

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Bruna de Almeida Martins

**METABÓLITOS BIOATIVOS A PARTIR DE RAÍZES DE AMOREIRA**  
***(Morus alba)***

Belo Horizonte

2018

UFMG/ ICEx/DQ. 1284<sup>a</sup>

D.703<sup>a</sup>

Bruna de Almeida Martins

**METABÓLITOS BIOATIVOS A PARTIR DE RAÍZES DE AMOREIRA**  
**(*Morus alba*)**

Dissertação apresentada ao  
Departamento de Química do Instituto de  
Ciências Exatas da Universidade  
Federal de Minas Gerais como requisito  
parcial para a obtenção do grau de  
Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2018

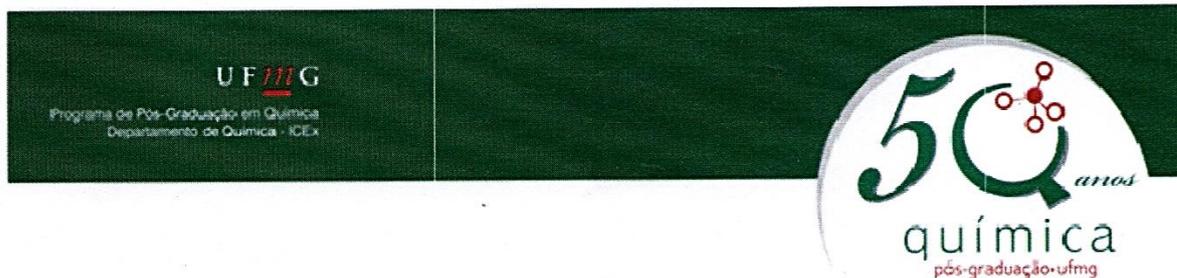
Martins, Bruna de Almeida  
M298        Metabólitos bioativos a partir de raízes de  
2018        amoreira(morus alba) [manuscrito] / Bruna de Almeida  
D            Martins. 2018.  
             XVI, 75 f. : il.

Orientadora: Jacqueline Aparecida Takahashi.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de  
Minas Gerais. Departamento de Química.  
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais -  
Teses 3. Flavonoides - Teses 4. Antioxidantes - Teses  
5. Inibidores de colinesterase - Teses. I.Takahashi,  
Jacqueline Aparecida - Orientadora II. Título.

CDU 043

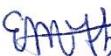


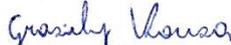
## "Metabólitos Bioativos a partir de Raízes de Amoreira (*Morus alba*)"

**Bruna de Almeida Martins**

Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

  
Prof. Jacqueline Aparecida Takahashi - Orientadora  
UFMG

  
Prof. Esther Maria Ferreira Lucas  
CEFET-MG

  
Prof. Grasiely Faria de Sousa  
UFMG

Belo Horizonte, 17 de julho de 2018.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À Cláudia, Gilson, Graça, Nozico e Piter, por  
serem minha definição de amor, apoio e  
motivação.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dra. Jacqueline Aparecida Takahashi, Jac, pela confiança, ensinamentos e por sempre transmitir tranquilidade e otimismo.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios e demais amigos do Departamento de Química, pela companhia, momentos de descontração, trocas de conhecimento e auxílio nos experimentos. Em especial aos meus químicos de referência Geane, Wagner, Gesiane e Gabriel.

À Nathany, Diego, Tainara, Denise e Maykelis, pela colaboração no estudo de *Morus alba*.

Às químicas Mirra Angelina e Dra. Ivana Silva Lula, pelo auxílio na realização dos experimentos de cromatografia líquida e ressonância magnética nuclear, respectivamente.

Aos Me. Hebert Vinicius e Lucas Pinto e ao Prof. Dr. Rodinei Augusti, pela realização dos espectros de massas.

Às alunas Dayana Gonzalez e Katherine García e ao Prof. Oscar Mosquera, pelo aprendizado que possibilitou a realização do ensaio de capacidade neuroprotetora. Ao Prof. Dr. João Trindade Marques, pela doação de *Drosophila melanogaster*.

À Universidade Federal de Minas Gerais, ao Programa de Pós-graduação em Química e a todos os professores que contribuíram para a minha formação.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa; à Capes e FAPEMIG, pelo financiamento da pesquisa.

## RESUMO

### Metabólitos Bioativos a partir de Raízes de Amoreira (*Morus alba*)

*Morus alba*, conhecida popularmente como amoreira branca, é uma espécie vegetal originária da Ásia, mas atualmente distribuída mundialmente. É conhecida por suas propriedades farmacológicas, sendo utilizada em alguns países no tratamento de diversas enfermidades. Porém, esta utilização se baseia majoritariamente em preparos com suas folhas e frutos, sendo o potencial de suas raízes pouco aproveitado. O presente trabalho teve como objetivo o estudo de extratos etanólicos de variedades de raízes de *M. alba* vindas de Cuba, visando o isolamento dos principais constituintes fitoquímicos presentes nestas matrizes. A partir do extrato etanólico da variedade **IZ 40** foram isolados quatro compostos, por meio de utilização de técnicas cromatográficas clássicas (cromatografia em coluna) e instrumentais (HPLC preparativo). Estes foram denominados **BM 1**, **BM 2**, **BM 3** e **BM 4**. A caracterização da estrutura química dos compostos isolados foi realizada a partir de análises dos espectros de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais, e espectro de massas. Os compostos **BM 1** e **BM 2** foram identificados como o flavonoide morusina e o derivado geranilado de 2-arilbenzofurano, mulberrofurano B, respectivamente. O perfil cromatográfico dos compostos isolados e dos extratos etanólicos das variedades **IZ 13/6**, **IZ 40**, **IZ 56/4**, **IZ 64**, **Indonésia** e **Tigreada** foram obtidos e, a partir dos mesmos, foi realizada a quantificação dos teores dos compostos presentes nos extratos. Observou-se que, com exceção de **BM 2**, os compostos isolados consistem nos constituintes majoritários dos extratos analisados. Considerando o extrato do qual se originou o isolamento dos compostos, os teores determinados foram: 3,6% de **BM 2**, 10,7% de **BM 3**, 11,9% de **BM 1** e 13,5% de **BM 4**. Com o intuito de verificar o papel biológico destes marcadores químicos foram realizados bioensaios para avaliação da atividade antioxidante e capacidade neuroprotetora dos mesmos. A atividade antioxidante foi avaliada seguindo as metodologias de atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio), poder redutor férrico (método do ferrocianeto) e capacidade de sequestro de radicais ABTS e DPPH. Para ambos os ensaios, **BM 2** apresentou os melhores resultados, com destaque para a captura de radicais livres ABTS, para o qual apresentou valor de concentração efetiva a 50% ( $37,6 \pm 1,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) relativamente próximo ao obtido para o padrão ácido ascórbico ( $17,6 \pm 0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Os resultados obtidos para os demais compostos variaram entre os diferentes protocolos analisados. O composto **BM 1**, apesar de ter apresentado moderada atividade antioxidante quando analisado independentemente, mostrou correlação estatística entre seus teores nos extratos e a atividade antioxidante apresentada pelos mesmos, na maioria dos extratos. Quanto aos ensaios de neuroproteção, foi avaliada a atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase para todos os extratos etanólicos e compostos isolados. Neste ensaio, o composto **BM 1** ( $53,5 \pm 0,1\%$ ) e o extrato da variedade **IZ 40** ( $54,2 \pm 0,1\%$ ) se destacaram como os inibidores mais fortes. Subsequentemente, estas duas amostras foram submetidas ao ensaio de geotaxis negativa com moscas *Drosophila melanogaster*, para verificação da ocorrência de proteção contra lesões neurológicas induzidas nos indivíduos da espécie pela toxina rotenona. Houve geração de uma maior resistência à toxicidade da rotenona nas moscas expostas primeiramente às amostras em análise, em relação àquelas expostas à rotenona primeiramente. Evidenciou-se assim um caráter de prevenção de doenças neurodegenerativas para estas amostras, tornando de interesse o aprofundamento de seus estudos.

**Palavras-chave:** *Morus alba*, metabólitos secundários, atividade antioxidante, acetilcolinesterase, *Drosophila melanogaster*.

## ABSTRACT

### Bioactive Metabolites from Mulberry (*Morus alba*) Roots

*Morus alba*, popularly known as white mulberry, is a plant species native to Asia, but currently distributed worldwide. It is known for its pharmacological properties, being used in some countries for the treatment of various diseases. However, this use is based mainly on fruit and leaf preparations, with the potential of its roots being little used. The present work had as objective the study of ethanolic extracts of varieties of *M. alba* roots coming from Cuba, aiming the isolation of the main phytochemical constituents present in these matrices. From the ethanolic extract of **IZ 40** variety, four compounds were isolated using classical chromatographic (column chromatography) and instrumental (preparative HPLC) techniques. These were named **BM 1**, **BM 2**, **BM 3** and **BM 4**. Characterization of the chemical structure of the isolated compounds was carried out from analyzes of uni and bidimensional nuclear magnetic resonance spectra, and mass spectrum. Compounds **BM 1** and **BM 2** were identified as the flavonoid morusin and the geranylated derivative of 2-arylbenzofuran, mulberrofuran B, respectively. The chromatographic profile of the isolated compounds and the ethanolic extracts of varieties **IZ 13/6**, **IZ 40**, **IZ 56/4**, **IZ 64**, **Indonesia** and **Tigreada** were obtained and, from these, quantification of compounds contents in the extracts was carried out. It was observed that, with the exception of **BM 2**, the isolated compounds are the major constituents of the analyzed extracts. Considering the extract from which the compounds were isolated, the determined levels were 3.6% **BM 2**, 10.7% **BM 3**, 11.9% **BM 1** and 13.5% **BM 4**. In order to verify the biological role of these chemical markers were performed bioassays to evaluate the antioxidant activity and neuroprotective capacity of them. The antioxidant activity was evaluated according to the methodologies of total antioxidant activity (phosphomolybdenum method), ferric reducing power (ferrocyanide method) and ABTS and DPPH radical sequestration capacity. For both assays, **BM 2** presented the best results, especially from ABTS free radical capture, for which it presented an efficient concentration value at 50% ( $37.6 \pm 1.7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) relatively close to the obtained for the standard ascorbic acid ( $17.6 \pm 0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). The results obtained for the other compounds varied among the different protocols analyzed. Compound **BM 1**, despite presenting moderate antioxidant activity when analyzed independently, showed statistical correlation between its content in the extracts and the antioxidant activity presented by them, in most of the extracts. Regarding the neuroprotection assays, the inhibitory activity of enzyme acetylcholinesterase was evaluated for all ethanolic extracts and isolated compounds. In this assay, compound **BM 1** ( $53.5 \pm 0.1\%$ ) and extract of **IZ 40** variety ( $54.2 \pm 0.1\%$ ) stood out as the strongest inhibitors. Subsequently, these two samples were submitted to the negative geotaxis test with *Drosophila melanogaster* flies, to verify the occurrence of protection against neurological lesions induced in individuals of the species by the toxin rotenone. There was a higher resistance to rotenone toxicity in the flies exposed first to the samples under analysis, in relation to those exposed to rotenone first. It was evidenced a neurodegenerative disease prevention character for these samples, making interesting the deepening of their studies.

**Key-words:** *Morus alba*, secondary metabolites, antioxidant activity, acetylcholinesterase, *Drosophila melanogaster*.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Alcaloides extraídos de <i>Papaver somniferum</i> , utilizados como agentes medicinais.....	3
FIGURA 2 – Metabólitos secundários isolados de cascas de raízes de <i>M. alba</i> . ....	6
FIGURA 3 – Flavonoides isoprenilados isolados de cascas de raízes de <i>M. alba</i> .....	7
FIGURA 4 – Inibidores de $\alpha$ -glicosidase isolados de <i>M. alba</i> . ....	7
FIGURA 5 – Agentes antioxidantes utilizados na indústria cosmética e alimentícia.....	9
FIGURA 6 – Mecanismos de atividade antioxidante por eliminação de radicais livres. .....	10
FIGURA 7 – Princípio do mecanismo dos ensaios de captura de radicais livres DPPH e ABTS.....	11
FIGURA 8 – Substâncias inibidoras de acetilcolinesterase, utilizadas no tratamento da Doença de Alzheimer. ....	13
FIGURA 9 – Esquema do isolamento de substâncias a partir do extrato etanólico de raízes da variedade IZ 40 de <i>M. alba</i> . ....	22
FIGURA 10 – Cromatografia em camada delgada das frações combinadas 2-40.....	30
FIGURA 11 – Cromatograma da fração 17.5, com detecção a 280 nm. ....	31
FIGURA 12 – Cromatograma da fração 21.5.3.3, com detecção a 280 nm. ....	32
FIGURA 13 – Cromatograma para o extrato da variedade IZ 40, com detecção em dois comprimentos de onda, 254 e 280 nm.....	33
FIGURA 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das raízes das seis variedades de <i>M. alba</i> (detecção a 280 nm). ....	33
FIGURA 15 – Cromatogramas do extrato IZ 40 e dos compostos BM 1, BM 2, BM 3 e BM 4 (detecção a 254 nm, exceto BM 2 a 280 nm). ....	33
FIGURA 16 – Teores dos compostos isolados (%) nos extratos etanólicos das variedades de raízes de <i>M. alba</i> . ....	35
FIGURA 17 – Atividade antioxidante dos compostos isolados. Barras com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).....	37
FIGURA 18 – Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos compostos isolados. ....	39
FIGURA 19 – Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de <i>M. alba</i> . ....	39
FIGURA 20 – Geotaxis negativa de moscas <i>D. melanogaster</i> expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico de raízes da variedade IZ 40 de <i>M. alba</i> . ....	40
FIGURA 21 – Geotaxis negativa de moscas <i>D. melanogaster</i> expostas primeiramente ao extrato IZ 40 ( $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e em seguida a rotetona ( $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), e vice-versa. .....	41

FIGURA 22 – Geotaxis negativa de moscas <i>D. melanogaster</i> expostas primeiramente ao composto BM 1 (10,0 mg.mL <sup>-1</sup> ) e em seguida a rotetona (100,0 mg.mL <sup>-1</sup> ), e vice-versa. ....	42
FIGURA 23 – Estrutura química de morusina. ....	43
FIGURA 24 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	44
FIGURA 25 – Subespectro DEPT 135 do composto BM 1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	45
FIGURA 26 – Mapa de contornos HSQC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	45
FIGURA 27 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto BM 1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	46
FIGURA 28 – Mapa de contornos COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	47
FIGURA 29 – Mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	48
FIGURA 30 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) – Parte I. ....	48
FIGURA 31 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) – Parte II. ....	49
FIGURA 32 – Possíveis estruturas químicas para o composto BM 1. ....	49
FIGURA 33 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) – Parte III. ....	50
FIGURA 34 – Correlações <sup>3</sup> J <sub>CH</sub> visualizadas no mapa de contornos HMBC para o composto BM 1. ....	50
FIGURA 35 – Espectro de massas obtido por ionização PS-MS, modo positivo, para o composto BM 1. ....	51
FIGURA 36 – Estrutura química de mulberrofurano B. ....	53
FIGURA 37 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	54
FIGURA 38 – Mapa de contornos COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	55
FIGURA 39 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C do composto BM 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	55
FIGURA 40 – Subespectro DEPT 135 do composto BM 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	56
FIGURA 41 – Mapa de contornos HSQC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	56
FIGURA 42 – Mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	57
FIGURA 43 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) – Parte I. ....	58
FIGURA 44 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C do composto BM 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) – Parte II. ....	58

FIGURA 45 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ do composto BM 2 (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) – Parte III. ....	59
FIGURA 46 – Possíveis estruturas químicas propostas na literatura para mulberrofurano B.....	59
FIGURA 47 – Espectro de massas obtido por ionização PS-MS, modo positivo, para o composto BM 2.....	60
FIGURA 48 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto BM 3 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	64
FIGURA 49 – Espectro de RMN de $^1\text{H}$ do composto BM 4 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	64
FIGURA 50 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ do composto BM 3 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	65
FIGURA 51 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ do composto BM 4 (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ). ....	65
FIGURA 52 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-MS, modo positivo, para o composto BM 3.....	66
FIGURA 53 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-MS, modo positivo, para o composto BM 4.....	66

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Detalhamento do fracionamento da “combinação 8” por cromatografia em coluna. ....	18
TABELA 2 – Combinações realizadas a partir das 186 frações provenientes da cromatografia em coluna da “combinação 8”. ....	19
TABELA 3 – Curva de calibração do padrão ácido ascórbico. ....	25
TABELA 4 – Correlações entre o teor de BM 1 nos extratos de <i>M. alba</i> e a atividade antioxidante dos mesmos.....	36
TABELA 5 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl <sub>3</sub> ) do composto BM 1. ....	52
TABELA 6 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl <sub>3</sub> ) do composto BM 2. ....	62

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1 – Método cromatográfico para quantificação das amostras por UFLC.....	23
--	----

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ABTS	–	2,2-Azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]
AChE	–	Acetilcolinesterase
ATCI	–	Iodeto de acetiltiocolina
BHA	–	Hidroxianisol butilado
BHT	–	Hidroxitolueno butilado
br	–	Largo (do inglês, <i>broad</i> )
CC <sub>50</sub>	–	Concentração citotóxica a 50%
CC	–	Cromatografia em coluna
CCD	–	Cromatografia em camada delgada
COSY	–	Do inglês, <i>correlation spectroscopy</i>
d	–	Dupleto
dd	–	Dupleto duplo
DA	–	Doença de Alzheimer
DP	–	Doença de Parkinson
DEPT	–	Do inglês, <i>distortionless enhancement by polarization transfer</i>
DHA	–	Ácido docosaexaenoico
DMPD	–	N,N-dimetil-p-fenilenodiamina
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNJ	–	1-Deoxinojirimicina
DPPH	–	2,2-Difenil-1-picrilidrazil

DQ	–	Departamento de Química
DTNB	–	Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)
EC <sub>50</sub>	–	Concentração efetiva a 50% (do inglês, <i>efficient concentration 50%</i> )
EM	–	Espectrometria de massas
EROs	–	Espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	–	Espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> (do inglês, <i>electrospray ionisation mass spectrometry</i> )
IC <sub>50</sub>	–	Concentração inibitória a 50% (do inglês, <i>inhibitory concentration 50%</i> )
ICB	–	Instituto de Ciências Biológicas
<i>J</i>	–	Constante de acoplamento
HMBC	–	Do inglês, <i>heteronuclear multiple-bond correlation</i>
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, <i>high performance liquid chromatography</i> )
HSQC	–	Do inglês, <i>heteronuclear single-quantum correlation</i>
LaβB	–	Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios
LAREMAR	–	Laboratório de ressonância magnética de alta resolução
LDL	–	Do inglês, <i>low density lipoprotein</i>
<i>m</i>	–	Multiplete
<i>m/z</i>	–	Razão massa/carga
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
P.A.	–	Para análise (do latim, <i>pro analyse</i> )
PS-MS	–	Espectrometria de massas com ionização por <i>paper spray</i> (do inglês, <i>paper spray ionisation mass spectrometry</i> )

RING	–	Do inglês, <i>rapid interactive negative geotaxis</i>
RMN	–	Ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>13</sup> C	–	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	–	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
rpm	–	Rotações por minuto
s	–	Simpleto
t	–	Tripleto
UFLC	–	Cromatografia líquida ultra rápida (do inglês, <i>ultra fast liquid chromatography</i> )
UFMG	–	Universidade Federal de Minas Gerais
δ	–	Deslocamento químico em partes por milhão

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>2</b>
2.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS VEGETAIS E A FITOTERAPIA.....	2
2.2	<i>MORUS ALBA L.</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS E APLICAÇÕES.....	4
2.2.1	Composição química e atividade biológica.....	5
2.3	SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES.....	8
2.3.1	Mecanismos de atividade antioxidante.....	10
2.4	DOENÇAS NEURODEGENERATIVAS E MECANISMOS DE NEUROPROTEÇÃO.....	12
2.4.1	Substâncias antioxidantes e atividade neuroprotetora.....	14
<b>3</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>15</b>
3.1	REAGENTES E MATERIAIS.....	15
3.2	EQUIPAMENTOS.....	16
3.3	METODOLOGIA.....	17
3.3.1	Obtenção dos extratos.....	17
3.3.2	Isolamento de metabólitos secundários.....	18
3.3.3	Caracterização espectrométrica dos compostos isolados.....	21
3.3.4	Quantificação dos compostos isolados.....	22
3.3.4.1	<b>Análise estatística.....</b>	<b>24</b>
3.3.5	Bioensaios.....	24
3.3.5.1	<b>Atividade antioxidante.....</b>	<b>24</b>
3.3.5.1.1	Atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio).....	24
3.3.5.1.2	Poder redutor férrico (método do ferrocianeto).....	25
3.3.5.1.3	Capacidade antioxidante de sequestro de radicais ABTS.....	26
3.3.5.1.4	Capacidade antioxidante de sequestro de radicais DPPH.....	26
3.3.5.2	<b>Atividade inibitória de acetilcolinesterase.....</b>	<b>27</b>
3.3.5.3	<b>Capacidade neuroprotetora.....</b>	<b>28</b>
3.3.5.4	<b>Análise estatística.....</b>	<b>29</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>30</b>
4.1	ISOLAMENTO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	30
4.2	ANÁLISE DOS EXTRATOS POR HPLC E QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS.....	32

4.3	BIOENSAIOS.....	36
4.3.1	Atividade antioxidante .....	36
4.3.2	Atividade inibitória de acetilcolinesterase .....	38
4.3.3	Capacidade neuroprotetora.....	40
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ISOLADOS .....	43
4.4.1	Caracterização do composto BM 1 .....	43
4.4.2	Caracterização do composto BM 2 .....	53
4.4.3	Caracterização dos compostos BM 3 e BM 4.....	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A utilização das plantas medicinais como ferramenta terapêutica é relatada desde as antigas civilizações, ganhando maior destaque a partir da Revolução Industrial, quando diversos medicamentos produzidos a partir de produtos naturais foram desenvolvidos.

Atualmente, a fitoterapia continua atuante no tratamento de patologias. Algumas das causas são a disseminação do conhecimento entre gerações, a crescente busca do uso de produtos de origem natural como alternativa aos sintéticos, e a facilidade de acesso da população a várias espécies vegetais. Entretanto, é de extrema importância que haja validações quanto à efetividade e segurança das propriedades farmacológicas destes produtos, com padronização das formulações e avaliação de possíveis efeitos tóxicos e sinérgicos no organismo.

A introdução de novos fitoterápicos, ou seja, medicamentos obtidos a partir de metabólitos secundários vegetais bioativos, é de grande interesse. O potencial farmacológico da amoreira branca, *Morus alba* L., a torna uma espécie amplamente estudada para esta finalidade. Sendo utilizada na Ásia para o tratamento de diversas enfermidades, é rica em compostos fenólicos aos quais são atribuídos, *e.g.*, propriedades antioxidantes, anticancerígenas e neuroprotetoras. Entretanto, os estudos acerca de *M. alba* se concentram majoritariamente em seus frutos e folhas, pela aplicação direta dos mesmos na alimentação humana e do bicho-da-seda, respectivamente. As raízes não são comumente aproveitadas, apesar de serem notórias fontes de diversos constituintes fitoquímicos.

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo geral o isolamento e identificação dos principais componentes de extratos etanólicos de raízes de variedades de *M. alba*, com subsequente determinação da atividade biológica dos mesmos. Para tanto, os objetivos específicos são: a) obter as substâncias majoritárias dos extratos a partir de técnicas cromatográficas; b) caracterizar as estruturas utilizando métodos espectrométricos; e c) realizar bioensaios para avaliação das atividades antioxidantes e neuroprotetoras das substâncias, frente a diferentes mecanismos de ação.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Metabólitos secundários vegetais e a fitoterapia

A partir das reações metabólicas que ocorrem nas células dos organismos vivos são formados os compostos químicos denominados metabólitos (SIMÕES *et al.*, 2010). Os metabólitos primários correspondem às proteínas, lipídeos, carboidratos, aminoácidos e ácidos nucleicos, ou seja, substâncias que permitem a sobrevivência do organismo. Já os metabólitos secundários consistem em produtos naturais de baixa massa molecular, formados a partir de caminhos biossintéticos relacionados à defesa do organismo. No caso das plantas, estes caminhos são ativados em condições de estresse, como o ataque de herbívoros ou patógenos. Desta forma, diferentemente dos metabólitos primários, não são essenciais para os processos metabólicos básicos das plantas, mas estão relacionados aos mecanismos de adaptação das mesmas ao habitat. São conhecidos mais de 100.000 metabólitos secundários de origem vegetal, consistindo principalmente, de compostos orgânicos alcaloidais, fenólicos e terpênicos (DIXON, 2001; DELBONE, 2010). Muitos destes são de grande importância para as indústrias farmacêuticas e/ou alimentícias (BALDI *et al.*, 2009).

Neste processo de adaptação, os metabólitos produzidos podem se tratar de substâncias bioativas, ou fitofármacos, e a espécie vegetal da qual se originam é desta forma considerada uma planta medicinal. Assim, o emprego de uma planta medicinal em uma formulação específica pode caracterizar um medicamento fitoterápico (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).

O uso das plantas medicinais como alternativa terapêutica no tratamento de doenças é relatado desde civilizações antigas. Naquela época, esta prática envolvia muito misticismo, sendo comumente associadas a elementos mágicos e sobrenaturais. Com o desenvolvimento da indústria farmacêutica pós Revolução Industrial, importantes medicamentos foram produzidos a partir de produtos naturais (FERREIRA *et al.*, 2014). No caso de extratos de plantas, tem-se, como exemplo, os fármacos alcaloidais morfina **(1)** e codeína **(2)** (Figura 1, p. 3), importantes analgésicos obtidos a partir da papoula, *Papaver somniferum* (BALANDRIN *et al.*, 1993). Desta mesma espécie, cerca de outros trinta alcaloides foram isolados, dentre os quais a papaverina **(3)** (Figura 1, p. 3), substância que apresenta ação vasodilatadora (VEIGA JÚNIOR *et al.*, 2005).



Desta forma, observa-se que nem toda planta medicinal pode ser utilizada como um produto fitoterápico, reiterando a importância do estudo e a padronização de fitomedicamentos para a garantia da qualidade do produto e da segurança dos usuários (KLEIN *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2014).

Países desenvolvidos como os Estados Unidos, Japão e alguns países europeus são os que mais comercializam produtos naturais e, também, são os que mais investem em pesquisas de novos fitomedicamentos, considerando que são elevados os investimentos necessários para o desenvolvimento e produção de qualquer medicamento (KLEIN *et al.*, 2009). A medicina oriental é tradicionalmente conhecida pelo uso recorrente de espécies vegetais no tratamento de enfermidades. O intenso desenvolvimento da mesma resultou no interesse constante pelo isolamento de novos princípios ativos e conhecimento dos mecanismos de ação dos preparados vegetais (VIEGAS JÚNIOR & BOLZANI, 2006). Diversos medicamentos fitoterápicos são aprovados na China, inclusive para uso como ingredientes alimentares, sendo consumidos, *e.g.*, para o tratamento de distúrbios digestivos e inflamações (LIU *et al.*, 2008). No Brasil, o investimento para a produção de produtos fitoterápicos ainda é considerado pequeno em vista do potencial de sua flora em termos mundiais (KLEIN *et al.*, 2009).

## **2.2 *Morus alba* L.: características gerais e aplicações**

A família Moraceae, tradicionalmente presente na medicina chinesa (LIU *et al.*, 2018), compreende aproximadamente 40 gêneros e mais de 1000 espécies de plantas com flores (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Cerca de 16 membros desta família são pertencentes ao gênero *Morus* (amoreira), que apresenta ao todo cerca de 150 espécies conhecidas. Dentre estas, a amoreira branca, *Morus alba* L., é considerada a espécie dominante do gênero (SINGH *et al.*, 2013).

Devido à sua considerável atividade terapêutica e baixa toxicidade, *M. alba* tem alicerçado na história seu uso na medicina chinesa (ZAFAR *et al.*, 2013), onde é reconhecida pelo nome popular *sang shu*. Também é amplamente utilizada como planta medicinal em outros países asiáticos como Japão, Coreia, Turquia e Índia (CHAN *et al.*, 2016). Na Índia é conhecida como *tut* (DEVI *et al.*, 2013), e suas folhas são utilizadas em diversas receitas alimentícias e no preparo de especiarias (SRIVASTAVA *et al.*, 2006).

Apesar da origem asiática e popularidade neste continente, a amoreira branca, sendo uma planta de natureza tropical e sub-tropical, é cultivada em todo o mundo

(SRIVASTAVA *et al.*, 2006). Em Cuba, por exemplo, existiam 26 variedades de *M. alba* em 2014, algumas introduzidas de países como Costa Rica, Brasil, Coréia do Sul, China e Espanha, e outras já naturalizadas (MARTÍN *et al.*, 2014).

Há interesse particular no cultivo de *M. alba* onde há criação dos bichos-da-seda (*Bombyx mori* L.) (DEVI *et al.*, 2013), uma vez que os mesmos se alimentam da folhagem da amoreira. As folhas são fonte quase exclusiva de nutrientes e de água para estes insetos produtores de seda, e a qualidade da variedade, associada a fatores ambientais, exerce influência direta no desenvolvimento dos mesmos (PRIETO *et al.*, 2016). Desta forma, *M. alba* é importante na garantia de renda para diversas comunidades rurais e indústrias de sericicultura (SRIVASTAVA *et al.*, 2006). Outra aplicação das folhas da amoreira é em ração animal, para alimentação de ruminantes (CHAN *et al.*, 2016).

Os frutos de *M. alba*, as amoras, além de consumidos em sua forma fresca, podem ser transformados em diversos produtos alimentícios como geleia, suco, sorvete, vinhos, sobremesas congeladas, entre outros (PAWLOWSKA *et al.*, 2008). Apesar da terminologia amoreira branca, seus frutos são verdes quando jovens, passando por tons alaranjados e avermelhados até se tornarem púrpura, em sua fase madura (CHAN *et al.*, 2016).

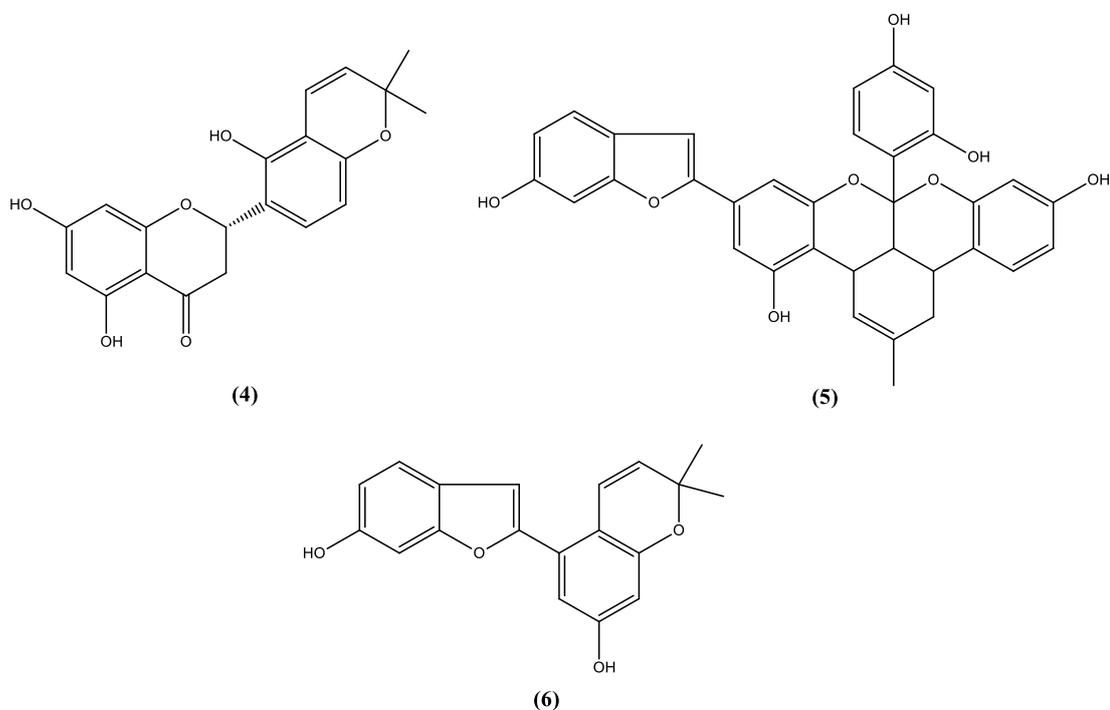
Além das aplicações industriais, de forma geral, folhas, frutas e cascas do caule de *M. alba* são muito utilizadas medicinalmente (CHAN *et al.*, 2016). Embora as cascas das raízes sejam consideradas valiosas pela medicina vietnamita no tratamento de tosse, inflamações, diabetes, câncer, hepatite e doenças cardíacas (DAT *et al.*, 2010), estas não são comumente aproveitadas em outras regiões. No Brasil, por exemplo, não é comum o uso das raízes de amoreira como ferramenta medicinal. Desta forma, a investigação de seus constituintes fitoquímicos ainda carece de atenção.

### 2.2.1 Composição química e atividade biológica

Os principais constituintes fitoquímicos presentes nas plantas do gênero *Morus* consistem em compostos fenólicos, sendo muitos deles isoprenilados. Podem se apresentar em diversas estruturas, mas são mais comumente presentes como flavonoides, adutos de Diels-Alder e derivados de arilbenzofuranos (HUANG *et al.*, 2017). Como exemplos de compostos isolados de raízes de *M. alba* com estas estruturas, têm-se sanggenona F **(4)**, mulberrofurano G **(5)** e moracina E **(6)** (Figura 2, p. 6) (JUNG *et al.*, 2015).

Dentre estes constituintes, muitos são ativos frente a diversas doenças. Aos flavonoides prenilados é atribuída a atividade antioxidante de extratos de *M. alba*, devido ao

potencial dos mesmos contra o estresse oxidativo. Conseqüentemente, geram proteção cardiovascular, ao inibir a oxidação do LDL. Também é relatado o potencial de suas folhas, fonte de proteínas, como inibidoras de distúrbios neurodegenerativos como as doenças de Alzheimer e de Parkinson (BUTT *et al.*, 2008).

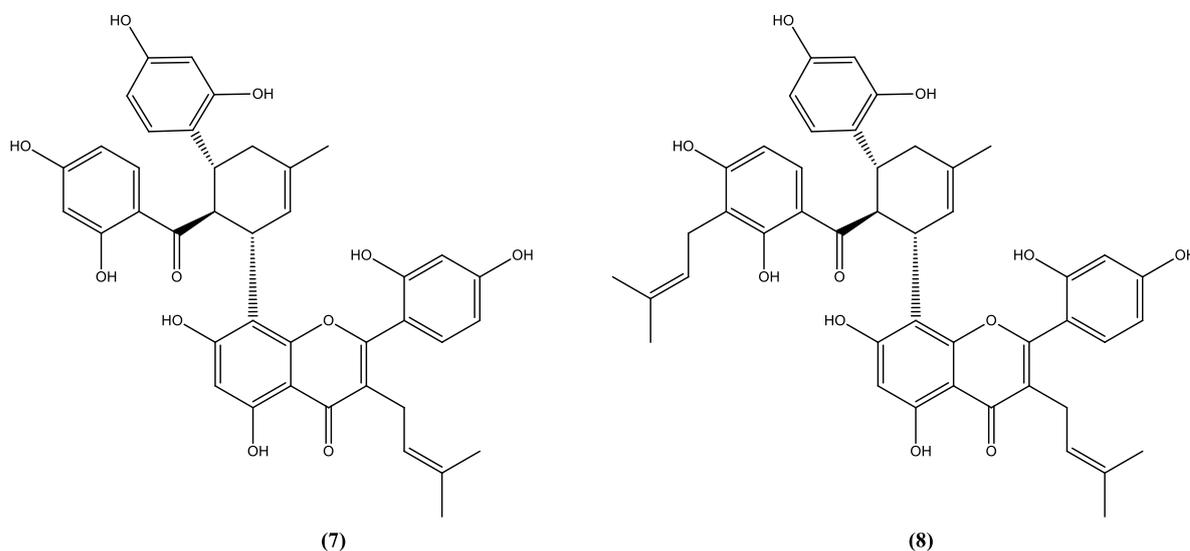


**FIGURA 2 – Metabólitos secundários isolados de cascas de raízes de *M. alba*.**

A partir de dados coletados na literatura, Singh e colaboradores (2013) indicaram algumas aplicações terapêuticas para cada parte do vegetal. Por exemplo, os frutos para o tratamento de tontura, zumbido nos ouvidos, visão turva, insônia, incontinência urinária, hipertensão, diabetes e para evitar o envelhecimento precoce dos cabelos. As folhas para o tratamento da tosse, febre, dores de garganta e cabeça, tontura e vertigem. Os galhos, para o combate de retenção de líquido e de dores nas articulações. As cascas das raízes são consideradas antiasmáticas e sedativas, além de apresentarem efeito laxante. De maneira geral, estes autores apresentam *M. alba* com as seguintes propriedades farmacológicas: antidiabética, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígena, neuroprotetora, hepatoprotetora, ansiolítica, antidepressiva, entre outras (SINGH *et al.*, 2013).

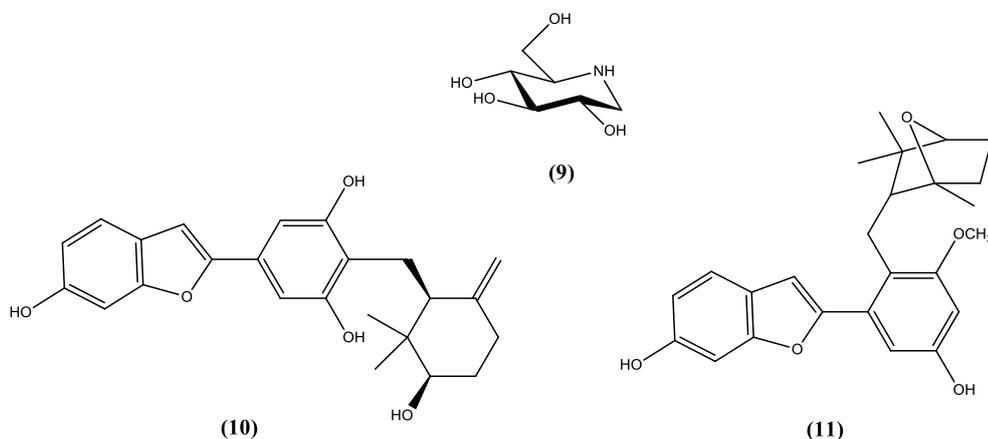
Algumas das primeiras substâncias ativas isoladas de cascas de raízes de *M. alba* foram os flavonoides isoprenilados, kuwanon G (**7**) e H (**8**) (Figura 3, p. 7), apresentando efeito hipotensivo (NOMURA *et al.*, 1999), ou seja, de diminuição da pressão arterial. Além disso, kuwanon G é reconhecido como um eficiente agente antimicrobiano (BUTT *et al.*, 2008). De

fato, a amoreira é reconhecida como uma poderosa fonte de flavonoides, potentes antioxidantes naturais e fontes de pigmentos (PAWLOWSKA *et al.*, 2008).



**FIGURA 3 – Flavonoides isoprenilados isolados de cascas de raízes de *M. alba*.**

Outro exemplo de substância bioativa encontrada em folhas e cascas de *M. alba* é o alcaloide 1-deoxinojirimicina (DNJ) **(9)** (Figura 4). Este se refere a um dos mais poderosos inibidores de  $\alpha$ -glicosidase, sendo seu consumo de extrema importância para pacientes com diabetes mellitus (BUTT *et al.*, 2008). Zhang e colaboradores (2014) isolaram dez compostos das cascas das raízes de *M. alba* com inibição de  $\alpha$ -glicosidase comprovada experimentalmente. As estruturas químicas de dois derivados de 2-arilbenzenofurano **(10-11)**, que se destacaram nesta atividade inibitória, são apresentadas na Figura 4.



**FIGURA 4 – Inibidores de  $\alpha$ -glicosidase isolados de *M. alba*.**

## 2.3 Substâncias antioxidantes

O estresse oxidativo é, por definição, o processo no qual ocorre aumento no número de radicais livres no organismo, em consequência de alguma falha dos sistemas de defesa antioxidantes na remoção dessas espécies instáveis e reativas (FRIES & FRASSON, 2010). Em outras palavras, ocorre quando há um desequilíbrio entre a produção de substâncias capazes de provocar lesões e a reparação pelo organismo dos danos por elas causados.

Os radicais livres correspondem a moléculas ou fragmentos com um ou mais elétrons desemparelhados. Esta estrutura justifica sua reatividade, ao passo que possibilita a oxidação de outros compostos ou a formação de outros radicais com facilidade (BOOTS *et al.*, 2008). Sendo majoritariamente derivados do oxigênio molecular diatômico ( $O_2$ ), são também identificados como espécies reativas de oxigênio (EROs), e incluem: o ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), os radicais hidroxila ( $\cdot OH$ ) e peroxila ( $RO_2^{\cdot}$ ), o óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o ozônio ( $O_3$ ), o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), entre outras espécies (BOOTS *et al.*, 2008; FRIES & FRASSON, 2010).

Como consequência do excesso destas moléculas reativas no organismo, tem-se por exemplo a aceleração do processo natural de envelhecimento da pele e dos cabelos (FRIES & FRASSON, 2010). Os radicais livres podem ainda ocasionar maior incidência de doenças degenerativas, cardíacas, inflamatórias e do sistema imunológico, além de disfunções neurológicas, entre outras enfermidades (MILANI *et al.*, 2012).

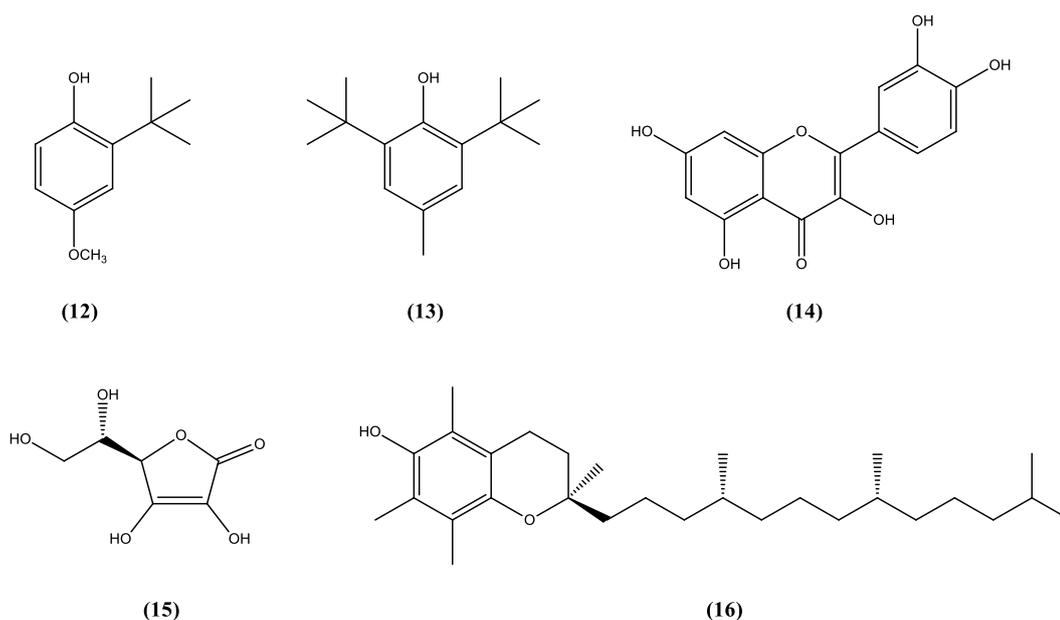
Substâncias antioxidantes, presentes em diversas frutas, vegetais, especiarias e bebidas, desempenham uma importante função na saúde humana ao inibir a formação dos radicais livres, diminuir seus efeitos e reparar o dano dos mesmos sobre as células e tecidos humanos (FRIES & FRASSON, 2010; MILANI *et al.*, 2012). As principais classes de substâncias antioxidantes são: os compostos fenólicos (como os flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, lignanas e estilbenos), as vitaminas e os carotenoides (OROIAN & ESCRICHE, 2015).

A indústria cosmética busca incessantemente o desenvolvimento de ativos antioxidantes para emprego em novos produtos, no intuito de retardar os efeitos dos radicais livres sobre a pele (FRIES & FRASSON, 2010). O mesmo ocorre na indústria alimentícia, onde o uso de antioxidantes para conservação de alimentos não é recente. Entretanto, nota-se uma tendência de substituição de antioxidantes artificiais pelos naturais. Alguns antioxidantes sintéticos, como os conhecidos hidroxianisol butilado (BHA) **(12)** e hidroxitolueno butilado (BHT) **(13)** (Figura 5, p. 9), embora inibam o estresse oxidativo, são considerados perigosos para os seres humanos (SINDHI *et al.*, 2013). Krishnaiah e

colaboradores (2011) mostraram que muitos extratos vegetais apresentam potenciais antioxidantes semelhantes aos do BHA e BHT, podendo substituir estes compostos sintéticos responsabilizados por danos no fígado e carcinogênese. Como exemplo, a fração aquosa do extrato acetato etílico de *Pistacia lentiscus* que possui atividade sequestradora de radicais DPPH (90%) equivalente à observada para o BHA (89%) (KRISHNAIAH *et al.*, 2011).

As plantas são consideradas ricas fontes de antioxidantes. Muitos metabólitos secundários vegetais flavonoides apresentam forte atividade antioxidante, devido à sua estrutura básica, e podem ser também reconhecidos como nutracêuticos (D'AMELIA *et al.*, 2018), ou seja, alimentos ou parte de alimentos que fornecem benefícios à saúde humana. Além da vantagem de se evitar possíveis efeitos colaterais dos medicamentos, são considerados suplementos dietéticos (NAGAR, 2018). É o caso da quercetina (14) (Figura 5), composto da sub-classe dos flavonóis, que é considerado um dos mais importantes antioxidantes alimentares, estando presente em diversos tipos de alimentos (vegetais, frutas, chás e vinhos) e suplementos alimentares. A ingestão alimentar relativa à quercetina geralmente se dá na forma glicosídica e, como um nutracêutico, pode ser usada de 10-125 mg/dose (BOOTS *et al.*, 2008; D'ANDREA, 2015).

As substâncias antioxidantes ácido ascórbico (15) e  $\alpha$ -tocoferol (16) (Figura 5), conhecidos como vitamina C e E, respectivamente, também são encontradas naturalmente em diversos alimentos (MILANI *et al.*, 2012). Além disso, são sintetizadas para adição em produtos cosméticos antienvhecimento (FRIES & FRASSON, 2010). Desta forma, são comumente utilizados como controle positivo para ensaios de atividade antioxidante realizados em laboratório (OROIAN & ESCRICHE, 2015).

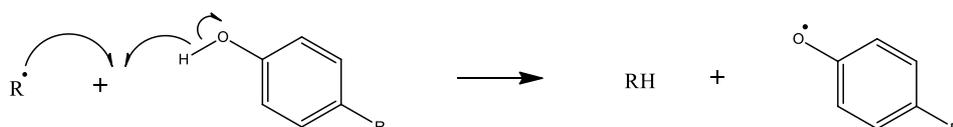


**FIGURA 5 – Agentes antioxidantes utilizados na indústria cosmética e alimentícia.**

### 2.3.1 Mecanismos de atividade antioxidante

Como mencionado, os compostos fenólicos em geral têm atividade antioxidante relacionada com a eliminação de radicais livres. Eles reagem com estes EROs tornando-os inativos a partir de mecanismos de transferência de átomos de hidrogênio ou pela transferência única de elétron, como mostrado na Figura 6 (LEOPOLDINI *et al.*, 2011).

**Transferência de H :**



**Transferência de e<sup>-</sup> :**



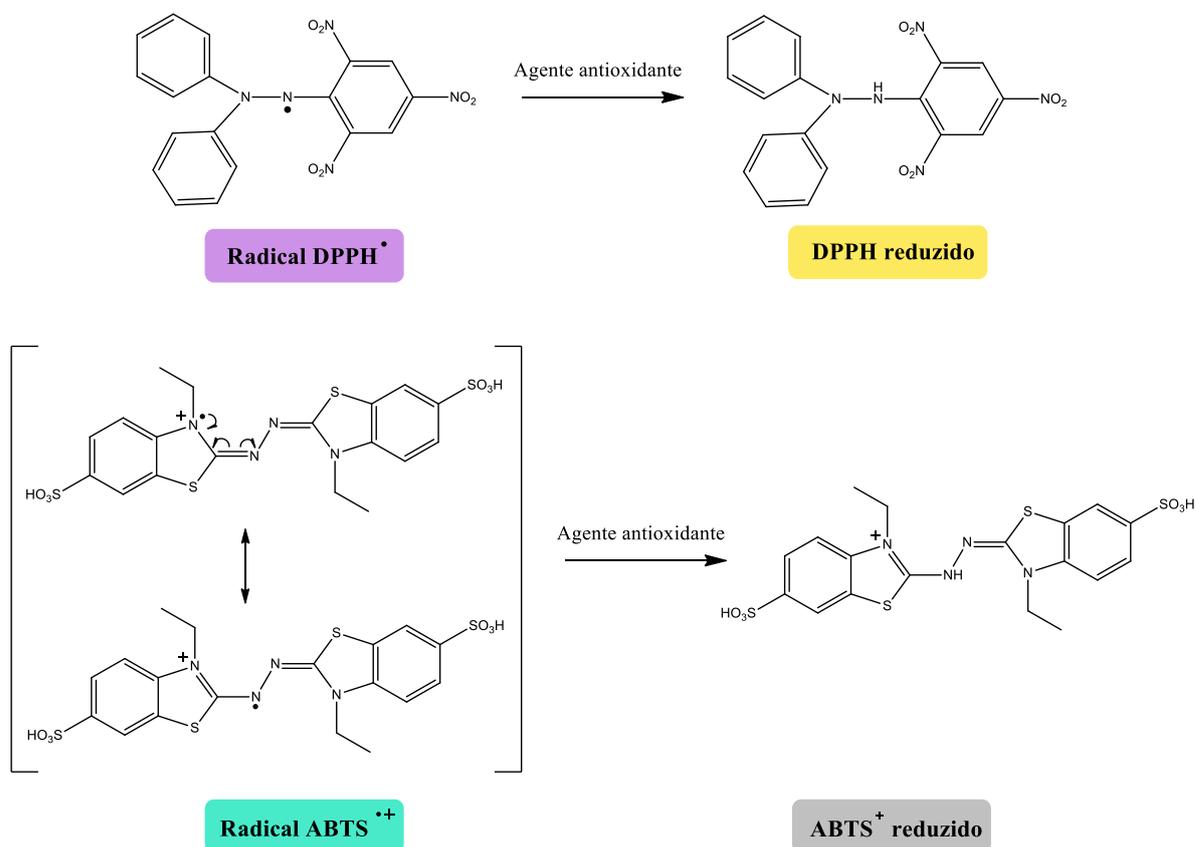
**FIGURA 6 – Mecanismos de atividade antioxidante por eliminação de radicais livres.**

Muitos radicais são utilizados em ensaios de avaliação de atividade antioxidante, como o 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), o 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS), o N,N-dimetil-p-fenilenodiamina (DMPD), entre outros (VILLANO *et al.*, 2007).

O radical livre DPPH• é estável à temperatura ambiente e de avaliação antioxidante relativamente rápida. Este aceita um elétron ou hidrogênio para se tornar uma molécula diamagnética estável, com conseqüente mudança de coloração de roxo para amarelo (Figura 7, p. 11), que é mais evidente quanto maior o potencial de eliminação de radicais livres do composto avaliado (AHMAD *et al.*, 2015). A resposta é medida em espectrofotômetro pela leitura de absorvância após 30 minutos de reação, no comprimento de onda próximo a 515 nm em metanol (VILLANO *et al.*, 2007), mas adaptações na técnica envolvendo o tempo reacional, comprimento de onda e solventes utilizados são encontradas na literatura (MARINOVA & BATCHVAROV, 2011).

O ensaio de captura de radicais ABTS também se refere a um método espectroscópico. Em uma primeira etapa, o ABTS é oxidado na presença de persulfato de potássio, com a produção direta do cátion radical ABTS<sup>•+</sup>, um cromóforo verde/azul. Em seguida, induzido por substâncias antioxidantes doadoras de hidrogênio, o radical é

novamente reduzido para ABTS com diminuição dos valores de absorvância, medida em 734 nm, com conseqüente descoloração da solução (Figura 7). Quanto maior a atividade antioxidante, maior a descoloração, e tanto a concentração de antioxidantes quanto a duração da reação são fatores que influenciam na resposta do teste (RE *et al.*, 1999).



**FIGURA 7 – Princípio do mecanismo dos ensaios de captura de radicais livres DPPH e ABTS.**

Alguns métodos de determinação da atividade antioxidante se baseiam na formação de complexos metálicos com conseqüente redução do íon metálico após reação com a espécie de caráter antioxidante. Como exemplo, tem-se o método do fosfomolibdênio, ensaio considerado como teste de determinação de antioxidantes totais. Neste, ocorre a redução de Mo (VI) a Mo (V), formando um complexo de fosfomolibdênio (V) de coloração verde, com absorvância máxima a 695 nm. Trata-se de um método quantitativo, uma vez que a capacidade antioxidante total é expressa em termos de equivalentes de padrões antioxidantes, como o  $\alpha$ -tocoferol ou o ácido ascórbico (UMAMAHESWARI & CHATTERJEE, 2008).

Outro exemplo de ensaio com formação de complexos com íons metálicos é o ensaio de poder redutor férrico, que determina a habilidade de redução de íons Fe (III) em Fe (II), também em relação ao padrão ácido ascórbico. É um método baseado na transferência única de elétron, com oxidação da substância antioxidante pelo íon metálico (OU *et al.*, 2002). As substâncias antioxidantes reagem com ferricianeto de potássio, formando ferrocianeto de potássio, que reage com tricloreto férrico, produzindo ferrocianeto férrico. Ao final da reação, tem-se um complexo de cor azul. A capacidade antioxidante é medida, como sendo proporcional ao aumento dos valores de absorvância, com leitura à 700 nm (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

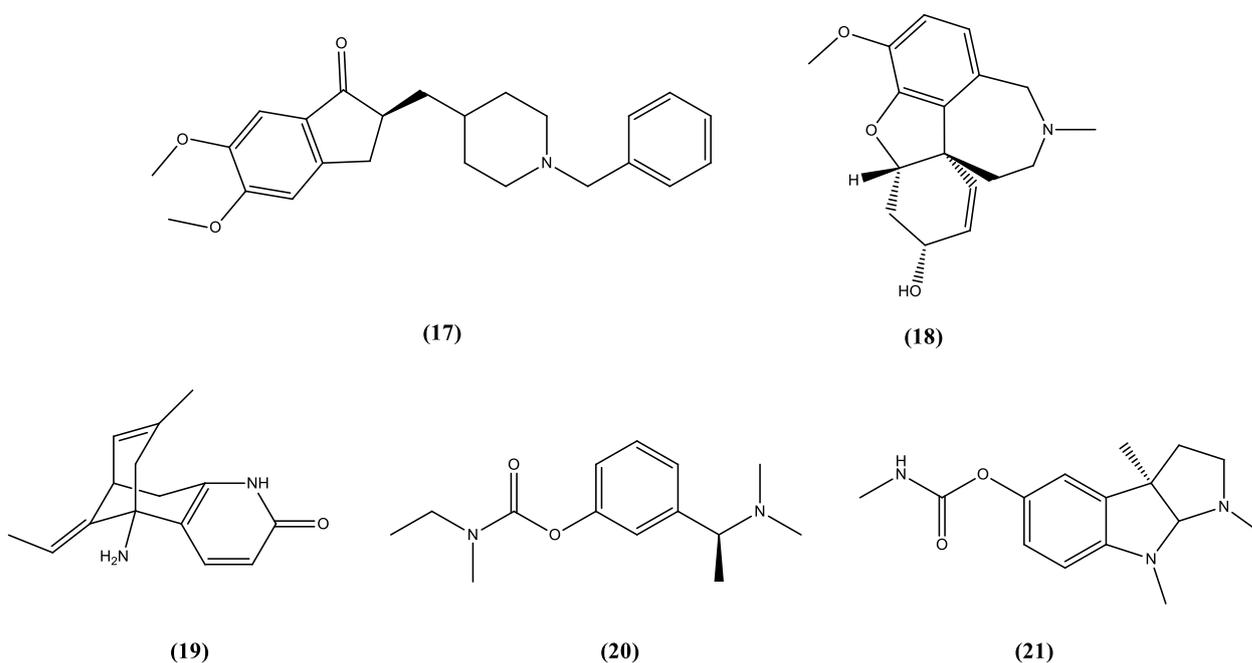
Existem diversos outros ensaios antioxidantes, para diferentes propósitos. Alguns são mais específicos, como os métodos de determinação da capacidade de captura de radicais hidroxila ( $\cdot\text{OH}$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), assim como determinação de peróxido ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ). Mas, existem também ensaios mais gerais, para determinação dos conteúdos totais de classes de compostos, como fenólicos, flavonoides e carotenoides totais, muito úteis na caracterização de extratos vegetais (UMAMAHESWARI & CHATTERJEE, 2008; ALVES *et al.*, 2010; EGEEA *et al.*, 2010). Todos estes ensaios mencionados consistem em métodos espectrométricos com determinação colorimétrica do final da reação. Técnicas eletroquímicas e cromatográficas também podem ser utilizadas para determinação da atividade antioxidante, existindo também outras formas de detecção da resposta antioxidante, como pela perda de fluorescência, por quimioluminescência, entre outras (PISOSCHI & NEGULESCU, 2011).

## 2.4 Doenças neurodegenerativas e mecanismos de neuroproteção

A Doença de Alzheimer (DA) é uma das doenças neurodegenerativas progressivas do sistema nervoso central que mais causa demência no mundo. É uma doença associada ao envelhecimento e, com o aumento da expectativa de vida da população mundial, vem aumentando o número de idosos afetados (SHAH, 2013; MOHAJERI *et al.*, 2015). A causa exata ainda é desconhecida, assim como formas de prevenção ou de se evitar a progressão da doença. Reverter a perda neuronal uma vez iniciada é um obstáculo. Desta forma, manter o cérebro envelhecido saudável por maior tempo por meio de suprimento de nutrientes necessários é uma alternativa (MOHAJERI *et al.*, 2015).

O principal tratamento visando o retardo dos sintomas da DA consiste na administração de inibidores de acetilcolinesterase (AChE). Alguns exemplos são as

substâncias de ação colinérgica donepezila **(17)**, galantamina **(18)**, huperzina A **(19)**, rivastigmina **(20)** (ZELÍK *et al.*, 2009) e eserina **(21)** (MANS *et al.*, 2014) (Figura 8). Novos inibidores naturais de AChE já foram encontrados em extratos de várias partes de material vegetal (ZELÍK *et al.*, 2009). O uso de inibidores de AChE no tratamento da DA se justifica devido aos baixos níveis de acetilcolina encontrados no cérebro de pessoas diagnosticadas com a doença. A acetilcolina é um importante neurotransmissor relacionado à memória, e a função dos inibidores de AChE é a de bloquear a sua hidrólise, ocasionada pela enzima (TEIXEIRA, 2017).



**FIGURA 8 – Substâncias inibidoras de acetilcolinesterase, utilizadas no tratamento da Doença de Alzheimer.**

Outra doença neurodegenerativa que acomete muitas pessoas é a Doença de Parkinson (DP), um distúrbio do movimento. No organismo de um paciente diagnosticado com DP ocorre uma degeneração progressiva dos neurônios da dopamina e, assim como na DA, não existe tratamento que consiga atrasar ou inativar os danos neurológicos após estes terem se iniciado. Muitos estudos sugerem uma associação das causas da doença com toxinas ambientais, como as inibidoras do complexo I mitocondrial. Como exemplo, tem-se o pesticida natural rotenona, obtido a partir das raízes de algumas plantas, *e.g.*, *Derris elliptica*. Nos últimos anos, a espécie de mosca *Drosophila melanogaster* tem sido usada como modelo de estudo de várias doenças neurodegenerativas, como a DP, avaliando os efeitos

neurodegenerativos e comportamentais dos indivíduos frente à rotenona, ou outras toxinas (COULOM & BIRMAN, 2004).

Neste modelo, são identificados fatores de susceptibilidade genética, como dos genes que afetam a homeostase da dopamina (CHAUDHURI *et al.*, 2007). Coulom e Birman (2004) observaram perda seletiva de neurônios dopaminérgicos e disfunção locomotora grave em *D. melanogaster* fêmeas expostas à rotenona. Entretanto, estudos mostram que a incidência da DP é maior em homens e, da mesma forma, a *Drosophila* macho exibe sintomas de maneira mais precoce frente as toxinas neurodegenerativas do que as fêmeas (CHAUDHURI *et al.*, 2007). Desta forma, *D. melanogaster* machos vêm sendo utilizadas nos ensaios laboratoriais do modelo RING (*Rapid Iterative Negative Geotaxis*), onde a geotaxis negativa é uma resposta de elevação das moscas contra a gravidade, possibilitando medir sua capacidade locomotora em resposta a variações na composição do alimento (JIMÉNEZ *et al.*, 2017), incrementado com potenciais substâncias neuroprotetoras, ou neurodegenerativas.

As moscas machos podem ser diferenciadas por serem menores que as fêmeas, apresentarem extremidade abdominal mais arredondada, e três listras pigmentadas na parte de trás do abdômen, sendo a última mais espessa, ao contrário da fêmea, que apresenta cinco listras (ADÁN).

#### **2.4.1 Substâncias antioxidantes e atividade neuroprotetora**

Na literatura encontram-se evidências de que o estresse oxidativo relaciona-se diretamente à patogênese da DA (SHAH, 2013) e da DP (MURALIDHARA, 2009), fazendo acreditar que a ingestão de nutrientes e substâncias com capacidade antioxidante pode ser benéfica na prevenção e no retardo da progressão destas doenças.

Mohajeri *et al.* (2015) reuniram estudos que mostram a ação positiva de compostos com propriedades antioxidantes, como o ácido graxo docosaenoico (DHA) e vitaminas como a E, C e D, como auxiliares contra o envelhecimento cerebral e, logo, na proteção contra doenças neurológicas. A partir destas evidências, e se tratando de nutrientes baratos e seguros em doses recomendadas, sugerem ser uma alternativa viável.

Desta forma, pesquisas vêm sendo direcionadas para comprovar a relação entre os excessos de radicais livres no organismo e doenças neurológicas como Alzheimer, Parkinson e a Esclerose Lateral Amiotrófica (SINDHI *et al.*, 2013). Assim, são investigados tratamentos alternativos, atentando-se para o efeito neuroprotetor de substâncias antioxidantes naturais, encontradas em diversas plantas (JIMÉNEZ *et al.*, 2017).

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

As atividades experimentais descritas a seguir foram realizadas, em sua maioria, no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios (LaßB) do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (DQ/UFMG).

#### 3.1 Reagentes e materiais

##### I - Solventes

- Solventes *P.A.*: álcool metílico (metanol)  $\text{CH}_3\text{OH}$  (Neon Comercial), acetato de etila  $\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$  (Nox Lab Solutions, LS Chemicals, Synth), clorofórmio  $\text{CHCl}_3$  (Synth), hexano  $\text{C}_6\text{H}_{16}$  (Nox Lab Solutions, Química Moderna), ácido fórmico 85%  $\text{HCOOH}$  (Neon Comercial);
- Solventes deuterados: clorofórmio-*d*  $\text{CDCl}_3$  (Aldrich®), metanol-*d*4  $\text{CD}_3\text{OD}$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.);
- Solvente grau HPLC: metanol UV/HPLC (Vetec, J.T. Baker);
- Água destilada;
- Água Milli-Q (Direct-Q Millipore).

##### II – Suportes para cromatografia em camada delgada e em coluna

- Sílica gel para cromatografia em camada fina (Macherey-Nagel);
- Sílica gel 60 para cromatografia em coluna (230-400 mesh) (Vetec);
- Sephadex LH-20 lipofílico (25-100  $\mu$ ) (Sigma®);
- Revelador: iodo metálico *P.A.*  $\text{I}_2$  (Vetec).

##### III – Reagentes utilizados para os ensaios antioxidantes

- 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS) (Sigma-Aldrich);
- 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) (Aldrich®);
- Ácido ascórbico  $\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_8$  (Neon Comercial);
- Ácido sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (Química Moderna, Anidrol);

- Ácido tricloroacético  $\text{Cl}_3\text{CCOH}$  (Neon Comercial);
- Cloreto férrico  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Synth);
- Ferrocianeto de potássio  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  (Química Moderna);
- Fosfato bibásico de sódio  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Vetec Química Fina);
- Molibdato de amônio  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Synth);
- Persulfato de potássio  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (Synth).

#### IV – Reagentes utilizados para os ensaios de inibição da acetilcolinesterase

- Acetilcolinesterase – AChE (Sigma®);
- Ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) (Sigma®);
- Albumina sérica bovina (Sigma®);
- Cloreto de magnésio  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Dinâmica);
- Cloreto de sódio  $\text{NaCl}$  (Dinâmica);
- Dimetilsulfóxido – DMSO (Sigma-Aldrich);
- Eserina (Sigma®);
- Iodeto de acetiltocolina – ATCI (Sigma®);
- Tris hidrocloreto ultrapuro (Invitrogen);
- Tween 80 (Nuclear).

#### V – Reagentes utilizados para os ensaios de capacidade neuroprotetora

- Ágar em pó bacteriológico puro (Vetec);
- Ácido propiônico;
- Éter etílico (Nox Lab Solutions);
- Fermento biológico – *Saccharomyces cerevisiae* (Fleischmann);
- Nistatina suspensão oral (Germed);
- Rotenona 95-98%  $\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$  (Sigma®).

### 3.2 Equipamentos

- Balança analítica, Shimadzu AUW2220D;

- Evaporadores rotativos, IKA RV10 e Buchi R-114;
- Bombas a vácuo, Millipore e Primatec;
- Estufas de secagem, Quimis, Fanem 002 CB e Nova Ética 400-3ND;
- Ultrassons, Cristófoli Biossegurança e Branson 1510;
- Shaker, IKA KS 4000i control;
- Centrífuga, CentriBio TDL80-2B;
- Medidor de ponto de fusão, Gehaka PF 1000;
- Espectrofotômetro, Biospectro SP 22;
- Espectrofotômetros leitores de microplacas de 96 poços, BioTek ELx800 e Thermo Scientific Multiskan GO;
- Espectrômetro de ressonância magnética, Bruker AVANCE III 400;
- Espectrômetro de massa com analisador íon-trap (ionização por *electrospray* / ionização por *paper spray*), Thermo-Scientific LCQ FLEET;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu 20A, composto pelos seguintes módulos: duas bombas gradientes LC-20AT e detector UV-Visível SPD-20A;
- Cromatógrafo líquido ultra rápido, Shimadzu Prominence, composto pelos seguintes módulos: desgaseificador DGU-20A3, duas bombas gradientes LC-20AD, auto-injetor SIL-20A, detector UV-Visível SPD-20A e forno de coluna CTO-20AC;
  - Coluna analítica C18 250 mm x 4,6 mm x 5 µm, Kromasil;
  - Coluna semi-preparativa C18 250 mm x 10 mm x 5 µm, NST.

### 3.3 Metodologia

#### 3.3.1 Obtenção dos extratos

Raízes secas e pulverizadas de variedades de *Morus alba* foram obtidas da *Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey*, na Universidade de Matanzas Camilo Cienfuegos, em Perico, Cuba, passando por prévia extração por percolação com hexano, etanol e água, sucessivamente.

No presente trabalho, utilizaram-se apenas os extratos etanólicos, de seis variedades de *M. alba*: as variedades naturais **Indonesiá** (IH 4210) e **Tigreada** (IH 3506); e as variedades híbridas **IZ 13/6** (IH 3625), **IZ 40** (IH 3626), **IZ 56/4** (IH 3628) e **IZ 64** (IH 3624).

### 3.3.2 Isolamento de metabólitos secundários

O extrato etanólico da variedade **IZ 40** de *M. alba* foi submetido à cromatografia em coluna visando o isolamento de constituintes químicos. A escolha do extrato foi baseada no fato de o mesmo já ter sido submetido a um fracionamento prévio, além da considerável atividade antioxidante registrada no trabalho de Sande e colaboradores (2016). Esta etapa preliminar consistiu no fracionamento do extrato etanólico bruto em coluna empacotada com sílica gel, obtendo-se 61 frações, que foram reunidas em 14 combinações após análise por cromatografia em camada delgada (CCD).

Neste trabalho, selecionou-se a “combinação 8” (6,1 g), obtida com a eluição em acetato de etila, para prosseguir com as etapas de purificação, de acordo com o perfil cromatográfico observado. Esta foi submetida à cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel (200,0 g), utilizando como eluente diferentes proporções de hexano, clorofórmio e metanol. Foram coletadas 186 frações de volumes variados, as quais foram rotaevaporadas para recuperação de solvente – Tabela 1.

**TABELA 1 – Detalhamento do fracionamento da “combinação 8” por cromatografia em coluna.**

<b>Frações</b>	<b>Eluente</b>	<b>Concentração (%)</b>	<b>Volume de cada fração (mL)</b>
<b>1-5</b>	Hexano	100	100
<b>6-11</b>	Hexano/Clorofórmio	80:20	100
<b>12-15</b>	Hexano/Clorofórmio	60:40	200
<b>16-21</b>	Hexano/Clorofórmio	40:60	200
<b>22-27</b>	Hexano/Clorofórmio	20:80	200
<b>28-70</b>	Clorofórmio	100	250
<b>71-114</b>	Clorofórmio/Metanol	95:5	250
<b>115-184</b>	Clorofórmio/Metanol	85:15	250
<b>185-186</b>	Metanol	100	250

Após análise por CCD, estas frações foram agrupadas, obtendo-se 40 combinações – Tabela 2 (p. 19). O perfil cromatográfico, o aspecto visual e a massa de cada combinação foram aspectos considerados para a escolha das etapas subsequentes.

**TABELA 2 – Combinações realizadas a partir das 186 frações provenientes da cromatografia em coluna da “combinação 8”.**

<b>Combinação</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>	<b>Combinação</b>	<b>Frações</b>	<b>Massa (mg)</b>
<b>01</b>	38 - 40	93,4	<b>21</b>	116 - 121	252,7
<b>02</b>	41 - 45	82,9	<b>22</b>	122 - 133	74,3
<b>03</b>	46	5,4	<b>23</b>	134 - 135	28,9
<b>04</b>	47 - 48	24,2	<b>24</b>	136	10,8
<b>05</b>	49	13,6	<b>25</b>	137	3,5
<b>06</b>	50 - 52	15,1	<b>26</b>	138 - 146	19,5
<b>07</b>	53	2,3	<b>27</b>	147 - 148	10,1
<b>08</b>	54	1,8	<b>28</b>	149 - 150	5,5
<b>09</b>	55 - 61	7,3	<b>29</b>	151 - 157	12,8
<b>10</b>	62 - 73	24,0	<b>30</b>	158 - 159	13,6
<b>11</b>	74	1159,9	<b>31</b>	160	3,4
<b>12</b>	75 - 81	655,8	<b>32</b>	161 - 165	10,0
<b>13</b>	82 - 84	157,3	<b>33</b>	166 - 167	16,0
<b>14</b>	85 - 86	300,2	<b>34</b>	168 - 171	15,4
<b>15</b>	87 - 88	204,9	<b>35</b>	172 - 174	5,1
<b>16</b>	89 - 90	56,1	<b>36</b>	175 - 178	3,7
<b>17</b>	91 - 97	148,2	<b>37</b>	179 - 180	9,5
<b>18</b>	98 - 100	13,7	<b>38</b>	181 - 183	3,2
<b>19</b>	101 - 110	58,4	<b>39</b>	184	3,3
<b>20</b>	111 - 115	5,4	<b>40</b>	185 - 186	20,7

A partir da combinação 11 (1159,9 mg) foram realizadas sucessivas separações em coluna cromatográfica empacotada com Sephadex LH-20 (15,0 g), utilizando metanol como fase móvel. Nestas etapas, as combinações das frações foram realizadas após análise por CCD com eluição em hexano-acetato de etila [60:40] e revelação com vapores de iodo. Na primeira CC, foram coletadas 21 frações, as quais foram combinadas em 5 grupos. A combinação 11.2 (882,7 mg) foi cromatografada em coluna, obtendo-se 16 frações, combinadas em 5 grupos. Em seguida, a combinação 11.2.3 foi submetida a CC, obtendo-se 15 frações, combinadas em 10 grupos. As combinações 11.2.3.3 (coluna A) e 11.2.3.4 (coluna B) foram submetidas a diferentes CC empacotadas com sílica gel. A coluna A foi empacotada com 8,2 g de sílica gel e a amostra foi eluída de maneira isocrática, utilizando-se hexano-acetato de etila [70:30] como fase móvel, obtendo-se 6,6 mg de um sólido amarelo. A coluna

B foi empacotada com 30,0 g de sílica gel e consistiu em uma eluição gradiente utilizando diferentes proporções da mistura de hexano-acetato de etila, onde, na proporção [85:15], obtiveram-se 44,8 mg de um sólido amarelo. Após análise espectroscópica de ambos os sólidos obtidos nas colunas A e B, verificou-se se tratar do mesmo composto, que foi nomeado **BM 1**.

A combinação 10 (24,0 mg) foi particionada, de acordo com a solubilidade parcial em metanol. A porção solúvel consistiu em um sólido marrom (18,8 mg), que foi nomeado **BM 2**.

A combinação 17 (148,2 mg) foi submetida a CC empacotada com Sephadex LH-20 (15,0 g), utilizando metanol como fase móvel. Foram coletadas 23 frações, as quais foram combinadas em 9 grupos, após análise por CCD com eluição em hexano-acetato de etila [50:50] e revelação com vapores de iodo. A combinação 17.5 (58,7 mg) foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), para o isolamento de substâncias. Para tanto, a amostra foi solubilizada em metanol UV/HPLC, na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. O sistema de eluição foi definido utilizando coluna analítica, a partir da injeção de 20 µL da solução, sendo este: 0,01-5,00 min 50% (B), 5,01-8,00 min 50-20% (B), 8,01-18,00 min 20% (B), 18,01-22,00 min 20-0% (B), 22,01-30,00 min 0% (B). As fases móveis utilizadas foram metanol UV/HPLC (solvente A) e água Milli-Q 0,1% em ácido fórmico (solvente B), com fluxo de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>. O cromatograma foi monitorado nos comprimentos de onda de 254 e 280 nm. Subsequentemente, utilizou-se coluna semi-preparativa, com o mesmo sistema de eluição, mas com fluxo de 2,840 mL.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas injeções de 400 a 500 µL de amostra, na mesma concentração, e foram coletadas frações. Esta análise resultou no isolamento de um sólido alaranjado (17,8 mg), nomeado **BM 3**.

A partir da combinação 21 (252,7 mg) foram realizadas duas separações em CC empacotada com Sephadex LH-20 (15,0 g), utilizando metanol como fase móvel. Nestas etapas, as combinações das frações foram realizadas após análise por CCD, com eluição em hexano-acetato de etila [20:80] e revelação com vapores de iodo. Na primeira CC, foram coletadas 26 frações, as quais foram combinadas em 9 grupos. A combinação 21.5 (64,4 mg) foi cromatografada, obtendo-se 18 frações, combinadas em 4 grupos. Em seguida, a combinação 21.5.3 foi submetida a CC empacotada com sílica gel (10,6 g). A amostra foi eluída de maneira isocrática, utilizando-se hexano-acetato de etila [50:50] como fase móvel. Obtiveram-se 16 frações, combinadas em 10 grupos após análise por CCD, com eluição em hexano-acetato de etila [30:70] e revelação com vapores de iodo. A combinação 21.5.3.3 (20,7 mg) foi analisada por HPLC, para o isolamento de substâncias. Para tanto, a amostra foi solubilizada em metanol UV/HPLC, na concentração de 5 mg.mL<sup>-1</sup>. O sistema de eluição foi definido utilizando coluna analítica, a partir da injeção de 20 µL da solução, sendo este: 0,01-

3,00 min 40% (B), 3,01-8,00 min 40-30% (B); 8,01-18,00 min 30-20% (B), 18,01-22,00 min 20% (B), 22,01-26,00 min 20-0% (B) 26,01-34,00 min 0% (B). As fases móveis utilizadas foram metanol UV/HPLC (solvente A) e água Milli-Q 0,1% em ácido fórmico (solvente B), com fluxo de 0,6 mg.mL<sup>-1</sup>. O cromatograma foi monitorado nos comprimentos de onda de 254 e 280 nm. Subsequentemente, utilizou-se coluna semi-preparativa, com o mesmo sistema de eluição, mas com fluxo de 2,840 mL.min<sup>-1</sup>. Foram realizadas injeções de 300 µL de amostra, na mesma concentração, e foram coletadas frações. Esta análise resultou no isolamento de um sólido alaranjado (7,3 mg), nomeado **BM 4**.

As separações e análises por HPLC foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do DQ/UFMG. Os cromatogramas foram obtidos a partir de processamento dos dados no *software* LCsolution.

O procedimento do isolamento de substâncias a partir do extrato etanólico de raízes da variedade **IZ 40** de *M. alba* é esquematizado na Figura 9 (p. 22).

### 3.3.3 Caracterização espectrométrica dos compostos isolados

Os compostos isolados tiveram seus pontos de fusão determinados, e foram submetidos à análise espectroscópica por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM) para caracterização estrutural.

Os experimentos de RMN consistiram em experimentos unidimensionais (<sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e DEPT-135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), na frequência de 400 e 100 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente. Estes foram realizados no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do DQ/UFMG, e os espectros foram processados no *software* MestReNova.

Os experimentos de EM foram realizados em espectrômetro de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) para os compostos **BM 1** e **BM 2**, e com ionização por *electrospray* (ESI-MS) para os compostos **BM 3** e **BM 4**. As análises foram realizadas no laboratório 167 do DQ/UFMG, pelos mestres Hebert Vinicius Pereira e Lucas Pinto da Silva. Os espectros foram processados no *software* Xcalibur e disponibilizados para análise.

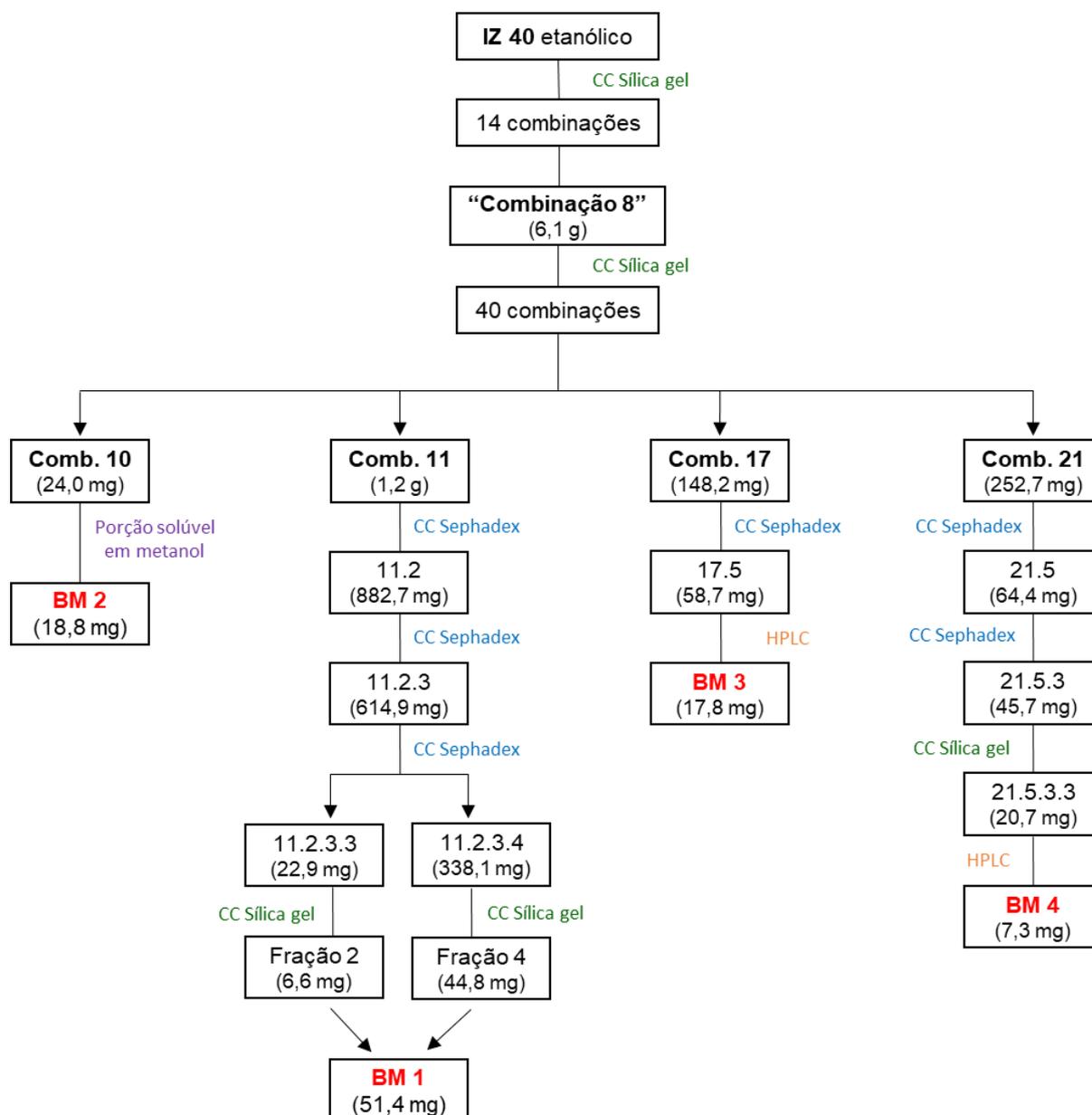


FIGURA 9 – Esquema do isolamento de substâncias a partir do extrato etanólico de raízes da variedade IZ 40 de *M. alba*.

### 3.3.4 Quantificação dos compostos isolados

As quatro substâncias isoladas tiveram seus teores determinados em relação aos seis extratos etanólicos de raízes de *M. alba*, por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC). Este experimento foi realizado no Laboratório de Cromatografia do DQ/UFMG. Os

cromatogramas e os registros das áreas dos picos foram obtidos a partir de processamento dos dados no *software* LCsolution.

Inicialmente, foram preparadas as soluções dos extratos na concentração de 2,0 mg.mL<sup>-1</sup> e das amostras (padrões) na concentração 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, todas solubilizadas em metanol UV/HPLC e devidamente filtradas com filtro de seringa de 0,45 µm. Foram realizadas injeções preliminares da solução do extrato **IZ 40** e das soluções dos padrões, com o intuito de identificar os picos correspondentes aos padrões e otimizar as condições de análise de forma a garantir uma boa separação dos mesmos. Desta maneira, foram ajustados os parâmetros de análise, sendo apresentados no Quadro 1.

**QUADRO 1 – Método cromatográfico para quantificação das amostras por UFLC.**

<b>Parâmetros</b>	<b>Condições cromatográficas</b>
<b>Fases móveis</b>	Água Milli-Q acidificada - 0,1% ácido fórmico (A) / Metanol UV/HPLC (B)
<b>Volume de injeção</b>	10 µL
<b>Fluxo</b>	0,850 mL.min <sup>-1</sup>
<b>Comprimentos de onda</b>	254 / 280 nm
<b>Temperatura do forno de coluna</b>	29 °C
<b>Gradiente</b>	0,01-4,00 min, 70% (B); 4,01-20,00 min, 70-100% (B); 20,01-35,00 min, 100% (B).

As soluções dos extratos foram injetadas nestas condições e as áreas dos picos referentes à cada amostra padrão foram registradas, no comprimento de onda no qual os mesmos apresentaram maior intensidade (254 nm para **BM 1**, **BM 3** e **BM 4**; 280 nm para **BM 2**). Este procedimento foi realizado três vezes.

Em seguida, foram preparadas soluções estoques dos padrões na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> em metanol UV/HPLC. A partir destas soluções, foram preparadas soluções de calibração com diluições em 3, 4, 6, 10, 15, 20, 40 e 120 vezes (concentrações de 0,33, 0,25, 0,17, 0,10, 0,07, 0,05, 0,03 e 0,01 mg.mL<sup>-1</sup>, respectivamente). Estas soluções foram injetadas e as áreas dos picos referentes à cada amostra padrão foram registradas, no comprimento de onda mais adequado para cada. Este procedimento foi realizado três vezes.

A partir da equação da reta obtida pela curva concentração *versus* média das áreas dos padrões, substituiu-se na variável “y” a média das áreas dos picos de cada amostra

padrão em cada extrato, obtendo-se as concentrações dos padrões nos extratos. A partir das massas iniciais dos extratos e volumes de solvente utilizados, obtiveram-se valores referentes às massas dos padrões em cada extrato e, assim, o teor (% m/m) dos mesmos. Estes resultados foram calculados com a utilização do *software* Microsoft Excel®.

#### **3.3.4.1 Análise estatística**

Os teores dos compostos isolados foram correlacionados com a atividade antioxidante dos extratos determinada previamente no trabalho de Sande *et al.* (2016), por cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) com  $P \leq 0,05$  (intervalo de confiança de 95%). Análise realizada com a utilização do *software* GraphPad Prism 5.02.

### **3.3.5 Bioensaios**

#### **3.3.5.1 Atividade antioxidante**

As substâncias isoladas foram submetidas a análise por diferentes mecanismos antioxidantes, anteriormente apresentados e discutidos (item 2.3.1, p. 10-12). Estes ensaios são: atividade antioxidante total, poder redutor férrico, sequestro de radicais ABTS e sequestro de radicais DPPH. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata e os resultados calculados com a utilização do *software* Microsoft Excel®.

##### *3.3.5.1.1 Atividade antioxidante total (método do fosfomolibdênio)*

Para a realização deste ensaio utilizou-se a metodologia descrita por Prieto *et al.* (1999). As amostras foram solubilizadas em metanol na concentração de  $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ . Transferiu-se  $0,3 \text{ mL}$  das amostras para tubos de ensaio, adicionando  $3,0 \text{ mL}$  de solução reagente (ácido sulfúrico  $0,6 \text{ mol.L}^{-1}$ , fosfato bibásico de sódio  $28 \text{ mmol.L}^{-1}$ , molibdato de amônio  $4 \text{ mmol.L}^{-1}$ ). O conteúdo foi homogeneizado e incubado por  $90 \text{ min}$  a  $95 \text{ }^\circ\text{C}$  em estufa com controle de temperatura. O mesmo procedimento foi realizado para um branco, substituindo o volume de amostra pela mesma quantidade de solvente. Após arrefecimento à temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram lidas a  $695 \text{ nm}$ , em espectrofotômetro, contra o branco.

Uma curva de calibração do padrão ácido ascórbico foi preparada conforme mostrado na Tabela 3 e lida no mesmo comprimento de onda. Em posse da equação da reta de ácido ascórbico obtida da curva Absorbância (nm) *versus* Concentração (mmol.L<sup>-1</sup>), substituiu-se o “y” pelas absorbâncias das amostras. Dividindo a média das concentrações obtidas pelas massas de amostra, obtiveram-se os resultados expressos em termos de equivalentes de ácido ascórbico (mmol de ácido ascórbico.g<sup>-1</sup> amostra).

**TABELA 3 – Curva de calibração do padrão ácido ascórbico.**

Pontos	Massa (µg)	Concentração (µg.mL <sup>-1</sup> )	Concentração (mmol.L <sup>-1</sup> )	Volume de padrão (µL)	Volume de água (µL)
1	5,0	16,6	0,094	10,0	290,0
2	15,0	50,0	0,282	30,0	270,0
3	30,0	100,0	0,564	60,0	240,0
4	60,0	200,0	1,128	120,0	120,0
5	90,0	300,0	1,692	180,0	120,0
6	105,0	350,0	1,974	210,0	90,0

#### 3.3.5.1.2 Poder redutor férrico (método do ferrocianeto)

A capacidade antioxidante de reduzir íons ferro (III) foi avaliada seguindo a metodologia de Oyaizu *et al.* (1986) *apud* Chang *et al.* (2011). Em tubos Falcon, foram adicionados 1,0 mL de amostra / padrão de ácido ascórbico (0,5 mg.mL<sup>-1</sup>) a 2,5 mL de tampão fosfato (fosfato bibásico de sódio, 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,6) e 2,5 mL de ferrocianeto de potássio 1% (m/v). Homogeneizaram-se as misturas e, em seguida, foram incubadas por 20 min a 50 °C em *shaker*. Subsequentemente, foram adicionados 2,5 mL de ácido tricloroacético 10% (p/v) e a mistura foi centrifugada a 3000 rpm por 10 min. Uma alíquota do sobrenadante (2,5 mL) foi coletada e misturada a 2,5 mL de água destilada e 0,5 mL de cloreto férrico 0,1% (p/v). O mesmo procedimento foi realizado para um branco, substituindo o volume de amostra pela mesma quantidade de solvente. Realizou-se a leitura de absorbância das soluções das amostras a 700 nm, em espectrofotômetro, contra o branco.

Em posse das absorbâncias, calculou-se média e desvio padrão. Os resultados foram convertidos em % de poder redutor férrico comparado ao padrão, ácido ascórbico.

### 3.3.5.1.3 Capacidade antioxidante de sequestro de radicais ABTS

A avaliação de atividade de captura de radicais 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico] (ABTS) seguiu a metodologia de Johnstone *et al.* (2006), adaptada para microplacas.

A preparação da solução ABTS consistiu na mistura de solução ABTS 7 mmol.L<sup>-1</sup> em metanol (0,384 mL para 100 mL) com solução de persulfato de potássio 2,4 mmol.L<sup>-1</sup> em água (0,014 g para 25 mL). Esta mistura foi incubada por 12 h, no escuro. A solução foi padronizada antes de sua utilização, com diluição em metanol até atingir uma absorbância de  $0,9 \pm 0,05$  a 734 nm.

Em seguida, 160 µL dessa solução foram colocados para reagir com 40 µL das amostras em diferentes concentrações (10,0-300,0 µg.mL<sup>-1</sup> para **BM 1**; 10,0-100,0 µg.mL<sup>-1</sup> para **BM 2**, **BM 3** e **BM 4**) em placa de micropoços, por 2 min. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, substituindo o volume de amostra pela mesma quantidade de metanol, e para o padrão de ácido ascórbico (3,75-12,5 µg.mL<sup>-1</sup>). As leituras das absorbâncias foram aferidas a 734 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas.

Em posse das absorbâncias, calculou-se a média e o desvio padrão. Em seguida, foram calculadas as porcentagens de inibição com utilização da Equação 1, onde  $A_b$  é a absorbância média do branco e  $A_a$  é a absorbância média da amostra/padrão.

$$\% I = \frac{(A_b - A_a)}{A_b} \times 100 \quad (1)$$

Desta forma, foram geradas curvas de Concentração *versus* % Inibição, possibilitando a expressão da atividade antioxidante em termos de EC<sub>50</sub>, ou seja, a concentração de extrato eficiente na captura de 50% dos radicais livres em solução.

### 3.3.5.1.4 Capacidade antioxidante de sequestro de radicais DPPH

O método de captura de radicais 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) seguiu a metodologia de Brand-Williams *et al.* (1995), com modificações. Consistiu em misturar 25 µL das amostras em diferentes concentrações (15,0-500,0 µg.mL<sup>-1</sup>) com 175 µL de solução de DPPH 0,1 mmol.L<sup>-1</sup> (0,0099 g para 250 mL de metanol), em placa de micropoços. Após agitação suave, as placas foram incubadas por 30 min, no escuro. O mesmo procedimento foi realizado para o branco, substituindo o volume de amostra pela mesma quantidade de

metanol, e para o padrão de ácido ascórbico (7,5-250,0 µg.mL<sup>-1</sup>). As leituras das absorbâncias foram aferidas a 492 nm (SHIKANGA *et al.*, 2010) em espectrofotômetro leitor de microplacas.

Em posse das absorbâncias, calculou-se a média e o desvio padrão. Em seguida, foram calculadas as porcentagens de inibição com utilização da Equação 1 (p. 26). Foram geradas curvas de Concentração *versus* % Inibição, possibilitando a expressão da atividade antioxidante em termos de EC<sub>50</sub>.

### 3.3.5.2 Atividade inibitória de acetilcolinesterase

O ensaio de inibição da acetilcolinesterase (AChE) foi realizado segundo metodologia descrita por Ellman *et al.* (1961), com modificações. Foram analisados os produtos isolados e os extratos etanólicos das seis variedades de raízes de *M. alba*, todos na concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup>, em dimetilsulfóxido (DMSO), assim como a enzima eserina, inibidora padrão de AChE.

Em microplacas de 96 poços foram adicionados aos poços 50 µL de tampão de tris hidrocloreto - Tris/HCl (50 mM, pH 8,0), 125 µL de ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico) - DTNB (3 mM em tampão Tris/HCl, contendo cloreto de sódio 0,1 M e cloreto de magnésio 20 mM), 25 µL de amostra e 25 µL de iodeto de acetiltiocolina - ATCI (15 mM). Utilizou-se ainda o emulsificante Tween 80, equivalente a 5% do volume de cada poço. O mesmo procedimento foi realizado para o controle negativo, substituindo a amostra pelo mesmo volume de DMSO, e para o inibidor padrão eserina (1,0 mg.mL<sup>-1</sup> em DMSO).

As absorbâncias foram medidas a 405 nm em espectrofotômetro leitor de microplacas, com intervalos de 1 min por oito vezes. Subsequentemente, adicionaram-se nos poços 25 µL de solução da enzima acetilcolinesterase (0,22 U.mL<sup>-1</sup> em tampão Tris/HCl, contendo albumina sérica bovina 0,1% (p/v)). Foi realizada nova leitura das absorbâncias, com intervalos de 1 min por dez vezes.

Em posse dos valores de absorbância, calculou-se a porcentagem de inibição da acetilcolinesterase a partir da Equação 2, onde: A<sub>1E</sub> é a absorbância da amostra com enzima, A<sub>1SE</sub> é a absorbância da amostra sem enzima, A<sub>2E</sub> é a absorbância do controle negativo com enzima e A<sub>2SE</sub> é a absorbância do controle negativo sem enzima.

$$\% I = 100 - \frac{A_{1E} - A_{1SE}}{A_{2E} - A_{2SE}} \times 100 \quad (2)$$

Neste ensaio, cada amostra foi analisada em quintuplicata, e os resultados calculados com a utilização do *software* Microsoft Excel®.

### 3.3.5.3 Capacidade neuroprotetora

O efeito neuroprotetor do extrato etanólico da variedade **IZ 40** e do composto **BM 1** foi avaliado, em modelo experimental *in vivo*, em lesões neurológicas induzidas por rotenona em moscas *Drosophila melanogaster*, seguindo metodologia de Jiménez e colaboradores (2017), com modificações. As moscas utilizadas foram criadas em temperatura ambiente, a partir de cepas cedidas pelo Dr. João Trindade Marques, do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG.

*D. melanogaster* machos e fêmeas, em um total de quinze para cada sexo, foram transferidas para frascos com 50,0 mL de alimento (mistura de banana prata – *Musa paradisíaca* –, levedura *Saccharomyces cerevisiae*, agar bacteriológico, Nistatina, ácido propiônico e água destilada) cada, e mantidas à temperatura ambiente. No oitavo dia, foram removidas dos frascos, remanescendo as larvas. Após 48 h do início da eclosão, as novas moscas foram transferidas para outros frascos com alimento, já estando prontas para o ensaio.

Primeiramente, foi realizado um teste para definição da concentração de amostra ideal para a realização do ensaio. Para tanto, as moscas foram imobilizadas temporariamente com éter etílico, para a seleção das moscas machos. Estas foram transferidas para outros frascos com alimento (20,0 mL) misturado ao extrato **IZ 40** (0,6 mL) nas concentrações de 5,0, 10,0 e 20,0 mg.mL<sup>-1</sup> (0,05, 0,1 e 0,2 %, respectivamente), em água destilada. Cada concentração foi avaliada em triplicata. As moscas machos (dez por frasco) foram mantidas nestes frascos durante 7 dias. Após, foi realizado o teste de geotaxis negativa, onde observa-se a tendência das moscas de se dirigirem contra a gravidade. O teste consistiu na transferência das moscas para tubos tipo Falcon de 50,0 mL e na aplicação de três golpes contra uma superfície sólida, por cinco vezes. A cada sequência de golpes, foram tiradas 10 fotos sequenciais, e a sexta foto de cada sequência foi utilizada para observação do número de moscas que atingiu a metade da altura do recipiente, com subsequente cálculo da média. Esta média foi utilizada como parâmetro de comparação entre os ensaios. Com base nas observações experimentais (médias de moscas atingindo a altura mínima determinada) e análise estatística, escolheu-se a concentração de amostra ideal para trabalho.

Realizou-se o ensaio de neuroproteção do extrato **IZ 40** na concentração escolhida. Para tanto, 90 moscas machos foram separadas e acondicionadas em nove frascos (dez por frasco), nos quais: três frascos continham apenas o alimento (controle); três continham alimento e o extrato (600,0 µL); e três continham alimento e rotenona (100,0 µL) na concentração de 100,0 mg.mL<sup>-1</sup>. Após 7 dias, as moscas que estavam no frasco contendo alimento e extrato foram transferidas para outro frasco contendo alimento e rotenona; e as moscas que estavam no frasco contendo alimento e rotenona foram transferidas para outro

frasco contendo alimento e extrato. Esta interação foi mantida por mais 7 dias. Passados os 15 dias totais, realizou-se a geotaxis negativa, registrando os resultados observados.

O mesmo procedimento foi realizado para análise da capacidade neuroprotetora do composto **BM 1**, na mesma concentração definida para o extrato **IZ 40**.

Comparando estatisticamente as médias dos números de moscas que atingiram metade da altura dos tubos após os golpes, nos frascos controles, nos frascos onde as moscas foram submetidas primeiramente à amostra de interesse e depois à rotenona, e nos frascos onde as moscas foram submetidas primeiramente à rotenona e depois à amostra de interesse, pôde-se avaliar a capacidade neuroprotetora destas amostras.

#### **3.3.5.4 Análise estatística**

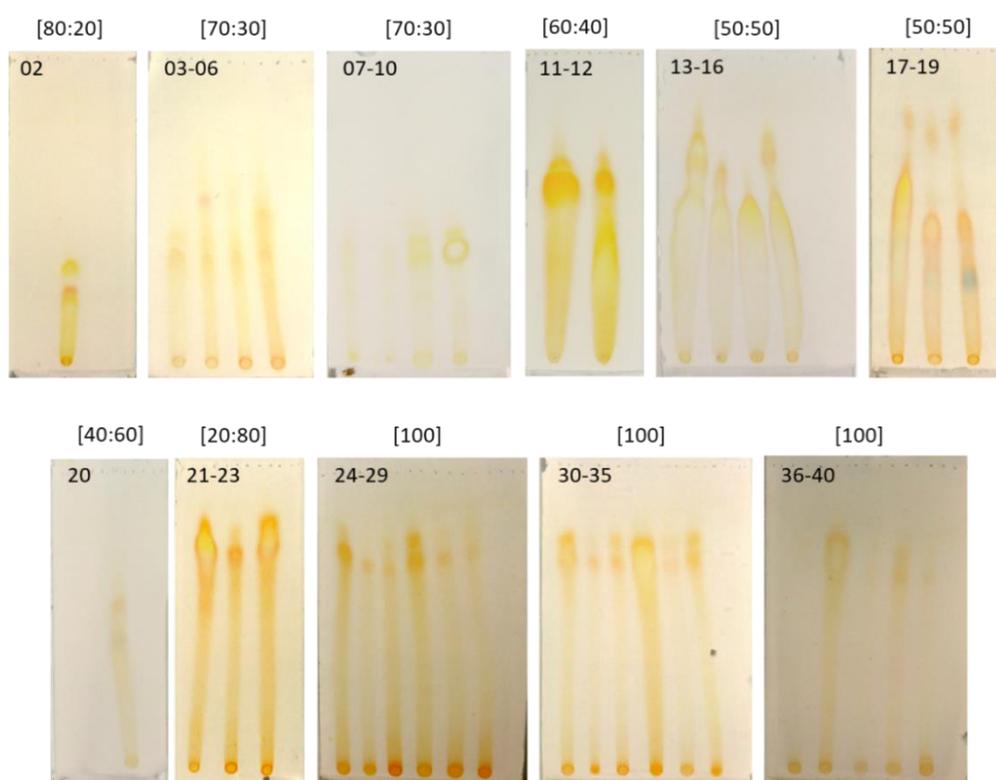
Os resultados obtidos nos ensaios de atividade antioxidante, inibição de acetilcolinesterase e avaliação de capacidade neuroprotetora foram submetidos à análise de variância ANOVA (one-way) e teste Tukey de comparação múltipla com  $P < 0,05$  (intervalo de confiança de 95%). Para inibição de AChE, também foram avaliadas possíveis correlações por cálculo do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) com  $P \leq 0,05$  (intervalo de confiança de 95%).

Todas estas análises foram realizadas com a utilização do *software* GraphPad Prism 5.02.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Isolamento de metabólitos secundários

Como descrito anteriormente (item 3.3.2, p. 18-22), o isolamento de metabólitos secundários a partir do extrato etanólico das raízes de variedade **IZ 40** de *M. aba* foi realizado a partir de técnicas cromatográficas clássicas (cromatografia em camada delgada e em coluna) e instrumental (cromatografia líquida). O perfil cromatográfico das frações combinadas 2-40, obtidas a partir da CC da “combinação 8” é apresentado na Figura 10 – eluição com diferentes proporções de hexano-acetato de etila e revelação com vapores de iodo.

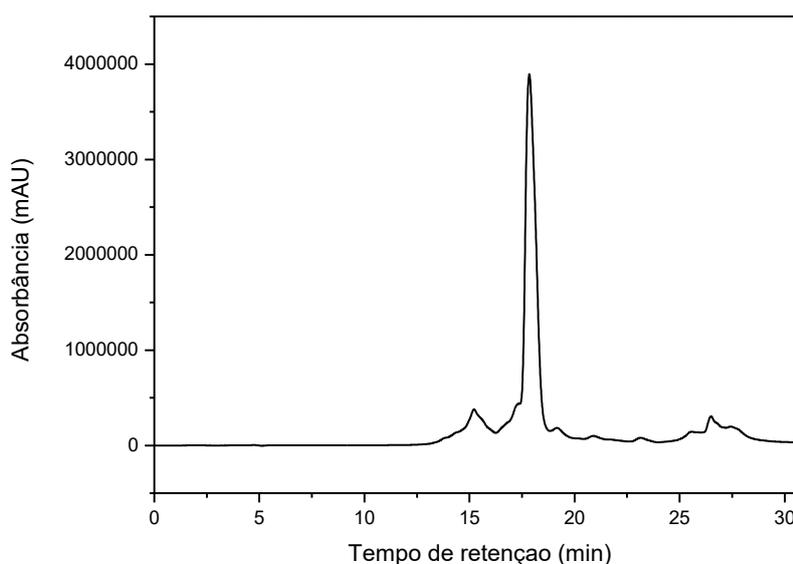


**FIGURA 10 – Cromatografia em camada delgada das frações combinadas 2-40.**

A cromatografia em coluna da combinação 11 resultou no isolamento do composto **BM 1**. A partição da combinação 10 pela solubilidade em metanol resultou no isolamento do composto **BM 2**.

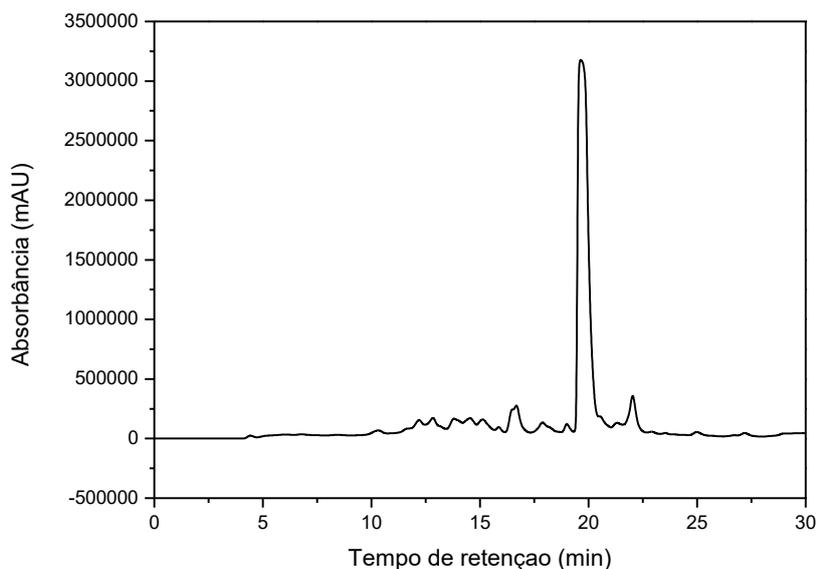
Após sucessivas cromatografias em coluna das combinações 17 e 21, verificou-se que os suportes cromatográficos utilizados não estavam sendo suficientemente eficientes na separação dos compostos. Com isso, podemos inferir que no meio haviam compostos de tamanhos semelhantes, não sendo separados por exclusão (em Sephadex), e de polaridades semelhantes, também não sendo separados por adsorção (em sílica gel). Dessa forma, deu-se continuidade à tentativa de purificação das frações analisando-as em HPLC preparativo, com a coleta de frações. Nos comprimentos de onda analisados, não foi notada diferença significativa no perfil dos cromatogramas, sendo escolhido 280 nm para trabalho.

A análise por cromatografia líquida da combinação denominada 17.5 (Figura 9, p. 22) resultou no cromatograma apresentado na Figura 11. Foi coletada a solução referente ao momento da detecção do pico mais intenso, com tempo de retenção em 17,84 min, que viria a corresponder ao composto **BM 3**.



**FIGURA 11 – Cromatograma da fração 17.5, com detecção a 280 nm.**

A análise por cromatografia líquida da combinação denominada 21.5.3.3 (Figura 9, p. 22) resultou no cromatograma apresentado na Figura 12 (p. 32). Foi coletada a solução referente ao momento da detecção do pico mais intenso, com tempo de retenção em 19,65 min, que viria a corresponder ao composto **BM 4**.



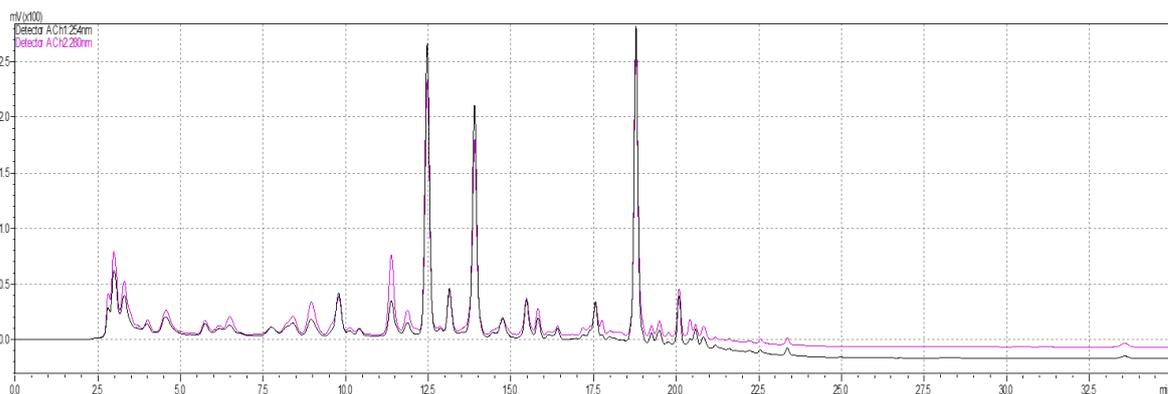
**FIGURA 12 – Cromatograma da fração 21.5.3.3, com detecção a 280 nm.**

#### **4.2 Análise dos extratos por HPLC e quantificação dos compostos isolados**

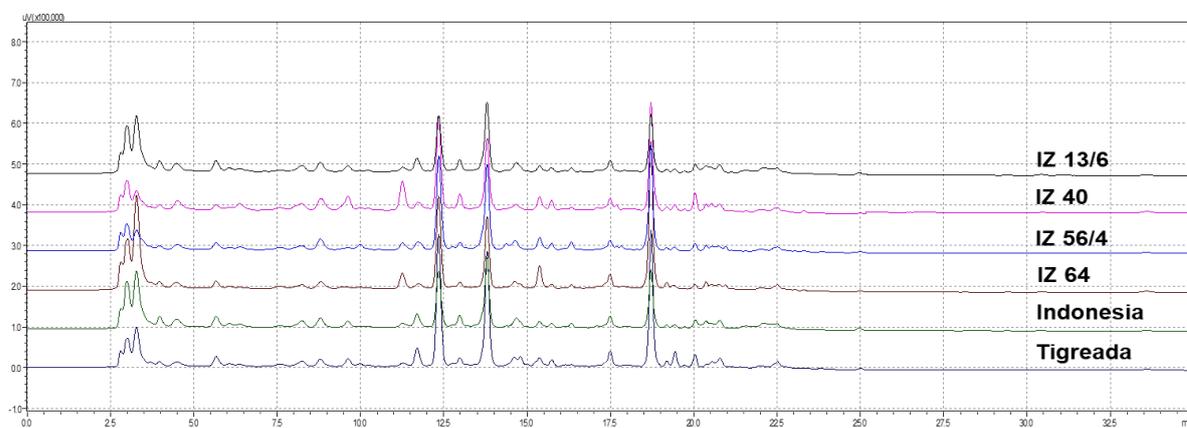
Os quatro compostos isolados a partir do extrato etanólico das raízes da variedade **IZ 40** de *M. alba* foram analisados por cromatografia líquida com o intuito de determinar os seus teores no extrato de origem (Figura 13, p. 33) e nos extratos das demais variedades (**IZ 13/6, IZ 56/4, IZ 64, Indonésia e Tigreada**).

Para tanto, os seis extratos etanólicos foram analisados primeiramente, conforme descrito no item 3.3.4 (p. 22-24). Obtiveram-se os cromatogramas *fingerprint* (impressão digital) dos extratos (Figura 14, p. 33), onde cada pico cromatográfico representa um composto separado. A partir dos mesmos, pode-se observar um perfil cromatográfico semelhante para as seis variedades, com variações nas intensidades de alguns picos.

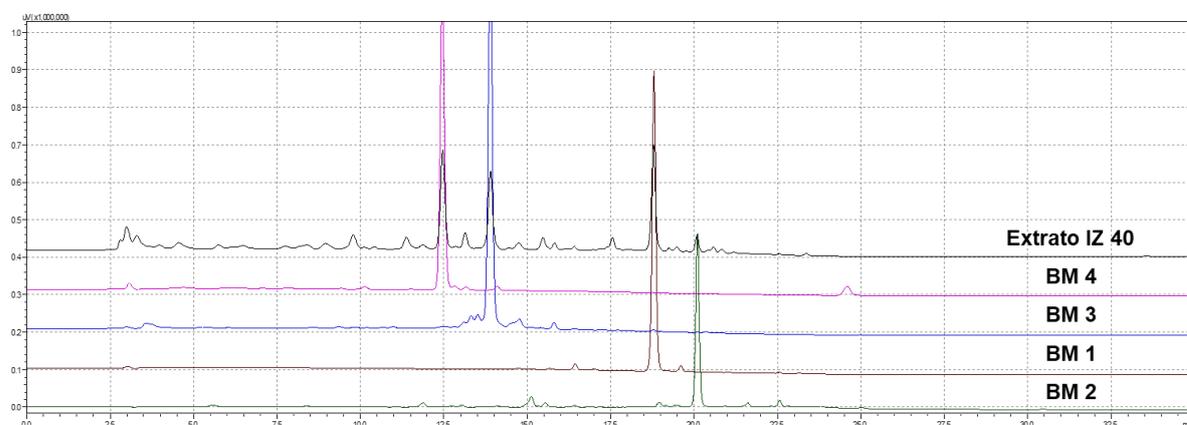
Com a análise das soluções dos compostos isolados, nas mesmas condições cromatográficas, e subsequente sobreposição aos cromatogramas dos extratos, identificaram-se os picos correspondentes aos compostos na matriz dos extratos. Estes picos são indicados no cromatograma da Figura 15 (p. 33).



**FIGURA 13 – Cromatograma para o extrato da variedade IZ 40, com detecção em dois comprimentos de onda, 254 e 280 nm.**



**FIGURA 14 – Cromatogramas dos extratos etanólicos das raízes das seis variedades de *M. alba* (detecção a 280 nm).**



**FIGURA 15 – Cromatogramas do extrato IZ 40 e dos compostos BM 1, BM 2, BM 3 e BM 4 (detecção a 254 nm, exceto BM 2 a 280 nm).**

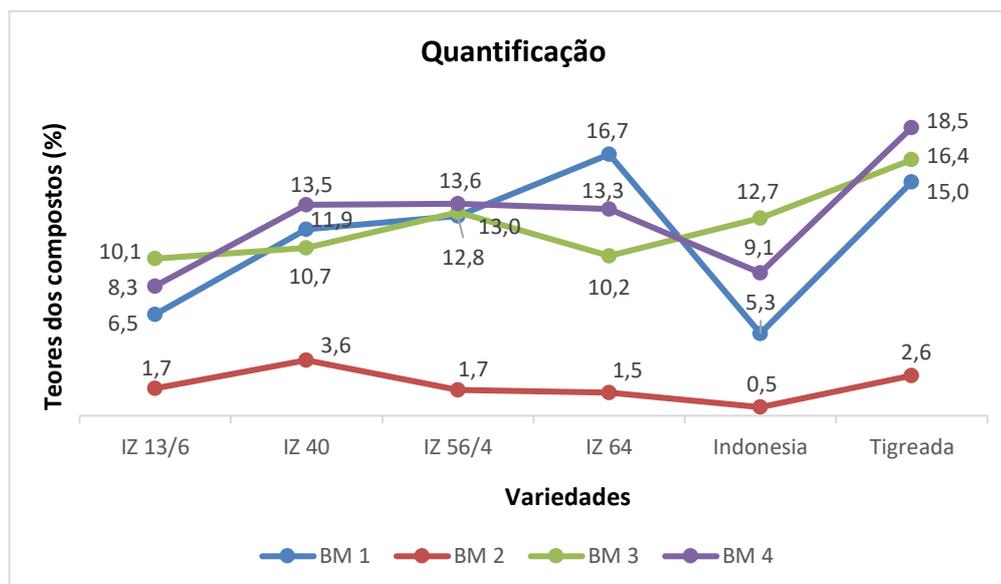
Observando os cromatogramas da Figura 15 (p. 33), verifica-se primeiramente que os quatro compostos estão presentes, não apenas no extrato **IZ 40** de onde foram isolados, mas em todos os extratos estudados. Além disso, os picos dos compostos **BM 1**, **BM 3** e **BM 4** referem-se aos picos mais intensos observados, indicando que os mesmos são compostos majoritários nos extratos e podem ser considerados marcadores químicos dessas amostras. **BM 2** está presente em menor quantidade em relação aos demais compostos.

Outra informação obtida a partir da observação dos cromatogramas da Figura 15 (p. 33) é acerca da polaridade relativa dos compostos. A análise foi realizada em uma coluna C18 de fase reversa, ou seja, empacotada com uma fase estacionária contendo cadeias alquil ligadas à superfície da sílica, que fazem com que a mesma apresente natureza menos polar (MALDANER & JARDIM, 2009). Isto sugere que substâncias de menor polaridade ficam mais tempo retidas na fase estacionária da coluna e, assim, são detectadas com um maior tempo de eluição. Dessa forma, uma provável ordem de polaridade seria: **BM 4** > **BM 3** > **BM 1** > **BM 2**.

A determinação quantitativa dos teores dos compostos foi realizada com base nos princípios da lei da absorção, ou lei de Lambert-Beer. As áreas ou as intensidades dos picos obtidos após passagem do analito pelo detector UV, em um determinado instante da análise, podem ser relacionadas com a concentração da substância que está absorvendo naquele comprimento de onda. Para tanto, os compostos devem obedecer a lei de Beer e, ao se construir uma curva analítica com uma série de soluções padrões do analito, obtém-se uma reta de calibração e uma equação linear por regressão (SKOOG *et al.*, 2006).

Desta forma, os teores dos compostos foram determinados para **BM 1** ( $r^2 = 0,9999$ ), **BM 2** ( $r^2 = 0,9962$ ), **BM 3** ( $r^2 = 0,9982$ ) e **BM 4** ( $r^2 = 0,9997$ ), em relação aos extratos etanólicos das diferentes variedades de raízes de *M. alba* estudadas. Estes, expressos em porcentagem, são apresentados no gráfico da Figura 16 (p. 35). Para tanto, o registro das áreas dos picos referentes aos compostos foi realizado para a detecção em 254 nm, exceto para **BM 2**, em 280 nm. Estes comprimentos de onda foram escolhidos para cada composto com base na maior absorção apresentada para os mesmos dentre os comprimentos de onda testados, ou seja, quando melhor seguem a lei de Beer.

Confirma-se que o teor de **BM 2** nos extratos é menor que o dos demais compostos em todos os extratos (0,5-3,6%). De uma forma geral, **BM 3** (10,1-16,4%) e **BM 4** (8,3-18,5%) estão presentes em maiores quantidades nos extratos, com exceção do extrato da variedade **IZ 64**, onde **BM 1** (6,5-16,7%) é majoritário. O extrato do qual se originou o isolamento dos compostos, variedade **IZ 40**, apresenta em seu conteúdo 3,6% de **BM 2**, 10,7% de **BM 3**, 11,9% de **BM 1** e 13,5% de **BM 4**. O extrato da variedade natural **Tigreada** foi um dos que, de forma geral, apresentou maiores teores dos quatro compostos.



**FIGURA 16 – Teores dos compostos isolados (%) nos extratos etanólicos das variedades de raízes de *M. alba*.**

No trabalho de Sande e colaboradores (2016) estes e outros extratos de raízes de *M. alba* foram estudados em relação à sua atividade antioxidante. De posse desses resultados obtidos previamente, foram avaliadas possíveis correlações entre os teores dos compostos isolados com a atividade antioxidante observada nestes extratos, por meio do coeficiente de correlação de Pearson ( $r$ ) com  $P \leq 0,05$ .

Dentre as possibilidades, o composto **BM 1** apresentou correlação estatisticamente significativa do seu teor com a atividade antioxidante de quatro dos seis extratos estudados: **Indonesia**, **IZ 13/6**, **IZ 40** e **IZ 64**. Uma correlação negativa ocorre com a captura de radicais ABTS ( $r = -0,91$ ;  $r^2 = 0,83$ ) e DPPH ( $r = -0,97$ ;  $r^2 = 0,95$ ), pois sugere que uma menor quantidade de amostra implica em uma maior atividade; e uma correlação positiva com o ensaio de flavonoides totais ( $r = 0,92$ ;  $r^2 = 0,85$ ). Como pode ser observado na Tabela 4 (p. 36), conforme o teor de **BM 1** aumenta, a concentração de extrato necessária para captura de 50% dos radicais ABTS e DPPH diminuem, o que é de interesse. Da mesma forma, à medida que os teores aumentam, a concentração de extrato em termos de equivalentes de quercetina também aumentam. Isto indica que possivelmente **BM 1** se trata de um composto flavonoide, com ação pronunciada nos extratos em relação a outros compostos flavonoides presentes nas matrizes analisadas. Nestes casos, não foi observada correlação para os demais ensaios antioxidantes, provavelmente pelo diferente mecanismo de ação atuante, demonstrando a importância em se analisar determinada substância ou extrato frente a vários mecanismos antioxidantes.

**TABELA 4 – Correlações entre o teor de BM 1 nos extratos de *M. alba* e a atividade antioxidante dos mesmos.**

	Teor de BM 1 (% m/m)	ABTS* EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	DPPH* EC <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	Flavonoides* (µg <sub>quercetina</sub> .g <sup>-1</sup> <sub>extrato</sub> )
<b>Indonesia</b>	5,27	34,81	733,59	195,11
<b>IZ 13/6</b>	6,48	29,13	642,18	250,23
<b>IZ 40</b>	11,93	28,63	568,76	326,16
<b>IZ 64</b>	16,74	13,20	378,08	812,18
<b>r de Pearson</b>	-	-0,91	-0,97	0,92

\*Sande *et al.* (2016).

Desta forma, pode-se inferir que **BM 1** exibe certa co-responsabilidade na atividade antioxidante das raízes de *M. alba*, em um provável sinergismo com outras substâncias que também são bioativas, como será discutido a seguir no item 4.3.1.

Neste estudo observou-se que três dos quatro compostos isolados poderiam ser considerados marcadores químicos dos extratos analisados, ou seja, constituintes quimicamente definidos da matéria prima vegetal, que podem ser utilizados inclusive como referência para o controle de qualidade da amostra. Um marcador químico pode ser ou não um princípio ativo, ou seja, apresentar atividade terapêutica global em relação a um possível produto fitoterápico formulado (TAPPIN & LUCCHETTI, 2007; YANG *et al.*, 2017). Com o intuito de verificar se os compostos isolados poderiam ser considerados marcadores químicos bioativos, foram realizados alguns bioensaios, sendo os resultados apresentados e discutidos a seguir.

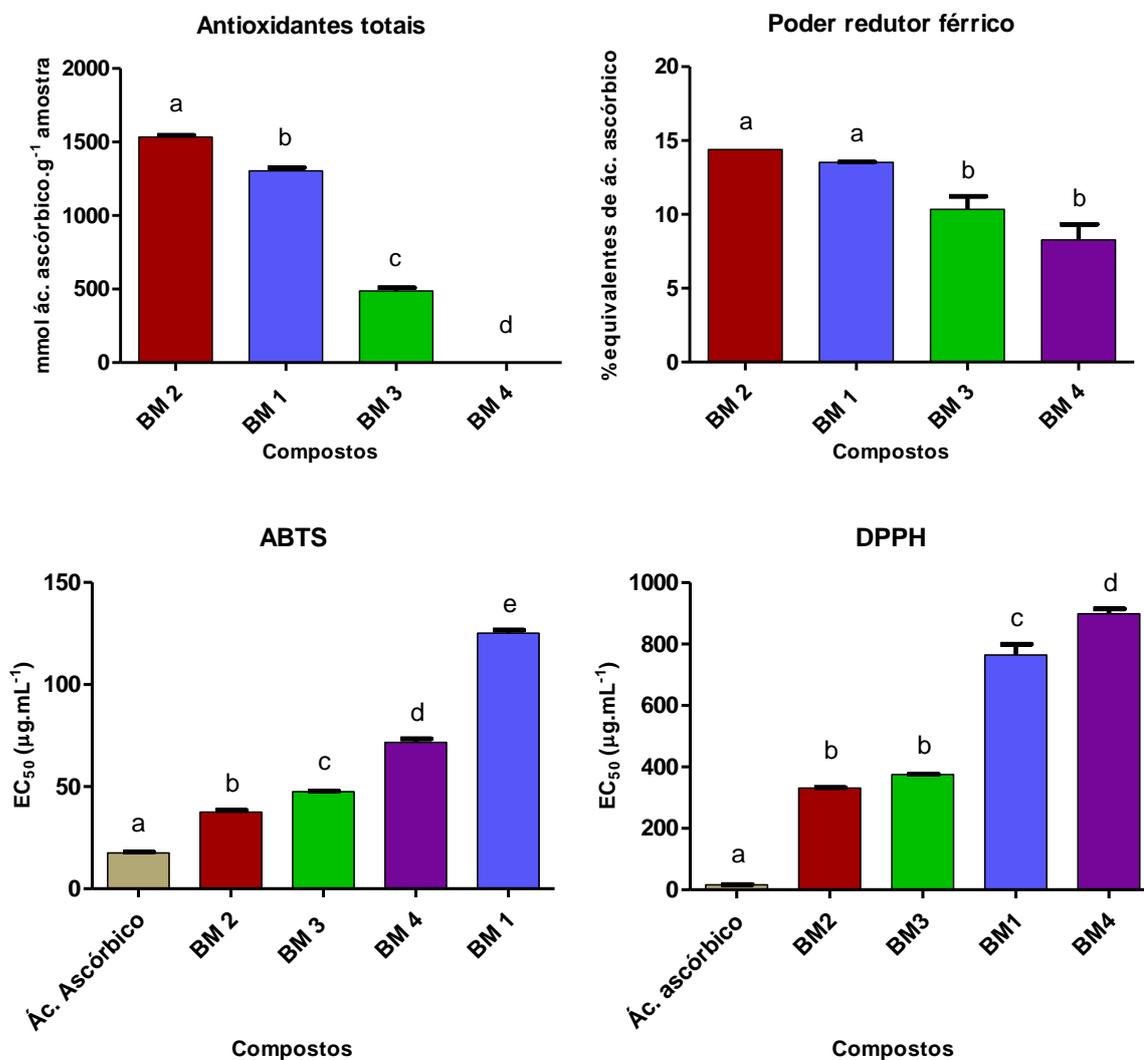
## 4.3 Bioensaios

### 4.3.1 Atividade antioxidante

Os resultados dos quatro ensaios de atividade antioxidante, realizados conforme item 3.3.5.1 (p. 24-27), são apresentados nos gráficos da Figura 17 (p. 37).

A análise de variância realizada para verificar se os compostos diferem entre si (ANOVA *one way*) em termos da atividade apresentada, mostrou em todos os ensaios que as amostras são significativamente diferentes no intervalo de confiança de 95%. Entretanto, a

comparação de médias dos pares (teste Tukey), no mesmo intervalo de confiança, mostrou no que se refere a captura de radicais DPPH que **BM 2 = BM 3** ( $r^2 = 0,99$ ) e, para o ensaio de poder redutor férrico, que **BM 2 = BM 1** e **BM 3 = BM 4** ( $r^2 = 0,87$ ). Para os demais ensaios, todos os pares são estatisticamente diferentes ( $P < 0,05$ ).



**FIGURA 17 – Atividade antioxidante dos compostos isolados. Barras com as mesmas letras não diferem significativamente pelo teste Tukey ( $P < 0,05$ ).**

A atividade antioxidante apresentada para os compostos a partir dos ensaios de poder redutor férrico e antioxidantes totais seguiu a seguinte ordem: **BM 2 > BM 1 > BM 3 > BM 4**. Analisando estatisticamente, verifica-se uma correlação positiva entre estes dois ensaios no intervalo de 95% ( $r = 0,9998$ ;  $r^2 = 0,9996$ ).

Já nos ensaios de captura de radicais livres ABTS e DPPH, **BM 2** e **BM 3** mostraram maior potencial em relação à **BM 1** e **BM 4**, ao apresentarem menor concentração

necessária para a captura de 50% dos radicais, uma vez que a eficiência destes ensaios é medida como inversamente proporcional aos valores de  $EC_{50}$ . Entretanto, não foi observada correlação significativa entre os dois ensaios e entre eles e os demais.

De maneira geral, a  $EC_{50}$  dos compostos obtida por captura de radicais ABTS mostrou-se baixa para todos, o que os torna interessantes como agentes antioxidantes. Já o ensaio de poder redutor férrico, por exemplo, revelou baixas porcentagens de equivalentes em ácido ascórbico para ambos, ou seja, estes possuem pouca eficiência de redução de íons férricos. Desta forma, novamente é ressaltada a importância em se analisar as substâncias por ensaios que apresentam diferentes mecanismos/protocolos antioxidantes de ação.

Apesar de **BM 2** não ser um dos compostos majoritários, dentre os quatro isolados e analisados, é o que apresenta atividade antioxidante mais pronunciada, em todas as metodologias testadas. Apresenta menor  $EC_{50}$  na captura dos radicais ABTS ( $37,6 \pm 1,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e DPPH ( $331,0 \pm 4,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e maior potencial como redutor férrico ( $14,4 \pm 0,0\%$ ) e como antioxidante total ( $1531,3 \pm 20,3 \text{ mmol ácido ascórbico.g}^{-1}$  composto) em termos de ácido ascórbico. Sugere-se que o mesmo seja muito eficiente e, que mesmo em baixas concentrações no extrato, deva ter considerável influência na atividade dos mesmos.

Este resultado mostra como a ação sinérgica entre substâncias atuando em conjunto pode influir na atividade final dos extratos, uma vez que os marcadores químicos neste caso não são exclusivamente os responsáveis pela atividade biológica dos extratos.

#### 4.3.2 Atividade inibitória de acetilcolinesterase

Os compostos isolados a partir do extrato de raízes da variedade **IZ 40** de *M. alba*, assim como os todos os demais extratos etanólicos, foram submetidos ao ensaio de atividade inibitória da enzima AChE conforme descrito no item 3.3.5.2. (p. 27). Os resultados obtidos para os mesmos são apresentados nas Figuras 18 e 19 (p. 39), respectivamente.

A análise de variância realizada (ANOVA *one way*) mostrou que, em termos da atividade inibitória de AChE, os compostos e extratos são significativamente diferentes no intervalo de confiança de 95%. O mesmo foi observado na comparação de médias dos pares (teste Tukey,  $P < 0,05$ ), no mesmo intervalo de confiança.

Embora os compostos e extratos analisados não apresentaram inibição próxima à do composto inibidor padrão da AChE, a enzima eserina ( $92,3 \pm 0,1\%$ ), os resultados obtidos são interessantes, sobretudo dos extratos, em virtude de consistirem em matrizes complexas, onde há interação de diversas substâncias.

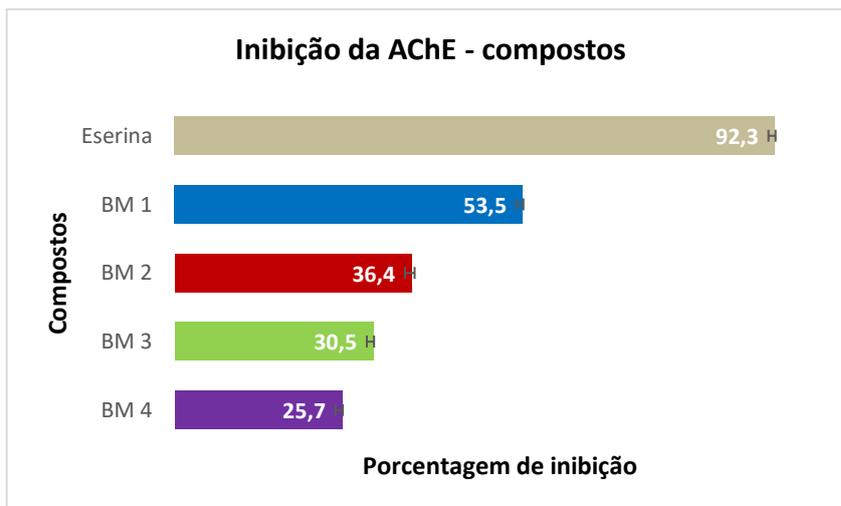


FIGURA 18 – Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos compostos isolados.

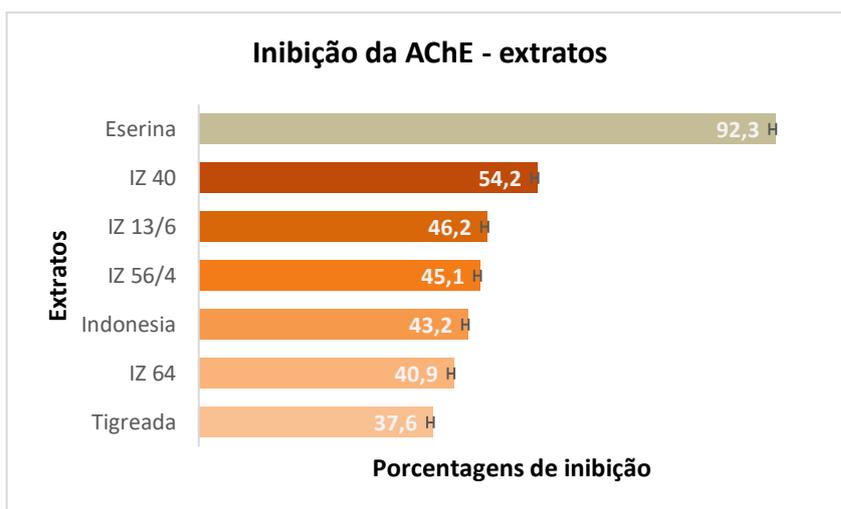


FIGURA 19 – Atividade inibitória da acetilcolinesterase dos extratos etanólicos de *M. alba*.

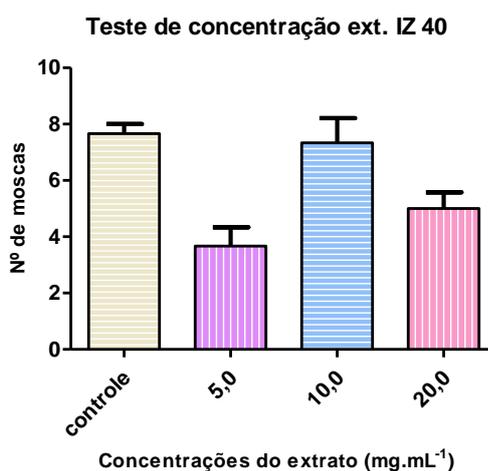
Dentre os compostos isolados, **BM 1** apresentou maior inibição da AChE ( $53,5 \pm 0,1\%$ ) e **BM 4** a menor ( $25,7 \pm 0,1\%$ ). Os extratos apresentaram atividades inibitórias próximas, com destaque para o extrato **IZ 40** ( $54,2 \pm 0,1\%$ ).

Não foi observada correlação evidente (Pearson ( $r$ ) com  $P \leq 0,05$ ), entre os teores de determinado composto isolado com a atividade inibitória de acetilcolinesterase dos extratos. Sugere-se assim um possível sinergismo entre estas e outras substâncias presentes nos extratos na promoção deste efeito.

### 4.3.3 Capacidade neuroprotetora

O extrato etanólico de raízes da variedade **IZ 40** de *M. alba* foi submetido ao ensaio de geotaxis negativa, tendência das moscas de se dirigirem contra a gravidade, para avaliação de sua capacidade neuroprotetora, conforme descrito no item 3.3.5.3. (p. 28-29). Consistiu em um modelo *in vivo* para o teste de possíveis compostos terapêuticos frente a mecanismos de neurodegeneração, mais especificamente, a proteção de moscas macho *D. melanogaster* contra lesões neurológicas induzidas pela toxina rotenona (LU & VOGEL, 2009).

Na etapa do teste para determinação da concentração de trabalho (Figura 20) as moscas foram expostas ao alimento com uma solução aquosa do extrato em diferentes concentrações e posteriormente ao alimento com a rotenona, realizando a determinação da geotaxis negativa.

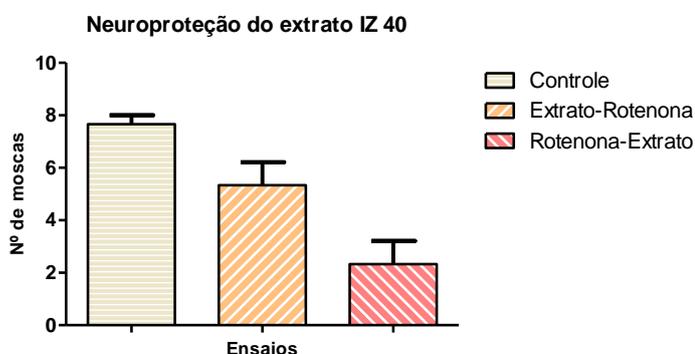


**FIGURA 20 – Geotaxis negativa de moscas *D. melanogaster* expostas a diferentes concentrações do extrato etanólico de raízes da variedade IZ 40 de *M. alba*.**

Observou-se, dentre as concentrações testadas, que com 10,0 mg.mL<sup>-1</sup> o extrato foi mais eficiente na neuroproteção das moscas. Nesta concentração, o número de moscas que conseguiram alcançar mais da metade da altura do recipiente foi mais próximo ao número observado nos frascos controle, onde nenhuma substância foi adicionada ao alimento. Na concentração de 5,0 mg.mL<sup>-1</sup> o extrato apresentou pouca atividade. E com o aumento da concentração para 20,0 mg.mL<sup>-1</sup>, houve decréscimo do número de moscas que atingiram a altura mínima em relação a 10,0 mg.mL<sup>-1</sup>, sugerindo que certa toxicidade foi atingida.

Em termos estatísticos, o controle e as diferentes concentrações são significativamente diferentes (ANOVA *one way*,  $r^2 = 0,77$ ). Porém, a comparação das médias do controle com as médias da concentração a  $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  e a  $20,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  não mostraram diferença significativa (teste Turkey,  $P < 0,05$ ). Dessa forma, optou-se por trabalhar com a menor concentração dentre elas ( $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

Seguindo o teste de neuroproteção com a concentração escolhida do extrato da variedade **IZ 40**, moscas machos foram expostas ao alimento com o extrato por sete dias e, posteriormente, ao alimento com a rotenona por mais sete dias. Paralelamente, outro ensaio foi realizado com ordem de exposição inversa. Realizando a geotaxis negativa para ambos os ensaios, obtiveram-se os resultados apresentados no gráfico da Figura 21.

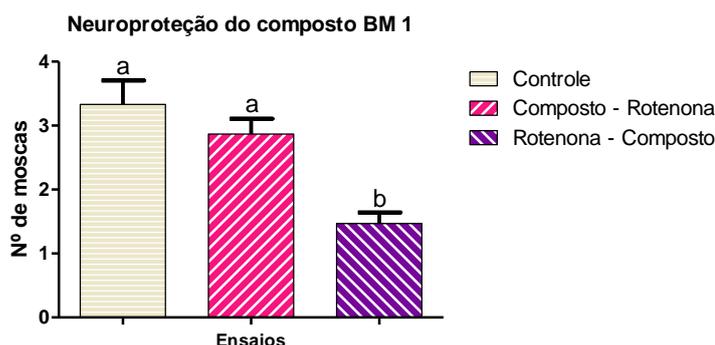


**FIGURA 21** – Geotaxis negativa de moscas *D. melanogaster* expostas primeiramente ao extrato IZ 40 ( $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e em seguida a rotenona ( $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), e vice-versa.

Em termos estatísticos, o controle e os outros dois parâmetros analisados são significativamente diferentes (ANOVA *one way*,  $r^2 = 0,81$ ). Porém, na comparação entre os pares, não foi apresentada diferença significativa (teste Turkey,  $P < 0,05$ ).

Entretanto, observou-se que as moscas que foram expostas primeiramente ao extrato apresentaram maior resistência à toxicidade da rotenona do que aquelas expostas à rotenona primeiramente. Além disso, para o segundo caso, as moscas sobreviventes apresentaram padrão confuso de voo, conseguindo girar, mas sem se deslocar do local onde estavam. Desta forma, verificou-se certa atividade neuroprotetora deste extrato.

O composto **BM 1**, como uma solução aquosa a  $10,0 \text{ mg.mL}^{-1}$ , também foi analisado quanto a sua capacidade neuroprotetora, em ensaios realizados semelhantemente ao descrito para o extrato **IZ 40**. Realizando a geotaxis negativa para os frascos controle e frascos de exposição às substâncias, obtiveram-se os resultados apresentados no gráfico da Figura 22 (p. 42).



**FIGURA 22 – Geotaxis negativa de moscas *D. melanogaster* expostas primeiramente ao composto BM 1 (10,0 mg.mL<sup>-1</sup>) e em seguida a rotenona (100,0 mg.mL<sup>-1</sup>), e vice-versa.**

Em termos estatísticos, o controle e os outros dois parâmetros analisados são significativamente diferentes (ANOVA *one way*,  $r^2 = 0,81$ ). Na comparação entre os pares (teste Turkey,  $P < 0,05$ ), não foi apresentada diferença significativa entre o comportamento das moscas do controle e das moscas que foram expostas primeiramente ao extrato. Entretanto, ambos apresentaram diferença significativa em relação ao comportamento das moscas expostas primeiramente a rotenona. Desta forma, a exposição primária das moscas ao composto **BM 1**, na concentração de 10,0 mg.mL<sup>-1</sup>, também gerou uma maior resistência à toxicidade da rotenona, apresentando assim certa atividade neuroprotetora frente ao modelo avaliado em *D. melanogaster*.

De posse destes resultados, somados aos resultados de inibição da AChE, apresentados no item 4.3.2 (p. 38-39), supõem-se que extratos etanólicos de raízes da amoreira branca, assim como alguns dos seus constituintes isolados, podem vir a ser benéficos para seres humanos na prevenção de doenças neurodegenerativas.

## 4.4 Caracterização dos compostos isolados

A identificação estrutural dos compostos isolados neste trabalho foi realizada a partir da análise dos espectros de RMN, incluindo técnicas unidimensionais ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135) e bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), e espectros de massas. Os dados obtidos foram comparados com os relatados na literatura.

### 4.4.1 Caracterização do composto BM 1

O composto **BM 1**, um sólido amarelo obtido a partir de sucessivas colunas cromatográficas empacotadas com Sephadex e com sílica gel, apresentou faixa de fusão 104-106 °C e mostrou-se solúvel em clorofórmio. Com base nos dados obtidos nas análises espectroscópicas e espectrométrica do composto, e comparando-os com os dados da literatura, sua estrutura química foi atribuída ao composto morusina (Figura 23).

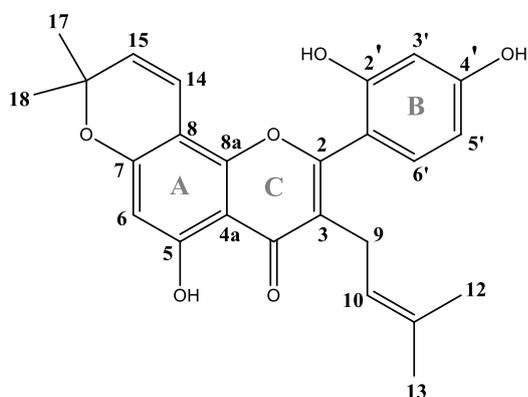
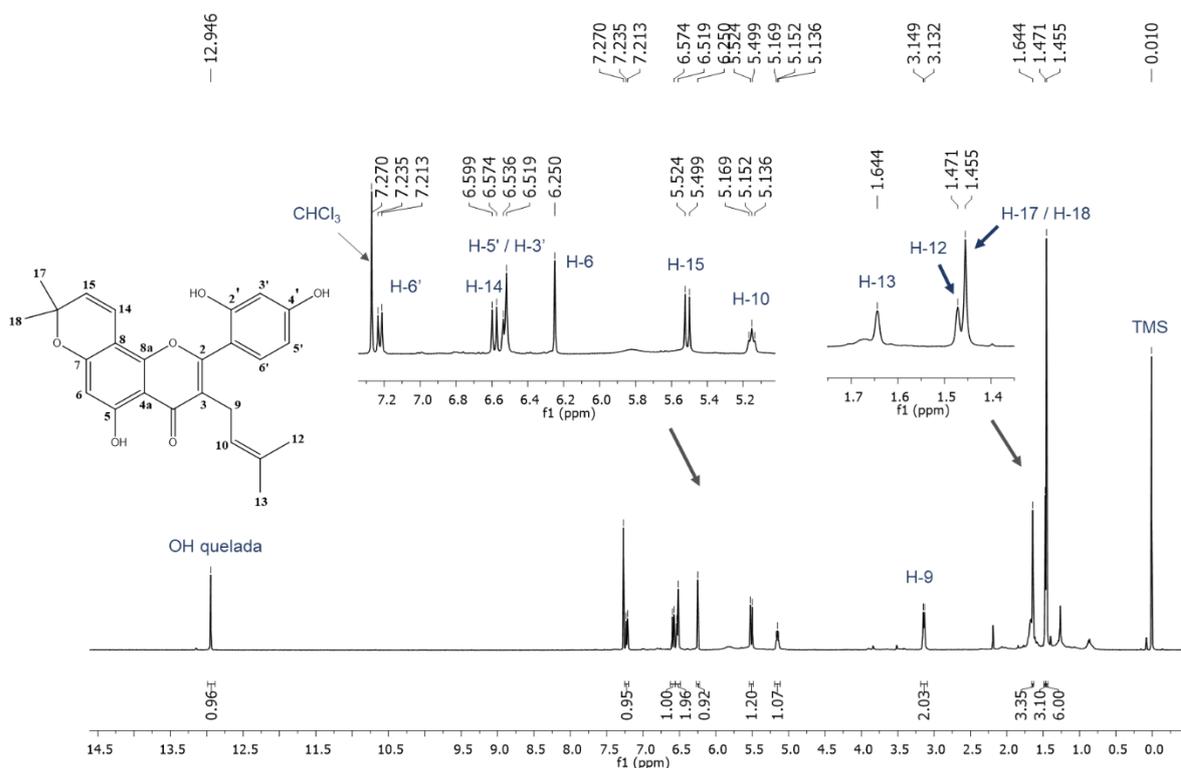


FIGURA 23 – Estrutura química de morusina.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 24, p. 44) apresentou três sinais simpletos intensos referentes a grupos metílicos, em  $\delta_{\text{H}}$  1,47 e 1,64 ppm, com integral correspondente à três átomos de hidrogênio ( $\text{CH}_3$ -12 e  $\text{CH}_3$ -13, respectivamente) e em  $\delta_{\text{H}}$  1,46 ppm, com integral correspondente à seis átomos de hidrogênio ( $\text{CH}_3$ -17 e  $\text{CH}_3$ -18). Observou-se um

sinal duplete em  $\delta_H$  3,14 ppm, com integral correspondente à dois átomos de hidrogênio, referente a um grupo metilênico (CH<sub>2</sub>-9).

Observaram-se um tripleto em  $\delta_H$  5,15 ppm (CH-10) e um duplete em  $\delta_H$  5,51 ppm (CH-15), ambos com integral correspondente à um átomo de hidrogênio. Na região de hidrogênios aromáticos, com deslocamento químico entre 7,22-6,25 ppm, observaram-se simpletos em  $\delta_H$  6,25 e 6,52 ppm (CH-6 e CH-3', respectivamente) e dupletos em  $\delta_H$  6,53, 6,59 e 7,22 ppm (CH-5', CH-14 e CH-6', respectivamente).



**FIGURA 24 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto BM 1 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).**

O subspectro DEPT 135 (Figura 25, p. 45) confirmou a presença de um átomo de carbono metilênico em  $\delta_C$  24,5 ppm (CH<sub>2</sub>-9), e outros onze carbonos hidrogenados. Os sinais destes carbonos hidrogenados tiveram seus respectivos átomos de hidrogênio atribuídos a partir do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 26, p. 45).

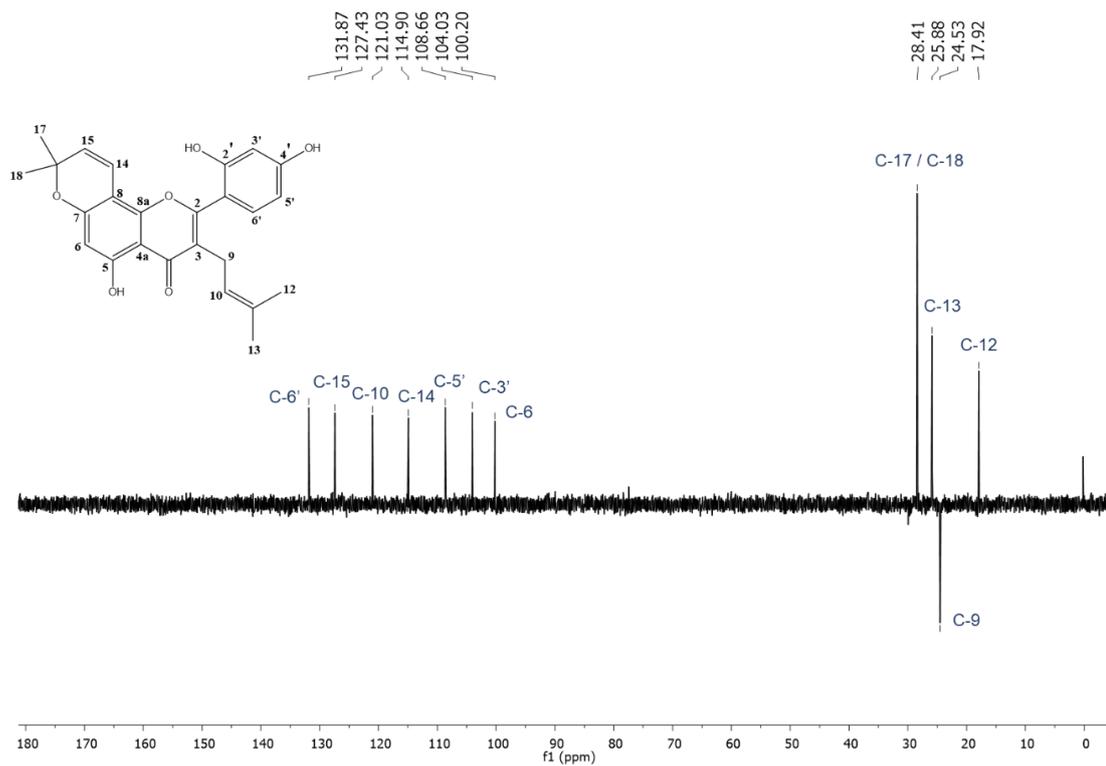


FIGURA 25 – Subspectrum DEPT 135 do composto BM 1 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

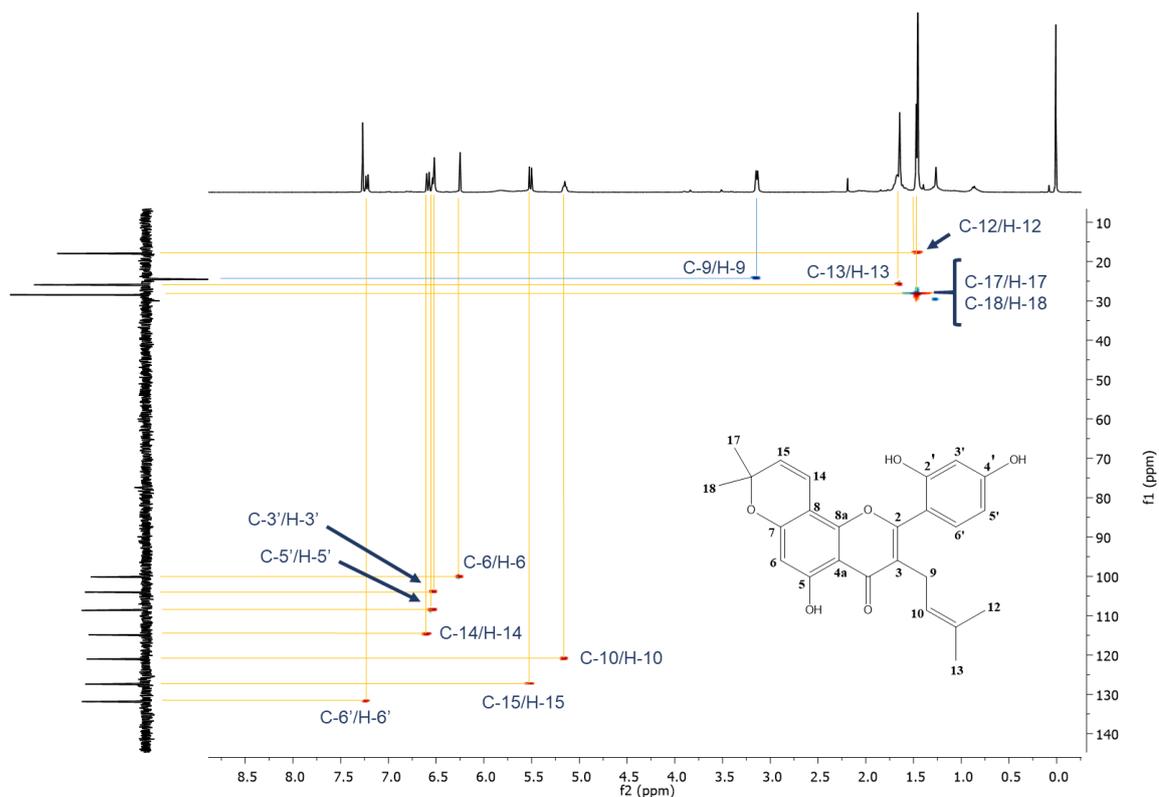


FIGURA 26 – Mapa de contornos HSQC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (Figura 27) evidenciou 25 átomos de carbono, sendo atribuídos dois átomos de carbono para o sinal em  $\delta_c$  28,4 ppm ( $\text{CH}_3$ -17 e  $\text{CH}_3$ -18), considerando a maior intensidade relativa e a correlação visualizada no mapa de contornos HSQC com o sinal de RMN de  $^1\text{H}$  com integração para seis átomos de hidrogênio. Dentre os carbonos não hidrogenados, sugere-se que os sinais com deslocamento químico entre 182,5-152,3 ppm, apresentando maior deslocamento químico relativo, sejam de átomos de carbono olefínico diretamente ligados à átomos de oxigênio. O sinal em  $\delta_c$  182,5 ppm, mais especificamente, refere-se a um átomo de carbono carbonílico (C-4). O sinal em  $\delta_c$  78,3 ppm, ausente no DEPT 135, refere-se a um átomo de carbono não hidrogenado e não aromático, ligado diretamente a um átomo de oxigênio (C-16), pela região em que se encontra no espectro.

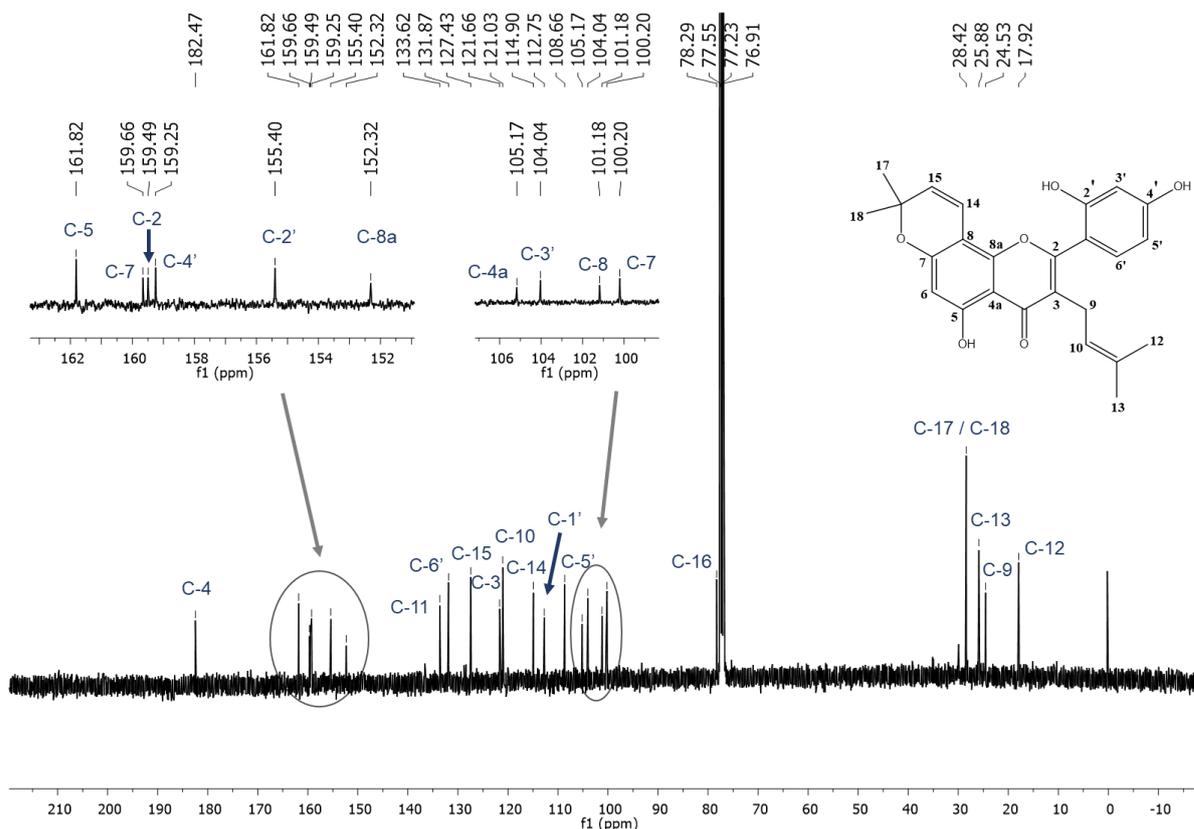
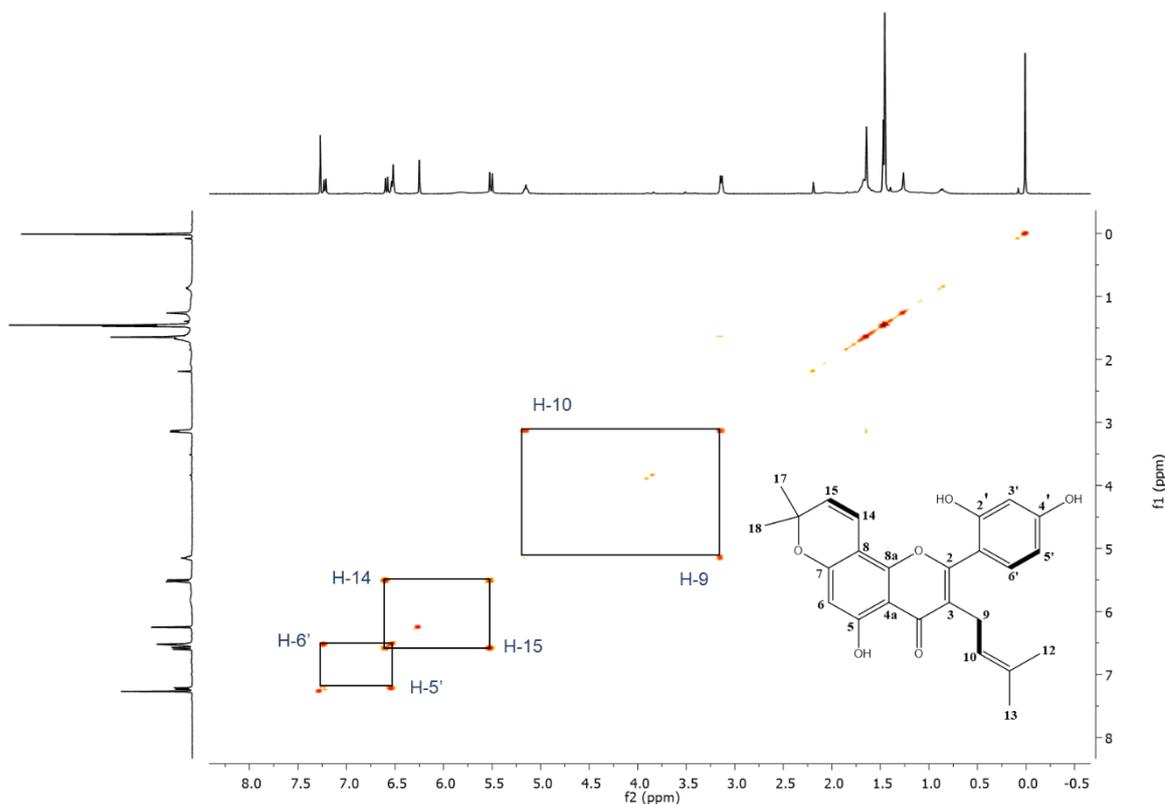


FIGURA 27 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

O mapa de contornos COSY (Figura 28, p. 47) mostra a correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  entre:  $\delta_{\text{H}}$  5,15 ( $J = 6,6$  Hz) e 3,14 ppm ( $J = 6,8$  Hz) (H-10 e H-9, respectivamente);  $\delta_{\text{H}}$  6,59 e 5,51 ppm (H-14 e H-15, respectivamente), ambos com constante de acoplamento  $J =$

10,0 Hz; e  $\delta_H$  7,22 ( $J = 8,8$  Hz) e 6,53 ppm (H-6' e H-5', respectivamente). Estes valores de constantes de acoplamento indicam acoplamento na posição orto ( ${}^3J$ ) para estes carbonos metínicos.



**FIGURA 28 – Mapa de contornos COSY  ${}^1H$ - ${}^1H$  do composto BM 1 (400 MHz,  $CDCl_3$ ).**

As correlações  ${}^2J_{CH}$  e  ${}^3J_{CH}$  observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 29, p. 48) permitiram identificar o fragmento prenila ( $-CH_2CHC(CH_3)_2$ ) (Figuras 30 e 31, p. 48 e 49, respectivamente). Entretanto, comparando todos os dados anteriormente apresentados com os relatados na literatura, o composto isolado poderia ser caracterizado como três possíveis estruturas. Estas seriam kuwanon A, kuwanon B (NOMURA *et al.*, 1977) e morusina (NOMURA *et al.*, 1976) com mudanças da posição e substituição dos anéis (Figura 32, p. 49).

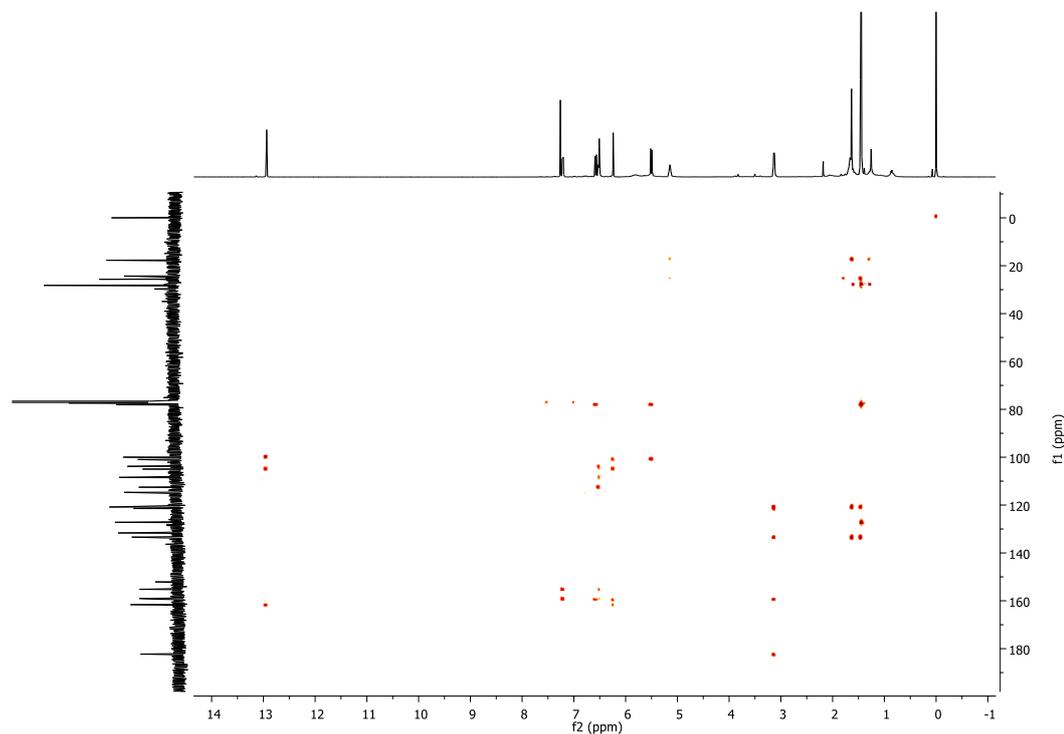


FIGURA 29 – Mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

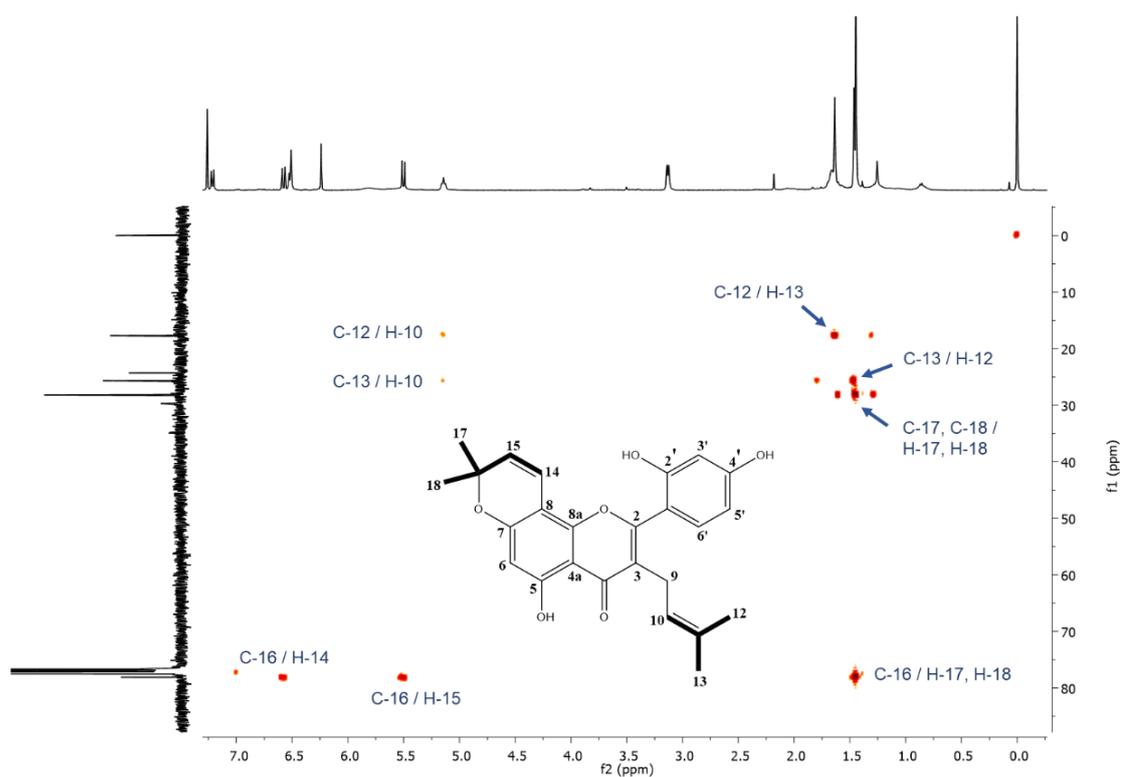
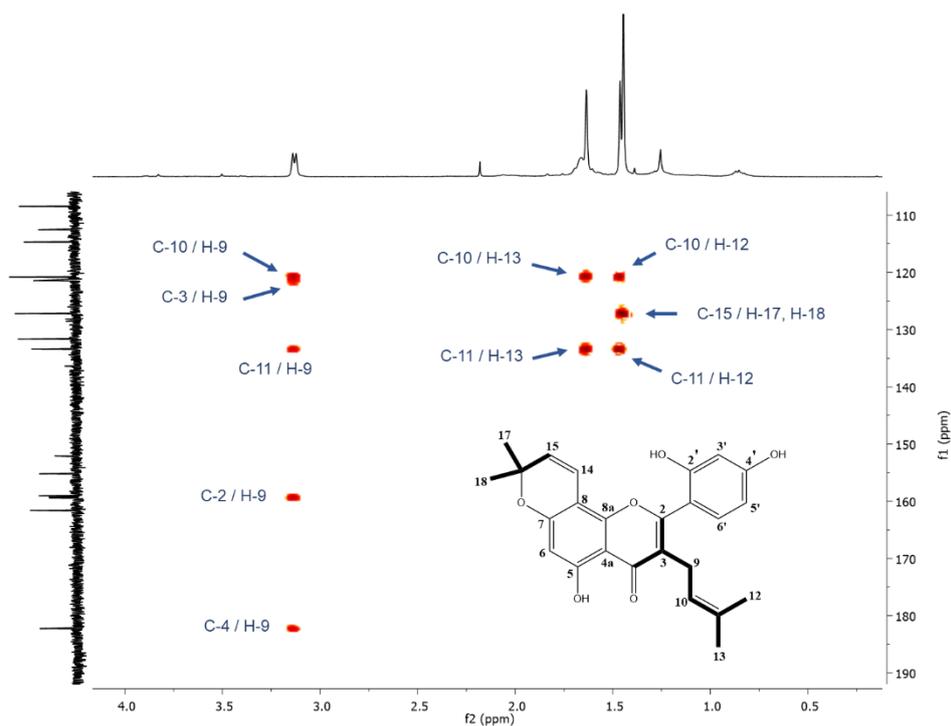
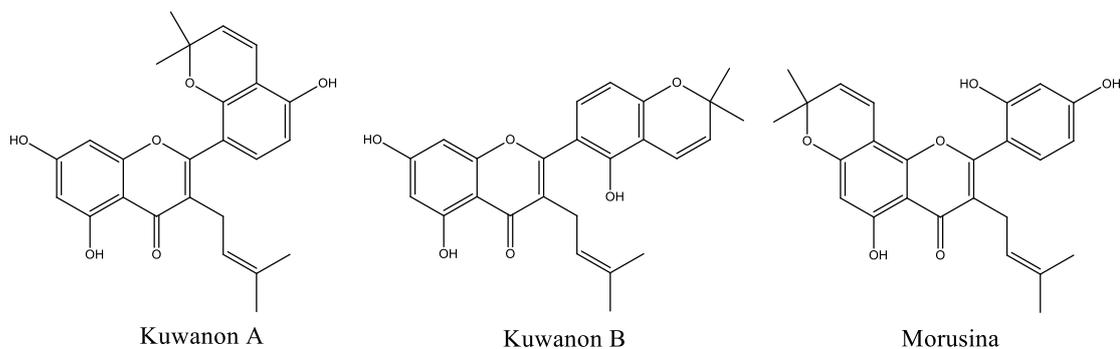


FIGURA 30 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte I.



**FIGURA 31 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte II.**



**FIGURA 32 – Possíveis estruturas químicas para o composto BM 1.**

Para a definição inequívoca do composto como sendo morusina, algumas correlações do mapa de contornos HMBC foram fundamentais (Figura 33, p. 50). Estas são as correlações entre os sinais de  $-\text{CH}$  de aromáticos C-3'/H-5', C-2'/H-6' e C-1'/H-5' em  $^3J$  que sugerem que C-3', C-5' e C-6' pertencem ao mesmo anel aromático, descartando assim as duas outras estruturas. Outras correlações como C-2/H-6', C-4a/H-6, C-8/H-6 e C-8/H-15 em  $^3J$  confirmaram as interligações entre os outros anéis da estrutura da morusina (Figura 34, p. 50).

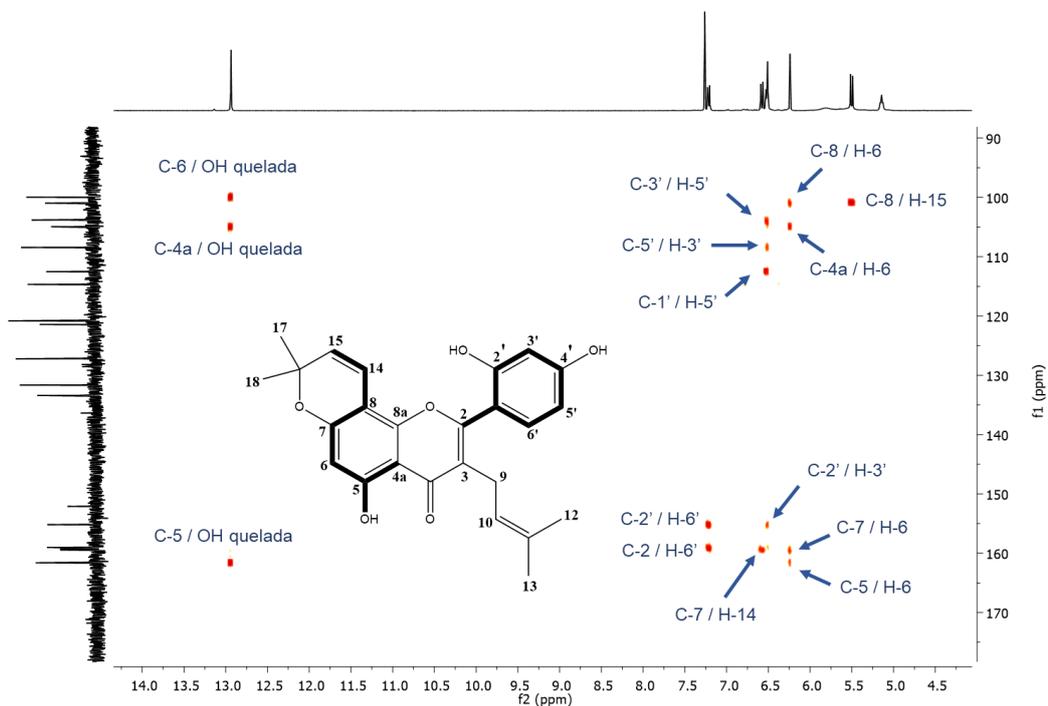


FIGURA 33 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 1 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte III.

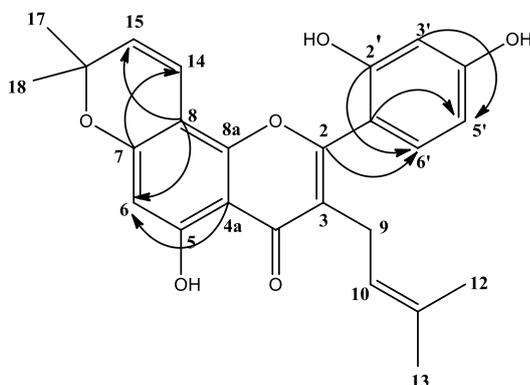
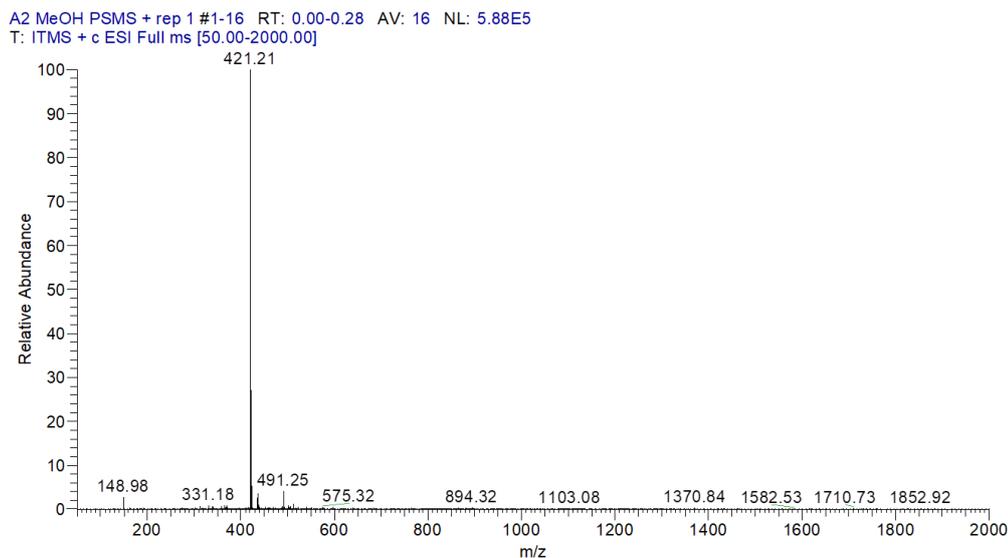


FIGURA 34 – Correlações  $^3J_{\text{CH}}$  visualizadas no mapa de contornos HMBC para o composto BM 1.

O espectro de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS, modo positivo) apresentou pico do íon da espécie molecular,  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , em  $m/z$  421,21 (Figura 35, p. 51), permitindo a confirmação da fórmula molecular do composto como  $\text{C}_{25}\text{H}_{24}\text{O}_6$  (massa molecular: 420,16 u;  $m/z$   $[\text{M}+\text{H}]^+ = 421,21$ ).



**FIGURA 35 – Espectro de massas obtido por ionização PS-MS, modo positivo, para o composto BM 1.**

Os dados obtidos na análise espectroscópica por RMN são apresentados na Tabela 5 (p. 52).

Morusina trata-se de um flavonoide isoprenilado, mais especificamente, pertencente à sub-classe das flavonas. Este composto foi isolado das cascas das raízes de *M. alba* pela primeira vez por Nomura e colaboradores em 1976. Em uma revisão sobre a biossíntese de flavonoides isoprenilados, Nomura (1999) definiu morusina como o principal flavonoide isoprenilado dentre os vários já isolados a partir da amoreira e de outras plantas da família Moraceae.

Alguns estudos corroboram com os resultados obtidos para este composto no presente trabalho. Kim e colaboradores (2011) isolaram morusina de cascas das raízes de *Morus lhou* e verificaram seu potencial como metabólito inibidor de acetilcolinesterase, assim como Mazimba *et al.* (2011) a isolaram do caule de *Morus nigra* e mostraram sua moderada atividade na captura de radicais DPPH.

Outros estudos avaliaram seu potencial citotóxico contra células cancerígenas como, por exemplo, as do câncer de mama (LI *et al.*, 2015), pulmão (LI *et al.*, 2017), leucemia mieloide, colo do útero e gástrico (QIN *et al.*, 2015), com resultados promissores.

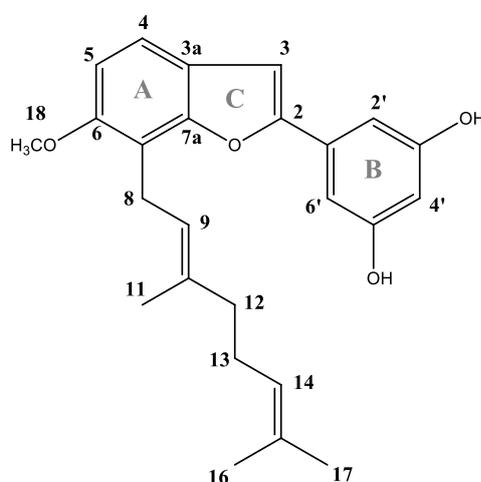
TABELA 5 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl<sub>3</sub>) do composto BM 1.

nº	Carbono	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)	$\delta^1\text{H}$ (ppm); $J$ (Hz)	HMBC		$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) morusina*
				$^2J$	$^3J$	
2	C	159,5	-	-	-	163,9
3	C	121,7	-	-	-	122,5
4	C	182,5	-	-	-	184,3
4a	C	105,2	-	-	-	106,3
5	C	161,8	-	-	-	163,1
6	CH	100,2	6,25 (1H, s)	C-5; C-7	C-4a; C-8	100,5
7	C	159,7	-	-	-	161,0
8	C	101,2	-	-	-	102,6
8a	C	152,3	-	-	-	154,2
9	CH <sub>2</sub>	24,5	3,14 (2H, d, $J = 6,8$ )	C-3; C-10	C-2; C-4; C-11	23,9
10	CH	121,0	5,15 (1H, t, $J = 6,6$ )	-	C-12; C-13	123,1
11	C	133,6	-	-	-	133,3
12	CH <sub>3</sub>	17,9	1,47 (3H, s)	C-11	C-10; C-13	18,1
13	CH <sub>3</sub>	25,9	1,64 (3H, s)	C-11	C-10; C-12	26,2
14	CH	114,9	6,59 (1H, d, $J = 10,0$ )	-	C-7; C-16	116,2
15	CH	127,4	5,51 (1H, d, $J = 10,0$ )	C-16	C-8	128,6
16	C	78,3	-	-	-	79,6
17	CH <sub>3</sub>	28,4	1,46 (3H, s)	C-16	C-15; C-18	28,8
18	CH <sub>3</sub>	28,4	1,46 (3H, s)	C-16	C-15; C-17	28,8
1'	C	112,8	-	-	-	113,5
2'	C	155,4	-	-	-	162,5
3'	CH	104,0	6,52 (1H, br s)	C-2'	C-5'	108,5
4'	C	159,3	-	-	-	158,4
5'	CH	108,7	6,53 (1H, br d)	-	C-1'; C-3'	104,3
6'	CH	131,9	7,22 (1H, d, 8,8 Hz)	-	C-2; C-2'	132,8

\*Kim *et al.* (2011), 125 MHz, CD<sub>3</sub>OD.

#### 4.4.2 Caracterização do composto BM 2

O composto **BM 2** consiste em um sólido marrom obtido por separação em coluna cromatográfica empacotada com sílica gel, seguida de separação pela solubilidade parcial em metanol. Apresentou faixa de fusão 58-60 °C e se mostrou também solúvel em clorofórmio. Com base nos dados obtidos nas análises espectroscópicas e espectrométrica do composto, e comparando-os com os dados da literatura, sua estrutura química foi atribuída ao composto mulberrofurano B (Figura 36).



**FIGURA 36 – Estrutura química de mulberrofurano B.**

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 37, p. 54) mostra a presença de quatro sinais intensos com integral correspondente à três átomos de hidrogênio, referentes aos grupos metílicos. Em  $\delta_{\text{H}}$  1,52, 1,59, 1,86 ( $\text{CH}_3$ -16,  $\text{CH}_3$ -17 e  $\text{CH}_3$ -11, respectivamente) e 3,87 ppm. O último se encontrando mais desblindado, permite supor a presença de um grupo metoxila ( $\text{OCH}_3$ -18).

Observa-se ainda três sinais com integral correspondente à dois átomos de hidrogênio referentes a grupos metilênicos, dois apresentados como tripletos em  $\delta_{\text{H}}$  1,96 e 2,04 ppm ( $\text{CH}_2$ -12 e  $\text{CH}_2$ -13, respectivamente) e um como duplete em  $\delta_{\text{H}}$  3,62 ppm ( $\text{CH}_2$ -8). Quanto aos sinais com integral correspondente à um átomo de hidrogênio, observam-se dois tripletos referentes a átomos de hidrogênio de carbonos olefínicos em  $\delta_{\text{H}}$  5,04 e 5,38 ppm ( $\text{CH}$ -14 e  $\text{CH}$ -9, respectivamente); um sinal largo em  $\delta_{\text{H}}$  6,32 ppm ( $\text{CH}$ -4'); e sinais sobrepostos na região de hidrogênios aromáticos, entre  $\delta_{\text{H}}$  6,88-6,82 ppm, referentes a quatro átomos de hidrogênio, e entre  $\delta_{\text{H}}$  7,28-7,25 ppm, referentes a um átomo de hidrogênio e o

sinal residual de  $\text{CHCl}_3$ . Pela análise da correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  no mapa de contornos COSY (Figura 38, p. 55), concluiu-se que os sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,27 ppm (H-4) e 6,84 ppm (H-5) estão correlacionados e, portanto, correspondem a dupletos que apresentam constante de acoplamento semelhantes ( $J = 8,4$  e  $8,8$  Hz, respectivamente). Assim, definiu-se a presença de dois átomos de hidrogênio sobrepostos em  $\delta_{\text{H}}$  6,88 ppm (CH-2' e CH-6'), e um átomo de hidrogênio em  $\delta_{\text{H}}$  6,82 ppm (CH-3).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto (Figura 39, p. 55) evidencia 25 átomos de carbono, sendo atribuídos dois átomos de carbono para os sinais em  $\delta_{\text{C}}$  104,5 (C-2' e C-6') e 157,3 ppm (C-3' e C-5'), considerando uma maior intensidade relativa e a possibilidade de uma unidade aromática simétrica. A partir do subespectro DEPT 135 (Figura 40, p. 56), confirmou-se a presença de três carbonos metilênicos, três metílicos, um carbono metoxílico, oito carbonos metínicos, restando dez carbonos não hidrogenados. Os carbonos hidrogenados apresentados no subespectro DEPT 135 tiveram seus respectivos átomos de hidrogênio atribuídos a partir do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 41, p. 56). Dentre os carbonos não hidrogenados, os sinais com deslocamento químico entre 157,3-154,5 ppm são atribuídos a aqueles ligados diretamente à átomos de oxigênio que, por estarem mais desblindados, apresentam maior deslocamento químico relativo.

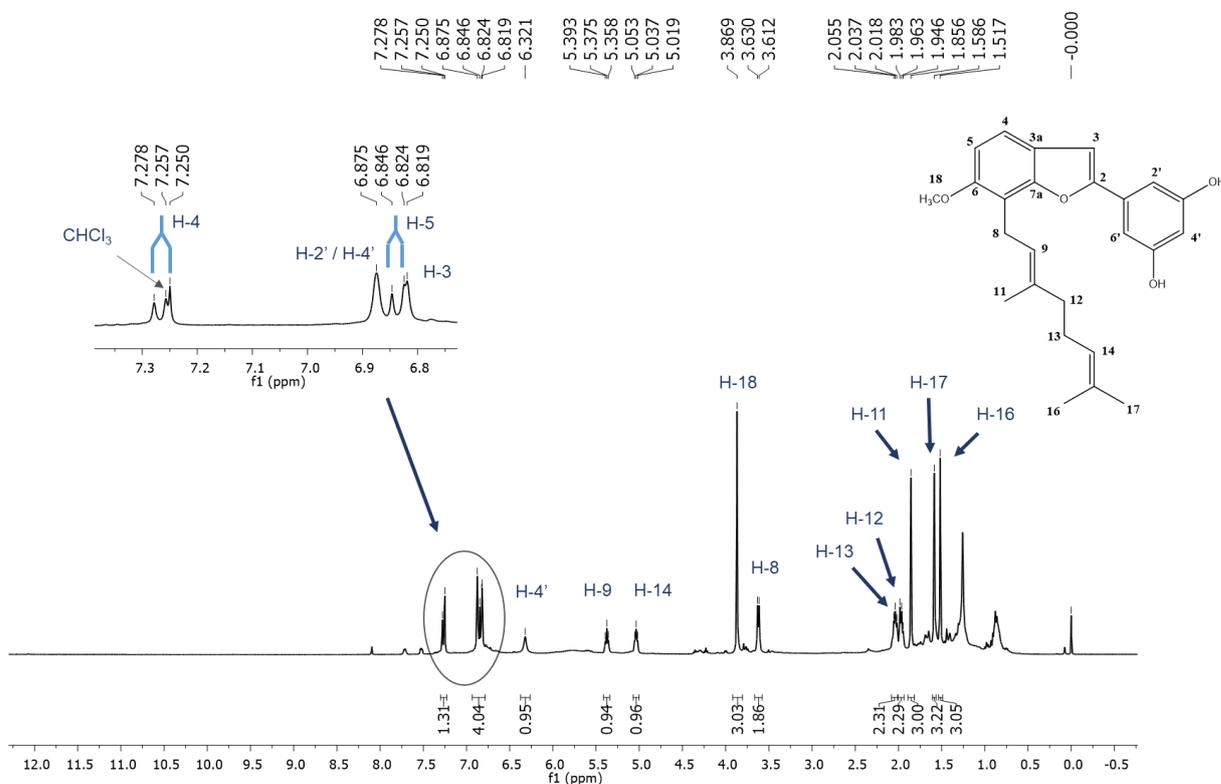


FIGURA 37 – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

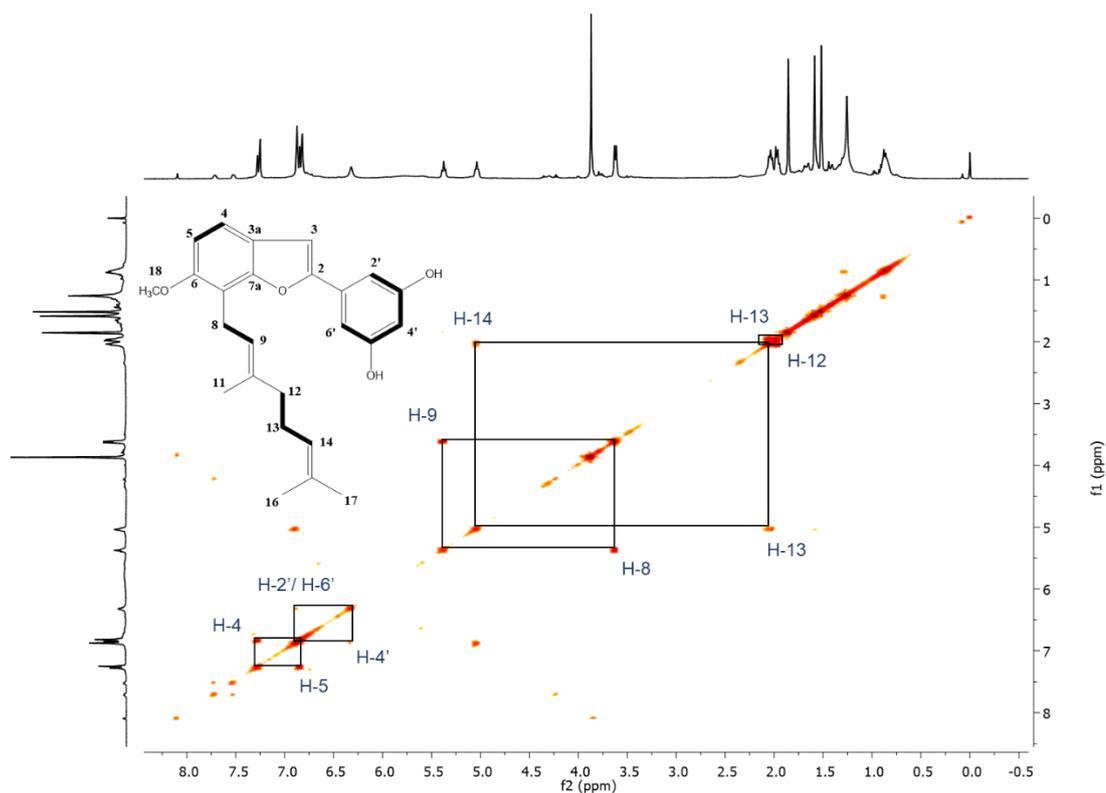


FIGURA 38 – Mapa de contornos COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

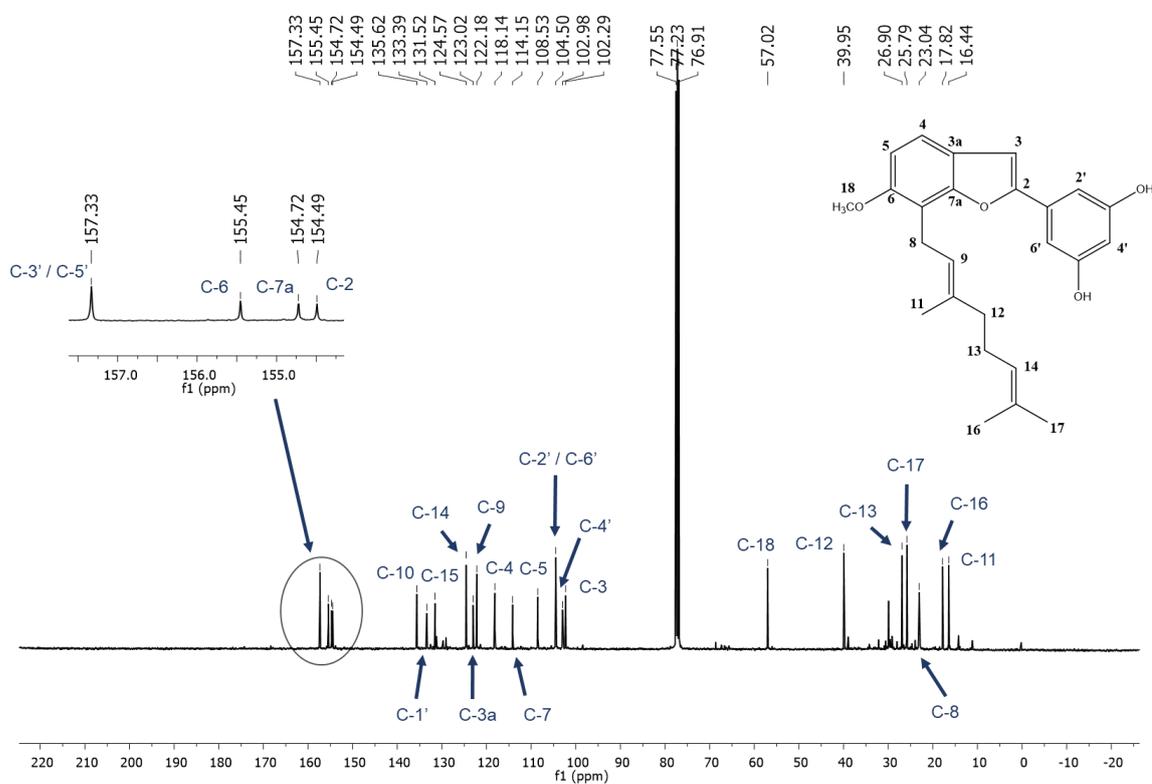


FIGURA 39 – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  do composto BM 2 (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

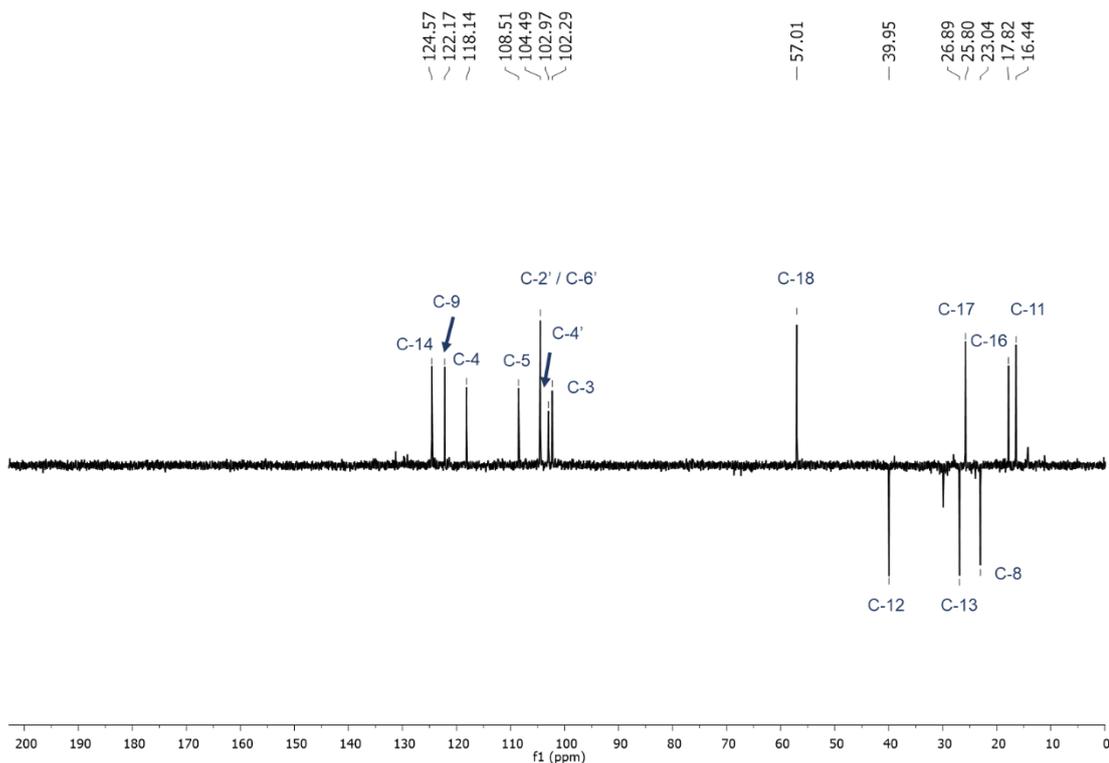


FIGURA 40 – Subespectro DEPT 135 do composto BM 2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

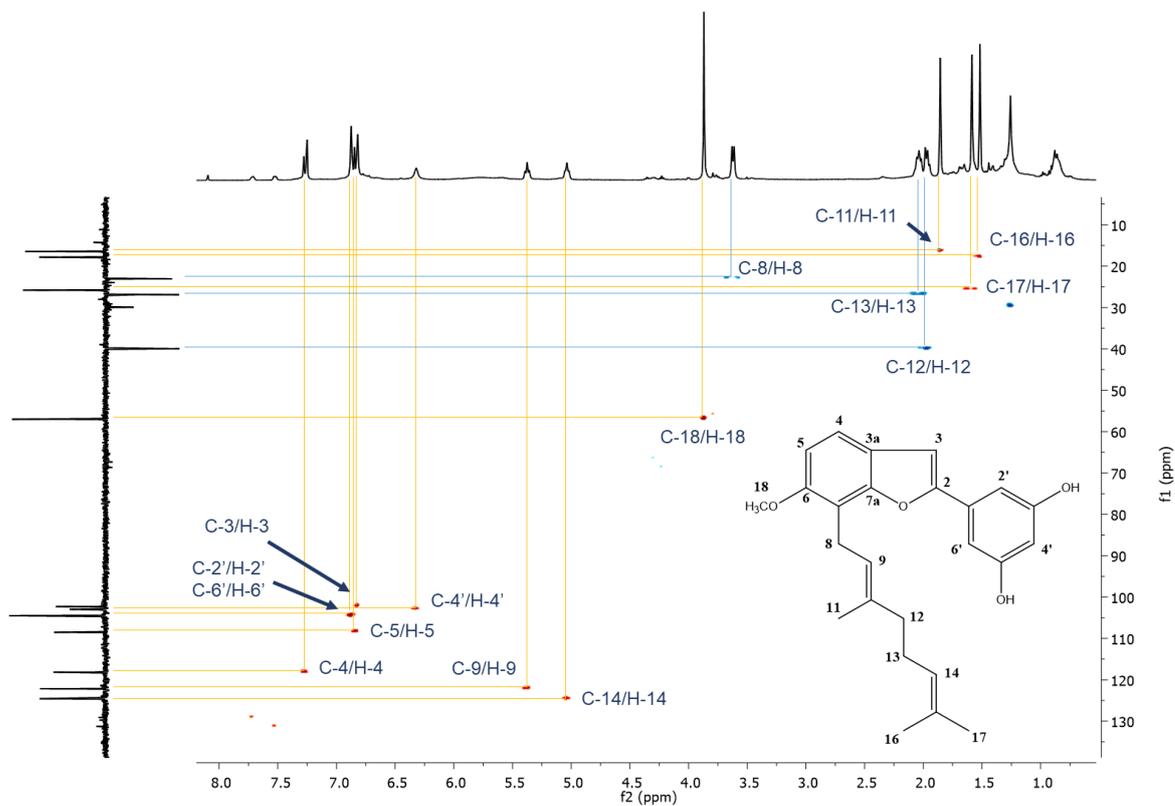


FIGURA 41 – Mapa de contornos HSQC <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C do composto BM 2 (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>).

Outras correlações observadas no mapa de contornos COSY (Figura 38, p. 55) mostraram-se importantes para a caracterização estrutural do composto. Observa-se correlação entre os sinais correspondentes a H-2' e H-6' com H-4'. Estes hidrogênios se acoplam em posição meta, gerando uma pequena constante de acoplamento. Isto influi na multiplicidade prevista para os sinais (duplete duplo e tripleto, respectivamente), e justifica a visualização dos sinais no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 37, p. 54) como simpletos alargados. Observaram-se também correlações entre os sinais correspondentes à H-9 e H-8 ( $J = 7,0$  e  $7,2$  Hz, respectivamente), H-14 e H-13 ( $J = 6,8$  e  $7,4$  Hz, respectivamente) e H-13 e H-12 ( $J = 7,4$  Hz, para ambos), com valores de constantes de acoplamento que indicam acoplamento na posição orto para estes carbonos metínicos. Estas correlações  $^3J_{\text{HH}}$ , juntamente com as correlações  $^2J_{\text{CH}}$  e  $^3J_{\text{CH}}$  observadas no mapa de correlação heteronuclear HMBC (Figura 42), permitiram identificar o fragmento geranila ( $-\text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHC}(\text{CH}_3)_2$ ) (Figuras 43 e 44, p. 58).

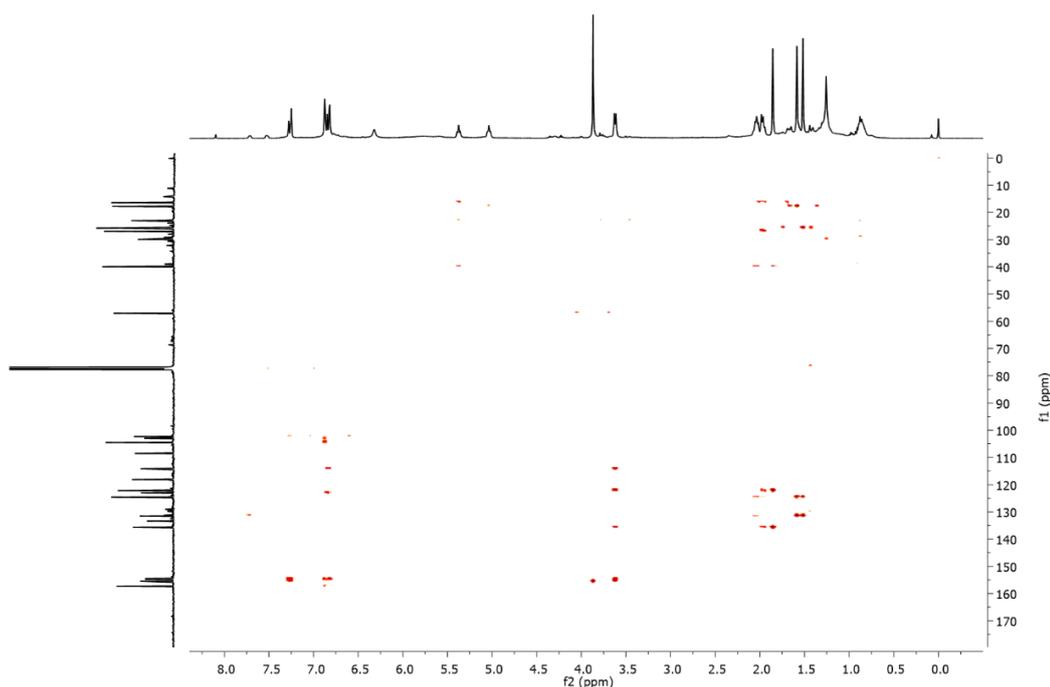


FIGURA 42 – Mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

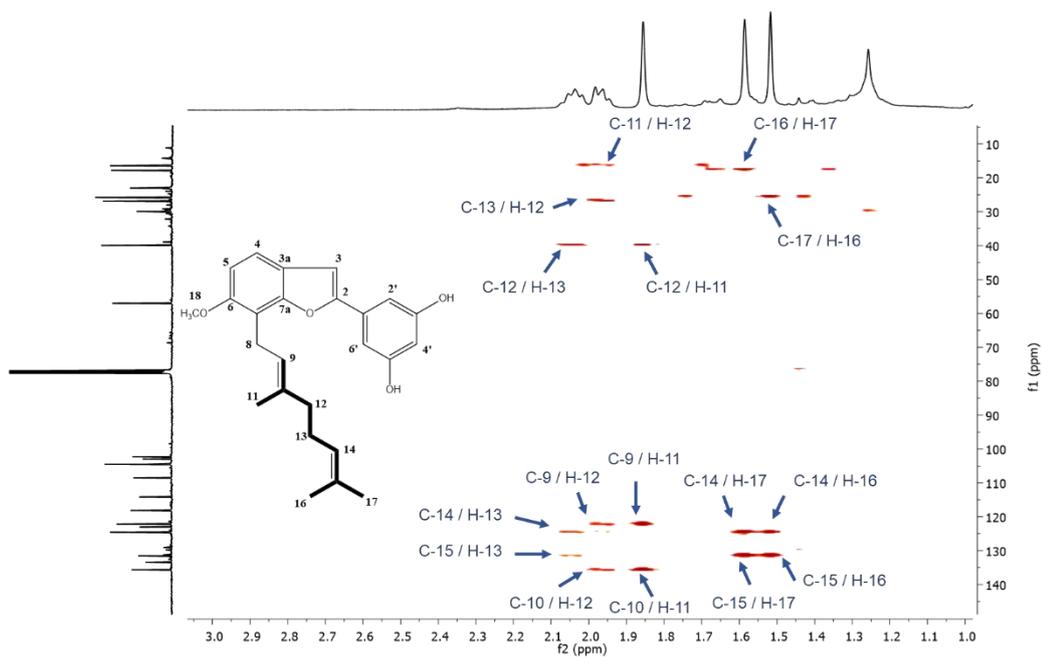


FIGURA 43 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte I.

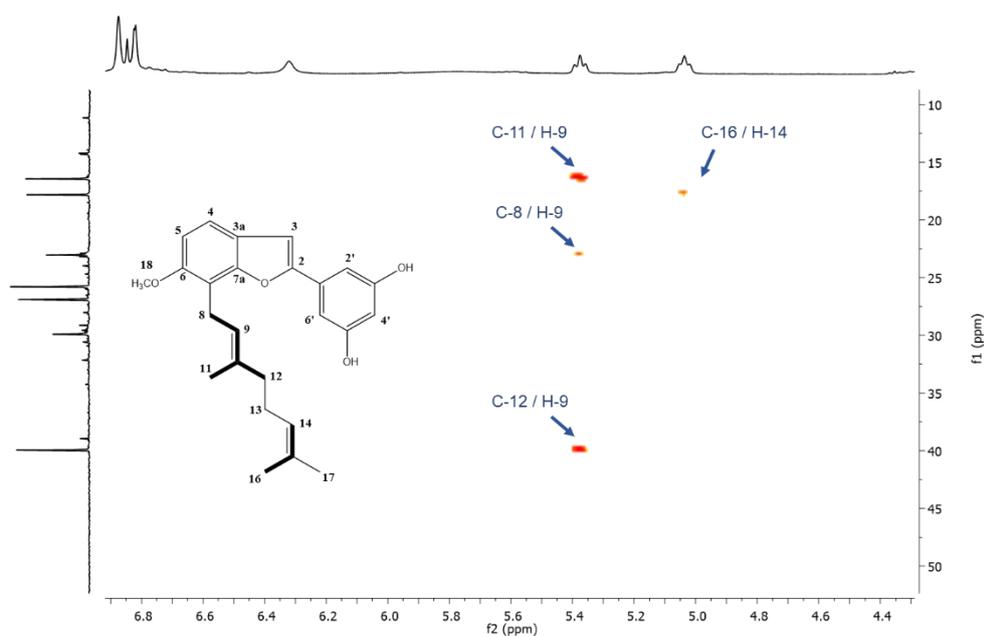
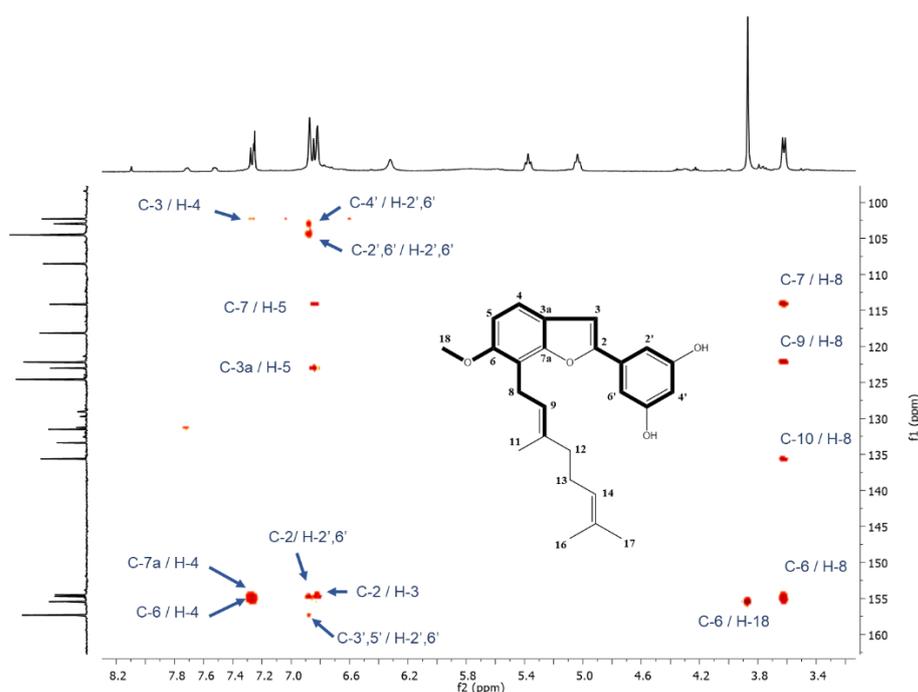
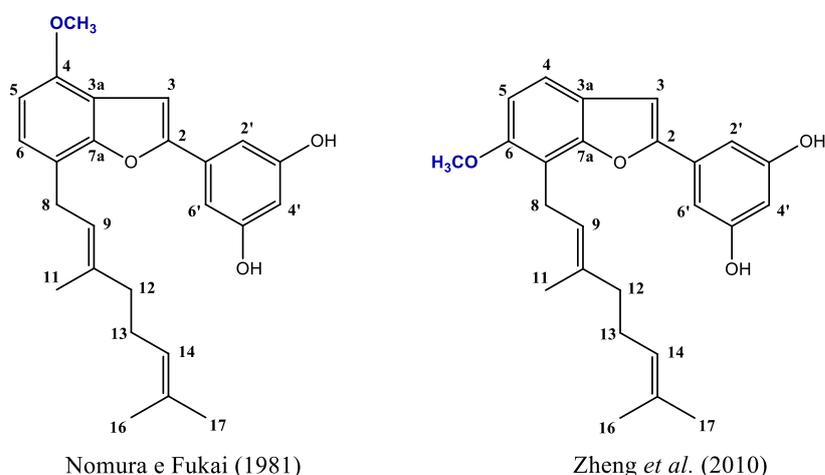


FIGURA 44 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte II.

Além disso, a correlação de H-8 com C-6 no mapa de contornos HMBC (Figura 45) mostra que o fragmento geranila é vizinho ao grupo  $-\text{OCH}_3$ , como afirmado por Zheng e colaboradores (2010). Diferentemente do que Nomura e Fukai acreditavam em 1981, quando, na ausência de uma evidência inequívoca, propuseram que o grupo geranila estivesse em posição oposta (C-4) ao grupo funcional oxigenado no anel aromático – Figura 46. Também por análise das correlações HMBC, confirmou-se a unidade aromática simétrica, onde H-2' e H-6' correlacionam-se com C-3' e C-5', respectivamente, em  $^2J$ , e com C-2 e C-4' em  $^3J$ .

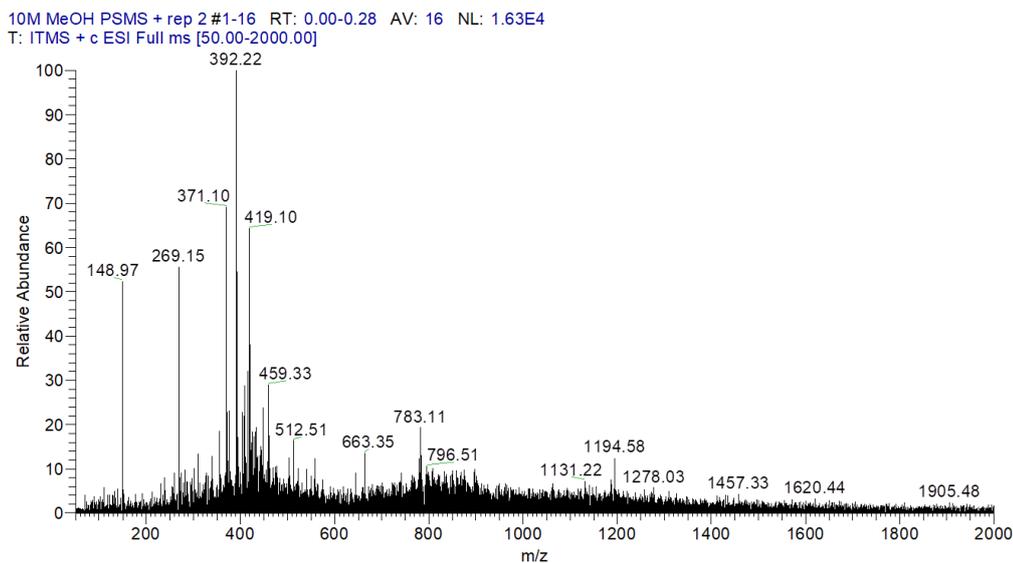


**FIGURA 45 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – Parte III.**



**FIGURA 46 – Possíveis estruturas químicas propostas na literatura para mulberrofurano B.**

O espectro de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS, modo positivo) apresentou pico do íon da espécie molecular,  $[M+H]^+$ , em  $m/z$  392,22 (Figura 47), permitindo a confirmação da fórmula molecular do composto como  $C_{25}H_{28}O_4$  (massa molecular: 392,20 u).



**FIGURA 47 – Espectro de massas obtido por ionização PS-MS, modo positivo, para o composto BM 2.**

Os dados obtidos na análise espectroscópica por RMN são apresentados na Tabela 6 (p. 62).

Mulberrofurano B consiste em um derivado geranilado de 2-arilbenzofurano, isolado das cascas das raízes de *M. alba* pela primeira vez por Nomura e Fukai em 1981. Foi também isolado de cascas de raízes de *Morus mongolica* por Shi e colaboradores (2001), que determinaram sua concentração citotóxica a 50% ( $CC_{50}$ ), contra células tumorais HSC-2, HSG, e HGF (59, 59 e 71  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente). Zheng *et al.* (2010), isolaram-no de raízes de *Morus nigra* e avaliaram a atividade inibitória de tirosinase, mas esta foi considerada fraca ( $IC_{50} > 200 \mu\text{M}$ ). Percebe-se assim, que o composto está presente em diferentes espécies da família Moraceae.

Diversos derivados de 2-arilbenzofuranos já foram isolados de espécies do gênero *Morus*, incluindo aqueles com unidades prenila ou mais especificamente, geranila. Muitos deles apresentam atividades biológicas como capacidade antioxidante, anti-inflamatória (TAN *et al.*, 2010), anti-hiperglicêmica e inibitórias de  $\alpha$ -glucosidase (ZHANG *et al.*, 2014), entre outras.

Neste trabalho, verificou-se que o mulberrofurano B apresenta considerável atividade antioxidante, nos diferentes mecanismos testados. Uma possível causa seria a disponibilidade dos grupos hidroxílicos no anel B de sua estrutura (Figura 36, p. 53), o que facilita sua ação como um antioxidante doador de hidrogênio. Além disso, esse anel aromático é capaz de suportar o despareamento de elétrons no seu sistema de elétrons  $\pi$  (MILANI *et al.*, 2012).

TABELA 6 – Dados espectroscópicos de RMN (CDCl<sub>3</sub>) do composto BM 2.

nº	Carbono	$\delta$ <sup>13</sup> C (ppm)	$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm); J (Hz)	HMBC		$\delta$ <sup>1</sup> H (ppm); J (Hz) mulberrofurano B*
				<sup>2</sup> J	<sup>3</sup> J	
2	C	154,5	-	-	-	-
3	CH	102,3	6,82 (1H, s)	C-2	-	6,86 (1H, s)
3a	C	123,1	-	-	-	-
4	CH	118,1	7,27 (1H, d, J = 8,4)	-	C-3; C-6; C-7a	7,32 (1H, d, J = 8,0)
5	CH	108,5	6,84 (1H, d, J = 8,8)	-	C-3a; C-7	6,86 (1H, d, J = 8,0)
6	C	155,5	-	-	-	-
7	C	114,2	-	-	-	-
7a	C	154,7	-	-	-	-
8	CH <sub>2</sub>	23,0	3,62 (2H, d, J = 7,2)	C-7; C-9	C-6; C-10	3,63 (2H, br d, J = 7,0)
9	CH	122,2	5,38 (1H, t, J = 7,0)	C-8	C-11; C-12	5,20-5,55 (1H, m)
10	C	135,6	-	-	-	-
11	CHH	16,4	1,86 (3H, s)	C-10	C-9; C-12	1,87 (3H, s)
12	CH <sub>2</sub>	40,0	1,96 (2H, t, J = 7,4)	C-10; C-13	C-9; C-11	2,00 (2H, br s)
13	CH <sub>2</sub>	26,9	2,04 (2H, t, J = 7,4)	C-12; C-14	C-15	2,00 (2H, br s)
14	CH	124,6	5,04 (1H, t, J = 6,8)	-	C-16	4,88-5,20 (1H, m)
15	C	131,5	-	-	-	-
16	CH <sub>3</sub>	17,8	1,52 (3H, s)	C-15	C-14; C-17	1,52 (3H, s)
17	CH <sub>3</sub>	25,8	1,59 (3H, s)	C-15	C-14; C-16	1,59 (3H, s)
18	OCH <sub>3</sub>	57,0	3,87 (3H, s)	-	C-6	3,88 (3H, s)
1'	C	133,4	-	-	-	-
2' 6'	CH (2)	104,5	6,88 (2H, br s)	C-3'/5'	C-2; C-2'/6'; C-4'	6,89 (2H, dd, J = 2,5)
3' 5'	C (2)	157,3	-	-	-	-
4'	CH	103,0	6,32 (1H, br s)	-	-	6,32 (1H, t, J = 2,5)

\*Nomura *et al.* (1981), em CDCl<sub>3</sub>.

#### 4.4.3 Caracterização dos compostos **BM 3** e **BM 4**

Os compostos denominados **BM 3** e **BM 4** são sólidos alaranjados obtidos a partir de sucessivas colunas cromatográficas com subsequente separação por HPLC em coluna semi-preparativa. Estes mostraram-se insolúveis em clorofórmio, mas solúveis em metanol, solvente que foi então utilizado para as análises espectroscópicas e espectrométrica.

Foram obtidos os espectros de RMN uni e bidimensionais para os dois compostos, entretanto, neste trabalho, estes não foram completamente caracterizados. Alguns fragmentos presentes nas moléculas foram identificados e, comparando os espectros obtidos para ambos os compostos, verificou-se um perfil estrutural semelhante entre eles. Esta semelhança pode ser observada, por exemplo, nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  apresentados nas Figuras 48 e 49 (p. 64).

A maior diferença estrutural detectada se refere à presença de dois grupamentos isoprenila no composto **BM 3**, sendo que apenas um destes é observado em **BM 4**. Esta informação pôde ser definida a partir do número de carbonos metílicos e metilênicos observados no subspectro DEPT 135, correlações homonucleares visualizadas no mapa de contornos COSY, além de correlações heteronucleares apresentadas no mapa de contornos HMBC (Figuras 50 e 51, p. 65).

Outra informação relevante obtida a partir da análise dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  corresponde a dois sinais com elevado deslocamento químico ( $\delta\text{c}$  184,1 ppm e  $\delta\text{c}$  210,3-210,5 ppm) que indicam a possível presença de duas carbonilas nas estruturas. Se confirmando, estes grupos podem ser os responsáveis pela maior polaridade relativa de **BM 3** e **BM 4** frente aos demais compostos isolados, como anteriormente observado e discutido com a análise dos seus respectivos cromatogramas (item 4.2, p. 34). Além disso, o fato de **BM 3** apresentar menor polaridade em relação a **BM 4** corrobora com o fato deste apresentar duas unidades isoprenila.

A partir desta interpretação dos espectros de RMN pode-se sugerir que estes compostos pertençam à classe dos flavonoides isoprenilados, assim como morusina.

Os espectros de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS, modo positivo) obtidos para **BM 3** e **BM 4** são apresentados nas Figuras 52 e 53 (p. 66), respectivamente.

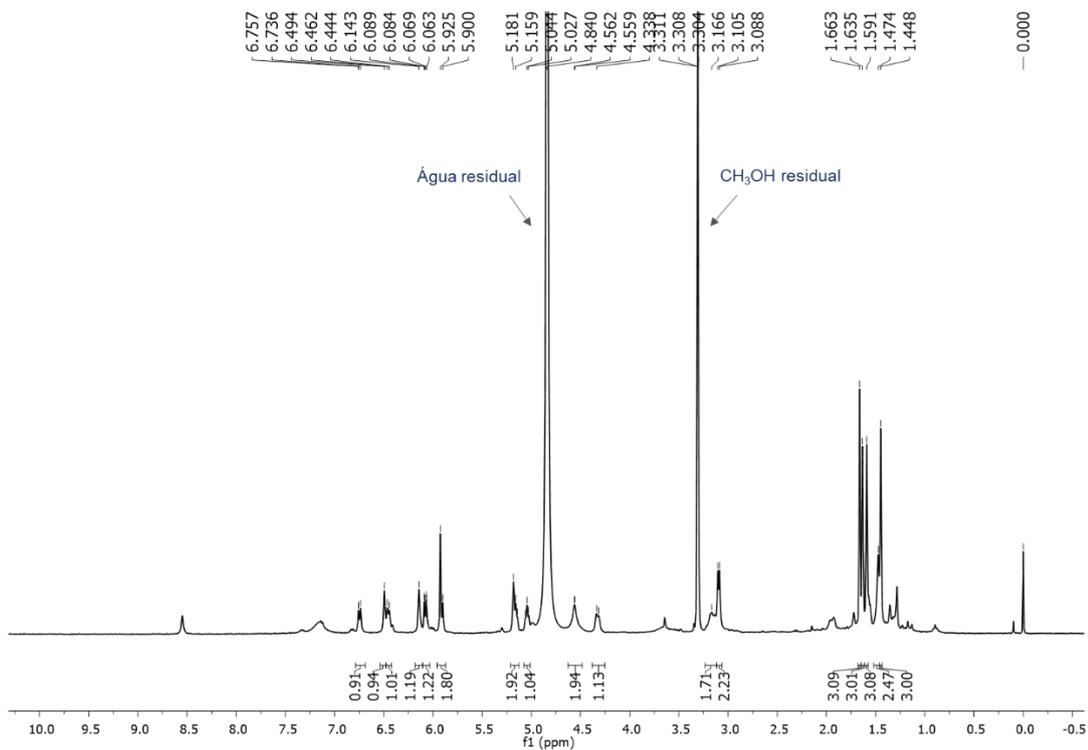


FIGURA 48 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto BM 3 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

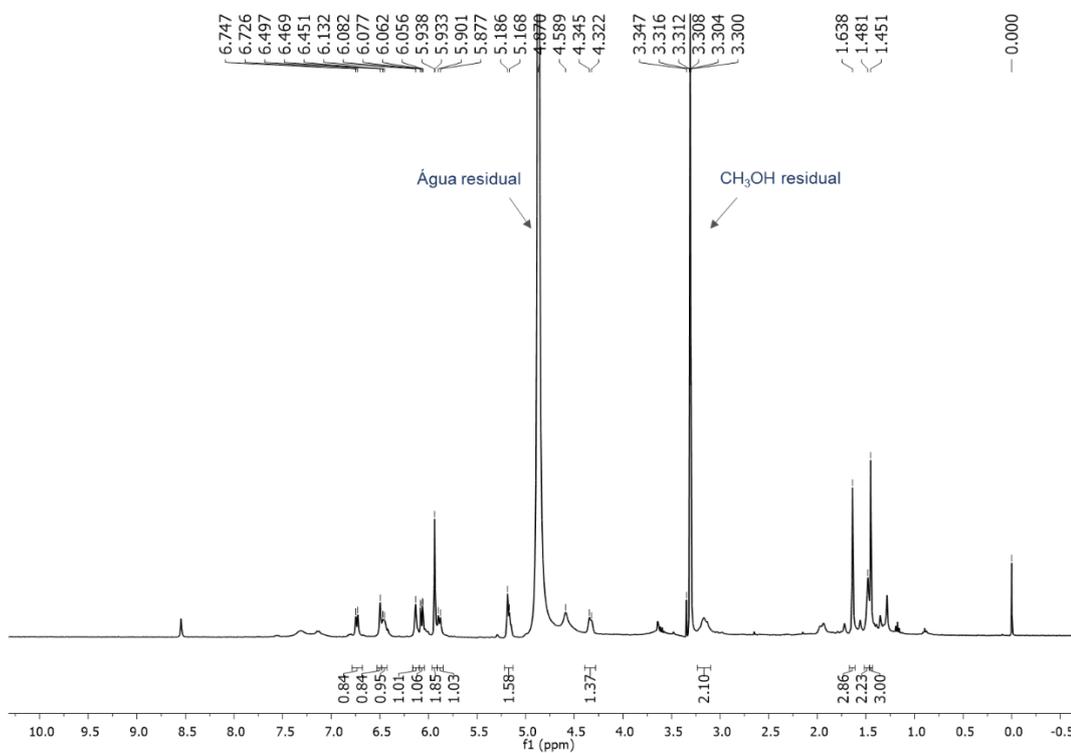


FIGURA 49 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto BM 4 (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD).

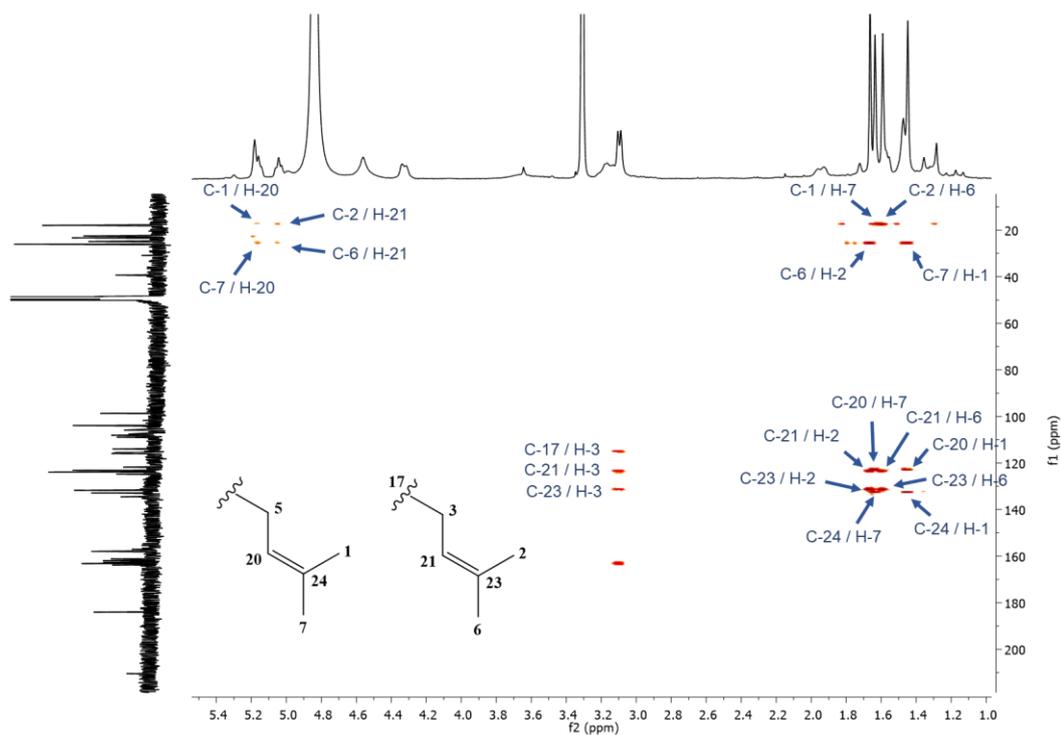


FIGURA 50 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 3 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

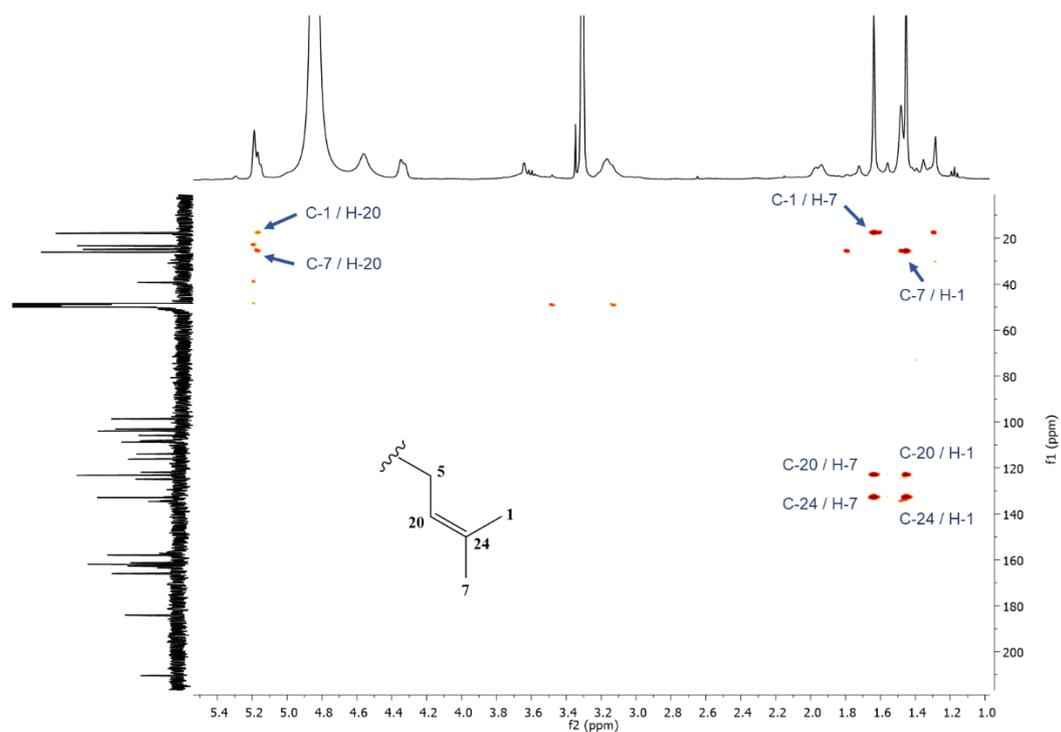
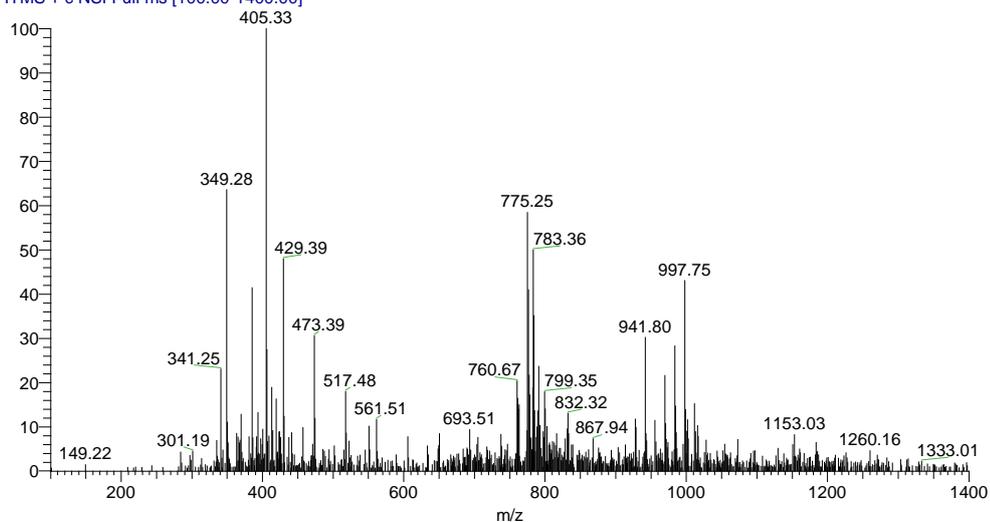


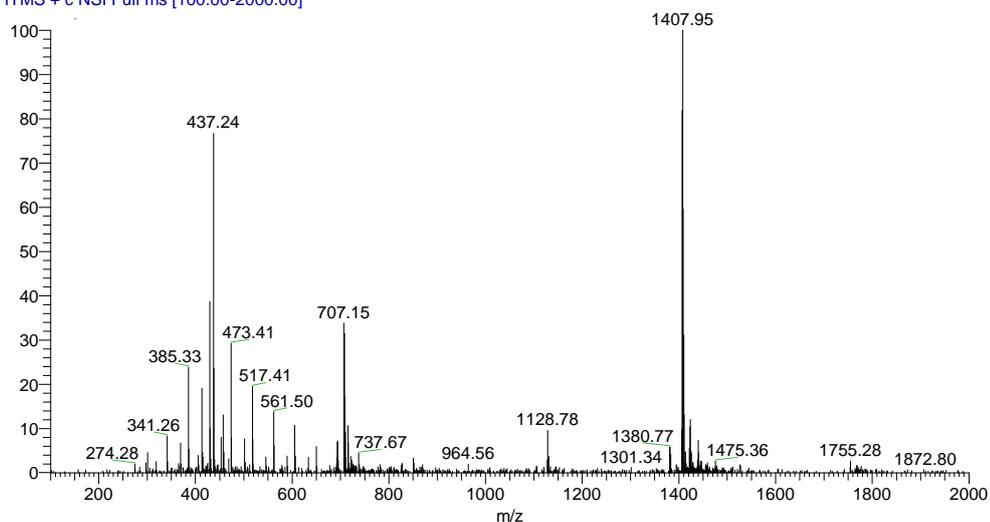
FIGURA 51 – Seção expandida do mapa de contornos HMBC  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  do composto BM 4 (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ).

Bruba.Martins\_2018.02.22\_BM3 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.58E4  
T: ITMS + c NSI Full ms [100.00-1400.00]



**FIGURA 52 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-MS, modo positivo, para o composto BM 3.**

Bruba.Martins\_2018.02.22\_BM4 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 3.75E4  
T: ITMS + c NSI Full ms [100.00-2000.00]



**FIGURA 53 – Espectro de massas obtido por ionização ESI-MS, modo positivo, para o composto BM 4.**

## 5 CONCLUSÕES

O estudo do extrato etanólico de raízes da variedade **IZ 40** de *M. alba* resultou no isolamento de quatro compostos (**BM 1** - **BM 4**), por meio de utilização de técnicas cromatográficas clássicas e instrumentais. Esta matriz se mostrou complexa, onde a presença de substâncias de estruturas químicas semelhantes dificultou uma boa separação.

Os teores dos compostos foram determinados e, a partir da análise do perfil cromatográfico obtido para os compostos e para os extratos etanólicos de raízes de seis variedades de *M. alba*, verificou-se que três dentre as quatro substâncias isoladas (**BM 1**, **BM 3** e **BM 4**) correspondem a compostos majoritários nestes extratos, podendo ser consideradas marcadores químicos destas amostras.

Em relação aos ensaios de avaliação da atividade antioxidante dos compostos isolados, **BM 2** foi o que apresentou maior atividade antioxidante frente a todos os protocolos testados. Para os demais compostos, os resultados obtidos variaram entre as diferentes metodologias, o que mostra a importância de realizar a análise frente a diferentes mecanismos/protocolos de ação. Ressaltam-se também os resultados para o composto **BM 1**, que embora apresente moderada atividade antioxidante quando analisado independentemente, mostrou correlação estatística entre seus teores nos extratos e a atividade antioxidante apresentada para os mesmos, na maioria dos extratos. Desta forma, infere-se a corresponsabilidade de **BM 1** na atividade antioxidante dos extratos etanólicos das raízes de *M. alba*, em um provável sinergismo com outras substâncias bioativas.

Para os compostos isolados e extratos etanólicos, obteve-se porcentagens de inibição da enzima acetilcolinesterase próximas, com destaque para o composto **BM 1** e o extrato **IZ 40**. Para estas duas amostras realizou-se também o ensaio para avaliação da capacidade neuroprotetora em *D. melanogaster*, contra a exposição a toxina rotenona, com resultados promissores. Com isso, gera-se um maior interesse no aprofundamento de estudos das raízes de *M. alba* visando a prevenção de doenças neurodegenerativas.

De forma geral, conclui-se que os compostos isolados são bioativos e, estando presentes em grandes quantidades no material vegetal estudado, a exploração de seu potencial biológico é de interesse.

Finalmente, **BM 1** e **BM 2** puderam ter suas estruturas químicas caracterizadas e foram identificados como sendo o flavonoide morusina e o derivado geranilado de 2-arilbenzofurano, mulberrofurano B, respectivamente. Como perspectivas futuras, visa-se o isolamento de **BM 3** e **BM 4** com maior pureza, de forma a permitir a caracterização completa e inequívoca de suas estruturas químicas.

## REFERÊNCIAS

ADÁN, M. A. G. Las moscas de la fruta: obtención, mantenimiento y cria de este popular alimento para pequeñas mascotas. **Revista de la SECA**, n. 1, p. 17-23.

AHMAD, M.; BABA, W. N.; WANI, T. A.; GANI, A.; GANI, A.; SHAH, U.; WANI, S. M.; MASOODI, F. A. Effect of green tea powder on thermal, rheological & functional properties of wheat flour and physical, nutraceutical & sensory analysis of cookies. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 9, p. 5799-5807, 2015.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

BALANDRIN, M. F.; KINGHORN, A. D.; FARNSWORTH, N. R. Plant-derived natural products in drug discovery and development: an overview. **Human Medicinal Agents from Plants**, v. 5, p. 2-12, 1993.

BALDI, A.; SRIVASTAVA, A. K.; BISARIA, V. S. **Fungal elicitors for enhanced production of secondary metabolites in plant cell suspension cultures**. In: Varma, A.; Kharkwal, A. C. (Org.). *Symbiotic Fungi*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.

BHAMRA, S. K.; SLATER, A.; HOWARD, C.; JOHNSON, M.; HEINRICH, M. The use of traditional herbal medicines amongst South Asian diasporic communities in the UK. **Phytotherapy research**, v. 31, n. 11, p. 1786-1794, 2017.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European Journal of Pharmacology**, v. 585, n. 2-3, p. 325-337, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BUTT, M. S.; NAZIR, A.; SULTAN, M. T.; SCHROËN, K. *Morus alba* L. nature's functional tonic. **Trends in Food Science & Technology**, v. 19, n. 10, p. 505-512, 2008.

CHAN, E. W.-C.; LYE, P.-Y.; WONG, S.-K. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 14, n. 1, p. 17-30, 2016.

CHANG, L.-W.; JUANG, L.-J.; WANG, B.-S.; WANG, M.-Y.; TAI, H.-M.; HUNG, W.-J.; CHEN, Y.-J.; HUANG, M.-H. Antioxidant and antityrosinase activity of mulberry (*Morus alba* L.) twigs and root bark. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 785-790, 2011.

CHAUDHURI, A.; BOWLING, K.; FUNDERBURK, C.; LAWAL, H.; INAMDAR, A.; WANG, Z.; O'DONNELL, J. M. Interaction of genetic and environmental factors in a *Drosophila* Parkinsonism model. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 10, p. 2457-2467, 2007.

COULOM, H.; BIRMAN, S. Chronic exposure to rotenone models sporadic Parkinson's Disease in *Drosophila melanogaster*. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 48, p. 10993–10998, 2004.

D'AMELIA, V.; AVERSANO, R.; CHIAIESE, P.; CARPUTO, D. The antioxidant properties of plant flavonoids: their exploitation by molecular plant breeding. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 3, p. 611-625, 2018.

D'ANDREA, G. Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications? **Fitoterapia**, v. 106, p. 256-271, 2015.

DAT, N. T.; BINH, P. T. X.; QUYNH, L. T. P.; MINH, C. V.; HUONG, H. T.; LEE, J. J. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1224-1227, 2010.

DELBONE, C. A. C. Importância ecológica e evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In: CONGRESSO DE EDUCAÇÃO DO NORTE PIONEIRO, 10., 2010, Jacarezinho. **Anais...** Jacarezinho: UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná – Centro de Ciências Humanas e da Educação e Centro de Letras Comunicação e Artes, 2010. p. 396-404.

DEVI, B.; SHARMA, N.; KUMAR, D.; JEET, K. *Morus alba* Linn: a phytopharmacological review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 14-18, 2013.

DIXON, R. A. Natural products and plant disease resistance. **Nature**, v. 411, n. 6839, p. 843-847, 2001.

EGEA, I.; SÁNCHEZ-BEL, P.; ROMOJARO, F.; PRETEL, M. T. Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 2, p. 121–129, 2010.

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRESS JR., V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 88-90, 1961.

FERREIRA, T. S.; MOREIRA, C. Z.; CÁRIA, N. Z.; VICTORIANO, G.; SILVA JÚNIOR, W. F.; MAGALHÃES, J. C. Phytotherapy: an introduction to its history, use and application. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 290-298, 2014.

FREITAS, V. S.; RODRIGUES, R. A. F.; GASPI, F. O. G. Propriedades farmacológicas da *Aloe vera* (L.) Burm. f. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 299-307, 2014.

FRIES, A. T.; FRASSON, A. P. Z. Avaliação da atividade antioxidante de cosméticos anti-idade. **Revista Contexto & Saúde**, v. 10, n. 19, p. 17-23, 2010.

HUANG, Q.-H.; LEI, C.; WANG, P.-P.; LI, J.-Y.; LI, J.; HOU, A.-J. Isoprenylated phenolic compounds with PTP1B inhibition from *Morus alba*. **Fitoterapia**, v. 122, p. 138-143, 2017.

JIMÉNEZ, E. V.; TOVAR, J.; MOSQUERA, O. M.; CARDOZO, F. Actividad neuroprotectora de *Solanum ovalifolium* (Solanaceae) contra la toxicidad inducida por rotenona en *Drosophila melanogaster*. **Revista Facultad de Ciencias Básicas**, v. 13, n. 1, p. 26-34, 2017.

JOHNSTONE, C.; DAY, J. G.; STAINES, H.; BENSON, E. E. 2,2'-azinobis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolourisation assay for evaluating total antioxidant status in an alga used to monitor environmental impacts in urban aquatics habitats. **Ecological indicators**, v. 6, n. 2, p. 280-289, 2006.

JUNG, J.-W.; KO, W.-M.; PARK, J.-H.; SEO, K.-H.; OH, E.-J.; LEE, D.-Y.; LEE, D.-S.; KIM, Y.-C.; LIM, D.-W.; HAN, D., BAEK, N.-I. Isoprenylated flavonoids from the root bark of *Morus alba* and their hepatoprotective and neuroprotective activities. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n. 11, p. 2066-2075, 2015.

KIM, J. Y.; LEE, W. S.; KIM, Y. S.; CURTIS-LONG, M. J.; LEE, B. W.; RYU, Y. B., PARK, K. H. Isolation of cholinesterase-inhibiting flavonoids from *Morus lhou*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 4589-4596, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

LEOPOLDINI, M.; RUSSO, N.; TOSCANO, M. The molecular basis of working mechanism of natural polyphenolic antioxidants. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 288-306, 2011.

LI, H.; WANG, Q.; DONG, L.; LIU, C.; SUN, Z.; GAO, L.; WANG, X. Morusin suppresses breast cancer cell growth in vitro and in vivo through C/EBP $\beta$  and PPAR $\gamma$  mediated lipoapoptosis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 34, n. 137, p. 1-12, 2015.

LI, M.; WU, X.; WANG, X.; SHEN, T.; REN, D. Two novel compounds from the root bark of *Morus alba* L. **Natural Product Research**, v. 32, n. 1, p. 36-42, 2017.

LIU, H.; QIU, N.; DING, H.; YAO, R. Polyphenols contents and antioxidant capacity of 68 Chinese herbals suitable for medical or food uses. **Food Research International**, v. 41, n. 4, p. 363-370, 2008.

LU, B.; VOGEL, H. *Drosophila* models of neurodegenerative diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 4, p. 315-342, 2009.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, n. 1, p. 214-222, 2009.

MANS, R. A.; WARMUS, B. A.; SMITH, C. C.; MCMAHON, L. L. An acetylcholinesterase inhibitor, eserine, induces long-term depression at CA3-CA1 synapses in the hippocampus of adult rats. **Journal of Neurophysiology**, v. 112, n. 10, p. 2388-2397, 2014.

MARINOVA, G.; BATCHVAROV, V. Evaluation of the methods for determination of the free radical scavenging activity by DPPH. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 17, n. 1, p. 11-24, 2011.

MARTÍN, G. J.; PENTÓN, G.; NODA, Y.; CONTINO, Y.; DÍAZ, M.; OJEDA, F.; JIMÉNEZ, F. A.; LÓPEZ, O.; AGRAMONTE, D.; MILERA, M.; PRIETO, M. Behavior of mulberry (*Morus alba* L.) and its impact on the animal production and the breeding of silkworms in Cuba. **Cuban Journal of Agricultural Science**, v. 48, n. 1, p. 73-77, 2014.

MAZIMBA, O.; MAJINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 6, p. 751-754, 2011.

MILANI, L. I. G.; TERRA, N. N.; FRIES, L. L. M.; CICHOSKI, A. J.; REZER, A. P. de S.; BACKES, A. M.; PARODIA, C. G. In vitro antioxidant and antimicrobial properties of persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Rama Forte) extracts. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 118-124, 2012.

MOHAJERI, M. H.; TROESCH, B.; WEBER, P. Inadequate supply of vitamins and DHA in the elderly: implications for brain aging and Alzheimer-type dementia. **Nutrition**, v. 31, n. 2, p. 261-275, 2015.

MURALIDHARA, R. H. Neuroprotective efficacy of *Bacopa monnieri* against rotenone induced oxidative stress and neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*. **NeuroToxicology**, v. 30, n. 6, p. 977-985, 2009.

NAGAR, P. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, v. 9, n. 2, 2018.

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

NOMURA, T.; FUKAI, T.; YAMADA, S.; KATAYANAGAI, M. Phenolic constituents of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 11, p. 2898-2900, 1976.

NOMURA, T.; FUKAI, T.; KATAYANAGI, M. Kuwanon A, B, C and Oxydihydromorusin, four new flavones from the root bark of the cultivated mulberry tree (*Morus alba* L.). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 3, p. 529-532, 1977.

NOMURA, T.; FUKAI, T. Mulberrofuran B, a new isoprenoid 2-arylbenzofuran from the root bark of the cultivated mulberry tree. **Planta medica**, v. 48, p. 197-199, 1981.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

OU, B.; HUANG, D.; HAMPSCH-WOODILL, M.; FLANAGAN, J. A.; DEEMER, E. K. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128, 2002.

OYAIZU, M. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, v. 44, p. 307-315, 1986.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 9, p. 3377-3380, 2008.

PISOSCHI, A. M.; NEGULESCU, G. P. Methods for total antioxidant activity determination: a review. **Biochemistry and Analytical Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2011.

POSADZKI, P.; WATSON, L. K.; ERNST, E. Adverse effects of herbal medicines: an overview of systematic reviews. **Clinical Medicine**, v. 13, n. 1, p. 7-12, 2013.

PRIETO, M. A.; DÍAS, M. S.; PÉREZ, M. del C. H.; MARTÍN, D. P. Influence of three *Morus alba* L. varieties on the growth of *Bombyx mori* L. **Pastos y Forrajes**, v. 39, n.3, p. 197-202, 2016.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E<sub>1</sub>. **Analytical Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

QIN, J.; FAN, M.; HE, J.; WU, X.-D.; PENG, L.-Y.; SU, J.; CHENG, X.; LI, Y.; KONG, L.-M.; LI, R.-T.; ZHAO, Q.-S. New cytotoxic and anti-inflammatory compounds isolated from *Morus alba* L. **Natural Product Research**, v. 29, n. 18, p. 1711-1718, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.

SANDE, D.; SOLARES, M. D.; RODRÍGUEZ, Y. E. M.; CABRERA, I. C.; CARBALLO, L. F.; PÉREZ, N. A.; MORALES, Y. L.; COLENC, G.; TAKAHASHI, J. A. Roots from mulberries (*Morus alba*) natural and hybrids varieties: phenolic content and nutraceutical potential as antioxidant. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 6, n. 11, p. 63-69, 2016.

SHAH, R. The role of nutrition and diet in alzheimer disease: a systematic review. **JAMDA**, v. 14, n. 6, p. 398-402, 2013.

SHI, Y.-Q.; FUKAI, T.; SAKAGAMI, H.; CHANG, W.-J.; YANG, P.-Q.; WANG, F.-P.; NOMURA, T. Cytotoxic flavonoids with isoprenoid groups from *Morus mongolica*. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 2, p. 181-188, 2001.

SHIKANGA, E. A.; COMBRINCK, S.; REGNIER, T. South African *Lippia* herbal infusions: total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities. **South African Journal of Botany**, v. 76, n. 3, p. 567-571, 2010.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINDHI, V.; GUPTA, V.; SHARMA, K.; BHATNAGAR, S.; KUMARI, R.; DHAKA, N. Potential applications of antioxidants - a review. **Journal of pharmacy research**, v. 7, n. 9, p. 828-835, 2013.

SINGH, R.; BAGACHI, A.; SEMWAL, A.; KAUR, S.; BHARADWAJ, A. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of *Morus alba* Linn.: a review. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 9, p. 461-469, 2013.

SKOOG, A. D.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, R. S. **Fundamentos de Química Analítica**, tradução da 8ª ed. norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SRIVASTAVA, S.; KAPOOR, R.; THATHOLA, A.; SRIVASTAVA, R. P. Nutritional quality of leaves of some genotypes of mulberry (*Morus alba*). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 57, n. 5/6, p. 305-313, 2006.

TAN, Y.-X.; YANG, Y.; ZHANG, T.; CHEN, R.-Y.; YU, D.-Q. Bioactive 2-arylbenzofuran derivatives from *Morus wittiorum*. **Fitoterapia**, v. 81, p. 742-746, 2010.

TAPPIN, M. R. R.; LUCCHETTI, L. Sobre a legislação de registro de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 3, n. 1, p. 17-30, 2007.

TEIXEIRA, D. R. T. **Mimetics of donepezil as potencial hybrid drugs against Alzheimer's disease**: synthesis and biochemical evaluation. 2017. Dissertação – Departamento de Química e Bioquímica, Universidade de Lisboa, Lisboa, 2017.

UMAMAHESWARI, M.; CHATTERJEE, T. K. *In vitro* antioxidant activities of the fractions of *Coccinia grandis* L. leaf extract. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, n. 1, p. 61-73, 2008.

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

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

VILLAÑO, D.; FERNÁNDEZ-PACHÓN, M. S.; MOYÁ, M. L.; TRONCOSO, A. M.; GARCÍA-PARRILLA, M. C. Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards DPPH free radical. **Talanta**, v. 71, n. 1, p. 230-235, 2007.

WOLSKI, T.; NAJDA, A.; KĘDZIA, B.; WOLSKA-GAWRON, K. Phytotherapy of dermatological diseases. **Postępy Fitoterapii**, v. 18, n. 4, p. 298-308, 2017.

YANG, Z.; SHAO, Q.; GE, Z.; AI, N.; ZHAO, X.; FAN, Xiaohui. A bioactive chemical markers based strategy for quality assessment of botanical drugs: Xuesaitong Injection as a case. **Study Scientific Reports**, v. 7, n. 2410, p. 1-11, 2017.

ZAFAR, M. S.; MUHAMMAD, F.; JAVED, I.; AKHTAR, M.; KHALIQ, T.; ASLAM, B.; WAHEED, A.; YASMIN, R.; ZAFAR, H. White mulberry (*Morus alba*): a brief phytochemical and pharmacological evaluations account. **International Journal of Agriculture & Biology**, v. 15, n. 3, p. 612-620, 2013.

ZELÍK, P.; LUKEŠOVÁ, A.; VOLOSHKO, L. N.; ŠTYS, D.; KOPECKÝ, J. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in cyanobacteria of the genus *Nostoc*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 2, p. 531-536, 2009.

ZHANG, Y.-L.; LUO, J.-G.; WAN, C.-X.; ZHOU, Z.-B.; KONG, L.-Y. Geranylated 2-arylbenzofurans from *Morus alba* var. *tatarica* and their  $\alpha$ -glucosidase and protein tyrosine phosphatase 1B inhibitory activities. **Fitoterapia**, v. 92, p. 116-126, 2014.

ZHENG, Z.-P.; CHENG, K.-W.; ZHU, Q.; WANG, X.-C.; LIN, Z.-X.; WANG, M. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 9, p. 5368-5373, 2010.