



UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

WELLINGTON FRANCISCO PEREIRA DA SILVA

**EFEITO VASODILATADOR E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DA
AMOREIRA (*Morus nigra* L.)**

Recife

2020

WELLINGTON FRANCISCO PEREIRA DA SILVA

**EFEITO VASODILATADOR E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DA
AMOREIRA (*Morus nigra* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Ciências Farmacêuticas**

Área de Concentração: Fármacos e Medicamentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Alice Valença Araújo

Coorientadora: Prof^a Dr^a Simone do Nascimento Fraga

Recife
2020

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S586e Silva, Wellington Francisco Pereira da.
Efeito vasodilatador e toxicidade dos extratos das folhas da amoreira
(*Morus nigra* L.) / Wellington Francisco Pereira da Silva. – 2020.
88 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Alice Valença Araújo.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.
Inclui referências.

1. Amoreira. 2. Vasodilatação. 3. Toxicidade. 4. Reatividade Vascular.
4. Genotoxicidade. I. Araújo, Alice Valença (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2020-076)

WELLINGTON FRANCISCO PEREIRA DA SILVA

**EFEITO VASODILATADOR E TOXICIDADE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DA
AMOREIRA (*Morus nigra* L.)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: **20/02/2020**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Alice Valença Araújo (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Ivone Antônia de Souza (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa (Examinador Externo)
Universidade Federal do Amazonas

Dedico este trabalho aos meus pais, **Agildo Pereira** e **Maria José** e a minha irmã **Werliany Pereira** pelo apoio, encorajamento e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente agradeço ao soberano **DEUS**, pelo seu amor, apoio, encorajamento, sustento e força. Pois sem ele nada disso tinha acontecido. Agradeço ainda pelas bênçãos concedidas e por todo cuidado que tem a mim. Nos momentos de desespero era com ele que eu “desmoronava” e Ele sempre disposto a me ajudar, me guiando através de pessoas maravilhosas que estavam e estão ao meu redor. Sem ti meu Deus eu seria absolutamente um nada.

A minha família, em especial aos meus pais **Agildo Pereira** e **Maria José**, por sempre me apoiarem e me incentivarem em todas as coisas (vocês são presentes de Deus na minha vida). Agradeço por cada sacrifício, palavra, gesto e carinho realizado por vocês. Sem dúvida vocês serão eternos em minha vida. Não poderia esquecer da minha irmã **Werliany**, aquela que sempre está ali me apoiando, apesar de ser mais nova, me aconselha, me guia e me conforta, você é um ser especial na minha vida. Estaremos sempre juntos “no bom e no ruim”. Também não posso esquecer do meu primo-irmão **Kellvyn**, que apesar do seu jeito calado e “carrancudo” sempre está disposto a ajudar, a você meu eterno agradecimento. A toda a minha família de maneira geral (**avós, tias, tios, primos**) agradeço pelo apoio e torcida que vocês têm por mim. Vocês são muito especiais.

À minha orientadora, a professora Dra. **Alice Valença**, não consigo expressar tamanho sentimento e gratidão que tenho. Agradeço a Deus por ter conhecido esse ser especial no primeiro semestre de 2014, ainda quando era 5º período de biológicas, nas aulas de fisiologia humana, as quais eu adorava participar. Lembrou-me que nesse mesmo período eu tinha esboçado a ideia de um pré-projeto para o mestrado e envergonhado fui até ela. Como esperado, me recebeu com uma mega atenção, elogiando a minha ideia, e conseqüentemente me guiando para que eu realizasse o mestrado. O tempo passou, e “cá” estou agradecendo...Muito obrigado por todo o apoio, atenção, cuidado, carinho e principalmente “puxões de orelha”, pois esse conjunto me fortalece e me faz querer ser um profissional semelhante a senhora. De coração, serei eternamente grato.

À minha co-orientadora, a professora Dra. **Simone Fraga**, minha eterna gratidão por apoiar juntamente com Alice minha ideia de pré-projeto. Agradeço por

cada palavra, cada ajuda, chamadas via Skype para me ajudar a montar o pré-projeto, essas coisas jamais sairão da minha mente e espero fazer no mínimo 50% do que vocês fizeram e faz por mim. Muito obrigado!

Aos amigos do tempo de graduação da turma 2012.1 vocês também foram essenciais para que eu chegasse até aqui. Sempre apoiando as minhas ideias de fazer mestrado e seguir carreira acadêmica. Em especial ao meu eterno grupo “Papas...”: **Elvis, Gilvania, Hadassa, Alexandre, Brenda, Erivalda e Luciana**, minha eterna gratidão. Agradeço ainda a minha eterna amiga **Shalon** (*in memoriam*) pelos momentos que compartilhávamos a ideia de seguir carreira acadêmica, a ela, minha eterna gratidão. Aos amigos de infância, **Nandinha, Arthur, João Paulo, Rafael, Ricardo** agradeço a vocês pelo apoio e incentivo dados. Vocês são especiais.

Não poderia esquecer das amizades construídas no decorrer desse tempo, **Sidiane, Silvinha, Paloma, Ana Paula, Bruna e Aniele** (parceiras de laboratório), obrigado pela amizade e pela paciência, expresse aqui minha admiração por vocês. Aos demais membros do grupo de pesquisa **FARMACOVIT** e a todos que fazem o **Laboratório de Nutrição Atividade Física e Plasticidade Fenotípica**, meus sinceros agradecimentos.

Agradeço pela ajuda e esclarecimento do Prof. **Augusto Santiago**, que tirou algumas dúvidas quanto a coleta da planta, armazenamento e identificação, meu eterno agradecimento. A senhora **Marlene Alencar**, pesquisadora responsável pelo Herbário Geraldo Mariz do Departamento de Botânica no Centro de Bociências - UFPE, obrigado pela atenção e recepção.

Aos nossos colaboradores, o Prof. **Rafael Ximenes** e ao seu aluno **Raudiney Frankilin** que nos ajudou na preparação dos extratos, bem como os demais que fazem o **Laboratório de Etnofarmacologia Aplicada**, muito obrigado. Ao Prof. **Luiz Alberto Lira Soares**, a Pós-Doc. **Magda Rhayanny** e a todos que fazem o **Laboratório de Farmacognosia** meus sinceros agradecimentos pela colaboração na execução da triagem fitoquímica dos extratos e pelas explicações concedidas. Ao Prof. **Cristiano Chagas** e a sua aluna **Talita Gisely** pela colaboração nos protocolos de genotoxicidade, meu muito obrigado. Ao Prof. **Francisco Amanajás**, pelo tempo cedido a me ajudar nas análises histológicas, meus sinceros agradecimentos. Ao Prof. **Alisson Rodrigo** por dispor do seu precioso tempo para nos ajudar nos testes de toxicidade. A todos vocês meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ainda a Universidade Federal de Pernambuco, de maneira especial ao Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão, pela sua infraestrutura e acolhimento, o qual desde 2012 tenho vínculo e orgulho. De maneira especial aos técnicos **Danilo Fontes, Juliete, Gleibson e Silvio** minha eterna gratidão e admiração pelos profissionais que são. Ao médico veterinário, **Vinicius Vasconcelos** meu sincero agradecimento pelo ensinamento e ajuda.

Ao **CNPq** pela concessão da bolsa de Mestrado, a qual me manteve financeiramente durante toda essa jornada. Muito obrigado.

Por último, porém não menos importante, a todos os **animais** que tiveram sua vida sacrificada para que esse projeto fosse concretizado, meu muito obrigado.

A todos que de forma direta ou indireta contribuíram para essa pesquisa, meu **MUITO OBRIGADO!**

RESUMO

Morus nigra L. é uma espécie pertencente à família Moraceae, gênero *Morus*, conhecida popularmente como amoreira-preta. É originária da Ásia e está plenamente aclimatada no Brasil. O presente estudo teve como objetivo avaliar os principais constituintes químicos, bem como o efeito vasodilatador e a toxicidade dos extratos aquoso (EAMn), hidroalcoólico (EHMn) e etanólico (EEMn) das folhas de *Morus nigra* L. Para isso, foram realizadas análises por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a avaliação do efeitos vasodilatador, foram realizados experimentos de reatividade vascular em artéria aorta de ratos *Wistar*. Para o estudo da toxicidade, foram realizados os testes de Toxicidade Aguda por via oral (OECD-423) e teste de genotoxicidade. A análise dos constituintes mostrou semelhanças quanto ao perfil fitoquímico entre os extratos apresentando taninos hidrolisáveis, derivados cinâmicos, flavonoides. Já o ácido elágico foi encontrado apenas no EEMn. O EAMn apresentou maior teor de derivados flavonoídicos, rutina, ácido elágico e derivados ácido elágico, destacando-se dos demais. O efeito vasodilatador promovido pelos extratos foi restrito aos anéis com endotélio (EAMn: $E_{max} = 37,4 \pm 5,2\%$ e $pEC_{50} = 8,65 \pm 0,23$, $n=6$, $p<0,05$; EHMn: $E_{max} = 35,2 \pm 4,4\%$, $n=6$; $pEC_{50} = 7,68 \pm 0,26$, $n=8$; EEMn: $E_{max} = 29,8 \pm 7,6\%$; $pEC_{50} = 8,22 \pm 0,25$, $n=7$). O efeito vasodilatador foi totalmente abolido na presença do L-NAME, indicando dependência da produção de NO pela Óxido Nítrico Sintase (NOS) para que haja vasodilatação. No ensaio de toxicidade aguda, os extratos EAMn, EHMn e EEMn não induziram alterações comportamentais e óbitos. Além disso, o EAMn não se apresentou genotóxico e/ou mutagênico. Portanto, nas condições experimentais utilizadas nesse trabalho, os extratos das folhas de *M. nigra* apresentaram efeito vasodilatador em artéria aorta de ratos *Wistar*, possivelmente devido aos constituintes fenólicos, bem como não apresentaram sinais de toxicidade.

Palavras-chave: Amoreira. Vasodilatação. Toxicidade. Reatividade Vascular. Genotoxicidade.

ABSTRACT

Morus nigra L. belongs to the Moraceae family, genus *Morus*, popularly known as blackberry. It is original from Asia and it is fully acclimatized in Brazil. The present study aimed to evaluate the main chemical constituents, as well as the vasodilator effect and the toxicity of the aqueous (AEMn), hydroalcoholic (HEMn) and ethanolic (EEMn) extracts of *Morus nigra* L. leaves. The phytochemical analysis was made by Thin Layer Chromatography and High Performance Liquid Chromatography. For the evaluation of the vasodilator effects, vascular reactivity studies were performed in aortic rings of male Wistar rats. Acute Oral Toxicity tests (OECD-423) and genotoxicity tests were also performed. The analysis of the constituents showed similarities regarding the phytochemical profile among the extracts and revealed the presence of hydrolyzable tannins, cinnamic derivatives, flavonoids. Ellagic acid, however, was found only in EEMn. The AEMn had a higher content of flavonoid derivatives, rutin, ellagic acid and ellagic acid derivatives. The vasodilator effect induced by the extracts was restricted to rings with endothelium (AEMn: $E_{max} = 37.4 \pm 5.2\%$ and $pEC_{50} = 8.65 \pm 0.23$, $n = 6$, $p < 0.05$; HEMn: $E_{max} = 35.2 \pm 4.4\%$, $n = 6$; $pEC_{50} = 7.68 \pm 0.26$, $n = 8$; EEMn: $E_{max} = 29.8 \pm 7.6\%$; $pEC_{50} = 8.22 \pm 0.25$, $n = 7$). The vasodilator effect of the extracts were abolished in the presence of L-NAME, indicating the dependence of NO production by Nitric Oxide Synthase (NOS) in this mechanism. In the acute toxicity test, the AEMn, HEMn and EEMn extracts did not induce behavioral changes and deaths. In addition, AEMn was not genotoxic and/or mutagenic. Therefore, in the experimental conditions used in this work, the extracts of the leaves of *M. nigra* showed a vasodilator effect on the aorta artery of Wistar rats, possibly due to the phenolic constituents, as well as it has shown no signs of toxicity.

Key words: Mulberry. Vasodilation. Toxicity. Vascular reactivity. Genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Características das folhas e frutos de <i>M. alba</i> e <i>M. nigra</i>	23
Figura 2 -	Classificação taxonômica de <i>M. nigra</i> L.	24
Figura 3 -	<i>Morus nigra</i> L.	36
Figura 4 -	Rotaevaporador	37
Figura 5 -	Processo de liofilização dos extratos de <i>M.nigra</i>	38
Quadro 1 -	Sistemas, reveladores e padrões utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários dos extratos estudados.	39
Quadro 2 -	Principais classes de metabólitos encontrados nos EMn.	47
Figura 6 -	Cromatogramas das amostras em 350nm	48
Figura 7 -	Espectros de varredura dos picos 1 a 4 evidenciados nos cromatograma a 350 nm	48
Figura 8 -	Espectros de varredura evidenciados no cromatograma a 350 nm da amostra EAMn.	49
Figura 9 -	Espectro de varredura evidenciado no cromatograma a 270 nm da amostra EEMn.	50
Figura 10 -	Relaxamento induzido pelo EAMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos <i>Wistar</i> .	51
Figura 11 -	Relaxamento induzido pelo EAMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos <i>Wistar</i> .	52
Figura 12 -	Relaxamento induzido pelo EHMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos <i>Wistar</i> .	52
Figura 13 -	Relaxamento induzido pela EHMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos <i>Wistar</i> .	53
Figura 14 -	Relaxamento induzido pelo EEMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos <i>Wistar</i> .	54
Figura 15 -	Relaxamento induzido pelo EEMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos <i>Wistar</i> .	54
Figura 16 -	Relaxamento induzido pelos EMn em anéis de aorta com endotélio em ratos <i>Wistar</i> .	55
Figura 17 -	Massa dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos das folhas de <i>Morus nigra</i> L.	56
Figura 18 -	Consumo de água dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos das folhas de <i>Morus</i>	58
Figura 19 -	Consumo de ração dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos das folhas de <i>Morus nigra</i> L.	58

Figura 20 -	Avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i> do extrato aquoso das folhas de <i>M. nigra</i> (2000mg/kg) pela determinação das frequências de micronúcleos eritrócitos policromáticos	59
Figura 21 -	Avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i> do extrato aquoso das folhas de <i>M. nigra</i> (2000mg/kg) pela determinação da frequência de dano.	60
Figura 22 -	Avaliação da genotoxicidade <i>in vivo</i> do extrato aquoso das folhas de <i>M. nigra</i> (2000mg/kg) pela determinação do índice de dano.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ach	Acetilcolina
AE	Ácido Elágico
AlCl₃	Cloreto de Alumínio
ANG II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CN	Controle Negativo
CO₂	Dióxido de Carbono
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CP	Controle Positivo
DCNT	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
DL₅₀	Dose letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EAMn	Extrato Aquoso de <i>Morus nigra</i> L.
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor, Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EEMn	Extrato Etanólico de <i>Morus nigra</i> L.
EHMn	Extrato Hidroalcoólico de <i>Morus nigra</i> L.
Emax	Efeito Máximo produzido por um fármaco
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERNs	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
ET-1	Endotelina -1

EUA	Estados Unidos da América
FD	Frequência de Dano
FeCl₃	Cloreto Férrico
GCs	Guanilil-ciclase solúvel
GMPc	Guanosina-monofosfato-cíclico
GPx	Glutaciona Peroxidase
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HNO₂	Ácido nitroso
HO	Hidroxila
ID	Índice de Dano
KCl	Cloreto de Potássio
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina metil éster
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MN	Micronúcleo
MS	Ministério da Saúde
N₂O₃	Óxido nitroso
NaCl	Cloreto de Sódio
NaH₂PO₄	Fosfato monossódico
NaHCO₃	Bicarbonato de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
NCE	Eritrócitos Normocromáticos
NO	Óxido Nítrico
NO₂	Nitritos
NO₃⁻	Nitratos
NOS	NO-Sintase
O₂	Oxigênio
O₂⁻	Superóxido
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONOO⁻	Peroxinitrito
PCE	Eritrócitos Policromáticos
PCEMn	Eritrócitos Polinucleados Micronucleados
pEC50	Concentração Efeito 50%

PGH₂	Prostaglandina H ₂
Phe	Fenilefrina
RENISUS	Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS
RO	Alcoxila
ROO	Peroxila
SOD	Superóxido Dismutase
SUS	Sistema Único de Saúde
TXA₂	Tromboxano A ₂
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USDA	United States Department of Agriculture
VC	Vanilina Clorídrica

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Teor dos compostos calculado no extrato de <i>Morus nigra</i> .	50
Tabela 2 -	Massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos de camundongos fêmeas <i>Swiss</i> após teste de toxicidade oral aguda dos extratos de <i>M.nigra</i> administrado em dose única de 2000 mg/Kg.	57
Tabela 3 -	Resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa.	59

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
cm	Centímetros
e-	Ausência de endotélio
e+	Presença de endotélio
g	Gramas
g/f	Gramas de força
h	Horas
Kg	Quilogramas
M	Massa Molar
mA	MiliAmpère
mg	Miligramas
min.	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetro
mmol/L	Milimoles por litro
nm	Nanômetro
nmol/L	Nanomoles por litro
°C	Graus Celsius
t_R	Tempo de Retenção
V	Volt
x	Vezes
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µg	Microgramas
µmol/L	Micromoles por litro
g/ml	Gramas por mililitros

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO	22
2.1	FAMÍLIA MORACEAE	22
2.2	GÊNERO <i>MORUS</i>	22
2.3	A ESPÉCIE <i>Morus nigra</i> L.....	24
2.4	CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Morus nigra</i> L.....	25
2.5	ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	26
2.6	DISFUNÇÃO ENDOTELIAL	28
2.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS	29
2.8	TOXICIDADE AGUDA.....	30
2.9	GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	31
3	HIPÓTESE	34
4	OBJETIVOS	35
4.1	OBJETIVO GERAL.....	35
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5	MATERIAL E MÉTODOS	36
5.1	MATERIAL BOTÂNICO.....	36
5.1.1	Processamento do material vegetal	37
5.1.2	Preparo do extrato etanólico de <i>Morus nigra</i> L. (EEMn).....	37
5.1.3	Preparo do extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> L. (EAMn).....	38
5.1.4	Preparo do extrato hidroalcoólico de <i>Morus nigra</i> L. (EHMn).....	38
5.2	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	39
5.2.1	Preparo da amostra.....	39
5.2.2	Preparo dos padrões.....	39
5.3	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)	40
5.3.1	Preparo da amostra.....	40
5.3.2	Preparo dos padrões.....	40
5.3.3	Condições Cromatográficas.....	40
5.4	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	41
5.5	EXPERIMENTOS REATIVIDADE VASCULAR (EXPERIMENTO COM ÓRGÃO ISOLADO).....	41
5.6	TOXICIDADE AGUDA.....	42

5.7	ATIVIDADES GENOTÓXICA	43
5.7.1	Grupos Experimentais	43
5.7.2	Coleta de material biológico.....	44
5.7.3	Ensaio Cometa	44
5.7.4	Teste de Micronúcleo.....	45
5.8	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	46
6	RESULTADOS	47
6.1	ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	47
6.2	REATIVIDADE VASCULAR	51
6.3	TOXICIDADE ORAL AGUDA	56
6.3.1	Avaliação da Massa Corporal e dos Órgãos.....	56
6.3.2	Avaliação do Consumo de Água e Ração	58
6.4	GENOTOXICIDADE	59
7	DISCUSSÃO	61
8	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71
	ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE	87
	ANEXO B - EXSICATA DEPOSITADA NO HERBÁRIO GERALDO MURIZ-UFPE	88

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo o conhecimento sobre o potencial curativo das plantas é reconhecido e estas tornaram-se objeto de estudo científico devido à sua relação com variadas propriedades medicinais. Estima-se que das 250 a 500.000 espécies de plantas existentes no planeta, apenas 1% foi descrita quanto ao seu potencial farmacológico (MELÉNDEZ; CAPRILES, 2006).

As plantas são capazes de produzir metabólitos, compostos que desempenham funções importantes como defesa de predadores e atração de polinizadores, colaborando assim para sua sobrevivência (TRAPP; CROTEAU, 2001). Além disso, estes metabólitos representam uma fonte importantíssima de substâncias potencialmente ativas do ponto de vista farmacológico (FUMAGALI et al., 2008)

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), consideram-se plantas medicinais aquelas que possuem substância, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica. Estas plantas vêm sendo utilizadas para o tratamento de diversas doenças, desde quadros leves como tosse, gripe, dores musculares e distúrbios do trato intestinal, assim como no tratamento de patologias mais graves como as Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT), tais como: diabetes, obesidade, carcinomas, doenças cardiovasculares, entre outras (SILANO et al., 2004; FOGGIO et al., 2006; AHMAD et al., 2010; CONTER et al., 2015; MORAES et al., 2011; MARMITT et al., 2016; BRASIL, 2019).

As DCNT são responsáveis por um elevado número de mortes prematuras, perda de qualidade de vida e alto grau de limitação para os indivíduos (MALTA et al., 2011). Entre as principais doenças crônicas, estão as doenças cardiovasculares, os cânceres, as doenças respiratórias crônicas e o diabetes mellitus. Estas doenças foram responsáveis, em 2015, por 51,6% do total de óbitos na população de 30 a 69 anos no Brasil (BRASIL, 2019). As doenças cardiovasculares estão relacionadas a fatores genéticos e ao estilo de vida: tabagismo, alcoolismo, inatividade física, dieta inadequada, obesidade e estresse físico e psicológico (BONOTTO et al., 2016; MEDEIROS, et al., 2018).

Conforme a Organização Mundial da Saúde (OMS,1990), diversas populações, principalmente as situadas em países em desenvolvimento, fazem o uso de plantas medicinais, muitas vezes, sendo a única forma de terapia. No ocidente, as plantas medicinais vem sendo cada vez mais consumidas e aproximadamente 40% da população faz uso regular de preparações fitoterápicas (ARAÚJO et al., 2014).

Em território brasileiro, cerca de 90% da população já fez o uso de alguma planta com caráter medicinal (CÔRREA et al., 2008). Tal uso se tornou tão comum no Brasil que, em algumas regiões do país, as plantas são comercializadas livremente em mercados populares e cultivadas nos quintais das residências (MACIEL, 2002). O uso dessas ervas é feito na maioria das vezes por adultos e idosos que buscam complementar o tratamento de uma doença crônica e geral acreditam que as plantas medicinais são uma alternativa isenta de efeitos adversos (BRASIL, 2006).

A fim de incentivar pesquisas que garantem o uso seguro e correto das plantas medicinais, bem como a implantação e utilização das terapias complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde (MS) elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). Logo depois, o MS elaborou a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) com o intuito de orientar estudos e pesquisas científicas que possam auxiliar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, de forma segura e eficaz, auxiliando o tratamento de determinadas doenças. A lista atualmente é composta por 71 plantas medicinais, entre elas espécies do gênero *Morus* (BRASIL, 2009)

Pertencente à família Moraceae, o gênero *Morus* possui aproximadamente 24 espécies e uma subespécie, sendo descritas pelos menos 100 variedades (ALMEIDA et al., 2011). O mesmo ainda é conhecido por conter uma variedade de compostos fenólicos incluindo flavonóides isoprenilados, cumarinas, cromonas e xantonas e fitoalexinas (NOMURA, 1988; NOMURA; HANO, 1994). Muitos destes compostos exibem propriedades biológicas interessantes, tais como atividades antiinflamatória, diurética, efeito hipotensores e antioxidante (NOMURA, 1988; TAKASUGI et al., 1978; PIETTA, 2000).

Entre os compostos citados, os flavonóides ganham destaque por compreenderem um grupo de compostos fenólicos com ampla distribuição em frutas e vegetais (ACKER et al.,1996). São conhecidos por suas propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antialérgicas, antitumoral, antitrombótica e antioxidante (GROOT; RAUEN, 1998; PRIOR; CAO, 1999; PIETTA, 2000; RUSSO et al., 2000; FORMICA; REGELSON, 1995; AVIRAM; FUHRMAN, 1998; HIRONO; GRASSO, 1981; AZIZ et al., 1998). A atividade antioxidante promovida pelos flavonoides se dá pela combinação de suas propriedades quelantes de ferro e do sequestro de radicais livres, o que tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como é o caso das doenças cardiovasculares (BRAVO, 1998; RUSSO et al., 2000; HAVSTEEN, 1983; HAENEN et al., 1997; SINGH et al., 2018).

A espécie *Morus nigra* L, conhecida popularmente como amoreira-preta, é originária da Ásia e está plenamente aclimatizada no Brasil (CRUZ, 1979). É uma planta temporária, de crescimento rápido possuindo desenvolvimento sob diferentes condições climáticas (SRIVASTAVA et al., 2003). Diversas partes desta planta são utilizadas popularmente: raiz, casca do caule, folhas e frutos (ÖZGEN, et al., 2009; MAZIMBA, et al., 2011). Quanto ao uso popular, o chá das folhas de *M. nigra* é bastante utilizado para o tratamento de diabetes, colesterol alto, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (OLIVEIRA et al., 2013).

Diante do exposto, o presente estudo visa a identificar os principais constituintes químicos de três diferentes extratos das folhas de *M. nigra*, analisando os possíveis compostos que participam de atividades na função vascular de aorta de ratos. Ainda, será avaliada a toxicidade dos extratos por meio do teste de toxicidade oral aguda e, a fim de investigar os possíveis efeitos a nível de DNA, serão realizados os testes de genotoxicidade. Desta forma, pode-se contribuir para a investigação de novas terapias e/ou mecanismos farmacológicos que contribuam para prevenção e/ou tratamento de doenças cardiovasculares.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 FAMÍLIA MORACEAE

A família Moraceae é uma família botânica bastante diversificada, apresentando-se em árvores, arbustos, lianas, raramente ervas ou, às vezes, epífitas. Até o presente momento, não há um entendimento sobre uma característica única dessa família, entretanto, as que mais se aceitam são a presença do látex leitoso, distribuído em todos os tecidos parenquimatosos, a presença de estípulas nas folhas que registram uma cicatriz circular no ramo, um pecíolo geniculado e a presença de glândulas no ápice do pecíolo, ou na margem inferior da lâmina (BERG et al., 2006).

Tal família possui ampla distribuição geográfica, porém concentra-se nas regiões tropicais e subtropicais, e compreende 37 gêneros e aproximadamente 1.100 espécies. Na região neotropical, é constituída de aproximadamente 27 gêneros e cerca de 300 espécies. Em território brasileiro, existem aproximadamente 19 gêneros e cerca de 230 espécies, em sua maioria concentrados na região amazônica e na costa leste do país, sendo apontadas 17 espécies raras (BERG, 2001; GIULIETTI et al., 2009).

Entre os gêneros encontrados no Brasil, destacam-se os gêneros *Ficus*, *Dorstenia*, *Brosimum*, *Sorocea*, *Clarisia* e *Morus* com maiores números de registros (GIULIETTI et al., 2009). Os gêneros *Ficus* e *Dorstenia* possuem aproximadamente 800 e 110 espécies, respectivamente (JUDD et al., 2009). A família Moraceae possui representantes reconhecidos no território brasileiro, entre eles destacam-se: *Artocarpus altilis*, conhecido por “fruta-pão”, *Artocarpus heterophyllus*, popularmente conhecido por “jaca”, *Ficus carica*, o “figo” e *Morus spp.*, a “amora” (PORTO, 2011).

2.2 GÊNERO MORUS

O gênero *Morus*, um dos gêneros pertencentes à família Moraceae, possui aproximadamente 24 espécies e uma subespécie, sendo descritas pelos menos 100 variedades (ALMEIDA et al., 2011). Em relação aos aspectos botânicos que são característicos desse gênero, pode-se dizer que apresentam-se como árvores, com

altura que varia ente 5 a 20 metros, possuem folhas bastante grossas, simples e alternas, cordiformes, simétricas na base, de cor verde escura, pecíolos curtos, ásperas, com dentes largos e regulares, estípulas longas, membranosas e felpudas. Morfologicamente, as suas flores são unissexuais: as masculinas monoclamídeas, isostêmones e as femininas aclamídeas, ovário súpero, bi ou unicarpelar, unilocular, uniovulado, com estigmas bífidos (AGAREZ et al., 1994). Suas infrutescências são grandes, ovaladas, negras ou vermelhas brilhantes, quase sésseis (Figura 1). Seus frutos são comestíveis de sabor agridoce, muito sumosos e refrescantes (MORGAN, 1982).

Figura 1 - Características das folhas e frutos de *M. alba* (A) e *M. nigra* (B).



Fonte: Souza, 2015.

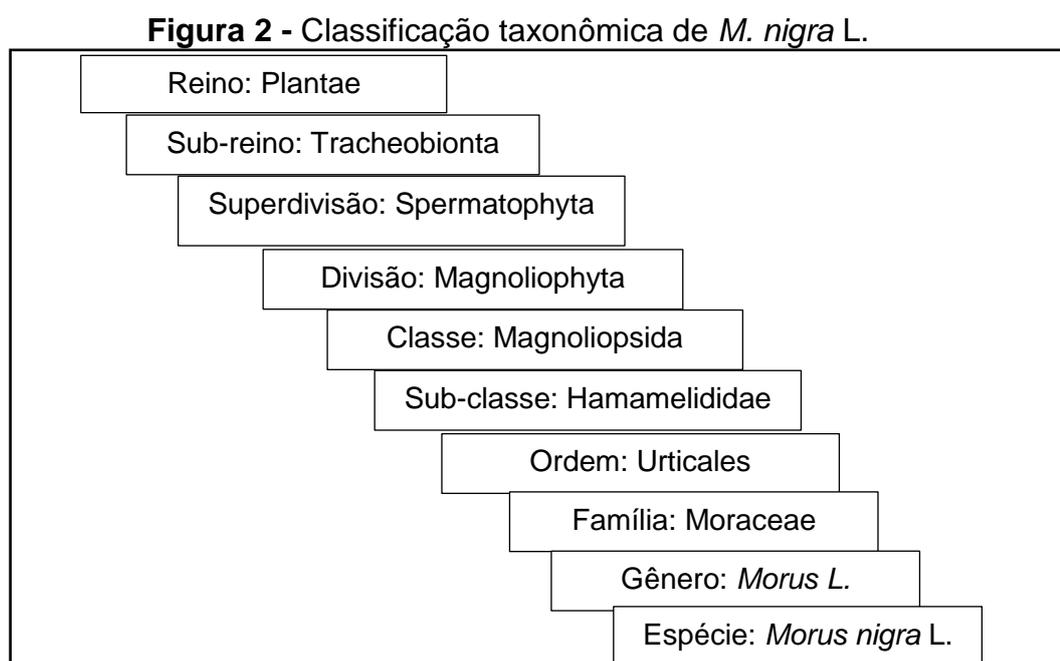
Esse gênero é dotado de grande importância quanto aos aspectos medicinais. Várias partes das plantas desse gênero, tais como raízes, caules, folhas e frutos, são utilizados popularmente no tratamento da hipertensão arterial, climatério, enjojo, ou como anti-inflamatório, anti-térmico, cicatrizante, diurético, analgésico, anti-séptico, vermífugo, hipoglicemiante e ansiolítico, entre outros (QUER, 1993; PADILHA et al., 2010; YADAV et al., 2008; NOMURA; HANO, 1994).

2.3 A ESPÉCIE *Morus nigra* L

A espécie *Morus nigra* L. é conhecida popularmente como “amora-preta” e, especificamente na região do Vale do São Francisco, é conhecida como “amora-miúra” (ALMEIDA, et al., 2013). Tal espécie possui como origem o extremo oriente, sendo que a sua frutificação ocorre de maneira mais intensa e abundante na Ásia Menor (CRUZ, 1979).

Morus nigra L. foi trazida ao Brasil por imigrantes japoneses e está totalmente aclimatizada em diversas regiões (ALMEIDA, et al., 2013). É uma planta temporária, de crescimento rápido, que se desenvolve sob diferentes condições climáticas e é apreciada por sua folhagem, que constitui o mais importante alimento para o bicho de seda (SASTRI, 1962 *apud* PADILHA, 2009, p.14). Conforme BASSOLS e MOORE (1981 *apud* PADILHA, 2009, p.14), no Brasil, essa espécie começou a ser pesquisada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em 1972, quando iniciou-se o programa de melhoramento genético com o plantio de sementes produzidas por mais de cinquenta cruzamentos realizados na Universidade de Arkansas, que originaram mais de 12.000 plântulas, e deram origem às primeiras cultivares brasileiras.

A Figura 2 mostra o enquadramento taxonômico da espécie em descrição de acordo com o banco de dados USDA – Plants Database (2014)



Fonte: Modificado de USDA – Plants Database (2014).

Diversas partes desta planta são utilizadas popularmente: raiz, casca do caule, folhas e frutos (ÖZGEN, et al., 2009; Mazimba, et al., 2011). Quanto ao uso popular, o chá das folhas de *M. nigra* é bastante utilizado para o tratamento de diabetes, colesterol alto, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (OLIVEIRA et al., 2013).

Em relação aos estudos farmacológicos, NADERI et al. (2004) demonstraram que os extratos dos frutos de *Morus nigra* têm uma ação protetora contra o estresse peroxidativo de biomembranas e biomoléculas, evidenciando que os extratos dos frutos de *Morus nigra* possuem compostos que atuam como antioxidantes. O extrato etanólico dos frutos de *Morus nigra* apresentou efeito preventivo de danos neuronais em modelos *in vivo* e *in vitro* de Doença de Parkinson (KIM, et al., 2010). De acordo com o estudo de SOUZA et al. (2000), feito com extrato das raízes de *M. nigra*, foi isolado um prenilflavonoide, conhecido como Morusina, o qual mostrou propriedades antinociceptivas em camundongos.

Em estudos com os extratos das folhas, parte da planta a ser investigada no presente estudo, foram observadas atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato diclorometânico das folhas (PADILHA, 2009). Além disso, o extrato hidrometanólico das folhas de *Morus nigra* apresentou efeito hepatoprotetor (MALLHI, et al., 2014).

2.4 CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Morus nigra* L.

As plantas são capazes de produzir uma diversidade de metabólitos secundários que contém um grupo fenol – um grupo hidroxila funcional em um anel aromático (LIU et al., 2018), os quais classificam-se em compostos fenólicos. Devido à sua diversidade química, os compostos fenólicos apresentam funções variadas nos vegetais, seja defesa contra herbívoros e patógenos, atração de polinizadores ou dispersores de frutos, e redução do crescimento de plantas competidoras adjacentes. Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides constituem a maior classe (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Vários compostos já foram isolados em diferentes partes desta espécie e por diferentes solventes. No extrato acetato de etila da casca do caule de *Morus nigra*, foram encontrados os seguintes compostos: estilbeno do tipo 2-arilbenzofurano, flavonas (do tipo Mornigrol D, junto com mornigrol G, mornigrol H, e norartocarpetina), e flavonoides (dihidrokaempferol) (WANG L. et al., 2010). A partir de quatro métodos de extração (Extrato bruto turbólise aquoso; Extrato bruto turbólise etanólico; Extrato bruto vapor; Extrato bruto soxhlet) dos frutos, foi possível a identificação de metabólitos secundários como antocianinas, dihidroflavonois, taninos, cumarinas, esteroides e triterpenos (PIEKARSKI, 2013). Através do extrato hidrometanólico dos frutos revelou-se a presença de saponinas, flavonoides, polifenóis e alcaloides (MALIK et al., 2012).

Especificamente das folhas de *Morus nigra*, o extrato hidroalcoólico apresentou flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos e esteroides (DE QUEIROZ, et al., 2012). Já o extrato etanólico mostrou a presença de fenóis, flavonoides, esteroides e terpenoides (ALMEIDA, et al., 2011). Já no extrato aquoso das folhas, foi possível a identificação de alcaloides, depsídeos e depsidonas (compostos fenólicos), saponinas e taninos (ROSA, et. al., 2016).

Os compostos fenólicos apresentam, dentre outras atividades, atividade antioxidante, por inibirem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, o que tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as doenças cardiovasculares (SINGH et al., 2018).

2.5 ESTRESSE OXIDATIVO E DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O estresse oxidativo pode ser definido como a oxidação de macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas, DNA e carboidratos, que ocorre quando a concentração de substâncias oxidantes supera a concentração de antioxidantes (CAI & HARRISON, 2000). Os processos de oxidação formam radicais livres, que são produzidos de forma natural ou por alguma disfunção direta. Esses radicais que possuem elétron ímpar são encontrados no nitrogênio e no oxigênio, e, portanto,

estas espécies chamam-se EROs (espécies reativas de oxigênio) ou ERNs (espécies reativas de nitrogênio) (FINKEL; HOLBROK, 2000; VISIOLI, et al., 2000; HALLIWELL, 2000; PIETTA, 2000).

Dentre as EROs, podemos destacar principalmente dois grupos: os radiculares: hidroxila (HO), superóxido (O_2^-), peroxila (ROO) e alcoxila (RO); e os não-radicalares: oxigênio, peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Já as ERNs incluem o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2), nitratos (NO_3^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (BARREIROS; DAVID, 2006).

Em algumas situações, as EROS podem ser produzidas em quantidades excessivas, levando a um desequilíbrio na formação de substâncias oxidantes e antioxidantes, causando redução da biodisponibilidade de NO e ativação de vias de sinalização intracelular que, em conjunto, resulta na alteração no tônus e remodelamento vascular, tais como hipertrofia do músculo liso vascular, elevação na deposição de proteínas da matriz extracelular, aumento da contratilidade das células do músculo liso vascular, inflamação, migração de monócitos, peroxidação lipídica, disfunção endotelial e apoptose (SZASZ et al., 2007; WESELER; BAST, 2010; ZINKEVICH; GUTTERMAN, 2011). Portanto, o conjunto desses desequilíbrios pode levar ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial e aterosclerose, e outras doenças, como diabetes (CAI; HARRISON, 2000).

As células apresentam mecanismos de defesa antioxidante, os quais têm como principal objetivo limitar os níveis intracelulares das espécies reativas, bem como controlar os possíveis danos decorrentes das mesmas, tais agentes que protegem as células dos efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos (SIES, 1993),

Os antioxidantes enzimáticos são as enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), e Glutathione Peroxidase (GPx) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; SCHNEIDER ; OLIVEIRA, 2004). Os antioxidantes de defesa não enzimáticos incluem os compostos antioxidantes exógenos, principalmente de origem dietética, dentre os quais se destacam as vitaminas (ácido ascórbico ou vitamina C e α -tocoferol e β -caroteno, precursores das vitaminas E e A), os minerais (zinco, cobre, selênio e magnésio) e compostos derivados de plantas (principalmente os

compostos fenólicos) (BIANCHI & ANTUNES, 1999; PRASAD et al., 2007; SCHNEIDER ; OLIVEIRA, 2004).

Os compostos fenólicos de plantas apresentam uma alta atividade antioxidante, principalmente os flavonoides. As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à capacidade de sequestrar radicais livres (DECKER, 1997). Outros compostos fenólicos que são empregados em estudos são o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico, sendo considerados importantes na inibição do processo de peroxidação lipídica (HARTMAN; SHANKEL, 1990; HALLIWELL et al., 1995), os quais podem prevenir o organismo de doenças cardiovasculares.

2.6 DISFUNÇÃO ENDOTELIAL

O endotélio vascular, uma camada monocelular que recobre a superfície luminal de todos os vasos sanguíneos, constitui uma interface ativa entre a circulação e a parede vascular. Está envolvido em diversas funções, dentre elas regulação da coagulação e da angiogênese, controle do tônus vascular, produção de mediadores que controlam crescimento e migração e morte celular (VANE et al., 1990; VRINTS G., et al., 1991; BASSEGNE; HUC, 1991; MOLHO-SABATIER P., 1987; CARVALHO, et al., 2001).

Como citado anteriormente, o endotélio é responsável pelo controle do tônus da musculatura lisa vascular, pela produção de mediadores vasodilatadores ou vasoconstritores. Entre os mediadores que estão envolvidos no relaxamento (vasodilatação), estão a prostaciclina, o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (do inglês, *endothelium-derived hyperpolarizing factor*, EDHF) e o óxido nítrico (NO). Entre os fatores contráteis (vasoconstritores), estão a prostaglandina H₂ (PGH₂), a tromboxano A₂ (TXA₂), a angiotensina II (ANG II), a endotelina-1 (ET-1) e as espécies reativas de oxigênio (EROs) (CARVALHO, et al., 2001).

Dentre os fatores vasodilatadores, o mais potente é o óxido nítrico (NO). Fisiologicamente, a produção de NO se dá pela NO-sintase (NOS) pela conversão de L-arginina em L-citrulina (MONCADA; HIGGS, 1995). Uma vez produzido, o NO

ativa a enzima citosólica guanilil-ciclase solúvel (GCs), que produz guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc). O GMPc funciona como um segundo mensageiro intracelular, amplificando a resposta vasodilatadora (ARNOLD et al., 1977).

Uma vez que o óxido nítrico é um dos mais importantes vasodilatadores, a sua regulação é fundamental para a função do endotélio vascular. Quando há um prejuízo na função vasodilatadora do endotélio, decorrente de uma diminuição da biodisponibilidade de NO (seja por diminuição da sua produção, seja por aumento da sua degradação), dá-se o nome de Disfunção Endotelial. Esta disfunção está relacionada a diversas doenças cardiovasculares, como hipertensão arterial, aterosclerose e doença arterial coronária, e outras doenças, como diabetes, câncer e obesidade, ou ainda com o processo de envelhecimento (SIES, 1991; ZANESCO ; ANTUNES, 2005; FERRANNINI et al., 1997; TOUYZ, 2004; CAI ; HARRISON, 2000; TADDEI et al., 2000).

Diante das possíveis atividades biológicas promovidas pelas plantas medicinais, entre elas propriedade antioxidante atuando na inibição de radicais livres e conseqüentemente na prevenção de doenças cardiovasculares, seu uso tem sido praticado por diversas populações, entretanto, são necessários estudos frente as possíveis propriedades tóxicas das plantas a fim de garantir a segurança do uso (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

2.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE PLANTAS

A “ciência dos venenos”. Era assim designada a toxicologia, ciência antiga que hoje em dia é definida como “o estudo dos efeitos adversos de agentes exógenos sobre sistemas biológicos ou organismos vivos, incluindo o homem, tendo como principal objetivo o estabelecimento da magnitude dos danos potenciais e o uso das substâncias químicas, de forma segura” (OLIVEIRA-FILHO, et al., 2013).

As plantas possuem diversas substâncias, as quais são amplamente utilizadas pelo homem. Tais substâncias muitas vezes podem ser tóxicas, dependendo da forma e quantidade que são utilizadas. A crença de que, por ser natural, a planta é segura, faz com que ocorra o seu uso de forma inadequada (GOMES et al., 2001; VEIGA JUNIOR et al., 2005; ARNOUS et al., 2005), pois

quando utilizadas para finalidades terapêuticas, formas de uso e/ou doses diferentes daquelas utilizadas popularmente, podem levar a efeitos adversos ou tóxicos que comprometem a saúde (GOMES, et al., 2001; MORGAN, 2003).

Algumas substâncias produzem efeitos tóxicos diretamente ou podem gerar constituintes tóxicos pela ação enzimática nos organismos. O incidente da resposta tóxica é, portanto, dependente das propriedades químicas e físicas a substância a ser administrada, da condição de exposição e da vulnerabilidade do sistema biológico ou do indivíduo (OGA et al., 2008).

Portanto, além de informações sobre eficácia, o conhecimento dos aspectos toxicológicos das plantas é fundamental para o uso racional das mesmas. Estes testes incluem estudos de toxicidade *in vivo* e *in vitro* (PURCHASE et al., 1998).

2.8 TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade aguda é caracterizado como um ensaio *in vivo*, a fim de investigar os possíveis efeitos adversos dentro de um período curto de tempo após a administração de uma dose única ou doses múltiplas dentro de 24 horas. A aplicação da substância teste se dá através da via oral, mas outras vias de administração podem ser escolhidas, levando em consideração a exposição humana (OGA et al., 2008).

Os testes de toxicidade aguda têm como finalidade a caracterização em relação a dose/resposta, identificação do potencial tóxico em órgãos específicos e identificação da toxicocinética, podendo ainda serem indicativos sobre o mecanismo de ação tóxica, diagnóstico e tratamento das reações tóxicas, estabelecendo por meio disso as doses para estudos adicionais de toxicidade (PURCHASE, et al., 1998; BLAAUBOER, 2003; PRIETO, et al., 2006; COECKE, et al., 2005). Podem, ainda, ser utilizados para o cálculo da Dose Letal (DL_{50} , dose capaz de matar 50% de uma população).

Vale salientar que a toxicidade das plantas medicinais é um problema de saúde pública. A escassez de pesquisas e de normas brasileiras em relação ao comércio de plantas medicinais leva ao uso não racional das plantas medicinais (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

2.9 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

A genotoxicidade é compreendida como a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alteração no material genético de organismo a elas exposto. Já a mutagenicidade diz respeito à indução de alterações transmissíveis permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético. Esses testes visam à verificação de possíveis agentes mutágenos e carcinógenos, bem como o estudo dos mecanismos de mutagênese e carcinogênese química, avaliando os possíveis riscos para os seres humanos (SASAKI et al., 2000; WASSON, et al., 2008).

Uma das formas de avaliar o potencial genotóxico de uma substância é pelo ensaio de eletroforese em gel de célula única, conhecido no âmbito científico como “Ensaio Cometa”, um ensaio simples, rápido, sensível e eficiente, usado para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Tal ensaio é baseado na medida de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico (CASTANEDA et al., 2005; JIANG et al., 2007; MUGHAL et al., 2010; PITOZZI et al., 2006).

Usualmente, as células em teste são englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força, ocasionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para o exterior do núcleo. As quebras nas moléculas de DNA podem ser de fita simples, duplas fitas, crosslinks, sítios de reparo por excisão ou lesões álcali-lábeis, induzidas por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (CEMELI et al., 2009; FORCHHAMMER et al., 2010; TSUBOY et al., 2007; VALVERDE ; ROJAS, 2009).

Quando finalizado o processo da eletroforese, as células são visualizadas através de microscópio de fluorescência. Quando for possível a identificação do núcleo íntegro, sem danos detectáveis no seu DNA, as células são classificadas como normais. Em contrapartida, as células que sofreram lesão são identificadas visualmente por um tipo de cauda, análogo a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Os fragmentos são apresentados em tamanhos diferentes, sendo sua extensão de migração proporcional ao número de quebras sofridas pelo DNA. Logo, a aparência do DNA danificado assemelha-se a de um cometa, daí o nome do ensaio (AZQUETA et al., 2009; JIANG et al., 2007). É possível determinar o nível de

dano causado através de uma escala visual da intensidade do dano provocado ou tamanho da cauda que vai de 0 (nenhum dano provocado) até 4 (máximo de dano) (COLLINS, 2004).

A potencialidade mutagênica de uma determinada substância pode ser avaliada utilizando um ensaio *in vitro*, denominado ensaio do micronúcleo (MN), caracterizado como um bioindicador de efeito clastogênico (quebra de cromossomos) ou aneugênico (induz aneuploidia ou a segregação cromossômica anormal), revelando assim, a instabilidade genômica (IAMARCOVAI et al., 2008; LINDBERG et al., 2007; MUGHAL et al., 2010; TERRADAS, et al., 2010; THIERENS ; VRAL, 2009).

O ensaio de micronúcleo é realizado em cultura de células. Após a exposição celular a agentes mutagênicos, micronúcleos são formados a partir de pequenos fragmentos de cromossomos acêntricos (cromossomos perdidos durante o processo de divisão celular) que não foram incorporados no núcleo ou por cromossomos inteiros que atrasaram na anáfase durante a divisão celular. Tais fragmentos são envolvidos por membrana nuclear, durante a telófase, e aparecem como pequenos núcleos no citoplasma, além do núcleo principal (CEPPI et al., 2010; Iamarcovai et al., 2008; THIERENS; VRAL, 2009), exibindo perda de cromatina em decorrência de dano cromossômico estrutural ou dano do aparelho mitótico não reparado previamente. Os danos causados no DNA são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (BONASSI et al., 2006; FENECH, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Existem algumas técnicas utilizadas para análise de micronúcleos, mas a técnica que realiza o bloqueio da citocinese utilizando a citocalasina B é a única que atinge dois objetivos importantes: o primeiro é que o micronúcleo recém formado permanece “preso” ao citoplasma, evitando a sua perda. O segundo objetivo está associado ao fato de que as células analisadas devem apresentar-se binucleadas, facilitando a leitura das amostras. Além disso, o bloqueio da citocinese permite a confirmação de que as células analisadas passaram pelo processo de divisão celular durante a realização do teste (FENECH; MORLEY, 1985).

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e a diversidade das espécies, mas podem gerar consequências maléficas ao organismo, incluindo má formação, câncer, envelhecimento e morte (SILVA et al., 2003).

Assim, para verificar o potencial genotóxico de um determinado composto, existem esses testes, os quais já são bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências reguladoras como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial (HAYASHI et al., 2000).

Esses testes de genotoxicidade são categorizados como importantes indicadores biológicos. A associação desses indicadores biológicos, bem caracterizados e quantificados, com o conhecimento dos mecanismos de ativação de proto-oncogenes (gene que se altera devido a uma mutação ou ao aumento de expressão gênica) ou da perda de função dos genes supressores de tumor, tem fortalecido a importância de sua realização (RIBEIRO et al., 2003). Vários métodos citogenéticos têm sido utilizados para a monitorização biológica de populações expostas a agentes genotóxicos e carcinogênicos, como a quantificação de micronúcleos e lesões no DNA (COLLINS et al., 1997; MAC GREGOR et al., 1987).

Por todos os aspectos aqui abordado, associados aos inúmeros trabalhos que retratam diferentes atividades biológicas de extratos de diferentes partes de *M.nigra*, estudos que abordem suas atividades no sistema cardiovascular, especificamente sobre os vasos sanguíneos, ainda são escassos. Sendo assim, a elucidação do efeito vasodilatador e dos mecanismos de ação de diferentes extratos das folhas em aorta torácica de ratos, bem como a toxicidade oral e a toxicidade a nível genético, necessitam ser melhor investigados.

3 HIPÓTESE

Os extratos das folhas de *M. nigra* são dotados de compostos fenólicos, que atuam induzindo vasodilatação na artéria aorta de ratos e não apresentam toxicidade nas condições experimentais estudadas.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os constituintes, os efeitos vasculares e a toxicidade dos extratos das folhas de *Morus nigra*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os principais compostos químicos presentes nos extratos aquoso (EAMn), hidroalcoólico (EHMn) e etanólico (EEMn) das folhas de *M. nigra*;
- Avaliar o efeito dos extratos de *M. nigra* sobre a reatividade vascular de aorta de ratos;
- Avaliar a toxicidade aguda dos extratos de *M. nigra* em camundongos;
- Investigar o potencial genotóxico do extrato aquoso de *M. nigra* (EAMn);
- Avaliar a atividade mutagênica do extrato aquoso de *M. nigra* (EAMn).

5 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos e experimentos foram realizados nos laboratórios de Nutrição, Atividade Física e Plasticidade Fenotípica, Laboratório de Biotecnologia e Fármacos, ambos do Centro Acadêmico de Vitória. Ainda contamos com a colaboração do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Antibióticos, e Laboratório de Farmacognosia do Departamento de Farmácia, ambos situados na Universidade Federal de Pernambuco -UFPE.

5.1 MATERIAL BOTÂNICO

Foram coletadas folhas da espécie *Morus nigra* L. (figura 3) no distrito de Frexeiras, município de Escada-PE., sob as coordenadas de número 8° 23' 14.091" S 35° 19' 25.104 O, no dia 21 de maio de 2018 e encaminhadas ao Herbário UFP – Geraldo Mariz do Departamento de Botânica no Centro de Biociências -UFPE , onde foi analisada pela pesquisadora Marlene Alencar, registrada sob exsicata de nº 83.483, podendo assim ser confirmada a espécie utilizada neste estudo.

Figura 3 – *Morus nigra* L.



Fonte: autor, 2018.

5.1.1 Processamento do material vegetal

O material vegetal coletado (~500 g) passou por um processo de secagem de aproximadamente 48h em estufa com temperatura constante de 50°C. Após esse processo de secagem, o material foi triturado com auxílio de um processador profissional Oster®. O pó resultante desse processo de trituração (~250 g) foi armazenado em local adequado até a preparação dos extratos.

5.1.2 Preparo do extrato etanólico de *Morus nigra* L. (EEMn)

Para o preparo do extrato etanólico de *Morus nigra* L. foram utilizados o pó obtido da trituração das folhas (50 g) o qual foi submetido a extração por decocção na temperatura de 90°C por 15 minutos, utilizando como agente extrator solução etanólica 95% (500 ml). Em seguida esse material foi agitado por aproximadamente três horas em mesa agitadora, filtrado e levado ao rotaevaporador por aproximadamente 3 horas, na temperatura de 45°C (figura 4) para a separação do solvente. O material obtido em seguida foi liofilizado (figura 5) e armazenado até a realização dos ensaios.

Figura 4 - Rotaevaporador



Fonte: autor, 2018.

Figura 5 - Processo de liofilização dos extratos de *Morus nigra* L.



Fonte: autor, 2018.

5.1.3 Preparo do extrato aquoso de *Morus nigra* L. (EAMn)

Para o preparo do extrato aquoso de *Morus nigra* L. foram utilizados 25 g do pó resultante da trituração das folhas, utilizando como solvente a água destilada (250 mL) a partir do processo de decocção por aproximadamente cinco minutos. Em seguida o material obtido foi filtrado com papel filtro e em seguida liofilizado e armazenado até a realização dos ensaios. O extrato apresentou rendimento final de 14,35%.

5.1.4 Preparo do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. (EHMn)

Para o preparo do extrato hidroalcoólico de *Morus nigra* L. foram utilizados 25 g do pó resultante da trituração das folhas, como solventes foram acrescentados água destilada e álcool respectivamente, sob as proporções de 30% e 70%. Em seguida esse material foi macerado por aproximadamente 72 horas, onde o sobrenadante foi filtrado por aproximadamente três vezes até que o filtrado se tornasse límpido. Posteriormente o material obtido foi concentrado a temperatura inferior à 50°C em rotaevaporador e em seguida armazenado até a realização dos ensaios. O extrato apresentou rendimento final de aproximadamente 17,15%.

5.2 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Foram analisados os extratos: aquoso (EAMn), etanólico (EEMn) e hidroalcoólico (EHMn) de *Morus nigra*.

5.2.1 Preparo da amostra

A amostra foi concentrada e o resíduo obtido (cerca de 4 mg) foi diluído em 2 mL de metanol.

5.2.2 Preparo dos padrões

Todos os padrões foram utilizados na concentração de 1 mg/mL.

As amostras e os padrões foram aplicados de forma manual em placas cromatográficas de sílica gel 60 - F254 (Macherey-Nagel®, Germany). As placas foram desenvolvidas em cubas após saturação com a fase móvel (Quadro 1). A cuba foi saturada durante 15 minutos, aproximadamente, à temperatura ambiente. As bandas foram aplicadas com largura de 5 mm e com uma distância entre elas e das bordas das placas de 5 mm. O tamanho da largura e do comprimento das placas cromatográficas foi de 5 cm. As amostras foram aplicadas a 5 mm da origem e com término 5 mm do final da placa. Após a eluição das placas as mesmas foram secas à temperatura ambiente, e observadas sob luz ultravioleta de 254 e 365 nm e luz visível em seguida foram digitalizadas. Na sequência foram reveladas com reagentes específicos para cada metabólito (Quadro 1). As bandas obtidas foram comparadas aos padrões correspondentes.

Quadro 1 - Sistemas, reveladores e padrões utilizados na cromatografia em camada delgada, para identificação dos metabólitos secundários dos extratos estudados.

Classe de Metabólito	Sistema	Revelador	Padrão	
Taninos Hidrolisáveis	90:5:5	FeCl ₃	Ác. Gálico	
Taninos Condensados		VC	Catequina	
Flavonoides		AlCl ₃	Rutina e Quercetina	
Derivados Cinâmicos			Ác. Clorogênico e Ác. Cafeico	

Sistema 90:5:5 – acetato de etila: ácido fórmico: água; FeCl₃: cloreto férrico a 5%; VC: vanilina clorídrica; AlCl₃: cloreto de alumínio a 5%.

5.3 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

5.3.1 Preparo da amostra

A amostra foi concentrada, e do resíduo obtido foi pesado 0,1 g e diluído em metanol para balão volumétrico com capacidade de 25 mL. A solução foi levada ao banho de ultrassom (Ultracleaner®) durante 30 minutos para completa solubilização. Ao final, foi retirada uma alíquota de 2,5 mL da solução para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi aferido com água ultrapura. A solução resultante foi filtrada para vial com auxílio de filtro de PES (0,45 µm; 25 mm; Chromafil®).

5.3.2 Preparo dos padrões

Os padrões utilizados foram: ácido gálico (Sigma®), ácido elágico (Sigma®) e rutina (Sigma®).

5.3.3 Condições Cromatográficas

Para análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) o sistema utilizado foi o cromatógrafo Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific, EUA) acoplado a um detector de arranjo fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific) e equipado com uma bomba binária (HPG-3x00RS; Thermo Fisher Scientific), degaseificador, e amostrador automático com um loop de 20 µL (ACC-3000; ThermoFisher Scientific). O comprimento de onda para as análises foi fixado em 270 nm. A separação cromatográfica foi realizada a 27 °C utilizando uma coluna Dionex® (250 mm × 4,6 mm d.i., 5 µm) equipada com pré-coluna Phenomenex® (C18; 4 mm × 3,9 µm). A fase móvel foi composta de água ultrapura (A) e metanol (B), ambos acidificados a 0,05% de ácido trifluoroacético, e a taxa de fluxo foi ajustada para 0,8 mL/min. O seguinte programa gradiente foi utilizado: 0-10 min, 10-25% B; 5-10 min, 25-40% de B; 10-15 min, 40-55% de B; 15-20 min, 55-75% B; 20-28 min, 75-10% B; 28-30 min, 10% B. Os dados foram analisados e processado usando o software Chromeleon® 6.0 (Dionex/Thermo Fisher Scientific, EUA). Os teores foram calculados de acordo com a equação da reta dos padrões utilizados.

5.4 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

Os experimentos que utilizaram animais tiveram proposta submetida e aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) sob o processo nº 0037/2018 em reunião em 02/10/2018, por estar de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Foram liberados para essa pesquisa científica camundongos *Swiss* (35-45 g), adultos, machos e fêmeas e ratos *Wistar* (200-300 g), adultos, machos e fêmeas, ambos originários do Biotério do Centro Acadêmico de Vitória.

5.5 EXPERIMENTOS REATIVIDADE VASCULAR (EXPERIMENTO COM ÓRGÃO ISOLADO)

Para a realização desses experimentos, foram utilizados ratos *Wistar* (200-300 g). Os animais utilizados foram sacrificados por decapitação e, em seguida, a artéria aorta foi isolada rapidamente e cortes transversais de aproximadamente 3 a 4 mm foram realizados. Os anéis foram acomodados em ganchos metálicos, com cuidado para a preservação do endotélio. Os ganchos metálicos foram levados para as cubas no banho de órgãos, que continham solução de Krebs (116 mmol/L de cloreto de Sódio – NaCl; 4,5 mmol/L de Cloreto de Potássio – KCl; 1,14 mmol/L de fosfato monossódico – NaH₂PO₄; 1,16 mmol/L de cloreto de magnésio – MgCl₂; 2,5 mmol/L de cloreto de cálcio – CaCl₂; 25 mmol/L de bicarbonato de sódio – NaHCO₃; e 11,1 mmol/L de D-glicose), a 37°C, pH7,4, continuamente gaseificada com solução carbogênica (95% de oxigênio e 5% de dióxido de carbono). Um dos ganchos metálicos estava fixo à cuba e outro ligado ao transdutor. A tensão isométrica de cada anel foi registrada continuamente e arquivada utilizando o sistema de aquisição AVS.

Alguns anéis foram gentilmente friccionados para a remoção mecânica do endotélio. Inicialmente, os anéis foram submetidos a uma tensão inicial de 1,5 g, por um período de estabilização de 1 hora, sendo lavadas a cada 15 minutos.

Posteriormente, a integridade do endotélio foi avaliada nos anéis de aorta pré-contráidos com fenilefrina (0,1 µmol/L). O endotélio foi considerado íntegro quando o

relaxamento induzido pela acetilcolina (1 $\mu\text{mol/L}$) igual ou superior a 80%. O anel foi considerado sem endotélio quando o relaxamento a esta mesma concentração de acetilcolina foi de, no máximo, 10%.

Após a confirmação da integridade do endotélio, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas, que consistem no acréscimo cumulativo dos extratos ao banho de órgãos. A partir das curvas concentração-efeito obtidas, foram calculados dois parâmetros farmacológicos: Efeito máximo (E_{max}) e pEC_{50} . O E_{max} representa o máximo efeito produzido por uma droga em determinado tecido. O pEC_{50} corresponde ao logaritmo negativo da concentração que induz 50% do efeito máximo.

Para determinação do mecanismo de ação vasodilatadora dos extratos, construídas curvas concentração-efeito para os extratos (0,1 nmol/L a 0,1 mmol/L) em anéis de aorta pré-contraídos com fenilefrina (0,1 $\mu\text{mol/L}$), na ausência e na presença do L-NAME (inibidor não-seletivo da NOS, 100 $\mu\text{mol/L}$).

5.6 TOXICIDADE AGUDA

O teste de toxicidade oral aguda foi realizado segundo o protocolo experimental Guideline 423 (OECD 423, 2001). Os grupos experimentais de camundongos foram compostos por fêmeas adultas jovens (fêmeas nulíparas e não grávidas), com 8 a 10 semanas de idade, pesando entre 30 a 40g. Os animais num total de 12, foram divididos em quatro grupos, de três animais cada. O grupo controle recebeu somente o veículo (1mL/100g de peso corporal) de água. O grupo EAMn recebeu o extrato aquoso de *M. nigra* (2000mg/kg). O grupo EHMn, recebeu o extrato hidroalcolico de *M. nigra* (2000mg/kg). O grupo EEMn, recebeu o extrato etanólico de *M. nigra* (2000mg/kg), todos através de gavagem.

A avaliação da toxicidade aguda tem por finalidade apontar as reações adversas em curto prazo após a administração de um composto. Os testes para determinar toxicidade aguda podem ser definidos como os efeitos adversos que acontecem dentro de um período de 14 dias e nas primeiras 24 horas após a administração de uma única dose ou de doses múltiplas (BARROS e DAVINO, 2003).

a) Consumo de água e ração

Foi ofertada diariamente 200 mL de água e 100 g de ração labina por grupo. Após 24 horas, foi medido o que restou desta quantidade e este valor foi dividido pela quantidade de animais que havia na caixa. As observações foram realizadas diariamente até o 14º dia no mesmo horário.

b) Massa corporal

Os animais foram pesados em balança digital antes do momento de administração do extrato ou solução fisiológica e diariamente no mesmo horário durante os 14 dias após a exposição.

c) Reações comportamentais

Os animais foram observados após a administração da substância para a identificação de possíveis sinais de toxicidade. Entre os sinais estão: alterações na pele e no pêlo, olhos, mucosas, sistema respiratório, circulatório, nervoso autônomo e central, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. Onde a presença de algum dos sinais é considerado indicativo de toxicidade. (OECD-423, 2001).

d) Necrópsia e pesagem dos órgãos

Após o período de observação, os órgãos (fígado, pulmão, coração, rins, baço, adrenais e pâncreas) foram removidos, analisados macroscopicamente e pesados, a fim de identificar possíveis alterações.

5.7 ATIVIDADES GENOTÓXICA

5.7.1 Grupos Experimentais

Os camundongos foram distribuídos em três grupos com cinco animais machos, organizados de acordo com os tratamentos a serem realizados. O grupo EAMn recebeu o extrato aquoso das folhas de *Morus nigra* (2000 mg/kg), o veículo utilizado para diluição dos extratos foi a água. O grupo controle negativo (CN) recebeu apenas água. Os animais destes grupos receberam seus respectivos

tratamentos por gavagem (1 mL). O grupo controle positivo (CP) para o teste de Micronúcleo recebeu ciclofosfamida (20 mg/kg – Sigma), um agente mutagênico bastante reconhecido na literatura científica, por via intraperitoneal. Para o CP do ensaio cometa, lâminas preparadas com o sangue dos animais do CN foram expostas a peróxido de hidrogênio a 200 mmol/L por 10 minutos antes da etapa de eletroforese.

5.7.2 Coleta de material biológico

Após 48 horas de tratamento, os camundongos foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), por via intraperitoneal e 1 mL de sangue periférico foi coletado de cada animal por punção retro-orbital. Logo depois, os animais foram eutanasiados com uma injeção letal da combinação de cetamina (300 mg/kg) + xilazina (30 mg/kg).

5.7.3 Ensaio Cometa

Por ser um teste de característica fotossensível, é necessário que todo o procedimento após a coleta do material seja feito em uma sala com luz vermelha (sem a presença da luz branca). Inicialmente, 15 μ L do sangue coletado foram homogeneizados com 100 μ L de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM), e o homogenato foi depositado em lâminas previamente preparadas com uma cobertura de agarose padrão. Estas lâminas foram cobertas com lamínulas e deixadas a 4°C por 10 minutos. Após a refrigeração, foram retiradas as lamínulas e as lâminas foram depositadas em cubas (protegidas da luz) com solução de lise (2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10mM TRIS, 1% Triton X-100, DMSO 10%, com pH 10) durante 48 horas. Após a lise, as lâminas foram submetidas à eletroforese em uma cuba horizontal contendo solução tampão alcalino (1 M NaOH e 200 mM sal dissódico EDTA, pH 13) por 20 minutos, com corrente de \pm 300mA e diferença de potencial de 32V. As lâminas que serviram de controle positivo foram expostas durante 10 minutos a uma solução de peróxido de hidrogênio a 200 mM, diluído no tampão de eletroforese entre as etapas de lise e eletroforese. Depois deste tempo, o tampão de eletroforese foi trocado por um novo e seguiu-se o protocolo convencional do ensaio cometa. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas durante 15 minutos em tampão

Tris- HCl 0,4 M, pH 7,5, fixadas por 5 minutos em álcool absoluto. As lâminas foram coradas com 100 µL de solução de laranja de acridina 4 µg/mL.

A avaliação dos possíveis danos foi realizada através do microscópio de fluorescência (*Zeiss-Imager*, M2), com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 546. Foram analisados 100 nucleoides por animal, com observação da relação entre o comprimento da cauda e o tamanho da cabeça do cometa. A classificação quanto aos possíveis danos, foi feito por análise de cada nucleoide sendo classificado em uma de cinco classes: 0 (sem dano); 1 (pouco dano aparente); 2 (dano médio); 3 (dano médio com cauda mais longa); e 4 (dano máximo). Desta forma, os valores obtidos para cada indivíduo podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4); a este valor denominados Índice de Dano (ID) por animal. Assim, o ID foi calculado seguindo a forma abaixo:

$$\text{ID total} = (\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 0}) + 1 (\text{n}^\circ \text{ classe 1}) + 2 (\text{n}^\circ \text{ classe 2}) + 3 (\text{n}^\circ \text{ classe 3}) + 4 (\text{n}^\circ \text{ classe 4})$$

Para analisar a frequência de danos (FD%), que foi calculada de acordo com a porcentagem de todos os nucleoides com algum dano (classe 1 até classe 4) em relação ao total de nucleoides contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total) (Collins et al., 2008). Seguindo a fórmula:

$$FD = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe 0}) \cdot 100]}{\text{n}^\circ \text{ total}}$$

5.7.4 Teste de Micronúcleo

Do sangue coletado de cada animal, foram retirados 5 µL e depositados em lâmina com laranja de acridina, cobrindo-se com uma lamínula para espalhar uniformemente o material biológico. As lâminas passaram por uma preparação prévia para receber o material biológico. Inicialmente foram lavadas com detergente neutro e água destilada, depois foram banhadas em álcool 70% e depositadas em estufa 80°C por 15 minutos. Ainda aquecidas, espalhou-se uniformemente 10 µL de

laranja de acridina (1 mg/mL) em cada lâmina, depois foram colocadas para secar em temperatura ambiente, por no mínimo 30 minutos (EIJL et al., 1992).

Antes do micronúcleo (MN), a citotoxicidade dos tratamentos foi analisada. Para isso, 100 eritrócitos foram avaliados, contabilizando-se a proporção de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação ao total de eritrócitos da seguinte maneira: $PCE / (PCE + NCE)$, onde NCE significa eritrócitos normocromáticos. Assim, a toxicidade de cada tratamento é indicada por uma redução significativa (menos de 20%) na percentagem de PCE, quando o grupo tratado é comparado com o CN (RIBEIRO, 2003). Para o MN propriamente dito, 2000 PCE por animal foram analisados para se quantificar a presença de PCE micronucleados (PCEMn) (OCDE, 2016). A análise foi realizada em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager M2, com objetiva de 40X, utilizando o filtro Alexa Fluor 488.

5.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

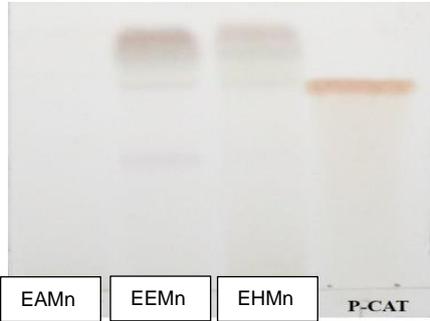
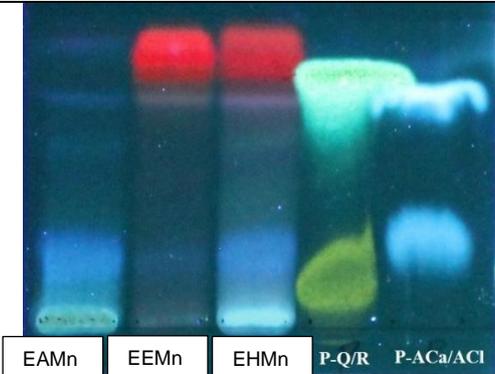
As análises estatísticas serão realizadas utilizando-se o programa Prisma 5.0. A homogeneidade das variâncias foi testada através do método de Bartlett. De acordo com a homogeneidade, os dados foram analisados por meio do teste t de Student para amostras independentes ou análise de variância de uma via (One Way ANOVA), seguido, se necessário, pelo teste de Newman-Keuls ou Tukey. Caso não assumam uma distribuição normal, será empregado os testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dun. Para as análises do consumo de ração e água utilizamos a análise de variância de duas vias (Two Way ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade será fixado em 5% ($p < 0,05$).

6 RESULTADOS

6.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A aplicação foi realizada na seguinte sequência: aquoso (EAMn), etanólico (EEMn) e hidroalcoólico (EHMn) e Padrão.

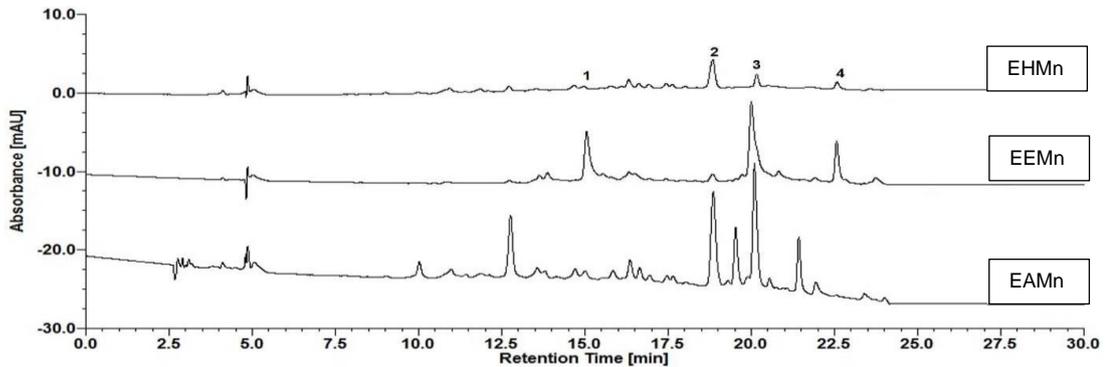
Quadro 2 – Principais classes de metabólitos encontrados nos EMn.

Classe de Metabólito	Resultado
Taninos condensados	 <p data-bbox="938 1115 1050 1144">Negativo.</p>
Flavonoides e Derivados Cinâmicos	 <p data-bbox="943 1559 1043 1588">Positivo.</p>

Fonte: Laboratório de Farmacognosia – UFPE, 2019.

Um cromatograma representativo de cada amostra está evidenciado abaixo no comprimento de onda de 350 nm (Figura 6). Foram verificadas a presença de diversos picos, sendo sugerida a presença de: derivado de ácido elágico: 1 – $t_R = 15,05$ min; rutina: 2 – $t_R = 18,86$ min; ácido elágico: 3 – $t_R = 20,00$ min; e, derivado flavonoídico(1): 4 – $t_R = 22,5$ min.

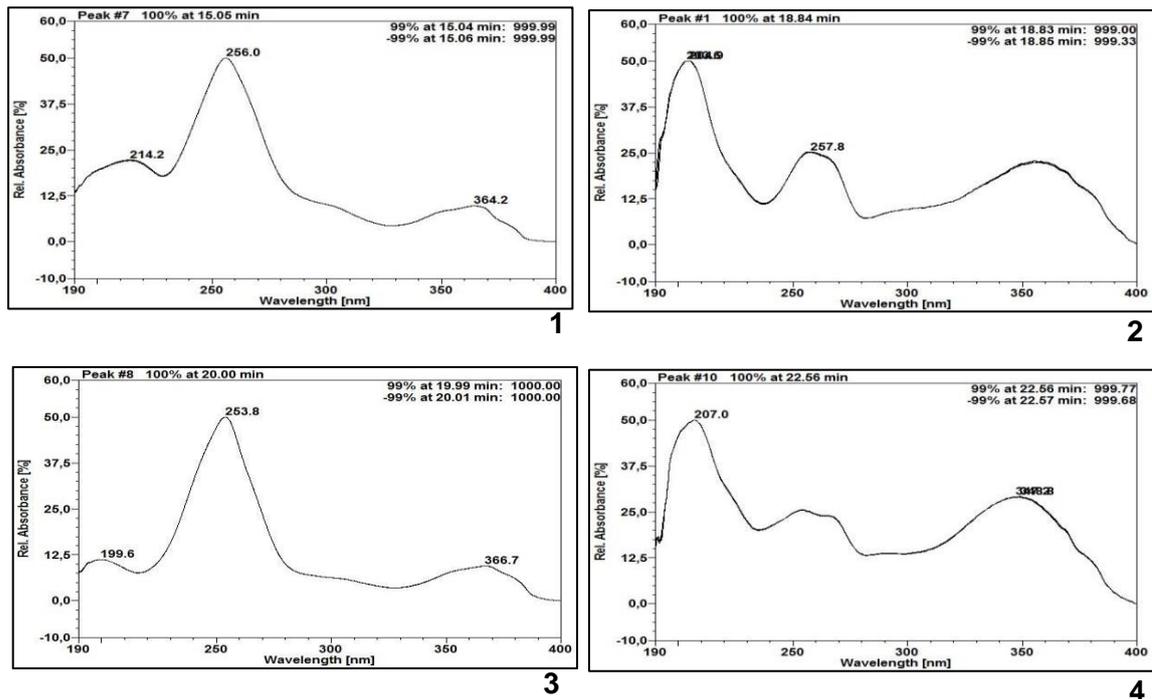
Figura 6 – Cromatogramas das amostras em 350 nm.



Fonte: Laboratório de Farmacognosia – UFPE, 2019.

Na figura 7 estão representados os espectros dos picos observados após varredura. A confirmação da presença dos compostos foi realizada mediante comparação dos espectros de varredura dos padrões, tempo de retenção e após coeluição das amostras e padrões.

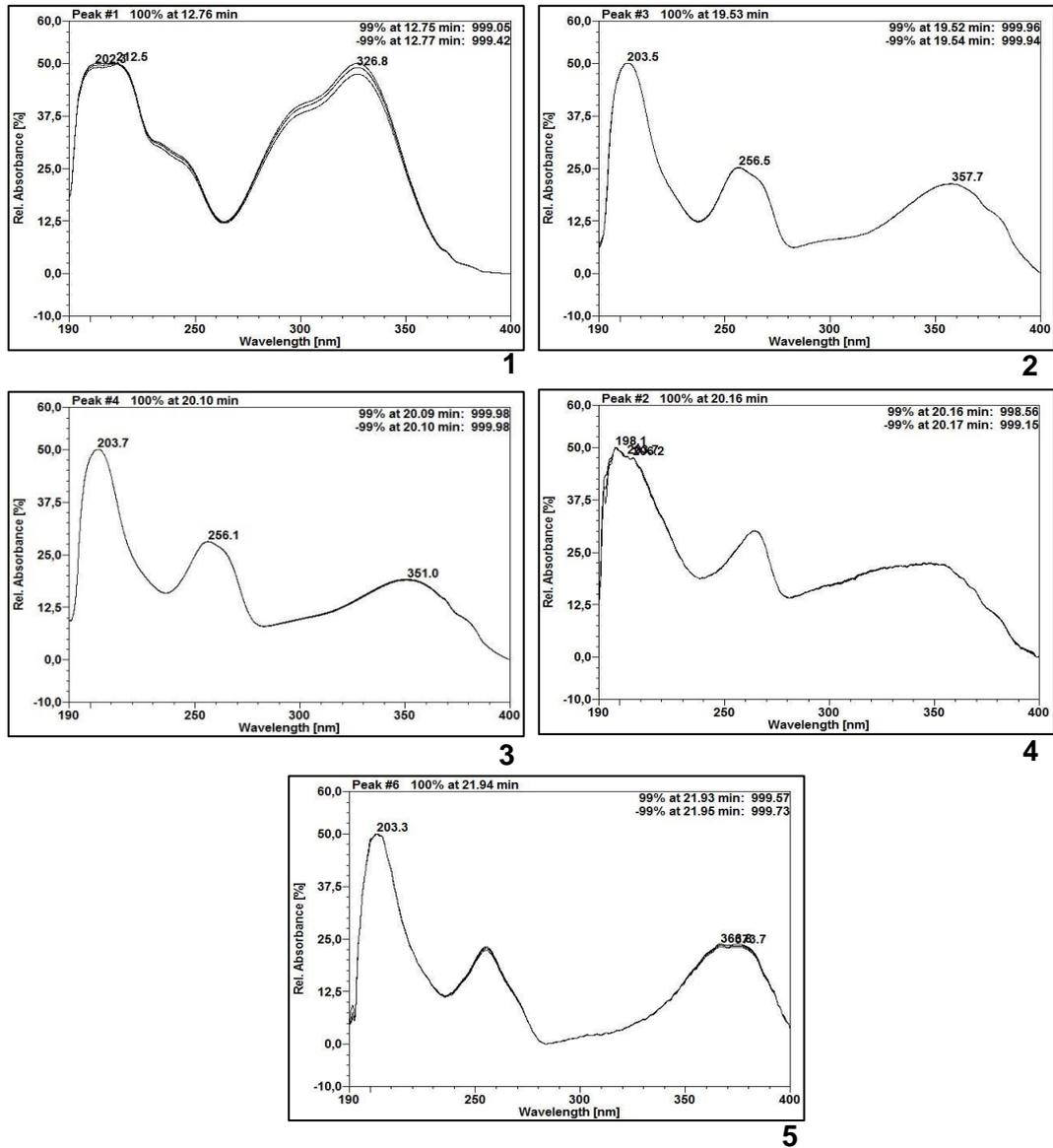
Figura 7 – Espectros de varredura dos picos 1 a 4 evidenciados nos cromatograma a 350 nm



Derivado de ácido elágico: 1 – t_R = 15.05 min; rutina: 2 – t_R = 18.86 min; ácido elágico: 3 – t_R = 20.00 min; e, derivado flavonoídico(1): 4 – t_R = 22.5 min.

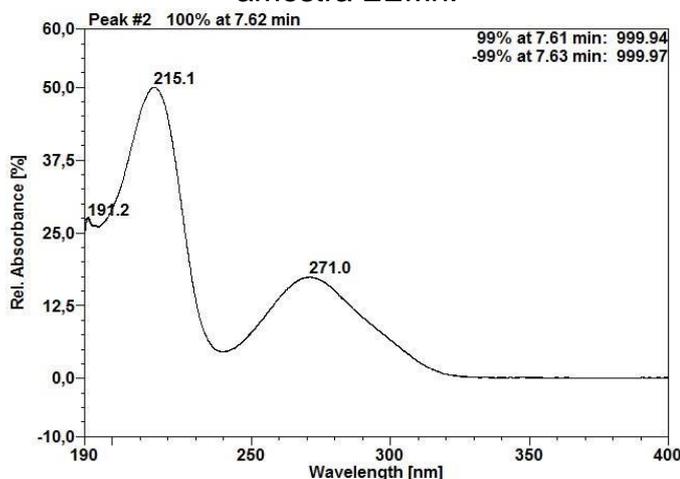
Como é possível observar no cromatograma da amostra aquosa em 350 nm, há evidência da presença de maior número de picos. Os espectros de varredura estão evidenciados na figura 8. De acordo com os espectros observados, infere-se que são compostos da classe de derivados cinâmicos (1) e de flavonoides (2-5).

Figura 8 – Espectros de varredura evidenciados no cromatograma a 350 nm da amostra EAMn.



Na amostra obtida com etanol, foi possível observar a presença de ácido gálico. O espectro de varredura encontra-se evidenciado na figura 9.

Figura 9 – Espectro de varredura evidenciado no cromatograma a 270 nm da amostra EEMn.



Além disso, a tabela 1 apresenta o teor dos compostos calculado nas amostras: extrato aquoso (EAMn), extrato etanólico (EEMn) e extrato hidroalcoólico (EHMn).

Tabela 1 – Teor dos compostos calculado no extrato de *Morus nigra*.

	EAMn	EEMn	EHMn
Ácido gálico	-	0,09 ± 0,0005 (0,29)	-
Ácido elágico	0,24 ± 0,0024 (0,96)	0,48 ± 0,0018 (0,38)	0,18 ± 0,0010 (0,99)
Rutina	0,33 ± 0,0021 (0,62)	0,34 ± 0,0010 (0,30)	0,13 ± 0,0005 (0,34)
Derivados flavonoídicos*	0,39 ± 0,0006 (0,43)	0,15 ± 0,0003 (0,20)	0,08 ± 0,0006 (0,72)
Derivados ácido elágico[#]	0,18 ± 0,0001 (0,05)	0,34 ± 0,0002 (0,05)	0,18 ± 0,0001 (0,05)

Os resultados foram expressos em g% (média ± dp; dpr%).

g%: gramas de metabólito por 100 g de extrato.

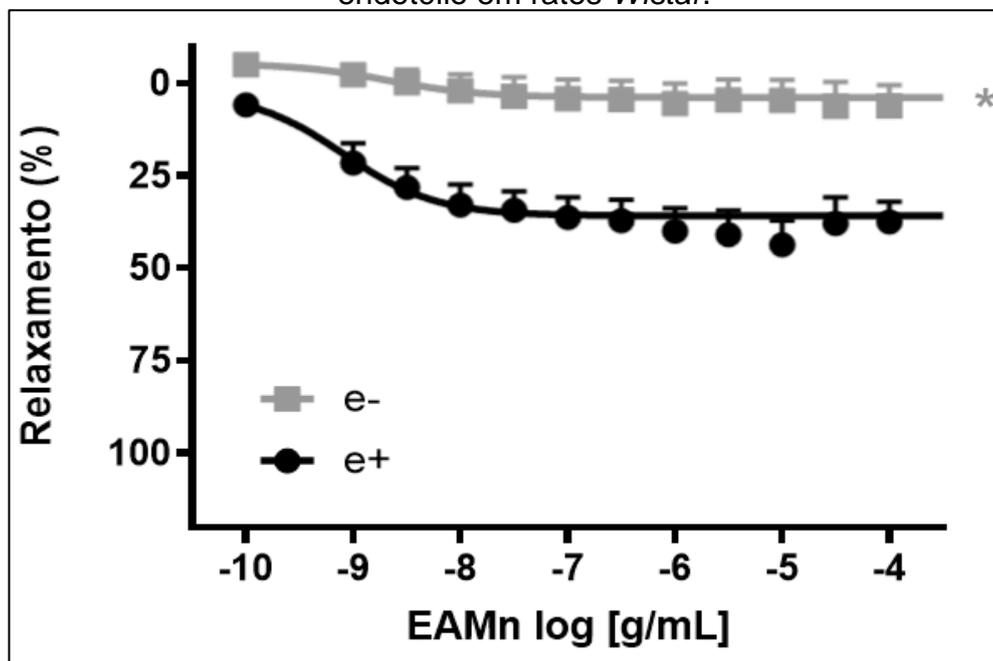
*Calculados como rutina; [#]Calculados como ácido elágico

Fonte: Laboratório de Farmacognosia – UFPE, 2019.

6.2 REATIVIDADE VASCULAR

Como podemos observar na figura 10, o EAMn foi capaz de induzir relaxamento em anéis de artéria aorta de ratos *Wistar* na presença de endotélio ($E_{max}= 37,4 \pm 5,2\%$ e $pEC_{50}= 8,65 \pm 0,23$, $n=6$), não sendo observado tal relaxamento em anéis desprovidos de endotélio ($E_{max}= 6,1 \pm 5,5\%$, $n=6$, $p<0,05$).

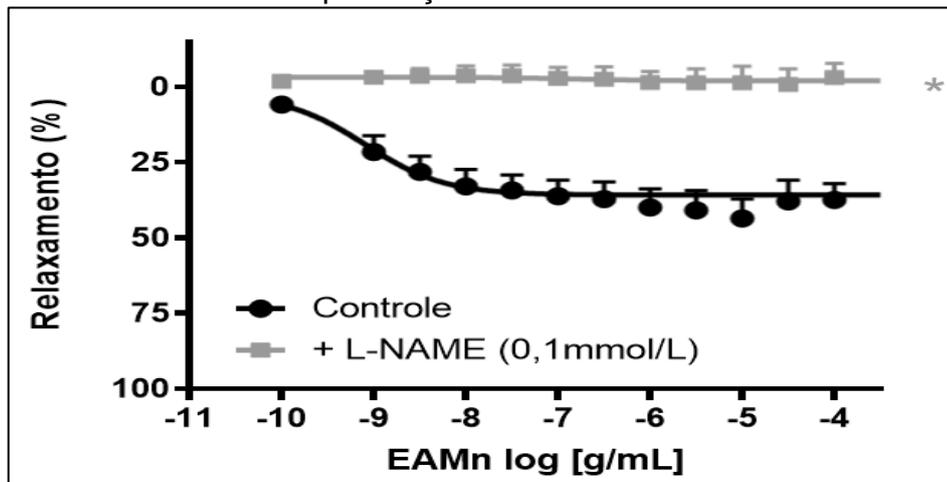
Figura 10 - Relaxamento induzido pelo EAMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos *Wistar*.



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzida pelo extrato aquoso de *M. nigra* (EAMn) na ausência (e-) e na presença (e+) do endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média, $n= 6-8$ experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo sem endotélio, $p<0,05$, Teste *t* de Student para amostras não pareadas.

A fim de identificarmos o mecanismo de ação envolvido no processo de vasodilatação induzido pelo EAMn, foi utilizado o inibidor da síntese do óxido nítrico (L-NAME) na concentração de $100 \mu\text{mol/L}$ em anéis de artéria aorta de ratos *Wistar* com endotélio intacto. Na presença do L-NAME, o relaxamento induzido pelo extrato foi abolido (Controle: $E_{max}=37,4 \pm 5,2\%$ e $pEC_{50}= 8,65 \pm 0,23$, $n=6$; EAMn + L-NAME: $E_{max}= -3,2 \pm 4,5\%$, $n=6$, $p<0,05$) (Figura 11).

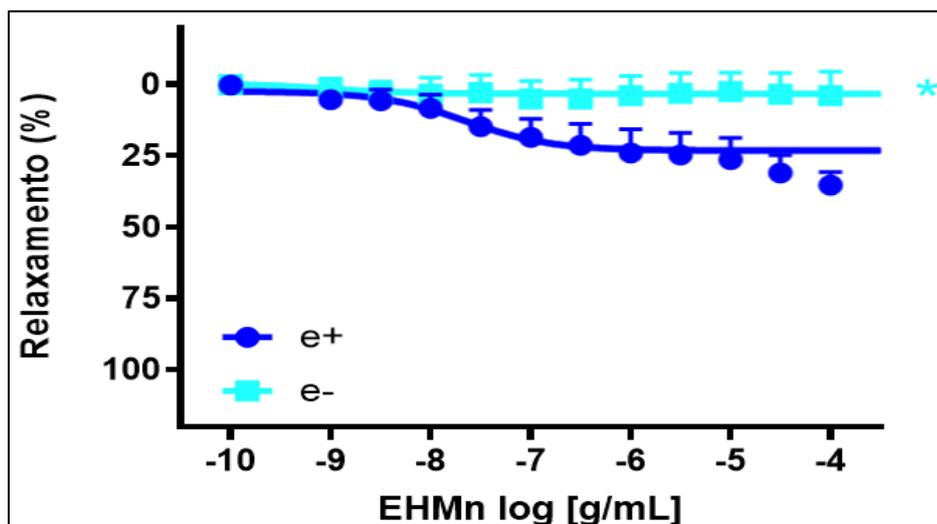
Figura 11 - Relaxamento induzido pelo EAMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos *Wistar*.



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzida pelo extrato aquoso de *M. nigra* (EAMn) na presença do endotélio, na ausência ou na presença de L-NAME (100 μ mol/L). Os pontos representam média \pm erro padrão da média, n= 6 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo controle, p<0,05, Teste t de Student para amostras não pareadas.

O EHMn também induziu relaxamento de aortas com endotélio, mas não sem endotélio (e+: Emax= 35,2 \pm 4,4% n=6; pEC₅₀= 7,68 \pm 0,26, n= 8; e-: Emax= 8,6 \pm 24,7% n=5, p<0,05) (Figura 12).

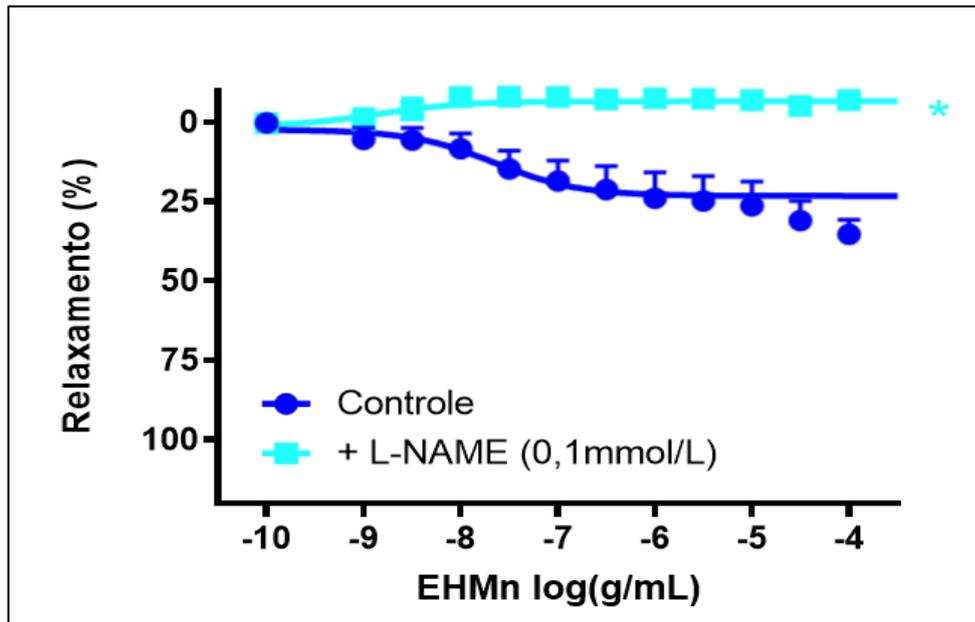
Figura 12 - Relaxamento induzido pelo EHMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos *Wistar*.



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzida pelo extrato hidroalcoólico de *M. nigra* (EAMn) na ausência (e-) e na presença (e+) do endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média, n= 6-8 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo sem endotélio, p<0,05, Teste t de Student para amostras não pareadas.

Na presença de L-NAME, o relaxamento induzido pelo EHMn foi abolido, (controle: $E_{max} = 35,2 \pm 4,4\%$, $n=6$; $pEC_{50} = 7,69 \pm 0,26$, $n= 8$; EHMn + L-NAME: $E_{max} = -7,0 \pm 3,2\%$, $n=5$, $p<0,05$), conforme mostra a Figura 13.

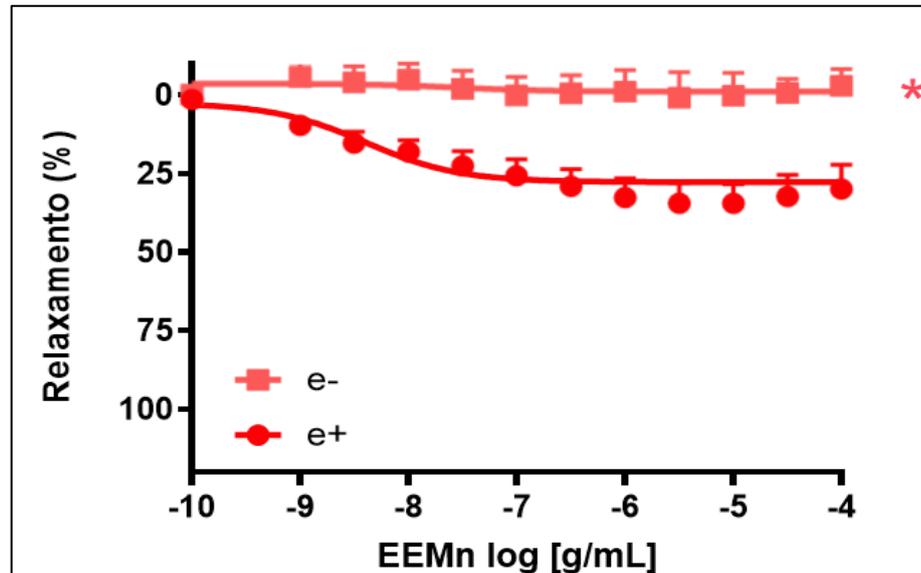
Figura 13 - Relaxamento induzido pela EHMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos *Wistar*



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzida pelo extrato hidroalcoólico de *M. nigra* (EHMn) na presença do endotélio, na ausência ou na presença de L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$). Os pontos representam média \pm erro padrão da média, $n= 5-8$ experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo controle, $p<0,05$, Teste *t* de Student para amostras não pareadas.

O efeito vasodilatador também foi promovido pelo EEMn em anéis de artéria aorta na presença de endotélio, mas não nos anéis sem endotetélio (figura 14) (e+: $E_{max} = 29,8 \pm 7,6\%$; $pEC_{50} = 8,22 \pm 0,25$, $n=7$; e-: $E_{max} = -2,9 \pm 5,2\%$, $n=4$, $p<0,05$).

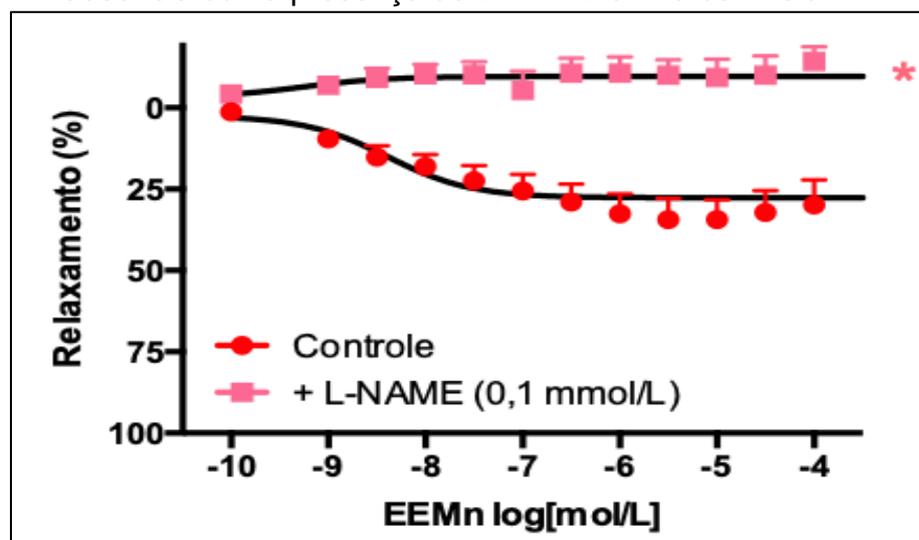
Figura 14 - Relaxamento induzido pelo EEMn em anéis de aorta com e sem endotélio em ratos *Wistar*.



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzido pelo extrato etanólico de *M. nigra* (EEMn) na ausência (e-) e na presença (e+) do endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média, n= 7-4 experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo sem endotélio, $p < 0,05$, Teste *t* de Student para amostras não pareadas.

Na presença do inibidor da NOS, L-NAME, o relaxamento induzido pelo EEMn foi abolido (Controle: $E_{max} = 29,8 \pm 7,6\%$; $pEC_{50} = 8,22 \pm 0,25$, n=7; EEMn + L-NAME: $E_{max} = -14,2 \pm 4,3\%$, n=6, $p < 0,05$).

Figura 15 - Relaxamento induzido pelo EEMn em anéis de aorta com endotélio na ausência ou na presença de L-NAME em ratos *Wistar*.

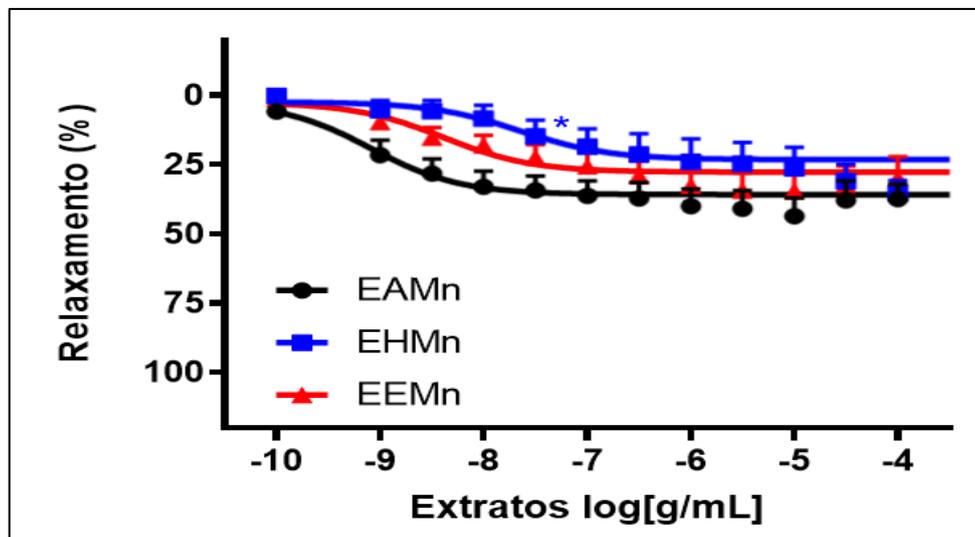


As curvas representam a resposta vasodilatadora induzida pelo extrato etanólico de *M. nigra* (EEMn) na presença do endotélio, na ausência ou na presença de L-NAME (100 μ mol/L). Os pontos representam média \pm erro padrão da média, n= 6 experimentos realizados em preparações de

diferentes animais. *diferença estatística quando comparada ao grupo controle, $p < 0,05$, Teste *t* de Student para amostras não pareadas.

Não houve diferença no E_{max} quando os extratos foram comparados entre si, em preparações com endotélio (EAMn: $E_{max} = 37,4 \pm 5,2\%$, $n=6$; EHMn: $E_{max} = 35,2 \pm 4,4\%$, $n=6$; EEMn: $E_{max} = 29,8 \pm 7,6\%$, $n=7$). Porém, a pEC_{50} do EAMn foi maior que a do EHMn (EAMn: $pEC_{50} = 8,65 \pm 0,23$, $n=6$; EHMn: $pEC_{50} = 7,68 \pm 0,26$, $n=8$; EEMn: $pEC_{50} = 8,21 \pm 0,24$, $n=7$, $p < 0,05$) (Figura 16).

Figura 16 - Relaxamento induzido pelos EMn em anéis de aorta com endotélio em ratos *Wistar*.



As curvas representam a resposta vasodilatadora induzido pelos extratos das folhas de *M. nigra* (EMn) na presença do endotélio. Os pontos representam média \pm erro padrão da média, $n= 6-8$ experimentos realizados em preparações de diferentes animais. *Diferença estatística quando comparado ao grupo EAMn. ANOVA de uma via, seguida do teste de Tukey.

6.3 TOXICIDADE ORAL AGUDA

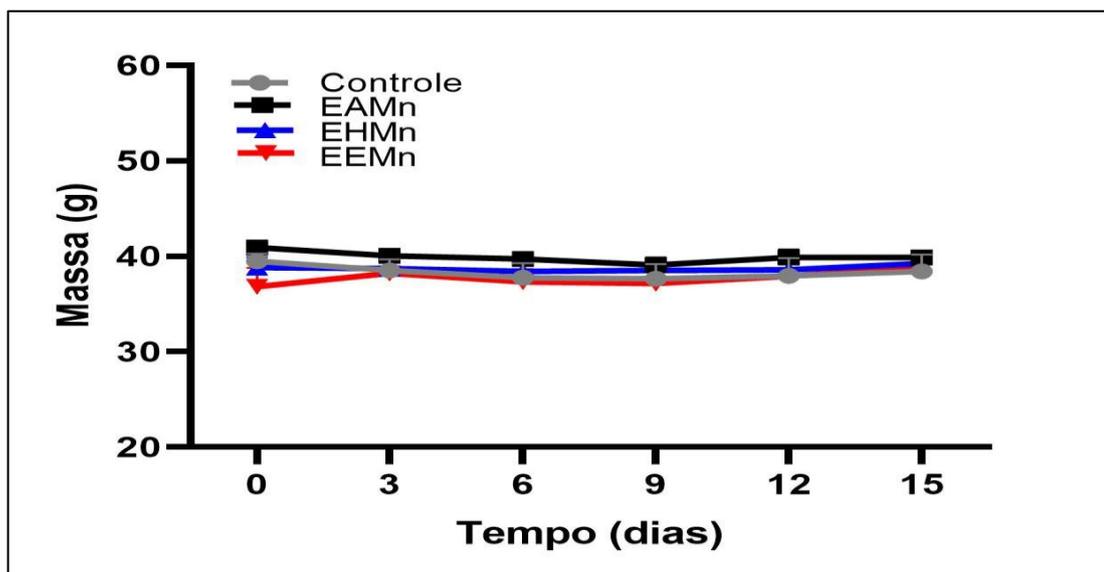
No presente estudo, não foram observadas alterações na pele e no pêlo, olhos, mucosas, sistema respiratório, circulatório, nervoso autônomo e central, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma ou óbito dos animais após tratamento com os extratos de *M. nigra* (EAMn, EHMn e EEMn) nas condições experimentais utilizadas, sendo considerada a estimativa da DL₅₀ superior a 2000 mg/kg.

6.3.1 Avaliação da Massa Corporal e dos Órgãos

Ao final dos 14 (quatorze) dias, os órgãos (coração, fígado, pulmões, rins, baço, adrenais e pâncreas) foram removidos e pesados, e sequencialmente analisados macroscopicamente quanto a coloração, consistência, presença de petéquias ou pontos hemorrágicos. Não foram observados sinais de alteração em nenhum dos órgãos avaliados.

Não houve diferença da massa corporal entre os animais do grupo controle e as dos animais dos grupos de tratados com a dose de 2000 mg/kg (figura 17).

Figura 17 - Efeito da administração oral em dose única dos extratos de *M. nigra* L.



Massa dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos aquoso (EAMn), hidroalcoólico (EHMn) e etanólico (EEMn) sobre a massa corporal em camundongos Swiss fêmeas. Os valores representam as médias (n=3/grupo).

Em relação à massa dos órgãos, foram calculadas a massa absoluta (g) e relativa (%) de cada um dos órgãos. Nas condições experimentais utilizadas, não foram evidenciadas alterações significativas quanto à massa relativa de nenhum dos órgãos, com exceção da massa absoluta, os grupos EAMn e EEMn, que foram maiores (Tabela 2).

Tabela 2. Massa absoluta (g) e relativa (%) dos órgãos de camundongos fêmeas Swiss após teste de toxicidade oral aguda dos extratos de *M.nigra* administrado em dose única de 2000 mg/Kg (n=3/grupo).

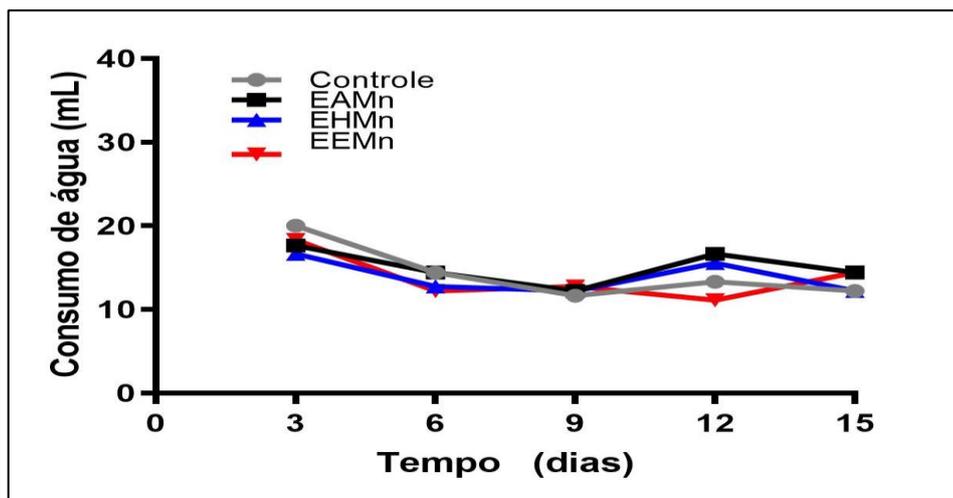
Órgãos	Controle	EAMn (2000mg/kg)	EHMn (2000mg/Kg)	EEMn (2000mg/kg)
Coração (g)	0,275 ± 0,026	0,215 ± 0,014	0,255 ± 0,041	0,227 ± 0,005
Coração (%)	0,713 ± 0,049	0,537 ± 0,042	0,650 ± 0,092	0,620 ± 0,031
Fígado (g)	2,273 ± 0,010	2,842 ± 0,122*	2,641 ± 0,126	2,709 ± 0,068*
Fígado (%)	6,006 ± 0,278	7,170 ± 0,412	6,803 ± 0,193	7,436 ± 0,352
Rins (g)	0,462 ± 0,012	0,544 ± 0,026	0,522 ± 0,042	0,561 ± 0,015
Rins (%)	1,221 ± 0,086	1,367 ± 0,084	1,337 ± 0,081	1,533 ± 0,070
Pulmões (g)	0,219 ± 0,016	0,316 ± 0,043	0,256 ± 0,029	0,284 ± 0,019
Pulmões (%)	0,577 ± 0,038	0,790 ± 0,104	0,653 ± 0,062	0,777 ± 0,071
Baço (g)	0,217 ± 0,010	0,238 ± 0,005	0,209 ± 0,009	0,235 ± 0,011
Baço (%)	0,563 ± 0,015	0,593 ± 0,018	0,533 ± 0,013	0,640 ± 0,047
Adrenais (g)	0,030 ± 0,002	0,040 ± 0,0003	0,042 ± 0,005	0,036 ± 0,003
Adrenais (%)	0,079 ± 0,005	0,093 ± 0,003	0,107 ± 0,012	0,097 ± 0,009
Pâncreas (g)	0,247 ± 0,018	0,293 ± 0,011	0,333 ± 0,050	0,267 ± 0,013
Pâncreas (%)	0,650 ± 0,050	0,733 ± 0,035	0,853 ± 0,115	0,730 ± 0,060

*Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, p <0,05).

6.3.2 Avaliação do Consumo de Água e Ração

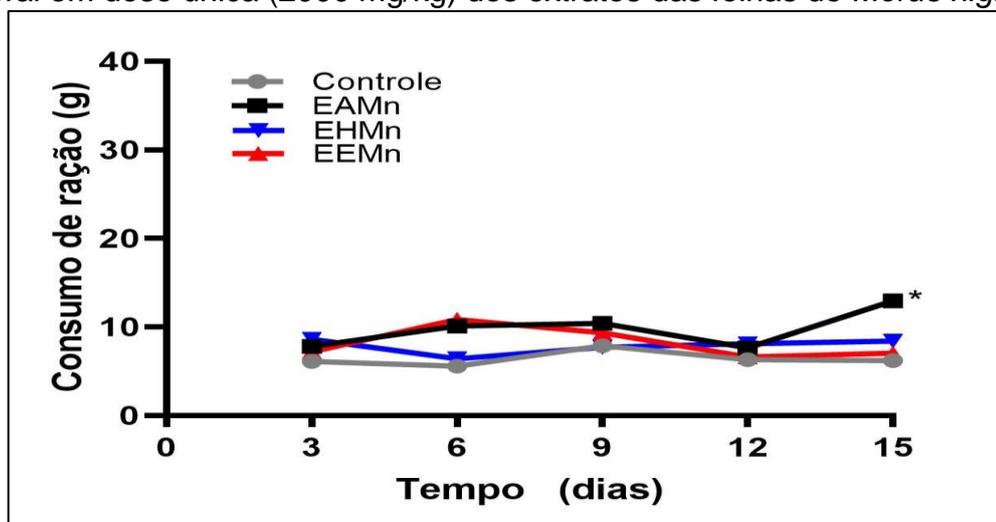
Em relação ao consumo de água, os grupos não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao grupo controle (Figura 18). Quanto ao consumo de ração, foi observado um aumento no grupo EAMn, quando comparamos ao grupo controle (Figura 19).

Figura 18 - Consumo de água dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos das folhas de *Morus*.



Efeito da administração em dose única (Teste toxicidade oral aguda 14 dias) dos extratos aquoso (EAMn), hidroalcoólico (EHMn) e etanólico (EEMn) sobre o consumo de água por camundongos Swiss fêmeas. Os valores representam as médias (n=3/grupo).

Figura 19 - Consumo de ração dos camundongos fêmeas após administração por via oral em dose única (2000 mg/kg) dos extratos das folhas de *Morus nigra* L.



Efeito da administração em dose única (Teste toxicidade oral aguda 14 dias) dos extratos aquoso (EAMn), hidroalcoólico (EHMn) e etanólico (EEMn) sobre o consumo de ração por camundongos Swiss fêmeas. Os valores representam as médias (n=3/grupo). *Estatisticamente diferente do grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Tukey, $p < 0,05$).

6.4 GENOTOXICIDADE

Como os efeitos máximos dos extratos foram semelhantes, optou-se por prosseguir o teste de genotoxicidade apenas com o extrato aquoso de *M. nigra*, devido à sua maior potência e ao fato de que este é o extrato usado popularmente. De acordo com a tabela 3, é possível identificar que não houve diferenças significativas entre o grupo EAMn em comparação com o controle negativo (CN) em nenhum dos testes realizados.

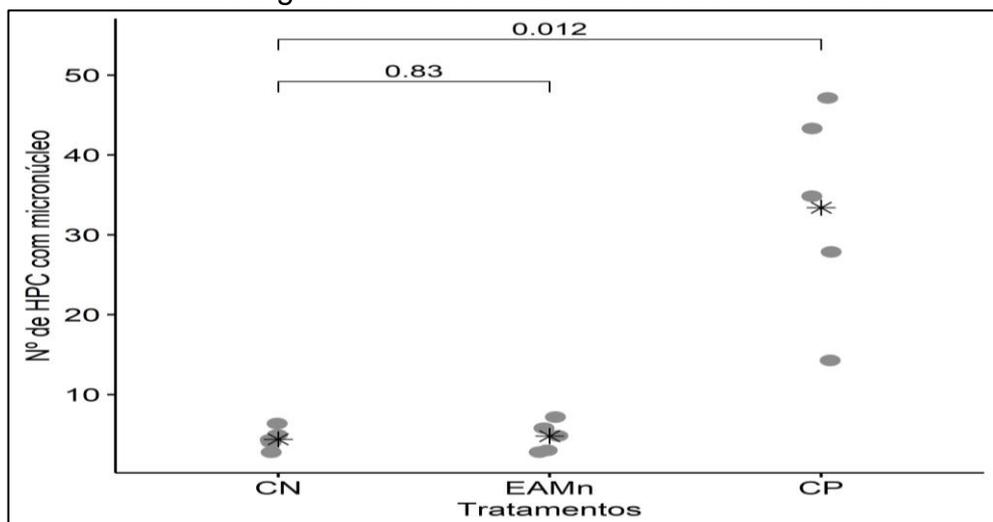
Tabela 3 – Resultados dos testes de micronúcleo e ensaio cometa.

GRUPOS	Testes		
	MN(%) Média (DP)	ID(%) Média (DP)	FD (%) Média (DP)
CN	4,4 (1,14)	55 (13,62)	32,0 (5,56)
CP	33,4 (13,08)	351 (31,31)	100,0 (0,00)
EAMn	4,8 (1,78)	57 (15,18)	34,4 (6,10)

MN: micronúcleo; ID: índice de dano pelo ensaio cometa; FD: frequência de dano. Valores expressos em percentagem; DP: desvio padrão; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; EAMn: Extrato Aquoso *M. nigra*.

Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com EAMn e o controle (CN) (Figura 20).

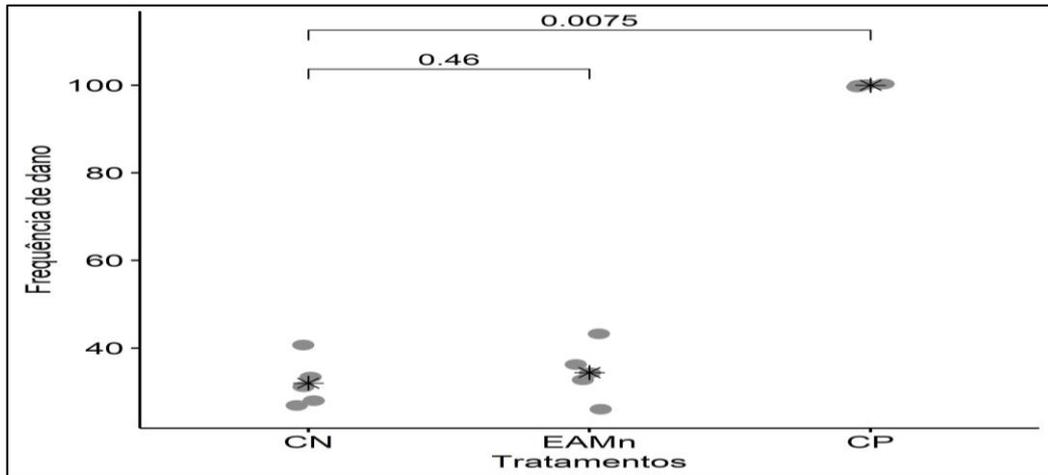
Figura 20 - Frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleos em camundongos tratados com EAMn ou ciclofosfamida.



Cada ponto representa um animal (n=5) do grupo. CN: controle negativo. CP: controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg i.p.). EAMn: Extrato aquoso *M. nigra* (2000 mg/kg v.o.). HPC: eritrócitos policromáticos. Números sobre barras representam os valores de p, Mann-Whitney.

Em relação a frequência de dano observada perante a administração do EAMn (figura 21) não houve diferença entre os grupos EAMn e CN.

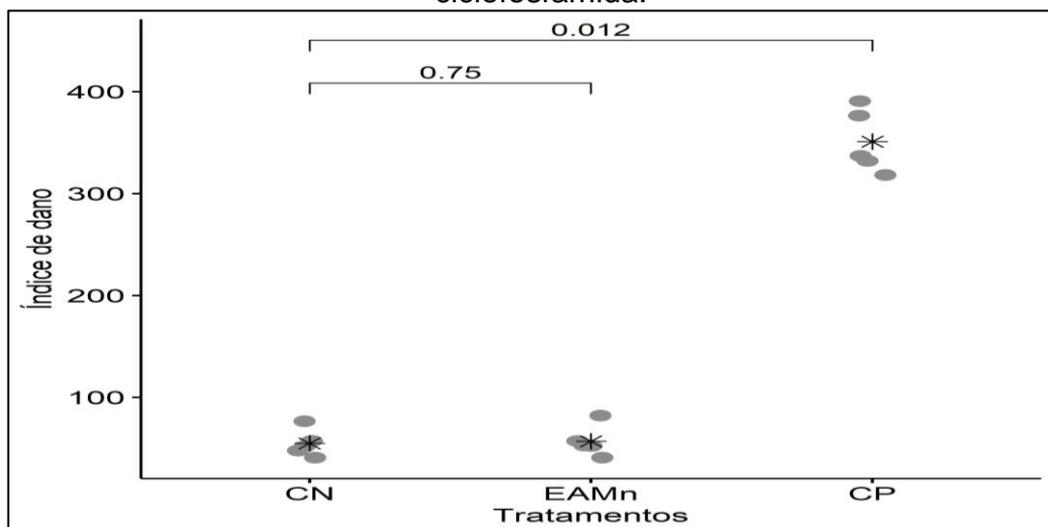
Figura 21 - Avaliação da Frequência de Dano em camundongos tratados com EAMn ou ciclofosfamida.



Cada ponto representa um animal (n=5) do grupo. CN: controle negativo. CP: controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg i.p.). EAMn: Extrato aquoso *M. nigra* (2000 mg/kg v.o.). Números sobre barras representam os valores de p, Mann-Whitney.

Em relação ao índice de dano do grupo EAMn (figura 22), não foram observados danos na dose e condições experimentais utilizadas quando comparamos ao CN.

Figura 22 - Avaliação do Índice de Dano em camundongos tratados com EAMn ou ciclofosfamida.



Cada ponto representa um animal (n=5) do grupo. CN: controle negativo. CP: controle positivo (ciclofosfamida 25 mg/kg i.p.). EAMn: Extrato aquoso *M. nigra* (2000 mg/kg v.o.). Números sobre barras representam os valores de p, Mann-Whitney.

7 DISCUSSÃO

Fitoquímica

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas como importante recurso no tratamento e prevenção de doenças. No entanto, para que haja o uso racional das mesmas, se faz necessário conhecer a sua constituição química e avaliar a sua eficácia e toxicidade. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar os principais constituintes presentes nos extratos das folhas de *Morus nigra* L., bem como os efeitos vasculares e a sua toxicidade.

O estudo dos metabólitos secundários de plantas tem se desenvolvido aceleradamente nos últimos anos. Estes compostos são conhecidos por cumprirem um importante papel na adaptação das plantas aos seus ambientes, bem como representam uma fonte importantíssima de substâncias farmacologicamente ativas (FUMAGALI et al., 2008).

Diversas espécies de plantas produzem uma grande diversidade de metabólitos secundários que muitas vezes possuem um grupo fenol, ou seja, um grupo hidroxila em um anel aromático (LIU et al., 2018). Esses metabólitos são classificados como compostos fenólicos, dentre os quais se destacam os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos, as ligninas e os tocoferóis (SHAHIDI, 1995).

Para a identificação das principais classes de metabólitos dos extratos das folhas de *M. nigra*, foram utilizados dois métodos analíticos bastante descritos na literatura: Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), que possibilitaram a identificação das classes de metabólitos e o teor dos principais compostos presentes em cada tipo de extrato estudado, respectivamente. Neste estudo, foi possível observar que os extratos das folhas de *M. nigra* possuem perfil fitoquímico semelhante. Foi possível evidenciar a presença de taninos hidrolisáveis, derivados cinâmicos e flavonoides nos três extratos. Especificamente a partir da CLAE, foram evidenciados quatro picos, os quais possuem o mesmo tempo de retenção nos três extratos, fato que garante a semelhança quanto ao perfil fitoquímico.

O extrato etanólico apresentou teor considerável de ácido elágico (AE), rutina e derivado ácido elágico. Apresentando, em menor teor, ácido gálico e derivados flavonoídicos. Porém foi o único extrato que apresentou ácido gálico, característica

que pode estar associada ao método de extração utilizado. O extrato hidroalcoólico apresentou teor relevante de diversos compostos sendo ácido elágico e derivados ácido elágico com maiores proporções. Já o extrato aquoso apresentou maior teor de derivados flavonoidicos, rutina, ácido elágico e derivados ácido elágico destacando-se dos demais extratos analisados.

Alguns compostos identificados corroboram com os achados de outros trabalhos. ROSA et al. (2016) verificou que o extrato aquoso das folhas de *M. nigra* apresentou alcaloides, depsídeos e depsidonas (compostos fenólicos), saponinas e taninos. No estudo de DE QUEIROZ, et al. (2012) foi visto a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenos e esteroides no extrato hidroalcoólico das folhas de *M. nigra*. Através do extrato etanólico das folhas dessa espécie, ALMEIDA et al. (2011) identificaram a presença de fenóis, flavonoides, esteroides e terpenoides.

Os taninos, um grupo de compostos fenólicos, foram compostos encontrados em nossa triagem fitoquímica. Os mesmos tem sido empregados na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, distúrbios gastrointestinais (azia, náusea, gastrite e úlcera gástrica), problemas renais e do sistema urinário e nos processos inflamatórios em geral (SERRANO, J. et al., 2009). Esses compostos apresentam diversas ações farmacológicas, dentre elas, bactericida, fungicida, antiviral, citotóxica, cicatrizante, antimutagênica e antioxidante (OKUDA T. et al., 2005; SERRANO, J. et al., 2009; QUIDEAU S. et al., 2011). Os taninos podem ser classificados quanto à sua estrutura química em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os taninos hidrolisáveis são poliésteres da glicose e classificados, dependendo do ácido formado de sua hidrólise, em taninos gálicos ou taninos elágicos, enquanto os taninos condensados são constituídos por monômeros do tipo catequina e conhecidos por flavonoides (PIZZI, 1993).

O ácido gálico foi identificado apenas no EEMn e é considerado derivado do ácido chiquimíco, um intermediário do metabolismo secundário de plantas, sendo ainda um componente importante na formação de taninos hidrolisáveis em plantas (GRUNDHOFER et al., 2001; FERNANDES; SALGADO, 2016). Estudos apontam as atividades biológicas promovidas pelo ácido gálico, entre elas: antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatório e efeito anti-idade na pele (GOW-CHIN et al., 2002; CHAIKUL et al., 2019).

Foram ainda encontrados nos extratos compostos derivados cinâmicos. O ácido cinâmico também chamado de ácido 3-fenil-2-propenóico é um composto fenólico natural presente em alimentos e vegetais. Os derivados cinâmicos são comuns em plantas, sendo a maioria deles na forma de ésteres de açúcar e ácido quínico ou como glicosídeos (GEISSMAN et al., 1968). Tal composto possui uma ampla aplicação terapêutica, além de baixa toxicidade, possuindo uma comprovada atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, bem como ação anti-inflamatória, antidiabética, antihiperlipidêmica, antibacteriana, antioxidante, entre outras (EKMEKCIOGLU et al., 1998; TAWATA et al., 1996; NAM et al., 2001; SHARMA, 2011).

Os flavonoides, outro grupo de compostos fenólicos, são responsáveis por inúmeras funções nas plantas, como proteção contra raios ultravioleta, insetos, fungos, vírus e bactérias, e são capazes de proporcionar a atração de animais polinizadores. Dentre as suas atividades farmacológicas, estão atividade antitumoral, anti-inflamatória, antiviral, antioxidantes, entre outras (AGRAWAL, 2011; OLIVEIRA, et al., 2002; HEIM et al., 2002; MELLOU et al., 2005; SHASHANK et al., 2013; SELVARAJ et al., 2013; SIMÕES et al., 2007, FLAMBÓ, 2013.). Quanto as atividades farmacológicas promovidas por subgrupos de flavonoides e alguns dos seus representantes encontramos no estudo de CRITCHFIEL et al. (1996), atividade antiviral, promovida pela acacetina, juntamente com a amentoflavona descrita por SHUANG-CHENG et al. (2001); a buteina, apresentando atividade anti-inflamatória descrita por CHAN et al., (1998); hesperidina, descrita por OKAMURA et al., (1994) identificando a capacidade antioxidante; Quercetina e a rutina (composto identificado nos extratos), foram descritos por possuírem atividade anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral e antimicrobiana (FORMICA et al., 1995; FERRANDIZ e ALACARAZ, 1991; BEIL et al., 1995; YOO et al., 2014; PIMENTEL et al., 2013; VISKUPICOVA et al., 2010; ALONSO-CASTRO et al., 2013).

A rutina, um dos principais representantes flavonoídicos encontrados nos extratos, é derivada de uma flavona natural encontrada em abundância em trigo sarraceno (*Fagopyrum esculentum*), bem como em outras plantas, como aspargos e frutas cítricas (NGUYEN et al., 2013). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* já foram descritos sobre a rutina, a fim de avaliar seu efeito antioxidante, pelos ensaios de redução do radical DPPH, ABTS, capacidade de redução férrica (RIBEIRO et al., 2010; SANTOS et al., 2014; OLIVEIRA, 2015; NGUYEN et al., 2013). Em teste *in*

vivo realizado por AL-REJAIE et al. (2013) foi comprovado que, após a administração da rutina em grupo de animais que recebia dieta rica em colesterol, foi possível observar a diminuição dos níveis de MDA e de H_2O_2 , além do aumento na expressão dos genes da enzima glutathione redutase (Gr) e glutathione peroxidase (Gpx) no tecido hepático, comprovando a atividade antioxidante desse flavonoide.

Outro grupo de compostos fenólicos encontrado no presente estudo foi o ácido elágico e derivados ácido elágico, os quais podem ser encontrados em diversas plantas em sua forma livre ou na forma de elagitaninos (que são considerados componentes estruturais da parede da célula vegetal). O ácido elágico (AE) e seus derivados estão presentes em frutas como amora, morango, framboesa, mirtilo, uva, cereja, dentre outras, estando presente ainda na romã, nozes, amêndoas, sementes e bebidas fermentadas. (VATTEM; SHETTY, 2005; LANDETTE, 2011; GALANO et al., 2016). Alguns estudos apresentam uma grande variedade quanto aos efeitos biológicos promovidos pelo AE como: atividade antimutagênica, antioxidante, anti-inflamatória, anti-câncer, anti-viral, antibacteriana, gastroprotetora, cardioprotetora, anti-aterosclerótica, anti-hepatotóxica e anti-replicação de HIV (VATTEM; SHETTY, 2005; CELIK et al., 2013; GALANO et al., 2016; LANDETTE, 2011). Tais propriedades biológicas tornam o AE um agente promissor no combate a doenças crônicas, como a hipertensão arterial (YILMAZ e USTA, 2013).

Os compostos fenólicos são responsáveis por várias atividades biológicas, entre elas atividade antioxidante, pela capacidade de inibir a formação de radicais livres (SINGH et al., 2018). O aumento destas substâncias está associado a algumas doenças, como por exemplo, as doenças cardiovasculares, tais como a hipertensão arterial. A análise fitoquímica dos extratos neste estudo apresentou teores consideráveis de compostos fenólicos, o que pode ser associada às atividades biológicas descritas neste trabalho.

Reatividade Vascular

Este é o primeiro trabalho que mostra o efeito vasodilatador dos extratos das folhas de *M. nigra* em artéria aorta de ratos isolada.

Por ser uma camada única que recobre o lúmen dos vasos, o endotélio é responsável pelo controle do tônus vascular, sendo ainda capaz de produzir mediadores que participam na vasodilatação quanto na vasoconstrição. A vasodilatação é mediada pela prostaciclina, pelo EDHF e pelo óxido nítrico (NO), sendo esse considerado o mais eficiente. O óxido nítrico é produzido pela NO-sintase, que converte a L-arginina em L-citrulina, ativando conseqüentemente a enzima citosólica guanilil-ciclase solúvel (GCs) que produz guanosina-monofosfato-cíclico (GMPc), amplificando a vasodilatação (VANE, et al., 1990; CARVALHO, et al., 2001; ARNOLD et al., 1977).

Diante disso, por ser considerado um importante agente mediador para a vasodilatação, o NO é fundamental para a função do endotélio vascular, uma vez que sua diminuição poderá estimular a disfunção endotelial. Portanto, a disfunção está associada a diversas doenças cardiovasculares, tais como hipertensão arterial, aterosclerose, doença arterial coronária, entre outras doenças como diabetes, câncer, obesidade ou ainda no processo de envelhecimento (SIES, 1991; ZANESCO ; ANTUNES, 2005; FERRANNINI et al., 1997; TOUYZ, 2004; CAI ; HARRISON, 2000; TADDEI et al., 2000).

Neste estudo, foi possível observar que os três extratos (EAMn, EHMn e EEMn) promoveram relaxamento da artéria aorta de ratos. Este efeito pode estar relacionado à presença de compostos fenólicos nos extratos. Alguns estudos mostraram que, quando comparada a outras espécies do mesmo gênero, *M. nigra* apresenta maiores teores de compostos fenólicos e com atividade antioxidante (ERCISLI e ORHAN, 2007; GUNDOGDU et al., 2011). Os flavonoides promovem efeito vasodilatador no músculo liso da aorta de ratos, bem como são responsáveis pela diminuição dos níveis séricos de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), diminuição da agregação plaquetária e possuem ação antioxidante (DUARTE et al., 1993; ANDRIAMBELOSON, et al., 1997).

Extratos de outras espécies do gênero *Morus* também induzem vasodilatação. O extrato acetato de etila das folhas de *Morus alba* L. induziu relaxamento de artéria aorta de ratos, via bloqueio do canal de cálcio dependente de voltagem (XIA et al., 2008). POTHINUCH et al. (2017) observaram que o extrato das folhas de *Morus spp.*

induziu vasodilatação em artéria basilar de suínos, o que foi atribuído à presença de compostos fenólicos no extrato.

Para a investigação da participação do NO como um dos principais agentes envolvidos no efeito vasodilatador propiciado pelos extratos nos anéis aórticos com endotélio, foi utilizado o inibidor não seletivo da NOS, o L-NAME. O L-NAME, na concentração utilizada, aboliu totalmente o relaxamento do vaso em anéis com endotélio induzido pelos três extratos. Sendo assim, podemos dizer que os extratos induzem relaxamento via NO. No estudo de KURNIATI et al. (2014) foi verificado que o relaxamento induzido pelo extrato etanólico das folhas de *Morus alba L.* em ratos e coelho também foi dependente do óxido nítrico.

Sendo assim, os extratos das folhas de *M. nigra* induziram relaxamento em anéis de artéria aorta de forma dependente do endotélio, fato que pode estar associado à presença de metabólitos, tais como flavonoides que são considerados importantes agentes antioxidantes, atuando como carreadores de radicais livres, desempenhando um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares. No entanto, outros estudos são necessários para a garantia do uso eficaz e seguro desses extratos.

Toxicidade Oral Aguda

Dentre os meios fundamentais para validar a segurança e eficácia das plantas medicinais, estão os estudos toxicológicos, os quais são métodos que podem ajudar a garantir o uso desses produtos naturais. Diante disso, foi avaliada a toxicidade *in vivo* dos extratos EAMn, EHMn e EEMn das folhas de *M. nigra*, pelos protocolos da OECD 423.

No decorrer do estudo de toxicidade oral aguda dos extratos, na dose de 2000 mg/kg, os EAMn, EHMn e EEMn não provocaram mortalidade nem morbidade nos animais, bem como não foram observadas alterações morfológicas a nível macroscópico dos órgãos analisados (fígado, coração, pulmão, pâncreas, rins, adrenais e baço), pois os mesmos não apresentaram mudanças quanto à sua coloração e consistência, nem petéquias ou pontos hemorrágicos. Sendo assim, pelo método de classes, os extratos de *M. nigra* se enquadram na classe 5

(substância com DL_{50} superior a 2000 mg/kg e menor que 5000 mg/kg), sendo considerados de baixa toxicidade (OECD-423, 2001).

Segundo MELLO (2001) os sinais de toxicidade são definidos a partir da redução do desenvolvimento ponderal, além da redução nos consumos de água e ração, apatia, má condição da pelagem, pelos arrepiados e alterações de comportamento. Quanto ao consumo de água e ração, MUKINDA; EAGLES (2010) enfatizam que a análise desses fatores em uma experimentação animal é importante para investigar a segurança das substâncias estudadas com intuito terapêutico.

Sendo assim, a partir da análise do consumo de ração e água dos animais deste estudo, foi constatado um aumento no consumo de ração no grupo tratado com o extrato aquoso das folhas de *M. nigra* (EAMn) quando comparados ao grupo controle. Por outro lado, o consumo de água e massa corporal não apresentaram alterações. Contudo, esse aumento especificamente do consumo de alimento pode ser justificado pelo estudo de MIRANDA et al. (2010), a qual realizou experimentos com humanos, especificamente com mulheres, administrando o chá das folhas de *M. nigra* para o tratamento do climatério, ocasionando em seguida aumento do apetite, gases e diurese. Dessa forma, essa diferença quanto ao aumento do consumo de ração, pode ser considerada um indicativo de toxicidade, necessitando nesse caso de mais estudos.

Tais dados se contrapõem com o estudo de toxicidade subcrônica do chá das folhas de *Morus nigra*, administrado durante 30 dias por via oral em ratos, realizado por OLIVEIRA et al. (2013), no qual houve diferença estatística em relação ao aumento do consumo de líquido, e não no consumo de ração.

Ao compara as massas absoluta e relativa dos órgãos entre os grupos, não foram encontradas diferenças significativas, com exceção da massa absoluta do fígado dos grupos EAMn e EEMn apresentando maior massa quando comparados ao controle. O aumento da massa do fígado pode estar associado a proliferação de células hepáticas, tais como os hepatócitos, podendo ainda indicar processo inflamatório, bem como ser indicio de hepatotoxicidade. Sendo assim, estes indicios devem ser investigados mais profundamente, visto que pode ser indicativo de

alguma complicação local, contudo, estudos histopatológicos e bioquímicos deverão ser realizados a fim de entender as possíveis alterações.

Outros dados descritos na literatura abordam estudos toxicológicos frente a diferentes extratos das folhas do gênero *Morus*, bem como através de diferentes vias de administração.

Em relação à espécie *M. Nigra*, estudos foram realizados quanto à sua toxicidade por diferentes vias de administração. No estudo de FIGUEREDO (2017) foi realizado estudo de toxicidade oral aguda com extrato etanólico das folhas de *M. nigra* e, na dose administrada (2000 mg/kg), não foram observadas alterações importantes. No estudo de ALMEIDA et al. (2011) foi realizada a administração via oral e intraperitoneal do extrato etanólico das folhas de *M. nigra* nas doses 5000mg/kg e 2000mg/kg respectivamente, não foram observados sinais de mortalidade e toxicidade. FIGUEREDO et al. (2018) através dos testes de toxicidade aguda e subaguda do extrato etanólico das folhas de *M. nigra* mostrou que não houve apresentação de toxicidade e mortalidade. Tais dados corroboram em parte com os achados do presente estudo.

No que diz respeito ao extrato das folhas de *Morus alba* L. outra espécie pertencente ao gênero *Morus*, OLIVEIRA et al. (2015) realizou a toxicidade oral aguda do extrato etanólico nas doses de 300mg/kg e 2000mg/kg, e observou turgidez de túbulos contorcidos nos rins, presença de infiltração de leucócitos ao redor da veia centrolobular do fígado e alta dispersão da polpa branca do baço, ambos visualizados através de análise microscópica. Por outro lado, o extrato apresentou baixa toxicidade uma vez que não foram registrados óbitos, porém alterações bioquímica, hematológicas e histopatológicas foram apresentadas, o que indica cautela quanto ao seu uso. No estudo de PEREIRA et al. (2013) o extrato hidroetanólico das folhas de *M. alba* foi administrado oralmente durante seis dias (300 mg/kg/dia) não sendo observados indícios de toxicidade.

Através do resultado da toxicidade oral aguda obtido no presente estudo, quando comparados a outros descritos na literatura, fica evidente que análises posteriores deverão ser realizadas para que haja uma maior segurança quanto ao uso e a dose a ser administrada, pois segundo VEIGA JUNIOR et al. (2005) diversas

substâncias isoladas de vegetais considerados medicinais podem possuir atividades citotóxicas ou genotóxicas, podendo estar relacionada a incidência de tumores.

Genotoxicidade

Os métodos utilizados nos testes de genotoxicidade são o ensaio de micronúcleo e o ensaio cometa considerados importantes biomarcadores de citogenética, usados para detectar possíveis danos induzidos por substâncias em teste nos cromossomos. Um composto é definido como genotóxico quando a frequência de micronúcleos em animais tratados é estatisticamente superior ao do controle negativo (OCDE 474, 2016).

Sob as condições experimentais deste estudo, foi possível observar que, no teste de micronúcleo, o EAMn não induziu sinais de toxicidade. Também no ensaio cometa, que objetiva detectar quebras na fita simples do DNA (KUMARAVEL e JHA, 2006), o EAMn não induziu alterações, sugerindo que o EAMn não é genotóxico.

Outros estudos investigaram a genotoxicidade de espécies do gênero *Morus*. Em seu estudo, LI et al. (2018) realizaram o teste a partir do extrato aquoso das folhas de *Morus alba* L. e constataram que não apresentou genotoxicidade evidente; OLIVEIRA et al. (2016) utilizou o extrato etanólico das folhas de *M. alba* em diferentes concentrações (75, 150 e 300mg/kg) por via oral, o qual não foi genotóxico, podendo ser considerado seguro nesse aspecto. No trabalho de YILMAZ et al. (2019) utilizou-se os frutos da *Morus nigra* os quais não apresentaram atividade genotóxica, por outro lado, apresentaram-se como genoprotetores, reduzindo a frequência de micronúcleo induzido pela mitomicina C (MMC).

Portanto, nas condições experimentais utilizadas nesse estudo, o EAMn não provocou alteração no material genético do organismo a ele exposto, bem como não foi capaz de induzir alterações transmissíveis permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético.

8 CONCLUSÃO

Os extratos das folhas de *Morus nigra L.* (EAMn, EHMn e EEMn) induziram efeito vasodilatador em aorta de ratos de maneira depende de endotélio, efeito possivelmente promovido pelos compostos fenólicos presentes nos extratos. Além disso, o extrato aquoso não induziu sinais de toxicidade nem de genotoxicidade nas condições experimentais utilizadas.

REFERÊNCIAS

ACKER, S. A. B. E., VAN DEN BERG, D., TROMP, M. N. J. L., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W. P., VAN DER VIJGH, W. J. F., & BAST, A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20 n.3, p. 331–342, 1996.

AGAREZ, F.; PEREIRA, C.; RIZZINI, C. M. Botânica: taxonomia, morfologia e reprodução das angiospermas: chaves para determinação das famílias. **Âmbito Cultural**, Rio de Janeiro, v. 2, 1994.

AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology**, v. 4, p. 1394-1398, 2011.

AHMAD, R.; JAVED, S.; BHANDARI, Uma. Antiapoptotic potential of herbal drugs in cardiovascular disorders: an overview. **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 4, p. 358-374, 2010.

ALMEIDA, J.R.G.S.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, A.P.; ARAÚJO, E.C.C.; SILVA, F.S.; NEVES, L.F.; OLIVEIRA, R.A.; SÁ, P.G.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.96-100, 2011.

ALONSO-CASTRO, A. J.; DOMÍNGUEZ, F.; GARCÍA-CARRANCA, A. Rutin exerts antitumor effects on nude mice bearing SW480 tumor. **Archives of Medical Research**, v. 44, p. 346-351, 2013.

AL-REJAIE, S. S.; ALEISA, A.M.; SAYED-AHMED, M. M.; SHABANAH ,O.A. A.; ABUOHASHISH, H. M.; AHMED, M. M.; AL-HOSAINI, K. A.; HAFEZ, M. M. Protective effect of rutin on the antioxidant genes expression in hypercholesterolemic male Westar rat. **BMC complementary and alternative medicine**, Londres, v.13, n.1, p.1, 2013.

ANDRIAMBELOSON, E., Kleschyov, A. L., Muller, B., Beretz, A., Stoclet, J. C., & Andriantsitohaina, R. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n.6, p. 1053–1058, 1997.

ARAÚJO, E.J.G. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal *Casearia sylvestris* Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v.35, p.355, 2014.

ARNOLD, W.P.; MITTAL, C.K.; KATSUKI, S.; MURAD, F. Nitric Oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3-5cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 74, n.8, p. 3203-3207, 1997.

ARNOUS, A.H.; SANTOS, A. S. e BEINNER, R. P. C. Plantas Medicinais de Uso caseiro- Conhecimento Popular e Interesse por Cultivo Comunitário. **Ver. Espaço para a Saúde**, Londrina, vol. 6, n.2 p. 1-6, 2005.

AVIRAM, M., & FUHRMAN, B. Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. **Atherosclerosis**, v. 137, p. 45–50, 1998

AZIZ, N.H., S.E. Farag, L.A. Mousa & M.A. Abo-Zaid. **Microbios**, v. 93, p. 43-54, 1998.

AZQUETA, A. et al. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. **Mutagenesis**, Swansea, v. 24, n. 4, p. 379-381, 2009.

BARREIROS ALBS, David JM, David JP. Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BASSEGNE, F. & HUCKSTOFF, C.H. Endothelium-mediated control of coronary circulation. **Acta Cardiologica**, Bruxelles, v.46, p.419-424, 1991.

BASSOLS, M do C.; MOORE, J.N. 'Ébano' primeira cultivar de amoreira- preta sem espinhos lançada no Brasil. EMBRAPA UEPAE de Cascata, Pelotas, p. 16, 1981.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K. F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and Helicobacter pylori growth. **Arzneimittelforschung**. v. 45, n. 6, p. 697- 700, 1995.

BERG, C. C. Moreae, Artocarpeae, and Dorstenia (Moraceae): with introductions to the family and ficus and with additions and corrections to Flora Neotropica Monograph. **Flora Neotropica Monograph**, 2001.

BERG, C.C., CORNER, E.J.H., JARRETT, F.M., Moraceae genera other than Ficus, **Flora Malesiana**, v. 1, p. 1–152, 2006.

Bianchi MLP, Antunes LMG. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev Nutr** v. 12, n. 12, p. 123-130, 1999.

BLAAUBOER, B. J. Biokinetic and toxicodynamic modelling and its role in toxicological research and risk assessment. **Alternatives to laboratory animals**. v.31 n. 3, p. 277-281, 2003.

BONASSI, S., et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of câncer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n.3, p. 625-631, 2006.

BONOTTO GM, et al. Conhecimento dos fatores de risco modificáveis para doença cardiovascular entre mulheres e seus fatores associados: um estudo de base populacional. **Ciênc. saúde coletiva**.V.21, n.1, p.293-302, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. **Sobre a vigilância de DCNT**. 2019. Acesso em 11 out. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Específica nº 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos**. Diário Oficial da União, 18 de março 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS-Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009.1p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução – RDC nº 10**, de 09 de março, Brasília, 2010.

BRAVO, L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n.11, p. 317–333, 1998.

CAI, H., & HARRISON, D. G. Endothelial Dysfunction in Cardiovascular Diseases: The Role of Oxidant Stress. **Circulation Research**, v. 87, n.10, p.840–844, 2000.

CARVALHO MHC, Nigro D, Lemos VS, Tostes RCA, Fortes ZB. Hipertensão arterial: o endotélio e suas múltiplas funções. **Rev Bras Hipertens**. v.8, n.1, p.76-88, 2001.

CASTANEDA,R. et al. Centered reduced moments and associate density functions applied to alkaline comet assay. **Journal of Biomedical Optics**, Bellingham, WA, v. 10, n.3, p.1-8, 2005.

CELIK, G., SEMIZ, A., KARAKURT, S., ARSLAN, S., ADALI, O., & SEN, A. A comparative study for the evaluation of two doses of ellagic acid on hepatic drug metabolizing and antioxidant enzymes on the rat. **BioMed Research Internation**, v. 2013, p. 1-9, 2013.

CEMELI, et al. Antioxidants and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.681, n.1, p.51-67,2009.

CEPPI, M., et al. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. **Mutation Research**, Amsterdam, v.705, n.1, p. 11-19, 2010.

CHAIKUL, P. et al. Characteristics and in vitro anti-skin aging activity of gallic acid loaded in cationic CTAB niosome. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 131, p. 39–49, 2019.

CHAN, S. C. et al. Three new flavonoids and antiallergic, anti-inflammatory constituents from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Planta Med.**, v. 64, n. 2, p. 153-158, 1998.

COECKE, S., BLAAUBOER, B. J.; ELAUT, G.; FREEMAN, S.; FREIDIG, A.; GENSMANTEL, N.; HOET, P.; KAPOULAS, V. M.; LADSTETTER, B.; LANGLEY, G.; LEAHY, D.; MANNENS, G.; MENEGUZ, A.; MONSHOUWER, M.; NEMERY, B.; PELKONEN, O.; PFALLER, W.; PRIETO, P.; PROCTOR, N.; ROGIERS, V.; ROSTAMI-HODJEGAN, A.; SABBIONI, E.; STEILING, W.; VAN DE SANDT, J. J. Toxicokinetics and metabolism. **Alternatives to laboratory animals** v. 33, p. 147-175, 2005.

COLLINS, A. R.; et al. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research**, v. 375, p. 183 -193, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations, **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

CONTER, L. U. et al. Screening de plantas nativas do rio grande do sul quanto ao seu potencial citotóxico na linhagem celular de carcinoma epidermoide de boca kb. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**, v. 1, n. 13, 2015.

CÔRREA, C. C. et al. Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. In: 46th Congress, July 20-23, 2008, Rio Branco, Acre, Brasil. **Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER)**, 2008.

CRITCHFIELD, J. W.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. **AIDS Res. Hum. Retroviruses**, v. 12, n. 1, p. 39-46, 1996.

CRUZ GL 1979. **Dicionário de plantas úteis no Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 599 p.

DE QUEIROZ, GT, Santos, TR, Macedo, R., Peters, VM, Leite, MN, da Silveira e Sá, R. de C., & Guerra, M. de O. Eficácia de *Morus nigra* L. na reprodução em ratos Wistar fêmeas. **Food and Chemical Toxicology**, v.50 n.3-4, p. 816-822, 2012.

DECKER, E.A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, New York, v.55, n.11, p.396-407, 1997.

DUARTE, J., Vizcaíno, F. P., Utrilla, P., Jiménez, J., Tamargo, J., & Zarzuelo, A. Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 24, n.4, p.857–862, 1993.

EIJI, Y. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides with triethylenemelamine. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 278, n. 2, p. 127-130, 1992.

EKMEKCIOGLU, C., FEYERTAG, J., MARKTL, W. Cinnamic acid inhibits proliferations and modulates brush border membrane enzyme activities in Caco-2 cells. **Cancer Letters**, v. 128, n.2, p. 137-144, 1998.

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 81-95,2000.

FENECH, M., & Morley, A. A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v. 147, n.1-2, p. 29–36, 1985.

FERNANDES, F.H.A & SALGADO, H.R.N. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 257-265, 2016.

FERRANDIZ, M. L: ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, v. 32, n. 3-4, p. 283-288, 1991.

FERRANNINI E, Natali A, Capaldo B, Lehtovirta M, Jacob S, Yki-Järvinen H. Insulin resistance, hyperinsulinemia, and blood pressure: role of age and obesity. **Hypertension**, v. 30, n. 5, p. 1144-9, 1997.

FIGUEREDO, K. C., Guex, C. G., Reginato, F. Z., Haas da Silva, A. R., Cassanego, G. B., Lhamas, C. L., ... de Freitas Bauermann, L. Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 224, p. 290–296, 2018.

FIGUEREDO, Kássia Caroline. **Avaliação do Perfil Fitoquímico, Toxicidade e Comportamento do Extrato das folhas de *Morus nigra* Linnaeus frente à sobrecarga de Ferro.** 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Santa Maria -UFSM,RS, 2017.

FINKEL, T., & HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, p. 239–247, 2000.

FLAMBÓ, D. F. A. L. P. **Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana.** 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2013.

FOGLIO, M. A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. **Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 1-8, 2006.

FONT QUER, P. **Plantas medicinales: el dioscorides renovado** . Barcelona: Labor, 1993. 3v. ISBN 84-335-0084-8 (ENC).

FORCHHAMMER, et al. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. **Mutagenesis**, Swansea, v.25, n.2, p.113-123,2010.

FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. **Food and Chemical Toxicology**. v. 33, n. 12. p. 1061-1080, 1995

FUMAGALI, E., Gonçalves, R. A. C., Machado, M. de F. P. S., Vidoti, G. J., & Oliveira, A. J. B. de. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, 2008.

Galano, A. et al. Food antioxidants: Chemical insights at the molecular level. **Annu Rev Food Sci Technol**, v. 7, n. 15, p.15-18, 2016.

GEISSMAN, T.A., CROUT, D. H. G. **Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism**. São Francisco: Freeman, Cooper and Company, 1968, 592 p.

GIULIETTI, A. M. et al. **Plantas raras do Brasil**. Conservação Internacional, Belo Horizonte, 2009.

GOMES, E.C.; ELPO, E. R. S.; GABRIEL, M. M.; LOPES, M. Plantas Mediciniais com Características Tóxicas Usadas pela População do Município de Morretes, PR. **Ver. Visão Acadêmica**. v.2., n. 2., p. 77-80, 2001.

GOW-CHIN, Y.; PIN-DER, D.; HUI-LING, T. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 307–313, 2002.

GROOT, H., & RAUEN, U. Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 12, n.3, p.249–255, 1998.

GRUNDHOFER, P.; NIEMETZ, R.; SCHILLING, G.; GROSS, G. G. Biosynthesis and subcellular distribution of hydrolysable tannins. **Phytochemistry**, v. 57; p.915-927, 2001.

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. **Scientia Horticulturae**, v.132, p. 37–41, 2011.

HAENEN, G. R. M. M., PAQUAY, J. B. G., KORTHOUWER, R. E. M., & BAST, A. Peroxynitrite Scavenging by Flavonoids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 236, n. 3, p. 591–593, 1997.

HALLIWELL, B. O paradoxo antioxidante. **The Lancet**, v. 355, n.9210, p; 1179-1180, 2000.

HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLINGER, J., ARUOMA, O.I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v.33, n.7, p.601-617, 1995.

HARTMAN, P.E., SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.15, n.3, p.145-182, 1990.

HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v. 32, n.7, p. 1141–1148, 1983.

HAYASHI, M.; et al. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 35, p. 234 - 252, 2000.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: Chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, n. 10, p. 572-584, 2002.

HIRONO, I., & GRASSO, P. Natural Carcinogenic Products of Plant Origin. **CRC Critical Reviews in Toxicology**, v. 8, n. 3, p.235–277, 1981.

IARMARCOVAI, G., et al. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. **Mutations Research**. Amsterdam, v. 658, n.3, p. 215-233, 2008.

JIANG, L.; CAO, J.; AN, Y.; GENG, C.; QU, S.; JIANG, L.; ZHONG, L. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (epG2) cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.21, n.8, p. 1486-1492, 2007.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A., STEVENS, P.F., DONOGHUE, M.J. **Sistemática Vegetal: Um Enfoque Filogenético**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 392p.

Kim, H.G., Ju, M.S., Shim, J.S., Kim, M.C., Lee, S.H., Huh, Y., Kim, S.Y. Mulberry fruit protects dopaminergic neurons in toxin-induced Parkinson's disease models. **Br. J. Nutr.** v.104, p. 8–16, 2010.

KUMARAVEL, T. S., & JHA, A. N. Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 605, n.1-2, p. 7–16, 2006.

KURNIATI, N. F., Suryani, G. P., & Sigit, J. I. Vasodilator Effect of Ethanolic Extract of Mulberry Leaves (*Morus alba* L.) in Rat and Rabbit. **Procedia Chemistry**, v.13, p. 142–146, 2014

LANDETTE, J. M. Ellagitannins, ellagic acid and their derived metabolites: a review about source, metabolism, functions and health. **Food Research International**, v. 44, p. 1150-1169, 2011.

LI, Y., Zhang, X., Liang, C., Hu, J., & Yu, Z. Safety evaluation of mulberry leaf extract: Acute, subacute toxicity and genotoxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 95, p. 220–226, 2018.

LINDBERG, H. K., et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. **Mutations Research**. Amsterdam, v. 617, n.1-2, p. 33-45, 2007.

LIU, Y., Qi, Y., Chen, X., He, H., Liu, Z., Zhang, Z., ... Ren, X. Phenolic compounds and antioxidant activity in red- and in green-fleshed kiwifruits. **Food Research International**, v. 116, p. 291-301, 2018.

MAC GREGOR, J. T.; et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v. 189, p. 103-112, 1987

MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALIK MNH, Alamgeer US, Qayyum A, Samreen S. Phytochemical analysis and cardiac depressant activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* L. fruit. **J. Appl. Pharm. Sci.** v.2, n.12, p. 39-41, 2012.

MALLHI, TH, MI Qadir, YH Khan e M. Ali. "Atividade hepatoprotetora do extrato metanólico aquoso do *Morus Nigra* contra a hepatotoxicidade induzida por paracetamol em camundongos". **Jornal de Farmacologia de Bangladesh**, v. 9, n. 1, p. 60-66, 2014.

MALTA DC, Morais Neto OL, Silva Junior JB. Apresentação do plano de ações estratégicas para o enfrentamento das doenças crônicas não transmissíveis no Brasil, 2011 a 2022. **Epidemiol. Serv. Saúde**. v.20, n.4, p.425-438, 2011.

MARMITT, D. J. et al. Revisión sistemática de las plantas de interés para el Sistema de Salud con potencial terapéutico cardiovascular. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 108-124, 2016.

MARTINS-RAMOS, D.; BORTOLUZZI, R. L. C.; MANTOVANI, A. Medicinal plants in a remnant of High Montane Araucaria Moist Forest, Urupema Municipality, Santa Catarina State, Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 3, p. 380-397, 2010.

MAZIMBA, O., et al. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 751–754, 2011.

MEDEIROS FILHO RA, et al. Prevalência de comportamentos e fatores de risco para doenças cardiovasculares na população de hipertensos no norte de Minas Gerais, Brasil. **Rev Fund Care Online**. V.10, p. 90-96, 2018.

MELÉNDEZ, P. A.; CAPRILES, V. A. Antibacterial properties of tropical plants from Puerto Rico. **Phytomedicine**, v. 13, n. 4, p. 272-276, 2006.

MELLO, F. B. **Estudo dos efeitos de Lantana camara (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos**. 2001. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

MELLOU, F. et al. Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. **J. Biotechnol.**, v. 116, n. 3, p. 295-304, 2005.

MIRANDA, M. A.; VIEIRA, G. D.-V.; ALVES, M. S.; YAMAMOTO, C. H.; PINHO, J. DE J. R. G. DE; SOUSA, O. V. DE. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. **HU Revista**, v. 36, n. 1, 28 jul. 2010.

MOLHO-SABATIER P. Endothelium et thrombose. **Rev Méd Interne**, v. 8, p. 389-94, 1987.

MONCADA S. & HIGGS EA: Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB Journal**. v.9, p. 1319–1330, 1995.

MONTEIRO, J. M. et al. The effects of seasonal climate changes in the Caatinga on tannin levels in *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All. and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 338-344. 2006.

MORAES, L. G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C.. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 77-99, 2011.

MORGAN R 1982. **Enciclopédia das ervas e Plantas Mediciniais**. São Paulo: Hemus editora. 555 p.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas & Plantas Mediciniais. Doenças, Aplicações, Descrição e Propriedades**. 9 ed. Hemus, 2003.

MUGHAL, A. et al. Micronulceus and comet assay in the peripheral blood of juvenil rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DAN damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.700, n.1-2, p. 86-94, 2010.

MUKINDA, J.T.; EAGLES, P.F.K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 236-240, 2010.

Naderi, A.G., Asgary, S., Sarraf-Zadegan, N., Oroojy, H., Afshin-Nia, F., 2004. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. **Phytother. Res.** v. 18, p. 365–369.

NAM, N. H., YOU, Y. J., KIM, Y. D., HONG, H., KIM, H. M., ANN, Y. Z. Synthesis of certain 3-aryl-2-propenoates and evaluation of their cytotoxicity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 11, n. 9, p. 1173-1176, 2001.

NGUYEN, T. A.; LIU, B.; ZHAO, J.; THOMAS D. S.; HOOK, J. M. An investigation into the supramolecular structure, solubility, stability and antioxidant activity of rutin/cyclodextrin inclusion complex. **Food chemistry**, v. 136, n. 1, p 186-192, 2013.

NOMURA, T. Phenolic compounds of the mulberry tree and related plants. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**,[S.l.], v. 53, p. 87-201, 1988.

NOMURA, T.; HANO, Y. Isoprenoid-substituted phenolic compounds of moraceous plants. **Natural Products Reports**, v.11, p.205-218, 1994.

OECD. **Test No. 474:Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test,OECD Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, 2016.Disponível em: <https://www.oecd.org/env/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test-9789264264762-en.html>

OECD. **Guidelines for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method**. Test No.423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17th December 2001. OEDC, Paris.

OGA, Seizi; CAMARGO, Marcia Maria de Almeida; BATISTUZZO, José Antonio de Oliveira (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. 3.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 676 p. ISBN 9788574540986 (broch.)

OKAMURA, N. et al. Flavonoids in *Rosmarinus officinalis* leaves. **Phytochemistry**, v. 37, n. 5, p. 1463-1466, 1994.

OKUDA, M., Kobayashi, Y., Suzuki, K., Sonoda, K., Kondoh, T., Wagawa, A., ... Yoshimura, H. Self-Organized Inorganic Nanoparticle Arrays on Protein Lattices. **Nano Letters**, v. 5, n. 5, p. 991–993, 2005.

OLIVEIRA FILHO, EDUARDO CYRINO; SISINNO, CRISTINA LUCIA SILVEIRA. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. S.i: Intercincia, 2013. 216 p.

OLIVEIRA, A. M. de, Nascimento, M. F. do, Ferreira, M. R. A., Moura, D. F. de, Souza, T. G. dos S., Silva, G. C. da, ... Napoleão, T. H. Evaluation of acute toxicity, genotoxicity and inhibitory effect on acute inflammation of an ethanol extract of *Morus alba* L. (Moraceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.194, p.162–168, 2016.

OLIVEIRA, A. M., Mesquita, M. da S., da Silva, G. C., de Oliveira Lima, E., de Medeiros, P. L., Paiva, P. M. G., ... Napoleão, T. H. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L.

(Moraceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p.1–7, 2015.

OLIVEIRA, A.C.B. et al . Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu , v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013 .

OLIVEIRA, G. L. S. Capacidade antioxidante celular da rutina frente ao dano oxidativo induzido em linhagens mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, Araraquara v. 36, n. 3, 2015.

OLIVEIRA, Tania Toledo de. et al. Efeito de diferentes doses de flavonoides em ratos hiperlipidêmicos, **Rev. Nutr.**, v. 15, n. 1, pp. 45–51, 2002.

ÖZGEN, M., Serçe, S. e Kaya, C. Propriedades fitoquímicas e antioxidantes de frutos de *Morus nigra* e *Morus rubra* ricos em antocianinas. **Scientia Horticulturae**, v.119, n. 3, p. 275–279, 2009.

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

PADILHA, Maria de Mesquita. **Estudo farmacognóstica, fitoquímico e farmacológica das folhas de *Morus nigra* L. (amoreira-preta)**. 2009.63 f: Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Campus Alfenas, Alfenas, 2009.

PEREIRA, C.B.,MARIN, A., DALMORA, S.L., NECCHI, R.M.M., MORESCO, R.N., MANFRON, M.P. Atividade anti-inflamatória e avaliação da toxicidade do extrato hidroetanólico de *Morus alba* (Moraceae). **Rev. Ciências Farm. Básica Apl.** v.34, p. 43-46, 2013.

PIEKARSKI, P. **Análise nutricional e fitoquímica de frutos da *Morus nigra* L.** Dissertação. Mestrado em Segurança Alimentar e Nutricional, do Curso de Pós-graduação em Segurança Alimentar e Nutricional, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2013.

PIETTA, P.-G.. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n.7, p. 1035–1042, 2000.

PIMENTEL, R. B. D. Q. et al. Antimicrobial activity and rutin identification of honey produced by the stingless bee *Melipona compressipes manausensis* and commercial honey. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 151, 2013.

PITTOZZI, V. et al. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. **Free Radical Research**, London, v. 40, n. 11, p. 1149-1154,2006.

PORTO, Kalyne Faria. **Constituintes Químicos da Família Moraceae**. 2011. 94 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Química)- Centro de Ciências e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2011.

POTHINUCH, P., Miyamoto, A., Nguyen, H. T. T., & Tongchitpakdee, S. Vasodilatory effects of mulberry (*Morus* spp.) leaf extract on porcine cerebral arteries in vitro: Possible underlying mechanisms. **Journal of Functional Foods**, v.38, p.151–159, 2017.

PRASAD AS, Beck FWJ, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, et al. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. **Am J Clin Nutr**. v. 85, n.3, p. 837-44, 2007.

PRIETO, P.; BAIRD, A. W.; BLAAUBOER. B. J.; CASTELL RIPOLL, J. V.; CORVI, R.; DEKANT, W.; DIETL, P.; GENNARI, A.; GRIBALDO, L.; GRIFFIN, J. L.; HARTUNG, T., HEINDEL, J. J.; HOET, P.; JENNINGS, P.; MAROCCHIO, L.; NORABERG, J.; PAZOS, P.; WESTMORELAND, C.; WOLF, A.; WRIGHT, J.; PFALLER, W. The assessment of repeated dose toxicity in vitro: a proposed approach. The report and recommendations of ECVAM workshop 56. **Alternatives to laboratory animals**. v. 34, n. 3, p.315-41, 2006.

PRIOR, R. L., & CAO, G. Antioxidant Capacity and Polyphenolic Components of Teas: Implications for Altering In Vivo Antioxidant Status¹. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 220, n. 4, p. 255–261, 1999.

PURCHASE, I. F.; BOTHAM, P. A.; BRUNER, L. H.; FLINT, O. P.; FRAZIER, J. M.; STOKES, W. S. Workshop overview: scientific and regulatory challenges for the reduction, refinement, and replacement of animals in toxicity testing. **Toxicological Sciences**. v.43, n.2, p.86-101, 1998.

QUIDEAU S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Poységu L. 2011.Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Int**. v. 50, p. 586- 621.

RIBEIRO, L. R; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas, RS: Ed. Ulbra, 2003.

RIBEIRO, L. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo**. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, Canoas, p. 173-178, 2003.

RIBEIRO, L.R.; SALVADOR, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas: 1ª ed., 2003.

RIBEIRO, S. O.; OLIVEIRA, T. T; ZATTI, R. A.; SILVA, S. R. S.; NAGEM, T. J. Avaliação antioxidante de flavonoides de Citrus sp. **ANAIS SIMPAC**, Viçosa, v. 2, n. 1, 2010.

ROSA, R.C.A et al. Triagem fitoquímica dos extratos aquosos de Bauhinia candicans, Foeniculum vulgare, Mentha pulegium e Morus nigra. **Conexão Ciência (Online)**, v. 11, n. 1, p. 44-51, 2016.

RUSSO, A., ACQUAVIVA, R., CAMPISI, A., SORRENTI, V., DI GIACOMO, C., VIRGATA, G., VANELLA, A. (2000). Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. **Cell Biology and Toxicology**, v. 16, n. 2, p. 91–98.

SANTOS, P. M.; ALMEIDA, P. D. O.; LIMA, E. S.; MORAES, M. O.; COSTA, P. M.; MEIRA, A. S.; PESSOA, C. Ó.; VALENTE, L. M. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Perfil de flavonoides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de Bauhinia purpurea (Fabaceae) da região amazônica. **Revista Química Nova**, São Paulo, v.37, n.1, p. 89-94, 2014.

SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: Comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S.NTP carcinogenicity database. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v.30, n.6, p. 629-799, 2000.

SCHNEIDER CD, Oliveira AR. Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. **RBME**. v.10, n.10, p. 308-313, 2004.

SELVARAJ, K.; CHOWDHURY, R.; BHATTACHARJEE, C. Isolation and structural elucidation of flavonoids from aquatic fern Azolla microphylla and evaluation of free radical scavenging activity. **Int. J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 5, n. 3, p. 743-749, 2013.

SERRANO, J. PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; DAUER, A.; AURA, A.M.; SAURACALIXTO, F. Tannins: Current knowledge of food sources, intake bioavailability and biological effects. **Mol. Nutr. Food Res**. v. 53, p. 310-329, 2009.

SHARMA, P. Cinnamic acid derivatives: A new chapter of various pharmacological activities. **Journal of Chemical and Pharmacological Research**, v.3, n.2, p. 403-423, 2011.

SHASHANK, K.; ABHAY, K. Review article chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Sci. World J**, v. 4, n. 2, p. 32-48, 2013.

SHUANG-CHENG, M. A. Antiviral amentoflavone from Selaginella sinensis. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 3. p. 311-312, 2001.

SIES, H. (1991). Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n.3, p. S31–S38.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.215, n.2, p.213- 219, 1993.

SILANO, M., De Vincenzi, M., De Vincenzi, A., & Silano, V. The new European legislation on traditional herbal medicines: main features and perspectives. **Fitoterapia**, v. 75, n.2, p. 107–116, 2004.

SILVA J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES J. A. P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora alcance, p. 422, 2003.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007.

SINGH, B. et al. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum L.*) peel: a review. **Food Chemistry**, v. 261, p. 75-86, 2018.

SOUZA, Grasielly Rocha. **Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de flavonoides em extratos das folhas de Morus nigra L.** 2015. 66f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Centro, Petrolina, 2015.

SOUZA, M.M.; BITTAR, M.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R.A.; MESSANA, I.; DELLE-MONACHE, F.; FERRARI, F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 55c, p. 256-260, 2000.

SRIVASTAVA, S. et al. Mulberry (*Morus alba*) leaves as human food: a new dimension of sericulture. **Internacional Journal of Food Science and Nutrition**, v. 54, p.411- 416, 2003.

SZASZ, T.; THAKALI, K.; FINK, G.D.; WATTS, S.W. A comparison of arteries and veins in oxidative stress: Producers, destroyers, function and disease. **Exp. Biol.Med.**, v. 232, p. 27-37, 2007.

TADDEI, S., et al., Antihypertensive drugs and reversing of endothelial dysfunction in hypertension. **Curr Hypertens Rep**, v. 2, n.1, p. 64-70, 2000.

TAIZ, L.; ZEIGERT, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719p.

TAKASUGI M, Munoz L, Masamune T, Shirata A, Takahashi K .Studies on phytoalexins of Moraceae 3. Stilbene phytoalexins from diseased mulberry. **Chem. Lett.**, v. 7, p. 1241-1242, 1978

TAWATA, S., TAIRA, S., KOBAMOTO, S., ZHU, N., ISHIHARA, J., TOYAMA, S. Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n.5, p. 909-910, 1996.

TERRADAS, M., Martín, M., Tusell, L., & Genescà, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60–67, 2010.

THIERENS, H. & Vral, A. The micronucleus assay in radiation accidents. **Annali dell' Istituto Superiore di Sanità**, Roma, v. 45, n.3 p. 260-264, 2009.

TOUYZ, R.M., Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? **Hypertension**, v.44, n.3, p. 248-52, 2004.

TRAPP, S. C.; CROTEAU, R. B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v. 158, n. 2, p. 811-832, 2001.

TSUBOY et al. Genotoxic. Mutagenic and cytotoxic effects of the comercial dyeCl Disperse Blue 291 in the huma hepatic cell line HepG2. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 21, n.8, p. 1650-1655,2007.

USDA- United States Departament of Agriculture. **Natural Resources Coservations Service. Classification taxonomyc of Morus nigra L.** Disponível em: <<http://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=MONI>>. Acesso em março de 2018.

VALENTIN-SEVERIN, I., et al. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 536, n. 1-2, p. 79-90,2003.

VALVERDE, M., & ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 93–109, 2009.

VANE, J. R., et al. Regulatory Functions of the Vascular Endothelium. **New England Journal of Medicine**, v. 323, n. 1, p. 27–36, 1990.

VATTEM, D. A.; Shetty, K. Biological functionality of ellagic acid: a review. **Journal of Food Biochemistry**, v.29, p. 234-266, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F., PINTO, A. C. e MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura?. **Quím. Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VISIOLI, F. et al. Antioxidants and cardiovascular disease; panaceas or tonics for tired sheep? **Cardiovascular Research**,v.47, n. 3,p. 409, 2000.

VISKUPICOVA, J. et al. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oilbased foods. **Food Chemistry**, v. 123, p. 45- 50, 2010.

VRINTS, G., GERMAN, A.G. Role of endothelium in the regulation of coronary artery tone. *Acta Cardiologica*, Bruxelles, v. 46, p.399-418, 1991.

WANG, L., Yang, Y., Liu, C. e Chen, R.-Y. Três novos compostos do Morus nigraL. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 12, n. 6, p. 431–437, 2010.

WASSON, G.R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C.S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and câncer. **Mutagenesis**. Swansea, v.23, n.3, p.153-162, 2008.

WESELER, A. R.; BAST, A. Oxidative stress and vascular function: implications for pharmacologic treatments. **Current hypertension reports**, v. 12, n. 3, p. 154- 161, 2010.

WHO. Consejo Ejecutivo, 87. Medicina tradicional y asistencia sanitaria moderna: informe del Director General sobre los progresos realizados. **Organización Mundial de la Salud.**, 1990.

XIA, M., Qian, L., Zhou, X., Gao, Q., Bruce, I. C., & Xia, Q. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* (L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 3, p.442–446, 2008.

YADAV AV, Kawale LA, Nade VS. Efeito das folhas de *Morus alba* L. (amoreira) na ansiedade em camundongos. **Indian J Pharmacol** . v.40, n.1, p.32-36, 2008.

YILMAZ, B.; Usta, C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aorta rings and the underlying mechanism. **Phytother Res**, v. 27, p. 285-289, 2013.

YILMAZ, SERKAN; UCAR, ASLI; GOKTAŞ, BAYRAM. Potencial genotóxico e genoprotetor de frutos de amoreira preta (*Morus nigra*). **Anais Acad. Bras. Ciênc.** , Rio de Janeiro, v. 91, n. 4, e20190337, 2019.

YOO, H. et al. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. **Inflammation Research**, v. 63, p. 197-206, 2014.

Zanesco A, Antunes E. Células endoteliais. In: Carvalho H, Collares-Buzato C, editores. **Células**. p. 184-91, 2005.

ZINKEVICH, N.a S.; GUTTERMAN, D. D. ROS-induced ROS release in vascular biology: redox-redox signaling. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 301, n. 3, p. H647-H653, 2011.

ANEXO A - PARECER DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA DE USO ANIMAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO-UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
 Centro de Biociências
 Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
 50670-420 / Recife - PE - Brasil
 Fones: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 05 de outubro de 2018

Ofício nº 90/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof.ª Alice Valença Araújo**
 Centro Acadêmico de Vitória (CAV)
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº **0037/2018**

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo dos efeitos cardiovascular e citotóxico dos extratos das folhas de Morus nigra L.?**” registrada com o nº **0037/2018**, sob a responsabilidade de Prof.ª **Alice Valença Araújo** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 02/10/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2018 a 29/07/2020
Espécie/linhagem/raça	Rato/heterogênico/Camundongos/heterogenico
Nº de animais	76
Peso/Idade	Rato 200-300g/60-90 dias / Camundongos 35-45g/ 60-90 dias
Sexo	Macho (40) e Femea (36)
Origem	Bioterio do Centro Academico de Vitoria e Bioterio do Departamento de Fisiologia e Farmacologia (UFPE)

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345691

ANEXO B - EXSICATA DEPOSITADA NO HERBÁRIO GERALDO MURIZ-UFPE

