

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

PAULA PIEKARSKI

ANÁLISE NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.



**CURITIBA
2013**

PAULA PIEKARSKI

ANÁLISE NUTRICIONAL E FITOQUÍMICA DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Segurança Alimentar e Nutricional, do Curso de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Co-Orientadora: Profa. Dra. Regina Maria Vilela

**CURITIBA
2013**

Piekarski, Paula
Análise nutricional e fitoquímica de frutos da *Morus nigra L* / Paula Piekarski – Curitiba, 2013.
139 f. : il.(algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel
Coorientadora: Professora Dra. Regina Maria Vilela
Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em
Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Morus nigra L*. 2. Compostos fenólicos. 3. Antioxidante.
I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Vilela, Regina Maria. III. Universidade
Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 612.3

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional

EXAME DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Paula Piekarski

Título: *"Análise nutricional e fitoquímica de frutos da Morus nigra L."*

PARECER

A Banca de Defesa, reunida nesta data nas dependências do Setor de Ciências da Saúde, Campus Botânico, da Universidade Federal do Paraná, composta pelos seguintes membros: Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel – Orientador, Prof^a. Dra Claudia Carneiro Hecke Krüger- DNUT-UFPR, Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias – DFAR/UFPR, após análise da dissertação e arguição com a mestranda, a banca aprovou a referida dissertação como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre em Segurança Alimentar e Nutricional, no Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional


Prof Dr. Obdulio Gomes Miguel


Profa. Dra Claudia Carneiro Hecke Krüger


Profa. Dra. Josiane de Fátima Gaspari Dias

Curitiba, 09 de julho de 2013.

Dedico este trabalho aos meus pais, Jorge e Marcia, pela vida, pelo amor incondicional e pelo apoio e incentivo a qualquer momento.
As minhas avós, Anastácia e Brasilina, pela paciência, amor sem limites e ensinamentos fundamentais.
A minha irmã, Bruna, pelo carinho e apoio.
Ao meu namorado, Guilherme, pelo amor e incentivo.
A Deus, pela vida, saúde, força e oportunidades.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional pela oportunidade e apoio.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao Dr. Obdúlio Gomes Miguel, pela orientação, apoio, incentivo e paciência sem limites.

À Dra. Regina Maria Vilela, pela orientação, incentivo e dedicação.

Às demais professoras do Programa de Pós-Graduação em Segurança Alimentar e Nutricional pela ajuda na concretização de mais uma etapa.

Ao Curador do Herbário do Museu Botânico Municipal, Osmar dos Santos Ribas, pela identificação da espécie vegetal.

Ao Dr. Marcelo Ribani e ao TECPAR, pelo auxílio nas análises via CLAE.

Ao MSc. Vinícius Bednarczuk de Oliveira, pela ajuda na metodologia e identificação de substâncias via RMN.

Ao MSc. Cleverson Martins pelo auxílio com a Espectrometria de Massas.

Ao técnico Jair José de Lima, pelo auxílio ao longo de todo o trabalho e pela prontidão em ajudar.

A técnica Lindamir Tomczak Tullio pelo auxílio nas análises físico químicas.

As nutricionistas e amigas de curso Thaís Regina Mezzomo e Juliana Nadal, pelo apoio diário e incentivo.

A nutricionista e amiga de curso Renata Costa de Miranda pelo auxílio na colheita de amoras.

Aos demais amigos de curso, Flávia Monteiro, Daniele do Rocio Ribeiro, Paulo Victor Modanesi, Talita Cestonaro e Márcia Lobo pelo apoio e pelas contribuições a este trabalho.

À todos os professores e técnicos do Departamento de Nutrição e do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Nem tudo que se enfrenta pode ser modificado, mas nada pode ser modificado até que seja enfrentado.

Albert Einstein

RESUMO

A amora (*Morus nigra L.*), planta facilmente cultivada em jardins, é rica em compostos fenólicos, entre eles flavonoides e antocianinas, os quais apresentam atividades biológicas e podem provocar alterações químicas ou enzimáticas, impactando na saúde humana. Buscou-se neste trabalho verificar a composição nutricional e o perfil fitoquímico do fruto, determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides em quatro extratos brutos e frações, assim como verificar atividades biológicas e avaliar indicativo de toxicidade *in vitro* destes extratos e frações. Buscou-se ainda elaborar um subproduto a partir do fruto. A fim de determinar a composição nutricional, empregaram-se as análises de umidade, cinzas, pH, acidez titulável, lipídeos, proteínas e fibras em frutos maduros *in natura*. O teor de carboidratos e o valor energético foram obtidos por meio de cálculos matemáticos. Para verificar o perfil fitoquímico, realizou-se ensaio sistemático, seguido do isolamento e identificação de substâncias via cromatografia líquida de alta eficiência ou via ressonância magnética nuclear. Para quantificação de compostos fenólicos e flavonoides foi empregado o método de Folin-Ciocalteu e o método de Cloreto de Alumínio, respectivamente. Quanto às atividades biológicas, três métodos para avaliação da atividade antioxidante foram utilizados, sendo eles, formação do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH e formação espécies reativas do ácido tiobarbitúrico. Adotou-se o método de impregnação em placas sangue de carneiro para avaliar a atividade hemolítica e a determinação da concentração inibitória mínima para atividade antimicrobiana. Para avaliar a toxicidade, empregou-se o teste *in vitro* frente à *Artemia Salina*. Para elaboração de subproduto, foi proposta uma formulação de pastilha com extrato incorporado. Observou-se que o fruto apresenta adequada qualidade nutricional devido à baixa densidade energética, elevado teor de fibras e compostos fenólicos. A análise dos extratos permitiu o isolamento e/ou identificação das seguintes substâncias: o álcool graxo 2,6 octacosano-2,6-dien-1-ol e os compostos fenólicos ácido clorogênico, rutina, quercetina e kaempferol. Quanto às atividades biológicas, os extratos e as frações apresentaram atividade antioxidante pelos três métodos empregados. Nenhum extrato apresentou atividade antimicrobiana e apenas a fração acetato de etila apresentou atividade hemolítica. A fração acetato de etila também foi a única a apresentar indicativo de toxicidade *in vitro*. A partir dos resultados, pode-se concluir que as amoras são alimentos nutricionalmente ricos com potencial para uso na promoção da saúde da população.

Palavras-chave: *Morus nigra L.* Amora. Compostos fenólicos. Antioxidante.

ABSTRACT

The mulberry (*Morus nigra L.*), a plant easily grown in gardens, has been studied as a source of phenolic compounds, including flavonoids and anthocyanins, which have biological activities and could improve the human health. The purpose of this work was to verify the nutritional and phytochemical composition of this fruit, to evaluate the content of phenolic compounds and flavonoids in four extracts and fractions, as well as biological activities and evaluate the indicative of toxicity *in vitro* of these extracts and fractions. It was also an objective of this study to elaborate a processed product from this fruit. The nutritional composition of the fresh fruit was analyzed to determine moisture, ash, pH, titratable acidity, lipid, protein, fiber, carbohydrate and energy value. The phytochemical profile, was verified by systematic assay, in addition to the isolation and identification of substances by high performance liquid chromatography, by nuclear magnetic resonance or by mass spectrometry. Phenolic compounds and flavonoids were analyzed through Folin-Ciocalteu and Aluminum Chloride methods, respectively. The determination of antioxidant activity was performed by DPPH radical scavenging activity, formation of phosphomolybdenum complex and thiobarbituric acid reactive substances. Haemolysis assay was conducted by using sheep blood agar plates and antimicrobial activity was verified by the determination of minimum inhibitory concentration. The toxicity was evaluated by the brine shrimp lethality test. To elaborate a candy bar, sugar and honey was added to the ethanolic extract with its marc. According to these analysis, the fruit presented an adequate nutritional quality due to low energy density and adequate amounts of fiber, in addition the presence of secondary metabolites such as phenolic compounds and flavonoids. It was possible to isolate and/or identify the following substances: octacosyl alcohol, a fatty alcohol and chlorogenic acid, rutin, quercetin and kaempferol, belonging to the class of phenolic compounds. Regarding the biological activities, all extracts and fractions showed antioxidant activity. Extracts did not showed antimicrobial activity and only the ethyl acetate fraction showed haemolytic activity. The ethyl acetate fraction was also the only one to present indicative of toxicity *in vitro*. From these results, it can be postulated that this mulberries have high nutritional value and that their potential on health promotion could be explored.

Key-words: *Morus nigra L.* Mulberry. Phenolic Compounds. Antioxidant.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.....	21
FIGURA 2 – FRUTOS DA <i>Morus nigra</i> L.	25
FIGURA 3 – SUBCLASSES DE COMPOSTOS FENÓLICOS	29
FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES.....	30
FIGURA 5 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE PROTEÍNAS	47
FIGURA 6 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE FIBRA ALIMENTAR TOTAL	48
FIGURA 7 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE CARBOIDRATOS	49
FIGURA 8 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO TOTAL	49
FIGURA 9 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE TEOR DE SÓLIDOS (%)	68
FIGURA 10 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES OBTIDOS A 370nm	76
FIGURA 11 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS OBTIDOS A 370nm.....	77
FIGURA 12 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS OBTIDOS A 370nm.....	78
FIGURA 13 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES HEXANO E CLOROFÓRMIO OBTIDOS A 370nm.....	79
FIGURA 14 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE OBTIDOS A 370nm	80
FIGURA 15 – SUBFRAÇÕES (A) E ISOLADOS DA FRAÇÃO HEXANO (b).....	85
FIGURA 16 – CCD PREPARATIVA (A) E ISOLADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO REMANESCENTE (b).....	86
FIGURA 17 – ESPECTRO RMN ¹³ C DE IHEX1	87
FIGURA 18 – ESPECTRO RMN ¹ H DE IHEX1	87
FIGURA 19 – ESPECTRO DE MASSAS DE IHEX1	89
FIGURA 20 – ESPECTRO DE MASSAS DE IHEX1	90
FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA IHEX1	90
FIGURA 22 – FÓRMULA PARA ATIVIDADE HEMOLÍTICA RELATIVA.....	105
FIGURA 23 – MATERIAIS EMPREGADOS NA ELABORAÇÃO DE PASTILHA	108
FIGURA 24 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	119
FIGURA 25 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA	125
FIGURA 26 – FORMAÇÃO DE ESPUMA NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.....	125
FIGURA 27 – RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DE SOXHLET ANTES (a) E APÓS (b) INCORPORAÇÃO DE EXTRATO.....	129
FIGURA 28 - PASTILHAS ELABORADAS A PARTIR DE EXTRATO DE AMORA	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>Morus nigra</i> L.	25
QUADRO 2 – PROGRAMAÇÃO DO GRADIENTE DA FASE MÓVEL	69
QUADRO 3 – FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA.....	103
QUADRO 4 – CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS E CONTROLES DE ACORDO COM O NÚMERO DA COLUNA DA MICROPLACA.....	106

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – CURVA PADRÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	109
GRAFICO 2 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	110
GRÁFICO 3 – CURVA PADRÃO PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	112
GRÁFICO 4 – TEOR DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	113
GRÁFICO 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA À RUTINA.....	116
GRÁFICO 6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA AO ÁCIDO ASCÓRBICO	117
GRÁFICO 7 – ÍNDICE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES.....	123

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – UMIDADE, CINZAS, PH E ACIDEZ TITULÁVEL DE FRUTOS DA <i>Morus nigra</i> L.	50
TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FRUTOS DA <i>Morus nigra</i> L.....	51
TABELA 3 – PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO ALCOÓLICO DA <i>Morus nigra</i> L.....	73
TABELA 4 – PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DA <i>Morus nigra</i> L.....	74
TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS	75
TABELA 6 – TEOR DOS COMPOSTOS PADRÕES ANALISADOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	81
TABELA 7 - TEOR DOS COMPOSTOS PADRÕES ANALISADOS NOS EXTRATOS BRUTOS	84
TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ¹³ C E ¹ H DA SUBSTANCIA IHEX1 COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA n-OCTACOSANOL.....	88
TABELA 9 – FORMULAÇÃO FINAL DA PASTILHA	108
TABELA 10 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS	111
TABELA 11 - TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS NOS EXTRATOS BRUTOS	114
TABELA 12 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES (EC ₅₀).....	120
TABELA 13– POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS (EC ₅₀).....	122
TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS BRUTOS	126
TABELA 15 – TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA APRESENTADA PELOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES	128

LISTA DE SIGLAS

AAR	-	Atividade Antioxidante Relativa
ABAP	-	Cloreto de 2,2'-azo-bis (2-amidinopropano)
Act	-	Fração Acetato de Etila
AHR	-	Atividade Hemolítica Relativa
ANOVA	-	Análise de Variância
ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	-	<i>Association of Official Agricultural Chemists</i>
BHT	-	Butil-hidroxitolueno
CCD	-	Cromatografia de Camada Delgada
CIM	-	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Clo	-	Fração Clorofórmio
DCNT	-	Doenças Crônicas não-Transmissíveis
DL ₅₀	-	Dose Letal (50%)
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
DNA	-	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	-	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EAG	-	Equivalentes de Ácido Gálico
EC ₅₀	-	Concentração Efetiva (50%)
EM	-	Espectrometria de Massas
EQE	-	Equivalentes de Quercetina
EROs	-	Espécies Reativas de Oxigênio
ES	-	Extrato Seco
FAT	-	Fibra Alimentar Total
FF	-	Fruto Fresco
Hex	-	Fração Hexano
IHex1	-	Isolado 1 da fração Hexano
LDL	-	<i>Low Density Lipoproteins</i>
MDA	-	Malonaldeído
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
RDC	-	Resolução de Diretoria Colegiada
Rem	-	Fração Remanescente
RMN	-	Ressonância Magnética Nuclear
RP	-	Fase Reversa
SOD	-	Superóxido Dismutase
SOX	-	Extrato Bruto Soxhlet
TA	-	Extrato Bruto Turbólise Aquoso
TBA	-	Ácido Tiobarbotúrico
TCC	-	Cloreto de Trifenil Tetrazolium
TE	-	Extrato Bruto Turbólise Etanólico
TMS	-	Tetrametilsilano
TSA	-	Triptona de Soja
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia
USDA	-	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	-	Ultravioleta
VA	-	Extrato Bruto a Vapor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 HIPÓTESE	19
1.2 OBJETIVOS	19
1.2.1 Objetivo Geral	19
1.2.2 Objetivos Específicos	19
1.3 JUSTIFICATIVA	20
1.4 FLUXOGRAMA DE TRABALHO	20
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E QUÍMICOS	22
1.1.1 Família Moraceae.....	22
1.1.2 Gênero <i>Morus</i>	22
1.1.3 Espécie <i>Morus nigra L.</i>	24
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	28
1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A RELAÇÃO COM A SAÚDE HUMANA.....	32
REFERÊNCIAS	35
CAPÍTULO II - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE FRUTOS DA <i>Morus nigra L.</i> ...	43
1 INTRODUÇÃO	43
2 MATERIAL E MÉTODOS	45
2.1 AMOSTRA.....	45
2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	45
2.2.1 Umidade	45
2.2.2 Cinzas	46
2.2.3 pH.....	46
2.2.4 Acidez Titulável	46
2.2.5 Lipídeos.....	47
2.2.6 Proteínas	47
2.2.7 Fibra Alimentar Total	48
2.2.8 Carboidratos.....	48
2.2.9 Valor Energético.....	49

3 RESULTADOS	50
4 CONCLUSÃO	53
REFERENCIAS	54
CAPÍTULO III – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTOS DA <i>Morus nigra L.</i>	56
1 INTRODUÇÃO	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	58
2.1 AMOSTRA.....	58
2.2 ENSAIO SISTEMÁTICO.....	58
2.2.1.1 Pesquisa de Alcaloides	59
2.2.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas	59
2.2.1.3 Pesquisa de Flavonoides	60
2.2.1.3.1 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos	60
2.2.1.3.2 Teste Oxálico Bórico (Flavonóis).....	60
2.2.1.3.3 Ensaio de Pacheco (Dihidroflavonóis).....	60
2.2.1.3.4 Ensaio com Zinco em Ácido Clorídrico (Dihidroflavonóis)	61
2.2.1.4 Pesquisa de Cumarinas	61
2.2.1.5 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos.....	61
2.2.1.6 Pesquisa de Esteroides e/ou Triterpenos.....	62
2.2.2 Extrato Aquoso.....	62
2.2.2.1 Pesquisa de Heterosídeo Antociânico.....	62
2.2.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponinicos	63
2.2.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos.....	63
2.2.2.4 Pesquisa de Taninos.....	64
2.2.2.4.1 Ensaio de Cloreto Férrico.....	64
2.2.2.4.2 Ensaio de Solução de Gelatina	64
2.2.2.5 Pesquisa de Amino Grupo.....	64
2.2.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos	65
2.2.2.7 Pesquisa de Ácidos Voláteis	65
2.3 ELABORAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	65
2.3.1 Elaboração de Extratos Brutos.....	65
2.3.1.1 Extrato aquoso sem emprego de temperatura – Turbólise Aquoso	66
2.3.1.2 Extrato etanólico sem emprego de temperatura – Turbólise Etanólico	66
2.3.1.3 Extrato aquoso com emprego de temperatura – Vapor.....	66

2.3.1.4 Extrato etanólico com emprego de temperatura – Soxhlet.....	67
2.3.2 Elaboração das Frações.....	67
2.3.3 Determinação do Teor de Sólidos e pH.....	68
2.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	68
2.5.1 Cromatografia Líquida em Coluna.....	70
2.5.2 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa.....	71
2.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	71
2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear.....	71
2.6.1 Espectrometria de Massas.....	72
3 RESULTADOS.....	73
3.1 ENSAIO SISTEMÁTICO.....	73
3.2 CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS.....	75
3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VIA CLAE.....	76
3.4 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS.....	85
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE IHEX1.....	86
4 CONCLUSÃO.....	92
REFERENCIAS.....	93
CAPÍTULO IV – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FRUTOS DA <i>Morus nigra</i> L.....	98
1 INTRODUÇÃO.....	98
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	100
2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	100
2.2 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES.....	100
2.3 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	100
2.4 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES.....	101
2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	102
2.5.1 Atividade Antioxidante.....	102
2.5.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio.....	102
2.5.1.2 Redução do Radical DPPH.....	103
2.5.1.3 Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico.....	104
2.5.2 Atividade Hemolítica.....	104
2.5.3 Atividade Antimicrobiana.....	105
2.6 TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	107

2.7 DESENVOLVIMENTO DE SUBPRODUTO A PARTIR DE FRUTOS DA <i>Morus nigra</i> L.	107
3 RESULTADOS	109
3.1 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	109
3.2 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES	112
3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	116
3.3.1 Atividade Antioxidante	116
3.3.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio	116
3.3.1.2 Redução do Radical DPPH	118
3.3.1.3 Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico	122
3.3.2 Atividade Hemolítica.....	124
3.3.3 Atividade Antimicrobiana	126
3.4 TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i>	127
3.5 ELABORAÇÃO DE SUBPRODUTO	129
4 CONCLUSÃO	131
CONCLUSÃO FINAL	132
REFERENCIAS	133

1 INTRODUÇÃO

Uma dieta rica em frutas e hortaliças apresenta impacto direto sobre a saúde humana atuando principalmente nas doenças crônicas não transmissíveis (DNCT), como doenças cardiovasculares, diabetes tipo II, doenças neurodegenerativas e alguns tipos de câncer (BERNAL *et al.*, 2011). Sabe-se que o consumo de frutas e hortaliças tem relação inversamente proporcional com a mortalidade por estas doenças, apesar do mecanismo de ação ainda não estar bem definido (LOCK *et al.*, 2005; JAIME *et al.*, 2007; FU *et al.*, 2011). Esses benefícios à saúde vêm sendo atribuídos à presença de metabólitos secundários denominados compostos fitoquímicos, os quais apresentam atividades biológicas e podem provocar alterações orgânicas, químicas ou enzimáticas, impactando na saúde humana (BEECHER, 2003). O interesse por metabólitos secundários fez crescer o número de pesquisas com produtos naturais a fim de isolar e identificar estes compostos, e, conseqüentemente, aumentar sua procura na forma de produtos farmacêuticos e/ou suplementos. Este fato fez surgir o termo nutracêuticos, ou seja, metabólitos secundários isolados de extratos de alimentos com efeitos sobre a saúde (ESPÍN *et al.*, 2007; JONES; KINGHORN, 2012).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não reconhece o termo nutracêuticos. Os compostos isolados de alimentos e comercializados na forma de produtos farmacêuticos (tabletes, comprimidos, drágeas, pós, cápsulas, granulados, pastilhas, soluções e suspensões) são denominados Substâncias Bioativas, segundo a RDC nº 02 de 2002, a qual regulamenta a comercialização de carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolipídios, organosulfurados, polifenóis e probióticos (BRASIL, 2002).

Apesar dos compostos bioativos não serem considerados nutrientes, apresentam importância fundamental na manutenção da saúde. Estes compostos estão presentes em produtos naturais e, devido às atividades biológicas que apresentam, vem sendo cada vez mais estudados (COSTA *et al.*, 2013)

Tanto as amoras, quanto os demais frutos do tipo *berry*, como cereja, framboesa e mirtilo apresentam compostos bioativos, entre eles antocianinas, as quais conferem coloração ao fruto. Frutos fortemente coloridos, são relacionados

como mais saudáveis em comparação a outros alimentos, principalmente em países orientais (LIN; TANG, 2007).

1.1 HIPÓTESE

A *Morus nigra L.* apresenta elevado teor de compostos fenólicos e a presença destes compostos pode ser responsável por diversas atividades biológicas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Verificar a composição nutricional, o perfil fitoquímico e as atividades biológicas dos frutos da *Morus nigra L.*

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar os frutos da *Morus nigra L.* do ponto de vista físico-químico.
- Verificar os principais grupamentos químicos presentes.
- Isolar, identificar e quantificar metabólitos secundários;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides totais e verificar a melhor forma de extração destes compostos;
- Avaliar atividades biológicas (atividade antioxidante, hemolítica e antimicrobiana);
- Verificar indicativo de toxicidade *in vitro*.
- Elaborar subproduto a partir dos frutos de *Morus nigra L.*

1.3 JUSTIFICATIVA

Os frutos do tipo *berry* são uma das fontes mais importantes de metabólitos secundários com potencial de promotores da saúde (ZADERNOWSKI *et al.*, 2005). A literatura demonstra que estes frutos possuem elevados níveis de compostos fenólicos, os quais apresentam atividades biológicas podendo proporcionar benefícios à saúde humana. Devido ao seu poder antioxidante, frutos do tipo *berry* são relacionados à redução de risco de doenças cardiovasculares e a outros eventos relacionados ao estresse oxidativo (KOCA; KARADENIZ, 2009). Frutos como a amora preta (*blackberry*), o mirtilo (*blueberry*) e a framboesa (*raspberry*) são amplamente disponíveis na América do Norte e na Europa (SEERAM, 2008). No Brasil, devido a condições de cultivo, estes frutos apresentam alto custo e são pouco disponíveis para o consumo da população. Uma boa opção de substituição seria o uso das amoras silvestres (*mulberry*), visto que são facilmente cultivadas em quintais e jardins, não necessitando de produtos químicos como pesticidas e herbicidas, e apresentam elevado teor de compostos fenólicos, podendo ser este, superior a outras espécies similares (ZADERNOWSKI *et al.*, 2005).

1.4 FLUXOGRAMA DE TRABALHO

A presente dissertação é composta de quatro capítulos, sendo o primeiro destinado à revisão de literatura e os demais destinados aos métodos aplicados e resultados obtidos. A FIGURA 1 demonstra o desenho experimental dos métodos empregados neste trabalho. Cada método será detalhado nos respectivos capítulos.

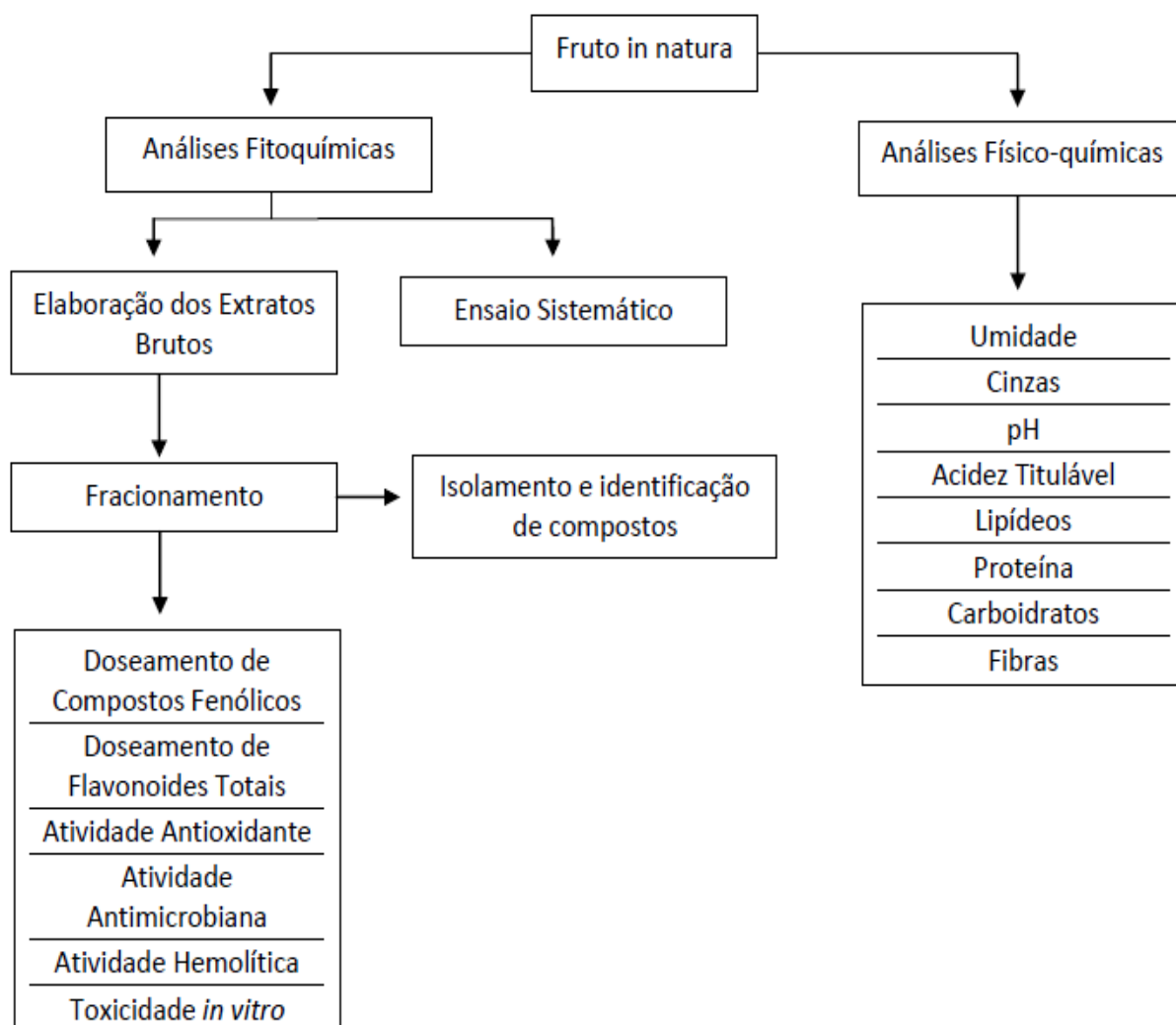


FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO.

FONTE: A autora (2013)

CAPÍTULO I - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 ASPECTOS BOTÂNICOS E QUÍMICOS

1.1.1 Família Moraceae

A família Moraceae apresenta cerca de 40 gêneros e 1400 espécies, sendo os principais gêneros: *Morus*, *Maclura*, *Artocarpus*, *Ficus* e *Broussonetia*. As espécies da família Moraceae estão distribuídas por todo o mundo, principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Apresentam importância econômica devido à produção frutífera (*Ficus*, *Morus* e *Artocarpus*), ao uso na alimentação do bicho da seda (*Morus* e *Maclura*), à produção de papel (*Morus*, *Maclura* e *Broussonetia*) e móveis (*Broussonetia* e *Artocarpus*) (ZHEKUN; GILBERT, 2003). São fontes de metabólitos secundários como xantonas, triterpenos e flavonoides (ROYER *et al.*, 2010; ZEREGA *et al.*, 2005).

1.1.2 Gênero *Morus*

As amoreiras pertencem à ordem Urticales, família Moraceae, gênero *Morus*, sendo as espécies mais comuns a *Morus alba*, *Morus nigra* e *Morus rubra* (BHATTACHARYA; RANADE, 2001; IMRAN *et al.*, 2010; ERCISLI; ORHAN, 2008). Entre o gênero *Morus*, as amoreiras são as espécies que apresentam maior importância medicinal (KUMAR; CHAUHAN, 2008).

Do ponto de vista botânico, as amoreiras podem ser tanto monoicas quanto dioicas (KUMAR; CHAUHAN, 2008). O fato de serem dioicas faz com que haja maior variabilidade genética entre as espécies de amora (AWASTHI *et al.*, 2004). Diversos

estudos apontam alta variabilidade genética entre amoreiras, mesmo entre as cultivadas em uma mesma região (OZRENK *et al.*, 2010). Quanto às diferenças moleculares entre as três principais espécies, a *Morus nigra* e *Morus rubra* parecem ser diferentes da *Morus alba*, sendo a *Morus nigra* a que apresenta menor variação morfológica, mesmo em árvores cultivadas em condições ecológicas diferentes (KAFKAS *et al.*, 2008).

As flores são verdes e a floração ocorre no Brasil entre agosto e setembro. Os frutos apresentam forma cilíndrica, medem aproximadamente 2cm de comprimento e são considerados frutos agregados, ou seja, se originam de flores que apresentam vários carpelos, nas quais as partes individuais são chamadas de frutículos. Para a formação dos frutículos, as corolas tornam-se espessas por adquirir substâncias de reserva como açúcares e certos ácidos orgânicos. As sementes apresentam coloração variando de amarela a marrom de acordo com a espécie e podem medir até 3mm. O cerne é durável e as folhas são decíduas e isentas de espinhos (KOYUNCU *et al.*, 2004; BARBOUR *et al.*, 2001; RAVEN *et al.*, 2007; FERRI, 1990).

A amoreira (*Morus sp.*) é uma árvore originária da Ásia que apresenta fácil cultivo, sendo encontrada em quase todo o mundo já que pode se adaptar a uma grande variedade de condições de cultivo (ZHAO *et al.*, 2005). No Brasil, parece ter sido introduzida desde o período colonial (ALMEIDA, 2002; KUMAR; CHAUHAN, 2008). Pode crescer em diversos tipos de solo tolerando tanto solos úmidos quanto secos (MOHIUDDIN *et al.*, 2011). A temperatura ideal para crescimento varia entre 24 e 29°C e a umidade entre 65 a 80% (KUMAR; CHAUHAN, 2008), contudo, a planta é capaz de tolerar grande variação climática, já que se desenvolve bem tanto nos hemisférios quanto nos trópicos. Toleram também diferentes altitudes, tendo bom desenvolvimento desde regiões ao nível do mar até altitudes de 4.000 metros. Entretanto, as diferentes condições de desenvolvimento podem influenciar a composição química do fruto (ERCISLI; ORHAN, 2008; IMRAN *et al.*, 2010).

Em alguns países como China e Índia as amoreiras são principalmente cultivadas como folhagens para a criação do bicho-da-seda (*Bombyx mori L.*) já que as folhas da amoreira servem de alimento para este animal (ERCISLI; ORHAN, 2007; IMRAN *et al.*, 2010; HU *et al.*, 2011). Contudo, em outros lugares do mundo, os frutos também são bastante consumidos, seja na forma *in natura* ou processados (ERCISLI;

ORHAN, 2007). As folhas são também utilizadas no preparo de chás e até na alimentação de ruminantes em alguns países (KUMAR; CHAUHAN, 2008).

Segundo a medicina popular, a amoreira apresenta funções medicinais, sendo os frutos podendo ser utilizados como laxativos, vermífugos, expectorantes, eméticos e hipoglicêmicos (ERCISLI; ORHAN, 2007). As raízes e cascas podem ser utilizadas no tratamento de anemia, artrite, reumatismo, hipertensão e diabetes, além de terem ação expectorante e diurética (ÖZGEN *et al.*, 2009; HU *et al.*, 2011; NOMURA, 1999).

Plantas do gênero *Morus* são fontes de isoprenoides que apresentam atividades biológicas e farmacológicas (KUMAR; CHAUHAN, 2008), além de serem ótimas fontes de compostos fenólicos como flavonoides e antocianinas (CHEN *et al.*, 2005). Os compostos fenólicos dos frutos da *Morus sp.* foram associados à atividade imunomoduladora por estímulo à produção de esplenócitos em ratos (LIN; TANG, 2007). Já as antocianinas apresentaram ação anticancer por demonstrar efeito inibitório na invasão de células pulmonares cancerosas A549 (CHEN *et al.*, 2006)

1.1.3 Espécie *Morus nigra* L.

A *Morus nigra* L. é uma árvore nativa do oeste da Ásia, mais especificamente do Irã (ERCISLI; ORHAN, 2008). A árvore pode medir até 9m de altura, apresentando folhas ovaladas, flores monoicas ou dioicas e frutos de coloração roxa a preta no estágio máximo de maturação, medindo até 2,5cm e apresentando sabor levemente ácido (KUMAR; CHAUHAN, 2008; ÖZGEN *et al.*, 2009). É considerada uma planta de jardim, tolerando bem a poluição atmosférica (MOHIUDDIN *et al.*, 2011; HASSIMOTTO *et al.*, 2007).

O QUADRO 1 a seguir traz o enquadramento taxonômico da espécie de acordo com dois referenciais teóricos.

	UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA)	MISSOURI BOTANICAL GARDEN (MOBOT)
Reino	Plantae	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida	Equisetopsida
Subclasse	Hamamelididae	Magnoliidae
Ordem	Urticales	Rosales
Família	Moraceae	Moraceae
Gênero	<i>Morus L.</i>	<i>Morus L.</i>
Espécie	<i>Morus nigra L.</i>	<i>Morus nigra L.</i>

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *Morus nigra L.*

FONTE: USDA - Plants Database (2012); MOBOT - Tropicos (2012)

Os frutos da *Morus nigra L.* não são facilmente encontrados para comercialização *in natura*, sendo normalmente comercializados processados na forma de sucos, geleias, caldas para sorvetes e licores. Dois fatores principais ditam o processamento deste fruto, o primeiro é o curto período de colheita que apresentam, sendo este de aproximadamente dois meses e o segundo é a frágil estrutura que o fruto apresenta o que, conseqüentemente, provoca uma baixa estabilidade de estocagem. Em geral, as amoras podem ser estocadas por no máximo seis meses, sendo o processamento, portanto, a melhor forma de disponibilizar o fruto por maior tempo (HASSIMOTTO *et al.*, 2007; ERCISLI; ORHAN, 2007; FAZAEI *et al.*, 2011). Além disso, outro atrativo para a indústria alimentícia é o sabor mais ácido apresentado pela *Morus nigra* em comparação as outras espécies do gênero *Morus* (KAFKAS *et al.*, 2008).



FIGURA 2 – FRUTOS DA *Morus nigra L.*

FONTE: A autora (2013)

Nota: (a) Frutos em diferentes estádios de maturação. (b) Frutos maduros.

Além do uso dos frutos na alimentação, diversas partes da árvore são utilizadas para fins medicinais pela cultura popular. Às raízes, por exemplo, são atribuídas ação laxativa e vermífuga e são utilizadas no tratamento de hipertensão e dores de dente. As folhas são identificadas como capazes de reduzir os níveis de glicose e colesterol sanguíneos (VOLPATO *et al.*, 2011; HUO, 2002), já os frutos, podem apresentar ação anticancer e ser utilizados no tratamento de lesões bucais, na contenção de sangramento e na inflamação (VOLPATO *et al.*, 2011; ÖZGEN *et al.*, 2009; KUMAR; CHAUHAN, 2008).

A *Morus nigra* L. apresenta elevada quantidade de metabólitos secundários, sendo os principais, pertencentes à classe dos compostos fenólicos, responsáveis pela adstringência e sabor ácido que o fruto apresenta (ÖZGEN *et al.*, 2009). Quando comparada as outras duas principais espécies do gênero *Morus* L., a *Morus nigra* apresenta os maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonoides (ERCISLI; ORHAN, 2007). Quando comparada apenas a *Morus rubra*, apresenta maior quantidade de antocianinas monoméricas, além de maior atividade antioxidante (ÖZGEN *et al.*, 2009). Devido à presença destes metabólitos secundários, as amoras tem sido estudadas para avaliar suas atividades biológicas como antioxidante, antiangiogênica, antibacteriana e antiviral, o que poderia levar à melhora a resposta imune, melhora o perfil lipídico, redução da agregação plaquetária e melhora do metabolismo hormonal (ZAFRA-STONE *et al.*, 2007).

Quanto aos flavonoides presentes nos frutos de *Morus nigra*, três foram identificados via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) por Pawlowska *et al.* (2008), sendo eles, quercetina-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-rutinosídeo e quercetina-3-glicosídeo. Quatro antocianinas também foram identificadas via CLAE, entre elas, cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-O-rutinosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo e pelargonidina-3-O-rutinosídeo (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). A morina, outro flavonoide também isolado da *Morus nigra*, demonstrou em estudo *in vivo* com ratos redução nos níveis teciduais de ciclosporina, um potente agente imunossupressor e redução da produção de óxido nítrico (FANG *et al.*, 2005). Pode-se dizer que os frutos da *Morus nigra* são pobres do ponto de vista qualitativo, visto que um número mais limitado flavonoides é encontrado nos frutos. Contudo, quantitativamente se torna um fruto rico, apresentando as antocianinas como componente predominante (PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011).

Cinco ácidos orgânicos, entre eles, málico, cítrico, tartárico, oxálico, e fumárico foram identificados nos frutos da *Morus nigra*, sendo o ácido málico o predominante, seguido pelo cítrico e tartárico. O teor de ácidos orgânicos é um fator importante nas propriedades organolépticas dos frutos, contudo, este teor pode variar de acordo com as condições geográficas em que a árvore se desenvolve (KOYUNCU, 2004).

As atividades de raízes e principalmente folhas, são mais vastamente estudadas que os frutos. A raiz da *Morus nigra* contém elevada quantidade de monringa G e moringa M, lectinas capazes de se ligar a galactose e manose, respectivamente. Estas proteínas apresentam atividade hemaglutinante (DAMME *et al.*, 2002). A partir das raízes, também foram identificados dois prenilflavonoides isoméricos, mornigrol E mornigrol F (WANG. *et al.*, 2009). Além disso, raízes e galhos da *Morus nigra* apresentam oxiresveratrol, que apresenta efeito inibidor da enzima tirosinase, que está envolvida na formação da melanina (ZHENG *et al.*, 2010).

Quanto às folhas, diversos estudos apontam para o efeito hipoglicêmico por elas apresentado. Em estudo com extrato aquoso de folhas da *Morus nigra*, Volpato *et al.* (2011), verificaram que uma dose de 400mg/kg/dia ofertada a ratas *Wistar* grávidas diabéticas e não diabéticas não apresentou efeitos hipoglicêmicos, contudo houve redução nas taxas de colesterol total, colesterol LDL (*low density lipoproteins*) e triglicerídeos. Foi observado também que a oferta do extrato aquoso elevou os níveis sanguíneos da enzima superóxido dismutase (SOD), demonstrando que o extrato das folhas de *Morus nigra* apresenta ação antioxidante (VOLPATO *et al.*, 2011).

Compostos pertencentes à classe dos triterpenos e esteroides também foram identificados nas folhas de *Morus nigra*, sendo eles germanicol, ácido betulínico e β -sitosterol, os quais apresentaram atividade antiinflamatória em ratos (PADILHA *et al.*, 2010).

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos atuam nos alimentos como pigmentos, precursores de sabor e antioxidantes naturais. Esses compostos tem sido estudados para diversos efeitos na saúde humana como redução da glicemia, redução do peso corpóreo, ação anti-inflamatória, anticarcinogênica, anti-idade e antitrombogênica (BERNAL *et al.*, 2011).

São originados do metabolismo secundário das plantas, sendo sua rota biossintética originada do ácido chiquímico e/ou das rotas dos poliacetatos. São essenciais para o crescimento, reprodução e pigmentação das plantas e tem sua produção intensificada em situações de estresse como radiações ultravioleta (UV), cortes, entre outros (ANGELO; JORGE, 2007; BERNAL *et al.*, 2011).

Quimicamente, apresentam estruturas com pelo menos um anel aromático e um ou mais grupos hidroxila. Os compostos fenólicos podem apresentar moléculas que variam de simples até as com alto grau de polimerização. Nos vegetais, são encontrados na forma livre ou ligados a outras moléculas, principalmente a açúcares, como glicose, ramnose, galactose, xilose e arabinose (BRAVO, 1998). O comportamento físico químico destes compostos é influenciado pelas características estruturais das moléculas (SANTOS-BUELGA *et al.*, 2012).

Podem ser divididos em 19 subclasses, sendo elas apresentadas na FIGURA 3 a seguir.

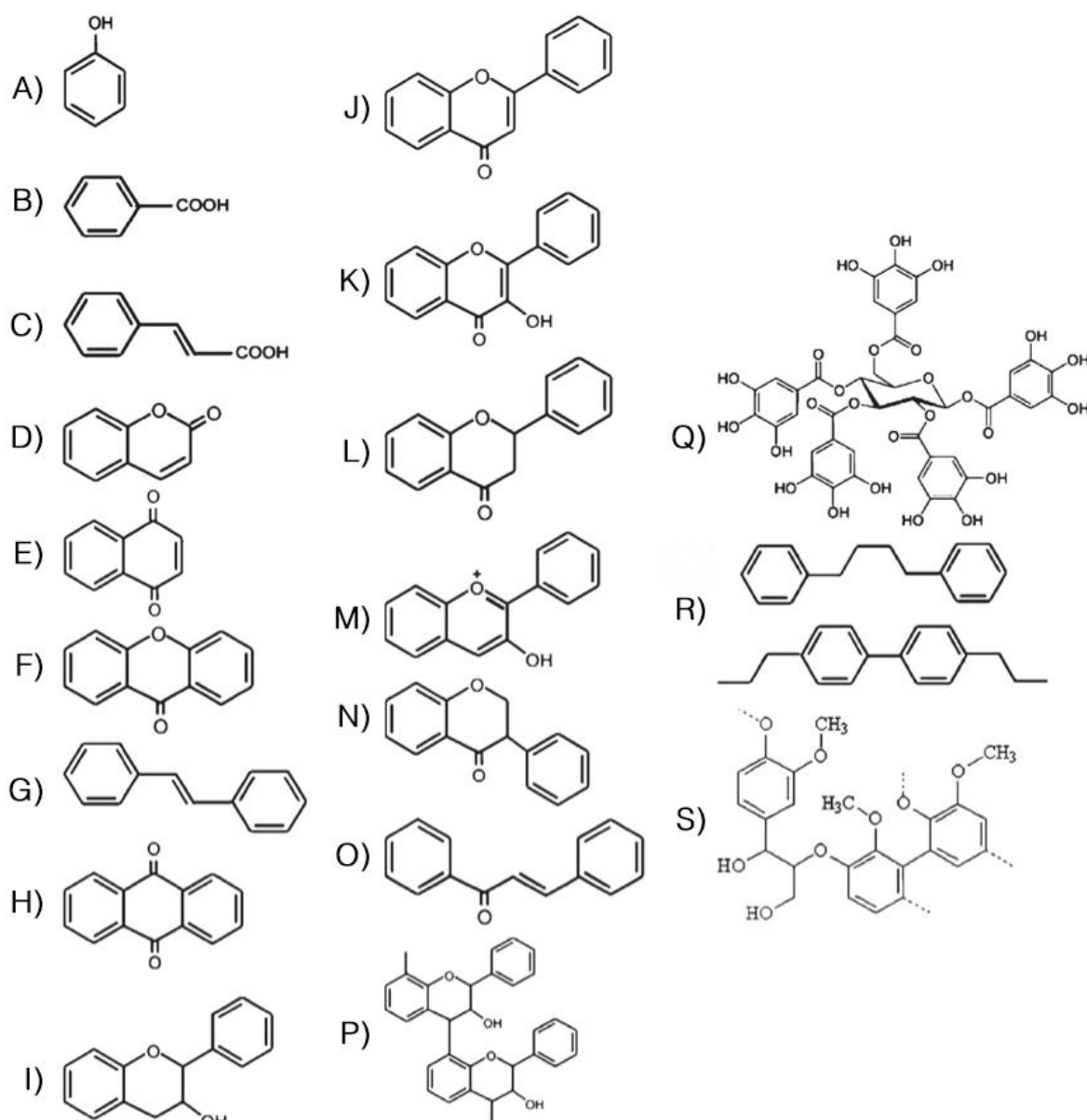


FIGURA 3 - SUBCLASSES DE COMPOSTOS FENÓLICOS

FONTE: SANTOS-BUELGA (2012)

NOTA: a:fenóis simples; b:ácidos fenólicos; c:ácidos hidroxicinâmicos; d:cumarinas; e:nafthoquinonas; f:xantonas; g:estilbenos; h:antraquinonas; i:flavan-3-ols; j:flavonas; k:flavonols; l:flavononas; m:antocianinas; n:isoflavonas; o:chalconas; p:taninos condensados; q:taninos hidrolisáveis; r:lignanas; s:ligninas.

Entre os compostos fenólicos, os flavonoides são os presentes com maior frequência na dieta da população, sendo encontrados principalmente em frutas, vegetais, chás e vinhos (FANG *et al.*, 2005). Estes compostos apresentam uma estrutura comum composta por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que formam um heterociclo oxigenado, conforme pode ser observado da FIGURA 4. Mais de 5.000 flavonoides já foram identificados, sendo as subfamílias dos flavonoides

definidas de acordo com as características químicas do anel pirano, podendo ser classificados em antocianidinas, isoflavonas, flavonas, flavonóis, flavononas, chalconas e flavon-3,4-diol, os quais são responsáveis principalmente pela pigmentação das frutas (LIN; TANG, 2007; GOSSLAU; CHEN, 2004; FRAGA; OTEIZA, 2011).

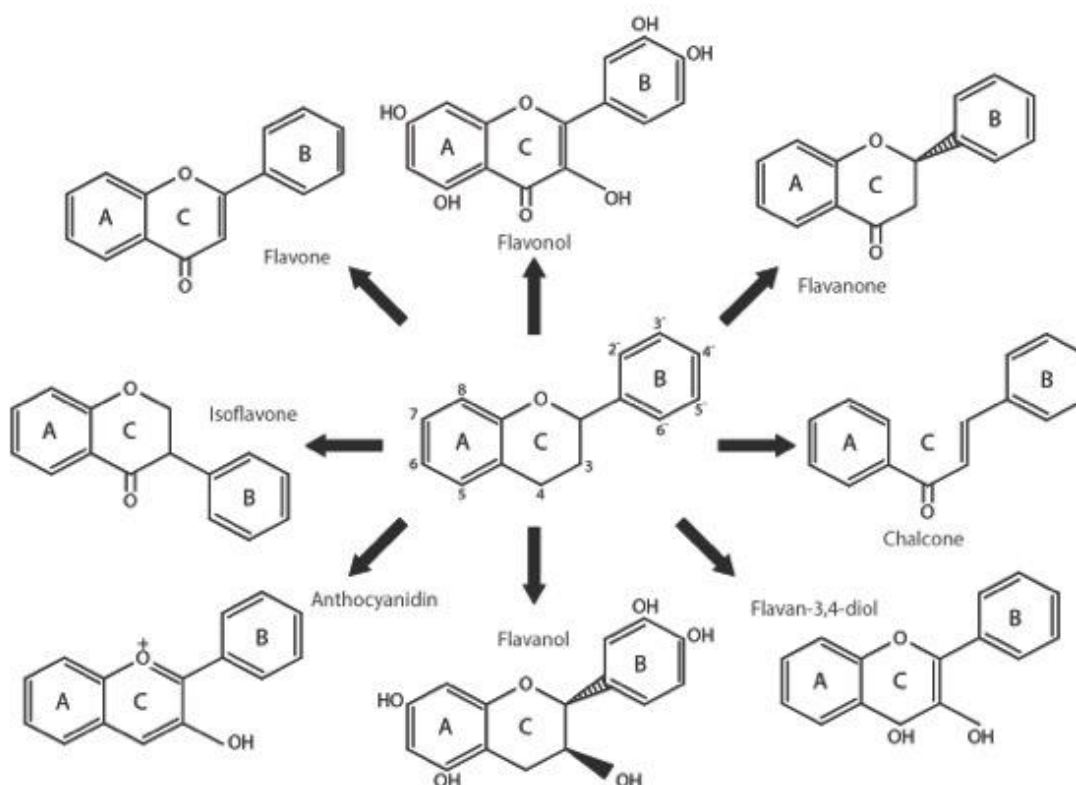


FIGURA 4 – ESTRUTURA BÁSICA DOS FLAVONOIDES
 FONTE: FRAGA; OTEIZA (2011)

Os flavonoides presentes nos alimentos normalmente estão na forma glicosilada, ou seja, ligados a um açúcar. Apresentam ação direta no sequestro de radicais livres pela doação de elétrons ou transferência de moléculas de hidrogênio, apresentando, portanto, atividade antioxidante e demonstram ação anti-inflamatória, sendo esta atribuída principalmente a modulação de citocinas. Os flavonoides apresentam ainda atividade antiviral e anticarcinogênica, além de serem capazes de proteger moléculas de LDL da oxidação e prevenir a agregação plaquetária. Pequenas diferenças existentes entre o tipo de ligação com monômeros, a isomerização ou a redução da polimerização influenciam nas atividades biológicas destes compostos.

Quanto maior o número de hidroxilas na molécula, por exemplo, melhor será a atividade antioxidante dos flavonoides via sequestro de radical (MLADENKA *et al.*, 2010; CALIXTO *et al.*, 2004; PRIOR, 2003).

Dentre os flavonoides, a classe das antocianidinas é mais distribuída nos alimentos. As antocianidinas são derivadas de sais flavílicos e apresentam estrutura carbônica C₆-C₃-C₆. As principais representantes da classe são cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina, malvidina e pelargonidina, sendo que as diferenças moleculares entre elas ocorrem pelo número de grupos hidroxila, número de natureza dos açúcares ligados às moléculas, posição destas ligações e quantidade e natureza de ácidos ligados aos açúcares (KONG, 2003; WALLACE, 2011).

Nas plantas são encontradas na forma glicosilada, assim como a maior parte dos flavonoides, recebendo a denominação de antocianinas. Os principais açúcares ligados às moléculas são glicose, ramnose, xilose, galactose, arabinose e frutose. Diversos estudos apontam que a atividade antioxidante das antocianidinas é maior que os respectivos glicosídeos. Os fatores estruturais destes compostos interferem na polaridade, estabilidade, potencial antioxidante de ação como quelantes (KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003).

Dentre os pigmentos, a classe das antocianinas é a segunda mais abundante, atribuindo coloração azul, roxa e vermelha aos vegetais, sendo que a coloração vermelha ou azulada destes compostos em pH ácido ocorre pela presença de oito duplas ligações conjugadas (PRIOR, 2003; WALLACE, 2011).

Além de serem responsáveis pela coloração de frutos e flores, as antocianinas exercem importante atividade antioxidante (MOHIUDDIN *et al.*, 2011; KÄHKÖNEN; HEINONEN, 2003). Já é reconhecido que as antocianinas exercem papel importante na promoção da saúde. Grande parte dos estudos sobre as atividades biológicas das antocianinas vem sendo realizados em ensaios *in vitro* ou *in vivo* em animais, sendo que, melhora da capacidade visual, melhora da função cognitiva, redução do risco cardiovascular, prevenção contra certos tipos de câncer e influencia na obesidade já foram avaliados (ESPÍN *et al.*, 2007; CHEN *et al.*, 2005). Alimentos ricos em antocianinas são fortemente associados à redução do risco cardiovascular, sendo que, estudos *in vitro* já demonstraram que este composto fitoquímico apresenta efeito na função endotelial e em marcadores pró-inflamatórios. Estudos *in vivo* incluindo pacientes diagnosticados com doença cardiovascular demonstraram que o consumo de baixas doses de antocianinas estava relacionado à redução da isquemia, da

pressão sanguínea, do nível de lipídeos plasmáticos e do status inflamatório (WALLACE, 2011). Podem ainda ter caráter protetor para alguns tipos de câncer por reduzir fatores de iniciação tumoral, minimizar o dano no ácido desoxirribonucleico (DNA), suprimir a angiogênese e inibir a progressão de estágios do tumor (MARTIN *et al.*, 2013).

É importante salientar que a biodisponibilidade das antocianinas pode variar de acordo com o tipo de fonte consumida, tipo de matriz na qual as antocianinas são administradas e a dose de administração. Em geral, os níveis sanguíneos após o consumo são baixos, variando de 55,3 a 168,5nmol/L, segundo Cao *et al.* (2001) em estudo com mulheres idosas. Entretanto, é possível que produtos secundários estejam presentes na circulação sanguínea sem ser identificados, o que poderia mascarar os dados de taxa de absorção deste composto. Em geral, a absorção ocorre em aproximadamente 1h, provavelmente em região do intestino delgado, sendo as antocianinas absorvidas em sua forma glicosilada. São eliminadas na urina em cerca de 4h após o consumo (CAO *et al.*, 2001; ESPÍN *et al.*, 2007; WALLACE, 2011).

1.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E A RELAÇÃO COM A SAÚDE HUMANA

Na cadeia respiratória mitocondrial, principalmente durante a fosforilação oxidativa, espécies reativas de oxigênio (EROs) como o radical hidroxila, oxigênio singlete, superóxido, peróxido de hidrogênio e óxido nítrico são constantemente formadas. Além da produção durante a cadeia respiratória mitocondrial, estas espécies também podem ser formadas endogenamente por neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, microsomas, peroxissomos e pelo citocromo P450 ou podem ser advindas de fontes exógenas como a radiação e os xenobióticos. Em condições normais, um equilíbrio entre a produção dos radicais e a sua inativação por moléculas antioxidantes é mantido, contudo, quando ocorre um desequilíbrio pela produção excessiva de EROs ou pela falta de antioxidantes, fica caracterizado o estresse oxidativo, o qual é capaz de causar dano celular (BARBOSA *et al.*, 2010; FU *et al.*, 2011; DAI *et al.*, 2012; VALKO *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo está envolvido na etiologia de diversas doenças crônicas e/ou degenerativas (CHELI; BALDI, 2011). Doenças cardiovasculares, diabetes e

alguns tipos de câncer envolvem estresse oxidativo em sua patogênese (FUKUJI *et al.*, 2010). Nas doenças cardiovasculares, por exemplo, o estresse oxidativo modifica a molécula do LDL, o que induz ao aumento da aderência leucocitária e redução da proteção endotelial, causando inflamação e levando ao processo de aterosclerose, que somado a agregação plaquetária, leva a indução da trombose e possível infarto do miocárdio. Além disso, pacientes hipertensos apresentam maior estresse oxidativo (MLADENKA *et al.*, 2010). No diabetes mellitus, o estresse oxidativo está envolvido tanto na patogênese da doença quanto no desenvolvimento das complicações. O excesso de radicais livres contribui para a disfunção de células β -pancreáticas e compromete a ação periférica da insulina. Além do mais, diabéticos estão mais propensos a maior oxidação de ácidos graxos, o que implica nas complicações cardiovasculares (VALERO *et al.*, 2011). Quanto ao câncer, as EROs são capazes de causar dano ao DNA, resultando em alterações na transcrição, transdução e replicação, o que está relacionado à carcinogênese (VALKO *et al.*, 2006). A relação entre o envelhecimento e maior prevalência de DCNT pode estar relacionada ao fato de que o envelhecimento mitocondrial é responsável por gerar maior quantidade de EROs, o que leva ao estresse oxidativo, o qual está envolvido na etiologia das patologias relacionadas ao envelhecimento. A produção aumentada de EROs é capaz de causar mutação no DNA e consequente disfunção mitocondrial, levando à redução da função celular (DAI *et al.*, 2012).

Antioxidantes são substâncias capazes de reduzir o efeito dos radicais livres pela estabilização ou inativação destas moléculas. Podem ter ação direta ou indireta, ou seja, ser tanto enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) quanto não-enzimáticos (vitamina C, vitamina E, glutathione, flavonoides e carotenoides) (CHELI; BALDI, 2011; SHAMI; MOREIRA, 2004). A dieta, por ser fonte de antioxidantes naturais exógenos, torna-se extremamente importante na modulação do estresse oxidativo (BARBOSA *et al.*, 2010). Frutas e hortaliças são a maior fonte de vitaminas, minerais e compostos fenólicos da dieta, sendo alimentos indispensáveis em uma dieta balanceada por apresentarem elevada qualidade nutricional com baixo teor calórico (FIGUEIREDO *et al.*, 2008). Sabe-se que o consumo de frutas e hortaliças tem relação inversamente proporcional com a mortalidade por DCNT, contudo este mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido (FU *et al.*, 2011; JAIME *et al.*, 2007; LOCK *et al.*, 2005). Hassimotto *et al.* (2005) sugerem que o mecanismo de ação protetora das frutas e hortaliças pode estar

relacionado à atividade antioxidante que estes alimentos apresentam, já que, o consumo regular é capaz de aumentar a capacidade antioxidante do plasma, auxiliando na prevenção de DCNT. Wootton-Bear e Ryan (2011) sugerem que a função destas substâncias nos alimentos pode estar relacionada à manutenção do equilíbrio redox, à estimulação da resposta antioxidante e à atuação em cascatas de sinalização. Porém, as evidências científicas na prevenção de DCNT apresentam fortes evidências em estudos *in vitro*, necessitando de maiores estudos *in vivo*.

O consumo de frutas como amora, cereja, mirtilo e framboesa, aliadas a folhosos e crucíferas é recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a fim de reduzir o risco de doenças coronarianas, hipertensão e infarto do miocárdio. Frutos do tipo *berry* são conhecidos por apresentar um elevado teor de compostos fenólicos e, conseqüentemente, alta atividade antioxidante (BALOGH *et al.*, 2010).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J. DE; FONSECA, T. C. **Mulberry germplasm and cultivation in Brazil.** FAO Electronic Conference on MULBERRY FOR ANIMAL PRODUCTION (Morus1-L). Anais... [S.I.]: FAO, 2002.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

AWASTHI, A. K.; NAGARAJA, G. M.; NAIK, G. V. et al. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. **BMC Genet.**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2004.

BALOGH, E.; HEGEDŰS, A.; STEFANOVITS-BÁNYAI, É. Application of and correlation among antioxidant and antiradical assays for characterizing antioxidant capacity of berries. **Sci. Hortic.**, v. 125, n. 3, p. 332-336, 2010.

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.

BARBOUR, J. R.; READ, R. A.; BARNES, R. L. Moraceae - Mulberry Family - *Morus* L. **Woody Plant Seed Manual**. [S.I.]: United States Department of Agriculture (USDA), 2001. p. 728-732.

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.I.]: The Journal of Nutrition., 2003.

BERNAL, J.; MENDIOLA, J. A.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, n. 4, p. 758-74, 2011.

BHATTACHARYA, E.; RANADE, S. A. Molecular distinction amongst varieties of Mulberry using RAPD and DAMD profiles. **BMC Plant Biol.**, v. 1, n. 3, p. 1-8, 2001.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutr. rev.**, v. 56, n. 11, p. 317-33, 1998.

BRASIL. Resolução RDC n.º 2, de 7 de Janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 jan. 2002. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 23/05/2012

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta med.**, v. 70, n. 2, p. 93-103, 2004.

CAO, G.; MUCCITELLI, H. U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R L. Anthocyanins are absorbed in glycated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 5, p. 920-6, 2001.

CHELI, F.; BALDI, A. Nutrition-based health: cell-based bioassays for food antioxidant activity evaluation. **J. Food Sci.**, v. 76, n. 9, p. R197-205, 2011.

CHEN, C.-C.; LIU, L.-K.; HSU, J.-D. et al. Mulberry extract inhibits the development of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. **Food Chem.**, v. 91, n. 4, p. 601-607, 2005.

CHEN, P.; CHU, S.; CHIOU, H.; KUO, W. Mulberry anthocyanins , cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside , exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. **Cancer Lett.**, v. 235, n. 2, p. 248-259, 2006.

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive Compounds and Health Benefits of Exotic Tropical Red-black Berries. **J. Funct. Foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

DAI, D.-F.; RABINOVITCH, P. S.; UNGVARI, Z. Mitochondria and cardiovascular aging. **Circ. Res.**, v. 110, n. 8, p. 1109-24, 2012.

DAMME, E. J. M. V.; HAUSE, B.; HU, J. 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.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chem.**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra* L.) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Sci. Hortic.**, v. 116, n. 1, p. 41-46, 2008.

ESPÍN, J. C.; GARCÍA-CONESA, M. T.; TOMÁS-BARBERÁN, FRANCISCO A. Nutraceuticals: facts and fiction. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22, p. 2986-3008, 2007.

FANG, S.-H.; HOU, Y.-C.; CHAO, P.-D. L. Pharmacokinetic and pharmacodynamic interactions of morin and cyclosporin. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 205, n. 1, p. 65-70, 2005.

FAZAEI, M.; HOJJATPANA, G.; EMAM-DJOMEH, Z. Effects of heating method and conditions on the evaporation rate and quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 46, n. 5, p. 956-962, 2011.

FERRI, M. G. Botânica – **Morfologia Externa das Plantas (Organografia)**. 15^o. ed. São Paulo: Nobel, 1990. p. 90-91

FIGUEIREDO, I. C. R.; JAIME, P. C.; MONTEIRO, C. A. Fatores associados ao consumo de frutas, legumes e verduras em adultos da cidade de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, v. 42, n. 5, p. 777-785, 2008.

FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dietary flavonoids: Role of (-)-epicatechin and related procyanidins in cell signaling. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 51, n. 4, p. 813-23, 2011.

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.

GARCIA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S. DE; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chem.**, v. 84, p. 13-18, 2004.

GOSSLAU, A.; CHEN, K. Y. Nutraceuticals, Apoptosis, and Disease Prevention. **Nutrition.**, v. 20, n. 1, p. 95-102, 2004.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra L.*) growing in Brazil. **Food. Sci. Tech. Int.**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 8, p. 2928-35, 2005.

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

HUO, Y. **Mulberry Cultivation and Utilization in China**. FAO Eletronic Conference on Mulberry for Animal Production. Anais... [S.l.]: FAO. , 2002

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.

JAIME, P. C.; MACHADO, F. M. S.; WESTPHAL, M. F.; MONTEIRO, C. A. Educação nutricional e consumo de frutas e hortaliças: ensaio comunitário controlado. **Rev. Saúde Pública**, v. 41, n. 1, p. 154-157, 2007.

JONES, W. P.; KINGHORN, A. D. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3°. ed. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. v. 864p. 341-366.

KAFKAS, S.; ÖZGEN, M.; DOGAN, Y. 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.

KOCA, I.; KARADENIZ, B. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. **Sci. Hortic.**, v. 121, n. 4, p. 447-450, 2009.

KONG, J. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOYUNCU, F. Organic Acid Composition of Native Black Mulberry Fruit. **Chem. Nat. Compd.**, v. 40, n. 4, p. 367-369, 2004.

KOYUNCU, F.; KOYUNCU, M. A.; YLDIRIM, F.; VURAL, E. Evaluation of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Genotypes from Lakes Region , Turkey. **Europ. J. Hort. Sci.**, v. 69, n. 3, p. 125-131, 2004.

KUMAR, V.; CHAUHAN, S. Mulberry : Life enhancer. **J. Med. Plant Res.**, v. 2, n. 10, p. 271-278, 2008.

KÄHKÖNEN, M. P.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, n. 3, p. 628-33, 2003.

LIN, J.-Y.; TANG, C.-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chem.**, v. 101, n. 1, p. 140-147, 2007.

LOCK, K.; POMERLEAU, J.; CAUSER, L.; ALTMANN, D. R.; MCKEE, M. The global burden of disease attributable to low consumption of fruit and vegetables : implications for the global strategy on diet. **Bull World Health Organ.**, v. 83, n. 02, p. 100-108, 2005.

MARTIN, C.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, Diet, and Health. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 18.1-18.28, 2013.

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.

MOHIUDDIN, E.; USMANGHANI, K.; AKRAM, M. et al. *Morus nigra* - L. A. **J. Med. Plant. Res.**, v. 5, n. 20, p. 5197-5199, 2011.

NOMURA, T. The chemistry and biosynthesis of isoprenylated Flavonoids from moraceous plants. **Pure Appl. Chem.**, v. 71, n. 6, p. 1115-1118, 1999.

ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Sci. Hortic.**, v. 119, n. 3, p. 275-279, 2009.

OZRENK, K.; GAZIOGLU, I. R. S.; ERDINC, C.; GULERYUS, M.; AYKANAT, A. Molecular characterization of mulberry germplasm from Eastern Anatolia. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2010.

PADILHA, M. M.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q. et al. Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 10, p. 1496-1500, 2010.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 9, p. 3377-80, 2008.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 44, n. 8, p. 1793-1801, 2011.

PLANTS DATABASE. Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/profile?symbol=MORUS>>. Acesso em 15/03/2012

PRIOR, RONALD L. Fruits and vegetables in the prevention of cellular oxidative damage. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 78, n. 3 Suppl, p. 570S-578S, 2003.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7o. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. p. 484

ROYER, M.; HERBETTE, G.; EPARVIER, V. et al. Phytochemistry Secondary metabolites of *Bagassa guianensis* Aubl. wood : A study of the chemotaxonomy of the Moraceae family. **Phytochemistry**, v. 71, n. 14-15, p. 1708-1713, 2010.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3o. ed. [S.l.]: Humana Press, 2012. v. 864p. 427-464.

SEERAM, N. P. Berry Fruits for Cancer Prevention: Current Status and Future Prospects. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 3, p. 630-635, 2008.

SHAMI, N. J. I. E.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como Agente Antioxidante. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

TROPICOS. Disponível em:< <http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=21300470>>. Acesso em: 06/11/2012.

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.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem. Biol. Interact.**, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S. 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.

WALLACE, T. C. Anthocyanins in Cardiovascular Disease. **Adv. Nutr.**, v. 2, p. 1-7, 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.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health ? : The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 10, p. 3135-3148, 2011.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 2118-24, 2005.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M. et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 51, n. 6, p. 675-83, 2007.

ZEREGA, N. J. C.; CLEMENT, W. L.; DATWYLER, S. L.; WEIBLEN, G. D. Biogeography and divergence times in the mulberry family (Moraceae). **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 37, n. 2, p. 402-416, 2005.

ZHAO, W.; MIAO, X.; JIA, S.; PAN, Y.; HUANG, Y. Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. **Plant Sci.**, v. 168, n. 2, p. 519-525, 2005.

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

ZHENG, Z.-P.; CHENG, K.-W.; ZHU, Q. 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. 5368-73, 2010.

CAPÍTULO II - COMPOSIÇÃO NUTRICIONAL DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.

1 INTRODUÇÃO

As frutas são alimentos considerados fontes de nutrientes essenciais como fibras, vitaminas e minerais, além de apresentarem elevado teor de água (COSTA *et al.*, 2013). O Brasil é o terceiro maior produtor de frutas do mundo, contudo, apesar da variedade de produção de frutas no país ser vasta, poucas espécies são encontradas com facilidade em mercados. Esse fato pode estar atribuído à dificuldade de conservação dos atributos sensoriais pós-colheita, falta de conhecimentos sobre a produção, curto período de safra, fragilidade do fruto, entre outros fatores (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). Dentre os frutos que são pouco encontrados nos mercados brasileiros está a amora, sendo os frutos do gênero *Morus* ainda menos encontrados quanto comparado às amoras do gênero *Rubus*.

Dentre as espécies do gênero *Morus*, a *Morus nigra* L. é uma das principais, sendo cultivada por todo o mundo (ZHAO *et al.*, 2005). É uma árvore que pode se desenvolver em ampla variedade de condições de cultivo como diferentes climas, solos e topografias. Contudo, a composição química dos frutos varia de acordo com as condições de cultivo (IMRAN *et al.*, 2010).

Devido ao pH ácido, cerca de 3,5, e ao elevado teor de açúcares, cerca de 10%, apresentados pelo fruto, a amora se torna boa matéria prima para o preparo de geleias, doces e caldas, o que agrega valor ao fruto por diversificar sua forma de comercialização (ERCISLI; ORHAN, 2007). As amoras também podem ser consideradas boas fontes de fibras e vitamina C, o que faz aumentar seu valor nutricional e estimular seu uso em dietas balanceadas (IMRAN *et al.*, 2010).

Estudos prévios já demonstraram que frutos da *Morus nigra* apresentam ácidos orgânicos como málico, cítrico, tartárico, oxálico e fumárico, os quais são importante fonte de energia para as plantas e conferem sabor ao fruto (KOYUNCU, 2004), além de ácidos graxos essenciais, como ácido linoleico e palmítico, os quais não são produzidos pelo organismo humano (ERCISLI; ORHAN, 2007). Os frutos também apresentam quantidades consideráveis de minerais como potássio, cálcio, sódio, magnésio, ferro, zinco e níquel (IMRAN *et al.*, 2010).

Diversos estudos já foram realizados a fim de determinar a composição nutricional de frutos da *Morus nigra* L. (IMRAN *et al.*, 2010; KOYUNCU *et al.*, 2004; ERCISLI; ORHAN, 2007), contudo estudos com frutos brasileiros são escassos. Portanto, o objetivo deste capítulo é reportar o resultado das análises físico-químicas de frutos da *Morus nigra* L. cultivados na região de Curitiba – PR.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRA

Para as análises físico-químicas foram utilizados frutos maduros e *in natura* da *Morus nigra* L. colhidos de setembro a outubro de 2011 de seis diferentes árvores localizadas no município de Curitiba no estado do Paraná (PR), as quais apresentam as seguintes coordenadas geográficas: A₁: -25.387205,-49.253794; A₂: -25.39038,-49.256221; A₃: -25.442151,-49.234223; A₄: -25.43097,-49.238602; A₅: -25.414943,-49.228731; A₆: -25.39209,-49.23652. A Identificação foi realizada pelo botânico Osmar dos Santos Ribas, curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba – PR e uma exsicata da planta encontra-se depositada neste local sob o número MBM371423.

Para a análise de umidade, os frutos foram coletados e imediatamente analisados, enquanto que para os demais ensaios, os frutos foram congelados após a colheita a -18°C. Para todas as análises os frutos foram triturados em multiprocessador de alimentos marca Arno®.

2.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

2.2.1 Umidade

A umidade dos frutos da *Morus nigra* foi verificada por secagem direta em estufa de acordo com a metodologia 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Aproximadamente 5g de fruto triturado foram levados à estufa marca Quimis® a 105°C em pesa-filtro previamente padronizado e mantidos até apresentar peso constante. O experimento foi realizado em seis repetições. O teor da umidade foi obtido a partir da diferença entre a amostra seca e o peso do pesa-filtro. Os valores foram expressos em teor por 100g de fruto.

2.2.2 Cinzas

A análise de cinzas foi realizada de acordo com a metodologia 900.2 descrita pela A.O.A.C. (1996). Aproximadamente 5g de fruto triturado, em seis repetições, foram pesados em cadinho previamente padronizado e levados a secar e carbonização em chapa elétrica. Posteriormente, a amostra foi incinerada em mufla marca Robertshaw® modelo Indic 50 a 550°C, até eliminação do carvão, e resfriada em dessecador até o momento da pesagem. O teor de cinzas foi obtido a partir da diferença existente entre a amostra após incineração e o peso do cadinho. Os resultados foram expressos em teor por 100g de fruto.

2.2.3 pH

O pH dos frutos da *Morus nigra* foi determinado por processo eletrométrico de acordo com a metodologia 017/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Aproximadamente 10g de amostra triturada foram diluídos em 100mL de água destilada e o pH desta solução foi aferido em pHmetro marca Analyser®, modelo pH300 previamente calibrado. O experimento foi realizado em triplicata.

2.2.4 Acidez Titulável

A acidez titulável foi verificada de acordo com a metodologia potenciométrica 016/IV do Instituto Adolfo Lutz, 2008, a qual consiste em titular 10g da amostra diluída em 100mL de água destilada com solução de hidróxido de sódio 0,1M até atingir pH 8,0, o qual foi aferido por pHmetro marca Analyser®, modelo pH300.

2.2.5 Lipídeos

O teor de lipídeos foi determinado por meio de extração a quente da amostra com éter de petróleo de acordo com a metodologia 920.39.C da A.O.A.C. (1995). Aproximadamente 4g de amostra seca foram pesados em papel filtro e levados ao extrator de Soxhlet acoplado a um condensador de bolas e balão de fundo chato previamente padronizado. O conjunto extrator foi mantido sob aquecimento por aproximadamente oito horas para extração. O solvente foi destilado e o balão com o resíduo etéreo foi levado ao dessecador para posterior pesagem. O teor de lipídios foi expresso em teor em 100g de fruto de acordo com a diferença de peso existente entre o balão padronizado e o balão com o extrato etéreo. O experimento foi realizado em seis repetições.

2.2.6 Proteínas

Foi realizada determinação de Nitrogênio, pelo processo de digestão de Kjeldahl de acordo com a metodologia 991.20 da A.O.A.C. (1995). O experimento foi composto por três etapas: digestão, destilação e titulação. Na primeira pesou-se aproximadamente 1g da amostra e procedeu-se a digestão com ácido sulfúrico e catalisador CuSO_4 e K_2SO_4 , formando sulfato amoniacal. Na segunda etapa, ocorreu a destilação por arraste de vapor da amônia, a qual foi recebida em erlenmeyer contendo ácido bórico a 4% e gerando um complexo de coloração verde. Na terceira etapa, a amônia foi titulada com ácido sulfúrico 0,02M até viragem da coloração verde para um complexo cor-de-rosa. O cálculo para determinação de proteínas foi realizado pela fórmula descrita na FIGURA 5 a seguir.

$$\% \text{ de proteínas} = \frac{V \times 0,14 \times f}{P}$$

Na qual:
V: volume de ácido sulfúrico
gasto na titulação
P: peso da amostra,
f: fator de conversão (6,25)

FIGURA 5 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE PROTEÍNAS
FONTE: Instituto Adolfo Lutz, 2008

2.2.7 Fibra Alimentar Total

O teor de fibra alimentar total (FAT) foi determinado por método enzimático gravimétrico segundo a metodologia 045/VI do Instituto Adolfo Lutz, 2008. Brevemente, o método consistiu em digerir cerca de 1g do fruto triturado com três enzimas diferentes, sendo elas: α -amilase termorresistente, alcalase e amiloglucosidase. Após a digestão enzimática, 250mL de etanol 95% pré-aquecido foi adicionado à amostra e a solução permaneceu em repouso por 24h. Decorrido o período, essa solução foi filtrada em cadinhos de vidro sinterizado padronizados e lavada com 30mL de etanol 78%, 20mL de etanol 95% e 20mL de acetona. O resíduo que permaneceu nos cadinhos foi seco em estufa a 105°C e o peso foi aferido após estabilização. O ensaio foi realizado em seis repetições, sendo que três foram destinadas para análise de cinzas no resíduo, conforme metodologia já descrita no item 2.2.2 e o restante para análise de proteínas conforme descrito no item 2.2.6. O mesmo ocorreu com o branco, frasco no qual não continha amostra. A determinação de cinzas e proteínas no resíduo é importante para evitar que estes elementos interfiram nos resultados. Para determinação do teor de fibras foi empregada a seguinte fórmula:

$$\%FAT = \frac{R - P - C - B}{M} \times 100$$

Na qual:

R: Resíduo das amostras

P: Teor de proteína no resíduo

C: teor de cinzas no resíduo

B: branco da reação

m: peso da amostra analisada

FIGURA 6 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE FIBRA ALIMENTAR TOTAL
FONTE: Instituto Adolfo Lutz (2008)

2.2.8 Carboidratos

O teor de carboidratos foi calculado pela diferença existente entre 100 e o teor de proteínas, lipídeos, cinzas, fibras e umidade, conforme fórmula demonstrada na FIGURA 7.

$\% \text{Carboidratos} = 100 - P - L - C - F - U$	Na qual: P: Teor de proteína L: Teor de lipídeos C: Teor de cinzas F: Teor de fibras U: Teor de umidade
--	--

FIGURA 7 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE CARBOIDRATOS
 FONTE: MULER; TOBIN (1980)

2.2.9 Valor Energético

O valor energético foi calculado de acordo com a conversão de Atwater. O teor proteico e de carboidratos foram multiplicados por 4kcal e o teor de lipídeos por 9kcal. O valor energético total corresponde à soma dos produtos destas multiplicações (OSBORNE; VOOGT, 1978).

$\text{VET} = (P \times 4) + (C \times 4) + (L \times 9)$	Na qual: P: Teor de proteína C: Teor de carboidratos L: Teor de Lipídeos
---	---

FIGURA 8 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DO VALOR ENERGÉTICO TOTAL
 FONTE: OSBORNE; VOOGT (1978)

3 RESULTADOS

A TABELA 1 representa os valores de umidade, cinzas, pH e acidez titulável de frutos da *Morus nigra* L. Pode-se verificar que a amora apresenta pH ácido e tem um alto teor de água, dois fatores que ditam suas características organolépticas.

TABELA 1 – UMIDADE, CINZAS, pH E ACIDEZ TITULÁVEL DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.

	TEOR EM 100g DE PESO FRESCO
Umidade	86,25 ± 0,16
Cinzas	0,28 ± 0,04
pH	3,74 ± 0,01
Acidez Titulável	1,69 ± 0,046

FONTE: A autora (2013)

Os resultados obtidos por este trabalho são similares a outros já descritos na literatura. Imran *et al.* (2010), ao avaliar frutos de *Morus nigra* cultivados no Paquistão, observaram teor de 82,4% de umidade, 0,5% de cinzas, 3,68 de pH e 1,51% de acidez titulável (IMRAN *et al.*, 2010). Os valores de pH e acidez titulável são similares também aos encontrados em amoras cultivadas na Turquia (KOYUNCU *et al.*, 2004; ERCISLI; ORHAN, 2007; ERCISLI *et al.*, 2010).

Comparando com frutas exóticas cultivadas no Brasil, verifica-se que as amoras analisadas no presente trabalho são similares quanto ao teor de umidade à graviola, butiá, maracujá doce e mandacaru-de-três-quinhas (88%, 87,8%, 84% e 83,7%, respectivamente) (SOUZA, *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013). O teor de cinzas pode ser comparado ao obtido por Souza *et al.* (2012) em frutos como graviola e jenipapo (0,19 e 0,39%), enquanto que o pH pode ser comparado aos teores encontrados em murici e maracujá doce, sendo 3,32 e 3,31, respectivamente (SOUZA, *et al.*, 2012).

Quanto aos produtos processados, ao avaliar a acidez titulável de suco de amora, Khalid *et al.* (2011), observaram acidez titulável de 1,60%. Segundo Souza *et al.* (2012), os teores de acidez titulável podem ser classificados em médios quando variarem de 0,08% a 1,95% (SOUZA, *et al.*, 2012). Teores de acidez titulável menores são preferidos quando a intenção de consumo do fruto é in natura, já teores mais elevados são indicados para frutos que serão processados (LIMA *et al.*, 2002)

Estas características, tanto do teor de água, quanto da acidez são fatores importantes para determinar as características organolépticas dos frutos, as quais

serão cruciais na avaliação sensorial de um produto elaborado a partir desta matéria prima.

Quanto a composição centesimal (TABELA 2) pode-se observar que o carboidrato é o macronutriente predominante nestes frutos. Quanto à qualidade da composição dos frutos, os mesmos apresentam 4,06% de fibras totais e baixo valor energético.

TABELA 2 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DE FRUTOS DA *Morus nigra L.*

	TEOR EM 100g DE PESO FRESCO
Valor Energético (kcal)	44,34
Carboidratos (g)	6,28
Proteína (g)	1,79 ± 0,2
Lipídeos (g)	1,34 ± 0,19
Fibra Alimentar Total (g)	4,06

FONTE: A autora (2013)

O teor de fibra alimentar total verificado no presente estudo é diferente do apresentado por Imran *et al.* (2010), os quais observaram 11,75g de fibras/100g. Contudo, o resultados destes autores foi expresso em peso seco, enquanto que o do presente estudo em peso fresco. A mesma diferença é observada nos demais macronutrientes, já que os mesmos autores verificaram teor de lipídeos de 0,55%, proteínas de 0,96%, carboidratos de 13,83% e uma densidade energética de 64,11kcal/100g, todos calculados em base seca (IMRAN *et al.*, 2010).

Souza *et al.* (2012), avaliou a composição nutricional de polpas de frutos típicos do cerrado brasileiro, entre eles araticum, murici, jenipapo, graviola e maracujá doce. Verificou-se que as amoras analisadas no presente trabalho são similares quanto ao valor calórico à graviola (44,3kcal/100g) e apresentam teor de proteínas e fibras superior às frutas típicas do cerrado (SOUZA, *et al.*, 2012).

Quando comparados a dados da Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (UNICAMP, 2011), verifica-se que as amoras apresentam valor calórico similar a frutas como abacaxi (48kcal/100g), caju (43kcal/100g), carambola (46kcal/100g), laranja baía (45kcal/100g), mamão formosa (45kcal/100g), pitanga (41kcal/100g) e uva rubi (49kcal/100g). Quanto ao teor de fibras, as amoras apresentam-se mais ricas neste nutriente comparadas a diversas frutas comumente consumidas no país como abacaxi (1g/100g), ameixa (2,4g/100g), banana (1,9g/100g), jabuticaba (2,3g/100g), laranja pera (0,8g/100g), maçã (1,3g/100g), mamão (1,8g/100g), pera (3g/100g), pitanga (3,2g/100g) e uva(0,9g/100g).

Quando a relação fibras (g)/energia (kcal) é realizada, verifica-se que as amoras apresentam uma relação de 0,091g de fibras/kcal. Comparando com frutas comumente consumidas no Brasil, as amoras apresentam melhor relação quando comparadas a abacaxi (0,020g de fibras /kcal), laranja (0,024g de fibras /kcal), mamão (0,040g de fibras /kcal), maçã (0,023g de fibras/kcal), pera (0,056g de fibras /kcal) e uva (0,018g de fibras/kcal) (UNICAMP, 2011).

As características químicas de frutas podem variar de acordo com condições da própria fruta, como condições de cultivo, grau de maturidade na colheita e nível de exposição solar, ou condições experimentais como armazenamento pós-colheita, utilização de métodos diferentes e reagentes empregados (SOUZA *et al.*, 2012; PEREIRA *et al.*, 2013).

Frutas frescas são conhecidamente fontes de água, vitaminas, sais minerais e carboidratos. Em geral, o teor de lipídios e proteínas são irrelevantes na composição nutricional de um fruto. Além de estes macronutrientes estarem presentes em baixa concentração, as proteínas presentes nas frutas apresentam baixo valor biológico. O teor de carboidratos, macronutriente predominante, depende do estágio de maturação, sendo que com o aumento do grau de maturidade, o teor de amido é reduzido enquanto que a concentração de glicose e frutose aumentam, favorecendo o sabor adocicado dos frutos (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). Frutas apresentam de 3 a 30% de carboidratos, sendo os principais açúcares a glicose e a frutose (GUNDOGDU *et al.*, 2011). As fibras, outro macronutriente importante das frutas, desempenham papel importante na saúde por apresentar auxiliar na redução dos índices glicêmicos e aumentar a saciedade (MARTIN *et al.*, 2013).

4 CONCLUSÃO

A partir de análises físico químicas da amora (*Morus nigra L*) pode-se concluir que o fruto apresenta adequada qualidade nutricional, devido à baixa densidade energética (44kcal/100g) e elevado teor de fibras (4,06%) comparado a demais frutas comumente consumidas no Brasil. Além disso, os frutos apresentam pH ácido (3,74), o que caracteriza seu sabor. O elevado teor de umidade (86,25%) se torna fator crucial no armazenamento do fruto, reduzindo sua vida útil e dificultando a comercialização *in natura*, sendo necessária, portanto, a busca por formas de processamento.

REFERENCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** Arlington: A.O.A.C., 1995, cap. 33, p. 10-12.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (A.O.A.C). **Official Methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.** Arlington: A.O.A.C., 1996, cap. 44, p. 3.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive Compounds and Health Benefits of Exotic Tropical Red-black Berries. **J. Funct. Foods**, v. 5, n. 2, p. 539-549, 2013.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chem.**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

ERCISLI, S.; TOSUN, M.; DURALIJA, B.; SENGUL, M.; TURAN, M. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra* L.) and Purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 48, n. 1, p. 102-106, 2010.

GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; SENSOY, R. I. G.; YILMAZ, H. 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.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: 4.ed, 2008. Cap. 4, p. 83 – 160.

KHALID, N.; FAWAD, S. A.; AHMED, I. Antimicrobial Activity , Phytochemical Profile and Trace Minerals of Black Mulberry (*Morus nigra L.*) Fresh Juice. **Pak. J. Bot.**, v. 43, p. 91-96, 2011.

KOYUNCU, F. Organic Acid Composition of Native Black Mulberry Fruit. **Chem. Nat. Compd.**, v. 40, n. 4, p. 367-369, 2004.

LIMA, M. A. DE C.; ASSIS, J. S. DE; NETO, L. G. Caracterização dos Frutos de Goiabeira e Seleção de Cultivares na Região do Submédio São Francisco. **Rev. Bras. Frutic.**, v. 24, n. 1, p. 273-276, 2002.

MARTIN, C.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, Diet, and Health. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 18.1-18.28, 2013.

MULER, H.G., TOBIN, G. **Nutrition of Food Processing**. Croom Helm Ltd., London. 1980.

OSBORNE, D. R.; VOOGT, P. **The analysis of nutrient in foods**. London: Academic Press, 1978. p. 251.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A. *et al.* Characterization, bioactive compounds and antioxidant potential of three Brazilian fruits. **J. Food Compos. Anal.**, v. 29, n. 1, p. 19-24, 2013.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. DE D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chem.**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

UNICAMP. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**. 4º ed. Campinas, SP: UNICAMP. 2011, pp. 36–42.

ZHAO, W.; MIAO, X.; JIA, S.; PAN, Y.; HUANG, Y. Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus L.* **Plant Sci.**, v. 168, n. 2, p. 519-525, 2005.

CAPÍTULO III – ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS EM FRUTOS DA *Morus nigra* L.

1 INTRODUÇÃO

A amora (*Morus nigra* L.), pertence à família *Moraceae*, é uma planta originária da Ásia com uso bastante difundido nesta região, principalmente na medicina tradicional (OZRENK *et al.*, 2010), na qual, diversas partes da planta são utilizadas com função laxativa, vermífuga, expectorante, emética, hipoglicêmica, anti-inflamatória e antioxidante (ERCISLI; ORHAN, 2007).

Em busca dos compostos ativos capazes de provocar estes benefícios à saúde humana, estudos de isolamento e identificação de substâncias vêm sendo realizados. Para isto, o uso de tecnologias avançadas é essencial na pesquisa destes compostos bioativos, principalmente devido à complexidade das matrizes originais em que estes compostos se encontram. Tecnologias avançadas como Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (EM), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) são as mais utilizadas (BERNAL *et al.*, 2011).

Para o isolamento de substâncias, a cromatografia em coluna é um processo bastante empregado. Para isolamento de flavonoides, por exemplo, a resina Amberlite XAD, um adsorvente polimérico não iônico tem sido vastamente utilizado. Já para o isolamento de flavan-3-ols, como as proantocianidinas, e antocianinas o Sephadex LH-20 é utilizado por meio da exclusão por tamanho de partícula e adsorção (SANTOS-BUELGA *et al.*, 2012).

Quanto à identificação, a CLAE com colunas C18 de fase reversa pode ser utilizada. No caso de detecção de compostos fenólicos, o método padrão ouro utilizado é ultravioleta (UV) visível com detector de arranjo de diodos. Os compostos fenólicos mais simples são verificados a 240-290nm, enquanto que os de estrutura mais complexa, como os flavonoides, entre 300 e 550 (BERNAL *et al.*, 2011).

A ressonância magnética, técnica bastante empregada na identificação de substâncias, fornece um *fingerprint* da estrutura química a ser elucidada a partir de características como densidade dos elétrons da molécula e distribuição destes elétrons no núcleo (VEEMAN, 1997).

Compostos como flavonoides, antocianinas e ácidos orgânicos já foram isolados e identificados em frutos da *Morus nigra* L., utilizando tecnologias avançadas. Gundogdu *et al.* (2011), ao avaliar a composição da *Morus nigra* por meio de CLAE, observaram que o fruto apresenta ácidos orgânicos como ácido málico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido tartárico. O mesmo estudo também observou a presença de compostos fenólicos como ácido clorogênico, rutina, ácido gálico, ácido cumárico, ácido cafeico e quercetina. Em estudo com amoras cultivadas no Brasil, Hassimotto *et al.* (2007) verificaram a presença de cianidinas, pelargonidinas e quercetina via CLAE e EM. Pawlowska *et al.* (2008), a partir de análises de frutos da *Morus nigra* via CLAE, identificaram a presença dos flavonoides quercetina 3-O-rutinosídeo, kaempferol 3-O-rutinosídeo, quercetina 3-O-glicosídeo e as antocianinas cianidina 3-O-glicosídeo, cianidina 3-O-rutinosídeo, pelargonidina 3-O-glicosídeo e pelargonidina 3-O-rutinosídeo. Song *et al.* (2009) evidenciaram a presença de além dos flavonoides e antocianinas já supracitados, o composto oxiresveratrol.

O uso destes processos é importante para diversas etapas na produção de um fitoterápico ou nutracêutico como na identificação de novos fitoquímicos, caracterização da estrutura química, quantificação dos compostos na matriz original, controle de qualidade da produção, entre outros (BERNAL *et al.*, 2011). Por isso, objetiva-se com este capítulo verificar os principais grupamentos químicos presentes em frutos da *Morus nigra* L. além de isolar, identificar e quantificar metabólitos secundários presentes em extratos brutos e frações obtidos desta planta.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 AMOSTRA

Para as análises fitoquímicas foram utilizados frutos maduros e *in natura* da *Morus nigra* L. colhidos de setembro a outubro de 2011 de seis diferentes árvores localizadas no município de Curitiba no estado do Paraná (PR), as quais apresentam as seguintes coordenadas geográficas: A₁:-25.387205,-49.253794; A₂:-25.39038,-49.256221; A₃:-25.442151,-49.234223; A₄:-25.43097,-49.238602; A₅: -25.414943,-49.228731; A₆: -25.39209,-49.23652. A Identificação foi realizada pelo botânico Osmar dos Santos Ribas, curador do Museu Botânico Municipal de Curitiba – PR e uma exsicata da planta encontra-se depositada neste local sob o número MBM371423.

Os frutos foram congelados imediatamente após a colheita a -18°C. Para composição da amostra utilizada no preparo dos extratos, os frutos foram misturados e submetidos à quarteamento.

2.2 ENSAIO SISTEMÁTICO

O ensaio sistemático foi realizado 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 nas frações do extrato etanólico (hexano, diclorometano, acetato de etila e remanescente) e no extrato aquoso, conforme descrito por Moreira (1979) e adaptado por Miguel (2003).

2.2.1 Extrato Etanólico

Para elaboração do extrato etanólico, 290,9g de fruto fresco foram submetidos a maceração em banho-maria a 70°C durante uma hora, utilizando etanol 70% (v/v) como líquido extrator.

O extrato foi concentrado em rotaevaporador marca Janke & Kunkel® a 50°C e fracionado com solventes de polaridade crescente por meio de funil de separação. Os solventes utilizados foram hexano, diclorometano e acetato de etila. A fração restante foi denominada remanescente.

2.2.1.1 Pesquisa de Alcaloides

Este ensaio consistiu em levar à secura 50mL de cada fração em banho-maria a 70°C. O resíduo foi dissolvido em 1mL de etanol 95% e 20mL de ácido clorídrico 1%. A três tubos de ensaio foram adicionados 2mL desta solução para posterior adição de reativos específicos para a busca de alcaloides, sendo eles: Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff e Reativo de Bouchardat. A reação foi considerada positiva quando se formou precipitado branco na reação com reativo de Mayer, precipitado vermelho-tijolo com o reativo de Dragendorff e precipitado alaranjado com o reativo de Bouchardat.

2.2.1.2 Pesquisa de Leucoantocianidinas

Para este ensaio, 10mL de cada fração foram levados à secura e posteriormente diluídos em 5mL de etanol. As frações foram levadas a aquecimento após a adição de duas gotas de ácido clorídrico concentrado. O aparecimento de coloração vermelha foi indicativo para resultado positivo.

2.2.1.3 Pesquisa de Flavonoides

2.2.1.3.1 Pesquisa de Heterosídeos Flavônicos

Foram levados à secura 20mL das frações, os quais foram posteriormente diluídos em 10mL de etanol. Foram adicionados 200mg de limalha de magnésio e aproximadamente 1mL de ácido clorídrico fumegante. A reação foi considerada positiva no caso de desenvolvimento de coloração variando de amarela a vermelho para as flavonas, vermelho a vermelho sangue para flavonóis e dihidroflavonóis e vermelho a rosa para os derivados antociânicos.

2.2.1.3.2 Teste Oxálico Bórico (Flavonóis)

Este teste consistiu em levar à secura 10mL das frações, adicionar ao resíduo cinco gotas de acetona e 30mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1) e levar novamente à secura. Em seguida, adicionou-se ao resíduo 5mL de éter de petróleo e a solução foi analisada sob lâmpada UV. A presença de fluorescência indicou a presença de flavonóis.

2.2.1.3.3 Ensaio de Pacheco (Dihidroflavonóis)

Para este ensaio foram levados à secura 10mL de cada fração. O resíduo foi levado à chapa de aquecimento e adicionado de cristais de acetato de sódio, 0,1mL de anidrido acético e 0,1mL de ácido clorídrico concentrado. A presença de coloração roxa é considerada positiva da dihidroflavonóis.

2.2.1.3.4 Ensaio com Zinco em Ácido Clorídrico (Dihidroflavonóis)

Este ensaio consistiu em secar 10mL de cada fração e em seguida diluir em etanol. A solução foi transferida para tubos de ensaio previamente identificados e a ela foram adicionados uma pastilha de zinco e cerca de 1mL de ácido clorídrico fumegante. A presença de coloração roxa nos tubos indica presença de dihidroflavonóis.

2.2.1.4 Pesquisa de Cumarinas

Foram concentrados 30mL de cada fração. A fração remanescente foi acidificada até pH 1 antes da concentração e posteriormente foi extraída com éter etílico em funil de separação. Foram transferidos para tubos de ensaio 3mL de cada fração concentrada, assim como da fração etérea originada da fração remanescente. Foram adicionados aos tubos 2mL de hidróxido de sódio e os mesmos permaneceram em repouso sob luz UV por 15 minutos. O aparecimento de fluorescência azul, amarela ou esverdeada indicou a presença de cumarinas.

2.2.1.5 Pesquisa de Heterosídeos Antraquinônicos

Este método foi conduzido de forma a levar a refluxo com condensador de bolas, 30mL de cada fração juntamente com 5mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10%. Após 30 minutos, as soluções foram retiradas e filtradas em papel filtro. Às frações hexano, diclorometano e acetato de etila, foram adicionados 30ml de água e, com auxílio de funil de separação, a fase orgânica foi separada. Para a fração remanescente, ocorreu a extração com éter etílico, também com o auxílio de um funil de separação. Todas as frações foram concentradas até aproximadamente 5mL, transferidas para tubos de ensaio e adicionadas de 5mL de hidróxido de amônia. O

aparecimento de coloração vermelha indicou a presença de antraquinonas e/ou naftoquinonas.

2.2.1.6 Pesquisa de Esteroides e/ou Triterpenos

Este ensaio foi baseado na reação de Libermann Bouchard. Foi levado a secura 30mL das frações, as quais foram posteriormente dissolvidas em clorofórmio. Adicionou-se a tubos de ensaio 0,1mL, 0,5mL e 1,0mL da solução clorofórmica, sendo o volume completado para 2mL com clorofórmio, 1mL de anidrido acético e 2mL de ácido sulfúrico concentrado. O aparecimento de coloração rosa escuro ou azul, significou a presença da função carbonila na posição 3, a coloração verde indicou função hidroxila na posição 3 e a coloração amarela a presença de metila em C₁₄.

2.2.2 Extrato Aquoso

Para elaboração do extrato aquoso, 290,7g de fruto fresco foram submetidos à maceração em banho-maria a 70°C durante uma hora, utilizando água destilada como líquido extrator.

No extrato aquoso procedeu-se a busca dos grupamentos químicos descritos a seguir.

2.2.2.1 Pesquisa de Heterosídeo Antociânico

Este ensaio baseou-se na mudança de coloração do extrato de acordo com as modificações de pH. O pH do extrato foi corrigido para ácido (cerca de pH 4), neutro (cerca de pH 7) e básico (cerca de pH 10) em tubos de ensaio. A presença de coloração vermelha em meio ácido, violáceo em meio neutro e azul em meio básico indicou a presença de heterosídeos antocianicos.

Para a confirmação da presença de antocianidinas, 10mL do extrato aquoso foram transferidos para um funil de separação e procedeu-se a extração com n-butanol. A fração butanólica foi concentrada a 5mL, adicionada de ácido clorídrico concentrado e levada a aquecimento até ebulição. O aparecimento de coloração vermelha foi considerado positivo para antocianidinas.

2.2.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponinicos

Neste ensaio foram utilizados os tubos de ensaio preparados no item 2.1.2.1, os quais continham o extrato em diferentes pH. Este método baseou-se na agitação enérgica dos tubos de ensaio durante 5 minutos e medição do anel de espuma formado. Após 30 minutos, foi verificada a permanência do anel de espuma e o seu tamanho. A presença de anel superior a 1cm indicou presença de saponinas esteroidais.

2.2.2.3 Pesquisa de Heterosídeos Cianogenéticos

Este teste consistiu em adicionar a tubos de ensaio 5mL do extrato, seguido de 1mL de solução aquosa de ácido sulfúrico e suspender sobre este tubo uma fita de papel picro sódico. Após permanência de 30 minutos em banho-maria, verificou-se a presença de coloração vermelha no papel, o que seria indicativo de presença de heterosídeos cianogenéticos.

2.2.2.4 Pesquisa de Taninos

2.2.2.4.1 Ensaio de Cloreto Férrico

Neste ensaio, cinco gotas de cloreto férrico foram adicionados a 1mL de extrato aquoso. O desenvolvimento de coloração azul foi indicativa de presença de taninos hidrolisáveis, verde presença de taninos condensados e marrom presença de polifenóis.

2.2.2.4.2 Ensaio de Solução de Gelatina

Este ensaio consistiu em adicionar a três tubos de ensaio concentrações diferentes de extrato aquoso (0,5mL, 1,0mL e 2,0mL) e 2mL de solução de gelatina a 2,5%. O desenvolvimento de precipitação foi considerado positivo para taninos hidrolisáveis.

2.2.2.5 Pesquisa de Amino Grupo

Neste método, foram concentrados 10mL do extrato até volume de 5mL a uma temperatura de 60°C. O concentrado foi depositado em papel filtro previamente demarcado e levado a secura. Posteriormente, uma gota de ninhidrina foi depositada sobre a mancha e procedeu-se aquecimento a 100°C por 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul foi considerado positivo para esta reação.

2.2.2.6 Pesquisa de Ácidos Fixos

Neste ensaio, 20mL do extrato e 2mL de hidróxido de sódio foram transferidos para um balão de fundo chato, o qual foi acoplado a um condensador de bolas e levado a refluxo por 30 minutos. Após resfriamento da solução, a mesma foi acidificada com solução de ácido sulfúrico e extraída com éter etílico com auxílio de um funil de separação. A fração etérea foi coletada, tratada com carvão ativo e levada a secar a 50°C. Após resfriamento, foi adicionado 5mL de solução aquosa de hidróxido de amônia e três gotas foram transferidas para um papel filtro previamente delimitado com três círculos. No primeiro aplicou-se apenas a amostra, no segundo, a amostra mais uma gota do reativo de Nessler, enquanto que no terceiro apenas o reativo. O desenvolvimento de coloração no ponto dois diferente dos demais indicou presença de ácidos fixos.

2.2.2.7 Pesquisa de Ácidos Voláteis

Este teste consistiu em adicionar a tubos de ensaio 5mL do extrato e 1mL de ácido sulfúrico a 10% e suspender uma fita medidora de pH sobre o tubo. O conjunto foi levado a aquecimento em banho-maria a 60°C durante 30 minutos e a presença de coloração avermelhada no papel indicou a presença de ácidos voláteis.

2.3 ELABORAÇÃO DE EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

2.3.1 Elaboração de Extratos Brutos

Foram utilizados quatro métodos de extração, sendo duas delas com emprego de temperatura e duas a frio. Os solventes utilizados também diferiram, sendo empregado etanol 95% para dois extratos e água destilada para outros dois.

2.3.1.1 Extrato aquoso sem emprego de temperatura – Turbólise Aquoso

Para obtenção do extrato bruto turbólise aquoso (TA), 40,4g da amostra congelada foram agitados com 50ml de água destilada durante 10 minutos em agitador Metlabo® modelo MA102. Posteriormente, a solução foi centrifugada em centrífuga Zanetcki® T23 durante 20 minutos a 5000 rpm. O processo foi repetido por cinco vezes. Ao final, todo o extrato foi novamente centrifugado a 5000rpm durante 30 minutos para melhor remoção de resíduos. O extrato foi concentrado por meio de evaporação do solvente extrator em estufa com circulação de ar Quimis® modelo 314D a 35°C.

2.3.1.2 Extrato etanólico sem emprego de temperatura – Turbólise Etanólico

Para obtenção do extrato bruto turbólise etanólico (TE), 40,3g da amostra congelada foram agitados com 50ml de etanol 95% durante dez minutos em agitador Metlabo® modelo MA102. Posteriormente, a solução foi centrifugada em centrífuga Zanetcki® T23 durante 20 minutos a 5000rpm. O processo foi repetido por cinco vezes. Ao final, todo o extrato foi filtrado a vácuo para retirada de possíveis resíduos. O extrato foi concentrado por meio de evaporação do solvente extrator em estufa com circulação de ar Quimis® modelo 314D à 35°C.

2.3.1.3 Extrato aquoso com emprego de temperatura – Vapor

Para elaboração extrato bruto vapor (VA), 40,2g de amostra congelada foram colocados em panela de cozimento a vapor com 150ml de água destilada. Após 20 minutos de cocção, mais 50mL de água foram adicionados e se procedeu a cocção por mais dez minutos. O extrato foi filtrado a vácuo e concentrado por meio de evaporação do solvente extrator em estufa com circulação de ar Quimis® modelo 314D a 35°C.

2.3.1.4 Extrato etanólico com emprego de temperatura – Soxhlet

Para elaboração do extrato bruto Soxhlet (SOX), utilizou-se o aparelho de Soxhlet, sendo realizados dois processos de extração. No primeiro, 1000,6g de amostra congelada foram levadas ao extrator de Soxhlet adaptado com 2,5L de etanol 95%. Após extração por 5 horas, os frutos residuais foram triturados com 600mL de etanol para melhor extração. Na segunda, 1000,1g de frutos congelados foram triturados com aproximadamente 460mL de etanol e então levados ao extrator de Soxhlet com 4L de etanol por aproximadamente 6 horas. Os extratos foram reunidos e concentrados em rotaevaporador Janke & Kunkel® a 50°C. O extrato concentrado foi levado à secura em banho-maria marca B. Braun Biotech International®, modelo Thermomix a 50°C.

2.3.2 Elaboração das Frações

O extrato de Soxhlet foi submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, sendo eles hexano (Hex), clorofórmio (Clo) e acetato de etila (Act). Todas as partições ocorreram em aparelho de Soxhlet modificado. Para partição com hexano foi utilizado aproximadamente 1L de solvente e a partição ocorreu por 3 horas. Para partição com clorofórmio, utilizou-se cerca de 500mL de solvente por cerca de 1 hora e meia. Para partição com acetato de etila, utilizou-se cerca de 1L de solvente por cerca de 4h. A fração restante foi denominada fração remanescente (Rem). Todas as frações foram levadas a secura em banho-maria marca B. Braun Biotech International®, Modelo Thermomix a 50°C. O particionamento é uma fase importante da extração, visto que a partir dela é possível maior purificação dos extratos. Os solventes menos polares como hexano e clorofórmio são úteis para a extração de compostos lipofílicos como carotenoides, terpenos e lipídeos (SANTOS-BUELGA, 2012).

2.3.3 Determinação do Teor de Sólidos e pH

A determinação do teor de sólidos foi realizada com os quatro extratos brutos, em triplicata. A técnica consistiu em levar 1mL de extrato ou fração, em pesa filtro previamente padronizado, a secar em estufa Fanem® modelo 315SE à cerca de 100°C até peso constante. A diferença encontrada entre o peso final e o peso do pesa filtro corresponde ao teor de sólidos por mL de extrato. Para expressar os resultados, foi calculada a proporção de fruto por mL de extrato e, a partir deste resultado e do teor de sólidos por 1mL, aplicou-se a fórmula demonstrada na FIGURA 9.

$\% \text{ Teor de sólidos} = \frac{\text{TS} \times 100}{\text{TF}}$	Na qual, TS= teor de sólidos/mL de extrato TF= teor de fruto/mL de extrato
---	--

FIGURA 9 – FÓRMULA PARA CÁLCULO DE TEOR DE SÓLIDOS (%)
 FONTE: A autora (2013)

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows®.

O pH foi determinado em todos os extratos brutos, em triplicata, de acordo com o método 017/IV do Instituto Adolfo Lutz, 2010, no qual o pH foi aferido por meio de pHmetro marca Analyser®, modelo pH300 previamente calibrado.

2.4 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

Por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), quatro substâncias, entre elas, ácido clorogênico, rutina, quercetina e kaempferol, foram identificadas e quantificadas nos quatro extratos brutos e frações. Para isso, o sistema cromatográfico analítico utilizado foi um cromatógrafo Merck Hitachi LaChrom® composto de uma bomba quaternária L-7100, um injetor automático L-7250, um detector UV visível com varredura espectral L-7455 e um módulo de aquecimento de

colunas L-7300. O software Merck HSM[®], versão 4.1, foi usado no tratamento dos dados. A coluna utilizada foi a Lichrospher RP-18 (250mm x 4,6mm d.i.), com partículas de 5µm, Merck[®], mantida a 35°C.

A fase móvel foi composta de um gradiente de metanol (Solução A) e solução de ácido fórmico 0,3% (Solução B). A programação do gradiente da fase móvel foi otimizada conforme QUADRO 2 abaixo, utilizando-se como referencial o estudo de Song *et al.* (2009).

TEMPO	SOLUÇÃO A	SOLUÇÃO B
0 min	20 %	80 %
05 min	20 %	80 %
20 min	35 %	65 %
25 min	50 %	50 %
28 min	70 %	30 %
35 min	70 %	30 %
37 min	20 %	80 %
45 min	20 %	80 %

QUADRO 2 – PROGRAMAÇÃO DO GRADIENTE DA FASE MÓVEL
FONTE: A autora (2013)

Os padrões utilizados (ácido clorogênico, rutina, quercetina e kaempferol) eram da marca Sigma[®] e foram diluídos em metanol, sendo a concentração final de 31,6µg/mL de ácido clorogênico, 25,6µg/mL de rutina, 27,6µg/mL de quercetina e 23,4µg/mL de kaempferol. Os extratos brutos e frações foram diluídos em solução metanol:água (1:1) em concentração próxima de 10mg/mL.

O volume de injeção foi de 20µL, em duplicata, e o sistema de detecção utilizado foi UV visível com varredura espectral de 200 a 500nm, monitorado em 370nm. A vazão da fase móvel foi mantida constante por todo o tempo da análise a 1,0mL/min.

Cada composto foi identificado de acordo com os espectros e tempo de retenção de cada pico. A quantificação foi realizada de acordo com a área do pico e expressa em µg do composto / mg de extrato seco (ES). Para os extratos brutos, com a utilização do rendimento dos extratos, foi calculado o teor de compostos mg / g de fruto fresco (FF).

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows[®].

2.5 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

2.5.1 Cromatografia Líquida em Coluna

As frações Hexano e Acetato de Etila foram submetidas à coluna cromatográfica com fase estacionária Sílica Gel 60 Macherey-Nagel 0,063-0,2mm e fase móvel hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol. A pastilha foi preparada utilizando 10 partes de sílica em relação à amostra.

Para a fração hexanica, foi utilizado aproximadamente 5g de amostra e a sílica gel preparada foi depositada em coluna de vidro, seguida de papel filtro, pastilha e outro papel filtro para garantir a descida homogênea de solvente. A eluição iniciou com 100% de hexano, tendo acetato de etila como gradiente de polaridade, com variação de 5%. Ao atingir 100% de acetato de etila, iniciou-se novo gradiente de polaridade com acetato de etila e metanol, também com variação de 5%. Após atingir 100% de metanol, eluiu-se a coluna com 100% de etanol e finalmente 100% de água destilada. As frações obtidas foram recolhidas em frascos de vidro e levadas a secura a temperatura ambiente para cristalização dos compostos.

Para a fração acetato de etila seguiu-se o mesmo procedimento, utilizando aproximadamente 3g de amostra e alterando apenas a fase móvel. A eluição iniciou com 40% de hexano e 60% acetato de etila, com variação de 5% entre cada eluição. Ao atingir 100% de acetato de etila, procedeu-se com 90% acetato de etila e 10% de metanol, com variação de 10% até atingir 50% metanol. Realizou-se mais duas eluições, sendo elas metanol:água destilada (50:50) e 100% água destilada.

Para a fração remanescente, utilizou-se Coluna Cromatográfica Sephadex. Inicialmente, para a remoção de açúcares livres e outros compostos polares, 6g de fração remanescente foram diluídas em água e posteriormente acidificada a pH 2 com ácido clorídrico. A solução foi então filtrada, agitada em agitador magnético com Amberlite-XAD durante 6h e empacotada em coluna de vidro. A coluna foi eluída duas vezes com 100mL de solução ácida (pH 2), duas vezes com 100mL de água destilada e finalmente com 250mL de metanol absoluto (LIANDA; CASTRO, 2008; FERRERES *et al.*, 1994). A fração metanólica foi coletada, concentrada em rotaevaporador Janke & Kunkel® e levada a secura em banho-maria marca B. Braun Biotech International®,

modelo Thermomix a 50°C. Posteriormente, o extrato seco foi diluído em 5mL de metanol e colocado em coluna Sephadex. A eluição prosseguiu com 100mL de solução de metanol a 50% por duas vezes e 50mL de metanol absoluto. As frações foram coletadas em frascos de vidro e levadas a secura a temperatura ambiente.

2.5.2 Cromatografia de Camada Delgada Preparativa

A subfração 3 obtida da coluna Sephadex foi submetida a cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa utilizando como fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água destilada (8:1:1). A mesma placa foi eluída duas vezes e foi necessária a preparação de três placas cromatográficas. As faixas apresentadas foram raspadas e diluídas em metanol para posterior centrifugação a 14.000 rpm e separação da substância da sílica. O líquido coletado foi levado à secura em temperatura ambiente.

2.6 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

2.6.1 Ressonância Magnética Nuclear

Para identificação das substâncias isoladas da espécie *Morus nigra* L., inicialmente foi utilizado ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H . Utilizou-se espectrofotômetro Bruker ® modelo DPX 200, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de ^1H e ^{13}C a 200,13 e 50,62MHz, respectivamente. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm em relação ao sinal do TMS (tetrametilsilano – $(\text{CH}_3)_4\text{Si}$) como referência em δ 0 ppm.

A técnica de RMN é bastante empregada para a elucidação estruturas de substâncias isoladas de vegetais. É um método capaz de indicar a disposição do esqueleto hidrocarbônico (RIBEIRO; SOUZA, 2007).

2.6.1 Espectrometria de Massas

Para identificação do isolado IHex1, foi utilizada a infusão direta em espectrômetro de massas (DIMS). A análise foi conduzida em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo modelo API 3200 (Applied Biosystems) equipado com uma bomba seringa modelo Harvard 22 Dual (Harvard Apparatus) e uma fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). A fonte foi operada no modo negativo, mantendo a posição do capilar em 10 mm na vertical e 5mm na horizontal. A bomba seringa operou em velocidade de 10 μ L/min.

A solução-mãe do IHex1 foi preparada a uma concentração de 1mg/mL utilizando como solvente o álcool isopropílico. As soluções foram homogeneizadas em agitador Phoenix[®] por 1 minuto, submetidas ao banho de ultra-som por 30 minutos e, em seguida, filtradas com filtros contendo 0,22 μ m de diâmetro de poro (Millex-HV[®], PVDF Durapore, Millipore). As soluções então foram ajustadas para concentração de 500ng/mL, utilizando como solvente metanol. As amostras foram então submetidas aos experimentos de DIMS, sendo as análises realizadas em triplicata.

Os parâmetros ajustados manualmente no equipamento para estabilização do sinal foram: voltagem do capilar (IS): -4,5 kV, potencial de entrada no cone EP: 5 eV, potencial de desagrupamento (DP): -30 eV, gás de Interface (CUR): 10 psi, gás de nebulização (GS1): 20 psi e temperatura: 200^o C. O nitrogênio de alta pureza utilizado como CUR e GS1 foi produzido por um gerador de nitrogênio (*Peak Scientific Instruments*). Os espectros de massas foram adquiridos em varredura de 380 a 450 Daltons (Da) acumulando 90 ciclos de 2 segundos (3 minutos). A aquisição dos dados foi realizada utilizando o programa Analyst 1.4 (ABI/Sciex).

3 RESULTADOS

3.1 ENSAIO SISTEMÁTICO

Como pode ser observado na TABELA 3, as leucoantocianidinas, os derivados flavônicos e os esteroides e triterpenos estão presentes em todas as frações do extrato alcoólico. Já as cumarinas, estão presentes apenas na fração diclorometano. A presença de alcaloides, flavononóis e antraquinonas não foi identificada em nenhuma fração.

TABELA 3 – PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES NAS FRAÇÕES DO EXTRATO ALCOÓLICO DA *Morus nigra* L.

ENSAIOS	FRAÇÕES			
	HEXANO	DICLOROMETANO	ACETATO DE ETILA	REMANESCENTE
Alcaloides:				
Mayer	-	-	-	-
Dragendorff	-	-	-	-
Bouchardat	-	-	-	-
Leucoantocianidinas	+	+	++	+++
Flavonoides:				
Heterosídeos Flavônicos (Derivados Antociânicos)	+	++	++	++
Teste do Oxálico Bórico	-	-	-	-
Ensaio de Pacheco	+	+	-	-
Ensaio de Zn em HCl	+	++	+++	+++
Cumarinas	-	+	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteróides e Triterpenos	+	+	++	+
	(amarelo)	(amarelo)	(amarelo)	(amarelo)

FONTE: A autora (2013)

Nota: (+) reação levemente positiva; (++) reação moderadamente positiva; (+++) reação fortemente positiva; (-) reação negativa.

Os alcaloides estão conhecidamente presentes nas folhas de *Morus nigra*, sendo o principal o 1-deoxinojirimicina, composto relacionado à redução dos níveis de glicemia (SONG *et al.*, 2009). Quanto aos frutos, Imran *et al.* (2010), ao analisar amoras cultivadas no Paquistão, verificaram presença de alcaloides nos frutos analisados, em concentração de 630mg/100g de peso fresco, resultado este diferente do obtido no presente estudo.

Padilha *et al.* (2010) ao realizar *fingerprint* via CLAE de extrato bruto de folhas da *Morus nigra* cultivadas no Brasil, observaram presença de esteroides e triterpenos e ausência de alcaloides, estando, portanto em concordância com o encontrado nos frutos do presente trabalho. Chu *et al.* (2006), ao avaliar frutos da *Morus alba*, verificaram presença de cumarinas e flavonoides nos extratos analisados.

No extrato aquoso, verifica-se reação positiva para heterosídeos antocianicos e saponinicos tanto em meio ácido, quanto neutro, quanto básico. Aminogrupos foram encontrados na amostra, assim como taninos condensáveis. Para taninos hidrolisáveis, heterosídeos cianogenéticos, ácidos fixos e ácidos voláteis a reação foi negativa, conforme pode ser verificado na TABELA 4 a seguir.

TABELA 4 – PRINCIPAIS GRUPOS QUÍMICOS PRESENTES NO EXTRATO AQUOSO DA *Morus nigra* L.

ENSAIOS	EXTRATO AQUOSO
Heterosídeos Antocianicos	
Meio ácido	+
Meio neutro	+
Meio básico	+
Heterosídeos Saponínicos	
Meio ácido	+
Meio neutro	+
Meio básico	+
Heterosídeos Cianogenéticos	-
Taninos	
Ensaio FeCl ₃	+
Ensaio Gelatina	-
Aminogrupo	+
Ácidos Fixos	-
Ácidos Voláteis	-

FONTE: A autora (2013)

Nota: (+) reação positiva; (-) reação negativa.

A presença de antocianinas é relatada por diversos autores, visto que este é o pigmento responsável pela coloração de frutos da *Morus nigra* L. (BAE; SUH, 2007; PÉREZ-GREGORIO, 2011; HASSIMOTTO *et al.*, 2007; SIVACI; SÖKMEN, 2004).

Padilha *et al.* (2010), ao avaliar folhas de *Morus nigra* L. não observaram presença de saponinas pelo método de formação de espuma ou taninos pelo método do FeCl₃, resultados estes diferentes dos apresentados no presente estudo.

3.2 CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS

A TABELA 5 traz as características de quantidade de fruto utilizados, volume final, teor de sólidos e pH dos extratos brutos elaborados. Como se pode observar, o extrato a vapor foi o que apresentou menor rendimento, diferindo dos demais extratos. Quanto ao pH, os extratos aquosos apresentam-se mais ácidos que os extratos etanólicos.

Sultana *et al.* (2009), ao comparar extração por agitação e por refluxo, verificaram que os extratos elaborados por refluxo, independente do solvente utilizado, apresentaram maior rendimento. Os autores atribuíram o maior rendimento à temperatura empregada no processo de extração, sendo este resultado, diferente do encontrado no presente trabalho, visto que tanto o extrato obtido por Soxhlet, quanto por agitação mecânica, apresentaram o mesmo rendimento. Quanto ao solvente empregado, Arabshahi-Delouee e Urooj (2007), ao avaliar o rendimento de extratos aquosos e metanólicos de folhas da *Morus indica L.*, verificaram menor rendimento nos extratos aquosos. De fato, um extrato aquoso demonstrou menor rendimento no presente estudo, contudo apenas o elaborado pelo método a vapor, sendo o menor rendimento mais associado ao método extrativo do que ao solvente.

TABELA 5 – CARACTERÍSTICAS DOS EXTRATOS BRUTOS

EXTRATO	QUANTIDADE DE FRUTO FRESCO (g)	VOLUME FINAL DO EXTRATO (mL)	TEOR DE SÓLIDOS (%)	pH
TE	40,29	230	9,99 ^a	5,53
TA	40,38	290	9,91 ^a	4,16
VA	40,24	84	4,22 ^b	3,79
SOX	1000,65	2815	8,42 ^a	5,27

FONTE: A autora (2013)

Nota₁: TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor; SOX: extrato bruto de soxhlet.

Nota₂: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

A partir do extrato bruto de Soxhlet, foi realizado o fracionamento com solventes de polaridade crescente, obtendo-se os seguintes rendimentos: 5,0g da fração hexano, 700mg da fração clorofórmio, 3,4g da fração acetato de etila e 165g da fração remanescente.

3.3 IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS VIA CLAE

A FIGURA 10 a seguir traz o cromatograma e espectros dos padrões Ácido Clorogênico, Rutina, Quercetina e Kaempferol utilizados para as análises.

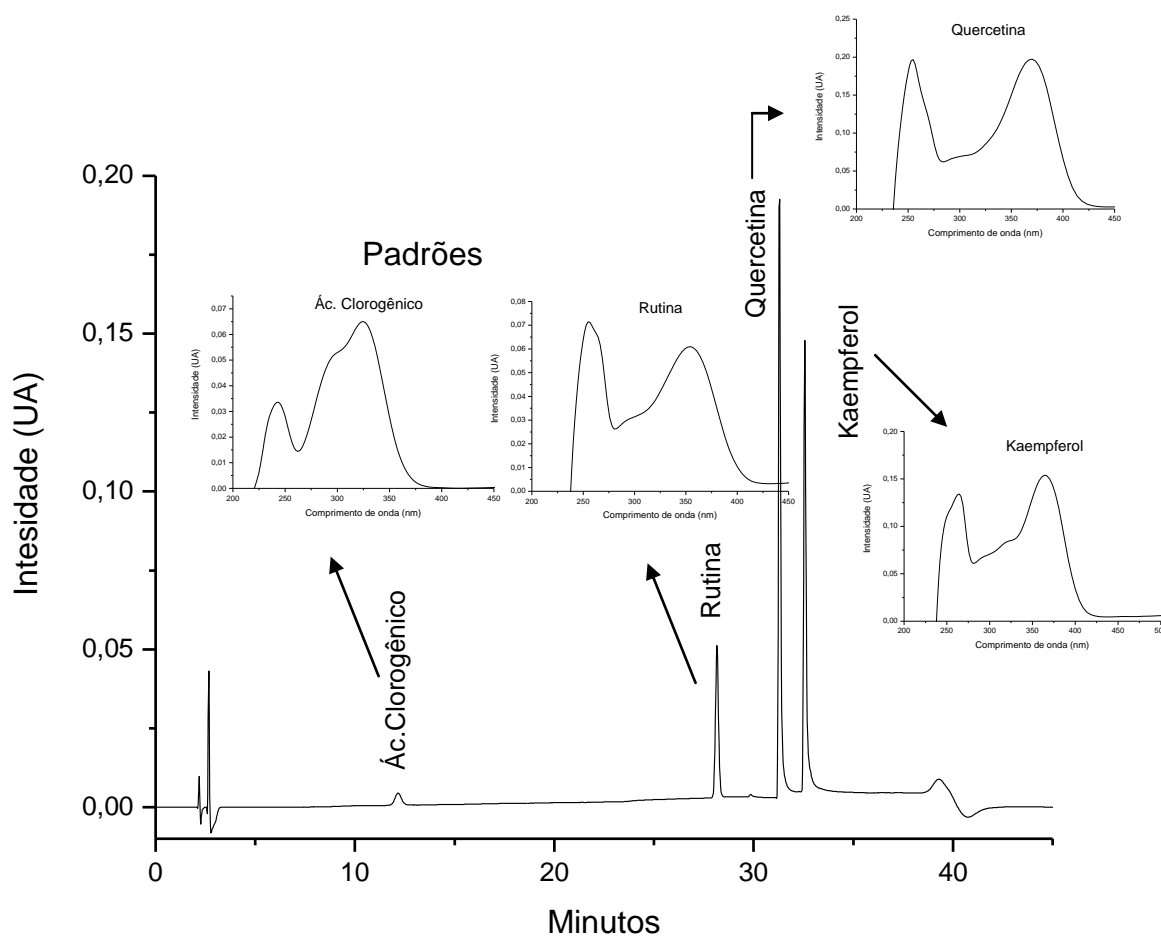


FIGURA 10 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS PADRÕES OBTIDOS A 370nm
 FONTE: A autora (2013)

Os perfis cromatográficos obtidos a 370nm dos extratos brutos e frações podem ser observados nas FIGURAS 11, 12, 13 e 14 a seguir.

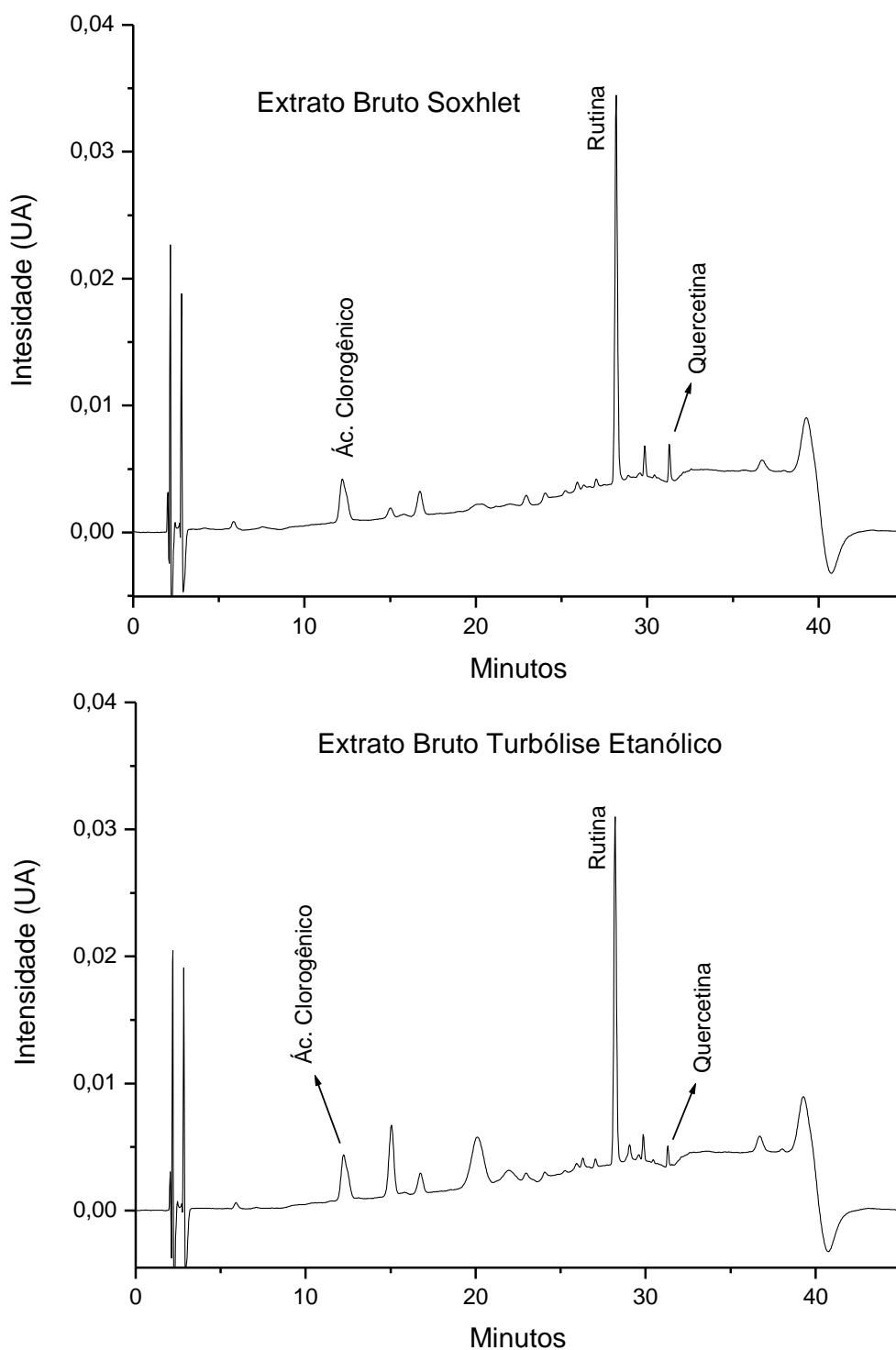


FIGURA 11 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS ETANÓLICOS OBTIDOS A 370nm
FONTE: A autora (2013)

Como pode ser observado, os cromatogramas dos extratos etanólicos são bastante similares, apresentando a rutina como composto principal. Os picos de ácido clorogênico são bastante similares, enquanto que o da quercetina é menor no extrato turbólise etanólico.

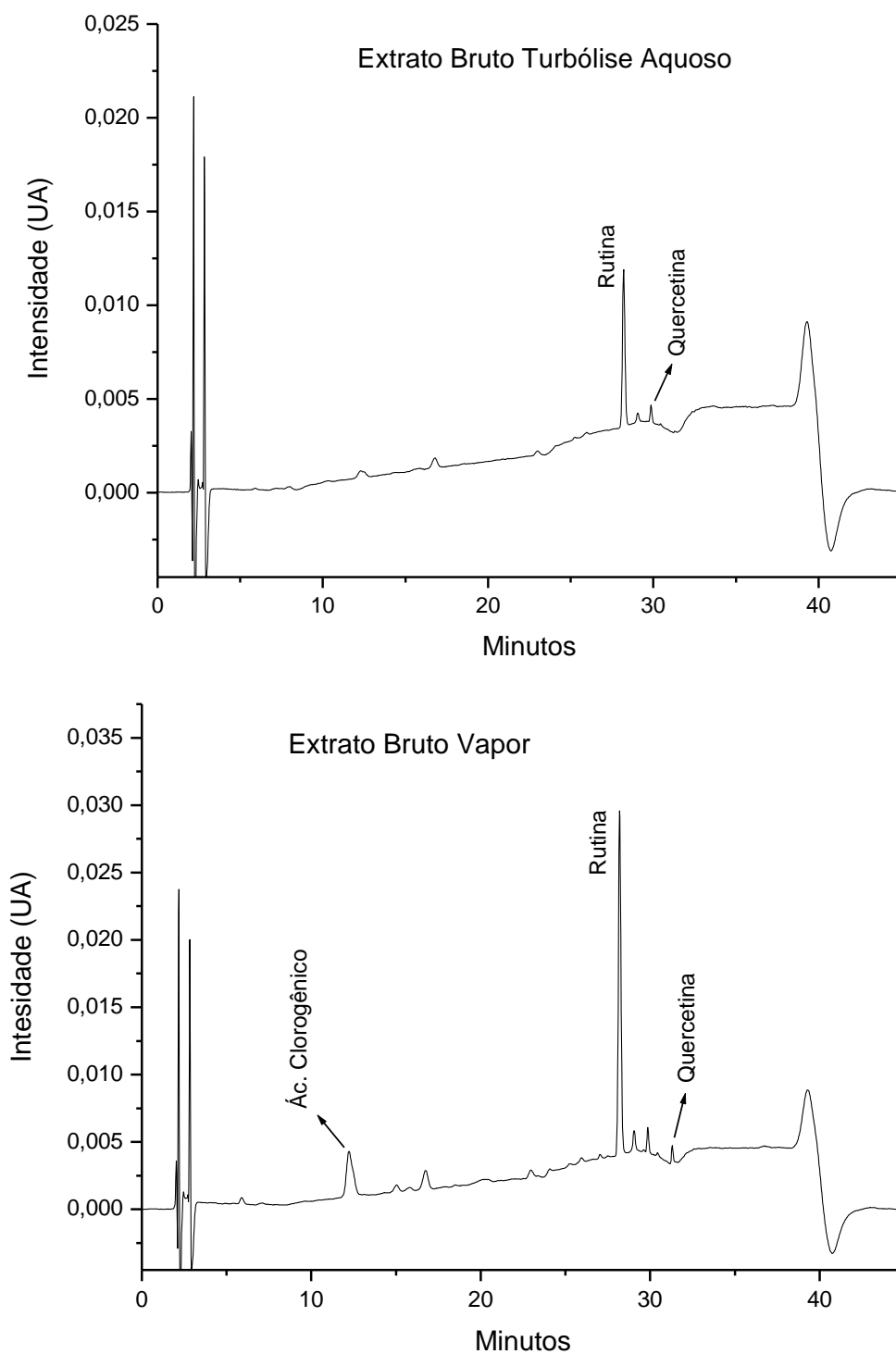


FIGURA 12 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS BRUTOS AQUOSOS OBTIDOS A 370nm
FONTE: A autora (2013)

Quanto aos extratos aquosos, verifica-se que o extrato turbólise aquoso apresenta menor concentração dos compostos, não apresentando ácido clorogênico e apresentando picos muito menores de rutina e quercetina.

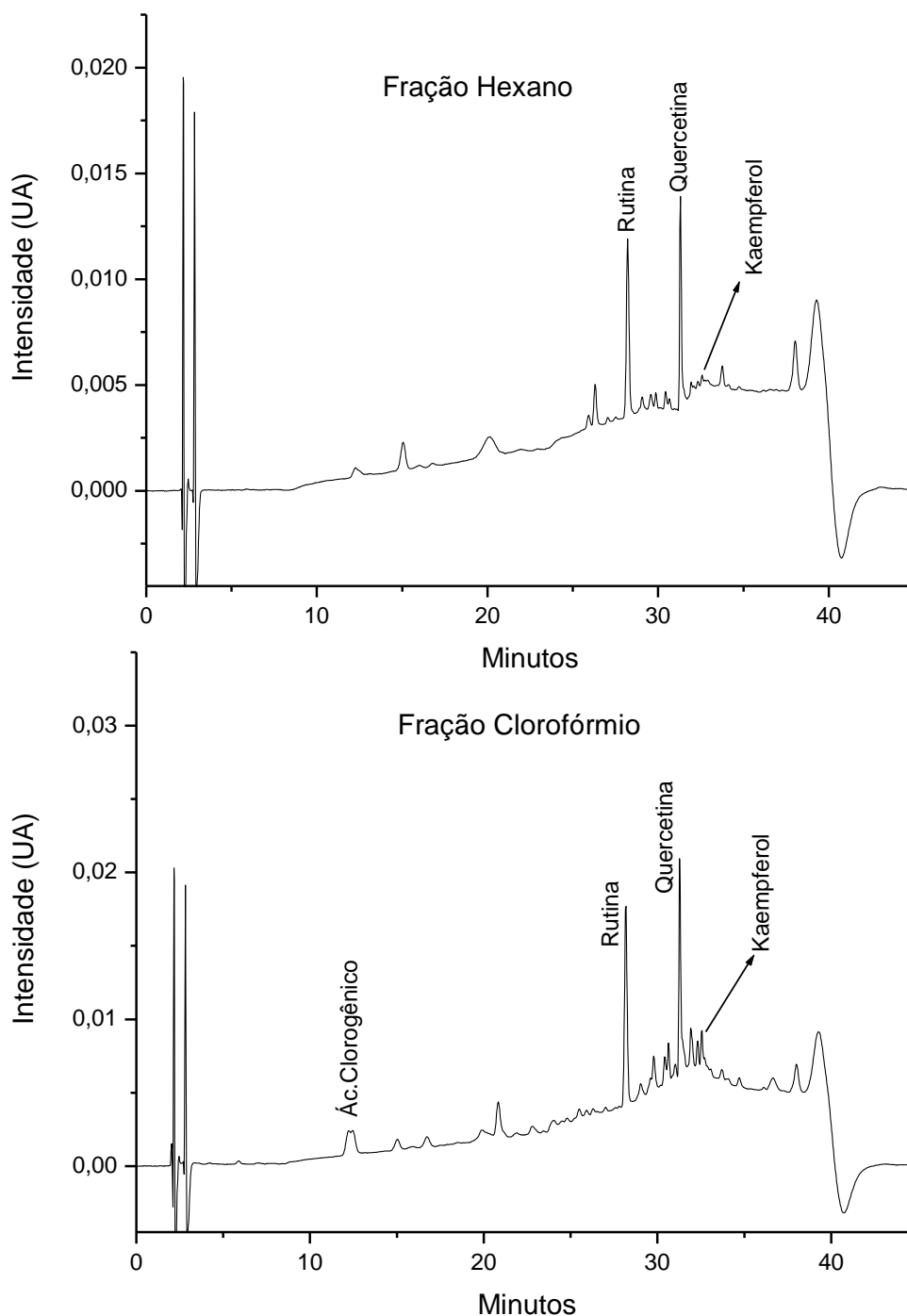


FIGURA 13 - PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES HEXANO E CLOROFÓRMIO OBTIDOS A 370nm
FONTE: A autora (2013)

Entre as frações mais apolares, observa-se uma gama maior de picos no cromatograma, sendo o da quercetina o maior pico, seguido pela rutina. A fração hexano não apresentou ácido clorogênico e ambas apresentaram um pequeno pico de kaempferol. A presença destes compostos nestas frações pode ter ocorrido porque no processo de fracionamento uma parte hidroalcoólica permanece nestas frações.

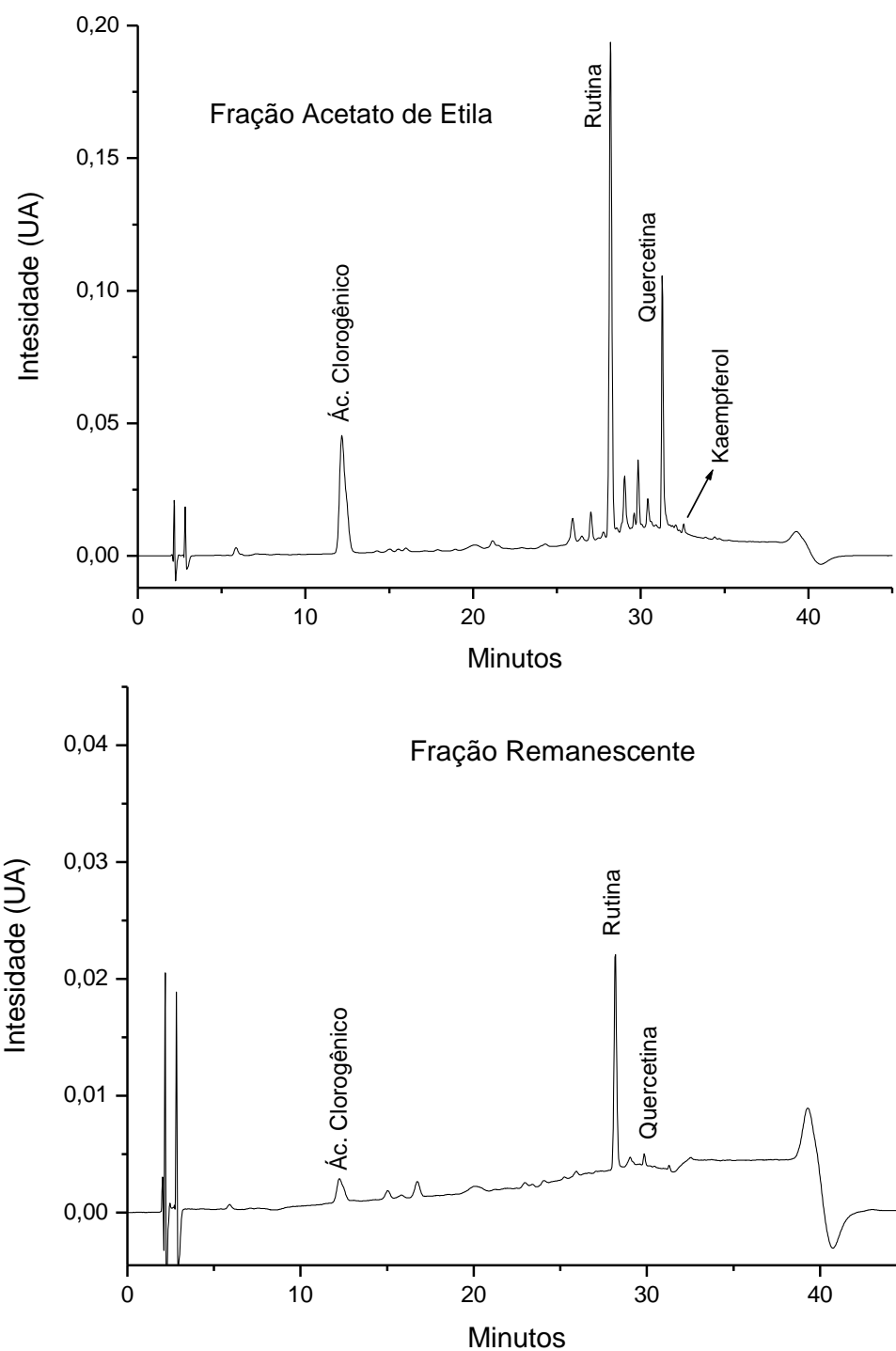


FIGURA 14 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DAS FRAÇÕES ACETATO DE ETILA E REMANESCENTE OBTIDOS A 370nm

FONTE: A autora (2013)

Entre as frações mais polares, o teor de rutina é superior ao de quercetina. Isso pode ser explicado pelo fato de que a rutina é um composto mais polar que a quercetina (THABTI *et al.*, 2012). Verifica-se que a fração acetato foi bastante eficaz

na extração dos compostos fenólicos, visto que a fração remanescente apresenta picos muito menores destes compostos.

Em suma, a partir dos compostos padrões, evidenciou-se a presença dos flavonoides rutina e quercetina em todas as frações. O ácido clorogênico não foi identificado a 370nm apenas no extrato bruto turbólise aquoso e na fração hexano. O kaempferol foi verificado a 370nm apenas nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano.

Pérez-Gregorio *et al.* (2011), ao analisar extratos de frutos da *Morus nigra*, cultivadas na Espanha, via CLAE, evidenciaram presença de quercetina, rutina e isoquercetina. Thabti *et al.* (2012), ao analisar extratos de folhas de *Morus alba* e *Morus rubra* elaborados com água e metanol (1:1), também evidenciaram a presença de quercetina, rutina e kaempferol, além de isômeros de ácido clorogênico. Segundo Zadernowski *et al.* (2005), ácidos hidroxicinâmicos, grupo do qual o ácido clorogênico faz parte, representam 85,8% do total de compostos fenólicos presentes em frutos da *Morus nigra*.

Quanto à quantificação, a TABELA 6 a seguir mostra o teor de ácido clorogênico, rutina, quercetina e kaempferol nos extratos brutos e frações.

TABELA 6 – TEOR DOS COMPOSTOS PADRÕES ANALISADOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

EXTRATO/ FRAÇÃO	ÁCIDO CLOGÊNICO (µg/mgES)	RUTINA (µg/mgES)	QUERCETINA (µg/mgES)	KAEMPFEROL (µg/mgES)	TOTAL (µg/mgES)
SOX	3,3474 ^a	1,5620 ^a	0,0386 ^a	-	4,948 ^a
TE	3,7549 ^a	1,4611 ^a	0,0213 ^{ab}	-	5,237 ^a
TA	-	0,4371 ^b	0,0131 ^b	-	0,450 ^b
VA	3,2677 ^a	1,3395 ^{ac}	0,0169 ^b	-	4,624 ^a
Hex	-	0,4409 ^b	0,1418 ^c	0,0423 ^a	0,624 ^b
Clo	2,0640 ^b	0,8984 ^d	0,2254 ^d	0,0469 ^b	3,234 ^c
Act	42,6349 ^c	10,4335 ^e	1,3946 ^e	0,0607 ^c	54,523 ^d
Rem	2,2023 ^b	1,0323 ^{cd}	0,0173 ^b	-	3,252 ^c

FONTE: A autora (2013)

Nota₁: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor; Hex: fração hexano, Clo: fração clorofórmio; Act: fração Acetato de Etila; Rem: fração remanescente.

Nota₂: Resultados expressos em µg do composto por mg de extrato seco.

Nota₃: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Verifica-se que entre os extratos brutos, o turbólise aquoso foi o que apresentou as menores concentrações das substâncias no total, enquanto que os demais extratos apresentam-se estatisticamente iguais. Quando estes valores são associados ao rendimento dos extratos, os etanólicos se mostram mais eficientes, já

que o rendimento do extrato a vapor foi baixo (4,22%). Como pode ser observado na Tabela 6, dentre as frações, a acetato de etila apresenta os valores mais expressivos, já que foi a fração mais eficiente na extração destes compostos devido às características do solvente. O acetato de etila, por ser um solvente menos polar, é mais apropriado para extração de formas agliconas de flavonoides (SANTOS-BUELGA, 2012).

A seleção adequada de solventes é essencial para otimizar o processo extrativo, visto que, fenólicos livres são solúveis em água ou misturas de solventes orgânicos com água (THABTI *et al.*, 2012). Os solventes utilizados com maior frequência para extração de compostos fenólicos são metanol, etanol, acetona e acetato de etila, assim como misturas destes solventes com água (SANTOS-BUELGA, 2012).

Quando analisadas as substâncias separadamente, verifica-se que, entre os extratos brutos, não há diferença significativa nos teores de ácido clorogênico. A fração acetato de etila apresenta os maiores teores, com uma concentração cerca de 13 vezes maior deste composto quando comparada aos demais extratos e frações. Quanto à rutina, flavonoide predominante em maior parte das amostras analisadas, observa-se que o extrato turbólise aquoso apresentou os menores valores, diferindo significativamente dos demais e apresentando concentração 24 vezes menor que a fração acetato de etila, a mais rica em rutina. A quercetina, outro flavonoide presente nas amoras analisadas, apresenta-se mais concentrada na fração acetato e em menor concentração nos extratos brutos aquosos e na fração remanescente. Finalmente, quanto ao kaempferol, as três frações que apresentaram este composto diferem significativamente entre si.

O ácido clorogênico, um éster obtido dos ácidos cafeico e quinico e um dos principais polifenóis da dieta, já foi descrito como o composto fenólico predominante em frutos da *Morus nigra*. Este metabólito secundário parece demonstrar poder de inibição da hidrólise da enzima glucose-6-fosfato, agindo desta forma na redução da glicogenólise e redução da absorção de glucose livre (THABTI *et al.*, 2012). Além disso, também apresenta efeito limitador da oxidação de moléculas do LDL, efeito anticancer e antimutagênico (GUNDOGDU *et al.*, 2011; MARTIN, *et al.*, 2013). Assim como os demais compostos fenólicos, a concentração deste composto em plantas varia de acordo com as condições de estresse durante o cultivo (PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011).

A quercetina é o principal flavonoide encontrado em frutas e conseqüentemente o mais consumido na dieta humana (CELLI *et al.*, 2011). Segundo Knekt *et al.* (2002), o consumo de quercetina está associado à redução do risco de isquemia cardiovascular e ao menor risco de câncer, principalmente garganta e mama.

Song *et al.* (2009) verificaram teor de rutina variando entre 0,045 a 1,957mg/g em frutos liofilizados de *Morus nigra*, resultados estes similares aos encontrados no presente estudo. A rutina é uma forma glicosilada da quercetina (quercetina-3-rutinosídeo), sendo, juntamente com a quercetina, os flavonoides mais consumidos. É um flavonoide com diversas atividades biológicas entre elas antitumoral, antimutagênica e antiinflamatória, além de parecer ter efeito antihiperlipidêmico (KAMALAKKANNAN; PRINCE, 2006).

O consumo de kaempferol, outro flavonoide encontrado nesta planta, já foi associado a redução do risco de isquemia cardiovascular e redução do risco de morte ou hospitalização por doenças cerebrais (KNEKT *et al.*, 2002). Além disso, este flavonoide demonstrou proteção hepática contra danos oxidativos provocados pelo álcool ou ácidos graxos polinsaturados (SHAKYA *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem do encontrado por Arfan *et al.* (2012). Estes autores, em análise via CLAE a 320 e 360nm de extratos metanólicos e acetônicos de *Morus nigra*, verificaram seis picos principais, sendo dois identificados como ácido clorogênico (21,3 e 23,3 µg/mg) e rutina (39,7 e 43,0 µg/mg), portanto em quantidades muito superiores do obtido pelo presente estudo.

Radojkovic *et al.* (2012), ao analisar frutos da *Morus nigra* cultivados na Sérvia e extraídos com solução etanol:água:ácido acético verificaram teor de 0,2 µg/mg de ácido clorogênico, 0,73 µg/mg de rutina e 0,13 µg/mg de quercetina por análise via CLAE. Estes resultados também não estão de acordo com este trabalho, visto que, no presente estudo, o ácido clorogênico foi o composto fenólico predominante, seguido pela rutina e finalmente pela quercetina. É importante observar que Radojkovic e colaboradores não especificaram o comprimento de onda utilizado na análise. Pawlowska *et al.* (2008), ao avaliar extratos metanólicos de amoras cultivadas na Itália via CLAE a 324nm, verificaram teor de kaempferol de 0,15µg/mg de peso seco e teor de quercetina de 3,63µg/mg de peso seco, resultados estes também superiores aos encontrados no presente estudo.

Chu *et al.* (2006), ao analisar extratos etanólico/aquosos de frutos da *Morus alba*, verificaram presença de rutina (0,29µg/mg), ácido clorogênico (0,23µg/mg), kaempferol (0,006µg/mg) e quercetina (0,015 µg/mg), em quantidades inferiores ao obtido com as amoras do presente estudo, contudo, utilizando o método de detecção amperométrica no sistema de eletroforese capilar.

A partir dos dados de rendimento dos extratos brutos, é possível calcular o teor de cada composto identificado por g de frutos frescos. Estes valores são apresentados na TABELA 7.

TABELA 7 - TEOR DOS COMPOSTOS PADRÕES ANALISADOS NOS EXTRATOS BRUTOS

EXTRATO/ FRAÇÃO	ÁCIDO CLOROGÊNICO (µg/mg FF)	RUTINA (µg/mg FF)	QUERCETINA (µg/mg FF)	TOTAL (µg/mg FF)
SOX	0,281	0,131	0,003	0,416
TE	0,375	0,146	0,002	0,524
TA	0	0,043	0,001	0,045
VA	0,040	0,016	0	0,056

FONTE: A autora (2013)

Nota₁: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor;

Nota₂: Resultados expressos em µg do composto por mg de fruto fresco.

Estes resultados confirmam que os extratos etanólicos são os mais eficazes na extração de compostos fenólicos, já que, utilizando a mesma quantidade de fruto, o teor destes compostos nos extratos etanólicos é aproximadamente dez vezes maior que nos extratos aquosos. Entre os extratos etanólicos, quando os métodos extrativos são comparados, é possível observar que o método que emprega a agitação mecânica é mais eficaz que a extração via Soxhlet. Esses resultados estão em concordância com o observado por Sultana *et al.* (2009), que, ao avaliar o poder extrativo de compostos fenólicos de diferentes plantas medicinais pelo método de agitação mecânica ou refluxo, verificaram que a extração por agitação em mecânica foi mais eficiente para extração destes compostos. Os autores atribuem essa diferença pela decomposição de alguns compostos devido à temperatura empregada durante o refluxo (SULTANA *et al.*, 2009).

Ao avaliar o teor de flavonoides em frutos cultivados no Brasil, Hoffmann-Ribani *et al.* (2009) verificaram que acerolas apresentavam teor de quercetina variando entre 2,3 a 8,6mg/100g de peso fresco, maçãs de 2,8 a 8,6mg/100g de peso fresco, figo de 0,8 a 1,9mg/100g, guava de 0,8 a 1,3mg/100g, pitanga de 5,1 a 7,3mg/100g e morangos de 0,7 a 1,4mg/100g. O kaempferol foi encontrado apenas

na acerola, com teores variando de 0,6 a 1,6mg/100g, pitanga (0,3 a 0,6mg/100g) e morango (0,6 a 1,3mg/100g). Os autores verificaram que o teor destes compostos foi bastante reduzido durante o processamento, tanto para polpas, quanto para sucos.

Gundogdu *et al.* (2011), ao analisar frutos da *Morus nigra* via CLAE, verificou que o composto fenólico predominante era o ácido clorogênico (3,106mg/g de peso fresco) seguido pela rutina (1,423mg/g de peso fresco). O teor de quercetina encontrado por estes autores foi de 0,113mg/g de peso fresco.

3.4 ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS

A partir da coluna cromatográfica realizada com a fração hexano, foram obtidas 283 subfrações, das quais, após agrupamento, três foram inicialmente selecionadas para a possível identificação via RMN, sendo elas subfração 10 a 12, subfração 15 e 16 e subfração 162, conforme pode ser observado na FIGURA 15 a seguir. Destas, devido a características de cristalização, peso e solubilidade, apenas a subfração 10 a 12 (IHex1) foi encaminhada para identificação via RMN. O IHex1 apresentou 39,4mg, sendo caracterizado por um precipitado amarelo presente nas subfrações 10 a 12.

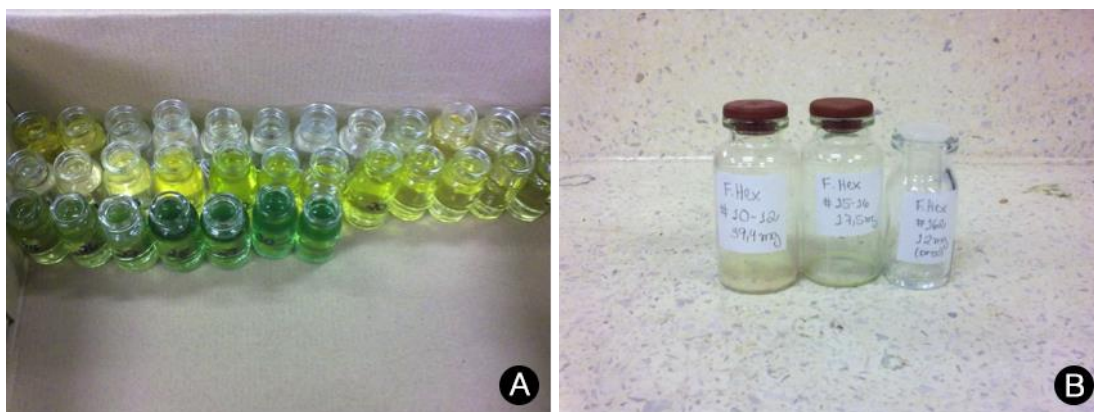


FIGURA 15 – SUBFRAÇÕES (A) E ISOLADOS DA FRAÇÃO HEXANO (B)
FONTE: A autora (2013)

Da coluna cromatográfica da fração acetato de etila foram obtidas 147 subfrações, das quais, nenhuma apresentou quantidade suficiente para possível identificação.

Da coluna Sephadex da fração remanescente, foram obtidas 23 subfrações, sendo a subfração número três selecionada para a cromatografia de camada delgada preparativa, sendo que desta, três compostos foram isolados, como pode ser observado na FIGURA 16. Entretanto, não foi possível a identificação via RMN pela quantidade insuficiente de substância isolada ou pela não solubilização do composto em solventes disponíveis no laboratório.

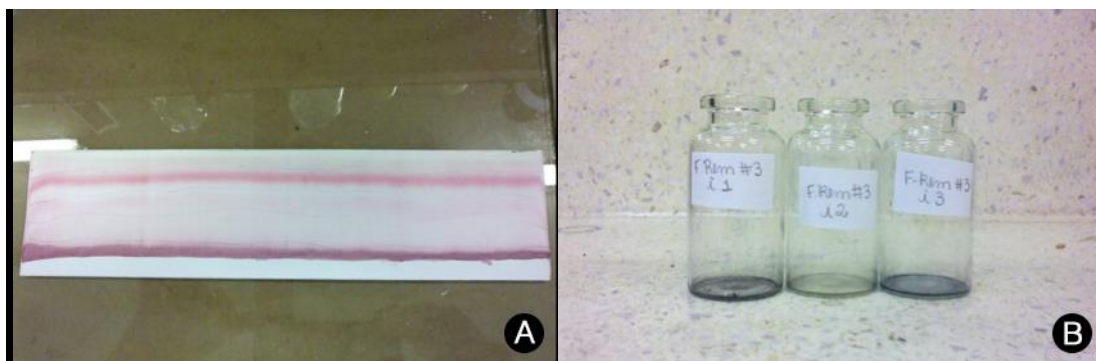
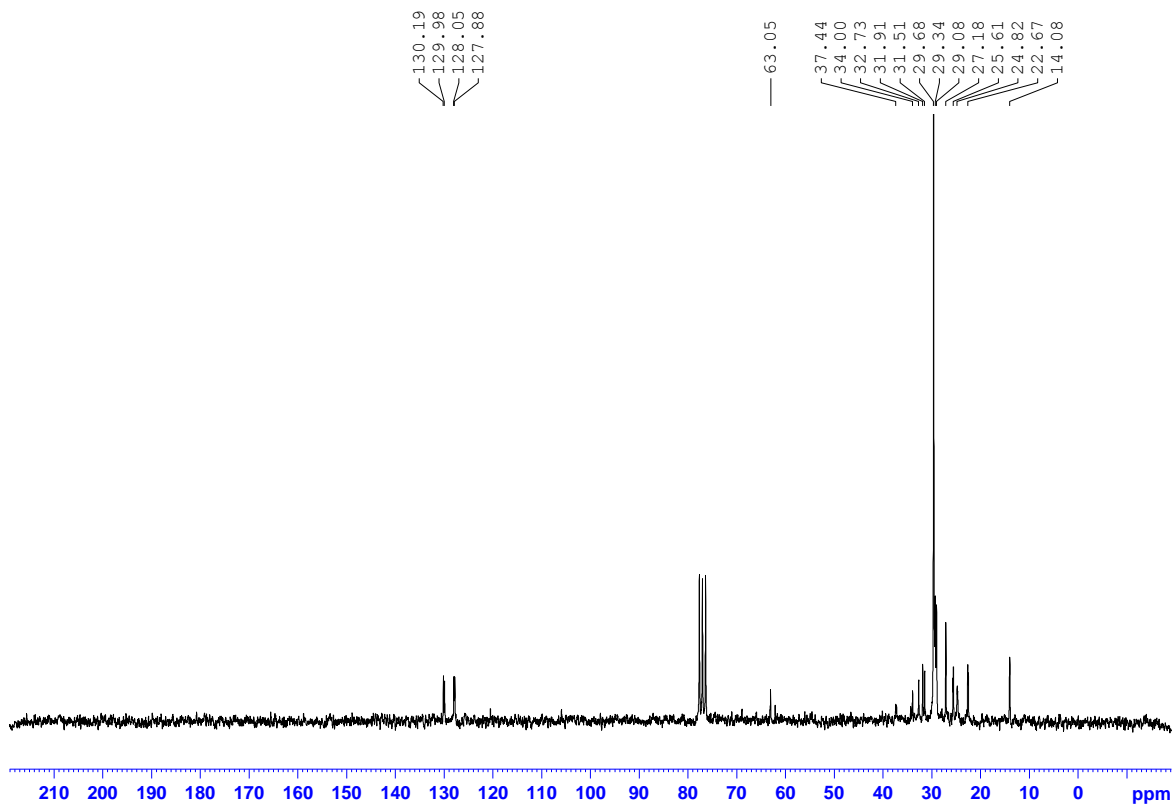


FIGURA 16 – CCD PREPARATIVA (A) E ISOLADOS OBTIDOS DA FRAÇÃO REMANESCENTE (B)
FONTE: A autora (2013)

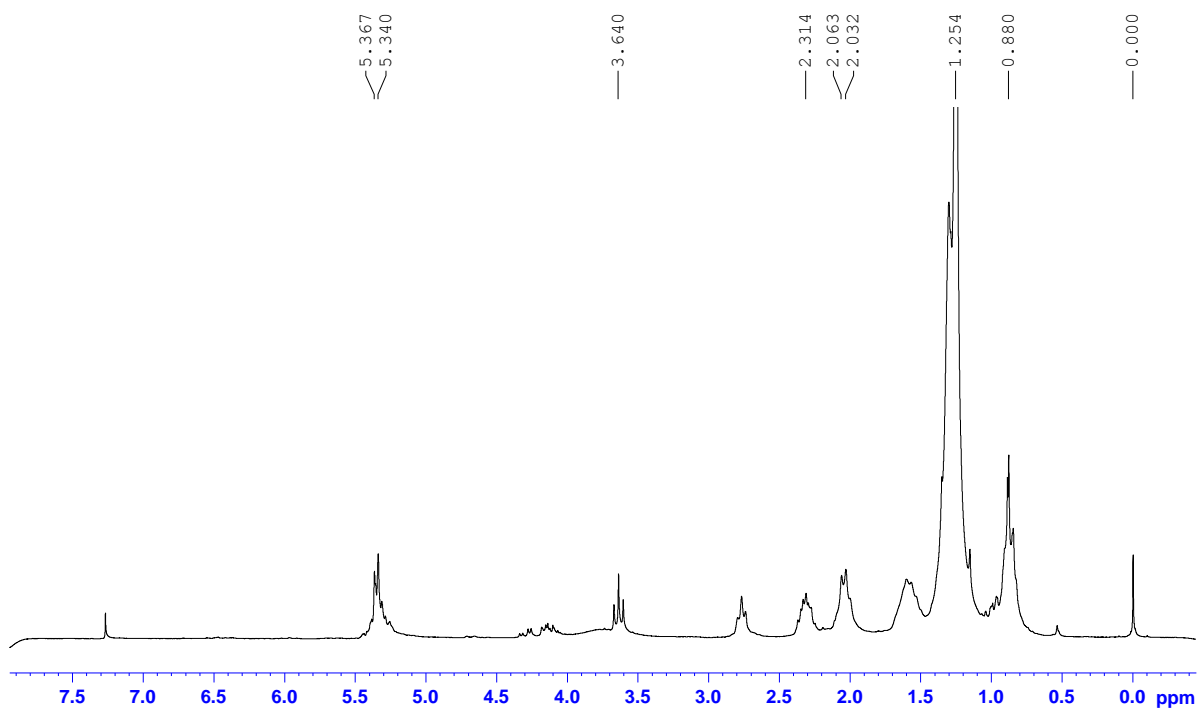
3.5 IDENTIFICAÇÃO DE IHex1

O espectro de RMN de ^{13}C para IHex1 foi obtido a 52,62MHz (FIGURA 17). Este espectro não permite confirmar o número exato de carbonos presentes na cadeia, sendo apenas três deles (C_1 , C_2 e C_6) melhor definidos. A presença do grupamento CH_2 (C_1), o qual é ligado a hidroxila na extremidade da cadeia carbônica, é confirmada pelo deslocamento químico δ 63.041, enquanto que a presença de duas duplas ligações são confirmadas pelos deslocamentos δ 130.187; 129.976 e δ 128.040 e 127.874. Possivelmente, as insaturações encontram-se no carbono 2 e 6, respectivamente.

O espectro de RMN de ^1H para o IHex1 foi obtido a 200,13MHz (FIGURA 18), registrando deslocamentos entre 0,8 e 5,4ppm. O sinal δ 0,88ppm apresenta-se como um tripleto com constantes de acoplamento ($J= 6,3\text{Hz}$. $13,02\text{Hz}$), enquanto que o sinal δ 3,64ppm apresenta-se como outro tripleto com constantes de acoplamento ($J= 6,3\text{Hz}$. $13,07\text{Hz}$). Os demais sinais de deslocamento podem ser observados na FIGURA 18 e TABELA 8.



FIRURA 17 – ESPECTRO RMN ^{13}C DE IHEX1
FONTE: A autora (2013)



FIRURA 18 – ESPECTRO RMN ^1H DE IHEX1
FONTE: A autora (2013)

A partir dos dados de RMN de C^{13} e 1H , propôs-se para este isolado a estrutura de um álcool graxo de cadeia insaturada. Por não ser possível identificar esta substância pela literatura, comparou-se os sinais de ^{13}C e 1H com um álcool graxo de cadeia saturada, o *n*-octacosanol. A TABELA 8 mostra a comparação dos valores dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e 1H para a substância IHex1 com aqueles encontrados na literatura para *n*-octacosanol por Volken (1999).

TABELA 8 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE RMN DE ^{13}C E 1H DA SUBSTANCIA IHEX1 COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA *n*-OCTACOSANOL

POSIÇÃO	RMN DE ^{13}C	RMN DE ^{13}C LITERATURA*	RMN 1H	RMN 1H LITERATURA
1	63,05	63,11	3,64 (t; 6.3, 13.07)	3,65 (t; 6.5, 13.3)
2	130,19	-	5,34 (m)	-
3	128,05	-	5,37 (m)	-
4	31,50	-	2,06 (m)	-
5	31,90	-	2,00 (m)	-
6	127,87	-	5,34 (m)	-
7	129,97	-	5,34 (m)	-
8	32,72	-	2,03 (m)	-
9	29,41	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
10	29,07	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
11	29,41	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
12	29,33	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
13 a 24	29,67	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
25	29,41	29,71	1,25 (m)	1,27 (m)
26	31,90	31,92	1,25 (m)	1,27 (m)
27	22,66	22,68	1,25 (m)	1,27 (m)
28	14,07	14,10	0,88 (t; 6.3, 13.02)	0,89 (t; 6.4, 13.3)

FONTE: A autora (2013); *VOLKEN (1999)

O composto *n*-octacosanol, utilizado como base para proposição da estrutura em questão, já foi identificado em raízes de *Ficus religiosa*, outra espécie da família Moraceae, (CHANDRASEKAR *et al.*, 2010), contudo não foram encontrados outros estudos relatando a presença deste composto em frutos de *Morus nigra* L. Diversos estudos já demonstraram atividades biológicas do *n*-octacosanol, sendo a mais vastamente estudada, a ação de redução dos níveis de colesterol (ARRUZAZABALA *et al.*, 1994; CASTAÑO *et al.*; 2001; LIN *et al.*, 2004) Outras atividades biológicas como ação antiinflamatória e atividade antiangiogênica de tumores também já foram observadas (OLIVEIRA *et al.*, 2012; THIPPESWAMY *et al.*, 2008).

A fim de confirmar a estrutura química do composto isolado, foi realizada a espectrometria de massas com infusão direta. Como pode ser observado na FIGURA 19, os espectros de massas demonstram pico base em 403,2Da, sendo este

demonstrado também na FIGURA 20. Verifica-se ainda a presença de outros picos no espectro, demonstrando que pode haver a mistura de substâncias no IHex1. O pico base do EM se demonstra compatível com uma estrutura química de 28 carbonos. Oliaro-Bosso *et al.* (2009), ao realizar a EM de octacosina-10,19-dien-1-ol, álcool graxo de 28 carbonos com cadeia insaturada, composto sintético análogo ao octacosanol, verificou pico base de 407,4Da, similar ao encontrado no presente trabalho (OLIARO-BOSSO *et al.*, 2009).

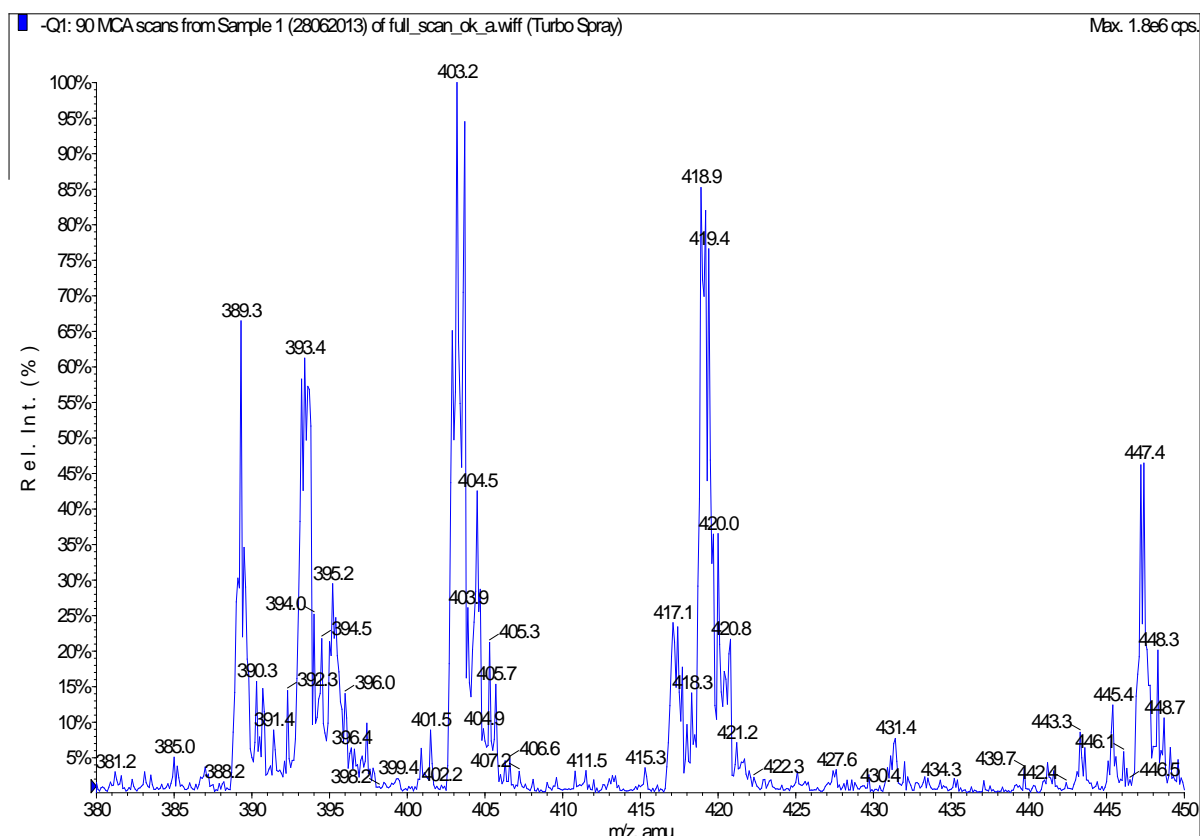


FIGURA 19 – ESPECTRO DE MASSAS DE IHEX1
 FONTE: A autora (2013)

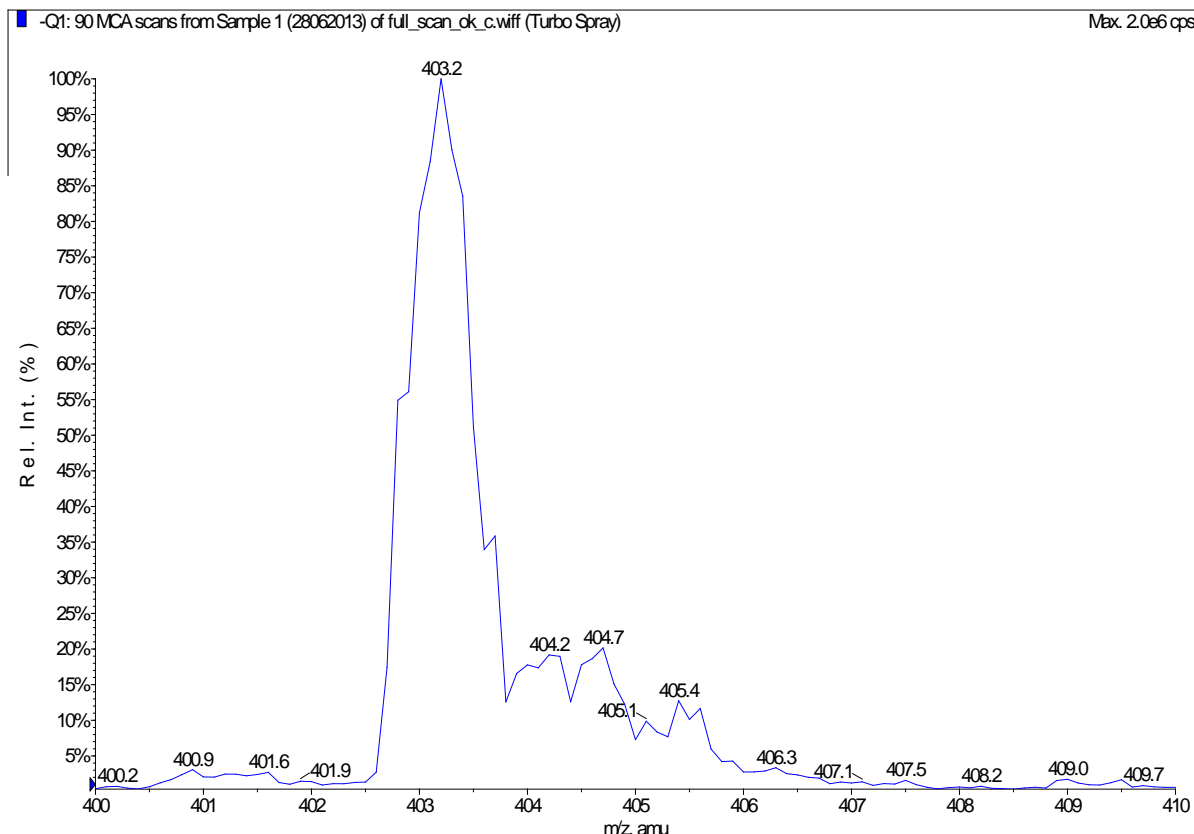


FIGURA 20 – ESPECTRO DE MASSAS DE IHEX1
 FONTE: A autora (2013)

A partir dos resultados de RMN de ^{13}C e ^1H e de EM, a substância foi identificada com denominação genérica de 2,6 octacosadien-1-ol (FIGURA 21), um álcool graxo de cadeia insaturada com 28 carbonos.

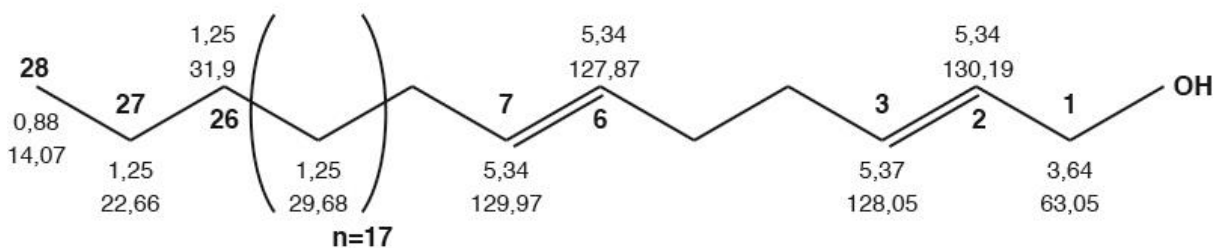


FIGURA 21 – ESTRUTURA QUÍMICA PROPOSTA PARA IHEX1
 FONTE: A autora (2013)

Álcoois graxos podem ocorrer na forma livre ou ligados a um ácido graxo, estando presentes em barreiras lipídicas de plantas, como ceras cuticulares por exemplo (ROWLAND; DOMERGUE, 2012). As ceras cuticulares são compostos lipofílicos que recobrem algumas partes dos vegetais. São formadas por misturas de

ácidos graxos, ésteres, aldeídos, cetonas, álcoois graxos, entre outros, geralmente compostos de cadeias com mais de 18 carbonos e facilmente extraídos por solventes orgânicos mais apolares como hexano e clorofórmio (SIQUEIRA *et al.*, 2003).

Álcoois graxos de cadeia insaturada podem ser empregados na indústria agroquímica, cosmética e farmacêutica, além da alimentícia, na qual podem ser utilizados como agente emulsificante ou espessante (ROWLAND; DOMERGUE, 2012). Além disso, apresentam atividades biológicas, principalmente relacionadas à atividade antioxidante e hipocolesterolêmica, podendo portanto, ser substâncias potenciais para uso no tratamento de doenças cardiovasculares (CRAVOTTO, 2003).

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste capítulo pode-se concluir que os frutos da *Morus nigra L.* analisados apresentam grande variedade de metabólitos secundários como antocianinas, dihidroflavonóis, taninos, cumarinas, esteroides e triterpenos. A partir de realização de coluna cromatográfica e análise via RMN e EM foi possível isolar e identificar um álcool graxo de cadeia insaturada presente na fração hexânica dos frutos. Além disso, foi possível verificar presença de ácido clorogênico e dos flavonoides rutina, quercetina e kaempferol. Quanto ao método extrativo, pode-se concluir que, entre os extratos brutos, os extratos turbólise etanólico e Soxhlet foram os mais eficazes para extração destes compostos e, como estes extratos apresentaram bom rendimento (9,99% e 8,42%), podem ser selecionados para elaboração de extratos de amora. Entre as frações, a acetato de etila apresentou os melhores resultados, fato já esperado devido à polaridade do solvente e afinidade com compostos fenólicos. Portanto, conclui-se que frutos da *Morus nigra L.* apresentam metabólitos secundários que, em estudos anteriores, já demonstraram atividades biológicas, podendo, desta maneira, exercer efeito positivo sobre a saúde humana.

REFERENCIAS

- ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Food Chemistry Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica L.*) leaves. **Food Chem.**, v. 102, p. 1233-1240, 2007.
- ARFAN, M.; KHAN, R.; RYBARCZYK, A.; AMAROWICZ, R. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 2472-2480, 2012.
- ARRUZAZABALA, M. L.; CARBAJAL, D.; MAS, R. et al. Cholesterol-lowering effects of policosanol in rabbits. **Biol. Res.**, v. 27, p. 205-208, 1994.
- BAE, S.; SUH, H. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 40, p. 955-962, 2007.
- BERNAL, J.; MENDIOLA, J. A; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A. Advanced analysis of nutraceuticals. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 55, n. 4, p. 758-74, 2011.
- CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora L.*) throughout the fruit developmental stages. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 8, p. 2442-2451, 2011.
- CASTAÑO, G.; MAS, R.; FERNANDEZ, L. et al. Comparison of two regimens of policosanol administered at 20 mg/d in patients with type II hypercholesterolemia: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. **Curr. Ther. Res. Clin. Exp.**, v. 62, n. 3, p. 194-208, 2011.
- CHANDRASEKAR, S. B.; BHANUMATHY, M.; PAWAR, A. T.; SOMASUNDARAM, T. Phytopharmacology of *Ficus religiosa*. **Pharmacogn. Rev.**, v. 4, n. 8, p. 195-199, 2010.
- CHU, Q.; LIN, M.; TIAN, X.; YE, J. Study on capillary electrophoresis – amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba L.* **J. Chromatogr. A**, v. 1116, p. 286-290, 2006.
- CRAVOTTO, G. **Long Chain Unsaturated Oxygenated Compounds and their use in Therapeutical, Cosmetic and Nutraceutical Field.** PCT/IB03/02317, 2003.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chem.**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

FERRERES, F.; TOMÁS-BARBERÁN, FA; SOLER, C. *et al.* A simple extractive technique for honey flavonoid HPLC analysis. **Apidologie**, v. 25, n. 1, p. 21-30, 1994.

GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; SENSOY, R. I. G.; YILMAZ, H. 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.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra L.*) growing in Brazil. **Food Sci. Tech. Int.**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. **J. Food Compost Anal.**, v. 22, p. 263-268, 2009.

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.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos. São Paulo: 4.ed, 2008. Cap. 4, p. 104.

KAMALAKKANNAN, N.; STANELY, P.; PRINCE, M. Antihyperglycaemic and Antioxidant Effect of Rutin , a Polyphenolic Flavonoid , in Streptozotocin-Induced Diabetic Wistar Rats. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 98, p. 97-103, 2006.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R. *et al.* Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, p. 560-568, 2002.

LIANDA, R. L. P.; CASTRO, R. N. Isolamento e identificação da morina em mel brasileiro de *Apis mellifera*. **Quim Nova**, v. 31, n. 6, p. 1472-1475, 2008.

LIN, Y.; RUDRUM, M.; WIELEN, R. P. VAN DER; *et al.* Wheat germ policosanol failed to lower plasma cholesterol in subjects with normal to mildly elevated cholesterol concentrations. **Metab.**, v. 53, n. 10, p. 1309-14, 2004.

MARTIN, C.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, Diet, and Health. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 18.1-18.28, 2013.

MIGUEL, O.G. Ensaio Sistemático de Análise Fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Trib. Farm.**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.

OLIARO-BOSSO, S. GAUDINO, E. C.; MANTEGNA, S; *et al.* Regulation of HMGCoA Reductase Activity by Policosanol and Octacosadienol, a New Synthetic Analogue of Octacosanol. **Lipids.**, v. 44, p.907–916, 2009.

OLIVEIRA, A. M. DE; CONSERVA, L. M.; FERRO, J. N. D. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Octacosanol from the Leaves of *Sabicea grisea* var . *grisea* in Mice. **Mol. Sci.**, v. 13, p. 1598-1611, 2012.

OZRENK, K.; GAZIOGLU, I. R. S.; ERDINC, C.; GULERYUS, M.; AYKANAT, A. Molecular characterization of mulberry germplasm from Eastern Anatolia. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, n. 1, p. 1-6, 2010.

PADILHA, M. M.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q. et al. Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytother. Res.**, v. 24, n. 10, p. 1496-1500, 2010.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 9, p. 3377-80, 2008.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 44, n. 8, p. 1793-1801, 2011.

RADOJKOVIĆ, M. M.; ZEKOVIĆ, Z. P.; VIDOVIĆ, S. S.; KOČAR, D. D.; MAŠKOVIĆ, P. Z. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus spp.* L., Moraceae) extracts. **Hem. Ind.**, v. 66, n. 4, p. 547-52, 2012.

ROWLAND, O.; DOMERGUE, F. Plant Science Plant fatty acyl reductases : Enzymes generating fatty alcohols for protective layers with potential for industrial applications. **Plant Sci.**, v. 193-194, p. 28-38, 2012.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. A. Esquema Geral para Elucidação de Substâncias Orgânicas Usando Métodos Espectroscópico e Espectrométrico. **Quim Nova.**, v. 30, n. 4, p. 1026-1031, 2007.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3^o ed. Humana Press, 2012. v. 864, p. 427-464.

SHAKYA, G.; MANJINI, S.; HODA, M.; RAJAGOPALAN, R. Hepatoprotective Role of Kaempferol During Alcohol- and PUFA-induced Oxidative Stress. J Basic Clin Physiol Pharmacol., v. 24, p.1-7, 2013.

SIQUEIRA, D. S.; PEREIRA, A. S.; NETO, F. R. A. *et al.* Determinação de Compostos de Massa Molecular Alta em Folhas de Plantas da Amazônia. **Quim Nova.**, v. 26, n. 5, p. 633-640, 2003.

SIVACI, A.; SÖKMEN, M. Seasonal changes in antioxidant activity , total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba L.* and *Morus nigra L.*). **Plant Growth Regul.**, v. 44, p. 251-256, 2004.

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.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. **Molecules**, v. 14, p. 2167-2180, 2009.

THABTI, I.; ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; FERCHICHI, A.; CAMPOS, M. DA G. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **J. Funct. Foods**, v.4, p.367-74, 2012.

THIPPESWAMY, G.; SHEELA, M. L.; SALIMATH, B. P. Octacosanol isolated from *Tinospora cordifolia* downregulates VEGF gene expression by inhibiting nuclear translocation of NF- κ B and its DNA binding activity. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 588, p. 141-150, 2008.

VEEMAN, W. S. Nuclear magnetic resonance , a simple introduction to the principles and applications. **Geoderma**, v. 80, n. 3-4, p. 225-242, 1997.

VOLKEN, M. C. **Biological and Phytochemical Investigations of Euphorbiaceae from Papua New Guinea**. p.122-126 Thesis for for the degree of Doctor of Natural Sciences. Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 1999.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic Acid Profiles in Some Small Berries. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 2118-24, 2005.

CAPÍTULO IV – ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.

1 INTRODUÇÃO

A amora (*Morus nigra*) pertence à família *Moraceae* e ao gênero *Morus* (MAZIMBA *et al.*, 2011). É um fruto de sabor levemente ácido que pode ser consumido *in natura*, na forma de sucos ou de geleias, além de ser empregada na indústria (ÖZGEN *et al.*, 2009; ERCISLI; ORHAN, 2008).

A amoreira é um tipo de planta que pode crescer em diversas condições de solo, clima e topografia, contudo, dependendo destas condições, ocorre modificação da composição química da fruta (IMRAN *et al.*, 2010). Características genéticas de cada amoreira também influenciam na composição (ERCISLI; ORHAN, 2008).

Diversos estudos apontam efeitos medicinais a esta fruta, como hipoglicemiante, expectorante, laxativo e anti-helmíntico (ERCISLI; ORHAN, 2007). Além disso, alto poder antioxidante é atribuído devido principalmente à presença de compostos fenólicos (NADERI *et al.*, 2004). Dentre estes compostos fenólicos estão os flavonoides que apresentam funções biológicas como antialérgicos, antivirais, antitumorais, anti-inflamatórios e antioxidantes, sendo a ocorrência destas atividades dependente principalmente do número e da posição de grupos hidroxila na estrutura química (HASSIMOTTO *et al.*, 2005; VOLP *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2009). A coloração vermelha a roxa escura dos frutos é atribuída à presença de antocianinas, que são compostos da classe dos flavonoides. As antocianinas apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas como efeito antioxidante, anti-inflamatório e antiviral (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Estes efeitos ocorrem devido à estrutura química apresentada pelas antocianinas, as quais são capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio para radicais livres (VOLP *et al.*, 2008). A presença destes compostos com atividade biológica nos frutos da *Morus nigra* desperta o interesse em explorar o potencial da fruta neste sentido.

Além disso, por apresentar compostos fenólicos, que apresentam benefícios à saúde humana, o consumo de amora, assim como de outras frutas, deve ser estimulado para garantir a qualidade da alimentação da população (FU *et al.*, 2011). Estas substâncias são metabólitos secundários das plantas, que as protegem de dano

oxidativo, sendo, portanto, capazes de proteger de danos no organismo humano (DILLARD; GERMAN, 2000).

Objetiva-se com este capítulo reportar os resultados da determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides, observando se o método extrativo influencia no teor destes compostos, reportar as atividades biológicas (atividade antioxidante, hemolítica e antimicrobiana) e o indicativo de toxicidade dos extratos e frações da *Morus nigra L.* Além disso, pretende-se elaborar subproduto obtido a partir de resíduo de extração.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Para as análises das atividades biológicas foram utilizados frutos maduros e in natura da *Morus nigra L.* conforme descrito no item 2.1 Caracterização da Amostra do Capítulo III – Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos em frutos da *Morus nigra L.*

2.2 ELABORAÇÃO DOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

A fim de verificar o melhor processo extrativo para frutos da *Morus nigra L.*, foram utilizados quatro métodos para elaboração dos extratos brutos, sendo um destes extratos submetidos a partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente, dando origem às frações.

Os extratos e frações foram elaborados conforme descrito no item 2.3 Elaboração de Extratos Brutos e Frações do Capítulo III – Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos em frutos da *Morus nigra L.* A determinação do teor de sólidos e pH dos extratos brutos e frações também seguiu como descrito no item 2.3.3 do mesmo capítulo.

2.3 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante de frutas, verduras e cereais e por isso a quantificação deste componente é fundamental (ARFAN *et al.*, 2012).

O doseamento de compostos fenólicos foi realizado de acordo com a metodologia de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965). O doseamento foi

realizado em todos os extratos brutos e frações em triplicata. Esta metodologia consistiu em adicionar água destilada, 120µL da amostra (4mg/mL), reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio 10% a tubos de ensaio e, após 30 minutos, realizar leitura a 765nm em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800. Para zerar o equipamento utilizou-se apenas metanol e para compor o controle utilizou-se a mesma composição dos demais tubos, substituindo a amostra por metanol. Como padrão utilizou-se o ácido gálico (2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10µL/mL), a partir do qual foi traçada uma reta para cálculo do teor de compostos fenólicos na amostra. Os resultados foram expressos como µg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de extrato seco. Para os extratos brutos, com o valor de rendimento dos extratos foi possível expressar os resultados em mg de equivalentes de ácido gálico por 100g de fruto fresco (FF).

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows®.

2.4 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

Para o doseamento de flavonoides foi utilizado o método que utiliza Cloreto de Alumínio, descrito por Chang *et al.* (2002), com adaptações. Brevemente, 400µL de amostra (1mg/mL), ou 400µL de metanol no caso do branco, foram adicionados de 200µL de cloreto de alumínio a 2,5% e 200µL de acetato de sódio a 10%. O volume foi completado para 4mL com metanol e os tubos permaneceram em repouso à temperatura ambiente e protegidos da luz por 40 minutos. Foi realizada leitura em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800 a 425nm, sendo o equipamento zerado com metanol. Como padrão utilizou-se a quercetina (2,5; 3; 4; 5; 6; 8; 10µL/mL), a partir da qual foi traçada uma reta para cálculo do teor de flavonoides na amostra. Os resultados foram expressos como µg de equivalentes de quercetina (EQE) por mg de extrato seco. Para os extratos brutos, com o valor de rendimento dos extratos foi possível expressar os resultados em mg de equivalentes de quercetina por 100g de fruto fresco (FF).

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows®.

2.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

2.5.1 Atividade Antioxidante

Os alimentos apresentam em sua composição uma mistura de componentes com atividade antioxidante, entre eles compostos bioativos, vitaminas e minerais, os quais podem agir por mecanismos de ação diferentes para exercer esta atividade (ALMEIDA *et al.*, 2011). Além disso, não existe um método padrão ouro para a determinação da atividade antioxidante em alimentos e por estes motivos, diversos métodos vêm sendo empregados por diferentes autores (HUANG *et al.*, 2005). No presente trabalho, a atividade antioxidante dos extratos brutos e frações foi determinada por três métodos distintos, conforme descrito a seguir.

2.5.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

Este é um método descrito por Prieto *et al.* (1999). É baseado na redução de Molibdênio VI a Molibdênio V levando a formação de um complexo de coloração verde em pH ácido formado por fosfato e Molibdênio V, medido por espectrometria. O ensaio consistiu em adicionar a tubos de ensaio 300µL de amostra (200µL/mL) e 3mL do reativo composto por fosfato de sódio 0,1M, molibdato de amônio 0,03M, ácido sulfúrico 3M e água destilada. Os tubos foram imediatamente fechados e levados a banho-maria a 90°C por 90 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800 a 695nm após resfriamento dos tubos, utilizando 300µL de metanol e 3mL do reativo como branco. Os resultados foram expressos em atividade

antioxidante relativa (AAR%) da amostra em relação a dois padrões com conhecida atividade antioxidante (ácido ascórbico e rutina) de acordo com as equações do QUADRO 3.

AAR% EM RELAÇÃO À VITAMINA C	AAR% EM RELAÇÃO À RUTINA
$\frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco} \times 100}{\text{Abs Vitamina C} - \text{Abs Branco}}$	$\frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco} \times 100}{\text{Abs Rutina} - \text{Abs Branco}}$

QUADRO 3 – FÓRMULAS PARA CÁLCULO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA

FONTE: A autora (2013)

Este é um método quantitativo para determinação da atividade antioxidante, que, além de ser validado quanto à reprodutibilidade e linearidade, apresenta execução simples e barata, podendo, portanto, ser utilizado na rotina industrial ou de laboratório (PRIETO *et al.*, 1999).

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows®.

2.5.1.2 Redução do Radical DPPH

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) é um radical estável que apresenta coloração roxa escura, a qual é perdida com a redução deste radical (PRIOR, RONALD *et al.*, 2005). Este ensaio, descrito inicialmente por Brand-Williams *et al.* (1995), consistiu em adicionar a tubos de ensaio, 2,5mL de amostra em diferentes concentrações (20, 40, 60, 80 e 100µg/mL para a fração acetato de etila e 100, 200, 300, 400 e 500µg/mL para os extratos brutos e demais frações) e 1mL de solução DPPH. Após 30 minutos de repouso no escuro, a absorbância da solução foi medida a 518nm em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800, utilizando-se as mesmas concentrações da amostra sem a solução de DPPH como branco, solução de metanol e DPPH como controle negativo e solução de ácido ascórbico e rutina como controle positivo. Os resultados foram expressos pelo coeficiente EC₅₀, ou seja, a quantidade necessária do extrato para reduzir em 50% a quantidade inicial do radical DPPH (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

2.5.1.3 Espécies Reativas do Ácido Tiobarbitúrico

O método de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico é baseado na peroxidação lipídica. O malonaldeído (MDA) é um dialdeído formado por auto oxidação ou degradação enzimática de ácidos graxos poliinsaturados. Esta molécula, em meio ácido e em temperaturas elevadas, reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico formando um complexo cor-de-rosa que é absorvido a 532nm (KISHIDA *et al.*, 1993). Este experimento consistiu em adicionar a tubos de ensaio 400µL de água destilada, 100µL de amostra (3mg/mL), 50µL de solução de cloreto de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) 0,035% (ABAP), 500µL de solução de gema de ovo 5%, 1500µL de solução de ácido acético 20% e 1500µL de solução de ácido tiobarbitúrico 0,4% (TBA). Os tubos foram imediatamente fechados e levados a banho-maria marca B. Braun Biotech International®, Modelo Thermomix a 95°C por 60 minutos. Após resfriamento, foi adicionado aos tubos 1500µL de n-butanol, os quais foram agitados, centrifugados em centrífuga Zanetzi® T23 a 5.000rpm por 3 minutos e a absorbância foi verificada a 532nm em espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800. Utilizou-se n-butanol para zerar o aparelho, tubos sem o ABAP como branco e tubos sem a amostra como controle positivo (HODGES, 1999). Como substâncias padrão, a título de comparação, o experimento também foi realizado com BHT, quercetina e vitamina E. Os resultados foram expressos em Índice Antioxidante (%).

Para análise estatística, foi utilizado o teste de análise de variância (ANOVA) *one-way* seguido do teste de Tukey a fim de avaliar a diferença mínima significativa entre as médias. Diferenças ao nível de $p < 0,05$ foram consideradas significantes. O software empregado para análise foi SPSS 17.0 para Windows®.

2.5.2 Atividade Hemolítica

Este método se baseou na metodologia descrita por Flach *et al.* (2005) na qual, discos estéreis de papel (6mm) foram impregnados com 20µl dos extratos e frações (1mg/20µl de metanol), levados a secura e adicionados a placas ágar Sangue de Carneiro Newprov® sob luz UV. Como controle positivo foi utilizado saponina e

como controle negativo apenas metanol. As placas foram incubadas por 24h a 35°C em estufa para cultura bacteriológica Odontobrás® modelo ECB2 e posteriormente, a formação de halo de hemólise ao redor do disco de papel foi observada. O halo formado foi medido em mm (FLACH *et al.*, 2005). O teste foi realizado em duplicata. Os resultados foram expressos em atividade hemolítica relativa (AHR) ao controle positivo saponina, segundo a seguinte fórmula:

$$\%AHR = \frac{\text{Halo amostra} \times 100}{\text{Halo controle}}$$

FIGURA 22 – FÓRMULA PARA ATIVIDADE HEMOLÍTICA RELATIVA
FONTE: A autora (2013)

No caso de reação positiva, foi aplicado o teste qualitativo para saponinas conforme descrito no item 2.2.2.2 Pesquisa de Heterosídeos Saponinicos do Capítulo III – Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos em frutos da *Morus nigra L.*, a fim de verificar a presença deste grupamento químico na amostra em questão.

2.5.3 Atividade Antimicrobiana

Este método foi aplicado apenas para os quatro extratos brutos (SOX, TE, TA e VA) e consistiu na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) por meio da técnica de microdiluição (WIKLER *et al.*, 2009). O teste foi realizado em duplicata.

Os microrganismos utilizados para o ensaio foram: *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212, os quais foram armazenados em TBS com glicerol 15% a -80°C até o momento do uso. Para reativação, as cepas foram subcultivadas em ágar TSA (Difco®), a temperatura de 37 °C por 20-24 horas.

Para o preparo dos inóculos foram realizadas suspensões em tubo contendo solução salina estéril (NaCl a 0,85%) na concentração de $1,0 \times 10^8$ UFC/ml, equivalente ao tubo 0.5 de McFarland. O ensaio foi realizado em microplacas de 96 cavidades (12 colunas e 8 linhas identificadas de A a H).

Os extratos brutos (100mg/mL) foram diluídos em etanol a 10% e DMSO a 2% e filtrados em membrana milipore 0,22µm.

Foram transferidos 100µl de caldo Mueller-Hinton (Merck®) para as microplacas na linha A das colunas 2 a 10. Na coluna 2 foi inoculado 100 µl de extrato vegetal e transferido após homogeneização 100 µl para o orifício da coluna 3, repetindo-se o procedimento até a coluna 10, obtendo-se assim concentrações decrescentes dos extratos, conforme o QUADRO 4 a seguir.

COLUNA	CONCENTRAÇÃO (µg/ml)
2	5000
3	2500
4	1250
5	625
6	312
7	156
8	78
9	39
10	19
COLUNA	CONTROLE
1 (-)	Caldo Mueller-Hinton + extrato
11 (-)	DMSO a 2% + caldo Mueller-Hinton + inóculo bacteriano
12 (+)	Caldo Mueller-Hinton + inóculo bacteriano

QUADRO 4 – CONCENTRAÇÃO DOS EXTRATOS E CONTROLES DE ACORDO COM O NÚMERO DA COLUNA DA MICROPLACA
 FONTE: A autora (2013)

Os inóculos bacterianos preparados foram inoculados (5µl) nos orifícios das colunas de 2 a 10, permanecendo uma concentração final de 10^4 por poço.

Para controle positivo ou de viabilidade do experimento, que foi realizado na coluna 12, foram adicionados 100µl de caldo Mueller-Hinton e 5µl do inóculo bacteriano. Para o controle negativo ou de esterilidade, foram adicionados 100µl de caldo Mueller-Hinton e 100µl de extrato vegetal na concentração de 100mg/ml na coluna 1. Já para o controle negativo da atividade inibitória do diluente DMSO foram adicionados 100µl de solução de DMSO a 2%, 100µl de caldo Mueller-Hinton e 5µl do inóculo bacteriano na coluna 11.

As microplacas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por cerca de 20 horas e decorrido o período, foram acrescidos 20µl de solução aquosa de TTC (cloreto de trifetil tetrazolium, Merck®) a 0,5%(AYRES *et al.*, 2008). As microplacas foram reincubadas por três horas a 35 °C para posterior leitura dos resultados, na qual a coloração vermelha indicou resultado negativo do efeito inibitório do vegetal e a ausência de coloração vermelha indica ação inibitória positiva (WIKLER *et al.*, 2009).

2.6 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

A *Artemia salina*, um crustáceo de águas salgadas, vem sendo bastante utilizado para testar a toxicidade de produtos naturais ao invés do uso de cobaias, por utilizar número menor de animais, causar menos estresse e dor, além de apresentar menor custo e maior rapidez. Além disso, os resultados de toxicidade em ratos e via *Artemia salina* apresentaram boa correlação sendo uso de *Artemia salina* uma alternativa viável para testar toxicidade de produtos naturais (PARRA *et al.*, 2001).

O ensaio foi originalmente descrito por Meyer *et al.* (1982), mas passou por adaptações. O teste consistiu em adicionar a diferentes frascos 10, 100 e 1000µg/mL dos extratos, levar a secura por 24h e em seguida adicionar 30 náuplios de *Artemia salina* e água do mar artificial até completar 5mL. Após 24h, foi realizada a contagem do número de animais vivos em cada tubo para determinar a concentração média letal (DL₅₀) do extrato em mµ/mL por meio do software Probitos[®]. O extrato ou fração pode ser considerado tóxico quando os valores de DL₅₀ forem inferiores a 1000mµ/mL (MEYER *et al.*, 1982). Como controle positivo do experimento foi utilizado o sulfato de quinidina e como controle negativo o metanol, solvente utilizado para dissolução das amostras. Para a obtenção dos náuplios da *Artemia salina*, 200mg de ovos do minicrustáceo foram adicionados a 400mL de solução salina, onde permaneceram por 48h sob luz e aeração contínua.

2.7 DESENVOLVIMENTO DE SUBPRODUTO A PARTIR DE FRUTOS DA *Morus nigra* L.

O resíduo da extração via Soxhlet foi seco em estufa a 40°C e posteriormente triturado em processador de alimentos marca Arno[®]. A este material com aspecto de pó de maior granulação, foi adicionado, de forma gradual, o extrato líquido obtido pela mesma extração de Soxhlet, gerando um produto obtido da incorporação do extrato fluido ao suporte sólido da amora. A fim de verificar as modificações entre o resíduo antes e após a extração, foi realizada análise microscópica em microscópio Olympus[®] modelo CX41RF.

A incorporação se processou pela adição de 2,0L de extrato fluido a 58g do suporte sólido matricial da amora. A adição do extrato fluido se deu de maneira gradual, com homogeneização e secagem em estufa a 40°C durante duas semanas até obtenção de matéria-prima com aspecto de pequenos grânulos. A partir desta matéria-prima, foi elaborada uma pastilha, a qual foi composta além do extrato incorporado, de mel e sacarose.

Foram testadas três formulações de pastilha, com variações no modo de preparo e proporção de ingredientes, sendo a terceira formulação a utilizada para produção das pastilhas (TABELA 9). A escolha se deu pela degustação do produto.

TABELA 9 – FORMULAÇÃO FINAL DA PASTILHA

INGREDIENTE	FORMULAÇÃO
Sacarose	50g
Mel	36,8g
Extrato incorporado	13,2g

FONTE: A autora (2013)

Para a formulação desta pastilha, homogeneizou-se o mel com a sacarose, sendo esta mistura levada a aquecimento em béquer até a formação de solução viscosa. A esta solução, foi adicionado o extrato incorporado e verteu-se a mistura em forma de alumínio previamente untada com óleo de soja. Após resfriamento, as pastilhas foram retiradas da forma para posterior pesagem.

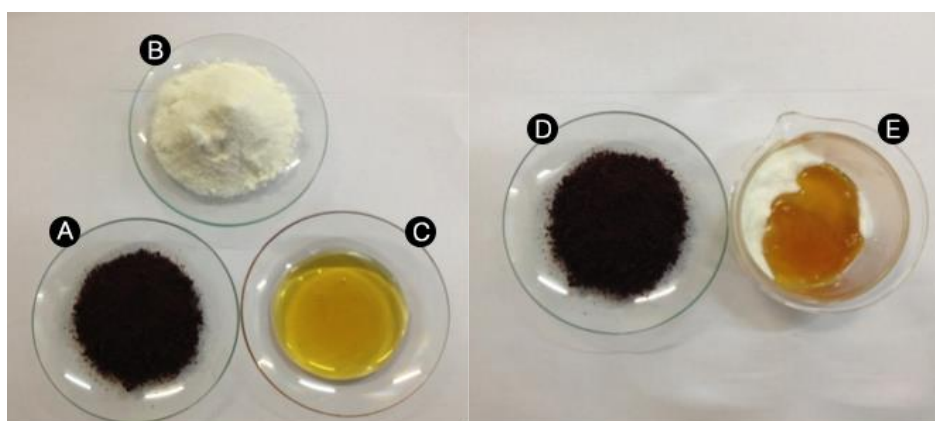


FIGURA 23– MATERIAIS EMPREGADOS NA ELABORAÇÃO DE PASTILHA

FONTE: A autora (2013)

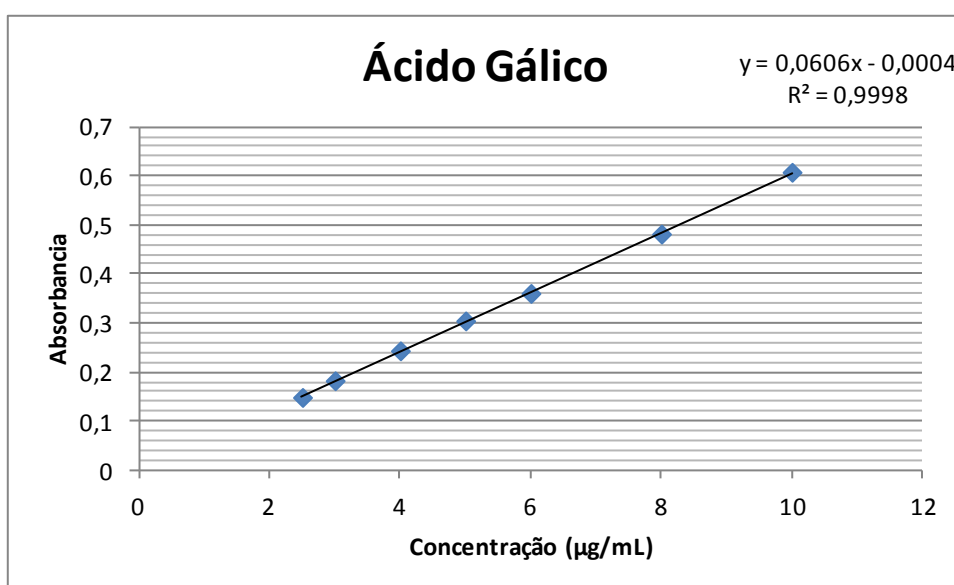
Nota: a) Extrato impregnado; b) Sacarose; c) Mel; d) Extrato Impregnado; e) Mistura de sacarose e mel.

3 RESULTADOS

3.1 DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

Para cálculo do teor de compostos fenólicos nos extratos brutos e frações, utilizou-se a equação da reta gerada pelas análises do padrão ácido gálico, a qual pode ser observada no GRÁFICO 1 a seguir.

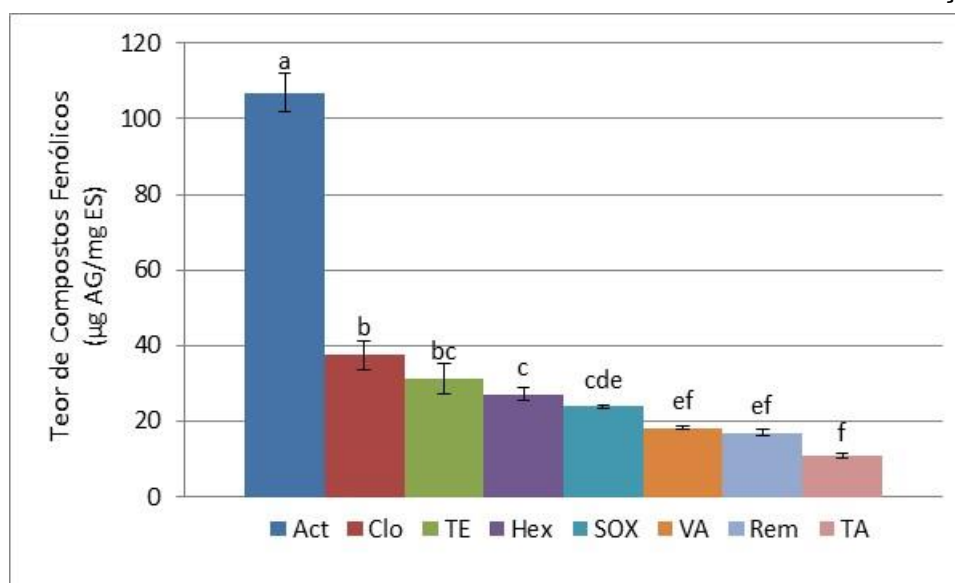
GRÁFICO 1 – CURVA PADRÃO PARA DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS



FONTE: A autora (2013)

A partir dos resultados obtidos pela equação, pode-se calcular o teor de compostos fenólicos nos extratos e frações, conforme pode ser verificado no GRÁFICO 2.

GRAFICO 2 – TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES



FONTE: A autora (2013)

Nota₁: Act: fração Acetato de Etila; Clo: fração clorofórmio; TE: extrato bruto turbólise etanólico; Hex: fração hexano; SOX: extrato bruto de soxhlet; VA: extrato bruto a vapor; Rem: fração remanescente; TA: extrato bruto turbólise aquoso.

Nota₂: Letras iguais não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Pode-se verificar que, como já era esperado devido à afinidade existente entre compostos fenólicos e o solvente, a fração acetato de etila apresentou os maiores teores de compostos fenólicos. Quando comparados apenas os extratos brutos, verifica-se que o turbólise etanólico apresentou o melhor poder extrativo, contudo não diferindo estatisticamente do extrato de soxhlet. Os extratos brutos aquosos e a fração remanescente, também aquosa, apresentaram o menor poder extrativo destes compostos. O menor teor de compostos fenólicos em extratos aquosos também foi verificado por Kutlu *et al.* (2011), os quais, ao avaliar extratos metanólicos e aquosos de *Morus nigra* cultivadas na Turquia, verificaram que o metanol foi mais eficaz na extração de compostos fenólicos que a água (KUTLU *et al.*, 2011).

Quando, utilizando os dados de rendimento dos extratos, o teor de compostos fenólicos por 100 gramas de fruto é calculado e obtêm-se os resultados apresentados na TABELA 10. É possível verificar que os extratos etanólicos são realmente mais eficazes na extração dos compostos fenólicos que os aquosos. Estes resultados estão de acordo com os obtidos via CLAE e citados no item 3.3 do Capítulo III desta dissertação.

TABELA 10 - TEOR DE COMPOSTOS FENÓLICOS NOS EXTRATOS BRUTOS

EXTRATOS	COMPOSTOS FENÓLICOS (mg EAG/100g FF)
SOX	200,4 ± 2,31 ^a
TE	311,8 ± 4,28 ^b
TA	108,2 ± 4,9 ^c
VA	22,3 ± 0,48 ^d

FONTE: A autora (2013)

Nota: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor.

Nota₂: Resultados expressos em mg de equivalente de ácido gálico por 100g de fruto fresco.

Nota₃: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Comparando-se com a literatura, evidencia-se que os achados do presente trabalho são similares aos obtidos por outros autores. O teor de compostos fenólicos em plantas pode variar por diversos fatores. Entre eles estão diferenças genéticas entre os frutos, grau de maturação no momento da colheita e condições de cultivo como tipo de solo, irrigação, exposição à luz solar, presença de pragas, entre outros (SIVACI; SOKMEN, 2004; ERCISLI; ORHAN, 2007). Além disso, condições experimentais como método e solvente empregados também podem ser responsáveis por estas diferenças (VASCO *et al.*, 2008).

Hassimotto *et al.* (2005), ao analisar extratos metanólicos de frutos da *Morus nigra* cultivados no Brasil, verificaram teor de compostos fenólicos de 373mg EAG/100g de peso fresco, utilizando a turbólise como processo extrativo e estando, portanto, de acordo com o resultado obtido no presente estudo. Mesmo comparando o resultado das amoras brasileiras analisadas com o resultado de amoras cultivadas em outros países, verifica-se concordância nos achados científicos. Özgen *et al.* (2009), por exemplo, ao avaliar o teor de compostos fenólicos em extratos de amoras cultivadas na Turquia, verificaram teor médio de 248,5mg EAG/100g de peso fresco (ÖZGEN *et al.*, 2009). Resultado similar ao encontrado por Ercisli *et al.* (2010), os quais verificaram teor médio de 214,9mg de EAG/100g de fruto fresco também cultivados na Turquia. Kostić *et al.* (2013), ao analisar frutos cultivados na Sérvia, verificaram teor de 118,8mg EAG/100g de fruto fresco, via extração aquosa. Ao avaliar o teor de compostos fenólicos em suco fresco de amoras cultivadas no Paquistão, Khalid *et al.* (2011), verificaram teor de 205mg EAG/100g de suco fresco.

Os resultados que mais destoam dos encontrados no presente estudo foram realizados com frutos liofilizados e diluídos em água, ao invés do uso de extratos. Ercisli; Orhan (2007) encontraram teor de 1422mgEAG/100g de peso fresco em frutos

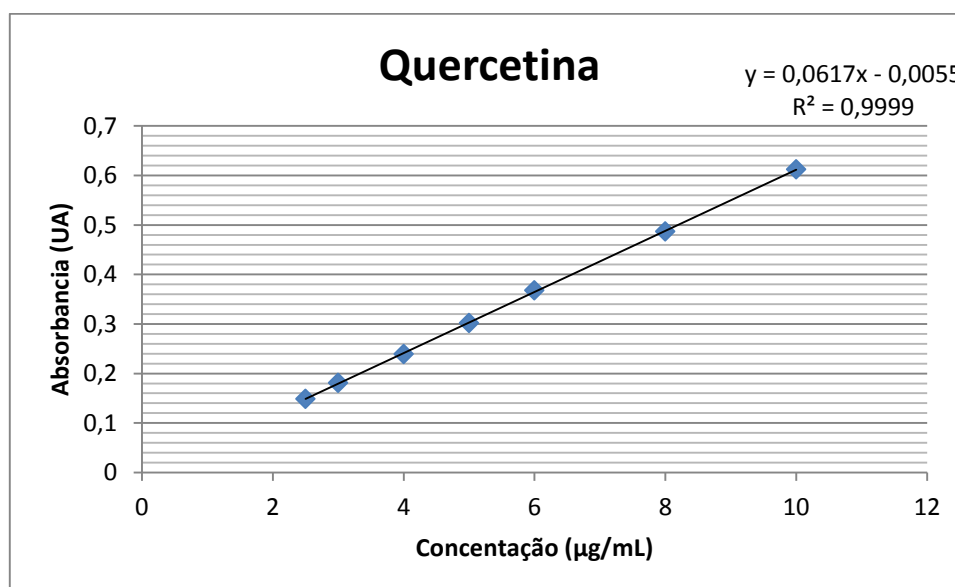
da *Morus nigra*, enquanto que Lin e Tang (2007), obtiveram teor de 1516mgEAG/100g de peso fresco em frutos da *Morus alba*.

Comparando estes valores ao de outras frutas brasileiras, verifica-se que o teor de compostos fenólicos pode ser considerado similar à polpa de maracujá doce, araticum, graviola (SOUZA *et al.*, 2012), murici (159,9mgGAE/100gPF) (ALMEIDA *et al.*, 2011), fruta pão (218,8mg), jabuticaba (440mg) e mangaba (169mg) (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011).

3.2 DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES

Para cálculo do teor flavonoides totais nos extratos brutos e frações, utilizou-se a equação da reta gerada pelas análises do padrão quercetina, a qual pode ser observada no GRÁFICO 3 a seguir.

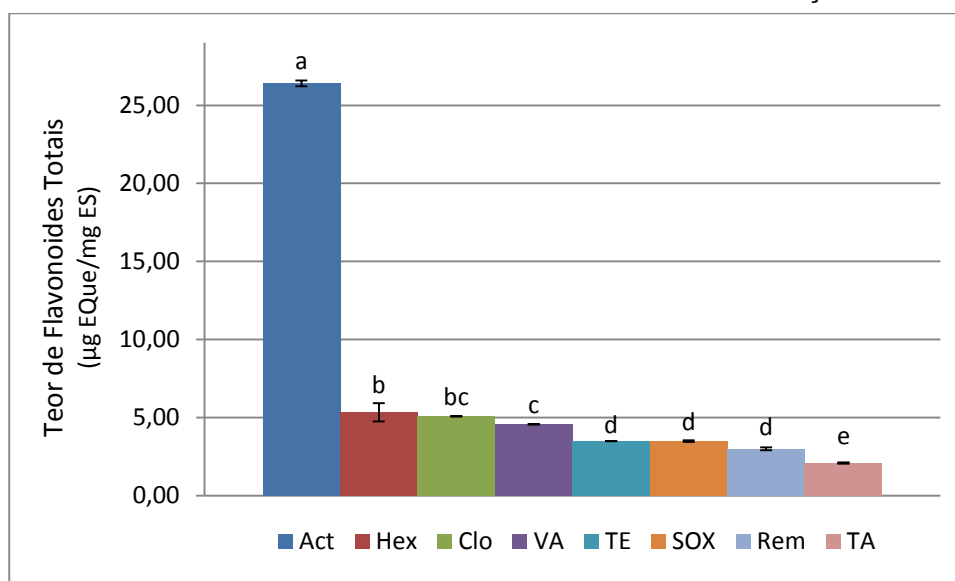
GRÁFICO 3 – CURVA PADRÃO PARA DOSEAMENTO DE FLAVONOIDES



FONTE: A autora (2013)

A partir dos resultados obtidos pela equação, pode-se calcular o teor de flavonoides nos extratos brutos e frações, sendo os resultados expressos em µg de equivalentes de quercetina/mg de extrato seco, conforme pode ser verificado no GRÁFICO 4.

GRÁFICO 4 – TEOR DE FLAVONOIDES NOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES



FONTE: A autora (2013)

Nota₁: Act: fração Acetato de Etila; Hex: fração hexano; Clo: fração clorofórmio; VA: extrato bruto a vapor; TE: extrato bruto turbólise etanólico; SOX: extrato bruto de soxhlet; Rem: fração remanescente; TA: extrato bruto turbólise aquoso.

Nota₂: Letras iguais não apresentam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

De acordo com o GRÁFICO 4, pode-se verificar que o extrato à vapor apresenta o melhor poder extrativo entre os quatro extratos brutos, enquanto que o extrato bruto de soxhlet e o turbólise etanólico apresentaram o mesmo poder extrativo. O fato de um extrato aquoso ter apresentado melhores resultados que os etanólicos é um resultado importante. O extrato aquoso é a opção mais natural, já que não emprega solventes químicos, e seu uso poderia ser melhor explorado na ação anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica, atividades estas atribuídas aos flavonoides (VOLP *et al.*, 2008). Quanto às frações, a fração remanescente foi similar aos extratos brutos, enquanto que a fração acetato de etila foi a mais rica em flavonoides (26,41µg de equivalentes de quercetina/mg de extrato seco). O acetado de etila é um solvente menos polar, sendo mais apropriado para extração de flavonoides quando comparado à fração hexano e clorofórmio (SANTOS- BUELGA, 2012).

Radojkovic *et al.* (2012), ao avaliar o teor de flavonoides, por método espectrofotométrico, em extratos de frutos da *Morus nigra* obtidos via turbólise com etanol 70% acidificado, verificaram teor de flavonoides de 1,508µg de equivalentes de rutina/mg de peso seco. Garcia-Alonso (2004) ao avaliar o teor de flavonoides, via CLAE, de frutos cultivados na Espanha, verificaram que amoras do gênero *Rubus*

apresentavam 0,319µg de flavonoides/ mg de fruto seco. Ambos os trabalhos demonstram teor de flavonoides abaixo do obtido no presente estudo.

Quando, utilizando os dados de rendimento dos extratos, o teor de flavonoides totais por 100 gramas de fruto é calculado e obtêm-se os resultados apresentados na TABELA 11. É Possível verificar que os extratos obtidos via turbólise são mais eficazes na extração de flavonoides que os demais, sendo o alcoólico ainda melhor que o aquoso. Sultana *et al.* (2009), ao analisar o efeito do método extrativo em plantas medicinais, também observaram que o método por agitação foi mais eficaz na extração de flavonoides que o método que utiliza refluxo, estando em conformidade com o presente trabalho (SULTANA *et al.*, 2009).

TABELA 11 - TEOR DE FLAVONOIDES TOTAIS NOS EXTRATOS BRUTOS

EXTRATOS	FLAVONOIDES TOTAIS (mg EQE/100g FF)
SOX	29,33 ± 0,52 ^a
TE	34,91 ± 0,23 ^b
TA	20,68 ± 0,40 ^c
VA	5,58 ± 0,02 ^d

FONTE: A autora (2013)

Nota: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor.

Nota₂: Resultados expressos em mg de equivalente de quercetina por 100g de fruto fresco.

Nota₃: Letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença estatística (p<0,05) pelo teste de Tukey.

Os dados obtidos no presente trabalho diferem de dados apresentados na literatura. Ercisli e Orhan (2007), ao avaliar frutos de *Morus nigra* cultivados na Turquia, verificaram teor médio de flavonoides de 276mg EQE/100g de peso fresco. O método empregado para determinação destes compostos foi o mesmo utilizado no presente estudo, contudo os autores trabalharam com frutos liofilizados ao invés de extratos (ERCISLI; ORHAN, 2007).

Kostić *et al.* (2013), ao avaliar extratos aquosos e etanólicos de amoras cultivadas na Sérvia, verificaram que o teor médio de flavonoides foi de aproximadamente 140mgEcatequina/100g para o extrato aquoso e 185mgEcatequina/100g para o extrato etanólico obtidos por meio de ultrassom. Estes resultados também diferem do encontrado no presente estudo.

Comparando com frutos brasileiros, as amoras analisadas apresentam teor de flavonoides similar a carambola (42,6mgEcatequina/100g), nêspera (24,3mgEcatequina/100g) e nectarina (23,7mgEcatequina/100g) e inferior a banana (62,8mgEcatequina/100g) e ameixa (78,6mgEcatequina/100g). Comparando à jaca,

espécie pertencente à família Moraceae, as amoras apresentam maior teor de flavonoides, já que o teor obtido em jacas foi de 18,8mgEcatequina/100g. Apesar do método para determinação de flavonoides ser similar, o método extrativo empregado (ultrassom) difere do utilizado no presente estudo. Além disso, foi utilizada a catequina como composto padrão, fatores estes que podem influenciar na diferença de resultados (BARRETO *et al.*, 2009).

Além dos diferentes métodos empregados, os resultados encontrados no presente estudo podem diferir dos demais quanto ao teor de flavonoides devido a variações genéticas, já que maior parte dos trabalhos aqui supracitados foram realizados com frutos europeus, quanto as condições de cultivo, já que as condições de solo, clima e exposição a fatores adversos podem influenciar no teor destes compostos, grau de maturação, pois o maior acúmulo de flavonoides ocorre no último estadio de maturação dos frutos e quanto a condições de armazenamento da amostra, já que o acondicionamento da amostra poderá levar a redução considerável no teor deste composto (ERCISLI; ORHAN, 2007; MENEZES *et al.*, 2011). Além disso, a comparação entre resultados se torna difícil em pesquisas desenvolvidas com alimentos devido à grande variação existente entre amostras e expressão de resultados.

Principalmente pela ação antioxidante que apresentam, os flavonoides são capazes de inibir a oxidação de moléculas de LDL e, por este motivo, o consumo deste grupo de fitonutrientes vem sendo atribuído à redução da ocorrência de eventos cardiovasculares, doenças relacionadas ao envelhecimento e alguns tipos de câncer (MARTIN *et al.*, 2013).

3.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

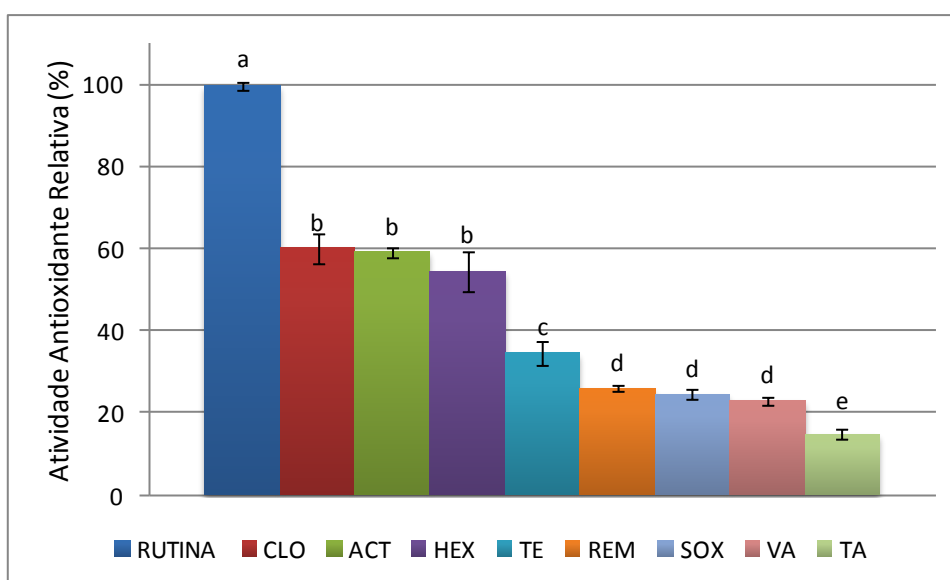
3.3.1 Atividade Antioxidante

3.3.1.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênio

O ensaio da formação do complexo fosfomolibdênio é capaz de avaliar a capacidade antioxidante tanto de compostos hidrossolúveis quanto de lipossolúveis e, por isso, pode ser considerado um método para verificar a capacidade antioxidante total (ARABSHAHI-DELOUEE; UROOJ, 2007).

Os resultados deste método foram expressos em atividade antioxidante relativa (%) a dois padrões com potencial antioxidante conhecido, sendo eles rutina e vitamina C. Os GRÁFICOS 5 e 6 a seguir trazem os resultados deste ensaio.

GRÁFICO 5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA À RUTINA

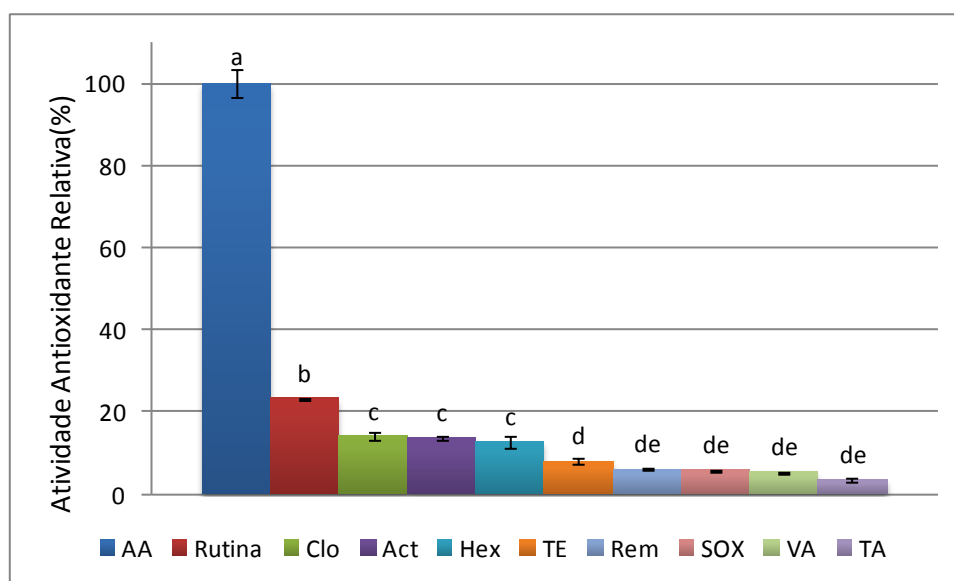


FONTE: A autora (2013)

Nota₁: Clo: fração clorofórmio; Act: fração Acetato de Etila; Hex: fração hexano; TE: extrato bruto turbólise etanólico; Rem: fração remanescente; SOX: extrato bruto de soxhlet; VA: extrato bruto a vapor; TA: extrato bruto turbólise aquoso.

Nota₂: Letras iguais não indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

GRÁFICO 6 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE RELATIVA AO ÁCIDO ASCÓRBICO



FONTE: A autora (2013)

Nota₁: AA: Ácido Ascórbico; Clo: fração clorofórmio; Act: fração Acetato de Etila; Hex: fração hexano; TE: extrato bruto turbólise etanólico; Rem: fração remanescente; SOX: extrato bruto de soxhlet; VA: extrato bruto a vapor; TA: extrato bruto turbólise aquoso.

Nota₂: Letras iguais não indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Como se pode observar, as frações clorofórmio, acetato e hexano demonstram os melhores resultados, com cerca de 15% da atividade do ácido ascórbico, apresentando cinética mais similar a rutina que ao ácido ascórbico. Quando os resultados destes extratos são comparados apenas aos da rutina, verifica-se que estas frações apresentam quase 60% da atividade antioxidante deste composto isolado. Este resultado pode ser justificado pelo fato de que o solvente acetato de etila foi capaz de extrair maior teor de compostos, principalmente flavonoides, com maior número de grupos hidroxila, o que aumenta a atividade antioxidante do extrato (NADERI *et al.*, 2004). Quanto à fração clorofórmio e hexano, a atividade antioxidante pode ser atribuída à outros compostos presentes, como esteroides e triterpenos. A fração clorofórmio apresentou ainda cumarinas, que também demonstram atividade antioxidante *in vitro* (THUONG *et al.*, 2010). A presença destes compostos nas amoras analisadas pode ser observada no item 3.1 Ensaio Sistemático do Capítulo III – Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos em frutos da *Morus nigra L.* da presente dissertação. Quanto aos extratos brutos, os extratos etanólicos apresentaram melhores resultados que os aquosos, havendo diferença significativa apenas entre TE e TA. Arabshahi-Delouee e Urooj (2007), ao avaliar extratos aquosos e metanólicos de folhas de *Morus indica L.*, verificaram que os metanólicos apresentavam melhor atividade antioxidante, sendo esta atribuída a capacidade

doadora de elétrons dos compostos presentes na amostra, principalmente compostos fenólicos. A correlação positiva entre teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante de frutas já foi observada por diversos autores (SOUZA *et al.*, 2012; ALMEIDA *et al.*, 2011).

Os compostos fenólicos presentes nas amoras testadas são capazes de doar elétrons e conseqüentemente tornar moléculas de radicais livres estáveis (JAYAPRAKASHA *et al.*, 2003). A presença de glicosídeos nas moléculas de flavonoides provoca redução da atividade antioxidante destes compostos por interferir na coplanaridade da molécula e conseqüentemente, reduzir o poder doador de elétrons (PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011). Como no presente trabalho não foi realizado nenhum processo de hidrólise destes carboidratos para o teste da atividade antioxidante, a presença destes glicosídeos podem ter interferido nos resultados.

A atividade antioxidante de frutas é proveniente da ação individual de compostos específicos, sendo que estes compostos podem agir por diferentes vias como sequestro de radicais, inibição da peroxidação lipídica e quelação de metais. Um mesmo composto pode apresentar elevada atividade antioxidante por um método e menor atividade por outro (ARABSHAHI-DELOUEE; UROOJ, 2007). Este fato pode explicar motivo pelo qual as frações clorofórmio e hexano apresentam atividade antioxidante similar à fração acetato por este método, enquanto que isto não ocorre no método de redução do radical DPPH e formação de espécies reativas de ácido tiobarbitúrico, como pode ser observado a seguir.

3.3.1.2 Redução do Radical DPPH

No método redução do radical DPPH, a redução da absorbância da solução está diretamente associada ao maior potencial antioxidante da amostra, visto que a redução da absorbância ocorre devido à redução da concentração do radical DPPH por captura de elétrons de uma molécula antioxidante (VASCO *et al.*, 2008; PÉREZ-GREGORIO *et al.*, 2011). Para expressão dos resultados, a partir das fórmulas geradas nas retas de cada extrato, obteve-se a EC_{50} , ou seja, a quantidade necessária de extrato para reduzir em 50% o radical DPPH. A FIGURA 24 apresenta os gráficos para cada extrato e a TABELA 12 os valores de EC_{50} .

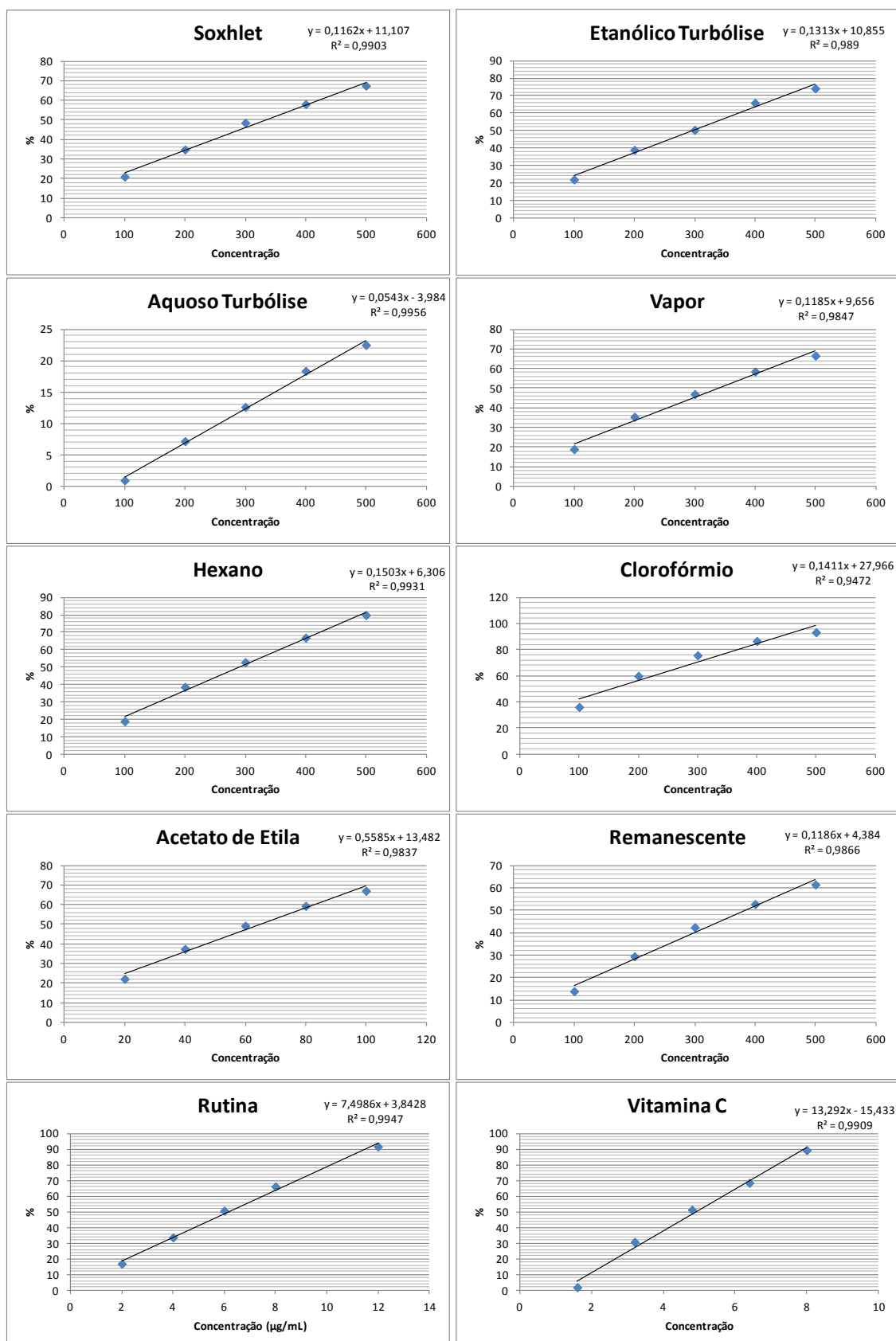


FIGURA 24 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA REDUÇÃO DO RADICAL DPPH
 FONTE: A autora (2013)

Como pode ser observado na TABELA 12, a fração que necessita de menor quantidade para reduzir em 50% o radical DPPH foi a fração acetato de etila, seguida pela fração clorofórmio, com necessidade de o dobro de extrato para se obter o mesmo efeito. Verifica-se que o extrato com a pior atividade antioxidante via redução do radical DPPH é o extrato bruto turbólise aquoso. Comparando aos dois padrões utilizados, ácido ascórbico e rutina, verifica-se a necessidade de cerca de dez vezes a concentração da fração com a melhor atividade (Act) para produzir o mesmo efeito no radical. Este fato pode ser explicado pela ação diferenciada existente entre um composto isolado, como é o caso das substâncias padrões, e um extrato, no qual há interferência de outros compostos e da matriz.

TABELA 12 – POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS E FRAÇÕES (EC₅₀)

EXTRATO	CONCENTRAÇÃO (µg/ml)
Ácido Ascórbico	4,92
Rutina	6,15
Act	65,37
Clo	156,16
Hex	290,69
TE	298,13
SOX	334,71
VA	340,46
Rem	384,62
TA	993,96

FONTE: A autora (2013)

Nota₁: Act: fração Acetato de Etila; Clo: fração clorofórmio; Hex: fração hexano; TE: extrato bruto turbólise etanólico; SOX: extrato bruto de soxhlet; VA: extrato bruto a vapor; Rem: fração remanescente; TA: extrato bruto turbólise aquoso.

Ercisli *et al.* (2010) verificaram que as amoras por eles analisados apresentavam moderada atividade antioxidante, pelo método da redução do radical DPPH, com média de 18,98µmol *trolox* equivalente/g de peso fresco, resultados estes expressos de maneira diferente da exposta no presente trabalho.

Imran *et al.* (2010), observaram que frutos da *Morus nigra* cultivada no Paquistão apresentavam baixa atividade antioxidante. Segundo os autores, extrato metanólico do fruto em concentração de 100µg/mL, foi capaz de reduzir em apenas cerca de 3% o radical DPPH, resultado este bem inferior ao apresentado pelo presente estudo. Já Sivaci e Sokmen (2004), obtiveram melhores resultados amoras cultivadas na Turquia. Os autores observaram EC₅₀ de 23,25 µg/mL em extrato metanólico de frutos da *Morus nigra*.

Arfan *et al.* (2012), verificaram os valores de EC₅₀ em extratos metanólicos e acetônicos de amoras cultivadas no Paquistão, sendo o extrato metanólico mais eficaz que o acetônico, apresentando EC₅₀ de 48µg/mL e 58µg/mL, respectivamente. Estes resultados diferem do presente estudo, visto que os extratos etanólicos, apresentaram EC₅₀ de 334 e 298µg/mL. Esta diferença pode ter ocorrido pelo fato de que Arfan e colaboradores removeram os açúcares livres por meio de resina Amberlite XAD, analisando apenas o extrato fenólico, enquanto que no presente estudo foi analisado o extrato total.

Arabshahi-Delouee e Urooj (2007), ao analisar extratos metanólicos de folhas da *Morus indica L.*, verificaram EC₅₀ de 79,5µg/mL, sendo este valor similar ao encontrado no extrato obtido a partir de acetato de etila com frutos da *Morus nigra* do presente estudo.

Comparando com outras frutas cultivadas no Brasil, os valores encontrados no presente estudo se aproximam com extratos etanólicos de polpa de araticum (148,82µg/mL) e pequi (298, 75µg/mL) observados por Roesler *et al.* (2007). Os mesmos autores verificaram melhor atividade antioxidante pelo método DPPH em extratos etanólicos, quando comparados a aquosos dos mesmos frutos (ROESLER *et al.*, 2007).

Kostić *et al.* (2013), observaram que o extrato aquoso de amoras apresentou 52% de capacidade em inibir o radical DPPH, enquanto que o extrato etanólico 40%. Este resultado difere dos aqui demonstrados, já que os extratos etanólicos apresentaram maior poder extrativo de substâncias antioxidantes que os aquosos. Esta diferença pode ser explicada pelo método extrativo, já que Kostić e colaboradores procederam a extração em banho de ultrassom, enquanto que o presente estudo por agitação mecânica em aparelho de turbólise e extração via aparelho de Soxhlet. Os mesmos autores observaram correlação entre a atividade antioxidante pelo método do DPPH e o teor de flavonoides dos frutos analisados. De fato, a fração acetato de etila apresentou tanto os maiores teores de flavonoides totais, quanto melhor atividade antioxidante pelo método radical DPPH. O mesmo ocorre com o extrato bruto turbólise aquoso, que apresentou os piores resultados para os dois métodos supracitados. Quanto à estrutura química de um flavonoide, quanto maior o número de hidroxilas ligadas à molécula, maior a atividade antioxidante (CAO *et al.*, 1997; GARCIA-ALONSO *et al.*, 2004).

TABELA 13– POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS BRUTOS (EC₅₀)

EXTRATO	EC ₅₀ (mg DE FRUTO FRESCO)
TE	7,45
SOX	9,96
TA	27,08
VA	69,77

FONTE: A autora (2013)

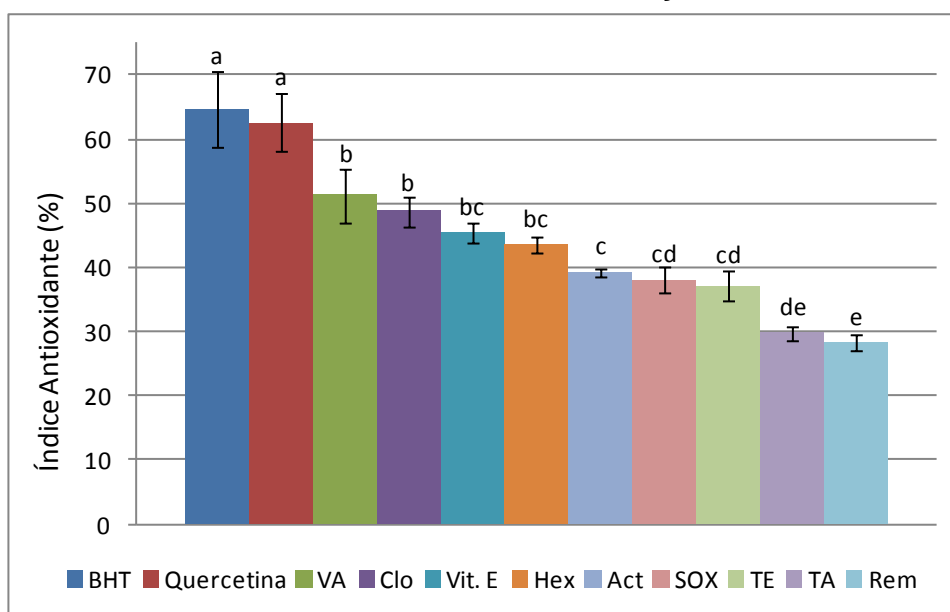
Nota₁: TE: extrato bruto turbólise etanólico; SOX: extrato bruto de soxhlet; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor;

Quanto os resultados de EC₅₀ são convertidos em peso fresco (TABELA 13), verifica-se que o extrato etanólico turbólise (7,45mg) é o mais eficaz, assim como verificado na análise de compostos fenólicos e flavonoides. Este resultado está de acordo com o obtido por Sultana *et al.* (2009), que, ao avaliar a atividade de redução do radical DPPH em diferentes extratos de plantas medicinais, observaram maior atividade no extrato obtido por agitação mecânica em comparação ao extrato por refluxo. Essa diferença foi explicada pelos autores como uma degradação dos compostos fenólicos no extrato obtido por refluxo, compostos estes responsáveis pela atividade antioxidante de extratos de plantas. Hojjatpanah *et al.* (2011), ao avaliar o efeito do emprego de calor em atributos qualitativos de sucos de amora, verificaram que a temperatura influencia na capacidade antioxidante do fruto, ocorrendo maior redução da atividade antioxidante pelo método da redução do DPPH quando este calor é aplicado sob condições de pressão.

3.3.1.3 Espécies Reativas de Ácido Tiobarbitúrico

A atividade antioxidante de extratos vegetais está associada com a capacidade dos compostos presentes no extrato em protegerem um sistema biológico da ação de radicais livres (ARNAO, 2000). Os resultados deste ensaio, a fim de avaliar a atividade antioxidante dos extratos e frações, estão dispostos no GRÁFICO 7.

GRÁFICO 7 – ÍNDICE ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS E FRAÇÕES



FONTE: A autora (2013)

Nota₁: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor; Hex: fração hexano, Clo: fração clorofórmio; Act: fração Acetato de Etila; Rem: fração remanescente.

Nota₂: Letras iguais não indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey.

Verifica-se que o extrato bruto a vapor, juntamente com a fração clorofórmio e hexano, apresentaram os melhores resultados, não diferindo estatisticamente do padrão de vitamina E e diferindo apenas cerca de 10 a 15% dos outros padrões BHT e quercetina. A vitamina E foi ainda estatisticamente igual aos demais extratos brutos, com exceção do turbólise aquoso, o qual, juntamente com a fração remanescente, apresentou os piores resultados para este ensaio.

Naderi *et al.* (2004), ao avaliar o efeito de extratos de amora na produção de malonaldeído em hepatócitos de ratos, percebeu que o extrato aquoso com 0,9% de NaCl foi o mais eficiente na redução da produção deste composto (80% de redução), seguido pelo extrato polifenólico (60%) e pelo extrato hidroalcoólico (57%). Apesar da metodologia empregada por estes autores ser diferente da utilizada no presente estudo, comprova-se que extratos de amora são capazes de reduzir a peroxidação lipídica.

Arabshahi-Delouee e Urooj (2007), ao avaliar extratos de folhas de *Morus indica*, verificaram índice antioxidante de 59,5% para o extrato acetônico e 36,9% para o extrato aquoso, resultado similar ao encontrado no presente estudo.

Por ter capacidade de agir na oxidação lipídica, extratos de amora podem também ser empregados na indústria alimentícia em substituição a antioxidantes

industriais como o BHT, que parece apresentar efeitos carcinogênicos. A peroxidação lipídica em alimentos provoca o aparecimento de sabores e odores indesejáveis, os quais são evitados com a adição de substâncias antioxidantes aos alimentos. O fato de um extrato aquoso apresentar potencial antioxidante é excelente do ponto de vista da segurança alimentar e nutricional, visto que, um extrato natural pode ser considerado como uma boa opção de substituição a um aditivo alimentar sintético que pode provocar efeitos adversos a saúde (RUFINO *et al.*, 2009, ARABSHAHI-DELOUEE; UROOJ, 2007). Além disso, a utilização de um antioxidante natural pode favorecer o processo industrial, já que estas substâncias são mais facilmente solubilizadas em solução aquosa. O emprego na indústria pode servir também como uma opção para o escoamento da produção ou reaproveitamento de resíduos formados durante o processamento industrial de frutas (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Garcia-Alonso *et al.* (2004), ao verificar atividade antioxidante em meio lipídico de frutas do tipo *berry* cultivadas na Espanha, verificaram EC₅₀ de 50µg para morangos, 55µg para framboesa, 74µg para cerejas, 76µg para amoras pretas e 78µg para mirtilo. No presente estudo, foram necessários 300µg de extrato seco para apresentar índice antioxidante de aproximadamente 50%. Garcia-Alonso *et al.* (2004), relacionaram a presença de antocianinas nos frutos analisados como fator importante para a atividade antioxidante em meio lipídico destas frutas. Segundo Bae e Suh (2007), as antocianinas parecem ter maior potencial antioxidante que a vitamina E *in vitro*. As antocianinas apresentam também alto poder de inibição da oxidação lipídica (SONG *et al.*, 2009).

3.3.2 Atividade Hemolítica

Este teste considerou como substância padrão a saponina, a qual foi capaz de formar um halo de hemólise de 2,1mm. O metanol, utilizado como padrão negativo, de fato não formou halo de hemólise. Entre os quatro extratos brutos e frações testadas, a única com atividade hemolítica foi a fração acetato de etila, como pode ser observado na FIGURA 25 a seguir. O halo de hemólise formado por esta fração foi de 0,6mm, representando 28,57% da saponina (controle positivo).

Acredita-se que efeito hemolítico não tenha sido causado pelo solvente acetato de etila, visto que todos os extratos foram completamente evaporados e posteriormente diluídos na mesma concentração de metanol.

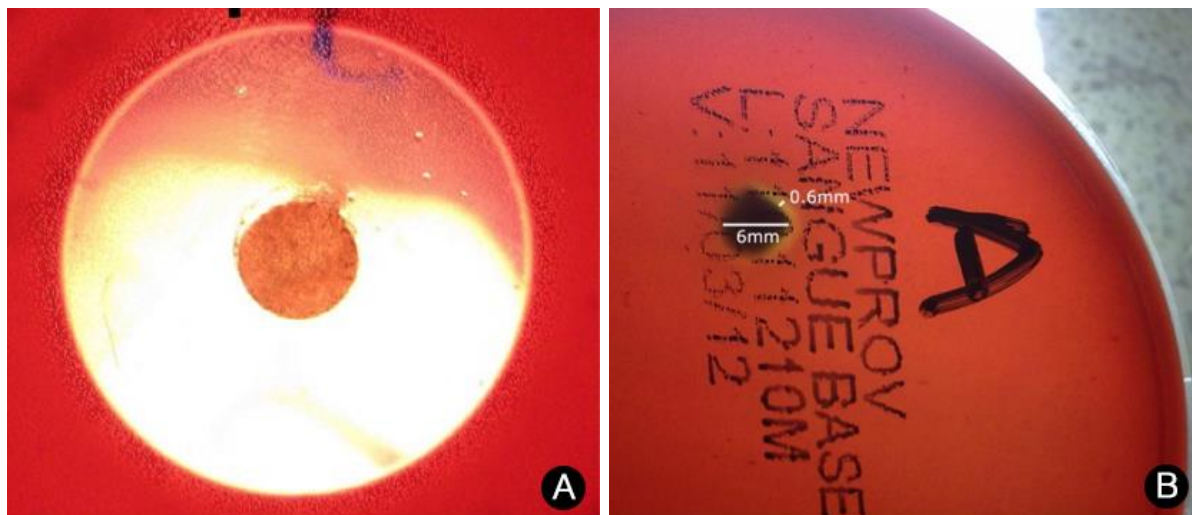


FIGURA 25 – ATIVIDADE HEMOLÍTICA

FONTE: A autora (2013)

Nota: a: Controle Positivo (Saponina); b: fração acetato de etila.

Como as saponinas são compostos que conhecidamente apresentam atividade hemolítica, foi aplicado o teste qualitativo para estas substancias e verificou-se reação positiva, devido a formação de espuma, como pode ser observado na FIGURA 26. Esse resultado indica que a atividade hemolítica desta fração pode ser atribuída à presença deste composto.

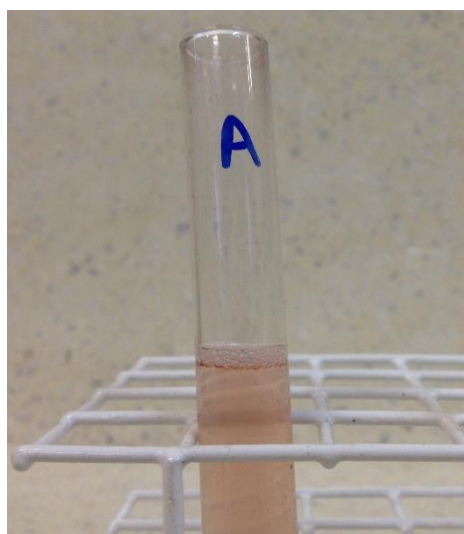


FIGURA 26 – FORMAÇÃO DE ESPUMA NA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA

FONTE: A autora (2013)

As saponinas são um grupo de glicosídeos vastamente distribuídos no reino vegetal. Apresentam, entre outras atividades biológicas, a ação hemolítica, a qual parece estar relacionada à interação deste composto com lipídeos presentes na membrana do eritrócito. Esta interação leva à formação de poros e consequente aumento da permeabilidade na membrana celular com subsequente liberação de hemoglobina para o plasma (GAUTHIER *et al.*, 2009; KAROU *et al.*, 2011; SPARG *et al.*, 2004). A estrutura química das saponinas interfere na atividade hemolítica apresentada por estes compostos. Segundo Kaiser *et al.* (2011), a ação hemolítica é aumentada pela presença de hidroxila em C-16, CH₂OH em C-17, grupamento acila em C-21 e acetila em C-22.

3.3.3 Atividade Antimicrobiana

Como pode ser observado na TABELA 14, a quantidade necessária para inibir o crescimento bacteriano é elevada, sendo que o extrato que apresentou melhores resultados foi o extrato bruto de soxhlet, o qual com 50% da dose necessária dos demais extratos foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Entretanto, pode-se considerar que nenhum extrato apresenta ação antimicrobiana de acordo com a classificação proposta por Holetz *et al.* (2002), na qual, extratos considerados ativos apresentam CIM inferior a 1000µg/µl.

TABELA 14 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DOS EXTRATOS BRUTOS

MICROORGANISMO	CIM (µg/µl)			
	SOX	TE	TA	VA
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	2500	>5000	5000	5000
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2500	>5000	5000	5000
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	1250	>5000	2500	2500
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1250	>5000	5000	2500

FONTE: A autora (2013)

Khalid *et al.* (2011), ao avaliar a atividade antimicrobiana de suco obtido a partir de frutos da *Morus nigra* pelo método de microdiluição em placa, observaram efeito inibitório positivo em bactérias Gram positivas e negativas, dentre elas *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Esses resultados são diferentes dos encontrados pelo

presente trabalho, contudo é importante ressaltar que o método utilizado estes autores também é diferente do utilizado no presente estudo.

Ordoñez *et al.* (2009), ao avaliar a atividade antimicrobiana de extrato de chuchu, verificaram CIM de 20 a 40 µg/µl para *E. coli* e *P. aeruginosa*. Os autores relacionaram esta atividade com a presença de flavonoides no vegetal. De fato, segundo Tesaki *et al.* (1999), os grupos hidroxilas presentes em um composto são os responsáveis pela atividade antimicrobiana contra *E. coli* e todos os substituintes do anel benzeno contra *S. aureus*. Entretanto, apesar de extratos de amora apresentarem moléculas com grupamentos hidroxila, a atividade antimicrobiana não foi observada em nenhum dos extratos testados

3.4 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina*

Os resultados do teste de toxicidade frente à *Artemia Salina* foram expressos em DL₅₀, ou seja, a dose capaz de levar a morte 50% dos organismos testados (TABELA 15).

TABELA 15 – TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA APRESENTADA PELOS EXTRATOS BRUTOS E FRAÇÕES

EXTRATO	MORTALIDADE/CONCENTRAÇÃO			DL ₅₀ (µg/mL)	IC 95% (µg/mL)
	10µg/mL	100µg/mL	1000µg/mL		
SOX	2	3	2	>1000	-
TE	4	4	14	>1000	-
TA	0	1	10	>1000	-
VA	2	3	14	>1000	-
Hex	5	0	3	>1000	-
Clo	5	2	3	>1000	-
Act	4	2	64	488,12	388,97-612,54
Rem	0	3	11	>1000	-
Etanol (C-)	0	0	0	>1000	-
Sulfato de Quinidina (C+)	3	26	85	177,38	136,9-229,9

FONTES: A autora (2013)

Nota: SOX: extrato bruto de soxhlet; TE: extrato bruto turbólise etanólico; TA: extrato bruto turbólise aquoso; VA: extrato bruto a vapor; Hex: fração hexano, Clo: fração clorofórmio; Act: fração Acetato de Etila; Rem: fração remanescente.

Segundo Meyer *et al.* (1982), um extrato é considerado tóxico se a DL₅₀ for inferior a 1000µg/mL e não tóxico se a DL₅₀ for maior que este valor. Verifica-se que apenas a fração acetato de etila apresentou toxicidade frente à *Artemia salina*, com uma DL₅₀ quase 3 vezes maior que o padrão sulfato de quinidina.

Este é um método que vem sendo empregado para verificar a citotoxicidade de extratos ou substâncias isoladas e apresenta boa correlação com citotoxicidade de tumores sólidos (APU *et al.*, 2010; ULLAH *et al.*, 2013). Para confirmar a toxicidade ou ação antitumoral, é necessário que o extrato seja posteriormente testado em animais, visto que inúmeros metabólitos secundários com ação citotóxica não específica podem estar presentes no extrato (ULLAH *et al.*, 2013).

A citotoxicidade no presente trabalho pode estar relacionada à presença de flavonoides em maior concentração na amostra, visto que a fração acetato apresentou o maior teor destes compostos. Segundo Cao *et al.* (2007), alguns flavonoides já demonstraram ação mutagênica *in vitro*.

A presença de flavonoides, com maior número de hidroxilas e em maior concentração nesta fração, pode levar a oxidação de biomoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, ocasionando a morte celular (YORDI; PÉREZ, 2012). Os flavonoides kaempferol e quercetina, que apresentam quatro e cinco hidroxilas, respectivamente, já demonstraram poder indutor de dano ao DNA e da peroxidação lipídica (CAO *et al.*, 1997). Estes dois flavonoides foram identificados na fração acetato de etila, conforme descrito no item 3.3 Identificação e Quantificação de

Substâncias Via CLAE do Capítulo III – Isolamento e Identificação de Compostos Bioativos em frutos da *Morus nigra L.*, da presente dissertação.

A quercetina oxidada pode ser considerada tóxica devido a sua possibilidade de reação com grupos tiol presentes em proteínas. Contudo, essa toxicidade ainda não foi comprovada *in vivo* (RUSSO *et al.*, 2012).

Além disso, um extrato pode apresentar toxicidade por este ensaio por exibir compostos tóxicos que apresentam ação ovicida ou larvicida (ULLAH *et al.*, 2013).

3.5 ELABORAÇÃO DE SUBPRODUTO

A elaboração de um subproduto a partir de frutos da *Morus nigra L.* se faz necessária pelo fato de que o processamento é a melhor maneira de disponibilizar o fruto ao longo do ano. Além do período de safra durar apenas dois meses, o fruto *in natura* apresenta baixa estabilidade de estocagem devido a frágil estrutura e elevado teor de água (HASSIMOTTO *et al.*, 2007; ERCISLI; ORHAN, 2007).

Com a impregnação de extrato ao resíduo, foi possível observar mudança da coloração e textura da matéria prima. Como pode ser observado em análise microscópica (FIGURA 27), a coloração se alterou de marrom para avermelhado, enquanto que a textura das partículas incorporadas parecem mais lisas e uniformes que as partículas do resíduo bruto.

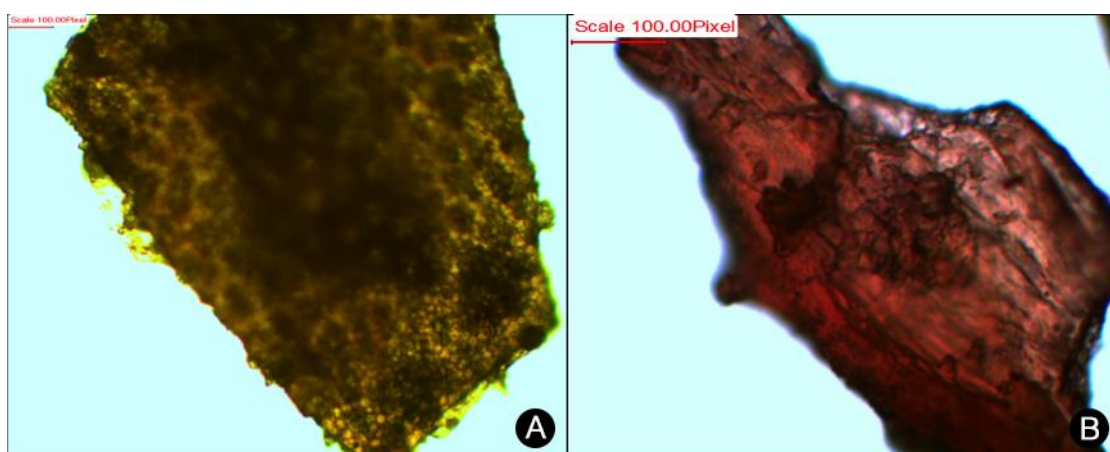


FIGURA 27 – RESÍDUO DA EXTRAÇÃO DE SOXHLET ANTES (A) E APÓS (B) INCORPORAÇÃO DE EXTRATO

FONTE: A autora (2013)

Quanto as pastilhas, a partir de um total de 100g de matéria prima, obteve-se nove pastilhas com consistência amolecida, formato uniforme e com peso médio de 8,74g cada. O sabor predominante foi o do mel, com fundo ácido característico da amora. O aspecto e tamanho das pastilhas podem ser observados na FIGURA 28.

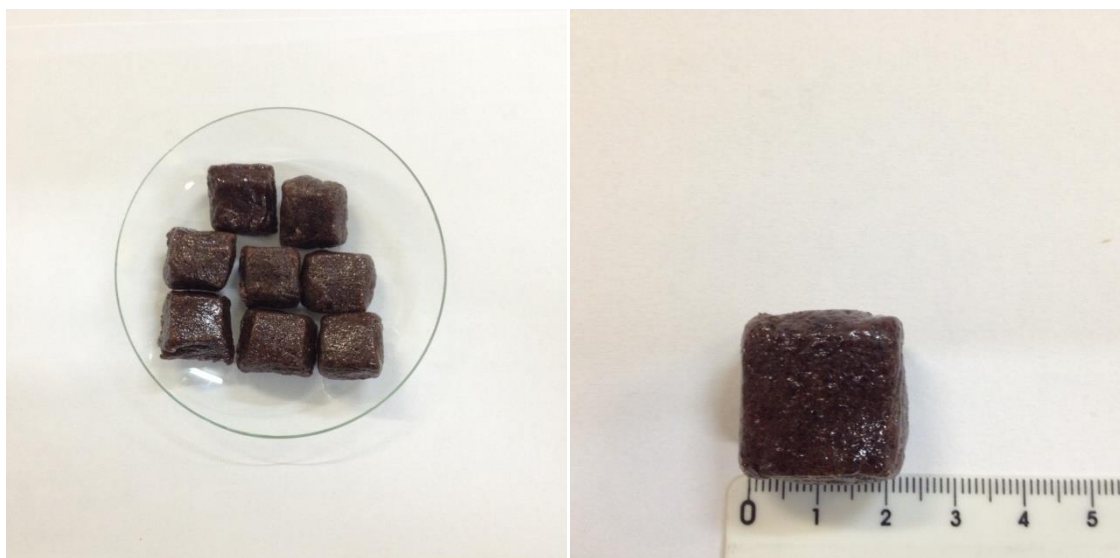


FIGURA 28 - PASTILHAS ELABORADAS A PARTIR DE EXTRATO DE AMORA
FONTE: A autora (2013)

Este subproduto é apenas uma proposta para a utilização do extrato bruto de amora, demonstrando que é viável agregar valor ao produto final sem o emprego de processos altamente industrializados, sendo portanto um estímulo ao estudo de outros produtos que empreguem o extrato incorporado e apresentem adequada composição nutricional.

A busca por novas opções de processamento se torna importante a fim de agregar valor ao produto final, visto que, em geral, os excessos de produção de frutas, normalmente são destinados à confecção de polpas e geleias, produtos que empregam baixa tecnologia para produção (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). A elaboração de pastilhas seria uma forma viável e prática de oferta do extrato incorporado à fibra residual do produto. Desta forma, a elaboração de extratos se torna sustentável, visto que o resíduo desta extração pode ser empregado na elaboração de produtos para consumo humano.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados reportados neste capítulo, pode-se concluir que:

- Os extratos brutos e frações obtidos a partir de frutos da *Morus nigra L.* apresentam compostos fenólicos e flavonoides, sendo a fração acetato de etila a mais eficaz na extração destes compostos. Dentre os extratos brutos, o extrato turbólise etanólico foi o mais eficaz na extração de compostos fenólicos enquanto que extrato à vapor foi o mais eficaz na extração de flavonoides.

- Quando associado o rendimento dos extratos aos doseamentos de compostos fenólicos e flavonoides, verificou-se que o extrato turbólise etanólico apresentou a maior concentração destes compostos, demonstrando que o processo extrativo influencia os resultados e que este extrato seria a melhor opção para elaboração de extratos de amora.

- Dentre os extratos brutos, o extrato turbólise etanólico também apresentou os melhores resultados em testes de atividade antioxidante com doação de elétrons ou moléculas de hidrogênio (redução do radical DPPH e formação do complexo fosfomolibdênio). Já na avaliação antioxidante em meio lipídico, o extrato a vapor demonstrou os melhores resultados dentre os extratos brutos.

- Quanto à inibição de crescimento bacteriano, verificou-se que nenhum extrato é útil para esta atividade, já que é necessária uma elevada concentração de extrato (>1250 µg/µl) para exibir efeito inibitório mínimo.

- A única fração que apresentou atividade hemolítica e toxicidade foi a fração acetato de etila, sendo necessário, portanto, maior investigação científica para o uso seguro desta fração.

- Quanto ao subproduto elaborado, pode-se dizer que é uma alternativa viável e sustentável, já que visa agregar valor comercial ao fruto e além disso, auxilia na redução de resíduos provenientes do processo extrativo ao meio ambiente.

CONCLUSÃO FINAL

Com base nos resultados do presente estudo, pode-se dizer que as amoras analisadas apresentam baixa densidade energética e elevado teor de fibras quando comparadas a outros frutos consumidos no Brasil. Além disso, extratos e frações elaborados a partir dos frutos apresentam compostos bioativos, como compostos fenólicos e flavonoides, os quais são responsáveis pela atividade antioxidante que o fruto apresenta.

São necessários outros estudos para comprovar as atividades biológicas *in vivo* deste frutos. Entretanto os resultados do presente trabalho apontam para o estímulo ao consumo dos frutos e para a utilização de extratos de amora no combate a radicais livres e conseqüente impacto positivo na saúde. O extrato bruto a vapor, apesar de apresentar baixo rendimento, pode ser mais explorado para aplicação clínica por não empregar solventes químicos em sua produção, ser uma boa fonte de flavonoides e apresentar ação contra a oxidação lipídica. Além dos extratos, as pastilhas podem ser consideradas outra forma de processamento, sendo uma opção viável e sustentável para oferta dos compostos bioativos presentes neste fruto.

Portanto, pode-se dizer que, devido ao valor nutricional e compostos bioativos que apresentam, as amoras se tornam uma opção para produção em escala comercial por agricultores brasileiros. Além de apresentar fácil cultivo, são fontes de compostos com ação antioxidante que podem impactar positivamente na saúde humana.

REFERENCIAS

ALMEIDA, M. M. B.; SOUSA, P. H. M. DE; ARRIAGA, Â. M. C. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, 2011.

APU, A. S.; MUHIT, M. A.; TAREQ, S. M. *et al.* Antimicrobial Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of the Leaves Extract of *Dillenia indica* Linn . **J. Young Pharm.**, v. 2, n. 1, p. 50-53, 2010.

ARABSHAHI-DELOUEE, S.; UROOJ, A. Food Chemistry Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. **Food Chem.**, v. 102, p. 1233-1240, 2007.

ARFAN, M.; KHAN, R.; RYBARCZYK, A.; AMAROWICZ, R. Antioxidant Activity of Mulberry Fruit Extracts. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, n. 2, p. 2472-2480, 2012.

ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals : a practical case. **Food Sci Tech**, v. 11, p. 419-421, 2000.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M. *et al.* Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 90-97, 2008.

BAE, S.; SUH, H. Antioxidant activities of five different mulberry cultivars in Korea. **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 40, p. 955-962, 2007.

BARRETO, G. P. M.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive Compounds from Several Tropical Fruits and Correlation by Multivariate Analysis to Free Radical Scavenger Activity. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 20, n. 10, p. 1856-1861, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebenson. Wiss.Technol.**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

CAO, G.; MUCCITELLI, H. U.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; PRIOR, R. L. Anthocyanins are absorbed in glycosylated forms in elderly women: a pharmacokinetic study. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 73, n. 5, p. 920-6, 2001.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **J. Food Drug Anal.**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Res. Int.**, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Review Phytochemicals : nutraceuticals and human health. **J. Sci. Food Agric.**, v. 80, n. 12, p. 1744-1756, 2000.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chem.**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra L.*) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Sci. Hortic.**, v. 116, n. 1, p. 41-46, 2008.

ERCISLI, S.; TOSUN, M.; DURALIJA, B.; SENGUL, M.; TURAN, M. Phytochemical Content of Some Black (*Morus nigra L.*) and Purple (*Morus rubra L.*) Mulberry Genotypes. **Food Technol. Biotechnol.**, v. 48, n. 1, p. 102-106, 2010.

FLACH, J.; KARNOPP, C.; CORÇÃO, G. Biofilmes formados em matéria-prima em contato com leite : fatores de virulência envolvidos. **Acta Sci. Vet.**, v. 33, n. 3, p. 291-296, 2005.

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.

GARCIA-ALONSO, M.; PASCUAL-TERESA, S. DE; SANTOS-BUELGA, C.; RIVAS-GONZALO, J. C. Evaluation of the antioxidant properties of fruits. **Food Chem.**, v. 84, p. 13-18, 2004.

GAUTHIER, C.; LEGAULT, J.; GIRARD-LALANCETTE, K.; MSHVILDADZE, V.; PICHETTE, A. Haemolytic activity, cytotoxicity and membrane cell permeabilization of semi-synthetic and natural lupane- and oleanane-type saponins. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 5, p. 2002-8, 2009.

HASSIMOTTO, N. M. A.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 8, p. 2928-35, 2005.

HASSIMOTTO, N.M.A.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Identification and Characterisation of Anthocyanins from Wild Mulberry (*Morus Nigra L.*) growing in Brazil. **Food. Sci. Tech. Int.**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.

HODGES, D. M.; DELONG, J. M.; FORNEY, C. F.; PRANGE, R. K. Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. **Planta**, v. 207, n. 4, p. 604-611, 1999.

HOJJATPANAH, G.; FAZAELI, M.; EMAM-DJOMEH, Z. Effects of heating method and conditions on the quality attributes of black mulberry (*Morus nigra*) juice concentrate. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 46, n. 5, p. 956-962, 2011.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R. *et al.* Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-31, 2002.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

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.; SELVI, T.; SAKARIAH, K. K. Antibacterial and antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. **Food Res. Int.**, v. 36, n. 2, p. 117-122, 2003.

KAISER, S.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Artigo Estudo da relação estrutura-atividade de saponinas hemolíticas e/ou imunoadjuvantes mediante uso de análise multivariada. **Ver. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 3, p. 300-309, 2010.

KAROU, S. D.; TCHACONDO, T.; OUATTARA, L. *et al.* Antimicrobial, antiplasmodial, haemolytic and antioxidant activities of crude extracts from three selected Togolese medicinal plants. **Asian Pac. J. Trop. Med.**, v. 4, n. 10, p. 808-13, 2011.

- KHALID, N.; FAWAD, S. A.; AHMED, I. Antimicrobial Activity , Phytochemical Profile and Trace Minerals of Black Mulberry (*Morus nigra* L.) Fresh Juice. **Pak. J. Bot.**, v. 43, n. SI, p. 91-96, 2011.
- KISHIDA, E.; KAMURA, A.; TOKUMARU, S. *et al.* Re-evaluation of Malondialdehyde and Thiobarbituric Acid-Reactive Substances as Indices of Autoxidation Based on Oxygen Consumption. **J. Agric. Food Chem.**, v. 41, n. 1, p. 1 - 4, 1993.
- KOSTIĆ, D. A.; DIMITRIJEVIĆ, D. S.; MITIĆ, S. S. *et al.* Phenolic Content and Antioxidant Activities of Fruit Extracts of *Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. **Trop. J. Pharm. Res.**, v. 12, n. 1, p. 105-110, 2013.
- KUTLU, T.; DURMAZ, G.; ATEŞ, B.; YILMAZ, İ.; ÇETİN, M. Ş. Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). **Turk. J. Biol.**, v. 35, p. 103-110, 2011.
- LIN, J.-Y.; TANG, C.-Y. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. **Food Chem.**, v. 101, n. 1, p. 140-147, 2007.
- MARTIN, C.; ZHANG, Y.; TONELLI, C.; PETRONI, K. Plants, Diet, and Health. **Annu. Rev. Plant Biol.**, v. 64, p. 18.1-18.28, 2013.
- MAZIMBA, O.; MAJINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 5, n. 6, p. 751-754, 2011.
- MENEZES, E. W. DE; SANTOS, N. C.; GIUNTINI, E. B. *et al.* Brazilian flavonoid database: Application of quality evaluation system. **J. Food Compos. Anal.**, v. 24, n. 4-5, p. 629-636, 2011.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. *et al.* Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.**, v. 45, n. 5, p. 31-4, 1982.
- NADERI, G. A.; ASGARY, S.; SARRAF-ZADEGAN, N.; OROOJY, H.; AFSHIN-NIA, F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother. Res.**, v. 18, n. 5, p. 365-9, 2004.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F *et al.* Fontes Naturais Vegetais de Antioxidantes. **Quim Nova.**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

ORDOÑEZ, A. A. L.; ORDOÑEZ, R. M.; ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I. Design and quality control of a pharmaceutical formulation containing natural products with antibacterial, antifungal and antioxidant properties. **Int. J. Pharm.**, v. 378, p. 51-58, 2009.

ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. **Sci. Hortic.**, v. 119, n. 3, p. 275-279, 2009.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395-400, 2001.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, n. 9, p. 3377-80, 2008.

PÉREZ-GREGORIO, M. R.; REGUEIRO, J.; ALONSO-GONZÁLEZ, E.; PASTRANA-CASTRO, L. M.; SIMAL-GÁNDARA, J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 44, n. 8, p. 1793-1801, 2011.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric Quantitation of Antioxidant Capacity through the Formation of a Phosphomolybdenum Complex: Specific Application to the Determination of Vitamin E. **Anal. Biochem.**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

PRIOR, RONALD L; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, n. 10, p. 4290-302, 2005.

RADOJKOVIĆ, M. M.; ZEKOVIĆ, Z. P.; VIDOVIĆ, S. S.; KOČAR, D. D.; MAŠKOVIĆ, P. Z. Free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid contents of mulberry (*Morus* spp. L., Moraceae) extracts. **Hem. Ind.**, v. 66, n. 4, p. 547-552, 2012.

ROESLER, R.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B. *et al.* Atividade antioxidante de frutas do cerrado Antioxidant activity of cerrado fruits. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

RUFINO, M.; FERNANDES, F.; ALVES, R.; DEBRITO, E. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chem.**, v. 114, n. 2, p. 693-695, 2009.

RUSSO, M.; SPAGNUOLO, C.; TEDESCO, I.; BILOTTO, S.; RUSSO, G. L. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy : Facts and fancies. **Biochem. Pharm.**, v. 83, n. 1, p. 6-15, 2012.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and Isolation of Phenolic Compounds. In: SARKER, S. D.; NAHAR, L. (Eds.). **Natural Products Isolation**. 3o. ed. [S.I.]: Humana Press, 2012. v. 864p. 427-464.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-phosphotungstic Acid Reagents. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SIVACI, A.; SÖKMEN, M. Seasonal changes in antioxidant activity , total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L . and *Morus nigra* L.). **Plant Growth Regul.**, v. 44, p. 251-256, 2004.

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.

SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. DE D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chem.**, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

SPARG, S. G.; LIGHT, M. E.; STADEN, J. VAN. Biological activities and distribution of plant saponins. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 219-43, out 2004.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of Extraction Solvent/Technique on the Antioxidant Activity of Selected Medicinal Plant Extracts. **Molecules**, v. 14, p. 2167-2180, 2009.

TESAKI, S.; TANABE, S.; MORIYAMA, M. *et al.* Isolation and Identification of an Antibacterial Compound from Grape and Its Application to Foods. **Nippon Nogeikagaku Kaishi**, v. 73, n. 2, p. 125-128, 1999.

THUONG, P. T.; HUNG, T. M.; NGOC, T. M. *et al.* Antioxidant Activities of Coumarins from Korean Medicinal Plants and their Structure – Activity Relationships. **Phytother. Res.**, v. 24, p. 101-106, 2010.

ULLAH, M. O.; HAQUE, M.; URMI, K. F. *et al.* Anti-bacterial activity and brine shrimp lethality bioassay of methanolic extracts of fourteen different edible vegetables from Bangladesh. **Asian Pac. J. Trop. Biomed.**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2013.

VASCO, C.; RUALES, J.; KAMAL-ELDIN, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. **Food Chem.**, v. 111, n. 4, p. 816-823, 2008.

VOLP, A. C. P.; RENHE, I. R. T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P. C. Flavonóides antocianinas : características e propriedades na nutrição e saúde. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 23, n. 2, p. 141-149, 2008.

YORDI, E. G.; PÉREZ, E. M. Antioxidant and Pro-Oxidant Effects of Polyphenolic Compounds and Structure-Activity Relationship Evidence. In: BOUAYED, J.; BOHN, T. (Eds.). **Nutrition, Well-Being and Health**. Croatia: InTech, 2012. p. 23-48.

WIKLER, M. A.; COCKERILL, F. R.; BUSH, K. *et al.* **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - Approved Standard**. 8^o. ed. Pennsylvania: CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. v. 29p. 1 – 65.