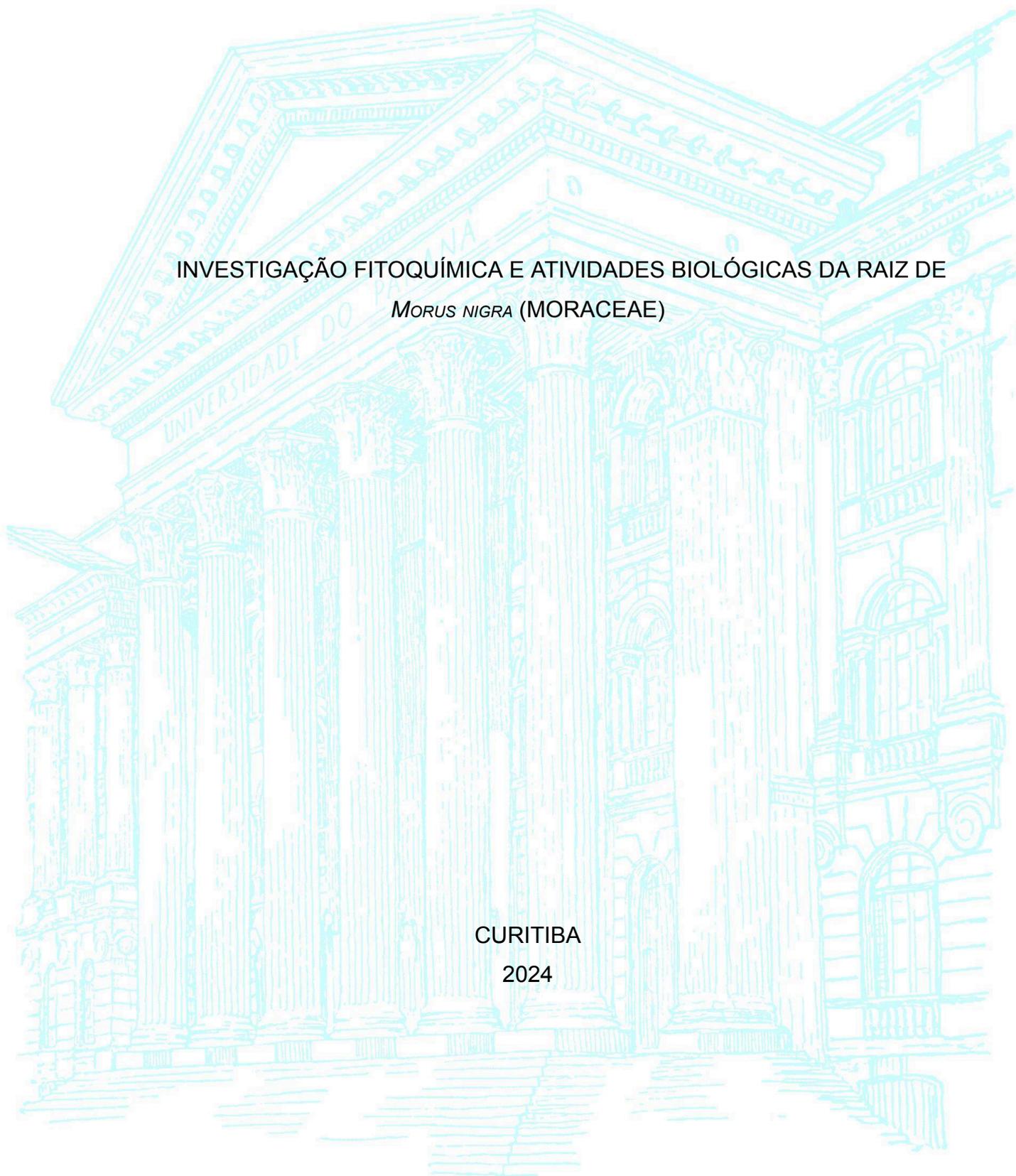


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CAROLINA COELHO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA RAIZ DE  
*MORUS NIGRA* (MORACEAE)

CURITIBA  
2024



Ana Carolina Coelho

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA RAIZ DE  
*MORUS NIGRA* (MORACEAE)

TCC apresentado ao curso de Graduação em Farmácia, Setor de ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Obdulio Gomes Miguel

CURITIBA

2024

## **TERMO DE APROVAÇÃO**

ANA CAROLINA COELHO

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DA RAIZ DE  
*MORUS NIGRA* (MORACEAE)

TCC apresentado ao curso de Graduação em Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel

Orientador – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 13 de dezembro de 2024.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, sempre presente nos momentos mais difíceis, foi uma fonte de força que me ajudou a superar as dificuldades. Iluminou meu caminho quando tudo parecia escuro e, sempre que precisei, renovou minha esperança e coragem para seguir em frente.

Ao meu pai, Laercio Santos Coelho, e à minha mãe, Anaclete Pavilak, minha eterna gratidão pelo amor incondicional, pela dedicação incansável e pelo apoio irrestrito em cada etapa desta jornada. Obrigado por estarem sempre ao meu lado, guiando-me e inspirando meus passos com sabedoria e força.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel, por me oferecer a oportunidade de iniciar minha trajetória na pesquisa científica, por acreditar em meu potencial e por toda a paciência ao longo desse processo. Agradeço por sua presença e por não desistir de mim, proporcionando um aprendizado inestimável que, sem ele, jamais teria alcançado.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marilis Dallarmi Miguel, pela co-orientação, pelo apoio constante e pela confiança.

A todos os professores do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, por compartilharem seu conhecimento e por toda a dedicação ao ensino.

Ao meu namorado, Rarel Ferner Silva, por seu carinho, compreensão e apoio em cada etapa desta caminhada. Agradeço por ter estado ao meu lado, ajudando em diversos momentos da minha pesquisa e me ouvindo sempre que precisei.

A todos que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste trabalho, meu mais sincero agradecimento.

## RESUMO

A *Morus nigra* L., popularmente conhecida como amoreira-preta, é uma planta originária da Ásia que se adaptou bem ao clima brasileiro. Essa espécie pertence à família Moraceae e é amplamente distribuída no Brasil nos biomas da Mata Atlântica, Cerrado, Pampa, Pantanal e Amazônia. A amoreira-preta é uma árvore de porte médio e seus frutos variam do roxo ao preto, sendo apreciados tanto por seu sabor quanto por suas propriedades medicinais. A *Morus nigra* é rica em compostos químicos que incluem alcalóides, cumarinas, triterpenos, esteróides e flavonóides. Estes compostos conferem à planta uma variedade de propriedades terapêuticas, explicando seu uso tradicional na medicina popular em tratamentos para condições inflamatórias e diabetes. Buscou-se, neste trabalho, realizar a coleta da raiz da espécie em questão, a extração dos compostos das raízes de *Morus nigra*, a obtenção do extrato bruto e suas frações, a determinação do teor de sólidos, a perda por dessecação e cinzas totais, o isolamento e identificação de uma substância precipitada durante a extração, a análise do perfil fitoquímico das frações, a avaliação da toxicidade preliminar do extrato bruto e suas frações, além da avaliação da atividade microbiológica do extrato bruto. Para verificar o perfil fitoquímico, realizou-se a extração em Soxhlet, o fracionamento foi feito pelo sistema de partição líquido-líquido, utilizando os seguintes solventes de polaridade crescente: hexano, clorofórmio e acetato de etila, já o teor de sólidos presentes no extrato bruto foi determinado utilizando a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª edição, a perda por dessecação foi determinado de acordo com a metodologia 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008) e as cinzas totais foi realizada de acordo com a metodologia descrita pela Farmacopéia Brasileira 6ª edição. Para realizar a investigação química/estrutural do precipitado foi utilizada a ressonância magnética nuclear (RMN). Em seguida foi realizada a pesquisa de metabólitos secundários via cromatografia em camada delgada e para separar os compostos foi empregada cromatografia líquida e Sephadex®. Para avaliar a toxicidade do extrato bruto e frações, empregou-se o teste in vitro frente à *A. Salina*, aplicando análise de CL<sub>50</sub> com o programa estatístico SPSS e para avaliar a atividade antimicrobiana a técnica de microdiluição em caldo. Obteve-se um isolado da raiz de *M. nigra* e a partir dos dados de RMN de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e DEPT 135, propôs-se para este isolado uma possível estrutura química de um composto orgânico que possui o grupo funcional carboxilato de cadeia longa e insaturada.. Foram obtidos resultados de teor de sólidos de 2,034%, perda por dessecação de 1,87% e o teor de cinzas totais de 3,41%. Também foi observado nas cromatografias a presença de cumarinas, taninos, esteroides, flavonoides e antraquinonas. Além disso, houve a comprovação que o extrato e suas frações não apresentaram toxicidade frente à *Artemia salina* e foi observado possíveis atividades antimicrobianas no extrato bruto contra *P. aeruginosa* ATCC® 27853, *S. aureus* ATCC® 6538 e *E. faecalis* ATCC® 29212. A partir dos resultados obtidos, pretende-se incentivar futuras pesquisas da raiz de *M. nigra*.

Palavras-chave: *Morus nigra* 1; Fitoquímica 2; Raiz 3; Atividades biológicas 4; Amora preta 5.

## ABSTRACT

*Morus nigra* L., popularly known as black mulberry, is a plant native to Asia that has adapted well to the Brazilian climate. This species belongs to the Moraceae family and is widely distributed in Brazil in the Atlantic Forest, Cerrado, Pampa, Pantanal and Amazon biomes. The black mulberry is a medium-sized tree and its fruits range from purple to black, and are appreciated both for their flavor and for their medicinal properties. *Morus nigra* is rich in chemical compounds that include alkaloids, coumarins, triterpenes, steroids and flavonoids. These compounds give the plant a variety of therapeutic properties, explaining its traditional use in folk medicine in treatments for inflammatory conditions and diabetes. This work sought to collect the root of the species in question, extract the compounds from the roots of *Morus nigra*, obtain the crude extract and its fractions, determine the solids content, loss due to desiccation and total ash, isolate and identify a substance precipitated during extraction, analyze the phytochemical profile of the fractions, evaluate the preliminary toxicity of the crude extract and its fractions, in addition to evaluating the microbiological activity of the crude extract. To verify the phytochemical profile, Soxhlet extraction was performed, fractionation was done by the liquid-liquid partition system, using the following solvents of increasing polarity: hexane, chloroform and ethyl acetate, while the solids content present in the crude extract was determined using the methodology described in the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition, the loss on drying was determined according to methodology 012/IV of the Adolfo Lutz Institute (2008) and the total ash was performed according to the methodology described by the Brazilian Pharmacopoeia 6th edition. To perform the chemical/structural investigation of the precipitate, nuclear magnetic resonance (NMR) was used. Then, the research of secondary metabolites was performed via thin layer chromatography and to separate the compounds, liquid chromatography and Sephadex® were used. To evaluate the toxicity of the crude extract and fractions, the in vitro test against *A. salina* was used, applying LC50 analysis with the SPSS statistical program and to evaluate the antimicrobial activity the broth microdilution technique. An isolate of the root of *M. nigra* was obtained and from the data of NMR of <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H and DEPT 135, a possible chemical structure of an organic compound that has the functional group carboxylate of long and unsaturated chain was proposed for this isolate. Results of solids content of 2.034%, loss on drying of 1.87% and total ash content of 3.41% were obtained. The presence of coumarins, tannins, steroids, flavonoids and anthraquinones was also observed in the chromatographies. Furthermore, it was proven that the extract and its fractions did not present toxicity against *Artemia salina* and possible antimicrobial activities were observed in the crude extract against *P. aeruginosa* ATCC® 27853, *S. aureus* ATCC® 6538 and *E. faecalis* ATCC® 29212. Based on the results obtained, we intend to encourage future research on the root of *M. nigra*.

Keywords: *Morus nigra* 1; Phytochemistry 2; Root 3; Biological activities 4; Blackberry 5.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: RAIZ DE <i>M. nigra</i> APÓS SECAGEM .....	19
FIGURA 2: COLUNA ACETATO DE ETILA.....	24
FIGURA 3: ESPECTRO RMN <sup>13</sup> C DO ISOLADO.....	33
FIGURA 4: ESPECTRO RMN <sup>1</sup> H DO ISOLADO.....	34
FIGURA 5: ESPECTRO RMN DEPT 135 DO ISOLADO.....	35

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE <i>Morus nigra</i> L.....	16
QUADRO 2 – COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS, REVELADORES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD.....	23
QUADRO 3 – RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS .....	27
QUADRO 4 – INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD .....	30
QUADRO 5 – CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO .....	37

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADO DA CCD.....	31
TABELA 2 – TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> APRESENTADA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES.....	36
TABELA 3 – TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> APRESENTADA PELO CONTROLE POSITIVO (SULFATO DE QUINIDINA).....	36

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1 PROBLEMA.....	14
1.2 OBJETIVOS.....	14
1.2.1 Objetivo geral.....	14
1.2.2 Objetivos específicos.....	14
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 MATERIAL VEGETAL .....	19
3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO.....	20
3.3 TEOR DE SÓLIDOS.....	20
3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO.....	21
3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	21
3.5.1 Perda por Dessecação.....	21
3.5.2 Cinzas Totais.....	22
3.6 ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO.....	22
3.7 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	22
3.7.1 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD).....	22
3.7.2 Cromatografia líquida em coluna da fração acetato de etila.....	23
3.7.3 Coluna Sephadex LH-20.....	24
3.7.4 Análise de RMN.....	25
3.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	25
3.8.1 Ensaio de toxicidade preliminar in vitro com <i>Artemia salina</i> Leach.....	25
3.8.2 Atividade antimicrobiana.....	26
<b>4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 TEOR DE SÓLIDOS.....	27
4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO.....	27
4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS.....	28

4.3.1 Perda por Dessecação.....	28
4.3.2 Cinzas Totais.....	29
4.4 ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO.....	29
4.5 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS.....	29
4.5.1 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD).....	29
4.5.2 Cromatografia líquida em coluna da fração acetato de etila.....	32
4.5.3 Coluna Sephadex LH-20.....	32
4.5.4 Análise de RMN.....	32
4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	35
4.6.1 Ensaio de toxicidade preliminar in vitro com <i>Artemia salina</i> Leach.....	36
4.6.2 Atividade antimicrobiana.....	37
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>39</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A *Morus nigra* L., conhecida como amoreira-preta, tem uma longa história de uso medicinal e é amplamente cultivada no Brasil desde sua introdução em 1811 por imigrantes japoneses (Corrêa, 1926). A planta adaptou-se bem ao clima tropical e subtropical brasileiro, sendo encontrada em diversas regiões do país, com destaque para o Vale do Rio São Francisco (Figueredo et al., 2018). Tradicionalmente, a *M. nigra* tem sido utilizada na medicina chinesa para o tratamento de condições como diabetes, hipertensão, reumatismo e distúrbios hepáticos, além de ser uma fonte de diversos compostos bioativos com propriedades terapêuticas, como flavonoides, antocianinas e triterpenos (Nomura et al., 2003; Zoofishan et al., 2019). Essas substâncias possuem atividades antioxidantes, hepatoprotetoras, anti-inflamatórias e antimicrobianas, o que reforça o potencial terapêutico da planta (Arshad et al., 2018; Oliveira et al., 2013). Em particular, as raízes da *M. nigra* têm demonstrado um grande potencial no tratamento de condições como hipertensão e diabetes, o que justifica a necessidade de investigar mais a fundo sua composição e propriedades biológicas.

A *Morus nigra* pertence à família Moraceae, que abrange cerca de 40 gêneros e 1.400 espécies, sendo as mais conhecidas as do gênero *Morus*, como *Morus alba* e *Morus rubra* (Zhekun; Gilbert, 2003). A família Moraceae tem uma ampla distribuição geográfica, sendo predominante em regiões tropicais e subtropicais, e inclui plantas de grande importância econômica, utilizadas na produção de alimentos, fibras, madeira e até na alimentação do bicho-da-seda, que se alimenta das folhas de amoreiras (*Morus alba*) (Imran et al., 2010).

O gênero *Morus*, em particular, é amplamente reconhecido por seu valor medicinal e nutricional, especialmente devido à presença de compostos fenólicos, como flavonoides e antocianinas, que possuem propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (Lin; Tang, 2007). Seu cultivo é incentivado tanto para a produção de frutos quanto para o uso das folhas, que servem de alimento para o bicho-da-seda (Imran et al., 2010). No Brasil, a *Morus nigra* tem sido cultivada principalmente pelo seu valor medicinal e pela utilização de seus frutos, que podem ser consumidos in natura ou processados em sucos, geleias e outros produtos alimentícios (Kumar, 2008).

Embora as folhas e frutos da *Morus* já sejam amplamente estudados e utilizados, as raízes da *M. nigra* permanecem menos exploradas. No entanto, pesquisas sobre outras espécies do gênero indicam que as raízes da *M. nigra* podem ter um grande potencial para o desenvolvimento de novos tratamentos medicinais (Hu et al., 2011).

## 1.1 PROBLEMA

As informações disponíveis sobre a *Morus nigra* L. ainda são limitadas a estudos pré-clínicos, abrangendo apenas extratos aquosos e etanólicos das folhas. No entanto, faltam informações sobre a segurança e as propriedades terapêuticas de outras partes da planta, como frutos, cascas e raízes, que também são comumente usadas em preparações tradicionais. Essa lacuna destaca a necessidade de estudos adicionais que explorem o perfil fitoquímico e a toxicidade dessas partes da planta.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Investigar a composição fitoquímica e as propriedades biológicas das raízes de *Morus nigra* L., visando identificar compostos e avaliar seu potencial terapêutico.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Realizar análise do teor de sólidos, a perda por dessecação e cinzas totais das raízes secas de *Morus nigra*.
- Realizar análise fitoquímica preliminar para identificar as principais classes de constituintes presentes no extrato bruto e suas frações.
- Preparar o extrato bruto e as frações de hexano, clorofórmio, acetato de etila e a fração residual a partir das raízes secas.
- Isolar compostos presentes na fração de acetato de etila por meio de técnicas cromatográficas.

- Identificar os compostos isolados por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
- Verificar a toxicidade do extrato e de suas frações frente ao microcrustáceo *Artemia salina*.
- Verificar a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e de suas frações contra as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538, *Escherichia coli* ATCC® 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853 e *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A espécie *Morus nigra* L., popularmente conhecida como amoreira-preta, amoreira-negra, sarça mora ou simplesmente amora, pertence à família Moraceae (Ercisli; Orhan, 2007). Originária do extremo oriente (Ásia), a amoreira-preta tem uma longa história de cultivo secular para utilização de suas folhas como alimento indispensável na sericultura, desempenhando um papel significativo na civilização da seda oriental (Nomura *et al.*, 2003). A planta pode ser encontrada em regiões temperadas e subtropicais da Ásia, África e América do Norte e pode crescer em uma grande variedade de condições climáticas, topográficas e de solo (De Pádua Lúcio *et al.*, 2018). Introduzida no Brasil por imigrantes japoneses por volta de 1811 (Corrêa, 1926), a amoreira-preta adaptou-se perfeitamente ao clima e solo do país. Atualmente, concentra-se principalmente na região conhecida como "Vale do Rio São Francisco" (Figueredo *et al.*, 2018). No entanto, sua distribuição geográfica abrange todas as regiões do Brasil: Norte (Amazonas, Pará), Nordeste (Bahia, Paraíba, Pernambuco), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (Pederneiras, 2023). O enquadramento taxonômico da amoreira-preta é apresentado no QUADRO 1.

QUADRO 1 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DE *Morus nigra* L.

HIERARQUIA	TAXONOMIA
Reino	Plantae
Divisão	Angiosperma
Classe	Equisetopsida
Subclasse	Magnoliidae
Ordem	Rosales
Família	Moraceae
Gênero	<i>Morus nigra</i> L
Espécie	<i>Morus</i> L

FONTE: Adaptado de Trópicos, 2023.

A *M.nigra* é uma árvore que pode chegar a 9 metros de altura, apresentando folhas ásperas, de formas diferentes atingindo em média 16 x 18 cm, escuras com

pecíolo de 1,5 a 2,5 cm amplamente ovadas, de coloração verde claro, agudas ou acuminadas nas pontas e serrilhada nas margens. Flores monoicas ou dioicas são pequenas, aparecendo em cachos escamosos de cerca de 1,3 cm, elas são verdes, pendentes e indefinidas, com floração no final do inverno. Frutos com um sincarpo ovóide composto por aquênios, cada um envolto por um cálice suculento. Geralmente, sua cor varia de violeta a preto no estágio máximo de maturação, com um comprimento de 1 a 2 cm. A polpa carnosa é comestível, com sabor doce e levemente ácido. É considerada uma planta de jardim, principalmente pelo efeito outonal de sua folhagem. (Corrêa, 1926; Figueredo *et al.*, 2018; Kumar, 2008; Vijayan, 2011). As raízes da *M. nigra* preferem solos lamacentos e arenosos. Com pH entre 5,5 e 6,5 e temperatura entre 24°C e 34°C para germinação e crescimento. Apresenta um sistema de raízes radiculares que prosperam com mínima fertilização (Arshad, 2018).

Estudos demonstraram diferentes grupos de compostos químicos presentes no gênero *Morus*, a exemplo de alcaloides, cumarinas, triterpenos, esteroides e especialmente flavonoides isoprenilados com interesse estrutural e biológico (Arshad, 2018; Nomura *et al.*, 2003).

A espécie *M. nigra*, é rica em ácido ascórbico reduzido, ferro, antocianinas monoméricas totais e principalmente flavonoides e os ácidos fenólicos (Zoofishan; Hohmann; Hunyadi, 2018). É utilizada na medicina tradicional chinesa há séculos, o chá preparado com folhas da *M. nigra* é amplamente utilizado em vários países, como China, Coreia, Japão e Brasil (Corrêa, 1926).

As folhas de *M. nigra* são usadas para tratar sintomas do climatério, tais como ondas de calor, calafrios, alterações no sono, alterações de humor, secura vaginal, perda óssea e aumento de peso (Costa *et al.*, 2020). Pesquisas etnomedicinais confirmaram o uso da *M. nigra* no tratamento desses sintomas, destacando seu potencial medicinal para estudos químicos e farmacológicos, principalmente como fonte de substâncias com atividade estrogênica (Miranda *et al.*, 2010).

O extrato etanólico livre de açúcar da *M. nigra* apresenta flavonoides, compostos fenólicos, rutinas e ácidos clorogênicos, enquanto nos frutos são encontrados lipídeos, ácidos graxos, vitamina C e minerais (Oliveira *et al.*, 2013). Investigações demonstraram a atividade hepatoprotetora promissora de extratos

aquosos metanólicos e etanólicos de *M. nigra* (Mallhi *et al.*, 2014), além do seu uso tradicional na icterícia (Abbasi *et al.*, 2009).

O extrato das folhas de *Morus nigra* L. também possui atividade antimicrobiana contra cepas de bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Proteus vulgaris*) e contra duas cepas de fungos (*Candida albicans* e *Candida glabrata*), com halo de inibição semelhante aos controles com Anfotericina B e Ciprofloxacino (Zhou *et al.*, 2019).

A amoreira também é reconhecida por seu papel no controle do diabetes mellitus (Oliveira *et al.*, 2013). Xiao Hu e colaboradores isolaram vários compostos dos galhos de *M. nigra*, capazes de aumentar a captação de glicose em adipócitos e promover o aumento da expressão de GLUT4, o que os torna promissores para explorar novos agentes na homeostase da glicose e no tratamento do diabetes tipo 2 (Hu *et al.*, 2011).

Foi determinada a capacidade redutora total dos extratos das folhas de *Morus nigra*, com valor de  $27,69 \pm 0,46$  mg QE g<sup>-1</sup>, demonstrando capacidade redutora total e atividade antioxidante da espécie (Schafranski *et al.*, 2022). Portanto, a pesquisa mostra que a *M. nigra* L. têm apresentado atividade antioxidante.

Dessa forma, a *M. nigra* destaca-se como uma planta com potencial terapêutico, abrangendo diversas propriedades, desde antioxidante, antinociceptivo, antidiabéticas e antimicrobiana, até propriedades anticancerígenas e relacionadas à saúde da mulher (Abbasi *et al.*, 2009).

As raízes de *Morus nigra* apresentam uma composição química rica e variada, destacando-se pela presença de prenilflavonóides e compostos fenólicos, incluindo constituintes prenilados e geranilados, bem como adutos do tipo Diels-Amieiro com uma grande diversidade de sistemas de anéis (Zoofishan; Hohmann; Hunyadi, 2018). É encontrado também em maior quantidade o constituinte químico pertence a classe do estilbeno (oxiresveratrol) com o percentual de 10%, obtidos através do extrato bruto em acetona (Mascarello *et al.*, 2018). A casca da raiz de algumas espécies de *Morus* é denominada "Mori Cortex", no medicamento tradicional chinês, e tem sido historicamente utilizada para tratar condições como diabetes, artrite e reumatismo (Nomura *et al.*, 2003).

A atividade antiespasmódica das raízes de *M. nigra* é comprovada, e o extrato metanólico da casca dessa raiz contém três compostos flavonoides e

difenilpropanoides principais: kuwanon U, albanol e moracina O. Kuwanon U e albanol demonstram potencial equivalente à papaverina. No entanto, a moracina O apresenta uma atividade antiespasmódica ainda mais forte que a papaverina, especialmente quando testada em músculos lisos, como os da traqueia de ratos (Zoofishan et al., 2019).

Além disso, as raízes de *M. nigra* são reconhecidas pelo seu teor de morusina, um importante antioxidante fenólico. A morusina não apenas exibe atividade antioxidante, mas também foi identificada como um potente agente quimiopreventivo in vitro (Zoofishan; Hohmann; Hunyadi, 2018). A utilização popular das raízes de *M. nigra* inclui o tratamento de hipertensão arterial, reumatismo, problemas oculares e espasmos infantis (Padilha et al., 2010). Dessa forma, as propriedades químicas e medicinais das raízes de *M. nigra* destacam-se, oferecendo uma perspectiva interessante para aplicações terapêuticas e estudos adicionais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAL VEGETAL

Raízes de *M. nigra* foram coletadas de uma única árvore, na cidade de São João do Triunfo, Paraná, nas coordenadas geográficas latitude-25,6617345 e longitude-50,1494832, no dia 4 do mês de março de 2024. A pesquisa científica com a *M. nigra* foi cadastrada no sistema eletrônico SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado), gerando o número do cadastro: A9B8EE2. Obteve-se 2 kg da raiz, que foram lavadas e secas em estufa a 50°C, ao abrigo da luz (pode-se observar a raiz após a secagem na FIGURA 1). Em seguida, o material vegetal foi triturado em um triturador comercial, obtendo-se 800 g de raiz seca e triturada.

FIGURA 1 – RAIZ DE *M. nigra* APÓS SECAGEM.



FONTE: A autora (2024)

### 3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

Para elaboração da extração etanólica, utilizando etanol 80% (v/v) como líquido extrator, 800g de raiz seca e triturada foram submetidos a extração em Soxhlet modificado segundo Carvalho *et al.*, (2009) (número de registro PI 0601703-7). A extração dos 800 g da amostra foi realizada em duas vezes, utilizando metade do material em cada extração. A duração da extração foi de 4 dias consecutivos totalizando 32 horas não consecutivas para cada metade do material.

### 3.3 TEOR DE SÓLIDOS

A determinação do teor de sólidos foi realizada com o extrato etanólico, e em triplicata. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). A técnica consistiu em levar 5mL de extrato, em placa de petri previamente pesada, a secar em estufa a cerca de 100°C até peso

constante. A diferença encontrada entre o peso final e o peso da placa de petri corresponde ao teor de sólidos por 5 mL de extrato. Para expressar os resultados, foi calculada a proporção de resíduo sólido por mL de extrato e, a partir deste resultado e do teor de sólidos por mL, aplicou-se a fórmula demonstrada na fórmula 1:

$$\text{Rendimento (\%)} = \frac{\text{Volume EB X Teor de sólidos \% X 100}}{\text{Planta seca}}$$

Onde:

Volume EB = Volume de extrato bruto obtido em mL.

Planta seca = Quantidade de planta seca e triturada em g utilizada para a obtenção do extrato bruto.

### 3.4 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

A obtenção de frações foi realizada pelo sistema de partição líquido-líquido, por meio de aparelho Soxhlet modificado segundo Carvalho et al., (2009). Foram utilizados solventes de polaridade crescente, na seguinte ordem: hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração restante foi denominada remanescente etanólico.

O fracionamento do extrato bruto em escala de polaridade é realizado para auxiliar na separação e identificação das classes de metabólitos com atividades nos ensaios.

### 3.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 3.5.1 Perda por Dessecação

A perda por dessecação das raízes da *Morus nigra* foi verificada por secagem direta em estufa de acordo com a metodologia 012/IV do Instituto Adolfo Lutz (2008). Aproximadamente 1g de raiz triturada foi levada à estufa a 105°C em cadinho de porcelana previamente padronizado e mantidos até apresentarem peso constante. O experimento foi realizado em sextuplicata. A perda por dessecação foi obtida a partir da diferença entre a amostra seca e o peso do cadinho de porcelana. Os valores foram expressos em teor por 100g de raiz.

### 3.5.2 Cinzas Totais

A análise de cinzas totais foi realizada de acordo com a metodologia da Farmacopéia Brasileira 6ª edição (Brasil, 2019). Aproximadamente 1g de raiz triturada, em sextuplicata, foram pesados em cadinho previamente padronizado e levados à secura e carbonização em chapa elétrica. Posteriormente, a amostra foi incinerada em mufla a 550°C, até eliminação do carvão, e resfriada em dessecador até o momento da pesagem. O teor de cinzas totais foi obtido a partir da diferença existente entre a amostra após incineração e o peso do cadinho. Os resultados foram expressos em teor de 100 g de raiz.

### 3.6. ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

Depois da obtenção do extrato bruto da *M. nigra*, observou-se a formação de um precipitado branco e amorfo no fundo do balão, foi observada sua presença também em menor quantidade nos fracionamentos. Esperou-se decantar todo o precipitado no fundo do balão usado para extração, logo após separou o precipitado do solvente extrator com ajuda de um filtro sinterizado acoplado a um kitasato ligado à uma trompa de vácuo, de forma que foi retirada a fase que estava o extrato e deixado o precipitado no fundo. Realizou-se lavagens com acetona no precipitado até o solvente empregado sair límpido, indicando que a amostra foi purificada.

Dessa forma foi realizado o isolamento do chamado precipitado branco. Após a evaporação completa do solvente, o isolado foi armazenado em recipiente de vidro com tampa e pesado em balança analítica. O peso do precipitado isolado foi de 0,378g.

### 3.7 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

#### 3.7.1 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD)

Os particionamentos foram submetidos a cromatografia de camada delgada (CCD) em placas de sílica, foram solubilizadas em metanol, utilizando como fases móveis e reveladores os listados no QUADRO 2.

QUADRO 2 - COMPOSIÇÃO DOS SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS, REVELADORES E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD

<b>METABÓLITOS SECUNDÁRIOS</b>	<b>FASE MÓVEL</b>	<b>REVELADOR</b>	<b>RESULTADO</b>	<b>REFERÊNCIAS</b>
<b>ALCALÓIDES</b>	Clorofórmio:m etanol (95:5) + (universo amônia)	Dragendorff	Coloração alaranjado forte na presença de alcalóides	Valente, <i>et al.</i> 2006.
<b>CUMARINAS</b>	Tolueno:acetato de etila (80:20)	Reativo de NEU e Hidróxido de sódio 1N	Coloração azul ou verde quando expostas a luz UV	Miguel, 2003.
<b>ESTERÓIDES E TRITERPENOS</b>	Tolueno:acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica 1%	Coloração rosa/violácea após aquecimento em estufa a 105°C	Wagner, 1996
<b>FLAVONÓIDES</b>	Acetato de etila:ácido fórmico:água destilada (95:3:2)	Reativo de NEU	Desenvolvimento de coloração amarela em luz UV	Wagner, 1996
<b>TANINOS</b>	Acetato de etila:ácido fórmico:água destilada (95:3:2)	Cloreto férrico	Coloração verde: taninos condensados. Coloração azul: taninos hidrolisáveis. Coloração marrom: compostos fenólicos	Wagner, 1996
<b>ANTRAQUINONAS</b>	Acetato de Etila:Metanol: Água (100:17:13)	Hidróxido de Potássio 5gr+ Etanol qsp 100ml	Coloração vermelha	Wagner, 1996

FONTE: Adaptado de Sartor (2020)

NOTA: Reativo de NEU: difenilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol 4000 5% em etanol

### 3.7.2 Cromatografia Líquida em Coluna da Fração Acetato de Etila

A fração Acetato de Etila do extrato alcoólico foi submetida à coluna cromatográfica com fase estacionária Sílica G60 e fase móvel hexano/acetato de etila, acetato de etila/metanol e metanol/água.

Para a preparação da sílica G60 e montagem da coluna cromatográfica, foram seguidos os passos: Primeiro, 56 g de sílica G60 foram misturados em bquer com 200 ml de hexano. Essa mistura foi depositada em uma coluna de vidro. Em seguida, um papel filtro foi colocado sobre a sílica G60. A amostra, contendo 38 mg diluídos em metanol em ultrasonicador, foi incorporada em 40 g de sílica G60 em grau de porcelana. A sílica G60 impregnada foi adicionada à coluna, seguida por outro papel filtro para garantir a descida homogênea de solvente. A FIGURA 2 ilustra a coluna cromatográfica vista sob luz ultravioleta que demonstra luminescência que pode indicar presença de compostos flavonoides.

FIGURA 2 – COLUNA ACETATO DE ETILA



FONTE: A autora (2024)

A eluição iniciou com 40% 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%. Ao atingir 100% de metanol, iniciou-se novo gradiente de polaridade com metanol e água, também com variação de 5%. A última eluição foi com 70% de metanol e 30% de água. Foram obtidas 235 subfrações recolhidas em frascos de vidro e levadas à secura a temperatura ambiente para cristalização dos compostos.

### 3.7.3 Coluna Sephadex® LH-20

Na coluna cromatográfica Sephadex® LH-20, foram utilizadas 3 partes agrupadas das subfrações obtidas na cromatografia em coluna da fração acetato de etila. O solvente utilizado foi uma solução de metanol 90% e água 10%.

As amostras foram diluídas em metanol e adicionadas individualmente à coluna Sephadex® LH-20. O processo com a solução de metanol e água foi passado pela coluna até sair límpido. Os frascos recolhidos foram acondicionados em temperatura ambiente até completa evaporação para visualização dos compostos.

#### 3.7.4 Análise de RMN

Para elucidar a substância que foi isolada da *M. nigra* L., a amostra foi preparada em solução homogênea com clorofórmio em tubo de RMN de 5mm. Foi empregada ressonância magnética nuclear (RMN) de <sup>13</sup>C, <sup>1</sup>H e DEPT 135. Utilizou-se equipamento de Ressonância Magnética Brucker® modelo DPX 200 MHz, operando a 4,7 Tesla, observando os núcleos de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C a 200,12 e 50,56 MHz, respectivamente realizado no Laboratório de RMN do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

### 3.8 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 3.8.1 Ensaio de toxicidade preliminar in vitro com *Artemia salina* Leach

O ensaio de letalidade em *Artemia salina* Leach, foi utilizado para testar a toxicidade do extrato bruto e suas frações frente aos microcrustáceos. O método utilizado foi o de Meyer (1982) com modificações (Dos Anjos, 2023). Para a eclosão dos ovos das *Artemia salina* foi preparada uma solução salina (água do mar artificial), utilizando 14,31 g de sal marinho (Blue Treasure Sea Salt) em 400 mL de água purificada. O pH da solução ficou em 9. Foi adicionado 200mg de *Artemia salina* Leach a água salina com temperatura em torno de 20°C, sob iluminação de 20W e oxigenação mecânica por 48 horas até a eclosão dos cistos. O teste consistiu em adicionar 5 ml de solução salina com as concentrações de 100, 250, 500, 750 e 1000 µg/mL do extrato e frações solubilizadas em 10% de DMSO (dimetilsulfóxido). Para controle negativo foi utilizada solução com 50 µL de DMSO e para controle

positivo sulfato de quinidina, nas concentrações 10, 20, 30, 40 e 50 µg/mL. Todos os grupos e concentrações do teste foram realizados em quintuplicata. Em cada frasco foram acondicionados 10 náuplios de *A. salina* e depois de 24 horas foi realizada a contagem dos náuplios vivos e mortos. Os dados obtidos foram analisados com auxílio da análise estatística pelo método probitos no software SPSS versão 22.0, para determinar a dose letal capaz de matar 50%, o CL<sub>50</sub>. Considerando o intervalo de confiança (IC) de 95%.

### 3.8.2 Atividade Antimicrobiana

Este método foi aplicado para o extrato bruto para avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o ensaio microbiológico com quatro cepas bacterianas: *Escherichia coli* ATCC® (American Type Culture Collection) 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538 e *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços (12 colunas e 8 linhas identificadas de A a H), seguindo a técnica de microdiluição.

Para o preparo da solução mãe, foram pesados 200 mg do extrato ou composto em um béquer, dissolvidos em 1 ml de DMSO, obtendo-se assim uma concentração final de 200 mg/ml.

As cepas bacterianas foram inicialmente reativadas (refreshing) em meio de cultura sólido Muller Hinton (Difco®), incubadas a 37°C por 20-24 horas. Em seguida, foram suspensas em solução salina estéril (NaCl a 0,85%) para ajustar a turbidimetria a 0,5 na escala de McFarland, correspondente a  $1,0 \times 10^8$  UFC/ml. Esta suspensão foi então diluída na proporção de 1:20, resultando em uma concentração final de  $5 \times 10^5$  UFC/ml.

O ensaio foi realizado na capela de fluxo laminar. Para cada microplaca estéril aberta, foi adicionado meio líquido e o extrato seguindo o esquema descrito a seguir: No primeiro poço: 190 µl de meio líquido Muller Hinton + 10 µl de extrato 20 mg/ml, no segundo poço: 100 µl de meio líquido Muller Hinton + 100 µl do conteúdo do primeiro poço, no terceiro poço: 100 µl de meio líquido Muller Hinton + 100 µl do conteúdo do segundo poço. Descartar 100 µl para equiparar os volumes dos poços,

no quarto poço: 100 µl de meio líquido Muller Hinton + 100 µl de DMSO (Controle negativo). Descartar 100 µl para equiparar os volumes dos poços.

Em cada poço, foram inoculados 10 µl da suspensão bacteriana preparada ( $5 \times 10^5$  UFC/ml). As microplacas foram então incubadas em estufa bacteriológica a 35°C por cerca de 18 horas. O teste foi realizado em triplicata com o extrato bruto. Após o período de incubação, foi realizada a leitura visual dos resultados, onde a turvação dos poços indicou o crescimento bacteriano, enquanto a ausência de turvação indicou atividade inibitória do extrato testado.

## 4 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TEOR DE SÓLIDOS

O teor de sólidos é uma medida que indica a quantidade de substâncias não voláteis presentes em um extrato. Em um extrato vegetal, os sólidos geralmente consistem em compostos como fitoquímicos, açúcares, proteínas, minerais, entre outros. É expresso como uma porcentagem em relação ao peso total do extrato. O extrato etanólico possui um teor de sólidos de 2,034%. Em outro estudo, obtiveram teor de sólidos de 15,43% utilizando as folhas de *M. nigra* (Guizzo et al., 2015). Apesar do baixo valor obtido em comparação com o estudo de Guizzo, os resultados obtidos estão de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia brasileira 6ª ed. Diante disso, pode-se sugerir que o baixo valor observado reflete a baixa concentração de substâncias não voláteis na planta em questão.

### 4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

A partir do extrato bruto foram obtidas quatro frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e remanescente, correspondendo a quatro polaridades. Abaixo está o QUADRO 3 que corresponde ao rendimento em gramas de cada fração obtida.

QUADRO 3 -RENDIMENTO DAS FRAÇÕES OBTIDAS

Frações	Quantidade (g)
Hexânica	39,00

<b>Clorofórmica</b>	42,92
<b>Acetato de Etila</b>	40,00
<b>Remanescente</b>	59,76

FONTE: A Autora (2024).

A fração que possuiu o maior rendimento foi a remanescente e a que possuiu o menor rendimento foi a hexânica.

A divisão do extrato bruto em frações com diferentes polaridades é uma etapa importante na análise química de extratos de plantas ou outros materiais biológicos. Essa abordagem permite a investigação mais detalhada dos compostos individuais e de suas potenciais propriedades biológicas. A partir do fracionamento é possível maior purificação dos extratos. Os solventes menos polares como hexano e clorofórmio são úteis para a extração de compostos lipofílicos como carotenóides, terpenos e lipídeos (SANTOS BUELGA, 2012).

### 4.3 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

#### 4.3.1 Perda por Dessecação

O resultado da perda por dessecação presente na casca da raiz da amora foi de 1,87%. Os resultados obtidos por este trabalho estão abaixo dos valores esperados para cascas de raízes secas que é de 8 a 14% (Oliveira *et al*, 2014). O baixo percentual de umidade é muito importante para a conservação e não proliferação de agentes deletérios como fungos e bactérias.

#### 4.3.2 Cinzas Totais

A determinação de cinzas totais permite a verificação de impurezas inorgânicas não voláteis, tanto de origem fisiológica (carbonatos, fosfatos, cloretos e óxidos) quanto de origem não fisiológica (areia, pedra, gesso e terra), e que podem estar presentes como contaminantes (Simões *et al*, 2017).

O resultado de cinzas totais presente na casca da raiz da amora foi de 3,4122%. Considerando a escassez de estudos contendo o teor de cinzas da casca da raiz do gênero *Morus*, o resultado do teor de cinzas totais do presente estudo foi comparado a teores de cinzas totais da casca da raiz de uma planta da mesma família moraceae, a *Streblus asper* Lour, que possui 15% de cinzas (Madhavan , et. Al, 2009). A *M. nigra* possui um teor de cinzas menor que a *Streblus asper* Lour.

#### 4.4 ISOLAMENTO DE CONSTITUINTE QUÍMICO

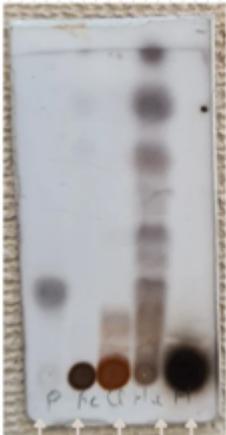
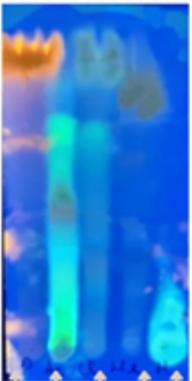
Foi obtido 0,378g do isolado que possuía a característica de precipitado branco amorfo. Com um rendimento, em relação ao extrato bruto, de 3,1832% e em relação ao peso total de planta de 0,0202%. A análise RMN sugere que a substância isolada seja um hidrocarboneto de cadeia longa.

#### 4.5 IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS

##### 4.5.1 Análise de cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram analisados, de forma qualitativa, os principais metabólitos secundários com os seus respectivos reveladores, sendo considerado presente o metabólito que demonstrou marcações com as colorações esperadas para cada metabólito, conforme QUADRO 4.

QUADRO 4 - INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS DA CCD

METABÓLITOS		
Imagens CCD		
<p><b>ALCALOIDES</b></p>  <p>Padrão Hexano Clorofórmio Ac. de Etila Remanescente</p>	<p><b>CUMARINAS</b></p>  <p>Padrão Clorofórmio Remanescente Ac. de Etila Hexano</p>	<p><b>ESTERÓIDES</b></p>  <p>Padrão Clorofórmio Remanescente Ac. de Etila Hexano</p>
<p><b>FLAVONOIDES</b></p>  <p>Padrão Clorofórmio Remanescente Ac. de Etila Hexano</p>	<p><b>TANINOS</b></p>  <p>Padrão Clorofórmio Remanescente Ac. de Etila Hexano</p>	<p><b>ANTRAQUINONAS</b></p>  <p>Padrão Clorofórmio Remanescente Ac. de Etila Hexano</p>

FONTE: A Autora (2024).

NOTA: CCD: Cromatografia em Camada Delgada; Ac. de Etila: Acetato de Etila.

TABELA 1 - RESULTADO DA CCD

<b>METABÓLITO SECUNDÁRIO</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>ALCALÓIDES</b>	Negativo
<b>CUMARINAS</b>	Positivo
<b>TRITERPENOS/ESTERÓIDES</b>	Positivo
<b>FLAVONOIDES</b>	Positivo
<b>TANINOS</b>	Positivo
<b>ANTRAQUINONAS</b>	Positivo

Fonte: A autora 2024.

NOTA: CCD: Cromatografia em Camada Delgada.

**Alcalóides:** não foram evidenciados nas amostras analisadas, pois não houve formação de banda colorida em nenhuma das amostras, apenas no padrão de papaverina.

**Cumarinas:** A fluorescência azul-esverdeada presente na fração hexano nos sugere a possível presença de cumarinas.

**Triterpenos/Esteroides:** após aquecimento em estufa a 105°C, pode-se observar formação de coloração violácea na fração hexano, indicando a possível presença de esteróides.

**Flavonoides:** após a visualização em luz UV, observou-se que a coloração amarela característica dos flavonoides foi observada no extrato bruto cetônico, nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano do extrato cetônico e na fração acetato de etila do extrato alcoólico, indicando a possível presença de flavonoides.

**Taninos:** após revelação com cloreto férrico foram observadas bandas de coloração marrom na fração clorofórmio indicando presença de compostos fenólicos e coloração esverdeada na fração hexano indicando a possível presença de taninos condensáveis.

**Antraquinonas:** O desenvolvimento de colorações avermelhadas/alaranjadas nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano indicam a possível presença de antraquinonas.

#### 4.5.2 Cromatografia Líquida em Coluna da Fração Acetato de Etila

A partir da coluna cromatográfica realizada com a fração Acetato de Etila, foram obtidas 235 subfrações, das quais, após avaliação por meio de cromatografia em camada delgada, foram agrupadas em 3 partes. A primeira parte reuniu-se os frascos 1 ao 31, a segunda parte reuniu-se os frascos 32 ao 89 e a terceira parte reuniu-se os frascos 90 ao 140. Depois foram selecionadas essas 3 partes para cada uma delas passar pela coluna Sephadex® LH-20.

#### 4.5.3 Coluna Sephadex® LH-20

A coluna Sephadex® LH-20, amplamente utilizada para a separação de flavonoides, é um polissacarídeo composto por unidades de glicose, obtido por fermentação de sacarose. Com diferentes diâmetros de partículas, ela separa substâncias com base no tamanho e nas formas moleculares (Santos-Buelga et al., 2012). Os flavonóides, são metabólitos secundários da classe de compostos fenólicos, desempenham um papel importante na defesa das plantas e estão envolvidos na proteção contra raios UV, insetos, fungos e bactérias, além de contribuírem para a atração de polinizadores. Dentre as atividades biológicas atribuídas aos flavonóides, destacam-se as propriedades antioxidante, antiviral, antitumoral e anti-inflamatória (Zuanazzi; Montanha, 2007).

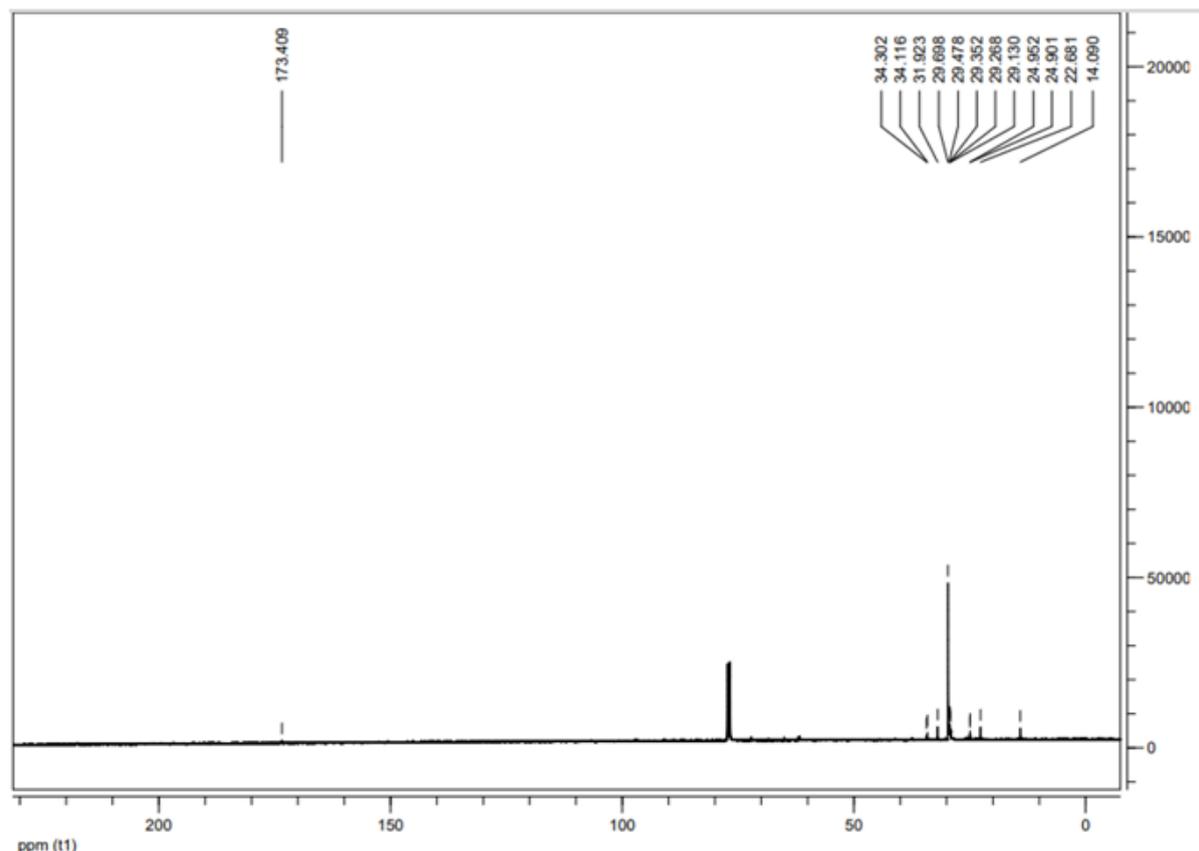
Das três partes agrupadas na coluna cromatográfica com acetato de etila, obtiveram-se 32 subfrações da primeira parte, 72 subfrações da segunda parte e 60 subfrações da terceira parte, após a passagem pela coluna Sephadex® LH-20.

#### 4.5.4 Análise de RMN

A técnica de RMN é bastante empregada para a elucidação estrutural de substâncias isoladas de vegetais, sendo um método capaz de indicar a disposição do esqueleto hidrocarbônico (Ribeiro, 2007). O espectro de  $^{13}\text{C}$  não permite confirmar o número exato de carbonos presentes na cadeia. A presença de grupamentos  $\text{CH}_2$  é confirmada pelo deslocamento químico  $\delta$  15-50 ppm, enquanto

a presença de um grupamento éster é confirmada pelo deslocamento  $\delta$  173,409 ppm (FIGURA 3).

FIGURA 3 – ESPECTRO RMN  $^{13}\text{C}$  DO ISOLADO

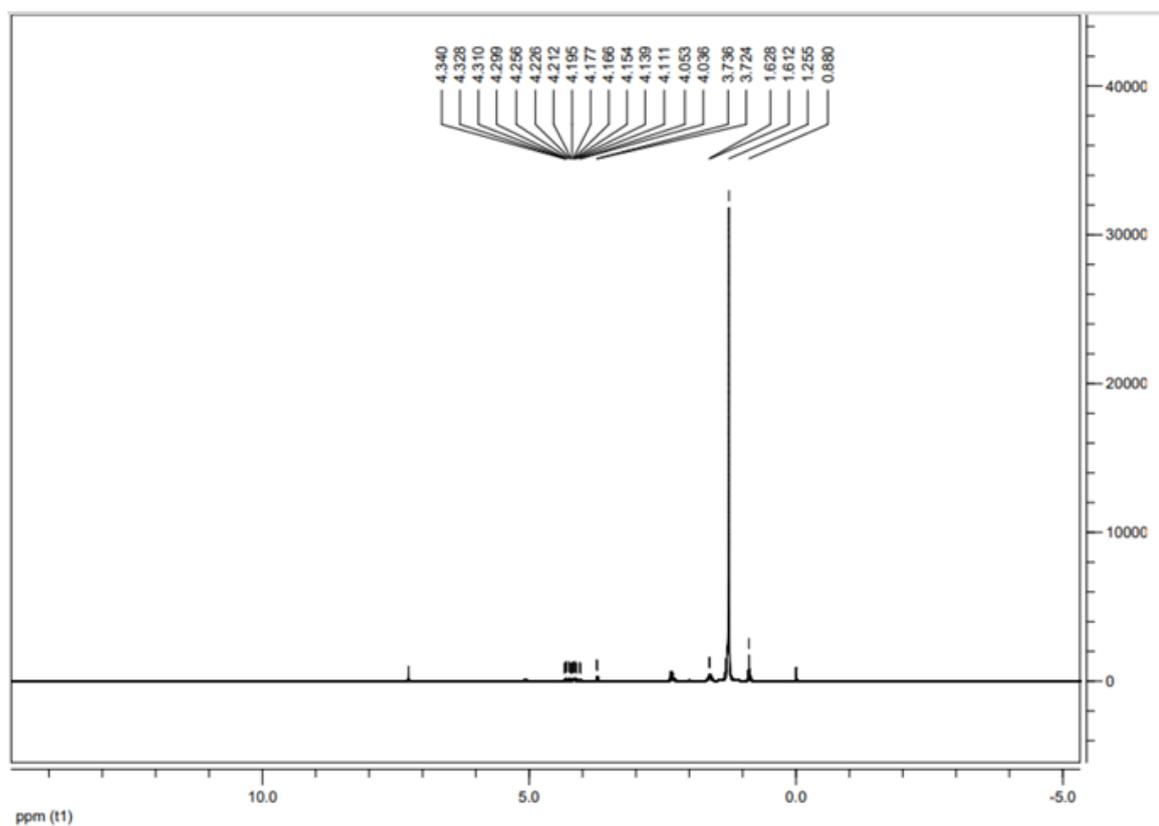


FONTE: A autora (2024)

NOTA: RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para o isolado (FIGURA 4), registrou deslocamentos entre 0,880 e 4,340ppm. O sinal  $\delta$  0,88 ppm apresenta-se como um tripleto. O intenso sinal em 1,255 é indicativo de grupamento  $\text{RCH}_2$  ("R" representa um radical, um grupo ou átomo que pode variar dependendo da molécula em questão).

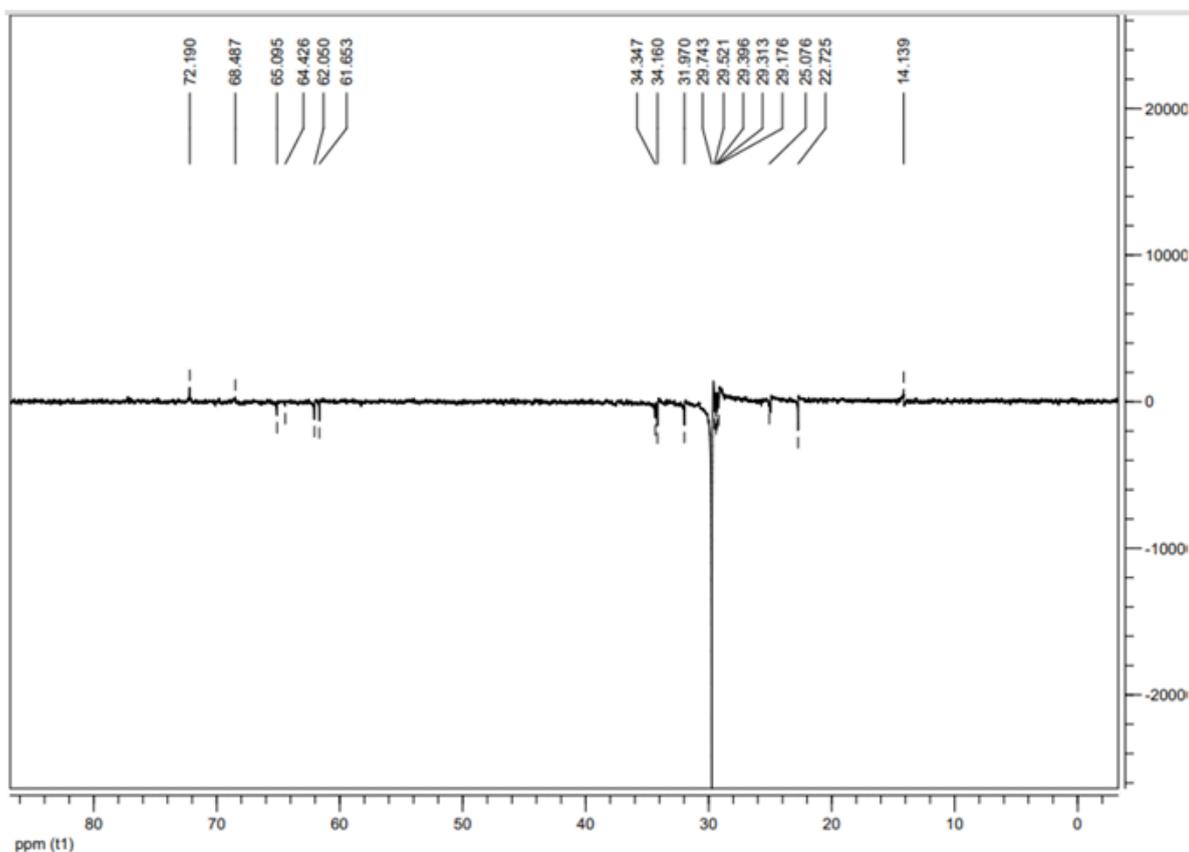
FIGURA 4 – ESPECTRO RMN  $^1\text{H}$  DO ISOLADO



FONTE: A autora (2024)

O espectro de DEPT 135 (FIGURA 5) registra a maioria dos picos formados de grupamentos  $\text{CH}_2$  com valores de deslocamento  $\delta$  29-30 ppm.

FIGURA 5 – ESPECTRO RMN DEPT 135 DO ISOLADO



FONTE: A autora (2024).

NOTA: DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.

A partir dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$  e dept 135, propôs-se para este isolado uma possível estrutura química de um composto orgânico que possui o grupo funcional carboxilato (grupamento éster) de cadeia longa e insaturada.

Muitos ésteres são utilizados como essências artificiais que imitam o odor e gosto de frutas. Assim são empregados na confecção de xaropes, pastilhas, doces e balas. Alguns ésteres são utilizados como medicamentos e outros de cadeia mais longa são aproveitados na produção de sabões (Nunes, 2014).

Dado o perfil estrutural, lipossolubilidade e a versatilidade dos ésteres, o composto pode ser direcionado para diferentes finalidades, como: indústria cosmética para fazer sabões e indústria farmacêutica como veículo para fármacos (Nunes, 2014).

#### 4.6 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

#### 4.6.1 Ensaio de toxicidade preliminar in vitro com *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade preliminar in vitro com *Artemia salina* Leach tem finalidade de realizar uma triagem preliminar quanto à segurança ambiental do extrato e frações (Dos Anjos, 2023). Os resultados do teste de toxicidade preliminar frente aos náuplios de *Artemia Salina* foram expressos em CL<sub>50</sub>, ou seja, a dose capaz de levar a morte 50% dos organismos testados, conforme TABELA 2 e a TABELA 3 a seguir:

TABELA 2 - TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* APRESENTADA PELO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES

EXTRATO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL) /MORTALIDADE (%)					CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC95% (µg/mL)
	100	250	500	750	1000		
Ext. B. Al.	4	4	6	10	18	>1000	-
F. Ae. Al.	2	2	4	4	8	>1000	-
F. Cl. Al.	2	4	4	4	4	>1000	-
F. Hex. Al.	4	4	2	2	6	>1000	-
F. Hidro. Al	2	10	10	10	16	>1000	-
DMSO (C-)	-	-	-	-	2	>1000	-

FONTE: A autora (2024).

NOTA: Ext. B. Al.: extrato bruto alcoólico; F. Ae. Al.: fração acetato de etila do extrato alcoólico; F. Cl. Al.: fração clorofórmio do extrato alcoólico; F. Hex. Al.: fração hexana do extrato alcoólico; F. Hidro. Al.: Fração hidroalcoólica do extrato alcoólico; DMSO: Dimetilsulfóxido; C-: Controle negativo; CL<sub>50</sub>: Concentração Letal 50%; IC95%: Intervalo de Confiança de 95%.

TABELA 3 - TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* APRESENTADA PELO CONTROLE POSITIVO (SULFATO DE QUINIDINA)

CONTROLE POSITIVO	CONCENTRAÇÃO (µg/mL) /MORTALIDADE (%)					CL <sub>50</sub> (µg/mL)	IC 95% (µg/mL)
	10	20	30	40	50		
SULFATO DE QUINIDINA	40	70	80	90	100	12,935	4,976-18,422

FONTE: A autora (2024).

NOTA: CL<sub>50</sub>: Concentração Letal 50%; IC95%: Intervalo de Confiança de 95%.

De acordo com Meyer *et al.* (1982), um extrato é considerado tóxico se a CL<sub>50</sub> for inferior a 1000µg/mL e não tóxico se a CL<sub>50</sub> for maior que este valor. A CL<sub>50</sub> é a concentração na qual metade dos organismos de *Artemia Salina* testados morreram, quando a CL<sub>50</sub> apresenta um resultado com valor baixo, indica que a amostra testada é tóxica para esses organismos, pois quanto menor o valor da concentração para atingir a CL<sub>50</sub>, maior a toxicidade da amostra sobre a *Artemia salina*.

Constatou-se que nenhum extrato ou particionamento apresentou toxicidade frente à *Artemia salina* em concentrações até 1000 µg/mL. No entanto, é importante lembrar que os resultados podem variar dependendo do organismo e das condições de teste e a falta de estudos de toxicidade da raiz de *M. nigra* revela a importância de uma avaliação completa da toxicidade com estudos adicionais com outros organismos.

#### 4.6.2 Atividade Antimicrobiana

A triagem inicial demonstrou que o extrato bruto de *M. nigra* apresentou efeito antibacteriano de acordo com a classificação proposta por Holetz *et al.* (2002), na qual, extratos considerados ativos apresentam Concentração Inibitória Mínima (CIM) inferior a 1000µg/µl. O extrato bruto de *M. nigra* apresentou possível atividade contra *P. aeruginosa* ATCC® 27853, *S. aureus* ATCC® 6538 e *E. faecalis* ATCC® 29212, enquanto foi inativo contra *E. coli* ATCC® 25922. Pode-se observar os resultados no QUADRO 5.

QUADRO 5 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DO EXTRATO BRUTO

Microrganismo	CIM (µg/µl)
<i>P. aeruginosa</i>	1000
<i>S. aureus</i>	7,81
<i>E. faecalis</i>	7,81
<i>E. coli</i>	>1000

FONTE: A Autora (2024).

NOTA: CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Esses resultados estão de acordo com os de Khalid *et al.* (2011), que, ao avaliar a atividade antimicrobiana do suco de frutos da *Morus nigra* pelo método de microdiluição em placa, observaram efeito inibitório positivo em bactérias Gram-positivas e negativas, como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. faecalis*. Esses achados são concordantes com os obtidos no presente estudo, com exceção do resultado para *E. coli*, que apresentou efeito inibitório negativo.

Budman e seu grupo de pesquisa avaliaram o efeito antibacteriano do extrato etanólico da casca do caule, fruto e folhas de *Morus nigra* L.. Os resultados mostraram que os extratos etanólicos da casca do caule e das frutas tiveram efeito

inibitório contra *S. epidermidis* e *P. acnes*, sendo a casca do caule o mais ativo contra tais microrganismos (Budiman et al., 2017). Embora esse grupo tenha utilizado uma metodologia e microrganismos diferentes dos empregados no presente estudo, isso reforça o potencial antibacteriano da espécie. No entanto, para afirmar que as raízes de *M. nigra* apresentam efeito antibacteriano, seriam necessários mais estudos.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesquisa sobre o extrato etanólico de raízes de *Morus nigra* proporcionou uma visão sobre suas propriedades e potencial de aplicação. Através da análise fitoquímica das raízes, foram identificados diversos grupos de compostos químicos, incluindo cumarinas, esteróides, flavonóides, taninos e antraquinonas. Além disso, foram realizados testes físico-químicos e identificação de substâncias por meio de métodos de separação, como a cromatografia em coluna. Este estudo demonstrou a ausência de toxicidade das frações do extrato frente à *Artemia salina*, sugerindo segurança preliminar em aplicações biológicas. O estudo também abordou a avaliação de atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico, sugerindo potencial uso em terapias antimicrobianas.

A planta mostrou-se relevante devido à diversidade de metabólitos secundários e seu potencial para diversas aplicações, especialmente em aplicações farmacológicas e terapias antimicrobianas. Este estudo oferece uma base para futuras pesquisas e aplicações da *Morus nigra*.

## REFERÊNCIAS

ABBASI, A. M. *et al.* Medicinal plants used for the treatment of jaundice and hepatitis based on socio-economic documentation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, p. 1643-1650, 20 April, 2009.

ARSHAD, S. *et al.* Morphology, chemical composition and medicinal properties of *Morus nigra* L. A review. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, p. 100-103, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Farmacopeia Brasileira**. 6a edição, v. 1. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), 2019.

BRASIL. Moraceae in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB618318>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

BUDIMAN, Arif *et al.* Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. **Pharmacognosy Journal**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 611-614, 2017.

CARVALHO, J. L. S.; *et al.* Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema de Soxhlet modificado. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1031-1035, 2009. DOI: 10.1590/S0100-40422009000400034

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura Imprensa Oficial/Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1926-1931. 1984. v.1. p.107.

COSTA, J. P. L. *et al.* Randomized double-blind placebo-controlled trial of the effect of *Morus nigra* L. (black mulberry) leaf powder on symptoms and quality of life among climacteric women. **International Journal of Gynecology & Obstetrics**, v. 148, n. 2, p. 243–252, 1 fev. 2020.

DE PÁDUA LÚCIO, Karine *et al.* Anti-inflammatory and antioxidant properties of black mulberry (*Morus nigra* L.) in a Model of LPS-Induced Sepsis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, [s. l.], v. 2018, 2018.

DOS ANJOS, C. A. et al. Atividade lavicida contra *Aedes aegypti* e toxicidade preliminar contra *Artemia salina* L. de extratos e frações de *Monteverdia evonymoides* (Reissek) Biral. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**. v. 27, n. 9, p. 4962-4974, 2023. DOI: <https://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/view/10562/5090>

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380–1384, 1 jan. 2007.

FIGUEREDO, K. C. et al. Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 290–296, 5 out. 2018.

GUIZZO, Pedro Luis et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Journal of Basic and Applied**

**Pharmaceutical Sciences Rev Ciênc Farm Básica Apl**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 259–265, 2015.

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.

HU, X. et al. Isoprenylated Flavonoids and Adipogenesis-Promoting Constituents from *Morus nigra*. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 4, p. 816–824, 25 abr. 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, n. SI, p. 91-96, 2011.

KUMAR, V.; CHAUHAN, S. Mulberry: Life enhancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 271–278, 2008.

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.

MADHAVAN, V. *et al.* Pharmacognostical evaluation of root bark of *Streblus asper* Lour. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 8, n. 2, p. 176-184, abr. 2009.

MALLHI, T. H. *et al.* Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 60–66, 7 fev. 2014.

MASCARELLO, Alessandra *et al.* Naturally occurring Diels-Alder-type adducts from *Morus nigra* as potent inhibitors of Mycobacterium tuberculosis protein tyrosine phosphatase B. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 144, p. 277–288, 2018.

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.

MIGUEL, O. G. **Ensaio sistemático de análise Fitoquímica**, 2003. Apostila da disciplina de Fitoquímica – Universidade Federal do Paraná, Farmácia, Curitiba, 2003.

MIRANDA, M. A. *et al.* Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Juiz de Fora, v. 36, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 2010.

NOMURA, T. *et al.* Chemistry and Biological Activities of Isoprenylated Flavonoids from Medicinal Plants (Moraceous Plants and Glycyrrhiza Species). **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 28, n. PART I, p. 199–256, 1 jan. 2003.

NUNES, Edilene de Cássia D.; LOPES, Fábio Renato S. **Polímeros - Conceitos, Estrutura Molecular, Classificação e Propriedades**. Rio de Janeiro: Érica, 2014. E-book. pág. 31. ISBN 9788536520506. Disponível em:

<https://integrada.minhabiblioteca.com.br/reader/books/9788536520506/>. Acesso em: 28 nov. 2024.

OLIVEIRA, A. C. B. *et al.* Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244–249, 2013.

OLIVEIRA, F. DE *et al.* **Farmacognosia: Identificação de Drogas Vegetais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, p.13, 2014.

PADILHA, M. M. *et al.* Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 621–626, set. 2010.

RIBEIRO, C. M. R.; SOUZA, N. Â. DE .. Esquema geral para elucidação de substâncias orgânicas usando métodos espectroscópico e espectrométrico. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 1026–1031, jul. 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**. 3o ed. Humana Press, 2012. v. 864, p. 427-464.

SARTOR, Elisiane de Bona. **Estudo fitoquímico, morfoanatômico, atividades biológicas e potencial antioxidante de *Parodiolyra micrantha* (Kunth) Davidse & Zuloaga, Poaceae**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2020.

SCHAFRANSKI, Kathlyn *et al.* AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE AMOREIRA PRETA (*Morus nigra* L.) UTILIZANDO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL EVALUATION OF BIOACTIVE COMPOUNDS AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF EXTRACTS OF BLACK MULBERRY. **Quim. Nova**, [s. l.], v. 00, p. 1–9, 2022.

SIMÕES, Cláudia M O. *et al.* **Farmacognosia**. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 93. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788582713655/>. Acesso em: 16 mar. 2024.

TROPICOS. ***Morus nigra* L.** Jardim Botânico de Missouri. Disponível em: <<https://tropicos.org/name/21300470>>. Acesso em: 18 mar. 2024.

VALENTE, L. M. M. et al. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 216 – 223, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200015>

VIJAYAN, K.; SARATCHANDRA, B.; TEIXEIRA DA SILVA, Jaime A. Germplasm conservation in mulberry (*Morus* spp.). **Scientia Horticulturae**, [s. l.], v. 128, n. 4, p. 371–379, 2011.

WAGNER, H. **Plant Drugs analysis**. 2. ed. Berlin: Springer, p 298-299, 1996.

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

ZHOU, R *et al.* Evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activity of *Morus nigra*. **South African Journal of Botany**, [s. l.], v. 124, p. 540–545, 2019.

ZOOFISHAN, Z. *et al.* Phenolic antioxidants of *Morus nigra* roots, and antitumor potential of morusin. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 5, p. 1031–1045, 31 out. 2018.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; et al. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre/Florianópolis, 2007.