isso começou? Essa é uma pergunta um tanto quanto complicada de se responder, pois existem muitas controvérsias quando a uma data específica. Todavia, acerca da forma de utilização, muitos pesquisadores acreditam que as causas das primeiras utilizações de produtos naturais como forma de medicamentos advêm da busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas.

¹ Segundo Diegues e Arruda (2001, p. 27) são consideradas Sociedades Tradicionais "grupos humanos diferenciados sob o ponto de vista cultural, que reproduzem historicamente seu modo de vida de forma mais ou menos isolada, com base na cooperação social e nas relações próprias com a natureza".

Segundo Viegas e Bolzani (2006), podem-se observar vários exemplos da utilização de produtos naturais durante o desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental, como a civilização Egípcia, Chinesa e Greco-romana. Sendo que tais civilizações desenvolveram uma medicina tradicional com tanta influência, que mesmo em dias atuais, muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados tanto pela busca incessante da compreensão da ação de tais drogas no organismo, quanto pela busca de isolamento dos princípios ativos.

Para além da utilização dos produtos naturais como técnicas medicinais, na Idade Média, foram encontradas inúmeras substâncias nocivas ao organismo biológico, em outras palavras, foram descobertos uma vasta quantidade de venenos, que por sua vez, eram destinados à defesa, caça, e ao uso como drogas ilícitas (VIEGAS e BOLZANI, 2006).

1.1.1 Produtos Naturais no Brasil

A história da utilização dos produtos naturais teve um papel muito significativo por parte dos índios para a descoberta dos fármacos que hoje são comercializados. Muitas civilizações indígenas da América do Norte que faziam uso da pintura corporal e/ou dos cabelos para fins estéticos ou ainda como forma de comunicação – mesmo antes de existir relatos de escrita existiram pinturas em cavernas e sítios sagrados – como por exemplo, tem-se a utilização, de corantes naturais, como bixina, genipina e a andirobina cuja utilidade estava na estética, e na religiosidade além de bálsamos (para curar enfermidades), gomas e essências (utilizados para repelir insetos e deixar ambientes cheirosos) (VIEGAS e BOLZANI, 2006). Na **Figura 1**, pode-se observar as estruturas químicas da bixina (1), genipina (2) e a andirobina (2):

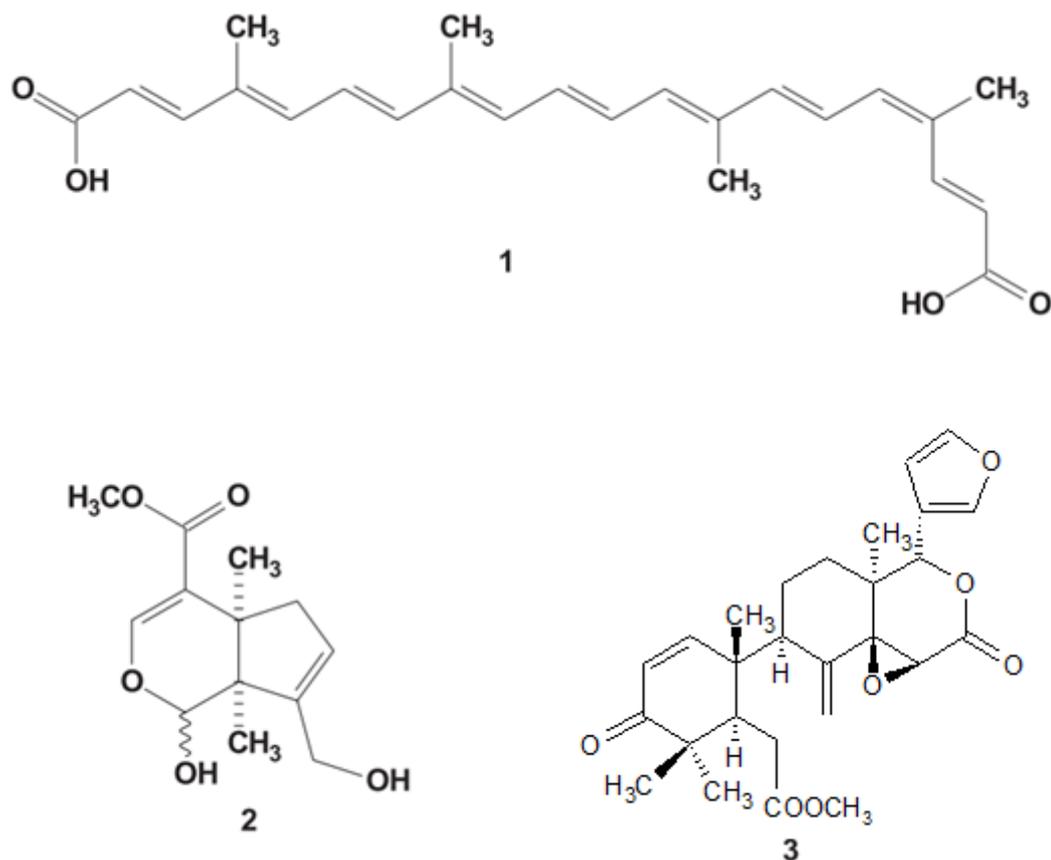


Figura 1. Estruturas químicas da bixina (1), genipina (2) e a andirobina (3). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 327)

Falando especificamente dos produtos naturais no Brasil, Pinto (1995) aponta a existência da utilização de práticas com os mesmos bem antes da chegada dos portugueses. Apesar dos índios, que povoavam o atual território brasileiro, já usarem os produtos naturais, assim como outros povos como os americanos mencionados anteriormente, o mundo tomou conhecimento dos corantes e plantas medicinais por meio da exploração e comercialização das especiarias (produtos) naturais. Grande parte de tais especiarias, adivinham da exploração exacerbada do pau-brasil (*Cesalpinia echinata*), e deste, eram obtidos corantes, como por exemplo a brazilina e fenoldienônico (corantes de cor vermelha). Na **Figura 2**, tem-se as estruturas da brazilina (4), da brazileína (5) e da morina (6), esta última, extraída de *Chlorophora tinctoria*, também utilizada como corante e amplamente comercializada na Europa por muitos anos (VIEGAS e BOLZANI, 2006).

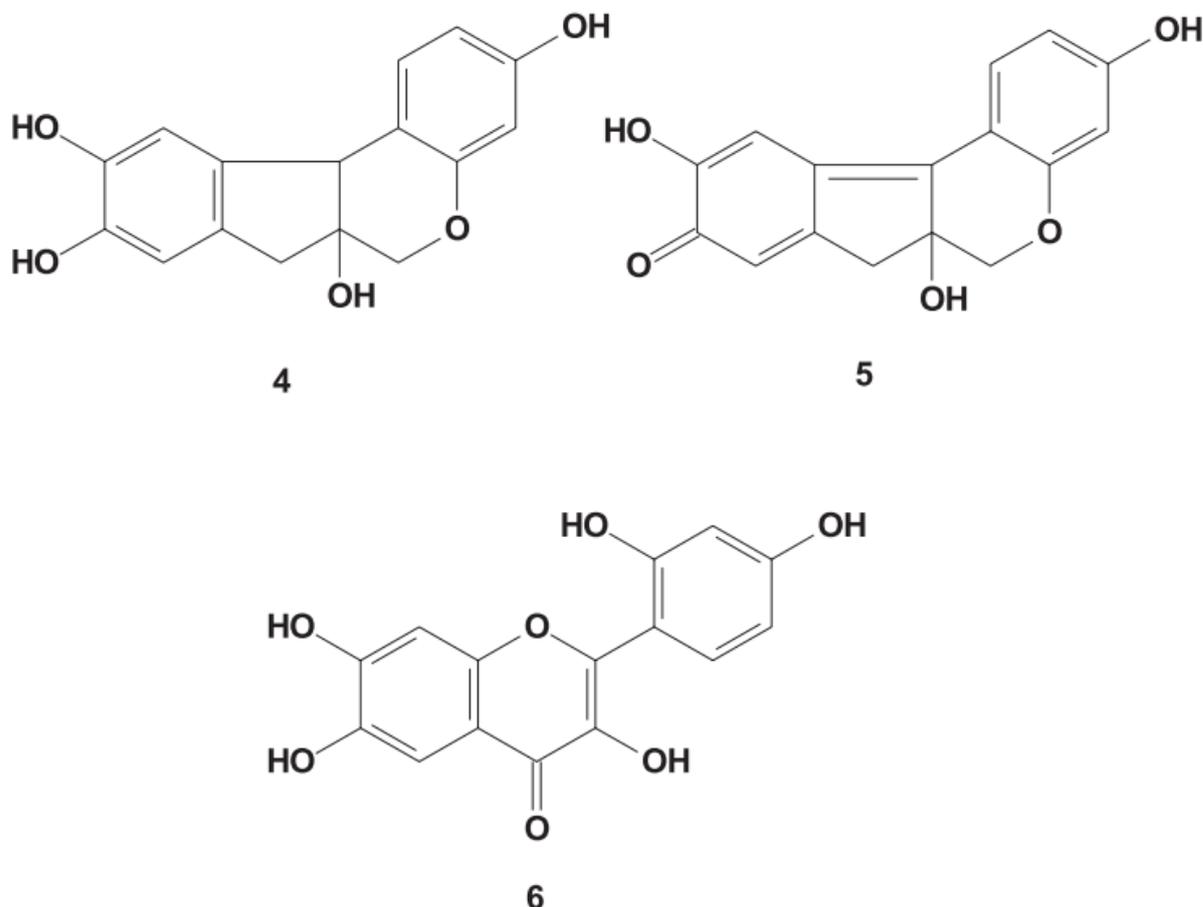


Figura 2. Estrutura dos corantes brazilina (4), brazileína (5) e da morina (6). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 327).

1.1.2. O Desenvolvimento dos Fármacos a partir dos Produtos Naturais

É notório que a Química dos Produtos Naturais se desenvolveu a partir do vasto conhecimento da natureza por meio dos povos primitivos e indígenas, entretanto, como aponta Viegas e Bolzani (2006), tem-se como o possível grande marco na história dos fármacos, a descoberta dos salicilatos, estes obtidos por meio da *Salix alba* (Salgueiro) em meados de 1757, quando Edward Stone associou o sabor amargo dessa espécie ao gosto dos extratos obtidos a partir da *Cinchona*.

Cinquenta anos mais tarde, na Europa, especificamente no Instituto de Farmacologia de Munique (Alemanha), Johann A. Buchner isolou pela primeira vez uma pequena porção de salicina (7, **Figura 3**). A partir desta descoberta, inúmeros trabalhos foram realizados na tentativa de aperfeiçoar os rendimentos obtidos da

síntese deste composto. Em 1860 Hermann Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico (8, **Figura 3**) bem como o sal sódico a partir do fenol. Todavia, ainda existiam problemas com estes compostos. Apesar da capacidade analgésica, eram muito ácidos, e, provocavam alguns efeitos colaterais indesejáveis. Em 1898, quando Felix Hofmann, pesquisando a cura para a artrite que afligia seu pai, descobriu o ácido acetilsalicílico (9, AAS, **Figura 3**), menos ácido que o ácido salicílico, e com a mesma propriedade analgésica desejada.

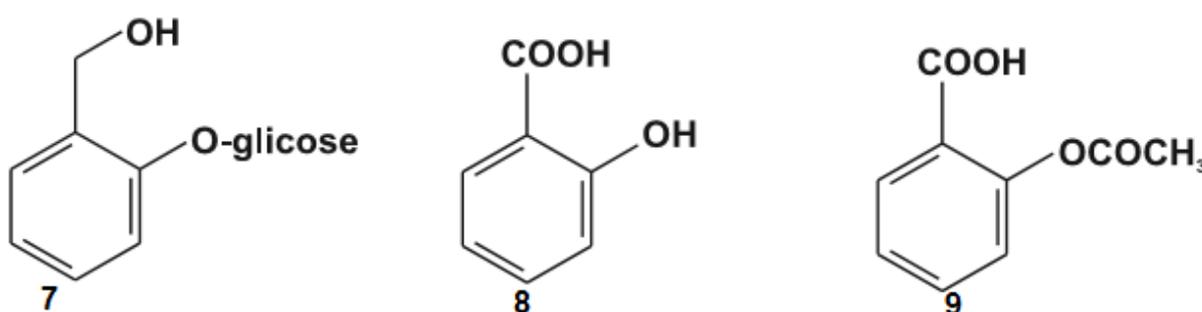


Figura 3. Salicilatos que marcaram o desenvolvimento de fármacos no período de 1800-1900: Salicina (7); Ácido salicílico (8); AAS (9). Fonte: Adaptada de Viegas e Bolzani (2006, p. 328).

1.2. Compostos Fenólicos e Flavonoides

1.2.1. Compostos Fenólicos

Na tentativa de se defenderem ou mesmo de se adaptarem dos constantes ataques do meio ambiente, as plantas, em geral, produzem uma ampla quantidade de substâncias naturais, chamados de metabólitos secundários, e, estes, por sua vez, possuem vários potenciais, como por exemplo, atividades antioxidantes, antimicrobianos e imunomoduladores. Segundo relatam Simões et al. (1999), os metabólitos secundários são encontrados naturalmente em frutas e hortaliças, apresentando efeitos benéficos sobre a saúde humana. Como exemplo, tem-se os compostos fenólicos e, por sua vez, os flavonoides, bem como os polifenóis, facilmente encontrados na alimentação diária dos seres humanos.

Os compostos fenólicos estão presentes nos vegetais, sejam livremente, sejam agrupados a glicosídeos (açúcares) ou proteínas. Tais compostos podem se apresentar em forma de moléculas simples ou ainda em moléculas com alto grau de polimerização (como por exemplo os taninos e as ligninas) (SIMÕES et al., 1999).

Estes compostos podem apresentar atividade antioxidante, visto que ao interagir com alguns radicais livres, são consumidos durante a reação, inibindo os processos da oxidação. Todavia, não é garantido a inteira proteção tanto das células como dos tecidos de todo e qualquer tipo de agressão oxidativa, visto que, em muitos casos, ao invés de apresentarem atividade antioxidante, apresentam atividade pró-oxidante (ANGELO; JORGE, 2007).

Desta forma, não se pode confiar inteiramente em todos os vegetais amplamente consumidos na dieta alimentar ricos em compostos fenólicos, visto que primeiramente se faz necessário estudos toxicológicos sobre os mesmos para ter-se uma garantia quanto sua inocuidade à saúde humana.

1.2.2. Flavonoides

Por consequência da ampla distribuição no reino animal e pelo grande número de constituintes naturais, os flavonoides se configuram como um grande grupo de compostos, eles estão presentes em frutos, folhas e flores, bem como na maioria das vezes, em outras partes da planta como por exemplo nas raízes, cascas e até mesmo nas sementes dos frutos (WANG, 2009). Os flavonoides são responsáveis pela cor, adstringência e amargura nos frutos, é o caso do vinho, onde compreendem, fundamentalmente, os derivados flavônicos, antociânicos, as catequinas ou catecóis, dentre outros (SIMÕES et al., 1999).

Pode-se encontrar flavonoides em inúmeras formas estruturais, entretanto, a grande maioria dos representantes desta classe apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, sendo compostos fenólicos do tipo C6-C3-C6, estes, formados por dois anéis aromáticos ligados por uma cadeia de três carbonos entre eles, resultando um composto tricíclico (**Figura 4**), cujas unidades são representadas como núcleos A, B e C (SIMÕES et al., 1999).

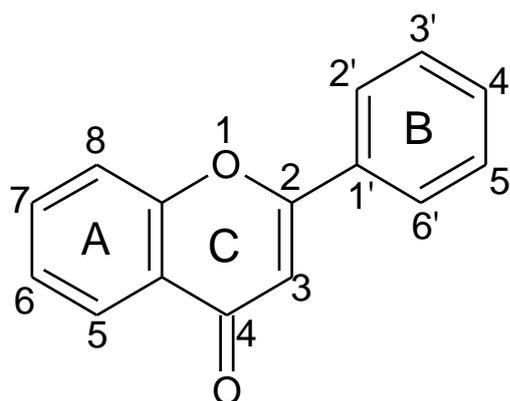


Figura 4. Núcleo fundamental dos flavonoides. Fonte: Adaptada de (SIMÕES et al., 1999, p.491).

Quanto à divisão, os flavonoides são encontrados divididos em oito subclasses: flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas, flavanols (flavan-3-ols ou catequinas), chalconas e di-hidro-chalconas. Estas subclasses são formadas por meio da variação das posições dos grupos funcionais, bem como por meio das variações no arranjo estrutural (WANG, 2009; SIMÕES et al., 1999).

São inúmeras as propriedades biológicas atribuídas aos flavonoides do reino vegetal, dentre as mais relevantes tem-se: **a)** proteção dos vegetais contra incidência dos raios ultravioletas e visíveis, além de proteção contra o ataque de insetos, fungos, vírus e bactérias; **b)** atrai animais com a finalidade de polinização; **c)** antioxidante; **d)** inibidores de enzimas; **e)** controle de ação de hormônios e **f)** agentes alelopáticos (SIMÕES et al., 1999).

Além do consumo comum na alimentação diária por meio da ingestão de alimentos cuja procedência é vegetal, em muitos casos, se utiliza em remédios a adição dos flavonoides, justamente pelas suas propriedades antioxidante, antiplaquetária, antiinflamatória, vasodilatadora, antialérgicas, espasmolítica e diurética. Tais propriedades podem ser encontradas com mais chances nas subclasses de flavonas e flavonóis, visto que são as principais classes de flavonoides presentes universalmente na natureza apresentando enorme importância principalmente pela atividade antioxidante em alimentos (canferol, quercetina e miricetina, por exemplo). Além disso, estudos epidemiológicos apontam que seu consumo diário garante uma redução do risco de câncer bem como de doenças cardiovasculares (WANG, 2009).

Pode-se observar na **Tabela 1**, as principais subclasses de flavonoides bem como uma pequena síntese das propriedades biológicas e farmacológicas mais relevantes para essa classe de compostos.

Tabela 1. Subclasses de Flavonoides e as principais características biológicas e farmacológica conhecidas (adaptada de SIMÕES et al., 1999, p. 492).

Subclasses de Flavonoides	Principais Características biológicas e farmacológica
Flavonas, flavonois e seus O-heterosídeos	Co-pigmentação em flores; protetores contra raios UV nas folhas
Antocianos	Pigmentação do vermelho até o azul
Chalconas	Pigmentação amarela
Auronas	Pigmentação amarela
Di-hidro-flavonois	Estão presentes frequentemente em tecidos de madeiras, protege a planta contra doenças por microrganismos
Flavanonas	Podem apresentar sabor amargo
Di-hidro-chalconas	Podem apresentar sabor amargo
Flavanas, leucoantocianidinas e proantocianidinas	Substâncias adstringentes com propriedades tanantes
Isoflavonoides	Propriedades estrogênicas e/ou antifúngicas
Biflavonoides	Propriedades antifúngicas

1.3. Atividade Antioxidante e sua ação no organismo humano

Espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo o radical hidroxila, oxigênio singlete, superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, são constantemente formadas durante o processo de fosforilação oxidativa, localizadas na cadeia respiratória mitocondrial. Todavia, tais espécies também podem ser formadas endogenamente seja por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, microssomos, peroxissomos bem como pelo citocromo P450 ou ainda podem advir de fontes exógenas, como por exemplo, a radiação e os xenobióticos (FU et al., 2011;

BARBOSA et al., 2010). No organismo, em se tratando de condições normais, existe um equilíbrio entre a produção dos radicais livres e a sua inativação por moléculas antioxidantes, entretanto, na ocorrência de um desequilíbrio pela produção exacerbada de EROs ou ainda pela falta de agentes antioxidantes, ocorre o chamado estresse oxidativo, este por sua vez, pode causar perda e/ou dano celular (FU et al., 2011; BARBOSA et al., 2010).

Inúmeras doenças degenerativas e/ou crônicas possuem relação direta (etiologicamente falando) com o estresse oxidativo, como por exemplo, alguns tipos de câncer, diabetes e doenças cardiovasculares, nestas últimas, a molécula de lipoproteína de baixa densidade (LDL) sofre modificações por consequência do estresse oxidativo, aumentando a aderência leucocitária e reduzindo a proteção endotelial, o que ocasiona uma inflamação contribuindo para o processo de aterosclerose, este, somado à agregação plaquetária leva a indução da trombose e possível infarto do miocárdio (FUKUJI et al., 2010; MLADENKA et al., 2010; VALERO et al., 2011). Além dessas doenças, é comum observar o estresse oxidativo em pacientes que possuem hipertensão e/ou diabetes (FUKUJI et al., 2010).

Consideram-se compostos antioxidantes, substâncias com a capacidade de reduzir o efeito dos radicais livres, seja pela estabilização ou inativação destes radicais, podendo ter uma ação enzimática (direta) como superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase ou também pode ser uma ação não-enzimática (indireta) por meio da vitamina C e da vitamina E, bem como por meio da glutathione, flavonoides e carotenoides (FU et al., 2011; BARBOSA et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a ingestão de frutas e/ou vegetais com alto potencial de atividade antioxidante (por apresentar um elevado teor de compostos fenólicos) com o objetivo de minimizar o risco de doenças cujas causas prováveis se relacionam com o estresse oxidativo, como doenças coronarianas, hipertensão e infarto do miocárdio (BARBOSA et al., 2010).

1.4. Hipótese

A amora preta (*Morus nigra L.*) apresenta elevado teor de compostos fenólicos e a presença de tais compostos pode ser responsável por inúmeras atividades biológicas apontadas pela medicina tradicional (popular).

1.5. Objetivos

1.5.1. Objetivo Geral

Verificar o perfil fitoquímico bem como as atividades biológicas possivelmente presentes nas folhas da espécie *Morus nigra L.*

1.5.2. Objetivos Específicos

- ✓ Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais;
- ✓ Avaliar atividades antioxidante e antimicrobiana;
- ✓ Verificar os principais grupamentos químicos presentes;
- ✓ Identificar os metabólitos secundários.

1.6. Justificativa

Este estudo foi impulsionado por meio de saberes populares (ou tradicionais), visto que na medicina popular, o chá das folhas da amora preta (*Morus nigra L.*) serve para diversos tratamentos de doenças, como por exemplo, dores de cabeça, cólicas menstruais, insônia, além de relatos acerca de possível ação de reposição hormonal em mulheres na menopausa. Todavia, quando feita uma busca bibliográfica da espécie, identificamos estudos voltados à caracterização química e botânica, bem como pesquisas relacionadas com o fruto da espécie, mas poucos relacionados às folhas em si. Sendo assim, há necessidade de investigar essas possíveis ações bioativas presentes nas folhas da amora preta.

1.7. Fluxograma de trabalho

A presente dissertação é composta de três capítulos, sendo o primeiro destinado à revisão da literatura e os demais destinados aos métodos utilizados bem como resultados obtidos. Pode-se observar na **Figura 5**, um fluxograma ilustrando as etapas dos métodos empregados na presente pesquisa, contudo, cada método será detalhado nos capítulos aos quais são destinados.

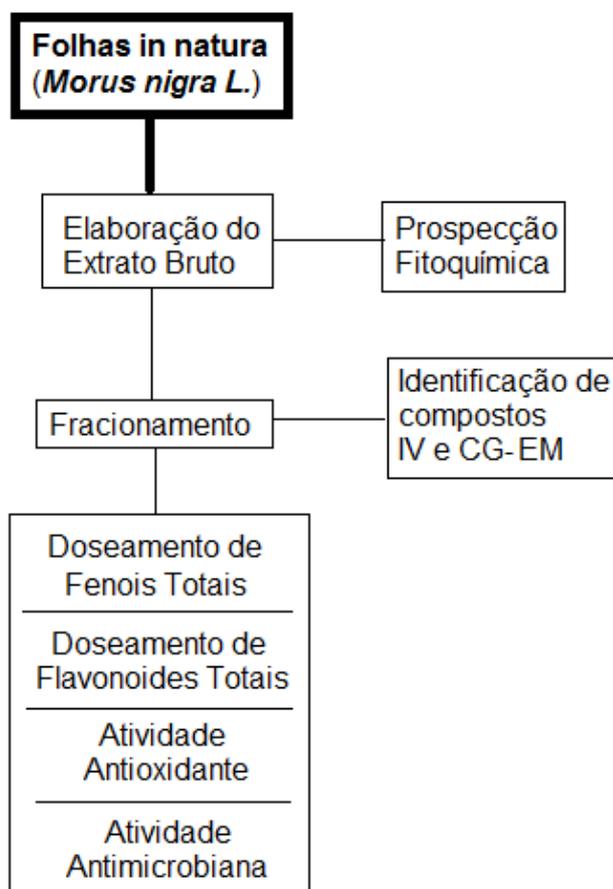


Figura 5. Fluxograma de trabalho.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Família *Moraceae*

A família *Moraceae* também conhecida como família de amoras (BURN, MAYLE, 2008) apresenta cerca de 40 gêneros e 1400 espécies, tendo como principais gêneros: *Morus*, *Maclura*, *Artocarpus*, *Ficus* e *Broussonetia*. É uma das famílias mais abundantes e ecologicamente importantes em florestas tropicais e neotropicais, suas espécies estão presentes por toda parte do mundo, inclusive nas florestas amazônicas. Com relação aos compostos fitoquímicos, segundo Zhekun e Gilbert (2003), podemos encontrar alguns metabólitos secundários, como por exemplo, triterpenos, flavonoides e xantonas, além disso. Ainda segundo os autores citados, a família apresenta uma importância econômica quando da produção de frutas, papel e móveis.

2.2. Gênero *Morus*

Segundo Sánchez-Salcedo (2015a) o gênero *Morus* contém uma variedade de compostos fenólicos como flavonoides, isoprenilados, cumarinas, cromonas bem como xantonas e fitoalexinas. As espécies mais cultivadas no gênero *Morus* são amoreira branca (*Morus alba*), amora preta (*Morus nigra*) e amora vermelha (*Morus rubra*) (GUNDOGDU et al., 2011).

Apesar de pertencerem ao mesmo gênero, as espécies apresentam entre si diferenças moleculares (estruturais) e morfológicas (KAFKAS et al., 2008). Piekarski (2013) relata que as flores apresentam coloração verde e a floração ocorre no Brasil entre agosto e setembro, seus frutos possuem forma cilíndrica, medindo em torno de 2 centímetros de comprimento, estes são considerados frutos agregados. Já as sementes, podem medir até 3 milímetros, dependendo da espécie (*Morus nigra*, *rubra* ou *alba*), da mesma forma pode possuir coloração variando de amarela a marrom.

Praticamente toda a árvore da amoreira (as folhas, raízes e galhos de espécies do gênero *Morus*) é utilizada na medicina popular para o preparo de medicamentos caseiros para as mais diversas doenças, como tratamento da anemia, febre, artrite,

hipertensão, melhora da visão e diabetes, bem como proteção hepática (HU et al, 2011).

2.3. Espécie *Morus nigra* L.

A espécie, *Morus nigra* L (vulgo Amora-preta), Moraceae, é um vegetal cuja origem vem da Pérsia (Irã) e da Armênia, cultivada na Europa desde tempos imemoriais, tornou-se árvore histórica, ligada a mitologia grega (PEIXOTO *et al*, 1995). No Brasil, os primeiros relatos de cultivo se deu no início do século XIX e tem os mesmos fins que a amora-branca (*Morus alba* L), seus frutos podem ser utilizados para consumo *in natura* e para produção de doces caseiros, como por exemplo no fabrico de geleias. Devido ao período de inverno marcante, a amoreira possui grande potencial para as regiões brasileiras, logo, seu cultivo se torna bem propício para pequenas propriedades agrícolas aqui no Brasil, sem contar que esta espécie não necessita de insumos químicos para sua produção (PIEKARSKI, 2013).

A amora-preta (**Figura 6**) é uma árvore frutífera de 5 a 20 m de altura com folhas bastante grossas (TUTIN et al., 1996) e pequenos frutos adstringentes, estes, antes de atingir a completa maturação, servem para o preparo de xarope, já quando completamente maduro, são saborosos para consumo e utilizados para o fabrico de geleias e refrescos. Todavia, segundo Piekarski (2013) se torna difícil a comercialização dos frutos *in natura* devido basicamente a dois fatores, o primeiro diz respeito ao curto período de colheita, segundo a autora, os frutos estão disponíveis apenas uma vez no ano durante aproximadamente dois meses (agosto e setembro no Brasil). O segundo fator se refere à frágil estrutura que os mesmos possuem, provocando por sua vez, uma baixa estabilidade para estocagem.



Figura 6. Amoreira-preta. Fonte: (Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental²)

Falando mais especificamente sobre a botânica da espécie (**Figura 7**), segundo Agarez et al (1994), as gemas são protegidas por estípulas caducas, inflorescência na forma de espiga, suas flores são unissexuais, sendo que as masculinas podem ser monoclamídeas e isostêmones já as femininas se classificam como sendo aclamídeas, ovário súpero, bi ou unicarpelar, unilocular, uniovulado, com dois estigmas.



Figura 7. Representação das folhas, flores e frutos da amora-preta. (TUTIN et al., 1996)

² Disponível em: <http://www.mistelten.dk/Morus%20nigra%20%20%20Morb%E6r.jpg>. Acesso em jul. 2017.

Na medicina popular, o chá das folhas serve para diversos tratamentos de doenças, como por exemplo, dores de cabeça, cólicas menstruais, insônia e alteração de libidos. Todavia, tais benefícios, em sua grande maioria, são visualizados apenas em conhecimentos tradicionais, na medicina popular.

Assim como nas demais espécies do Gênero *Morus*, a espécie *nigra* apresenta elevada quantidade de compostos fitoquímicos (metabólitos secundários), em sua grande maioria, pertencentes à classe dos compostos fenólicos, isso explica a característica adstringente (quando verde) e ácido (quando maduro) que o fruto apresenta (GUNDOGDU et al., 2009).

Segundo Sánchez-Salcedo (2015b), a *Morus nigra* L quando comparada as outras duas principais espécies do gênero *Morus* (*alba* e *rubra*), apresenta os maiores teores de flavonoides e compostos fenólicos totais, entretanto, quando comparada somente à *Morus rubra*, observa-se uma quantidade superior de antocianinas monoméricas, bem como um número maior de atividade antioxidante.

Pelo fato de existirem tais metabólitos secundários, nos últimos anos, as amoreiras têm recebido uma maior atenção quanto aos estudos para avaliar suas atividades biológicas, como por exemplo as atividades antioxidante, antiinflamatória, antibacteriana e antiviral (PADILHA et al., 2010b), o resultado esperado no organismo seria a melhoria do sistema imunológico bem como no metabolismo hormonal (PIEKARSKI, 2013). Tais atividades variam muito dependendo da parte analisada da planta (raízes, frutos ou folhas).

Ao se fazer uma detalhada pesquisa pela literatura disponível dos últimos anos, verifica-se que as principais atividades apontadas anteriormente para a espécie *Morus nigra* L provem das raízes, sobretudo das folhas da planta. As raízes contem proteínas (*moringa M* e *moringa G*, lectinas) possibilitando a ligação com a manose e a galactose, apresentando por fim uma atividade hemaglutinante (DAMME et al., 2002). Outra atividade presente nas raízes e galhos da *Morus nigra* L é o de inibidor da enzima tirosinase (responsável por catalisar a oxidação de fenóis, resultando como produto a melanina) por meio da substância oxiresveratrol (ZHENG et al., 2010). Wang et al., (2009) identificaram dois prenilflavonoides (isoméricos), são eles **mornigrol E** e **mornigrol F** (Figura 8).

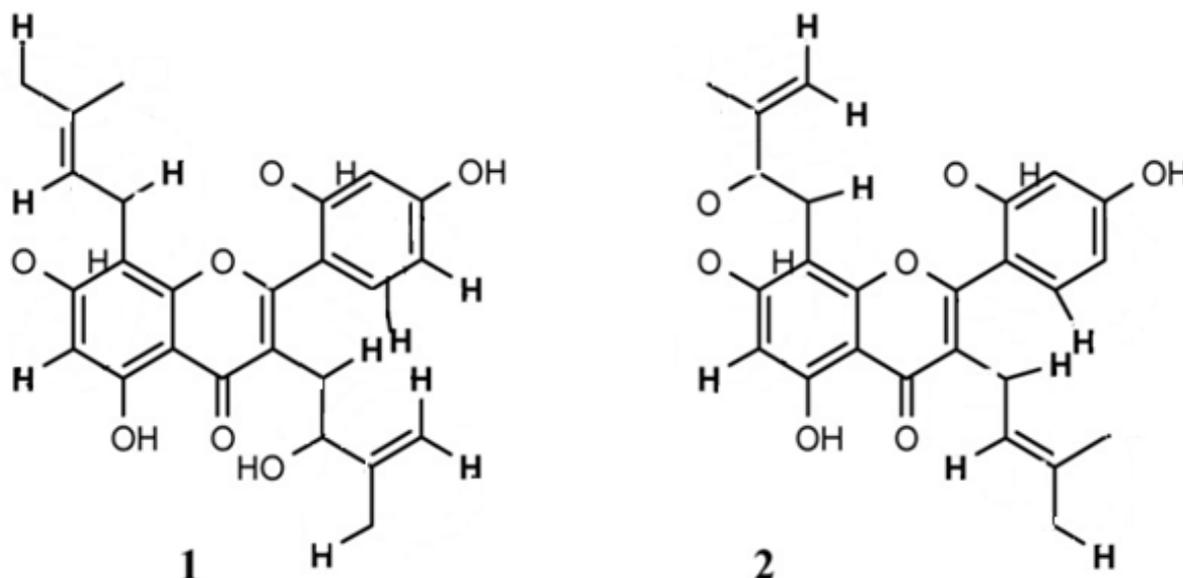


Figura 8. Estrutura do mornigrol E (1) e mornigrol F (2). Fonte: (WANG et al., 2009)

Os estudos voltados aos frutos da *Morus nigra*, mostraram a presença de cinco ácidos orgânicos, entre eles, málico (ácido predominante), cítrico, fumárico, tartárico e oxálico; três tipos de flavonoides (quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-O-rutinosídeo e kaempferol-3-O-rutinosídeo), quatro tipos de antocianinas (pelargonidina-3-O-rutinosídeo, cianidina-3-O-rutinosídeo, cianidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-glicosídeo) (PAWLOWSKA et al., 2008).

Sellappan et al. (2002) e Zadernowski et al. (2005) ao realizarem estudos com os frutos de amora preta (*Morus nigra*) encontraram compostos fenólicos, especificamente os ácidos hidroxicaféico, E-p-cumárico e gálico.

Ao avaliar os compostos (poli)fenólicos, a atividade antioxidante, bem como a maturação nos frutos, da *Morus nigra*, (SÁNCHEZ-SALCEDO et al., 2015a; 2015b) percebeu-se uma menor quantidade de flavonoides quando comparado às demais partes da planta, todavia, os frutos são bastante ricos em antocianinas (componente predominante).

A respeito das folhas desta espécie, alguns estudos discutem a existência de atividade antioxidante, hipoglicemiante, antimicrobiana, antinociceptiva e anti-inflamatória. Sendo que esta última atividade, foram encontrados germanicol, ácido betulínico e β -sitosterol (**Figura 9**) – os três pertencentes à classe dos triterpenos e esteroides – (PADILHA et al., 2009; 2010a; 2010b).

Volpato et al. (2011) identificaram, que houve uma considerável redução nos níveis de colesterol total (*Low Density Lipoproteins* - LDL), bem como uma diminuição das taxas de triglicérides ao realizar estudos com ratas Wistar grávidas.

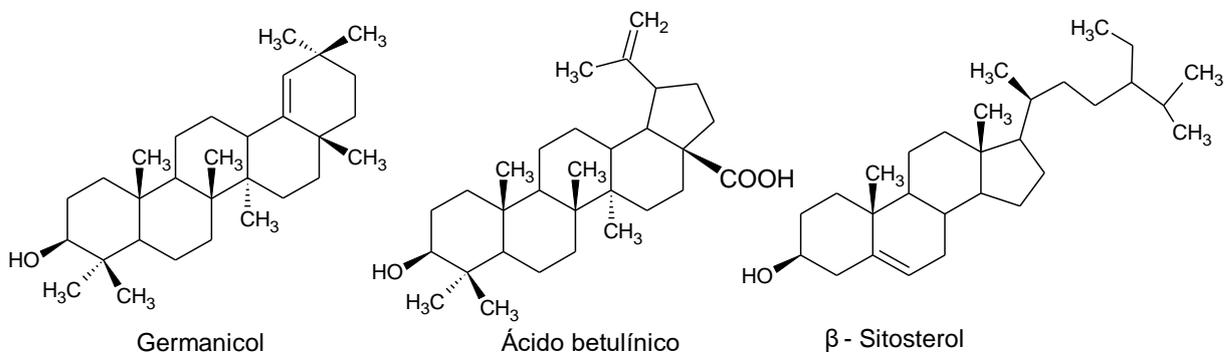


Figura 9. Estrutura química do Germanicol, Ácido betulínico e β-Sitosterol. Fonte: (PADILHA et al., 2009; 2010a; 2010b)

A fim de avaliar o efeito estrogênico da espécie *Morus nigra* no sistema reprodutivo e no desenvolvimento embrionário de ratas Wistar, Queiroz et al., (2012) fizeram uso de administração do extrato hidroalcoólico das folhas da planta nos níveis de dosagem de 25, 50, 75, 350 e 700 mg / kg de peso corporal superior a 15 dias até o dia 14º dia de gestação. Segundo mostraram os dados da investigação, após tal tratamento não houve nenhuma atividade estrogênica que constatasse a eficácia na reprodução das ratas, todavia, também não houve qualquer índice de toxicidade no sistema reprodutor nem no processo do desenvolvimento embriológico.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Material Vegetal

As folhas da espécie *Morus nigra L.* foram coletadas no município de Senador Guiomard-Acre, no bairro São Francisco, nos meses de abril e maio de 2016, utilizando-se sempre a mesma fonte de coleta, a qual apresenta as seguintes coordenadas geográficas: -10°08'57", -67°43'56". Exsiccatas se encontram depositadas no Herbário do Parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, sob registro PZ 96279.

3.2. Reagentes utilizados

Os reagentes utilizados foram acetato de etila P.A.-A.C.S (Synth, 99%), ácido 3,5-dinitrobenzoico P.A. (Dinâmica), ácido acético P.A. (Synth), ácido clorídrico P.A. (Synth, 37%), ácido sulfúrico P.A.-A.C.S. (Synth), álcool (n) butílico P.A.-A.C.S. (Synth, 99,4%), álcool metílico P.A.-A.C.S. (Nuclear, 99,8%), carbonato de sódio P.A. (Synth), cloreto de alumínio P.A. (Synth, 100%), cloreto férrico (Lafan), clorofórmio P.A.- A.C.S. (Nuclear, 99,8%), diclorometano P.A.-A.C.S. (Dinâmica, 99,5%), DMSO P.A.-A.C.S. (Vetec), DPPH, éter etílico P.A.-A.C.S (Synth, 100%), hexano P.A. (Chemco), hidróxido de amônio (Lafan), hidróxido de potássio P.A. (Lafan), hidróxido de sódio (Synth), iodeto de potássio P.A. (Lafan), iodo P.A.-A.C.S. (Synth), magnésio em fita, ninidrina P.A. (Qhemis), permanganato de potássio P.A.-A.C.S. (Synth, 100%), reativo de Bouchardat, reativo de Dragendorff, reativo de Fehling A e B, reativo de Kedde A e B, reativo de Lugol, reativo de Mayer, reativo de Pascová A e B, reativo Folin Ciocalteau, tricloreto de antimônio e vanilina.

3.3. Preparação e Fracionamento do Extrato Bruto das Folhas

3.3.1. Preparação do Extrato Bruto das Folhas

Foi empregada a técnica de extração por maceração e remaceração descrita por Simões e colaboradores (1999) utilizando metanol como solvente extrator, visto que segundo o autor, este solvente apresenta uma boa matriz para a extração de compostos fenólicos bem como polifenólicos. Além disso, como o material vegetal ficou um longo período de tempo em maceração para a obtenção do extrato bruto, o metanol se apresenta também como um bom agente antimicrobiano.

Uma massa de 1,0 kg de folhas secas e trituradas foi submetida à extração com 10 L de solvente extrator (metanol) durante um período de 72 horas, sob temperatura ambiente e abrigo da luz. O processo de maceração e filtração do sobrenadante foi realizado em quatro etapas (maceração exaustiva), sendo que a cada 72 horas o solvente era tirado, mantendo-se a mesma quantidade de folhas (torta), e, substituído por nova quantidade de solvente puro, a cada etapa, os extratos foram reunidos em um único recipiente, concentrados em rota-evaporador e secos em estufa de ar circulante à 40°, conforme fluxograma apresentado na **Figura 10**.

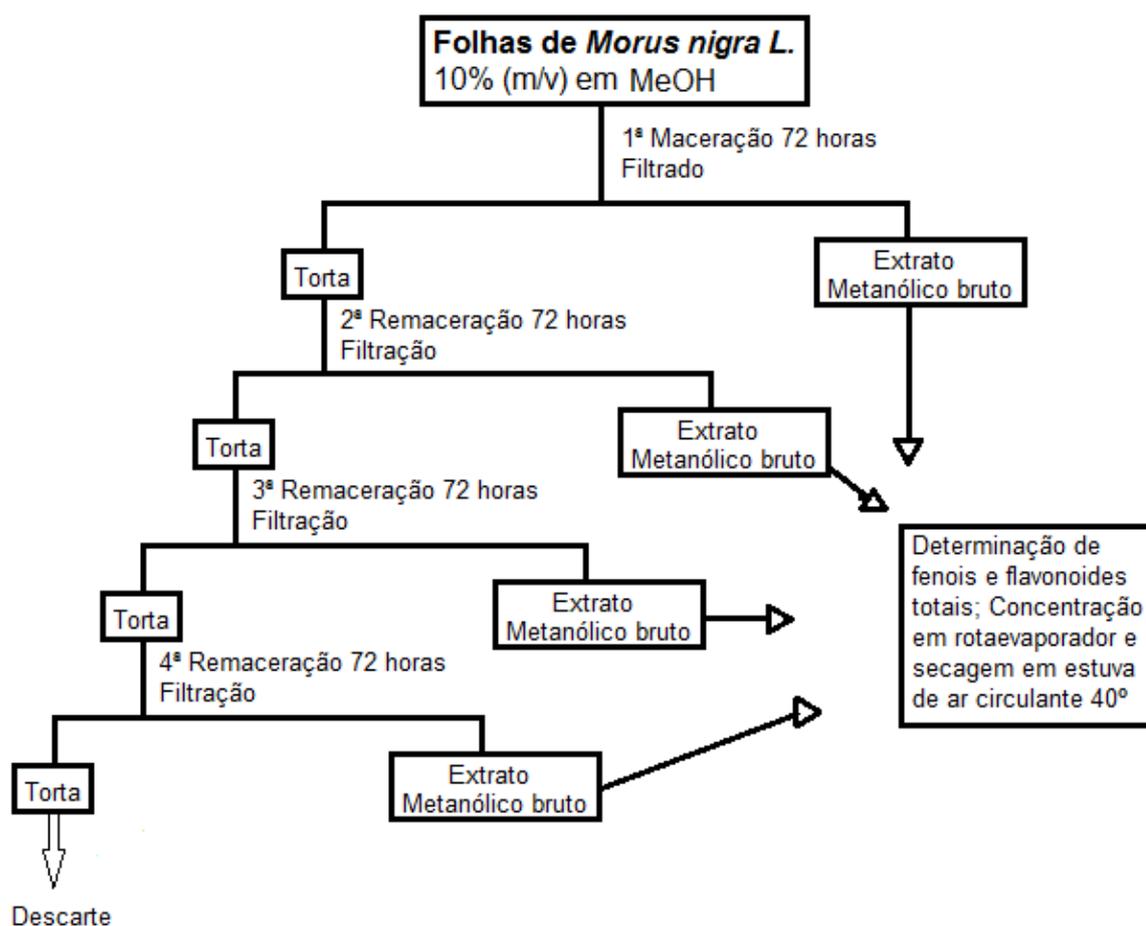


Figura 10. Fluxograma da obtenção do extrato bruto metanólico das folhas de *Morus nigra* L. por maceração exaustiva.

3.3.2. Fracionamento do Extrato Bruto das Folhas

O extrato bruto metanólico das folhas foi particionado com quatro tipos de solventes com polaridades crescentes: hexano < diclorometano < acetato de etila < n-butanol. Inicialmente, 30 g do extrato foram dissolvidos em solução 10% metanol (90 mL de água e 10 mL de metanol). Em seguida, transferiu-se a solução para um funil de separação juntamente com 100 mL de hexano, esperou-se formar duas fases e então, transferiu-se a fase com hexano para um béquer, obtendo-se a fração hexânica. Tal procedimento foi realizado em triplicata consumindo-se um total de 300 mL de hexano. O mesmo³ procedimento serviu para os três outros solventes, o

³ Agora, partindo da fração denominada “aquosa”, de cada solvente utilizado

resíduo da partição foi denominado fração aquosa das folhas. Na **Figura 11** é mostrado o fluxograma do fracionamento.

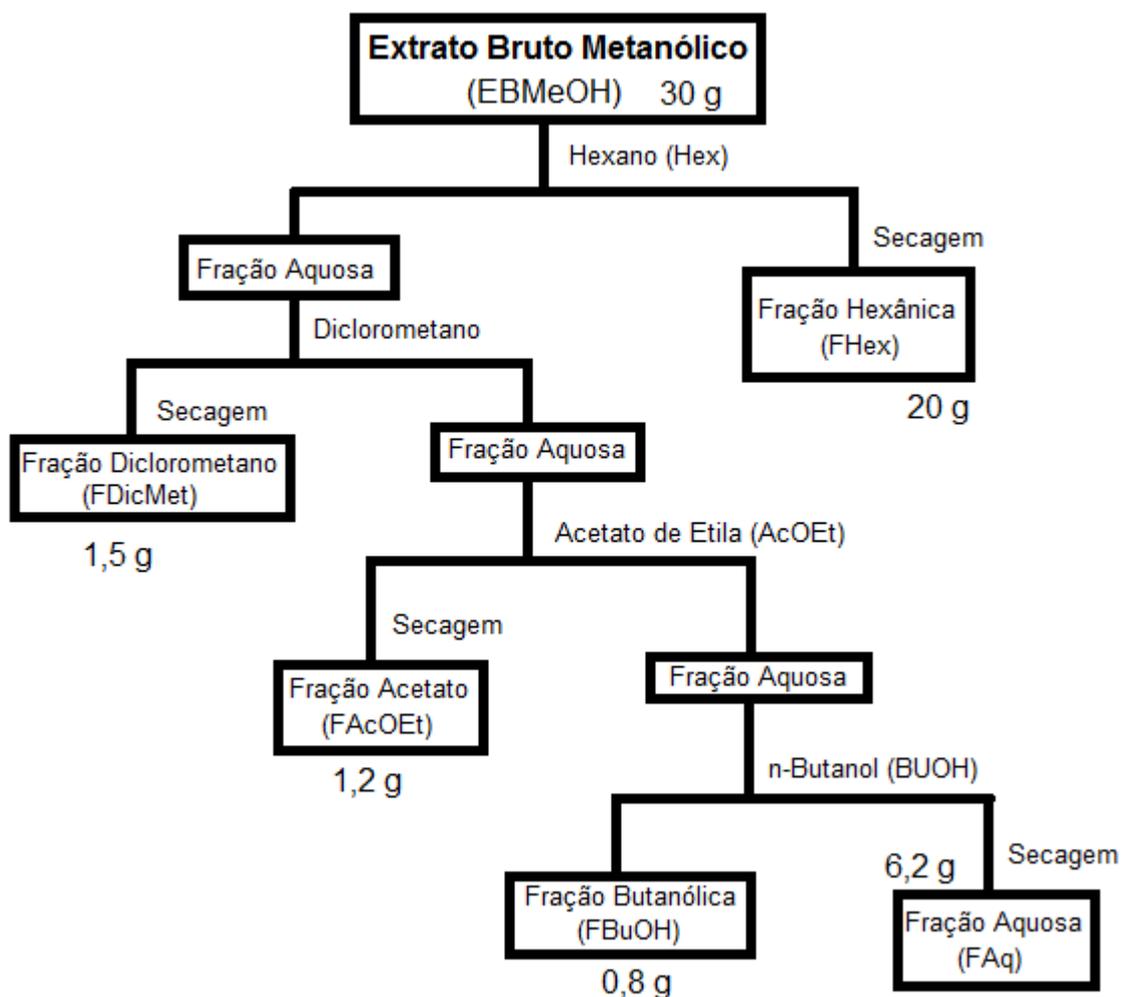


Figura 11. Fluxograma da partição do extrato bruto etanólico de folhas de *Morus nigra* L.

Após rota evaporação, foram obtidos, 20 g da fração hexânica das folhas, 1,5 g da fração com diclorometano das folhas, 1,2 g da fração acetato de etila, 0,8 g da fração butanólica e 6,2 g da fração aquosa das folhas.

O mesmo procedimento foi adotado para obtenção de mais massa para a realização de testes posteriores.

3.4. Prospecção Fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada com a finalidade de verificar **qualitativamente** os principais grupamentos químicos presentes na amostra por meio de reações de coloração e/ou precipitação. A busca dos grupamentos químicos foi realizada com o extrato metanólico bem como com as frações, conforme descrito por Matos (1997) e Barbosa (2001).

Testes convencionais em análise fitoquímica foram realizados para verificar a presença de flavonoides, taninos, saponinas, catequinas, ácidos orgânicos livres, polissacarídeos, açúcares redutores, glicosídeos cardiotônicos, proteínas, antraquinonas, carotenoides, alcaloides, depsídeos/depsídonas e esteroides/triterpenos, visando à caracterização de metabólitos secundários, com ênfase nos flavonoides (MATOS, 1988; BARBOSA, 2001).

3.4.1. Solução Estoque

Uma solução estoque (SE) foi preparada a partir de uma alíquota do EBMeOH, bem como de suas frações, cuja concentração final foi de 2,0 mg/mL, com volume suficiente para realizar todos os testes da prospecção fitoquímica.

3.4.2. Pesquisa de Flavonoides

Reação de Cianidina ou Shinoda: Foi transferido para um tubo de ensaio 2 mL da SE, 2 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado e 0,5 cm de magnésio (Mg) metálico em fita. O fim da reação deu-se pelo término de efervescência. Aparecimento de coloração que variou de parda a vermelha, indicou a presença de flavonoides no extrato (MATOS, 1988).

3.4.3. Pesquisa de Taninos/Fenóis

Reação com Cloreto Férrico: Colocaram-se em um tubo de ensaio 2 mL da SE, em seguida, adicionaram-se três gotas de solução alcoólica de cloreto férrico (FeCl_3), agitando fortemente, observou-se a variação de cor da solução. A formação de coloração azul indica taninos hidrolisáveis ou gálicos e a formação de coloração verde indica presença de taninos condensados, protocianidinas ou catéquicos (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.4. Pesquisa de Saponinas

Teste de Espuma: Em um tubo de ensaio foram adicionados 2 mL da SE e 2 mL de água destilada com 3 gotas de ácido clorídrico (HCl). Em seguida a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos e observado a formação de espuma. Espuma persistente e abundante (colarinho) indicou a presença de saponina. A formação de uma camada de espuma, permanecendo estável por mais de 30 (trinta) minutos indica presença de saponina (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.5. Pesquisa de Catequinas

Reação com Vanilina: Foram transferidos 3 mL do extrato a ser analisado para um tubo de ensaio. Em seguida, foi adicionado 1 mL da solução aquosa de vanilina $[(\text{C}_6\text{H}_3\text{CHO}(\text{OCH}_3)\text{OH})]$ a 1% (m/v) e 1 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A formação de coloração vermelha indica a presença de catequina (BARBOSA, 2001).

3.4.6. Pesquisa de Ácidos Orgânicos Livres

Reação de Pascová: Foram transferidos para um tubo de ensaio 3 mL de solução do material a ser analisado. Posteriormente, foram adicionadas 3 gotas do reativo de Pascová. O reativo foi preparado no momento do ensaio com 9 gotas do reativo Pascová A e depois uma gota do reativo de Pascová B. A mistura é estável

somente por 5 a 10 minutos. A descoloração do reativo de Pascová indica a presença de ácido orgânico livre (BARBOSA, 2001).

Reativo Pascová A: foi dissolvido 0,075 g de verde de bromocresol ($C_{21}H_{14}Br_4O_5S$) mais 0,25 g de azul de bromofenol ($C_{19}H_{10}Br_4O_5S$) em etanol até completar 100 mL de solução.

Reativo Pascová B: foi dissolvido 0,25 g de permanganato de potássio ($KMnO_4$) mais 0,25 g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) em água destilada até completar 100 mL de solução. No momento de uso para os testes usar 9 partes da solução A para 1 parte da solução B. A mistura só é estável entre 5 a 10 minutos.

3.4.7. Pesquisa de Polissacarídeos

Reação de Lugol: Foram transferidos para um tubo de ensaio 2 mL da SE. Em seguida, foram adicionadas 5 gotas do reagente Lugol. Foi feito um branco usando água e o reativo de Lugol. O aparecimento de coloração azul indica a presença de polissacarídeos (BARBOSA, 2001).

O reativo de Lugol: foi dissolvido 5 g de iodeto de potássio (KI) e 2,5 g de iodo ressublimado em 25 mL de água destilada e completar o volume para 50 mL.

3.4.8. Pesquisa de Açúcares Redutores

Reação de Fehling: Uma alíquota de 3 mL da SE foi transferida para um tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionados 2 mL de reativo Fehling A e 2 mL de reativo Fehling B. Após a adição, foi aquecido em banho-maria e deixado em ebulição por cinco minutos. O aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.9. Pesquisa de Glicosídeos Cardiotônicos

Reação de Kedde: Foi transferida uma alíquota de 3 mL da SE para um tubo de ensaio. Em seguida, foram adicionadas 3 gotas do reativo Kedde A e 3 gotas do

reativo de Kedde B. A formação de coloração azul ou castanho-avermelhada ou vermelho-violeta indica a presença de glicosídeos cardiotônicos (BARBOSA, 2001).

Reativo Kedde A: foi dissolvido 2 g de 3,5-dinitrobenzoico ($C_6H_3(NO_2)_2COOH$) em 50 mL de metanol.

Reativo de Kedde B: foi dissolvido 5,7 g de hidróxido de potássio (KOH) em 100 mL de metanol.

3.4.10. Pesquisa de Proteínas

Reação de Ninidrina: Foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 3 mL da SE. Em seguida foi adicionado 0,5 mL de solução aquosa de Ninidrina ($C_9H_6O_4$) a 1% (m/v). Em seguida, foi aquecido até a ebulição. A formação de coloração azul-violeta persistente indica a presença de aminoácidos, com exceção de prolina e hidroxiprolina que desenvolvem cor amarela (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.11. Pesquisa de Antraquinonas

Reação de Borntraeger: Foi transferida para um tubo de ensaio uma alíquota de 3 mL da SE. Adicionaram-se 2 mL de solução de hidróxido de amônio (NH_4OH) a 10% (v/v) – ou solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) a 5% (m/v) –. Agitou-se suavemente e aguardou-se por um período de 5 minutos. A formação de coloração rósea, vermelha ou violeta indica a presença de antraquinonas (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.12. Pesquisa de Carotenoides

Reação com Tricloreto de Antimônio: Foram transferidas para um tubo de ensaio 5 mL da SE e em banho-maria foi evaporado o solvente até a secura. Em seguida, foi dissolvido com 3 mL de clorofórmio e adicionado 2 mL de solução saturada tricloreto de antimônio ($SbCl_3$) em clorofórmio. A formação de coloração azul indica a presença de carotenoides (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.4.13. Pesquisa de Alcaloides

Adicionaram-se 2 mL da SE, 1 mL de ácido clorídrico (HCL) e 4 gotas de Bouchardat em um 1º tubo de ensaio, 2 mL de extrato, 1 mL de HCl e 4 gotas de reativo de Dragendorff em um 2º tubo e 2 mL de extrato, 1 mL de HCl e 4 gotas de Reativo de Mayer em um 3º tubo. A formação de precipitados insolúveis e floculoso confirma a presença de alcaloides (MATOS, 1997).

3.4.14. Pesquisa de Depsídeos e Depsídonas

Ensaio para depsídeos e depsídonas: Foi dissolvido em um tubo de ensaio 10 mg do EBMeOH (e frações) em 5 mL de éter etílico. Em seguida, foi filtrado e evaporado o solvente em banho-maria. O sólido residual foi dissolvido em 3 mL de metanol (CH₃OH) e adicionadas 3 gotas de solução de cloreto férrico (FeCl₃) a 1% (m/v). A formação de coloração verde, azul ou cinza indica a presença de depsídeos e depsídonas (BARBOSA, 2001).

3.4.15. Pesquisa de Esteroides e Triterpenos

Reação de Liebermann-Burchard: 2 mL da SE foi misturada à 2 mL de clorofórmio (CHCl₃) e, em seguida, 1 mL de anidrido acético (C₄H₆O₃), agitando suavemente. Por fim, acrescentou-se cuidadosamente três gotas de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado, agitando suavemente e observando, se haveria desenvolvimento de cores. Coloração azul evanescente seguida de verde, indica a presença de esteroides/triterpenoides respectivamente. (MATOS, 1997; BARBOSA, 2001).

3.5. Determinação Quantitativa de Fenóis Totais por Espectroscopia na Região do UV-vis

Para a determinação dos teores de fenóis totais nesta pesquisa foi utilizado o *Reagente de Folin Ciocalteau*, utilizando ácido gálico ($C_7H_6O_5$) como padrão de referência. O reagente de Folin Ciocalteau é uma solução de íons complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos, ou melhor, consiste na mistura dos ácidos fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotúngstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), sendo que o molibdênio se encontra com coloração amarela (oxidado) (IKAWA et al., (2003). Esse reagente oxida os compostos fenólicos, reduzindo os ácidos a um complexo azul (Mo-W), estes grupos oxidáveis (hidroxilas) determinam a quantidade de cor formada, e assim, pode-se saber o quantitativo de fenóis totais existentes na amostra (OLIVEIRA et al., 2009).

A **Figura 12** ilustra a reação de oxirredução entre compostos fenólicos e o molibdênio-tungstênio.

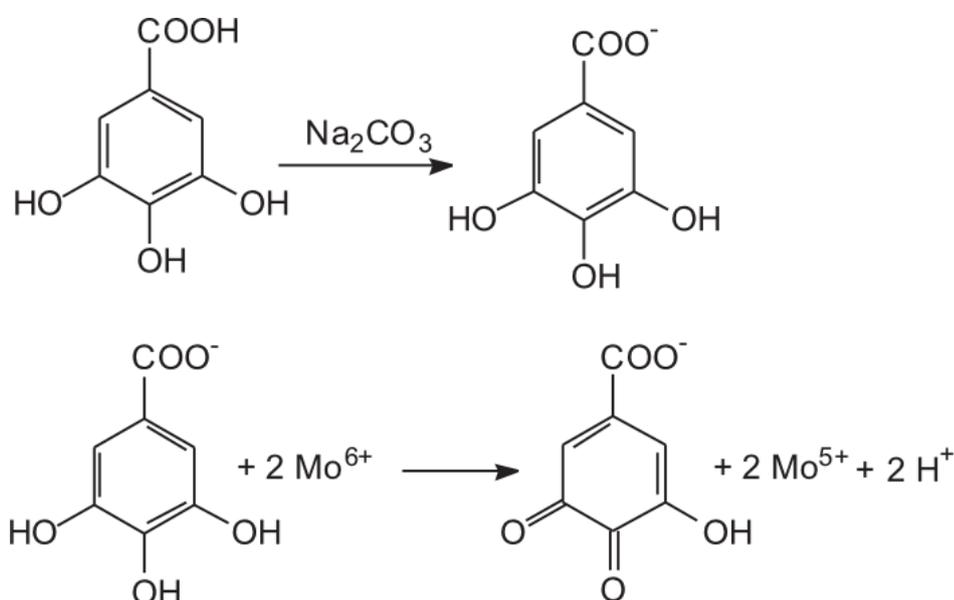


Figura 12. Reação do ácido gálico com molibdênio, componente do reagente de Folin-Ciocalteau.
Fonte: (OLIVEIRA et al., 2009, p. 697).

A concentração de fenóis totais (FT) dos extratos foi determinada como descrito por Jayaprakasha e colaboradores (2001) com algumas modificações. 100 mg do

material a ser analisado (frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa, separadamente) foram dissolvidos em metanol, transferidos quantitativamente para um balão volumétrico de 100 mL. Logo após, o volume final foi completado com metanol. Em seguida, 7,5 mL desta solução foram novamente transferidos para um balão volumétrico de 50 mL de capacidade; novamente, o volume desta segunda solução foi acertado com metanol. Uma alíquota de 100 µL da última solução foi constantemente agitada com 500 µL do reagente de Folin Ciocalteau e 6 mL de água destilada por 1 minuto. Passado 1 minuto, foram adicionadas à mistura, 2 mL de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% e agitada por 30 segundos. A solução foi deixada em repouso por 2 h ao abrigo da luz, após este tempo, foi feita a leitura em espectrofotômetro a 745 nm. Finalmente, a solução teve seu volume acertado para 10 mL com água destilada. Guardou-se após 2 h, a absorbância das amostras foi medida a 750 nm, tendo como “branco” a mistura do metanol e todos os reagentes, menos o material analisado (frações).

Para a elaboração da curva analítica (**Figura 13**), foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 10 a 350 µg/mL diluído em metanol. As concentrações de fenóis totais nas amostras foram obtidas a partir da equação da reta ($y = 0,0004x - 0,0011$) e os valores foram expressos em µg/mL de equivalentes de ácido gálico (EqAG). Para a determinação do rendimento, o teor de fenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/grama da fração.

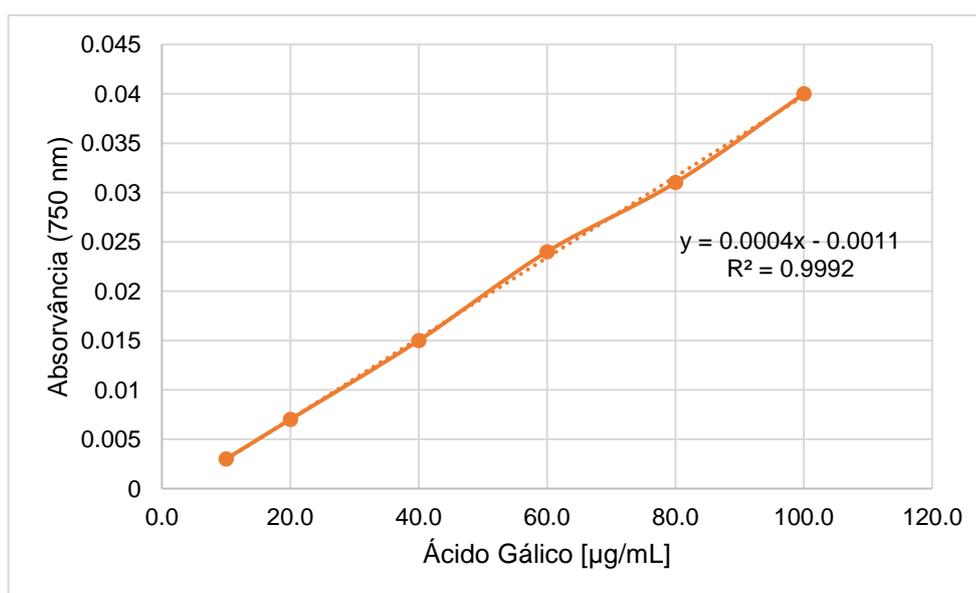


Figura 13. Curva analítica de ácido gálico para determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteau.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras na curva analítica construída com padrão de ácido gálico.

3.6. Determinação Quantitativa de Flavonoides Totais por Espectroscopia na Região do UV-vis

A dosagem de flavonoides totais das frações hexânica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa das folhas de *Morus nigra L.* foi determinada segundo o método colorimétrico do cloreto de alumínio, descrito por Chang e colaboradores (2002), com algumas modificações. O método consiste no fato do cloreto de alumínio ($AlCl_3$) em solução alcoólica se complexar com os flavonoides formando um cromóforo amarelo, apresentando absorção máxima a 425 nm.

Foram misturados 500 μ L de uma solução de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) a 2% com 500 μ L da solução de amostra (100 μ g de cada fração, separadamente). Após 30 minutos à temperatura ambiente, a absorbância da mistura de reação foi determinada a 425 nm, contra um branco, consistindo de uma solução de 500 μ L de metanol com 500 μ L de cloreto de alumínio ($AlCl_3$).

O conteúdo total de flavonoides foi determinado usando uma curva padrão (**Figura 14**) de quercetina (ARVOUET-GRAND et al., 1994) em quatro pontos de concentrações (5, 10, 20 e 40 μ g/ mL). Cada determinação foi realizada em triplicata. O teor de flavonoides totais foi expresso em miligramas equivalentes de quercetina/grama da fração.

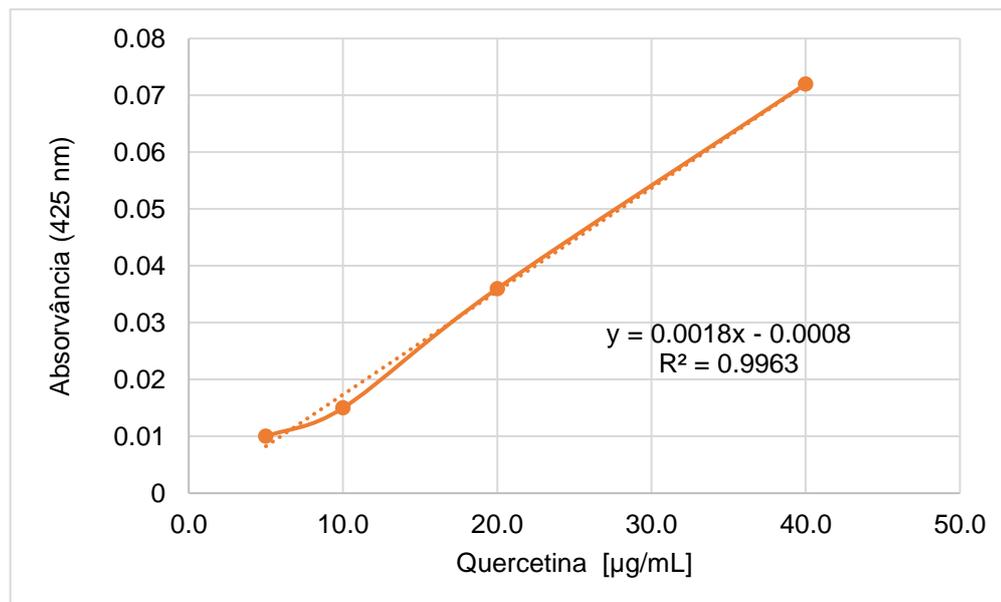


Figura 14. Curva analítica de quercetina para determinação de flavonoides totais por complexação com alumínio.

3.7. Espectroscopia na Região do Infravermelho (IV)

Para a determinação quantitativa de fenóis totais, flavonoides totais bem como para a determinação da atividade antioxidante, foi utilizado um espectrofotômetro modelo *SPECTRUM SP-2000 UV*.

Os espectros de absorção na região de infravermelho (IV) foram obtidos no Instituto de Análises Forenses (IAF) da Polícia Civil do Estado do Acre, com o auxílio de um espectrômetro modelo *Frontier™ IR/NIR* da *PerkinElmer* (**Figura 15**) com um acessório ATR (*Attenuated Total Reflectance*), de forma a minimizar o desvio do feixe do infravermelho.

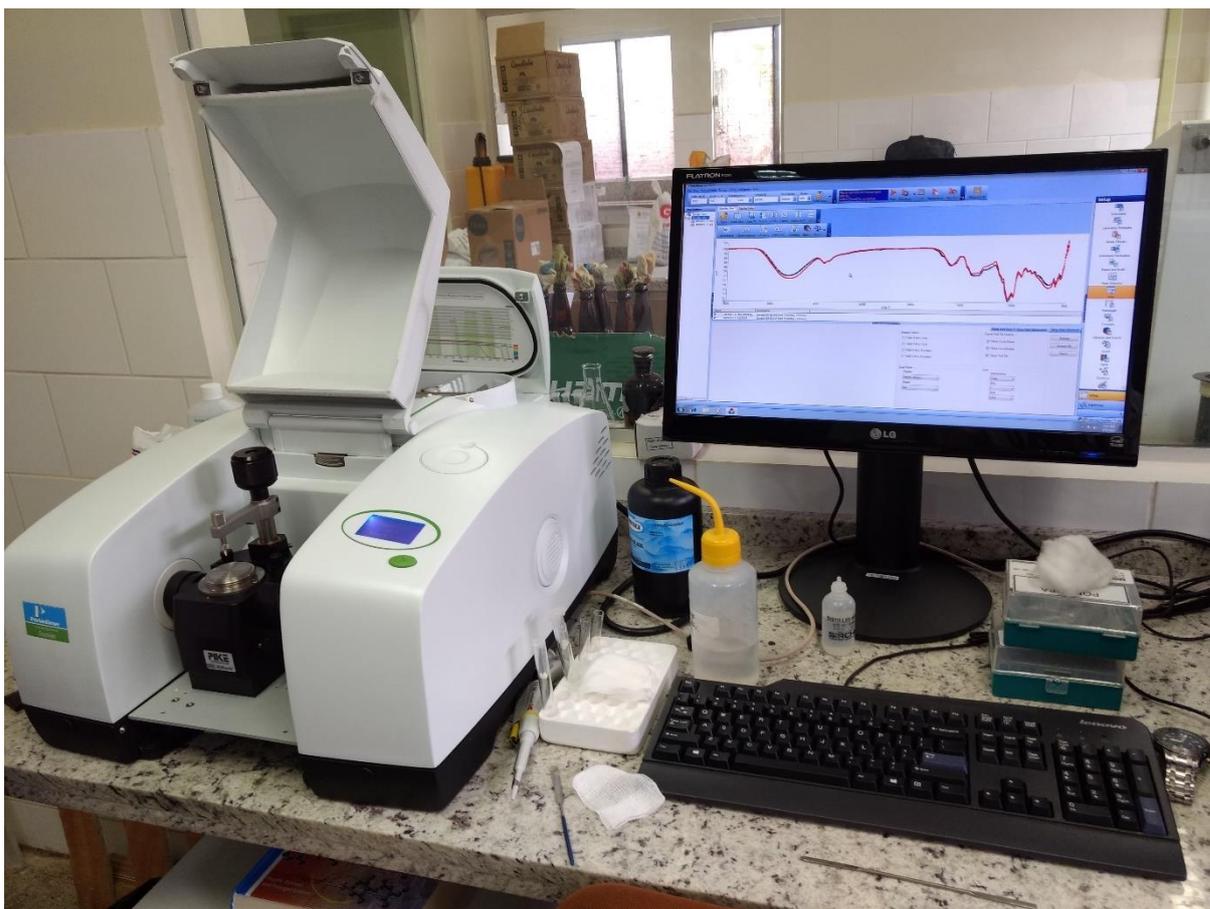


Figura 15. Espectrômetro modelo Frontier™ IR/NIR da PerkinElmer

As amostras (FDicMet, FAcOEt, FBuOH e FAq) encontravam-se em estado semissólido. Pequenas porções foram retiradas e colocadas diretamente no feixe de leitura no IV, este, calibrado na faixa de 500 a 4.000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acumulações de 64 varreduras, utilizando o software *Spectrum* versão 10.4.2 da PerkinElmer.

3.8. Cromatografia Gasosa Acoplada com Espectro de Massa (CG-EM)

A cromatografia gasosa foi realizada no departamento de perícia da Polícia Federal no Estado do Acre, por meio de uma coluna capilar HP-5MS de 30 m, 0,250 mm D.I. e filme 0,25 μm , acoplada a um equipamento *Agilent GC System 7890^a*. A ionização eletrônica e detecção dos fragmentos por espectrometria de massa foi realizada em um equipamento *Agilent Inert XL EI/CI MSD 5975C* (**Figura 16**).



Figura 16. Equipamento utilizado na CG-EM.

A CG-EM foi feita com as frações⁴ FDicMet e FAcOEt. Para a separação e a identificação dos compostos orgânicos, o gás de arraste usado foi o hélio com uma vazão de 1,0 mL/min. A programação de temperatura do forno do cromatógrafo foi a seguinte: temperatura do injetor 325°C; temperatura inicial da coluna 90°C por 0,7 min, depois 35°C/min até atingir 240°C por 4,87 min, depois 8°C/min até atingir 290°C por 0 min e finalmente 25°C/min por 6 min. As análises dos espectros de massas foram feitas por comparação aos espectros encontrados na biblioteca NIST 8.0. O modo de injeção foi *splitless* a 250 °C por 1 min. O volume injetado foi de 1,0 µL. O tempo de corte do solvente foi de 4,0 min e o tempo total da corrida cromatográfica foi de 80 min. A detecção foi realizada por um detector seletivo de massas com ionização por impacto de elétrons a 70 eV, em modo de ionização positiva. As análises em espectro de massas foram operadas no modo *full scan* para a identificação dos compostos.

⁴ A falta de filtro (para seringa) adequado impossibilitou a filtração bem como diluição das demais frações, desta forma foi possível somente trabalhar com as frações FDicMet e FAcOEt.

As temperaturas da fonte de íons e da linha de transferência do CG-EM foram de 270 °C. A faixa de varredura de m/z foi de 50 a 550. Os espectros de massa foram comparados com os compostos de referência da biblioteca NIST e com dados da literatura.

3.9. Avaliação da atividade antioxidante

Uma alíquota das partições (separadamente), foi solubilizada em metanol obtendo-se uma solução estoque de concentração final de 2,0 mg/mL. Diferentes volumes da solução estoque (25 μ L a 1000 μ L), foram acondicionadas com 2 mL de solução de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) (0,03 mM) gerando diferentes concentrações (25 a 1000 μ g/mL). Após o tempo de reação de 30 min a absorbância foi lida em 515 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (AA) usando a seguinte equação:

$$AA(\%) = \frac{|A_{\text{controle(-)}} - A_{\text{amostra}}|}{A_{\text{controle(-)}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$A_{\text{controle(-)}}$ = absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

A_{amostra} = absorbância da amostra com o DPPH.

Um controle foi feito com 2 mL de DPPH (controle negativo). Os testes foram feitos em triplicata. Os valores da metade da Concentração Inibitória máxima (IC_{50})⁵ foram calculados por regressão linear e plotados em gráfico, onde a abscissa representa a concentração do extrato testado e a ordenada à proporção da porcentagem da atividade antioxidante.

Análise estatística: Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP).

⁵ Se trata de uma medida da eficácia de uma substância (neste estudo, as folhas da amora) na inibição de uma função biológica ou bioquímica específica (neste caso, função antioxidante).

3.10. Avaliação da atividade antimicrobiana

Com relação ao teste antimicrobiano, o mesmo foi realizado por meio do método de difusão em discos (de papel filtro). As linhagens de bactérias utilizadas foram obtidas a partir da Coleção de Microrganismos do Laboratório de Microbiologia Aplicada (Rede Bionorte) da Universidade Federal do Acre (UFAC). Para este ensaio foram utilizadas duas bactérias gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12598), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 11733) bem como duas bactérias gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 10536) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883).

Foram utilizados discos de papel de filtro com diâmetro de 6 mm, conforme sugerido por Rabanal et al. (2002) e por Karaman et al. (2003) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (BARRY e THORNSBERRY, 1991) para conhecer o perfil de atividade dos extratos. Para este ensaio, utilizaram-se alíquotas de 10 µL dos extratos na concentração de 300 mg/mL para impregnar os discos de papel. Anteriormente, as frações hexânica e acetato de etila foram solubilizadas em dimetilsulfóxido (DMSO), já as frações metanólica, n-butanólica e aquosa, foram solubilizadas em água destilada estéril e, então, esterilizados por filtração em membrana de 0,22 µm (TPP).

Uma suspensão do microrganismo-teste ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL para bactérias) foi determinada através de comparação visual com um padrão na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland e espalhada (0,1 mL) sobre a superfície de meio sólido AMH (Ágar Müller–Hinton) em placa de Petri de (15 x 90 mm). Logo após, foram adicionados sobre as placas inoculadas, os discos impregnados com os extratos e frações do material analisado. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h. Após este período foi realizada a leitura visual sendo observado o halo de inibição de crescimento microbiano quantificado em mm com o auxílio de um halômetro.

Como controle positivo foi utilizado 30 µg de cloranfenicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) e como controle negativo utilizou-se os discos impregnados com DMSO. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Prospecção Fitoquímica

A avaliação fitoquímica dos extratos e frações das folhas da amora preta, possibilitou a análise qualitativa dos seus metabólitos secundários. Conforme mostrado na **Tabela 2**, os flavonoides, os taninos/fenóis, os alcaloides, bem como, os esteroides e triterpenos estão presentes em todas as frações do extrato metanólico das folhas da amora preta. Já as saponinas, estão presentes apenas na fração aquosa. A respeito da presença de catequinas, ácidos orgânicos livres, polissacarídeos, açúcares redutores, glicosídeos cardiotônicos, proteínas, antraquinonas, depsídeos e depsídonas, estas, não foram identificadas em nenhuma fração testada.

Tabela 2. Principais grupos químicos presentes nas frações do extrato metanólico das folhas da espécie *Morus nigra L.*

PESQUISA	FRAÇÕES				
	HEXANO	DICLOROMETANO	ACETATO DE ETILA	n-BUTANOL	AQUOSA
Flavonoides	+	+	+	+	+
Taninos/Fenóis	+	+	+	+	+
Saponinas	-	-	-	-	+
Catequinas	-	-	-	-	-
Ácidos Orgânicos Livres	-	-	-	-	-
Polissacarídeos	-	-	-	-	-
Açúcares Redutores	-	-	-	-	-
Glicosídeos Cardiotônicos	-	-	-	-	-
Proteínas	-	-	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-	-
Carotenoides					
Alcaloides	+	+	+	+	+
Depsídeos e Depsídonas	-	-	-	-	-
Esteroides e Triterpenos	+	+	+	+	+

Nota: (+) teste positivo; (-) teste negativo.

Song et al. (2009) ao realizarem estudos com diferentes tipos de amoras, encontraram alcaloides nas folhas da espécie *Morus nigra* L., sendo o principal encontrado conhecido como *1-deoxynojirimycin*, que por sua vez, está relacionado à redução dos níveis de glicemia. Da mesma forma, Imran et al. (2010), ao analisarem os frutos das amoras cultivadas no Paquistão, verificaram também a presença de alcaloides nos frutos analisados. Desta forma, pode-se inferir, que o resultado encontrado está de acordo com os últimos estudos desta espécie.

Com relação aos esteroides e triterpenos, Padilha et al. (2010) chegaram a mesma constatação ao trabalhar com extrato bruto das folhas amora preta cultivadas no Brasil, pois segundo dados apresentados, os autores identificaram o composto denominado β -sitosterol ($C_{29}H_{50}O$). Todavia, em tal trabalho, não foi relatado a presença de alcaloides, diferindo com os resultados aqui apresentados quanto à pesquisa por alcaloides.

Pode-se verificar que na fração aquosa há uma reação positiva para saponinas, estas, tanto em meio ácido, quanto neutro e básico. Também foram encontrados na amostra, taninos condensados, visto que ao fim da reação com cloreto férrico ($FeCl_3$), houve a formação de coloração verde. Estes resultados não se assemelham com os relatados por Padilha et al. (2010), ao analisar os extratos da folha desta espécie, visto que não foi observado a presença de saponinas pelo método de formação de espuma muito menos a presença de taninos pelo método do $FeCl_3$.

Com relação aos taninos, estes, são substâncias fenólicas responsáveis pela adstringência em muitos frutos, logo, é absolutamente comum a presença de tais compostos nos produtos vegetais, visto que além de sua importância no sabor dos frutos, os metabólitos secundários, como controle de insetos, fungos e bactérias, por exemplo (SIMÕES et. al, 1999). A respeito destes últimos metabólitos secundários, controle de fungos e bactérias, importa dizer que estudos sobre atividade dos taninos evidenciaram importante ação antibacteriana, ação sobre protozoários bem como na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica, todavia, tais efeitos estão diretamente ligados à dosagem, tipo de tanino ingerido (tanino hidrolisável ou condensado) e período de ingestão (SANTOS e MELLO, 1999).

Desta forma, as análises da prospecção fitoquímica permitiram evidenciar alguns metabólitos secundário que, podem (ou não) estarem associados às atividades

biológicas apontadas pela medicina popular. Todavia, ainda é muito precoce afirmar a existência de tais atividades, logo, se faz necessário analisar os próximos testes.

4.2. Análise Quantitativa de Fenóis Totais

Tabela 3. Determinação do teor de Fenóis Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão
FHex	2,536	0,304
FDicMet	10,238	0,105
FAcOEt	372,722	0,542
FBuOH	400,750	0,131
FAq	304,342	0,374

Conforme demonstrado na **Tabela 3**, as frações FAcOEt e FBuOH apresentaram um maior teor de fenóis totais, com 372,722 e 400,750 $\mu\text{g/mL}$ EqAG, respectivamente. O resultado ficou dentro do esperado, já que estas frações apresentam uma alta polaridade.

O oposto se observou com relação às frações FHex e FDicMet, onde foi identificado um teor correspondente a 2,536 e 10,238 $\mu\text{g/mL}$ EqAG, respectivamente. Todavia, as frações com hexano e diclorometano, teoricamente não deveriam apresentar teores de compostos fenólicos, visto que estas frações são relativamente de baixa polaridade. Estudo anterior (SILVA, 2012) mostrou resultados bem próximos do observado nesta pesquisa (**Tabela 4**), com relação à quantidade de fenóis totais identificada na fração hexânica, acredita-se que é atribuída às possíveis contaminações decorrente do processo de fracionamento a partir do extrato bruto, todavia, trata-se de quantidades muito baixas.

Com relação à FAq, também foram identificados valores de fenóis totais elevados (304,342 $\mu\text{g/mL}$ EqAG).

Tabela 4. Valores encontrados em outra pesquisa para a determinação do teor de Fenóis Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão
FHex	10,667	3,607
FDicMet	---	---
FAcOEt	358,133	1,847
FBuOH	395,000	5,568
FAq	277,333	3,607

Fonte: (SILVA, 2012).

Os resultados encontrados de teor de compostos fenólicos totais para estas frações, foram bem parecidos com trabalhos anteriores, todavia, tais teores de compostos fenólicos em plantas podem variar por diversos fatores, dentre eles, podem ser citadas as diferenças genéticas entre os frutos, o grau de maturação (no caso de frutos) no momento da colheita e sobretudo, às condições de cultivo como tipo de solo, irrigação bem como exposição à luz solar e presença de pragas (PIEKARSKI, 2013). Também se deve levar em consideração a forma que os extratos e frações foram preparados, visto que podem ter sido provenientes de diferentes solventes, e estes por sua vez, têm grande chance de serem responsáveis pela variação dos resultados encontrados.

Os resultados obtidos para a quantificação de teores totais de compostos fenólicos pode ser um forte indício da atividade antioxidante, visto que tais compostos ao interagir com alguns radicais livres, os mesmos são consumidos durante a reação, inibindo os processos da oxidação (ANGELO; JORGE, 2007).

4.3. Análise Quantitativa de Flavonoides Totais

Tabela 5. Determinação do teor de Flavonoides Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão
FHex	1,635	0,385
FDicMet	5,488	0,516
FAcOEt	60,959	0,398
FBuOH	71,424	0,419
FAq	2,255	0,285

Ao analisar a **Tabela 5**, pode-se observar que as frações que tiveram maior teor de flavonoides foram as FAcOEt e FBuOH, assim como no caso dos fenóis totais.

O mesmo aconteceu com relação aos flavonoides presentes na FHex. Apesar da baixa polaridade, encontrou-se uma pequena quantidade destes nesta fração, que assim como no caso anterior (dos fenóis totais), pode-se atribuir este fenômeno às possíveis contaminações decorrentes da etapa de fracionamento do extrato bruto metanólico.

Com relação à FAq, observou-se um valor bem abaixo do identificado no teste de fenóis totais. Silva (2012) também observou um resultado semelhante (**Tabela 6**), no entanto com um valor pouco acima do que neste estudo (4,5 Eq. quercetina), este fato possibilita a hipótese da fração aquosa não ser realmente 304,342 em $\mu\text{g/mL}$ EqAG observado no teste quantitativo de fenóis totais. Ao invés de fenóis, estes, poderiam ser carboidratos presentes nesta fração (FAq).

Tabela 6. Valores encontrados em outra pesquisa para a determinação do teor de Flavonoides Totais das frações do extrato metanólico das folhas da amora preta.

Fração	Média ($\mu\text{g/mL}$)	Desvio padrão
FHex	2,400	0,000
FDicMet	---	---
FAcOEt	53,867	0,924
FBuOH	65,600	0,419
FAq	4,533	0,924

Fonte: (SILVA, 2012).

Assim como no caso dos FT, vários fatores ambientais influenciam a produção de flavonoides nas plantas, como, por exemplo, infecção bem como temperatura, nutrição e qualidade de radiação (BLANK, 1947). Este último, é um dos fatores que, via de regra, está relacionada à variação quantitativa dos flavonoides encontrados no reino vegetal, visto que muitos trabalhos (BLANK, 1947) demonstraram que há um aumento quantitativo dos mesmos em órgãos expostos à luz (se comparado aqueles que estão à sombra).

Assim como na quantificação dos fenóis totais, os resultados obtidos para os valores de flavonoides totais corroboram para a tese de que a presente espécie estudada apresenta ação antioxidante. Simões et al (1999), diz que dentre várias ações no organismo biológico por meio dos flavonoides, pode-se destacar a capacidade do controle de ação de hormônios bem como de agentes alelopáticos, ambas ações também observadas na medicina popular.

4.4. Análises do Infravermelho

Durante a realização deste teste, não houve em nenhum momento a preocupação com quantificar a massa das amostras analisadas, visto que a intenção deste teste, segundo Lopes e Fascio (2004) é de uma análise qualitativa dos compostos orgânicos presentes. Os principais componentes químicos presentes numa detecção de moléculas orgânicas por IV são aqueles que contém bandas como **C-H**, **N-H** e **O-H** (XIE et al., 2011).

É possível por meio desta técnica identificar os grupos funcionais que constituem a amostra (mesmo sendo uma mistura de compostos) bem como de que forma os átomos pertencente à amostra se encontram ligados, uma vez que a técnica permite a produção de espectros de absorção ou transmissão por meio da incidência de um feixe de luz na região do infravermelho (LEITE; PRADO, 2012).

Para fins de melhor visualização (separadamente) dos espectros no IV de cada fração das folhas da amora preta, vide **apêndice A**.

Os resultados obtidos pela análise do infravermelho são mostrados na **Figura 17**, percebe-se que os espectros obtidos pelas frações FDicMet, FAcOEt, FBuOH e FAq são similares nas regiões de 1.500 a 4.000 cm^{-1} , diferenciando-se, ligeiramente, entre 500 e 1.500 cm^{-1} , onde o espectro da fração FAcOEt apresenta perfil da banda (baixa intensidade) em 1262.96 cm^{-1} indicando presença de C-O de éteres (éteres aromáticos e vinílicos: 2 bandas).

Nos quatro casos é possível verificar que os espectros apresentam nas regiões entre 3.000 e 3.500 cm^{-1} , perfil da banda (alargada) em 3.306 cm^{-1} indicando presença de OH de álcool ou fenol. Da mesma forma, é possível observar nos quatro casos, a presença de picos de estiramento da ligação C-H de alcano (3.000-2.840 cm^{-1}) e absorção moderada da região 1.600-1.630 cm^{-1} que pode ser atribuída a C=O.

Evidencia-se também deformação angular simétrica no plano de CH_2 (~1.460 cm^{-1}), vibrações C-O (1.300-1.000 cm^{-1}) bem como estiramento C-X (haletos de alquila) em 1.000-500 cm^{-1} .

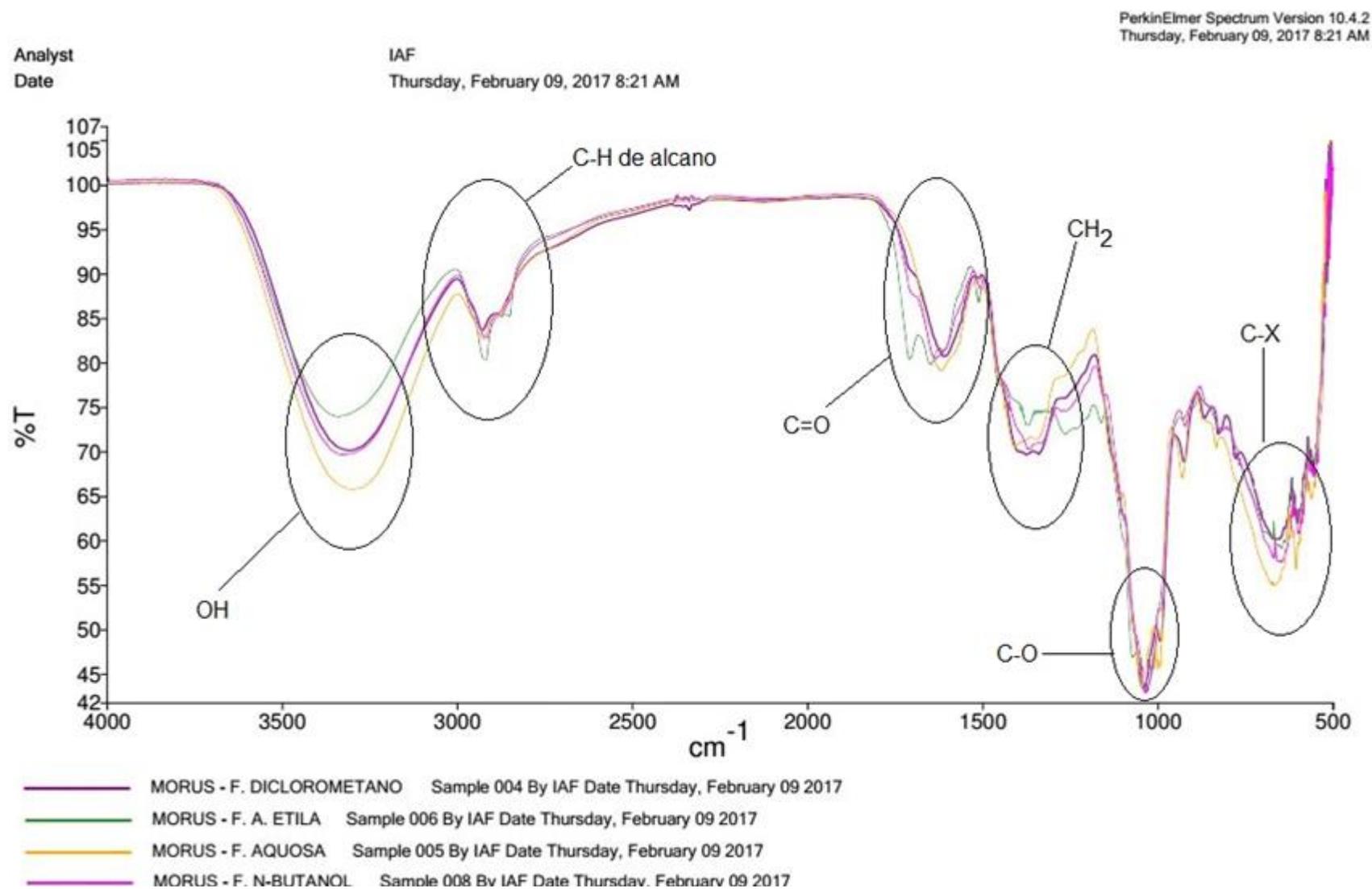


Figura 17. Espectros IV das frações das folhas da amora preta.

Gazola (2014), ao realizar diversos estudos com polpas de frutas, dentre elas a amora, obteve resultados bem próximos do que foram obtidos nesta investigação com as folhas da amora, pois observou estiramento O-H presente na polpa da amora, bem como a verificação de grupos C-H (alcanos), C=O, CH₂, C-O e C-X (haletos de alquila).

Diante dos resultados obtidos, constata-se que apesar das frações testadas possuírem solventes distintos (acetato de etila, diclorometano, n-butanol e água), os quatro espectros apresentaram compostos com grupos funcionais semelhantes, o que diferenciou foi apenas a intensidade de cada composto, visto que se tratou de um teste qualitativo e não quantitativo. Tais resultados, corroboram com a prospecção fitoquímica, pois os grupos funcionais identificados, fazem parte daqueles presentes nos compostos secundários anteriormente apresentados.

4.5. Identificação de compostos via CG-EM

As frações FAcOEt e FDicMet do extrato metanólico das folhas da amora preta foram analisadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (CG-EM).

O cromatograma da FAcOEt apresentou 18 picos (**Figura 18**) e o da FDicMet apresentou 5 picos (**Figura 19**), indicando uma presença maior de constituintes em fração obtida com solvente orgânico mais polar. Foram propostas identificações para 4 substâncias em FAcOEt e para 2, em FDicMet. Sendo que 1 substância foi detectada em ambas as frações.

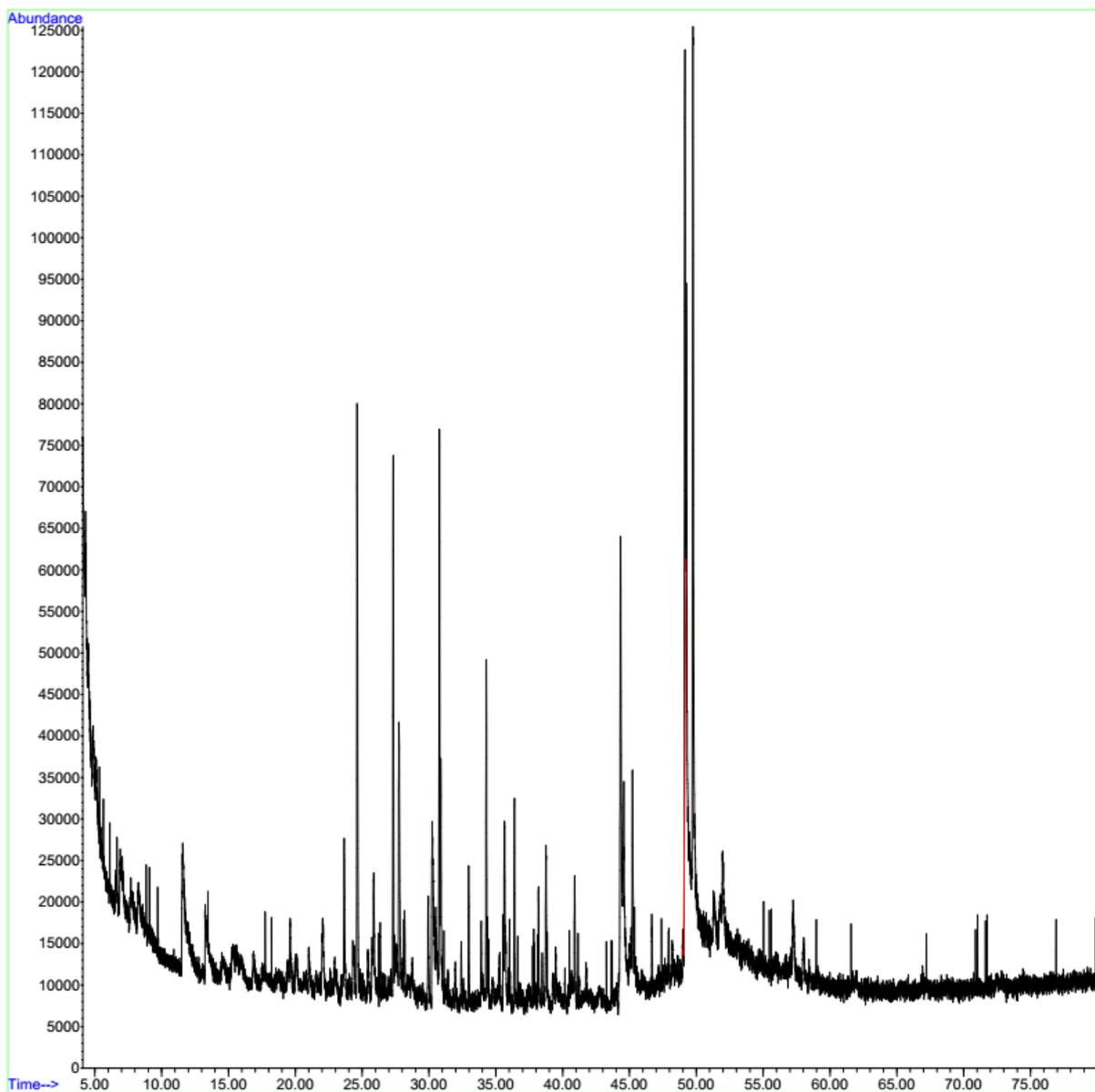


Figura 18. Cromatograma da FAcOEt obtido por CG-EM.

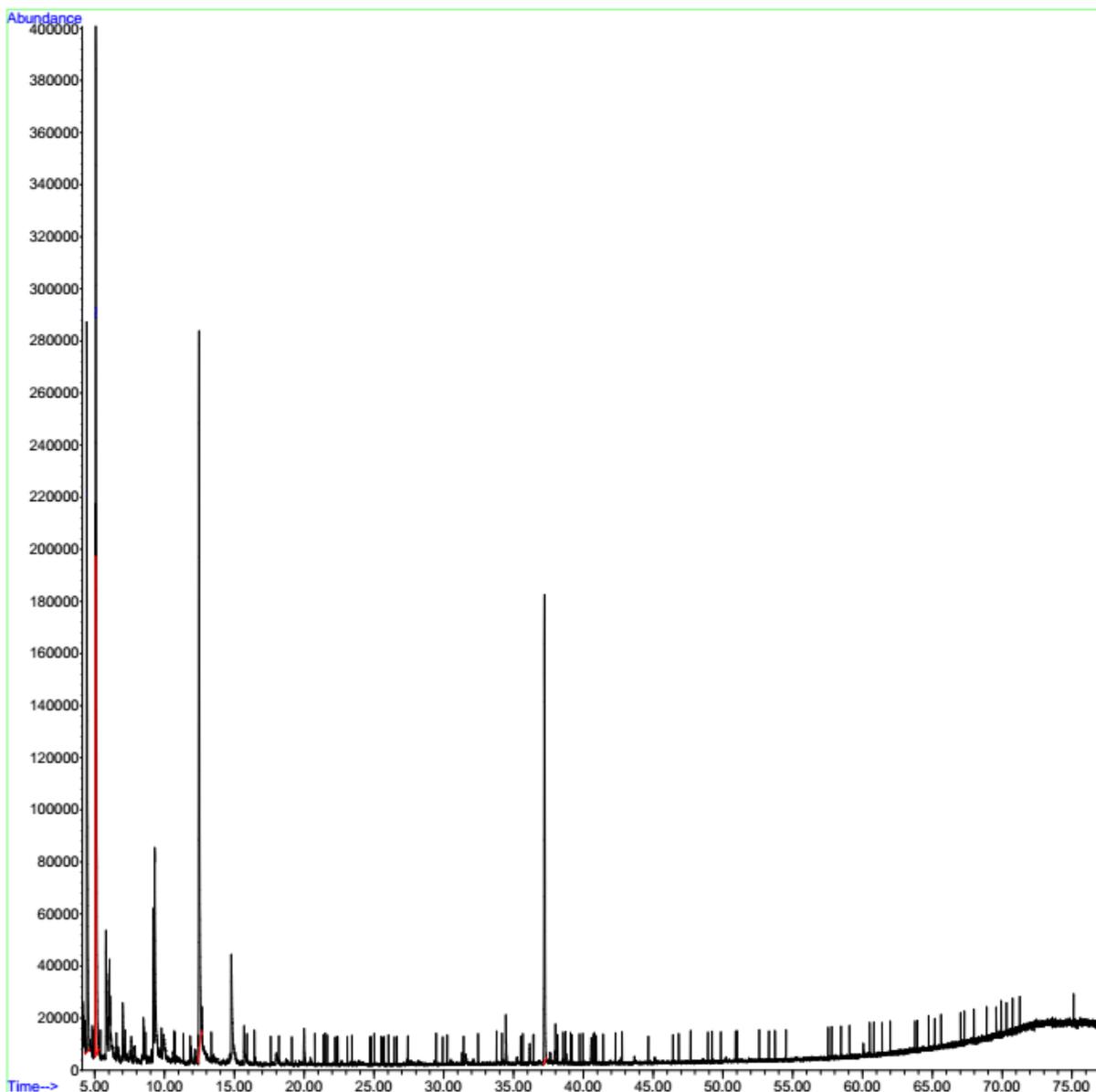


Figura 19. Cromatograma da FDicMet obtido por CG-EM.

Os compostos identificados nas duas frações são apresentados na **Tabela 7**. A identificação de algumas substâncias foi realizada mediante comparação dos espectros de massas dos componentes de cada amostra com os espectros das bibliotecas NIST05 e WILEY7. Não foi possível a identificação de todos os picos presentes nos cromatogramas das amostras, pois apresentaram espectros de massas com índice de similaridade baixo (<50%) em relação aos espectros das espectrotescas. Especificamente no caso da FAcOEt, visto que, a pesar de que saíram diversos compostos, os cromatogramas ficaram bem poluídos, com uma linha de base alta e alguns picos não bem resolvidos.

Tabela 7. Identificação de compostos propostos pela análise por CG-EM das frações FAcOEt e FDicMet.

Prováveis compostos	Fração Acetato de Etila (FAcOEt)			Fração Diclorometano (FDicMet)		
	MM	T.R.	%	MM	T.R.	%
Ácidos graxos						
Ácido esteárico (ácido octadecanóico)	284	6,349	85,6	-	-	-
Ácido láurico (ácido dodecanóico)	172	4,355	90,4	-	-	-
Terpenoides/Esteroides						
Megastigmatrienona (4-[but-1(E),3-dienil]-3,5,5-trimetil-ciclohex-2-en-ona)	190	32,974	76,5	-	-	-
β -sitosterol (17-(5-Ethyl-6-metilheptan-2-ol)-10,13-dimetil-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahidro-1H-cyclopenta[a]fenant-3-em-ol)	414	35,54	90	414	40,57	95,6
Loliolida (6S,7aR)-6-hidroxi-4,4,7a-trimetil-2,4,5,6,7,7a-hexahidro-1-benzofuran-2-ono)	-	-	-	196	37,21	93,0

MM = Massa molecular; T.R.= Tempo de retenção; % = Probabilidade de ser o referido composto segundo a biblioteca do equipamento.

Observa-se a presença de ácidos graxos apenas na FAcOEt. Já os compostos terpênicos foram encontrados tanto na fração FAcOEt quanto na fração FDicMet, neste grupo, o β -sitosterol esteve presente em ambas as frações, enquanto o Loliolida apresentou-se exclusivamente na FDicMet.

O fato de uma substância estar presente em uma fração, mas em outra não, ou ainda estar presente em ambas, deve-se ao grau de afinidade do composto com o solvente orgânico ao qual cada fração foi extraída e/ou ao teor de concentração da substância presente nas frações.

Os espectros de massas dos ácidos graxos identificação sugerida nas amostras bem como suas respectivas estruturas são apresentados nas **Figuras 20 e 21**.

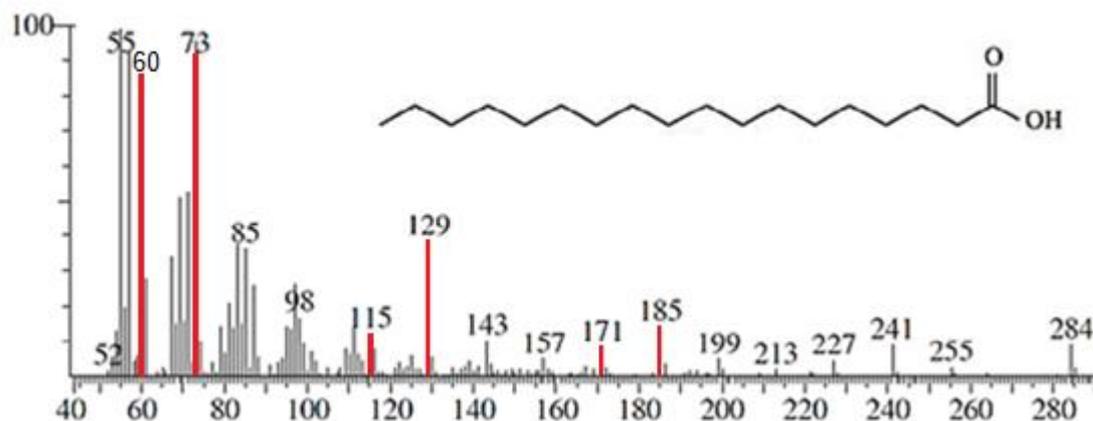


Figura 20. Espectro de massas e estrutura do ácido esteárico.

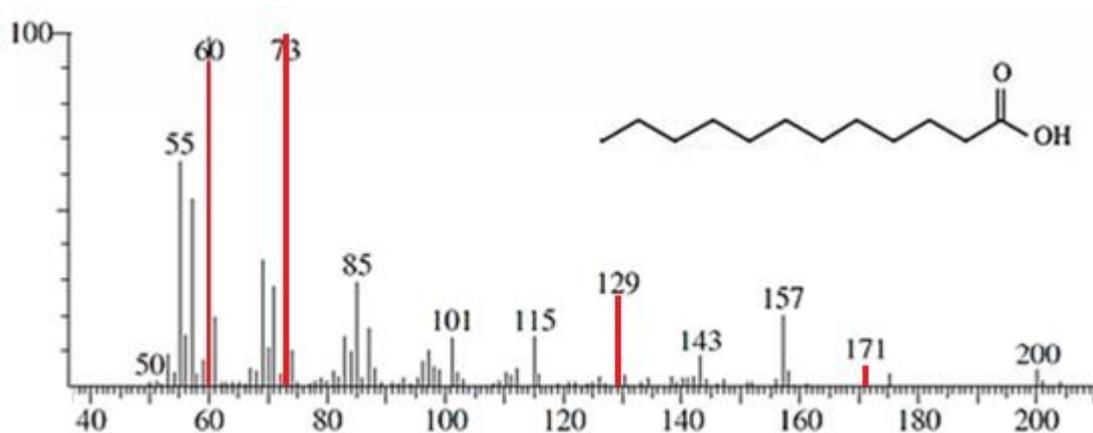


Figura 21. Espectro de massas e estrutura do ácido láurico.

Como foi dito anteriormente, os ácidos graxos foram detectados somente na fração FAcOEt, os dois espectros de massas acima representados (**Figuras 20 e 21**) são característicos **de ácidos graxos livres**, ou seja, nestes espectros, o pico referente ao íon molecular é pouco intenso e o pico base ou a presença de um pico com grande intensidade envolve o rearranjo de *McLafferty* do íon molecular, com quebra da ligação β ao grupo carbonila (SILVERSTEIN et al., 2007).

Com relação à fragmentação dos ácidos graxos via espectro de massas, de uma forma geral, pode-se observar a existência da formação de fragmentos comuns, como por exemplo, na fragmentação do ácido hexadecanóico (ácido palmítico) (**Figura 22 a**, p. 65), tem-se os íons m/z 213, m/z 185, m/z 171, m/z 129, m/z 73 (pico base) e m/z 60 (**Figura 22 b**, p. 65), estes, comuns aos ácidos esteárico e láurico aqui apresentados (SÁNCHEZ, 2012; SILVERSTEIN et al., 2007).

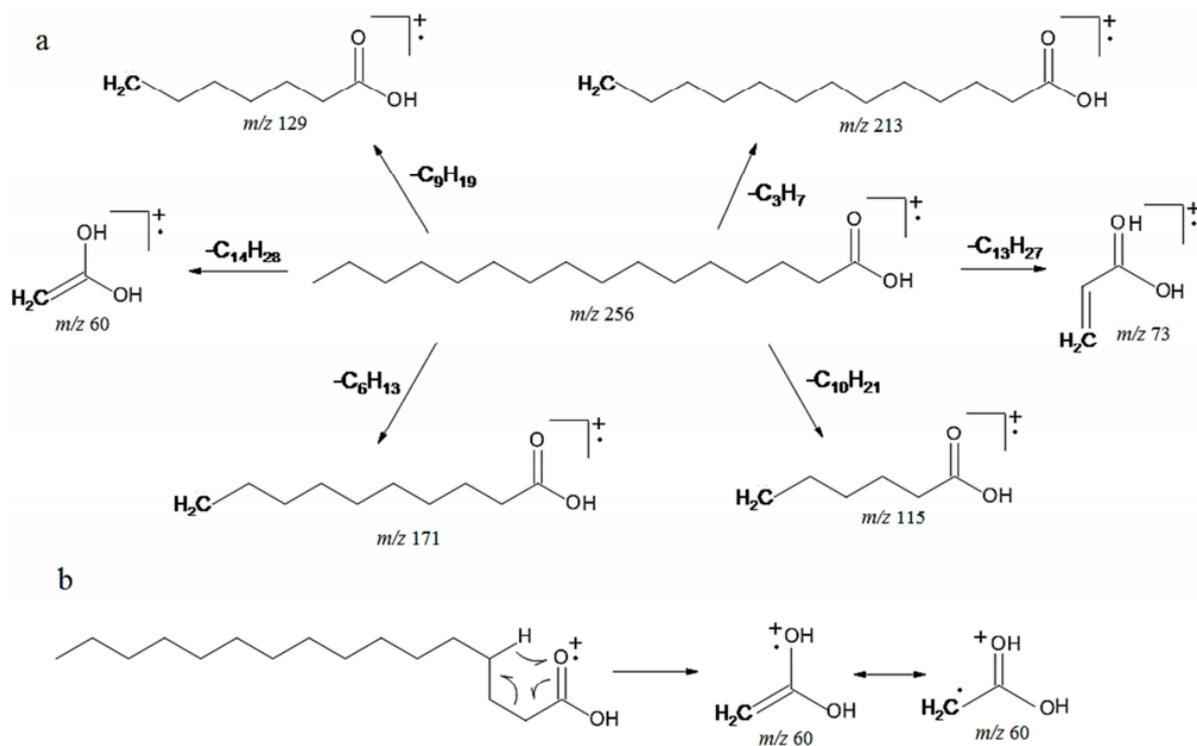


Figura 22. Fragmentação do ácido hexadecanóico por impacto de elétrons (a) e formação do fragmento m/z 60 por rearranjo de McLafferty (b). Fonte: Adaptado de Sánchez (2012) e Silverstein et al. (2007).

O composto 4-[but-1(E),3-dienil]-3,5,5-trimetil-ciclohex-2-en-ona, conhecido como megastigmatrienona, foi detectado somente na fração FDicMet. Segundo Uenojo (2007), trata-se de um composto volátil originado a partir de carotenoides, este composto está classificado como sendo um terpenoide, seu espectro de massas com identificação sugerida bem como sua respectiva estrutura estão apresentados na **Figura 23**.

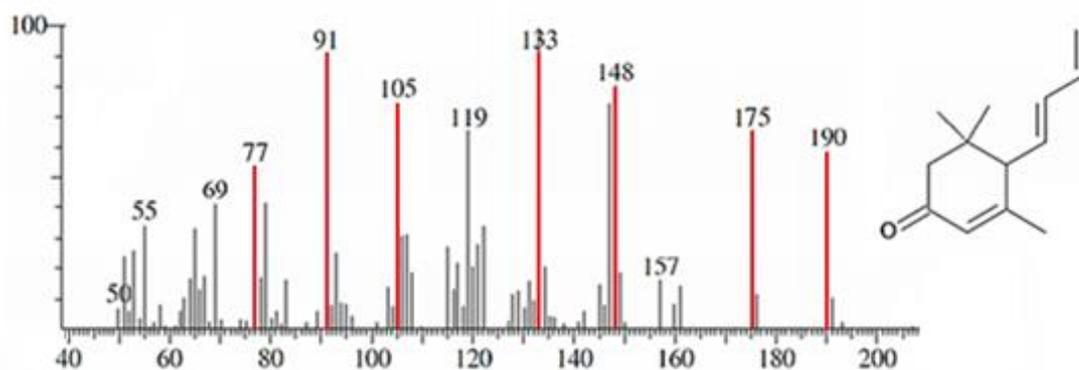


Figura 23. Espectro de massas e estrutura da megastigmatrienona.

Pode-se observar que, na fragmentação deste composto, o pico do íon molecular é intenso (m/z 190), o fragmento m/z 175 se forma pela perda de uma metila

pelo íon molecular (OLIVEIRA, 2014). Os fragmentos m/z 190, 175, 148, 131, 119, 91 e 77 são comuns nos espectros das megastigmatrienonas (NONIER et al., 2005), logo, pode-se dizer, que tal espectro de massas está de acordo com a literatura. Na **Figura 24** tem-se uma proposta dos fragmentos observados no espectro de massas da megastigmatrienona.

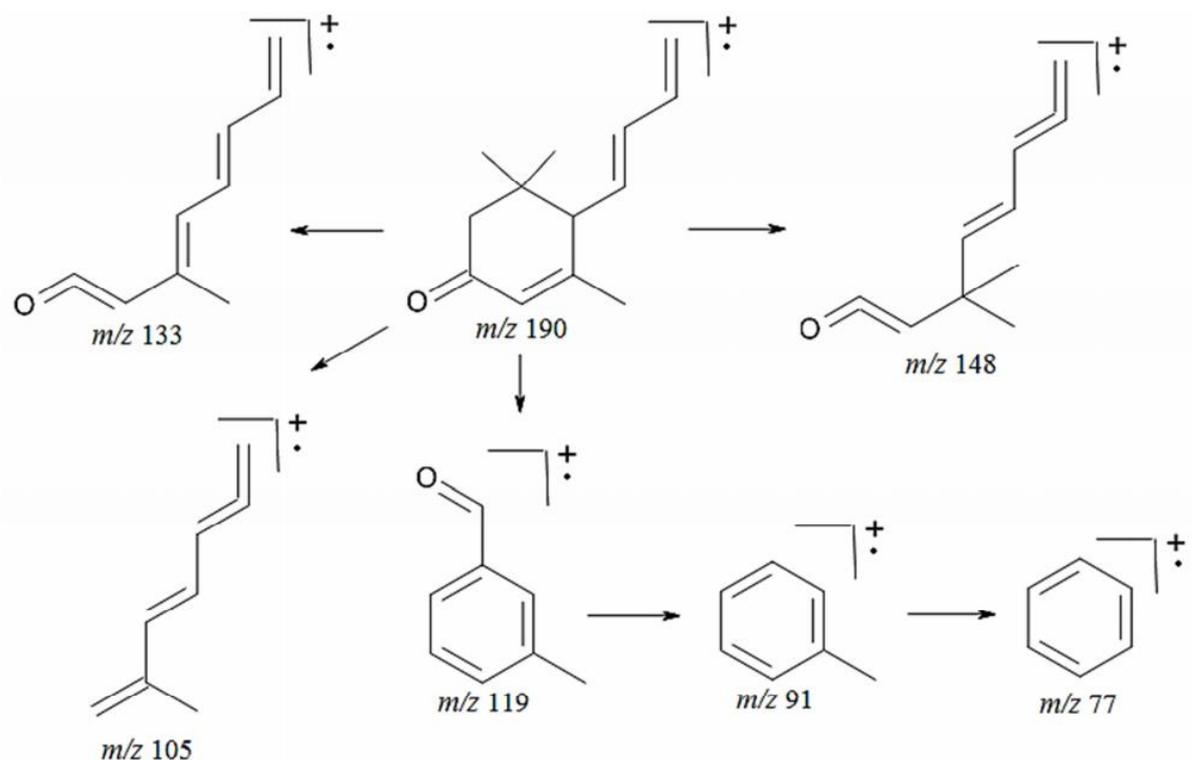


Figura 24. Fragmentação da megastigmatrienona por impacto de elétrons. Fonte: Oliveira (2014).

A análise por CG-EM sugeriu a presença do composto **β -sitosterol**, tanto na fração com acetato de etila quanto na fração com diclorometano.

No espectro de massas do β -sitosterol (**Figura 25**) o pico do íon molecular em m/z 414 não está evidente. Todavia, segundo sugere a literatura, por meio da perda de uma molécula de H_2O pelo íon molecular, forma-se o fragmento m/z 396, da mesma forma, outros íons são formados a partir de rearranjos, como por exemplo, os fragmentos m/z 145, m/z 121, m/z 105, m/z 95 e m/z 91 (OLIVEIRA, 2010). A **Figura**

26 apresenta uma proposta de fragmentação para o β -sitosterol.

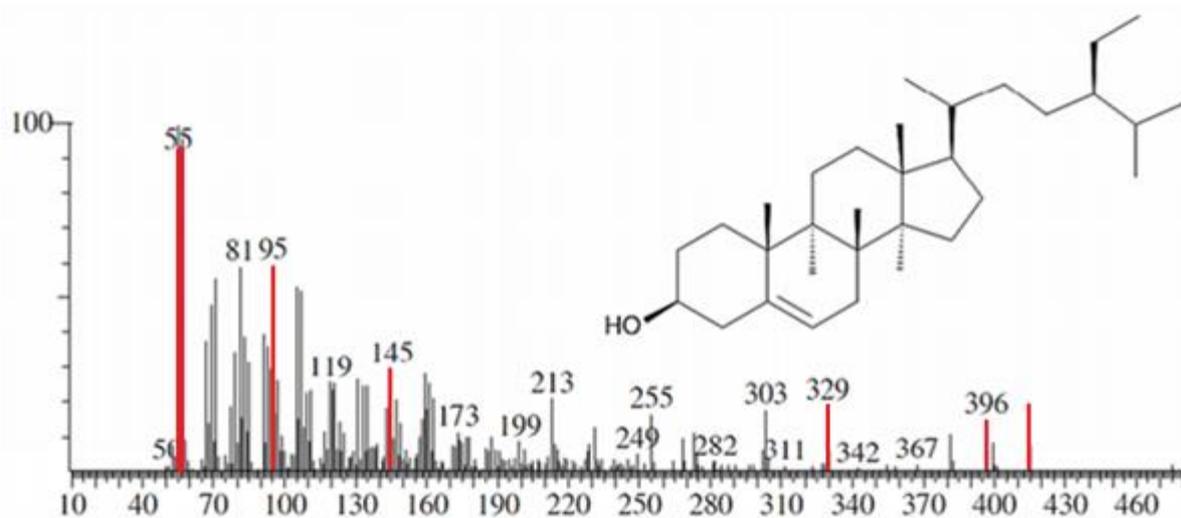


Figura 25. Espectro de massas e estrutura do β -sitosterol.

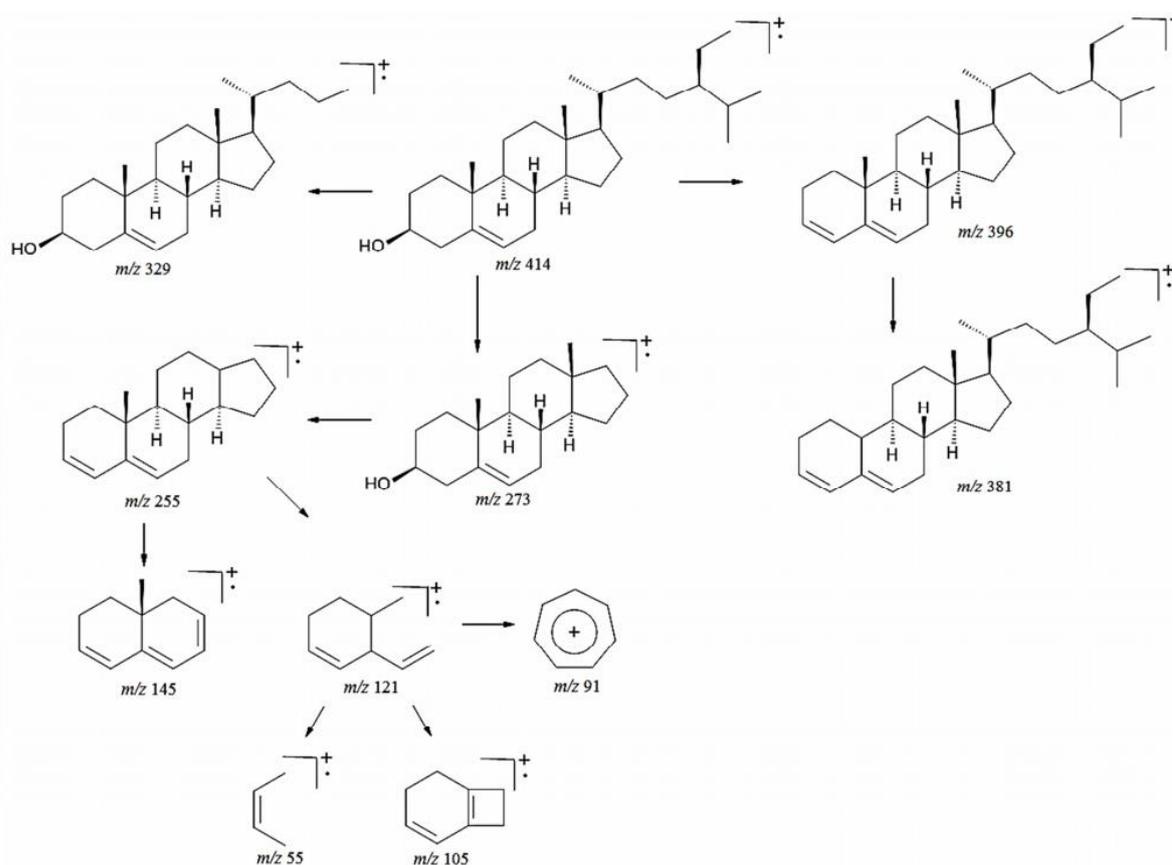


Figura 26. Fragmentação do β -sitosterol por impacto de elétrons. Fonte: Oliveira (2010).

O β -sitosterol está classificado no grupo dos esteroides, dentro deste grupo, ele está sub classificado como um fitosteroide (são quimicamente semelhantes ao colesterol e outros hormônios de origem animal), isto, pois, encontra-se amplamente distribuído nos vegetais. São utilizados pelas indústrias química e farmacêutica para semi-síntese de cortisona e hormônios utilizados como anticoncepcionais e são precursores de vitamina D (OLIVEIRA, 2014; GABAY et al., 2010; HAN et al, 2008).

Com relação a pesquisas feitas com a espécie em estudo (*Morus nigra L*), também identificou o composto **β -sitosterol** nas folhas da amora preta, atribuindo alguns benefícios no combate ao colesterol (PADILHA et al., 2009; 2010a; 2010b). Outros estudos também comprovam a eficácia de tal fitosterol no combate e prevenção de problemas cardiovasculares, doenças da próstata, no controle da glicemia, no tratamento da diabetes bem como no tratamento para minimizar os efeitos da menopausa (VOLPATO et al., 2011; PADILHA et al., 2009; 2010a; 2010b).

Desta forma, com a presente identificação, foi possível ratificar alguns saberes populares com relação à utilização das folhas da amora preta como chá em uso para fins medicinais, como por exemplo, a utilização do chá para minimizar os efeitos da menopausa. Isto, devido a identificação do composto denominado β -Sitosterol, que segundo a literatura consultada, é um fitosterol responsável por muitas atividades benéficas para o organismo humano, dentre eles, no tratamento da menopausa, como afirmam os saberes populares.

Por fim, a análise por CG-EM sugeriu a presença de Loliolida na fração FDicMet. No espectro de massas da Loliolida (**Figura 27**) observa-se a presença do pico do íon molecular em m/z 196. O fragmento m/z 178 se forma devido à perda de uma molécula de H₂O pelo íon molecular, outros íons são formados a partir de rearranjos, como os fragmentos m/z 178, m/z 163, m/z 105 e m/z 111 (OLIVEIRA, 2010). A **Figura 28** apresenta uma proposta de fragmentação para o β -sitosterol.

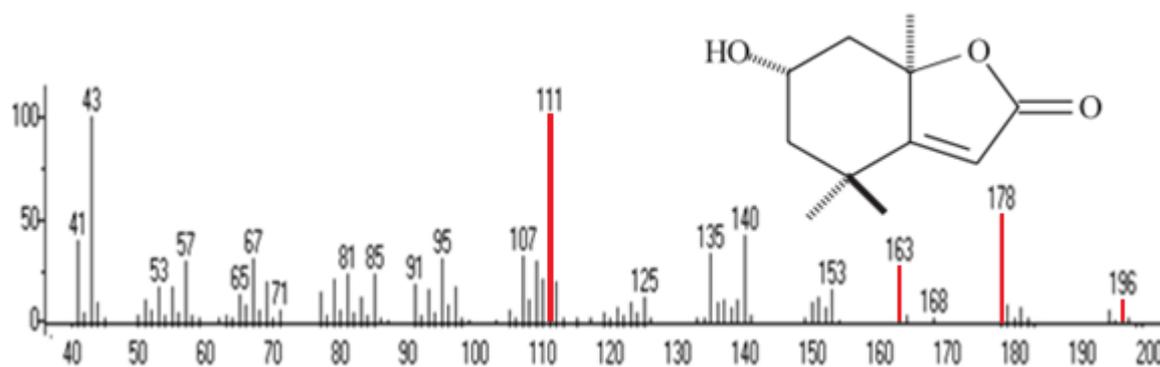


Figura 27. Espectro de massas e estrutura da Loliolida.

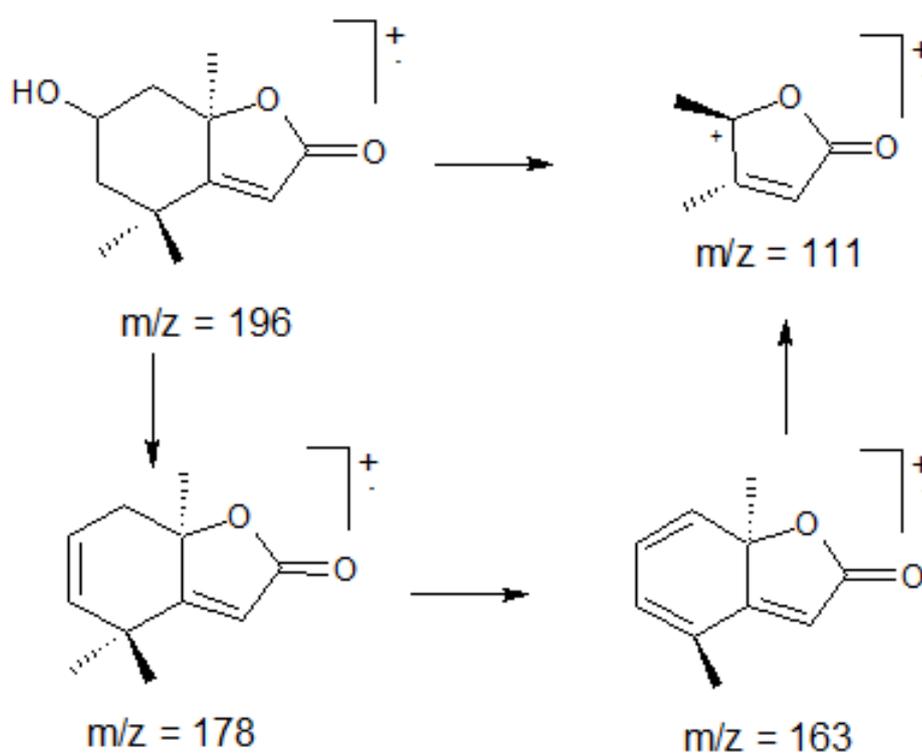


Figura 28. Fragmentação da Loliolida por impacto de elétrons.

A Loliolida está classificada como *lactona terpênica*, tendo como algumas propriedades biológicas reportadas, atividades como repelente (de formiga), inibidora de germinação, imunossupressiva e citotóxica contra *carcinoma* humano de *nasofaringe* (KB) e leucemia linfóide (P388) (CONEGERO et al., 2003). Até o presente momento não existem relatos na literatura com este composto extraído das folhas da amora preta.

4.6. Avaliação da Atividade Antioxidante

A evidência da atividade supressora da amostra foi determinada pelo cálculo da concentração inibitória capaz de suprimir 50 % da forma radicalar no sistema (IC_{50}), esta, por sua vez, é inversamente proporcional ao valor numérico do IC_{50} . Isto é possível visto que O DPPH• foi reduzido pela ação de um antioxidante, no caso em particular, por meio das frações das folhas da amora preta, formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH) (**Figura 29**), cuja coloração é amarela. Nesta etapa, ocorre o desaparecimento da banda de absorção, que, por sua vez, é monitorada pelo decréscimo da absorbância do material analisado (**Figura 30**).

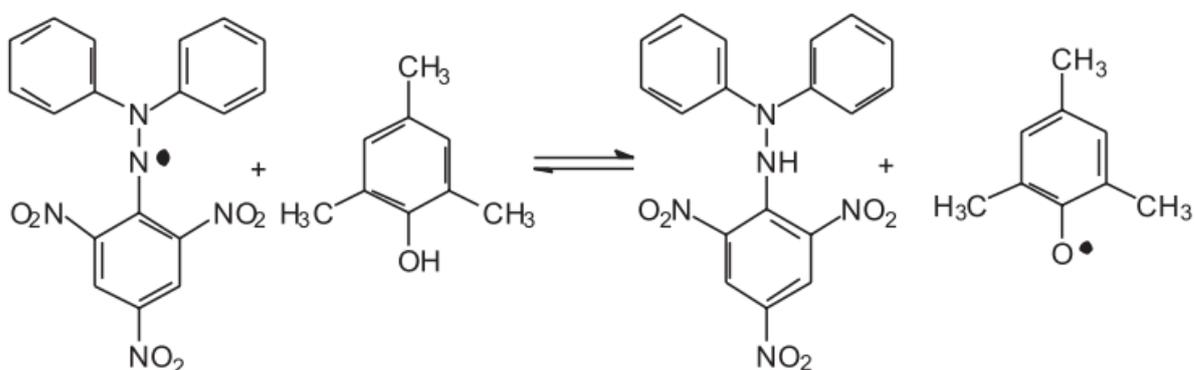


Figura 29. Reação química entre o BHT e o radical DPPH•. Fonte: (OLIVEIRA et al., 2009, p. 697).

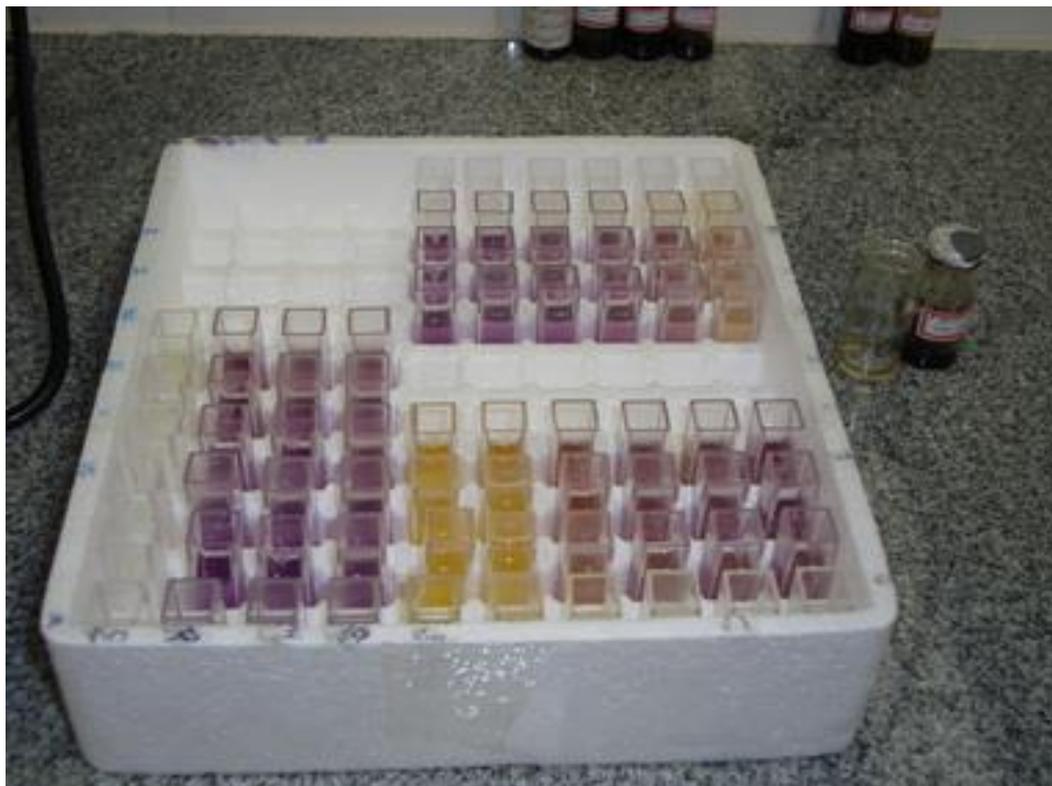


Figura 30. Mudança da coloração púrpura para amarela resultante do processo de redução do DPPH• pelas folhas da amora preta.

Por meio dos resultados obtidos a partir da leitura da absorbância, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante (quantidade de DPPH• consumida pelo antioxidante) ou sequestradora de radicais e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (OLIVEIRA et al., 2009).

Na **Tabela 8**, tem-se os resultados obtidos para a atividade antioxidante, que, são baseados no perfil que apresenta maior potencial supressor das formas radicalares ou oxidantes estudadas, ou seja, os menores IC₅₀.

Tabela 8. Resultados para a atividade antioxidante baseadas no IC₅₀.

Fração	IC ₅₀ (ppm)	Desvio padrão
FAcOEt	49,337	0,443
FDicMet	50,362	0,222
FBuOH	50,405	0,322
FAq	49,594	0,587
FHex	500,523	0,221

O padrão BHT (2,6-bis(1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) foi empregado como controle positivo, cujo IC₅₀ encontrado foi de 16 ppm⁶ (SILVA, 2008). Desta forma, ao analisar os dados da **Tabela 8**, pode-se chegar à conclusão de que as folhas da espécie estudada apresentam uma significativa atividade antioxidante, com exceção apenas da fração hexânica, visto que seu IC₅₀ apresentou valor bem maior que as demais frações.

O valor⁷ elevado acerca da atividade antioxidante, ratifica a constatação da quantificação tanto na prospecção fitoquímica quanto no teste de quantificação dos teores de fenóis totais, visto que os resultados foram positivos. A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, desempenhando assim, um papel importante tanto no sequestro quanto na neutralização de radicais livres, dentre eles, os EROs, evitando por sua vez, a propagação do processo de estresse oxidativo.

A busca por produtos naturais com atividade antioxidante vem ganhando cada vez mais espaço na indústria alimentícia, visto que pesquisas não descartam a possibilidade dos antioxidantes (sintéticos⁸) empregados apresentarem alguns efeitos tóxicos no organismo biológico, como por exemplo, o galato de propila (C₁₀H₁₂O₅), quando em presença de peróxido de hidrogênio, reage com íons ferrosos formando EROs, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (SOARES, 2002; SOUSA, 2007).

No caso dos agentes antioxidantes naturais, os compostos intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, visto que em sua estrutura apresentam anéis aromáticos, que são estabilizados por ressonância. Desta forma, os resultados apresentados possibilitam chegar à conclusão de que as folhas da amora preta apresentam propriedades antioxidantes quando comparadas ao antioxidante sintético (BHT) utilizado como padrão podendo ainda ter a vantagem de baixa possibilidade de toxicidade no organismo biológico.

⁶ Valor padrão do IC₅₀ em ppm, utilizando um antioxidante sintético (BHT)

⁷ Vale ressaltar que existem algumas evidências acerca da ação *in vitro* dos fenóis e polifenóis com espécies reativas de oxigênio, que, em algumas circunstâncias, tal como o ascorbato e os carotenóides, mostraram características pró-oxidantes, todavia, não foi o caso do estudo em questão (SOUSA, 2007).

⁸ butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de propila (GP).

4.7. Avaliação da Atividade Antimicrobiana

Na **Figura 31**, pode-se observar de forma esquemática, o princípio utilizado no teste para a atividade antimicrobiana. Apesar de ser um teste relativamente simples, apresenta resultados qualitativos confiáveis e, por isso, é um dos métodos mais utilizados pelos laboratórios de microbiologia. Em linhas gerais, seu princípio básico é a difusão do disco impregnado com o antimicrobiano (no caso em particular, as frações das folhas da amora preta) na superfície de uma placa contendo meio de cultura, este, rico em nutrientes no qual as bactérias podem se multiplicar. Em caso de teste positivo, o antimicrobiano se difunde na área ao redor do disco, e um halo de lise bacteriana se torna visível, em caso de teste negativo, não há formação de halo.

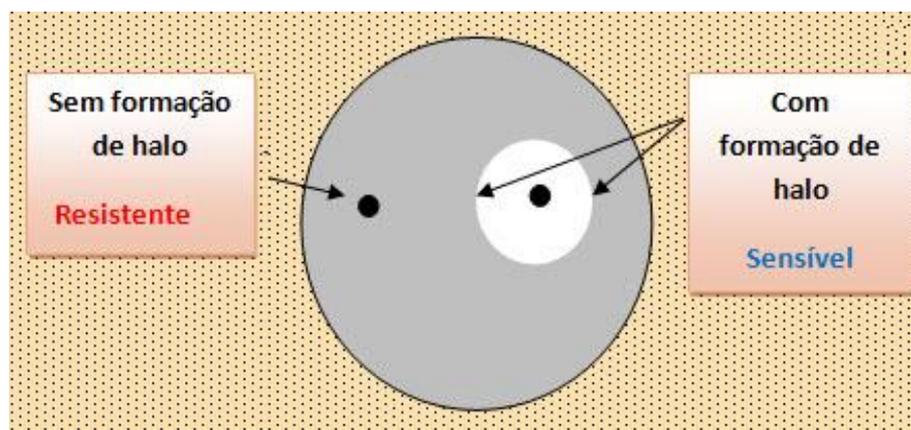


Figura 31. Representação esquemática do princípio de funcionamento do teste microbiano disco-difusão em ágar.

Os resultados constataam a **não** atividade antimicrobiana do extrato bruto metanólico bem como das frações das folhas da amora preta testadas para as bactérias mencionadas, visto que não houve a formação de nenhum halo de lise bacteriana visível ao redor dos discos, em outras palavras, as bactérias testadas foram resistentes ao material analisado.

Em diversos estudos sobre plantas que possuem presença de taninos, evidenciaram importante ação antibacteriana/antimicrobiana, ação sobre protozoários, na reparação de tecidos, regulação enzimática e proteica, assim, pelo fato das folhas de amora preta aqui estudadas apresentarem tal composto esperava-se a atividade antimicrobiana como resultado, no entanto, não foi o constatado. Com relação às atividades bactericidas e fungicidas nos taninos, sejam hidrolisáveis ou condensados (observado neste estudo), ocorrem por três características gerais

comuns: complexação com íons metálicos; atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; habilidade de complexar com outras moléculas, principalmente proteínas e polissacarídeos (SANTOS, MELLO, 2001).

Pesquisas mostram que a atividade antimicrobiana é relacionada à ação antioxidante dos fitoquímicos, este seria mais um forte indício para a possível ação antioxidante das folhas da amora preta, visto que as mesmas apresentaram um bom teor de ação antioxidante, todavia, esta relação pode variar de acordo com a concentração e o tipo de bactéria a ser estudada (MATASYOH et al., 2009; WU et al., 2008; THITILERTDECHA et al., 2008).

Ainda, pesquisas realizadas com o extrato das frutas da amora preta frente à bactéria gram-negativa *Salmonella enteritidis*, mostram resultados antimicrobianos positivos, estes, segundo os autores, relacionados com a capacidade antimicrobiana in vitro que estes extratos apresentaram (MARTINI et al., 2009).

CONCLUSÕES

Este estudo foi impulsionado por meio de saberes populares (ou tradicionais), visto que na medicina popular, o chá das folhas da amora preta (*Morus nigra L*) serve para diversos tratamentos de doenças, como por exemplo, dores de cabeça, cólicas menstruais, insônia, além de relatos acerca de possível ação de reposição hormonal em mulheres na menopausa. Desta forma, o principal foco de interesse foi verificar o perfil fitoquímico bem como as possíveis atividades antioxidante e antimicrobiana presentes nas folhas da amora preta.

Após a realização da prospecção fitoquímica, foi possível concluir que existem flavonoides, taninos/fenóis, alcaloides bem como esteroides e triterpenos presentes em todas as frações do extrato metanólico das folhas amora preta. Já as saponinas, estão presentes apenas na fração aquosa. Não foi constatada em nenhuma fração do extrato bruto metanólico a existência de catequinas, ácidos orgânicos livres, polissacarídeos, açúcares redutores, glicosídeos cardiotônicos, proteínas, antraquinonas, depsídeos e depsídonas.

A respeito da quantificação de compostos fenólicos bem como de flavonoides totais, foi possível identificar valores bem próximos a outros estudos de ambos os compostos nas frações testadas.

Com relação aos testes para avaliar as atividades biológicas, atividade antioxidante e antimicrobiana, chega-se à conclusão, que as folhas da amora preta apresentam uma significativa atividade antioxidante quando comparada à ação de antioxidantes sintéticos, todavia, para a atividade antimicrobiana, os resultados constataam a não atividade do extrato bruto metanólico bem como das frações das folhas da amora frente às bactérias testadas.

Dentre os objetivos desta investigação, estava verificar os principais grupamentos químicos, bem como identificar os metabólitos secundários presentes nas folhas da amora preta. Desta forma, foi realizado espectroscopia no infravermelho e cromatografia gasosa acoplada com espectro de massa.

Os resultados em cada caso apontam que as frações testadas apresentaram estiramento O-H, bem como a verificação de grupos C-H (alcanos), C=O, CH₂, C-O e

C-X (haletos de alquila). No CG-EM foi possível identificar a presença de ácidos graxos (ácido esteárico, ácido láurico) e terpenos/esteroides (megastigmatrienona, β -sitosterol e Loliolida).

Com o presente estudo, foi possível ratificar alguns saberes populares com relação à utilização das folhas da amora preta como chá em uso para fins medicinais, como por exemplo, a utilização do chá para minimizar os efeitos da menopausa. Isto, devido a identificação do composto denominado β -Sitosterol, que segundo a literatura consultada, é um fitosterol responsável por muitas atividades benéficas para o organismo humano, dentre eles, no tratamento da menopausa, como afirmam os saberes populares.

Ressalta-se a necessidade de estudos mais aprofundados, com técnicas mais específicas para isolar e quantificar todos os compostos que possivelmente (além dos identificados) estão presentes nas folhas da amora preta, técnicas como, cromatografia de coluna, cromatografia em camada delgada e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono. Além disso, se faz necessário testes *in vivo* para comprovar a eficácia dos compostos identificados quando do tratamento das doenças apontadas na literatura por meio dos mesmos.

REFERÊNCIAS

- ACHKAR, M. T. et al. Propriedade antioxidante de compostos fenólicos: importância na dieta e na conservação de alimentos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 11, n. 2, p. 398- 406, ago/dez. 2013
- AGAREZ, F. V.; CÉZIO, P.; CECÍLIA, M. R. **Botânica: Taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1994.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, p. 232-240, 2007.
- ARVOUET-GRAND, A.; VENNAT, B.; POURRAT, A.; LEGRET, P. Standardisation d'un extrait de propolis et identification des principaux constituants. **J Pharm Belg**, v. 6, p. 462-468, 1994.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. DE C. G. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BARBOSA, W. L. R. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Universidade Federal do Pará (UFPA). Belém, 2001.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. **J. Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 1117-1125, 1991.
- BEECHER, G. R. **Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake**. Proceedings of the Third International Scientific Symposium on Tea and Human Health: Role of Flavonoids in the Diet. Anais... [S.l.]: The Journal of Nutrition, 2003.
- BLANK, F. The anthocyanin pigments of plants. **Bot. Rev.** n. 13, p. 241-317, 1947.
- BURN, M. J.; MAYLE, F. E. Palynological differentiation between genera of the Moraceae family and implications for Amazonian palaeoecology, **Review of Palaeobotany and Palynology**, p. 187–201, 2008.

CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, p. 178–182, 2002.

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; Nazari, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H.; DIAS, B. P.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Chemical constituents of *Alchornea glandulosa* (Euphorbiaceae). **Química Nova (Impresso)**, v. 26, p. 825-827, 2003.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests - M02-A11**. 11. ed. Wayne: CLSI, Wayne: USA 2012.

DAMME, E. J. M. V. et al. Two Distinct Jacalin-Related Lectins with a Different Specificity and Subcellular Location Are Major Vegetative Storage Proteins in the Bark of the Black Mulberry Tree, **Plant Physiol**, v. 130, n. 2, p. 757-769, 2002.

DIEGUES, A. C. S. (Org.); ARRUDA, RINALDO, S. V. (Org.). **Saberes tradicionais e biodiversidade no Brasil**. 4. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2001. v. 4. 176p.

EMBRAPA. **Sistema de Produção da amoreira-preta**. Disponível em:<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Amora/SistemaProducaoAmoreiraPreta/botanica.htm>>. Acesso em: 05 jan. 2016.

FU, L.; XU, B. T.; XU, X. R. et al. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 62 fruits. **Food Chem.**, v. 129, n. 2, p. 345-350, 2011.

FUKUJI, T. S.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F. M. Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 51, n. 2, p. 430-438, 2010.

GABAY, O.; et al. Stigmasterol: a phytosterol with potential antiosteoarthritic properties. **Osteoarthritis and Cartilage**. v.18, p. 106–116, 2010.

GAZOLA, M. B. **Caracterização de polpas e bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja, amora, pitanga e mirtilo - análises reológicas, fitoquímicas, físico-químicas, microbiológicas e sensoriais**. 2014. 215 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Pós-

graduação em Controle de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. 2014.

GUNDOGDU, M. et al. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC, **Sci Hortic**, v. 132, p. 37-41, 2011.

HAN, J.H.; YANG, Y.X.; FENG, M.Y. Contents of phytosterols in vegetables and fruits commonly consumed in China. **Biomed Environ Science**, v. 21, p. 449-457, 2008.

HU, X. et al. Isoprenylated flavonoids and adipogenesis promoting constituents from *Morus nigra*, **J. Nat. Prod.**, v. 74, n. 4, p. 816-24, 2011.

IKAWA M, SCHAPER TD, DOLLARD CA, SASNER JJ. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

IMRAN, M.; KHAN, H.; SHAH, M.; KHAN, R.; KHAN, F. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. **J. Zhejiang Univ. Sci. B**, v. 11, n. 12, p. 973-80, 2010.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis Vinefera*) extracts on peroxidation models in Vitro, **Food Chemistry**, v.73, p.285-290, 2001.

KAFKAS, S. et al. Molecular Characterization of Mulberry Accessions in Turkey by AFLP Markers, **J. Amer. Soc. Hort. Sci**, v. 133, n. 4, p. 593-597, 2008.

KARAMANİ, Ş. F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M., ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J Ethnopharmacol**, p. 231-235, 2003

LEITE, D. O.; PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 34, n. 2, p. 2504-1 – 2504-9, 2012.

LOPES, W. A.; FASCIO, M. Esquema para interpretação de espectros de substâncias orgânicas na região do infravermelho. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 670-673, 2004.

MARTINI, S.; et al. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobials Agents**, v. 34, p. 50-59, 2009.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**, 2. ed. Fortaleza: UFC 1997.

MATASYOH, J.C., MAIYO, Z.C., NGURE, R.M., CHEPKORIR, R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Coriandrum sativum*. **Food Chemistry**, v. 113, p. 526-529, 2009.

MEDA, A.; LAMIEN, C. E.; ROMITO, M.; MILLOGO, J.; NACOULMA, O. G. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkin Fasan honey, as well as their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 91, n.3, p. 571-577, 2005.

MLADENKA, P.; ZATLOUKALOVÁ, L.; FILIPSKÝ, T.; HRDINA, R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity, **Free Radic. Biol. Med.**, v. 49, n. 6, p. 963-75, 2010.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, p. 517-543, 2001.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002. Disponível em < <http://www.scielo.br/pdf/rn/v15n1/a08v15n1.pdf>>. Acesso em 23 de mar de 2017.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>>. Acesso em 23 de mar de 2017.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e Plantas Medicinais**. São Paulo: Hemus editora, 1982.

NAKAMURA Y. et al. Dihydrochalcones: evaluation as novel radical scavenging antioxidants, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 3309-3312, 2003.

NONIER, M. F.; GAULEJAC, N. V.; VIVAS, N.; VITRY, C. Glycosidically bound flavour compounds in *Quercus petraea* Liebl. Wood. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 20, p. 567–572, 2005.

NOVAES, G. M. et al. Compostos antioxidantes e sua importância nos organismos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 11, n. 2, p. 535- 539, ago./dez. 2013.

OLIVEIRA, F. F. S. **Pesquisa de dados botânicos de plantas úteis coletadas por naturalistas europeus no século XIX no norte/nordeste de Minas Gerais - Dados botânicos, químicos e ensaios antioxidantes de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hil (*Erythroxylaceae*)**. 2014. 143 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM, Diamantina-MJ. 2014.

OLIVEIRA G. S. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e inibitória das catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (*Melastomataceae*)**. 2010. 98 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Moleculares) – Programa de Pós-graduação em Ciências Moleculares, Unidade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás, Anápolis, 2010.

OLIVEIRA, A. C. O.; VALENTIM, I. O.; GOULART, M. O. F.; SILVAI, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M.T.S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

PADILHA, M. M. et al. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice, **Journal of Medicinal Food**, v. 12, p. 1381-1385, 2009.

PADILHA, M. M. et al. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 621-626, 2010a.

PADILHA, M. M. et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves, **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1496-1500, 2010b.

PEIXOTO, A. M. (Org.); TOLEDO, F. F. **Enciclopédia Agrícola Brasileira, A-B**. v. 6. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo (FAPESP), 1995.

PIEKARSKI, P. **Análise Nutricional e Fitoquímica de Frutos da *Morus nigra* L.** 2013. 140f. Dissertação (Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

PINHEIRO, P. C.; GIORDAN, M. O preparo do sabão de cinzas em Minas Gerais, Brasil: do status de etnociência à sua mediação para a sala de aula utilizando um sistema hipermídia etnográfico, **Investigações em Ensino de Ciências**, v. 15, p. 355-383, 2010.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira, **Quim. Nov.**, v. 6, p. 608-615, 1995.

QUEIROZ, G. T. et al. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats, **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 816-822, 2012.

RABANAL R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SÁNCHEZ-MATEO, C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands, **J Ethnopharmacol**, p. 287-292, 2002.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M. et al. (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new products rich in phytochemicals, **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1039–1046, 2015a.

SÁNCHEZ-SALCEDO, E. M. et al. Phytochemical evaluation of White (*Morus alba* L.) and black (*Morus nigra* L.) mulberry fruits, a starting point for the assessment of their beneficial properties, **Journal of Functional Foods**, v. 12, p. 399–408, 2015b.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.50, n.8, p.2432-2438, 2002.

SILVA, A. A. **Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da planta *Cenchrus echinatus* L. (POACEAE).** 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Pós-graduação em Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2008.

SILVA, R. A. H. **Estudo da ação do extrato bruto de *Morus nigra* L. (Moreaceae) e frações fenólicas sobre a atividade antimicrobiana e geração de espécies**

reativas do oxigênio e nitrogênio: in vitro com ensaios “químicos”, enzimáticos e celular. 2012. 205 F. Tese (Doutor em Biociências e Biotecnologia aplicado à Farmácia) – Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia aplicado à Farmácia, Universidade Estadual Paulista, Araguara. 2012.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos.** Tradução ALENCASTRO R. B. 7ªed. Rio do Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 1. ed. Porto Alegre - RS: Editora UFRGS; Florianópolis –SC: Editora da UFSC, 1999.

SONG, W.; WANG, H. J.; BUCHELI, P. et al. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 57, n. 19, p. 9133-40, 2009.

THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 2029-2035, 2008.

TUTIN, G. T. et al. In: Flora of Europa. **Psilotaceae to Platanaceae**, v. 1. Australia: Cambridge University Press, 1996.

UENOJO, M.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Química Nova**. v. 30. p. 616-622, 2007.

VALERO, M. A.; VIDAL, A.; BURGOS, R. et al. Meta-análisis del papel del licopeno en la diabetes mellitus tipo 2, **Nutr. Hosp.**, v. 26, n. 6, p. 1236-1241, 2011.

VIEGAS, J. C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n.2, p. 326-337, 2006.

VOLPATO, G. T. et al. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal – fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats, **J. Ethnopharmacol**, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.

WANG, L.; GONG, T.; CHEN, R. Y. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L., **Chin. Chem. Lett.**, v. 20, n. 12, p. 1469-1471, 2009.

WU, V. C.; QIU, W. Q.; BUSHWAY, A.; HARPER, L. Antibacterial effects of American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) concentrate on foodborne pathogens. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 1834-1841, 2008.

XIE, L. et al. Prediction of titratable acidity, malic acid, and citric acid in bayberry fruit by near-infrared spectroscopy. **Food Research International**, v. 44, p. 2198-2204, 2011.

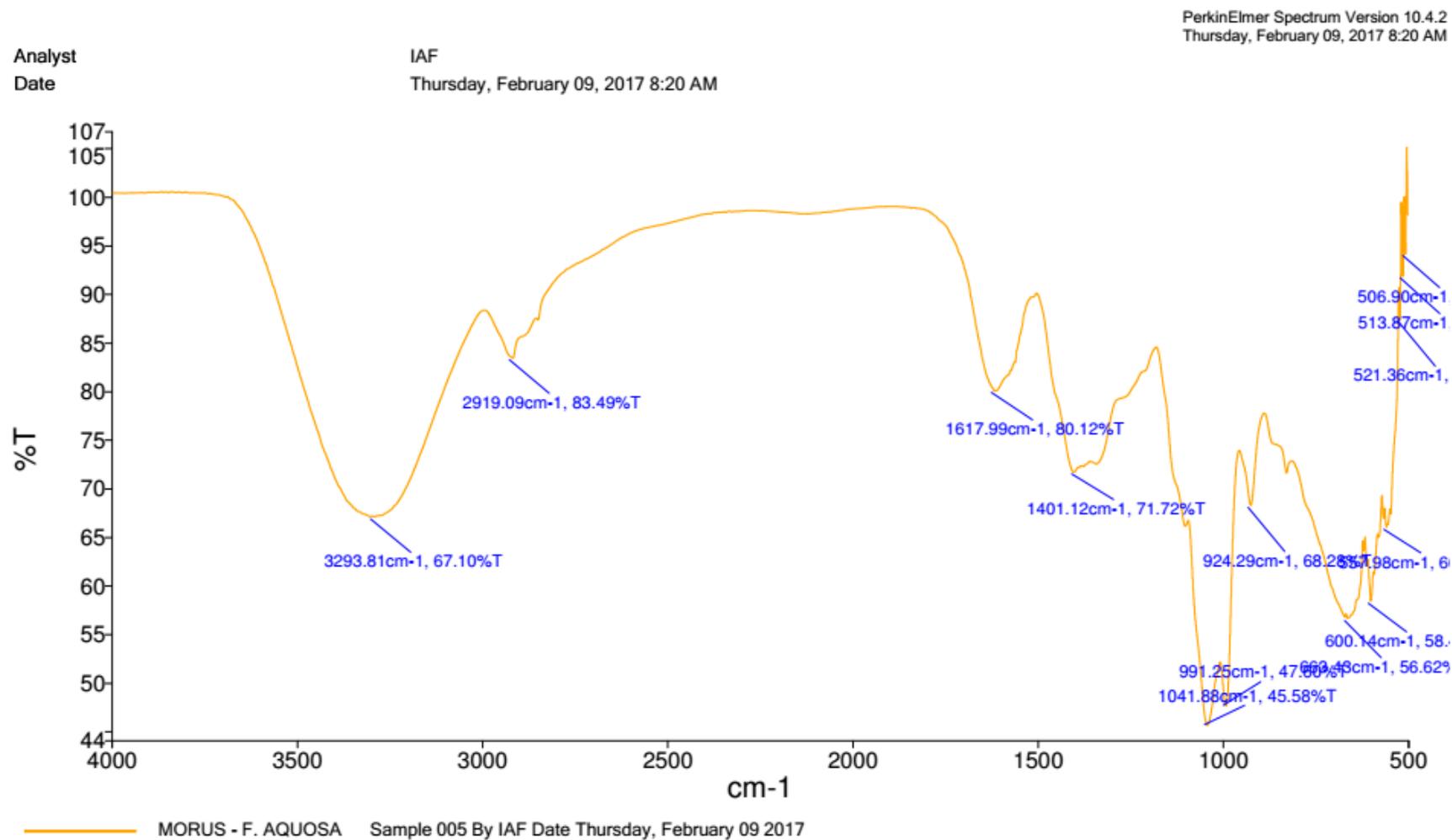
ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.53, p. 2118-2124, 2005.

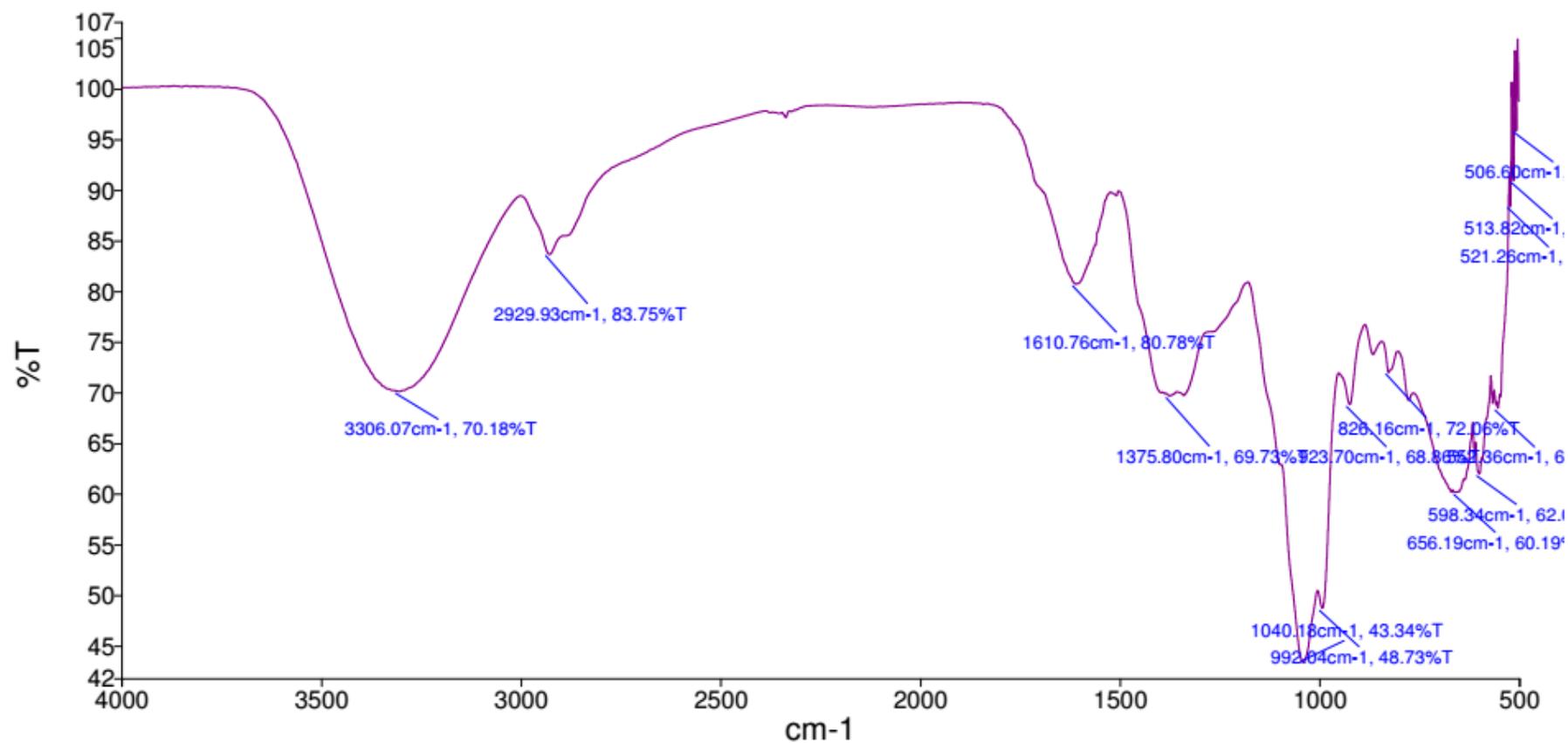
ZHEKUN, Z.; GILBERT, M. G. Moraceae, **Flora of China**, v. 5, p. 21-73, 2003.

ZHENG, Z. P. et al. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study, **J. Agric. Food Chem.**, v. 58, n. 9, p. 5368-5373, 2010.

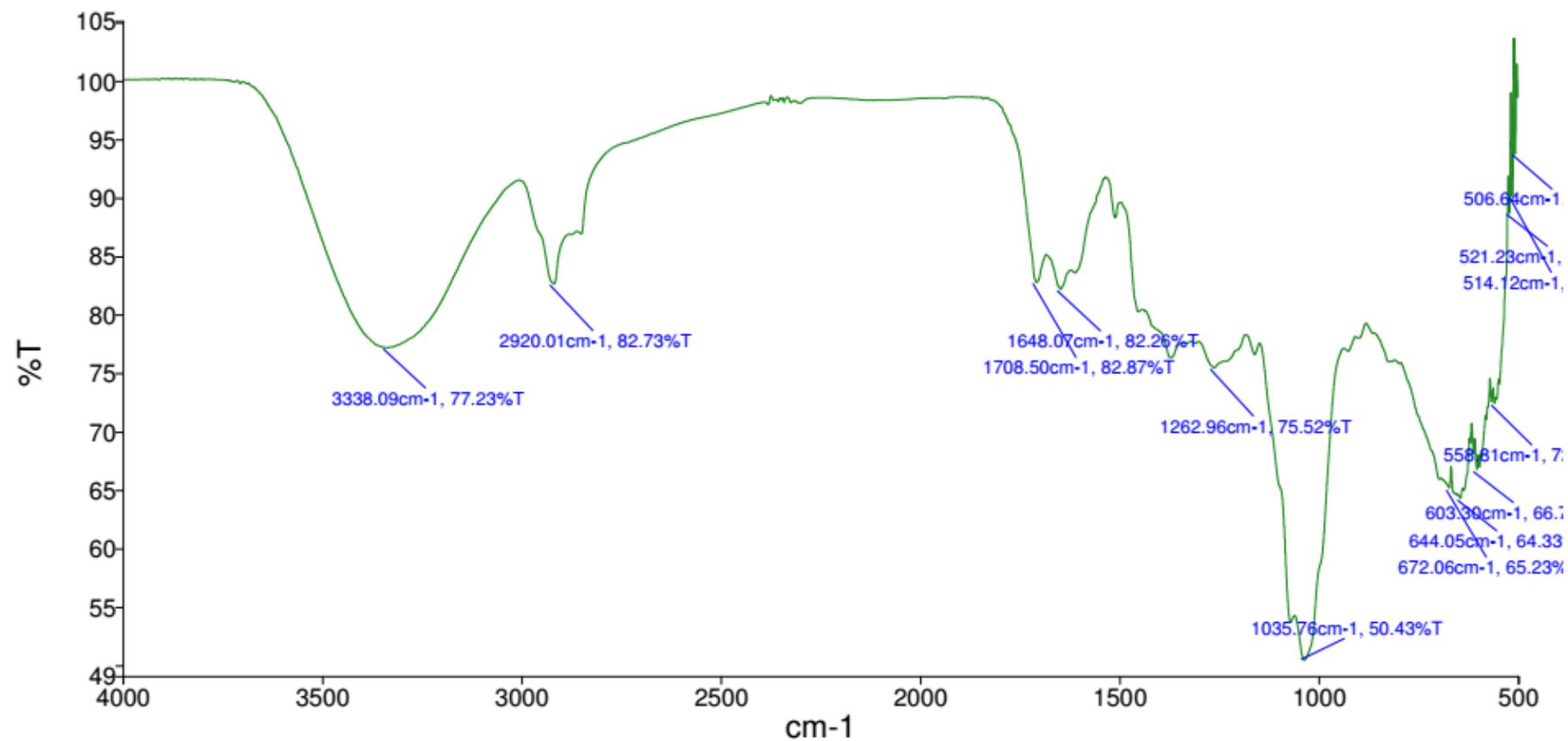
APÊNDICES

APÊNDICE A
ESPECTROS DE INFRAVERMELHO DAS FRAÇÕES DAS FOLHAS DA AMORA
PRETA

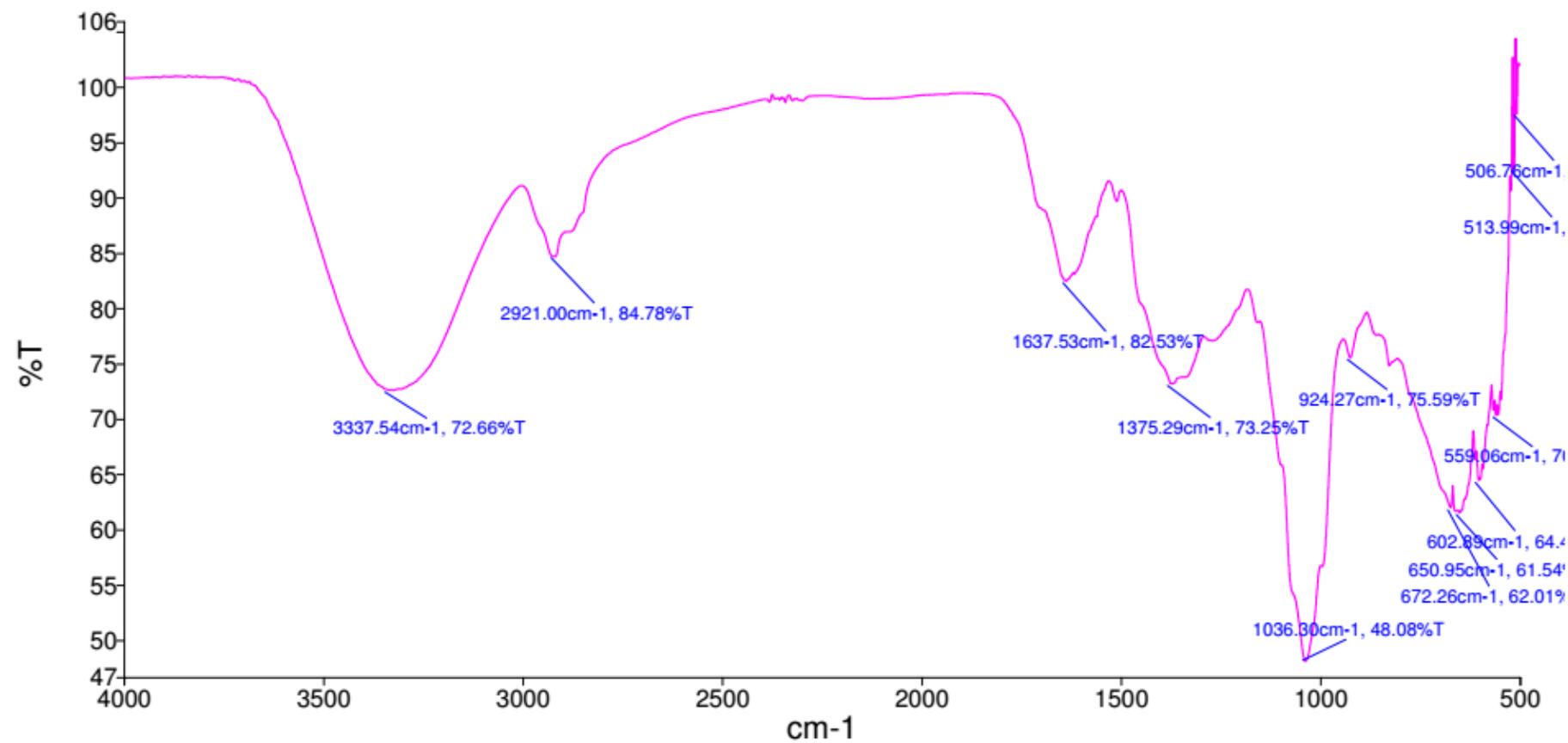


PerkinElmer Spectrum Version 10.4.2
Thursday, February 09, 2017 8:21 AMAnalyst
DateIAF
Thursday, February 09, 2017 8:21 AM

MORUS - F. DICHLOROMETANO Sample 004 By IAF Date Thursday, February 09 2017

PerkinElmer Spectrum Version 10.4.2
Thursday, February 09, 2017 8:20 AMAnalyst
DateIAF
Thursday, February 09, 2017 8:20 AM

MORUS - F. A. ETILA Sample 006 By IAF Date Thursday, February 09 2017

PerkinElmer Spectrum Version 10.4.2
Thursday, February 09, 2017 8:19 AMAnalyst
DateIAF
Thursday, February 09, 2017 8:19 AM

MORUS - F. N-BUTANOL Sample 008 By IAF Date Thursday, February 09 2017

