



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO – UFPE**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS E SAÚDE – CCS**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS – DCFAR**

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DAS  
FOLHAS DE *Morus nigra* L.**

**JOAQUIM GOMES DE MELO NETO**

**RECIFE**

**2022**

JOAQUIM GOMES DE MELO NETO

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DAS  
FOLHAS DE *Morus nigra* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Pernambuco, Centro acadêmico de Ciências e Saúde, como requisito para obtenção de título de grau Bacharel em Farmácia.

**Orientador:** Prof. Dr. Pedro Rolim Neto

**Co-orientador(a):** Me. Larissa Pereira Alves

**RECIFE**

**2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Melo Neto, Joaquim Gomes de .

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO  
DAS FOLHAS DE *Morus nigra* L. / Joaquim Gomes de Melo Neto. - Recife,  
2022.

54 : il., tab.

Orientador(a): Pedro José Rolim Neto

Coorientador(a): Larissa Pereira Alves

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Farmácia - Bacharelado, 2022.

Inclui referências, apêndices.

1. *Morus nigra* L. 2. Compostos fenólicos. 3. Flavonóides. 4. Antioxidantes. I.  
Rolim Neto, Pedro José . (Orientação). II. Alves, Larissa Pereira. (Coorientação).  
III. Título.

610 CDD (22.ed.)

JOAQUIM GOMES DE MELO NETO

**PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL NA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DAS  
FOLHAS DE *Morus nigra* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Pernambuco, Centro acadêmico de Ciências e Saúde, como requisito para obtenção de título de grau Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 21/12/2022.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Me. Lucas Amadeu Gonzaga da Costa (Examinador)  
Universidade Estadual de Pernambuco

---

Me. Demis Ferreira de Melo (Examinador)  
Universidade Federal de Campina Grande

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus e a Nossa Senhora; que me forneceram forças, saúde e me presentearam com a oportunidade de crescer feliz em meio as melhores pessoas possíveis.

Aos meus pais; pelo amor incondicional, apoio e ensinamentos, além de sempre fazer o possível e o impossível para realizar os meus sonhos.

Às minhas avós; Maria de Lourdes e Maria Lúcia por me amarem e rogarem bênçãos aos céus por mim, além de me propiciar condições para chegar até aqui.

À minha irmã; Maria Eduarda, por ser sempre alguém com quem posso contar.

Aos meus amigos e familiares; que sempre torceram por mim e alegraram minha vida até aqui.

Aos meus amigos de sala de aula; José Guido, Micaleyde, Maria Eduarda, Isabella e Maria Clara por me ajudarem no decorrer do curso, incentivarem, além de tornar mais tranquila a estadia na universidade.

À Alanna; que, ao longo de nossos cinco anos juntos, sempre demonstrou o máximo companheirismo e amor por mim.

Ao professor Pedro Rolim Neto; por me inspirar e por permitir que eu adentrasse ao laboratório de Tecnologia Farmacêutica, onde nele foi possível realizar todos os experimentos realizados no estudo e por me possibilitar amadurecer como profissional e crescer como ser humano.

À Larissa Pereira; pela paciência e por ser uma excelente pessoa e sempre estar disposta a me ensinar, tornando-se uma luz que me guiou durante todos esses meses.

À todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

## RESUMO

As plantas medicinais são, muitas vezes, o único recurso disponível para o tratamento de enfermidades e para algumas culturas ainda presentes no mundo, o uso delas é tão antigo quanto a humanidade. Graças à medicina popular, foi possível observar o potencial terapêutico da *Morus nigra* L., mais popularmente conhecida como amora preta. É uma planta oriunda da Ásia, da família Moraceae, com maior abundância de produção frutífera na Ásia menor e que foi importada ao Brasil por imigrantes japoneses. Na medicina popular, o chá das folhas de *Morus nigra* L. é utilizado por mulheres no combate aos sintomas pré-menstruais ou da menopausa, como também há relatos do uso contra diabetes, hipercolesterolemia e gota, esses benefícios estão relacionados com a presença de variadas substâncias, como por exemplo compostos fenólicos, esses que são, muitas vezes, moléculas de interesse comercial e que podem estar presentes em mais ou menos quantidade na planta a depender de condições climáticas, geográficas, sazonalidade ou coleta. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi maximizar a quantificação dos compostos fenólicos por meio de técnicas de caracterização analíticas e determinar a capacidade antioxidante dos extratos aquosos de *Morus nigra* L. da Paraíba e de Pernambuco. Foi realizada a caracterização das drogas vegetais e dos extratos fluidos, bem como obtido um planejamento fatorial fracionado dos extratos, para maximização de três variáveis dependentes: isoquercetina, rutina e ácido clorogênico. Para o extrato de Pernambuco obteve-se como resultado a escolha do extrato EaMn2, com os valores de 70° para a temperatura, a proporção droga:solvente (25:250) e o tempo de extração de 60 minutos; enquanto que para o extrato da Paraíba o extrato EaMn4 foi o escolhido pois apresentou os melhores resultados, com temperatura de 85°; proporção droga:solvente 25:250 e tempo de extração de 30 min. Com relação a quantidade de compostos fenólicos totais equivalente ao ácido gálico (GAE) foi encontrado para o extrato da Paraíba o valor de 7,05 mg.g<sup>-1</sup>/GAE enquanto que para o extrato de Pernambuco 3,424 mg.g<sup>-1</sup>/GAE, estes resultados corroboram com os dados da literatura. A capacidade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) obteve IC50 (50% da concentração inibitória) de 1220 µg/mL para o extrato da Paraíba e de 1913 µg/mL para o extrato de Pernambuco. Sendo assim, pôde-se determinar as melhores condições de extração destes extratos, os resultados obtidos para o extrato da Paraíba apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante frente ao extrato de Pernambuco, parâmetros que servem para avaliar o potencial de estudo de uma droga vegetal como produto comercial promissor.

**Palavras-chave:** *Morus nigra* L.; Compostos fenólicos; Flavonóides; Antioxidantes.

## ABSTRACT

Medicinal plants are often the only resource available for the treatment of illnesses and for some cultures still present in the world, their use is as old as humanity. Thanks to popular medicine, it was possible to observe the therapeutic potential of *Morus nigra* L., more popularly known as blackberry. It is a plant from Asia, from the Moraceae family, with a greater abundance of fruit production in Asia Minor and which was imported to Brazil by Japanese immigrants. In folk medicine, *Morus nigra* L. leaf tea is used by women to combat premenstrual or menopausal symptoms, as there are also reports of its use against diabetes, hypercholesterolemia, and gout, these benefits are related to the presence of various substances, such as phenolic compounds, which are often molecules of commercial interest and which may be present in more or less quantity in the plant depending on climatic, geographic, seasonality or collection conditions. In this context, the objective of the present work was to maximize the quantification of phenolic compounds through analytical characterization techniques and to determine the antioxidant capacity of aqueous extracts of *Morus nigra* L. from Paraíba and Pernambuco. The characterization of plant drugs and fluid extracts was carried out, as well as a fractional factorial design of the extracts, to maximize three dependent variables: isoquercetin, rutin, and chlorogenic acid. For the Pernambuco extract, the result was the choice of the EaMn2 extract, with values of 70° for the temperature, the drug:solvent ratio (25:250), and the extraction time of 60 minutes; while for the Paraíba extract, the EaMn4 extract was chosen because it presented the best results, with a temperature of 85°; drug:solvent ratio 25:250 and extraction time of 30 min. Regarding the amount of total phenolic compounds equivalent to gallic acid (GAE), a value of 7.05 mg.g-1/GAE was found for the Paraíba extract, while for the Pernambuco extract 3.424 mg.g-1/GAE, these results corroborate data from the literature. The ability to scavenge the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) obtained an IC50 (50% of the inhibitory concentration) of 1220 µg/mL for the Paraíba extract and 1913 µg/mL for the Pernambuco extract. Thus, it was possible to determine the best conditions for extracting these extracts, the results obtained for the extract from Paraíba showed greater amounts of phenolic compounds and greater antioxidant capacity compared to the extract from Pernambuco, parameters that serve to evaluate the potential of the study of a plant drug as a promising commercial product.

**Key words:** *Morus nigra* L.; Phenolic compounds; Flavonoids; Antioxidant.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Frutos e folhas de <i>Morus nigra</i> L.....	15
<b>Figura 2</b> – Estrutura química básica dos flavonoides.....	18
<b>Figura 3</b> – Organização do Planejamento experimental.....	21
<b>Figura 4</b> – Influência das variáveis $X_1$ (T °C), $X_2$ (T min) e $X_3$ (Droga:solvente) do extrato de Pernambuco e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina(A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).....	38
<b>Figura 5</b> – Influência das variáveis $X_1$ (T °C), $X_2$ (T min) e $X_3$ (Droga:solvente) do extrato da Paraíba e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina (A), rutina (B) e ácido clorogênico (C).....	39
<b>Figura 6</b> – Superfícies de resposta que descrevem o teor de isoquercetina para o extrato obtido de Pernambuco (esquerda) e da Paraíba (direita) em função da razão temperatura ( $X_1$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) e droga:solvente ( $X_3$ ).....	42

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Caracterização dos compostos fenólicos.....	18
---	----

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Níveis de desenho experimental para o método de extração do EA Mn.....	25
<b>Tabela 2</b> – Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE.....	26
<b>Tabela 3</b> – Resultados da granulometria aplicada dos pós aos extratos da Paraíba e Pernambuco.....	30
<b>Tabela 4</b> – Matriz de design experimental e resultados obtidos para o teor dos polifenóis.....	34
<b>Tabela 5</b> – ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de <i>Morus nigra</i> L. Pernambuco.....	35
<b>Tabela 6</b> – ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de <i>Morus nigra</i> L. Paraíba.....	36
<b>Tabela 7</b> – Equivalente em ácido gálico dos compostos fenólicos presente nos extratos.....	44
<b>Tabela 8</b> – Concentração inibitória do radical DPPH dos extratos da Paraíba e Pernambuco.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	Radical 2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ANOVA	Análise de Variância
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a arranjo de Diodo
DPPH	Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazil (ou 2,2-difenil-1-picrilidrazil)
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
UV-VIS	Ultravioleta-visível
MG	Miligrama
IC50	50% da concentração inibitória
TROLOX	(6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametacromano-Ácido 2- carboxílico)
NM	Nanômetro
G	Gramma
L	Litro
ISO	Isoquercetina
RUT	Rutina
AC	Ácido clorogênico
µg	Micrograma
R <sup>2</sup>	Coefficiente de determinação
DoE	<i>Design of experiments</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
GAE	Equivalente ao ácido gálico

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>13</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>14</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>14</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>14</b>
<b>4 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
<b>4.1 <i>Morus nigra</i> L.</b> .....	<b>15</b>
<b>4.2 Compostos fenólicos</b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 Ação antioxidante</b> .....	<b>19</b>
<b>4.4 Planejamento experimental</b> .....	<b>20</b>
<b>4.5 Planejamento fatorial</b> .....	<b>21</b>
<b>4.6 Planejamento fatorial fracionado</b> .....	<b>22</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1 Materiais</b> .....	<b>23</b>
<b>5.1.1 MATÉRIA VEGETAL</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2 Métodos</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.1.1 Determinação por perda de dessecação</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.1.2 Determinação da granulometria dos pós</b> .....	<b>23</b>
<b>5.2.1.3 Determinação de cinzas totais</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>MORUS NIGRA</i> L. PARA MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2.2.1 Desenvolvimento do desenho experimental</b> .....	<b>24</b>
<b>5.2.2.2 Preparação do extrato</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2.2.3 Determinação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)</b> .....	<b>25</b>
<b>5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO FLUÍDO</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2.3.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2.3.2 Determinação da densidade relativa</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2.3.3 Determinação do resíduo seco em extratos fluidos</b> .....	<b>27</b>
<b>5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA NA REGIÃO UV-VIS</b> .....	<b>27</b>

5.2.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA (OU REDUTORA) DO RADICAL DPPH .....	27
5.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	28
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1 Caracterização da droga vegetal.....</b>	<b>29</b>
6.1.1 PERDA POR DESSECAÇÃO .....	29
6.1.2 GRANULOMETRIA DOS PÓS .....	29
6.1.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS .....	31
<b>6.2 DoE para aprimoramento da eficiência da extração.....</b>	<b>31</b>
<b>6.3 Efeito das variáveis de entrada (X<sub>1-3</sub>) para o teor de polifenóis (Y<sub>1-3</sub>).....</b>	<b>36</b>
<b>6.4 Caracterização do extrato líquido.....</b>	<b>44</b>
6.4.1 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH).....	44
6.4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA.....	44
6.4.3 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO .....	44
<b>6.5 Determinação dos compostos fenólicos nos extratos de <i>Morus nigra</i> L. ....</b>	<b>44</b>
<b>6.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH.....</b>	<b>45</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>8 PERSPECTIVAS FUTURAS .....</b>	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>49</b>
<b>APÊNDICE A – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE <i>Morus nigra</i> L. de PE.....</b>	<b>53</b>
<b>APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE <i>Morus nigra</i> L. de PB.....</b>	<b>54</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são, muitas vezes, o único recurso disponível para o tratamento de enfermidades e para algumas culturas ainda presentes no mundo, o uso delas é tão antigo quanto o homem. Essa prática atende uma diversidade populacional, entre eles: o consumidor individual, vendedores de feiras livres, casa de produtos, mercados e ervanários (MACIEL et al., 2002). O elevado custo dos medicamentos sintéticos, pelas precárias condições financeiras, morosidade do sistema de saúde e a facilidade de acesso às ervas medicinais cultivadas em seus quintais ou comunidades, influenciam grande parte da população a utilizar essas plantas. Na indústria farmacêutica, são largamente utilizadas na produção de fitoterápicos e cosméticos (TUPINAMBÁ et al., 2021).

A amora-preta (*Morus nigra* L.) é uma planta oriunda da Ásia, da família Moraceae, com maior abundância de produção frutífera na Ásia menor e que foi importada ao Brasil por imigrantes japoneses. Na medicina popular, o chá das folhas de *Morus nigra* L. é utilizado por mulheres no combate aos sintomas pré-menstruais ou da menopausa, como também há relatos do uso contra diabetes, hipercolesterolemia e gota (BARROSO et al., 2020; MIRANDA et al., 2010).

Graças à medicina popular, foi possível observar o potencial terapêutico da *Morus nigra* L. Suas folhas possuem quantidades consideráveis de compostos fenólicos, apesar desses, em sua maioria, serem rapidamente degradados no trato gastrointestinal (SCHAFRANSKI, 2019). As folhas ainda possuem metabólitos secundários como alcalóides, depsídeos e depsídonas, taninos e saponinas, que podem apresentar uma série de benefícios, dentre eles: regulação da pressão arterial, bem como capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antibiótica e antitumoral (ROSA et al., 2016).

Desta forma, uma etapa importante no processo de produção de medicamentos fitoterápicos, é a preparação do insumo farmacêutico ativo. Considerando a influência de vários fatores, tais como: o método de extração, propriedade de diversos solventes, condições extrativas, variação na produção de princípios ativos pelo vegetal, bem como o clima, solo e condições de cultivo da planta influenciam tanto no teor, quanto na diferença entre compostos fenólicos presentes (GUIDO et al., 2018). A padronização e controle desses fatores na produção das drogas e derivados vegetais é imprescindível para a qualidade do produto fitoterápico.

Diante das atividades farmacológicas demonstradas e o uso popular da espécie *Morus nigra* L., assim como a importância da padronização da droga vegetal, faz-se relevante uma pesquisa, a fim de obter uma padronização dos extratos das folhas de *Morus nigra* L. fazendo o uso de um planejamento fatorial e diversas técnicas analíticas.

## 2 JUSTIFICATIVA

*Morus nigra* L. é conhecida popularmente como “amora-preta” ou “amora-miúra”. Sua árvore tem de 4 a 12 metros, com frutos muito palatáveis e suculentos. É uma planta medicinal com várias atividades farmacológicas e a investigação científica das suas folhas pela população para fins medicinais é interessante à medida que muitas informações populares podem ser verificadas para garantir-se da qualidade e inocuidade de tais produtos fitoterápicos (HAIDA et al., 2014)

Nessa perspectiva, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 26 de 13/05/2014, define que fitoterápicos são os medicamentos produzidos com o emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, com eficácia e segurança baseada em evidências clínicas que apresentam constância na sua qualidade. Portanto, para que uma planta medicinal possa ser utilizada como medicamento fitoterápico de forma segura, torna-se necessária sua padronização, ou seja, a autenticidade da droga vegetal e seu teor de princípios ativos devem ser estabelecidos dentro dos critérios de qualidade (BRASIL, 2014; BOFANTE et al., 2021).

Em virtude da existência de poucos estudos na literatura correlacionando o local de coleta e o teor de compostos fenólicos torna-se clara a necessidade de realização de um estudo de comparação entre extratos de *Morus nigra* L., buscando a maximização do teor de compostos fenólicos. Similarmente, é essencial o surgimento de mais estudos que avaliem a capacidade e quantificação de compostos antioxidantes no extrato de amoreira-negra, dada a sua presença marcante em plantas medicinais. Os antioxidantes são importantes alvos de pesquisa porque são capazes de defender o organismo dos radicais livres, o que diminui o risco de incidência de várias doenças, por exemplo, doenças neurodegenerativas, doenças cardiovasculares entre outras (ZATTI et al., 2022).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Maximizar a quantificação dos compostos fenólicos por meio de técnicas de caracterização analíticas e determinar a capacidade antioxidante dos compostos dos extratos aquosos de *Morus nigra* L do estado da Paraíba e de Pernambuco.

#### 3.2 Específicos

- Realizar a caracterização farmacognóstica da droga vegetal de *Morus nigra* L. coletada na Paraíba e no Pernambuco;
- Desenvolver o método de extração da droga vegetal, extrato aquoso de *Morus nigra* L., a partir de planejamento fatorial fracionado  $3^{3-1}$ , utilizando como fatores independentes: temperatura de extração, tempo para filtração e proporção droga: solvente;
- Quantificar e identificar os marcadores químicos majoritários por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a arranjo de diodo (CLAE-DAD);
- Quantificar compostos fenólicos totais por espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-VIS);
- Avaliar os compostos antioxidantes pelo método de DPPH;

## 4 REFERENCIAL TEÓRICO

### 4.1 *Morus nigra* L.

O gênero *Morus* detém 24 espécies e apenas uma subespécie, com descrição na literatura de 100 variedades (ERCISLI, ORHAN, 2006). É uma espécie de fácil adaptação a climas subtropicais e temperados, incluindo grande adaptação a variados tipos de solos, chegando a ser considerada uma espécie cosmopolita devido a sua grande adaptação a vários climas, solos e diferenças de altitudes. Assim como em outros locais, em solo brasileiro, a planta não encontrou dificuldades em adaptar-se à região, sendo rapidamente incorporada à agricultura familiar (PADILHA et al., 2010; BARROSO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2013).

**Figura 1** – Frutos e folhas de *Morus nigra* L.



**Fonte:** Jardim Botânico da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (JBUTAD), Isabel Garcia-Cabral, 2017.

Na Ásia, mais especificamente na China, espécies de amoreiras estão ligadas a agricultura, suas folhas servem de alimento para o bicho da seda ou na produção de biomassa para alimentação do gado (SCHAFRANSKI et al, 2019). Os imigrantes japoneses foram responsáveis por trazer a espécie até o Brasil, onde houve rápida aclimação (BRANDÃO et al., 2021). O Rio Grande do Sul detém a produção frutífera da amora-preta no país. Os frutos são comercializados *in natura*, ou podem servir na produção de sucos, compotas e outros produtos alimentícios (BRANDÃO et al., 2021).

As folhas são de tom verde escuro na face ventral e verde claro na face dorsal; seu formato é oval e serrilhadas nas margens, atingindo em média 9 centímetros (MINISTÉRIO

DA SAÚDE, 2015). Conforme dito anteriormente, as árvores têm de 4 a 12 metros de altura, copa simples e flores esverdeadas. Os frutos são comestíveis, sumosos, têm sabor agridoce e refrescante (PADILHA et al., 2010).

As folhas são bastante comercializadas em feiras livres e empregadas na medicina popular, principalmente na forma de chá. A medicina popular reconhece e aplica o potencial da infusão de folhas da *Morus nigra* L. no tratamento de doenças como diabetes, obesidade, inflamações, hipercolesterolemia, tratamento de sintomas ligados à menopausa, tensão pré-menstrual e gota (DALMAGRO et al., 2016; PEREIRA, 2018; OLIVEIRA, et al., 2013). Estudos demonstram presença de grande variedade de compostos fenólicos com diversas ações, tais como ação antimicrobiana, antialérgica, antidepressiva e ação neuroprotetora acompanhada do decréscimo do estresse oxidativo (SCHAFRANSKI et al. 2019). Nomura (1988) discorre ainda sobre a presença de flavonoides isoprenilados, estilbenos, 2-arilbenzopiranos, cumarinas, cromonas, xantonas e uma variedade de compostos de Diels-Alder.

Em se tratando das capacidades farmacológicas dos extratos de folhas da *Morus nigra* L, foi relatado por Ghorbani, et al. (2021) que diferentes partes da planta, principalmente as folhas e os frutos, obtiveram efeitos benéficos nos hepatócitos em células de modelos animais de dano hepático causado por medicamento, dieta rica em gordura e substâncias como o CCl<sub>4</sub> (tetracloreto de carbono). Esses efeitos benéficos foram atribuídos principalmente à presença de antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos.

Oliveira et al. (2018) em seu estudo, destaca principalmente a atividade antioxidante e hipolipemiante, com notória diminuição do estresse oxidativo, diminuição do colesterol, LDL e triglicérides. Além de destacar a necessidade de maiores estudos clínicos na utilização da *Morus nigra* L., para que sejam desenvolvidos produtos a partir da planta.

Ainda sobre as propriedades farmacológicas e terapêuticas, foram relatados efeitos antinociceptivos, antimicrobianos, anti-melatógenicos, antiobesidade, e anticancerígena a partir do uso da *Morus nigra* L. em diversos modos de utilização. A planta também possui efeitos protetores em alguns órgãos, como por exemplo, o fígado e os rins, demonstrando assim um grande potencial para desenvolvimento de nutracêuticos derivados da planta (LIM, et al., 2019).

A toxicidade de qualquer substância de interesse medicinal é um parâmetro que obrigatoriamente deve ser pesquisado e avaliado, e para a *Morus nigra* L. e seus extratos não é diferente, assim sendo, testes com o chá da *Morus nigra* L. administrados em ratos Wistar machos por 30 dias, demonstraram baixa toxicidade, pois, não produziu mortes ou sinais de toxicidade nos animais do estudo. Foram analisados testes bioquímicos e hematológicos dos ratos, além de análises histopatológicas e nenhum desses apresentaram sinais de toxicidade (OLIVEIRA, et al 2013). Lim et al. (2019) também relata estudo com ratos, usando extrato etanólico de *Morus nigra* L. por 28 dias onde também não foram observadas alterações toxicológicas de grande importância.

#### 4.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são estruturas químicas formadas da ligação de anéis aromáticos benzênicos que tenha, ao menos, um de seus hidrogênios substituídos com um grupamento hidroxila (HARBORNE, 1973). São compostos bastante relatados na literatura, com presença de mais de oito mil compostos fenólicos catalogados em plantas. Nessas, os compostos fenólicos são o resultado do metabolismo secundário e atuam em vários aspectos fisiológicos nos organismos vegetais. Essas estruturas são sintetizadas durante o desenvolvimento normal da planta e em resposta a estresses como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta e outros (NACZK, SHAHIDI, 2004).

A complexidade dos fenólicos é variada, partindo de moléculas simples até moléculas de alto grau de polimerização, garantindo multifuncionalidade a essas estruturas. Nas plantas encontram-se livres nos tecidos ou ligados a açúcares e proteínas (ANGELO, JORGE, 2007).

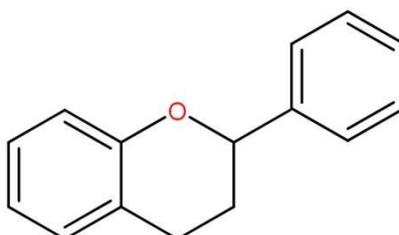
De acordo com a sua estrutura, os compostos fenólicos são divididos em algumas classes principais que são diferenciadas a partir do grau de polimerização da cadeia carbônica. O Quadro 1 apresenta algumas das classes e suas fórmulas químicas.

**Quadro 1** – Caracterização dos compostos fenólicos

CLASSES	ESTRUTURA
Fenólicos simples, Benzoquinonas	C6
Ácidos hidroxibenzóicos	C6-C1
Acetofenonas	C6-C2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C6-C3
Nafitoquinonas	C6 –C4
Xantonas	C6 –C1 –C6
Estilbenos, antoquinonas	C6 –C2 –C6
Flavonóides, isoflavonóides	C6 –C3 –C6
Lignanas, neolignanas	(C6 –C3) <sub>2</sub>
Biflavonóides	(C6 –C3 –C6) <sub>2</sub>
Ligninas	(C6 –C3) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C6 –C3 –C6) <sub>n</sub>

**Fonte:** Adaptado de ANGELO, JORGE, 2006.

De acordo com a classe, encontram-se diferentes atividades, e diferentes aplicações dos fenóis. A classe mais relevante entre todas as fontes de fenóis vegetais são os flavonoides. Segundo Bravo (1998), a estrutura dos flavonoides mais comum é a de difenilpropanos ((2, -C, -C,) que consiste em dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que geralmente formam um heterociclo oxigenado (Figura 2). Destaca-se a atividade antioxidante, atuando sobre as espécies reativas de oxigênio (SCHAFRANSKI, 2019).

**Figura 2** – Estrutura química básica dos flavonóides

**Fonte:** Adaptado de BRAVO, 1998.

O isolamento de compostos fenólicos passa diretamente pela fase de produção de extratos da planta; essa extração pode ser feita por infusão, percolação, maceração, etc. Algumas influências podem surgir com relação ao teor de compostos fenólicos: o método de extração, os solventes usados, a temperatura e o tempo de extração (GUIDO et al., 2018).

Além do método, o local onde a planta é encontrada, bem como o clima, solo e condições de cultivo da planta, influenciam tanto no teor quanto na diferença entre compostos fenólicos presentes no vegetal.

Os compostos fenólicos apresentam aplicabilidade na indústria alimentícia, são eles que conferem o sabor e a cor nos alimentos vegetais. São encontrados principalmente nos sucos de frutas. Para a indústria farmacêutica a capacidade farmacológica desses componentes tem sido importante no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, sendo uma opção natural no mercado e indo de encontro aos medicamentos sintéticos produzidos comumente (COSTA et al., 2018).

### **4.3 Ação antioxidante**

Radicais livres são moléculas resultantes dos metabolismos de seres vivos, que agem como mediadores na transferência de elétrons, com relevantes funções no metabolismo. Os locais mais presentes dos radicais livres são organelas citoplasmáticas que metabolizam oxigênio, nitrogênio e cloro. A presença excessiva desses radicais pode acometer as organelas envolvidas nesses metabolismos causando assim danos às células, o que acaba por levar ao acometimento de várias enfermidades (SHAMI, MOREIRA, 2004; CEDRIM, et al. 2018).

Nos organismos, os antioxidantes são moléculas capazes de prevenir e reduzir os danos causados pelos radicais livres às células, sendo o seu consumo essencial para a manutenção do bom funcionamento do corpo. Obtidos a partir do consumo de alimentos, eles podem agir diretamente sobre o radical livre ou facilitando a ação de enzimas envolvidas no metabolismo (MELO et al. 2008). Diversos estudos destacam a presença de compostos antioxidantes em alimentos variados, desde chá de folhas, até o alimento *in natura*, apontam os benefícios desses alimentos, juntamente com a pesquisa das atividades farmacológicas e outras questões acerca do assunto (NASCIMENTO, et al. 2008; SHAMI, MOREIRA, 2004; BARTH, et al., 2014; MORAIS, et al., 2009).

Devido ao potencial terapêutico e sua importância para a indústria farmacêutica, foram desenvolvidas diversas técnicas para a determinação da capacidade antioxidante de alimentos, extratos vegetais e bebidas. Borges (2011) destaca técnicas de determinação da capacidade antioxidante, além de classificá-las quanto ao método: eletroquímicos; colorimétricos (DPPH e ABTS) e biológicos.

#### 4.4 Planejamento experimental

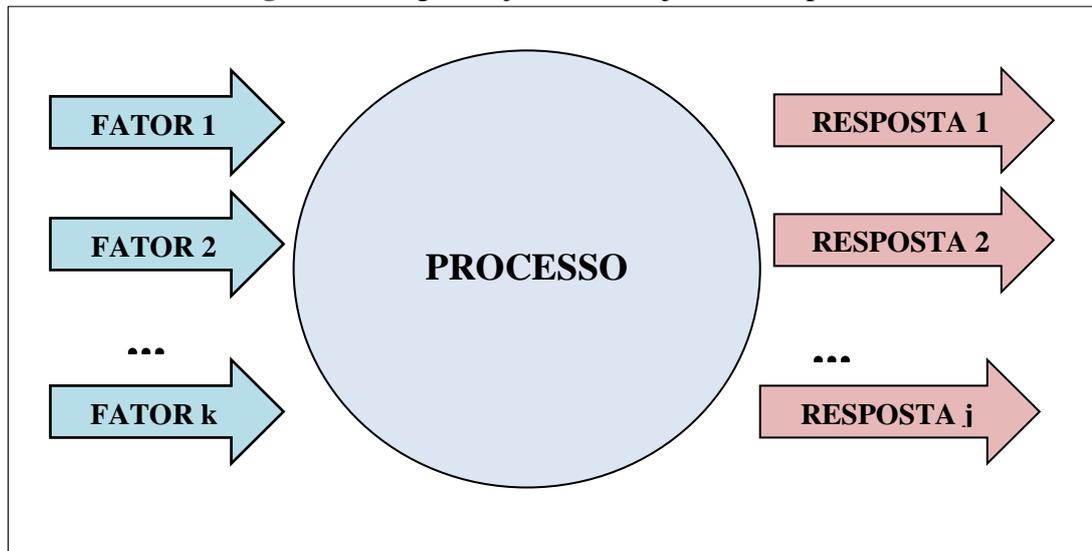
Em toda pesquisa acadêmica é necessário que haja um caminho bem definido a ser trilhado, nesse sentido, é notável que o uso do planejamento experimental traz para uma pesquisa grandes benefícios. Isso ocorre, pois, esta ferramenta fornece informações acerca dos efeitos de determinados fatores sobre o resultado final do experimento, sendo também capaz de apresentar quais variáveis exercem maior ou menor influência sobre o resultado final. Algumas das vantagens de utilizar a técnica são reduções de tempo do projeto, diminuição do custo, aproximação da relação entre o resultado esperado e o resultado obtido (MONTGOMERY, 2003).

De forma inicial, num planejamento experimental, é necessário que sejam definidos os fatores e também a resposta que se quer ter. Os fatores, neste caso, são as variáveis que o pesquisador pode manipular e que serão utilizadas no planejamento, esses fatores podem ser qualitativos ou quantitativos. Ainda sobre os fatores, existem ainda variáveis com as quais o pesquisador não tem interesse ou não tem condições de controlar, porém que surgem durante o processo, nesse sentido podem ser utilizadas técnicas de blocagem e aleatorização para que estas variáveis estejam menos presentes na análise final (BARROS NETO, 2003).

Os fatores são as variáveis de entrada e as respostas são as variáveis de saída do sistema, as respostas também podem ser classificadas como quantitativas e qualitativas, e podem ou não serem modificadas, a depender dos fatores que serão considerados no sistema, assim como mostra a Figura 3 (BARROS NETO, 2003).

É necessário definir qual o objetivo real do estudo, pois diferentes tipos de planejamentos experimentais requerem certas adequações. Um planejamento experimental pode ser feito de algumas maneiras diferentes, as duas principais são: o planejamento completo e com o planejamento fatorial. O planejamento completo abrange melhor estudos com objetivos de serem mais minuciosos, ou seja, desejam avaliar todas as alterações causadas às respostas pelos fatores. Quando ainda não desejamos certo rigor nas avaliações, mas sim uma análise preliminar fica clara a escolha pelo planejamento fatorial, pois este possibilita a realização de menos experimentos, visto que uma análise completa consideraria variáveis que provavelmente não seriam de grande interesse na análise preliminar (BARROS NETO, 2003; MONTGOMERY, 2003; GODOY, 2014; SOUZA, 2012).

A Figura (n° 3) abaixo descreve como é organizado um planejamento experimental:

**Figura 3** – Organização do Planejamento experimental

**Fonte:** Adaptado de BARROS NETO, 2007.

#### 4.5 Planejamento fatorial

O planejamento fatorial é uma técnica que permite ao pesquisador diminuir a quantidade de experimentos que seriam realizados num planejamento experimental completo. Este é determinado a partir do número de níveis aplicados, este então será elevado a K fatores, sendo então denominado um planejamento fatorial de dois níveis como  $2^K$ , no caso de um planejamento fatorial de 3 níveis, teríamos um planejamento fatorial  $3^k$ , geralmente estes são os tipos mais utilizados, pois ao aumentar o número de níveis também é aumentado o número de experimentos, fazendo então perder-se o objetivo da técnica (MONTGOMERY, CALADO, 2003).

Neste tipo de técnica devem-se definir os níveis e os fatores e, depois disso, é necessário que sejam realizados ensaios com todos os fatores em todos os níveis. No caso de um planejamento  $2^2$ , seriam realizados quatro ensaios, sem contar as réplicas. Essa lista de combinações é definida como matriz de planejamento. Os níveis na matriz de planejamento, quando quantitativos, são nomeados como (-) para o mais baixo e (+) para o mais alto, quando qualitativos o autor deve definir como nomeá-los. (VIEIRA, 1999)

#### 4.6 Planejamento fatorial fracionado

Um planejamento fatorial requer uma quantidade considerável de experimentos para sua realização, por exemplo: um experimento onde  $k=7$  são exigidos 128 ensaios, onde ainda serão realizadas réplicas para minimizar a possibilidade de erro experimental, o que elevaria ainda mais a quantidade de experimentos que seriam realizados, tornando assim um caminho impraticável para o desenvolvimento de um projeto. Partindo disso, surge a possibilidade de fracionar um planejamento fatorial, esse fracionamento tem por objetivo selecionar as quais fatores tem maior influência na resposta (MONTGOMERY, CALADO, 2003).

No caso de um planejamento fatorial fracionado, é importante que sejam identificadas as variáveis independentes que geraram os maiores efeitos do experimento. Com essas será realizado um planejamento aplicando metade dos ensaios que foram feitos anteriormente. Um planejamento completo com quatro fatores geraria 16 ensaios, sem contar as réplicas, mas caso sejam realizados 8 experimentos apenas, este planejamento seria um planejamento  $2^{4-1}$  onde o 1 é uma meia fração (MONTGOMERY, CALADO, 2003).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Materiais

#### 5.1.1 MATÉRIA VEGETAL

Foram realizadas análises através da comparação de folhas secas de *Morus nigra* L. coletadas na região de Campina Grande (Paraíba – Brasil) e Petrolina (Pernambuco – Brasil). O material coletado foi seco em estufa de ar circulante à temperatura de 45 °C por aproximadamente 5 dias. Em seguida, as folhas foram pulverizadas em moinho de facas (Adamo® modelo 340) com tamis de 20 mesh (0,84 mm) e armazenadas em temperatura ambiente.

### 5.2 Métodos

#### 5.2.1 CARACTERIZAÇÃO DA MATÉRIA PRIMA VEGETAL

##### 5.2.1.1 Determinação por perda de dessecação

Para a realização do experimento foi usado o método gravimétrico, em que se transferiu 2 g da amostra, para um pesa filtro previamente pesado e dessecado, a droga vegetal foi dessecada na estufa durante 2 horas sob temperatura média entre 100 a 105° C, até peso constante. A porcentagem de perda por dessecação foi calculada e realizada em triplicata. Os resultados foram expressos em perda de massa percentual segundo a equação (1):

$$PD = \frac{P_1 - P_2}{P_a} \times 100 \quad (1)$$

Onde: PD = Perda por Dessecação; P<sub>1</sub> = Peso do pesa-filtro contendo a amostra antes da dessecação; P<sub>2</sub> = Peso do pesa-filtro contendo a amostra após a dessecação; P<sub>a</sub> = peso da amostra antes da dessecação.

##### 5.2.1.2 Determinação da granulometria dos pós

A repartição granulométrica foi realizada utilizando 10 g do pó obtido da *Morus nigra* L. que passou por um conjunto de cinco tamises, previamente pesadas, com diâmetros das malhas respectivamente de 850 µm, 600 µm, 425 µm, 250 µm, 150 µm e 90 µm. Depois do conjunto ser tampado, o aparelho foi acionado por cerca de 15 minutos, com vibração adequada. Após o termino desse tempo, a amostra retida na parte superior de cada malha foi removida com o auxílio de um pincel e transferida para um papel impermeável para pesagem

do pó, inclusive do pó retido no coletor. A massa de pó retida foi calculada pela diferença de massa do tamis com o pó retido e o mesmo vazio. A análise foi realizada em triplicata e o percentual retido em cada tamis foi obtido, utilizando a equação 2:

$$\%Retidano\ tamis = \frac{P_1}{P_2} \times 100 \quad (2)$$

Onde:  $P_1$  = Peso da amostra retida em cada tamis (em gramas);  $P_2$  = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (em gramas).

Em seguida, obteve-se o diâmetro médio ( $D_m$ ) das amostras a partir da equação 3 (ALLEN JR et al., 2007).

$$D_m = \sum \quad (3)$$

### 5.2.1.3 Determinação de cinzas totais

Em um cadinho previamente tarado, pesou-se cerca de 3 g da amostra vegetal em pó, distribuída uniformemente, incinerou-se de forma gradativa a amostra até a temperatura de  $600 \pm 25$  °C, até que todo o carvão fosse eliminado. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C) foi utilizado. A amostra foi resfriada em um dessecador e pesada. A porcentagem de cinzas totais foi calculada em relação ao peso da droga vegetal em triplicata, de acordo com a equação 4 abaixo:

$$CT = \frac{C_2 - C_1}{C_a} \times 100 \quad (4)$$

Onde: CT = Teor de Cinzas;  $C_2$  = Peso do cadinho com a amostra após incineração;  $C_1$  = Peso do cadinho vazio;  $C_a$  = Peso da amostra antes da incineração.

## 5.2.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS DE *MORUS NIGRA* L. PARA MAXIMIZAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO

### 5.2.2.1 Desenvolvimento do desenho experimental

O método extrativo foi feito a partir de uma infusão, devido à simplicidade de processo frente a outros métodos. Além disso, é considerado que, para partes moles das plantas, como as folhas, o recomendado é que seja utilizado o processo de infusão para preparo de chá. E, para a otimização do processo extrativo, foi realizado um planejamento fatorial fracionado

que buscou a forma do extrato mais rica em compostos fenólicos, estes que foram obtidos a partir das folhas de *Morus nigra L.* do estado da Paraíba (PB) e Pernambuco (PE).

Foi realizado um planejamento fatorial fracionado envolvendo três fatores estudados em três níveis ( $3^{3-1}$ ). O desenho experimental incluiu três fontes de variação: temperatura de infusão ( $X_1$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) e proporção droga:solvente ( $X_3$ ) (Tabela 1).

Foram gerados 9 diferentes experimentos para cada amostra individual coletada, utilizando como variável dependente ou resposta no desenho experimental o teor de isoquercetina ( $Y_1$ ), rutina ( $Y_2$ ) e ácido clorogênico ( $Y_3$ ).

**Tabela 1** - Níveis de desenho experimental para o método de extração do EA Mn

Nível de variação			
Variáveis independentes	-1	0	+1
<b>X<sub>1</sub>: Temperatura de infusão</b>	70	85	100
<b>X<sub>2</sub>: Tempo de extração</b>	30	60	90
<b>X<sub>3</sub>: Proporção droga:solvente</b>	4:250	10:250	25:250
<b>Y<sub>1</sub>: Teor de isoquercetina</b>			
<b>Y<sub>2</sub>: Teor de rutina</b>			
<b>Y<sub>3</sub>: Teor de ácido clorogênico</b>			

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

#### 5.2.2.2 Preparação do extrato

O processo de obtenção do extrato aconteceu de acordo com Dalmagro et al. (2016). Foram usados 250 mL de água destilada fervida com temperatura ajustada conforme o planejamento experimental foi adicionado o material vegetal em contato com água de acordo com o tempo proposto. Após o resfriamento dos extratos obtidos, os mesmos foram submetidos ao processo de filtração com papel de filtro quantitativo (UNIFIL® 125 mm) para que fossem feitas as análises.

#### 5.2.2.3 Determinação dos compostos fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Como estratégia para obter as condições ótimas de extração das folhas pulverizadas de *Morus nigra L.*, foram realizadas análises para determinação quali-quantitativa dos

marcadores químicos. Para tanto, o método de análise CLAE foi desenvolvido e validado de acordo com os parâmetros estabelecidos pela RE nº 166/17 da ANVISA (BRASIL, 2015; ROSA, 2016).

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL-20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado por software LC-Solution® 1.0.

As soluções extrativas de estudo foram submetidas individualmente à análise (triplicata) nas seguintes condições cromatográficas: como fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Agilent® Eclipse); como fase móvel: solução A - água + 0,01% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA) e solução B: acetonitrila (ACN), obedecendo ao gradiente descrito na Tabela 2, com fluxo de 0,8 mL/min e volume de injeção de 100 µL. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30 °C durante toda a análise.

**Tabela 2** – Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE

	<b>Tempo</b>	<b>Solução A (%)</b>	<b>Solução B (%)</b>
<b>Gradiente linear</b>	0-40 min	100-60	0-40
<b>Isocrático</b>	40-50 min	60	40
<b>Gradiente linear</b>	50-60 min	60-100	40-0
<b>Isocrático</b>	60-70 min	100	0

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 µm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada em DAD no comprimento de onda de 340 nm.

### 5.2.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO FLUÍDO

#### 5.2.3.1 Determinação do potencial hidrogeniônico (pH)

Foi realizada através da utilização de cerca de 25,0 mL da solução extrativa em pHmetro Micronal® modelo B474 previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de seis determinações (BRASIL, 2010).

### **5.2.3.2 Determinação da densidade relativa**

A metodologia utilizada foi da BRASIL, 2010. Foi utilizado um picnômetro de 25 mL previamente calibrado. A calibração consiste na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água destilada. Foi transferida a amostra para o picnômetro, removendo excesso da substância e pesado. O peso da amostra foi obtido através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio. A densidade relativa foi determinada por meio da razão entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20°C. A análise foi realizada em triplicata.

### **5.2.3.3 Determinação do resíduo seco em extratos fluidos**

Foram transferidos 2 mL da solução extrativa para pesa-filtros. Evaporou-se até secura em banho-maria e dessecou-se em estufa a 100-105°C, por 3 horas. Deixou-se esfriar em dessecador, sobre sílica e pesou-se. Calculou-se o resíduo seco em porcentagem sobre o volume (BRASIL, 2010). A análise foi realizada em triplicata.

## **5.2.4 QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROMETRIA NA REGIÃO UV-VIS**

O método de Folin-Ciocalteu foi utilizado para determinar o teor de fenóis totais nos extratos, tendo o ácido gálico como padrão comparativo das amostras do composto fitoterápico em diferentes concentrações. Foram adicionados com 8,1 mL de água destilada, 0,5 mL de do reagente Folin, 1 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> a 10% (m/v). Em seguida, a absorbância foi medida em 725 nm usando um espectrofotômetro UV-VIS. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em µg de ácido gálico / mL do composto fitoterápico.

## **5.2.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE SEQUESTRADORA (OU REDUTORA) DO RADICAL DPPH**

O método utilizado foi baseado na metodologia de Blois (1958), utilizando o radical estável DPPH. 1 mg dos extratos foi diluído em 1 mL de metanol, dos quais foi realizada uma diluição seriada nas concentrações de 15,625 µg/mL - 1000 µg/mL. 40 µL destas concentrações foram adicionadas a 250 µL do reagente DPPH em uma placa de 96 poços. Após 30 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 517 nm. Calculou-se a porcentagem de atividade de eliminação de radical DPPH pela seguinte fórmula: Eliminação DPPH (%) = (Ac - Ae)/Ac x 100. Com os resultados da aplicação da

fórmula, obteve-se o IC 50, que denota a concentração da amostra necessária para diminuir a concentração inicial de radicais DPPH em 50%.

#### 5.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em triplicata. Para caracterização físico-química e farmacognóstica da droga vegetal foram utilizados os *softwares* Microsoft Excel® e OriginPro8®. Os dados foram apresentados considerando a média e o desvio padrão. A análise dos dados da quantificação dos marcadores químicos por CLAE foi realizada no OriginPro8® e a variância foi verificada via ANOVA, considerando significativamente diferentes quando  $p < 0,05$  (intervalo de confiança de 95%). Para a produção de gráficos e análise estatística do planejamento fatorial foi utilizado o *software* STATISTICA® 10.0.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 Caracterização da droga vegetal

#### 6.1.1 PERDA POR DESSECAÇÃO

O ensaio de perda por dessecação foi realizado de acordo com a Farmacopéia Brasileira (2019), onde foi empregado o método gravimétrico. Os resultados obtidos, tanto para o extrato de Pernambuco ( $8,08 \pm 0,12\%$ ), quanto no extrato da Paraíba ( $7,95 \pm 0,10$ ), estão dentro do limite estabelecido pela literatura que de no máximo 14% de substâncias voláteis presentes na amostra de droga vegetal, além disso, os valores encontrados são próximos ao apresentado por Guizzo et al. (2015), que realizou a determinação da perda por dessecação em balança de infravermelho e obteve o resultado de  $7,00\% \pm 0,173$  para o extrato de *Morus nigra* L..

A literatura indica que baixos valores de umidade e de materiais voláteis presentes na amostra demonstram eficiência no processo de secagem da droga vegetal, estabilidade, além de tornar a droga vegetal menos vulnerável ao crescimento de microrganismos potencialmente degradantes, visto que posteriormente a droga vegetal será utilizada em outros processos, sejam de caracterização ou de desenvolvimento em pesquisa (HAMANN, et al. 2020).

#### 6.1.2 GRANULOMETRIA DOS PÓS

De acordo com a Farmacopéia brasileira (2019) a metodologia de determinação da granulometria dos pós é importante para a padronização do pó obtido da droga vegetal, trazendo os resultados quantitativos sobre o tamanho médio da droga vegetal. Dessa forma, a metodologia de granulometria foi aplicada aos pós da droga vegetal do presente estudo, sendo elas a amostra da Paraíba e de Pernambuco, onde foi possível inferir o tamanho desses pós, após as somas entre os dois maiores percentuais de retenção de massa nas malhas. Os resultados obtidos seguem na Tabela 3 a seguir:

**Tabela 3** – Resultados da granulometria aplicada dos pós aos extratos da Paraíba e Pernambuco

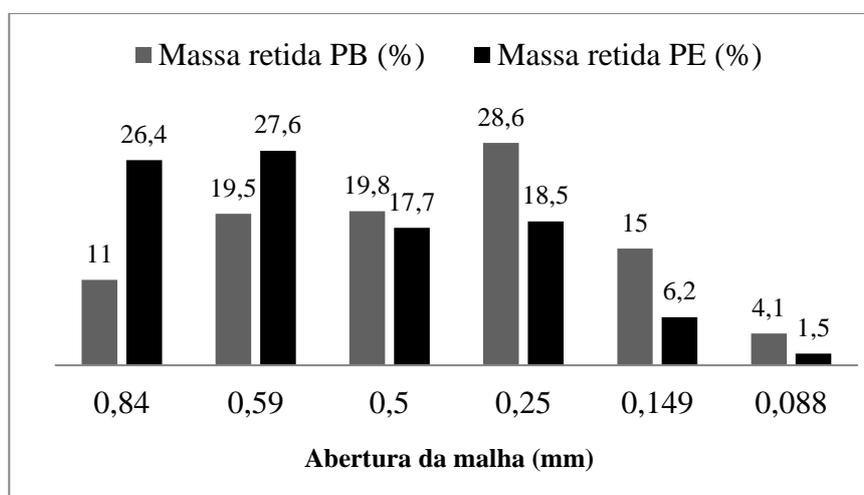
Abertura da malha ( $\mu\text{m}$ )	Abertura média ( $\mu\text{m}$ )	Massa retida PB (%)	Massa retida PE (%)
840	1015	11	26,4
590	715	19,5	27,6
500	545	19,8	17,7
250	375	28,6	18,5
149	199	15	6,2
88	118,5	4,1	1,5
<b>Coletor</b>	37	2	2,1

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

Sendo assim, a partir dos dados da Tabela 3, foi possível montar o Gráfico 1, nele torna-se mais fácil a visualização da distribuição da quantidade de pó retida em cada uma das malhas; O resultado para a droga vegetal da Paraíba demonstram que 48,4% da amostra ficaram entre as malhas de abertura de 500 e 250 $\mu\text{m}$ , estando qualificado como um pó moderadamente grosso; Para o pó da droga vegetal de Pernambuco, 54% do pó se manteve entre as malhas de abertura de 840 e 590  $\mu\text{m}$ , qualificando-se como um pó grosso.

Os resultados dos pós, tanto da Paraíba como o de Pernambuco corroboram resultados de Guizzo (2015), onde foi demonstrado que o tamanho médio das partículas de pó enquadrar-se como um pó grosso.

**Gráfico 1** – Granulometria dos Pós para droga vegetal da Paraíba e Pernambuco



**Fonte:** Elaborado pelo autor.

### 6.1.3 DETERMINAÇÃO DE CINZAS TOTAIS

A determinação das cinzas totais serve como parâmetro de avaliação da qualidade de coleta, manuseio e armazenamento do material vegetal amostral, nele é possível averiguar a presença de impureza de natureza inorgânica exterior (não fisiológica), como por exemplo, a presença de pedras, areia e etc., assim como a presença de matéria inorgânica de origem interior (fisiológica), presente na própria planta (LIMA, 2020).

O valor encontrado para a droga vegetal da Paraíba foi de  $6,39 \pm 0,008\%$ ; para a matéria vegetal de Pernambuco foi de  $7,05 \pm 0,018\%$ . Dessa forma, os valores dos dois pós obtidos estão dentro dos padrões estabelecidos na Farmacopéia Brasileira 6ª edição (2019) (os valores dos resultados das cinzas totais não podem ser maiores que 14%), demonstrando que houve cuidado tanto na coleta quanto no tratamento da matéria vegetal.

### 6.2 DoE para aprimoramento da eficiência da extração

Após a caracterização da droga vegetal e dos extratos foi realizado um DoE (*design of experiments*) afim de aumentar a eficiência de extração. Este método de desenho experimental foi escolhido devido ao aprofundamento de informações e detalhes obtidos a partir da análise dos extratos quando comparamos o método à abordagem empírica. A Tabela 4 lista todas as variáveis dependentes e independentes incluídas no desenho experimental e seus resultados.

Foram determinados os coeficientes de determinação ( $R^2$ ) para os extratos de Pernambuco e da Paraíba, os valores foram  $R^2=100\%$ ;  $R^2=99,92\%$  e  $R^2=94,34\%$ ;  $R^2=98,89\%$ ,  $R^2=94,66\%$  e  $R^2=96,27\%$  para isoquercetina, rutina e ácido clorogênico respectivamente. Os valores de  $R^2$  encontrados indicam a resposta explicada pelo modelo e também se encontra próximos de 1, isto comprova que há um ajuste de alta qualidade suficiente para justificar a variabilidade das respostas.

A análise de variância (ANOVA) da regressão para o teste de significância foi aplicada para comprovação estatística a fim de definir se os dados apresentam suposta relação entre os níveis de uma ou de mais de uma resposta no teste, foi também utilizado o teste t-student para o teste de hipótese. Foram consideradas a hipótese nula ( $H_0$ ) onde o termo e a resposta não estão associados significativamente e a hipótese alternativa ( $H_1$ ) que demonstra que há correlação entre o termo e a resposta.

A análise dos dados foi feita pelo modelo de distribuição de Fisher-Snedecor (teste F) e foi descartada a falta de ajuste no modelo em um nível de confiança de 95%. Os valores

obtidos estão descritos na Tabela 5, e nestes é observado que para o extrato de Pernambuco, utilizando como variável dependente a isoquercetina, o valor de  $F_{\text{calculado}(1,1)}$  foi maior que o  $F_{\text{crítico}(1,1)}$ , o que assume um valor no modelo de distribuição tabelado de  $F_{c(1,1)}=161,4$ , sendo assim aceita a hipótese  $H_1$  e recusa  $H_0$  concluindo-se que para as variáveis de temperatura, droga:solvente, e para as interações entre temperatura e tempo de extração, temperatura e droga:solvente, e, tempo de extração e droga:solvente estão correlacionadas com a resposta. O nível descritivo (p-valor) foi menor ou igual ao nível de significância de 5%, tendo assim relação estatisticamente significativa da variável resposta e o termo para as variáveis e interações. Já para as variáveis Rutina e ácido clorogênico apenas a variável independente proporção droga:solvente se mostrou significativa, influenciando o processo extrativo.

Para o extrato da Paraíba foi escolhido o modelo estatístico polinomial de segunda ordem, pois, foi o modelo que melhor representou os dados para as respostas de isoquercetina, rutina e ácido clorogênico quando comparado aos dados do extrato de Pernambuco para o teor de isoquercetina. Dessa forma, o modelo estatístico apresentou três variáveis/interações com respostas significativas, sendo elas: a variável droga:solvente, a interação temperatura/droga:solvente de forma linear e a variável quadrática do tempo de extração para a resposta  $Y_1$ . Para rutina e ácido clorogênico os resultados demonstram apenas significância para a variável proporção droga:solvente.

**Tabela 4** – Matriz de design experimental e resultados obtidos para o teor dos polifenóis

Experimento	Temperatura de infusão (X1)	Tempo de extração (X2)	Proporção droga: solvente (X3)	Y1		Y2		Y3	
				PB	PE	PB	PE	PB	PE
EaMn1	70	30	4:250	0,95 ± 0,00	4,17 ± 0,09	5,06 ± 0,01	6,94 ± 0,02	9,26 ± 0,15	50,95 ± 1,10
EaMn2	70	60	25:250	24,97 ± 0,30	24,66 ± 0,45	22,31 ± 1,83	18,02 ± 0,49	25,82 ± 5,84	218,57 ± 1,26
EaMn3	70	90	10:250	11,27 ± 0,09	9,18 ± 0,05	16,34 ± 0,03	9,37 ± 0,01	16,41 ± 1,44	58,57 ± 2,31
EaMn4	85	30	25:250	27,70 ± 0,25	22,24 ± 0,03	27,30 ± 1,82	15,62 ± 0,44	32,81 ± 1,41	153,17 ± 1,76
EaMn5	85	60	10:250	1,07 ± 0,01	9,85 ± 0,02	6,23 ± 0,05	8,45 ± 0,43	9,62 ± 0,10	43,48 ± 1,01
EaMn6	85	90	4:250	0,97 ± 1,38	4,09 ± 0,97	6,71 ± 1,19	6,11 ± 0,34	9,93 ± 3,13	20,94 ± 0,49
EaMn7	100	30	10:250	9,11 ± 3,59	9,90 ± 0,11	9,34 ± 2,86	8,13 ± 0,00	21,03 ± 1,69	40,28 ± 1,12
EaMn8	100	60	4:250	4,01 ± 0,07	7,05 ± 0,09	7,28 ± 0,04	6,37 ± 0,03	17,18 ± 0,07	25,82 ± 0,30
EaMn9	100	90	25:250	23,88 ± 0,91	23,16 ± 0,39	16,38 ± 7,34	15,40 ± 0,58	29,78 ± 5,51	199,08 ± 2,71

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Tabela 5** – ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de *Morus nigra* L. Pernambuco

Fator	Isoquercetina					Rutina					Ácido clorogênico				
	SS	DF	MS	F	<i>p</i>	SS	D F	MS	F	<i>p</i>	SS	D F	MS	F	<i>p</i>
Temperatura (L)	0,77	1	0,77	3216	0,0112	3,28	1	3,28	25,0	0,1257	659,35	1,00	659,35	0,48104	0,559675
Tempo de extração (L)	0,00	1	0,00	0	0,8456	0,01	1	0,01	0,0	0,8734	194,76	1,00	194,76	0,14209	0,742449
Tempo de extração (Q)	9,70	1	9,70	40598	0,0032	4,70	1	4,70	35,8	0,1054	37305,02	1,00	37305,02	27,21642	0,034834
Droga:solvente (L)	532,80	1	532,80	2229081	0,0004	146,20	1	146,20	1115,0	0,0191	5764,63	1,00	5764,63	4,20567	0,176766
Temperatura x Tempo de extração (L)	45,48	1	45,48	190281	0,0015	15,27	1	15,27	116,4	0,0588	1840,70	1,00	1840,70	1,34291	0,366187
Temperatura x Droga:solvente (L)	27,54	1	27,54	115233	0,0019	9,37	1	9,37	71,4	0,0750	209,69	1,00	209,69	0,15298	0,733436
Tempo de extração: droga solvente	3,83	1	3,83	16039	0,0050	0,83	1	0,83	6,3	0,2406	2741,36	2,00	1370,68		
Error	0,00	1	0,00			0,13	1	0,13			48454,12	8,00			
Total SS	591,22	8				166,88	8								

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

**Tabela 6** – ANOVA para o teste de falta de ajuste para a isoquercetina, rutina e ácido clorogênico obtidos de *Morus nigra* L. Paraíba

Fator	Isoquercetina					Rutina					Ácido clorogênico				
	SS	DF	MS	F	<i>p</i>	SS	D F	MS	F	<i>p</i>	SS	D F	MS	F	<i>p</i>
Temperatura (L)	0,01	1	0,01	0,00	0,9766	19,16	1	19,16	1,413	0,3566	45,39	1	45,39	3,851	0,1887
Tempo de extração (Q)	123,58	1	123,58	22,64	0,0415	51,46	1	51,46	3,795	0,1908	101,00	1	101,00	8,570	0,0996
Droga:solvente (L)	831,10	1	831,10	152,23	0,0065	367,20	1	367,20	27,079	0,0350	451,38	1	451,38	38,301	0,0251
Temperatura x Tempo de extração (L)	86,94	1	86,94	15,92	0,0574	25,02	1	25,02	1,845	0,3073	52,29	1	52,29	4,437	0,1698
Temperatura x Droga:solvente (L)	120,06	1	120,06	21,99	0,0426	48,88	1	48,88	3,605	0,1980	94,11	1	94,11	7,985	0,1057
Tempo de extração: droga solvente	12,04	1	12,04	2,20	0,2759	0,79	1	0,79	0,058	0,8316	12,11	1	12,11	1,027	0,4174
Error	10,92	2	5,46			27,12	2	13,56			23,57	2	11,79		
Total SS	989,85	8				508,25	8				632,71	8			

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

### 6.3 Efeito das variáveis de entrada ( $X_{1-3}$ ) para o teor de polifenóis ( $Y_{1-3}$ )

A técnica de CLAE-DAD foi aplicada nas 9 formulações de extratos desenvolvidos no estudo para doseamento dos compostos isoquercetina, rutina e ácido clorogênico para o estado de Pernambuco (APÊNDICE A) e da Paraíba (APÊNDICE B). Os resultados também estão expressos em gráfico de Pareto, pois permite maior clareza ao expor os resultados de conexão entre as variáveis de entrada e as respostas apresentadas neste modelo.

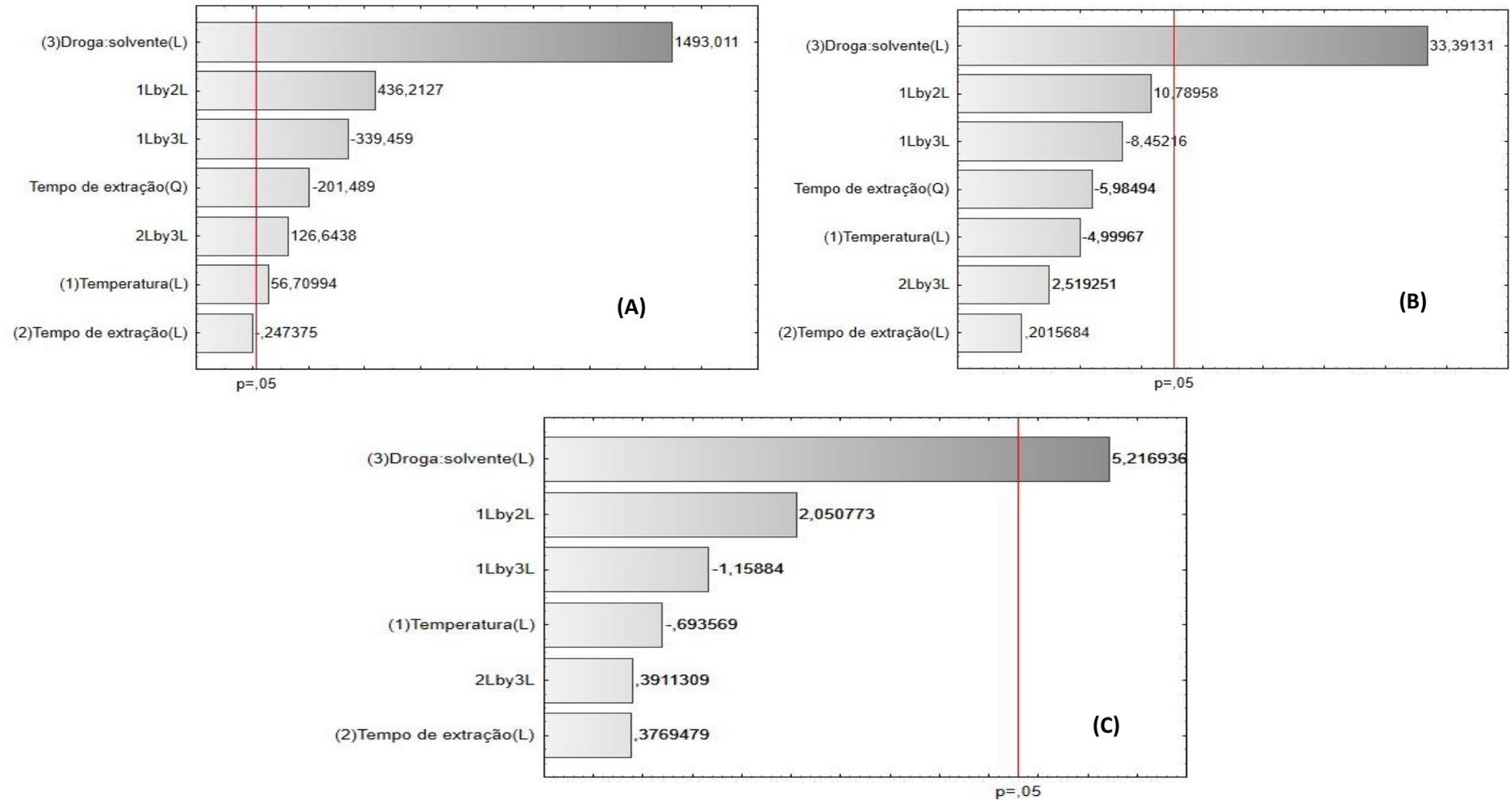
Os valores foram separados entre positivos (para influência positiva) e negativos (para influência negativa). Também é possível observar uma linha vertical, que é traduzida como o limite da rejeição da hipótese nula ( $p=0,05$ ), sendo tratada como significativa apenas os valores que cruzam esta linha vertical para o seu lado direito.

Nos gráficos apresentados na Figura 4 estão descritas as variáveis e suas interações sobre as variáveis resposta (isoquercetina, rutina e ácido clorogênico) para o extrato de Pernambuco. Observa-se que há influência significativa sobre o processo de extração os parâmetros de temperatura ( $X_1$ ) e proporção droga:solvente ( $X_3$ ), pois ambas estão à direita da linha vertical.

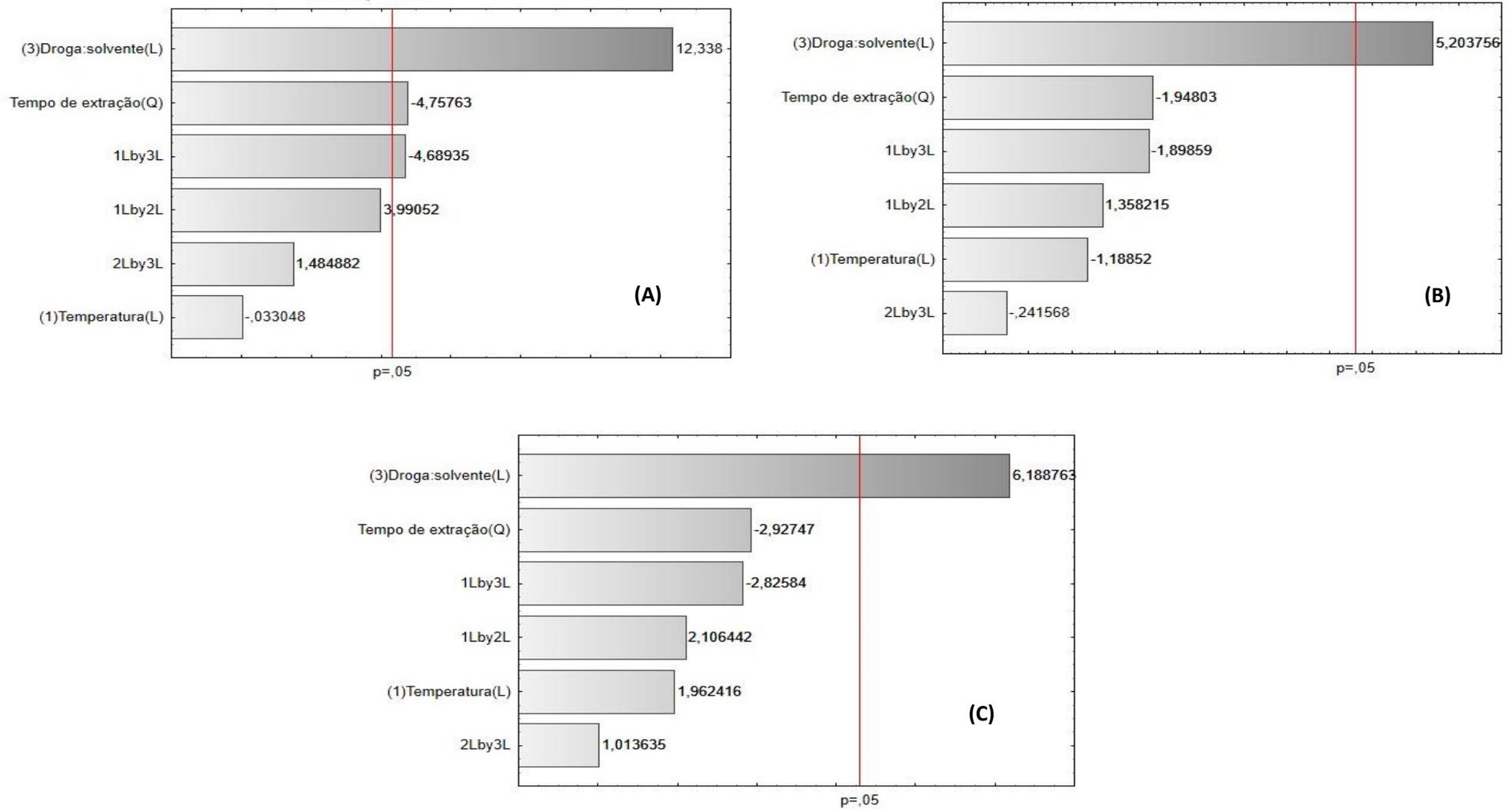
De longe, a variável de resposta mais significativa sobre o teor de isoquercetina (1A), foi a proporção droga:solvente, porém a temperatura também obteve influência positiva sobre o processo extrativo, sendo assim, os níveis que maximizam o teor de isoquercetina são, respectivamente para as duas variáveis, o maior nível (+1) e o menor nível (-1). Enquanto que o tempo de extração não apresentou efeito significativo, apesar de o termo quadrático ter influenciado negativamente a variável resposta. Para as variáveis rutina (1B) e ácido clorogênico (1C), apenas a proporção droga:solvente, em seu efeito linear, foi capaz de influenciar positivamente o processo extrativo.

A Figura 5 apresenta os gráficos para o extrato da Paraíba, e assim como os gráficos de Pernambuco para rutina (2B) e ácido clorogênico (2C), a única influência linear positiva foi a proporção droga:solvente. É possível observar também a forte influência positiva linear da proporção droga:solvente e uma influência quadrática negativa da interação  $X_1X_3$ , ambos para isoquercetina.

**Figura 4** – Influência das variáveis  $X_1$  (T °C),  $X_2$  (T min) e  $X_3$  (Droga:solvente) do extrato de Pernambuco e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoquercetina(A), rutina (B) e ácido clorogênico (C)



**Figura 5** – Influência das variáveis  $X_1$  (T °C),  $X_2$  (T min) e  $X_3$  (Droga:solvente) do extrato da Paraíba e de suas interações sobre as variáveis respostas de isoqueretina (A), rutina (B) e ácido clorogênico (C)



Diante do exposto, apenas as interações da isoquercetina foram consideradas estatisticamente significativas, e para fins de melhor compreensão dos dados apresentados, foram construídas representações gráficas (Figura 6) da superfície de resposta em função das variáveis codificadas para a resposta. O modelo de superfície de resposta otimiza as variáveis do processo e constrói modelos quadráticos para ilustrar a relação estatística entre os parâmetros considerados.

As representações gráficas trazidas pela Figura 6 expressam curvaturas acentuadas para a variável tempo de extração, o que pode ser identificado como uma forte influência quadrática negativa, quando comparamos às variáveis droga:solvente e temperatura, sendo também possível inferir que o nível mais adequado para a variável tempo de extração é o nível intermediário, pois a eficácia do processo é diminuída quando tempos o menor ou o maior nível. Já para as variáveis proporção droga:solvente e temperatura foi identificado uma influência linear positiva, evidenciada pela inclinação presente em seus gráficos.

Os dados apresentados pelas representações gráficas da metodologia de superfície resposta relatam que o menor nível de temperatura, e o tempo de extração médio conferem a máxima eficiência para a isoquercetina, enquanto alterações no tempo de extração para o maior nível ou o menor, na temperatura média diminuiu a concentração da isoquercetina. Outra possibilidade de aumento do teor de isoquercetina no processo extrativo seria com o maior nível da proporção droga:solvente, associada ao menor nível de temperatura e ao menor nível de tempo de extração. Estes dados corroboram com Ahmed et al. (2022) que retrata condições similares na extração de compostos fenólicos em frutos de cajá.

Sendo assim, o planejamento fatorial encontrou para o extrato de Pernambuco as suas condições ideais de extração para maximização do teor de isoquercetina. Esses valores são encontrados no EaMn2 da Tabela 4, com os valores de 70° para a temperatura, a proporção droga:solvente (25:250) e o tempo de extração de 60 minutos.

Para o extrato da Paraíba observa-se que a variável proporção droga:solvente tem influência linear positiva dada a inclinação do gráfico, sendo então o nível mais alto (+1) o com a maior resposta para as três variáveis dependentes (isoquercetina, rutina e ácido clorogênico). Já para a variável tempo de extração observa-se uma influência quadrática positiva, para o teor de isoquercetina (>12µg/mL), onde o nível mais baixo apresentou larga vantagem em comparação com os níveis intermediário (0) e o nível mais alto (+1).

As interações entre as variáveis para o extrato da Paraíba apresentaram apenas uma interação significativa, que no caso foi a temperatura frente à proporção droga:solvente, para

o teor de isoquercetina. O máximo teor de isoquercetina ( $>27\mu\text{g/mL}$ ) foi obtido quando a temperatura esteve em seu nível intermediário e a proporção droga:solvente no seu maior nível ao passo que houve diminuição do teor quando diminuiu-se os níveis da variável droga solvente. Para este extrato as condições ideais foram a do EaMn4, onde são apresentados valores de  $85^\circ$  de temperatura, 30 minutos de extração e 25:250 para proporção droga solvente.

A metodologia DoE revelou uma equação de segunda ordem, chamada de modelo, que apresenta a dependência entre as respostas ( $Y_{1-3}$ ) e as variáveis de entrada ( $X_{1-3}$ ). Ficando assim representada:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_2^2 + b_4X_3 + b_5X_1X_2 + b_6X_1X_3 + b_7X_2X_3 \quad (1)$$

Nesta equação temos que  $Y$  é a resposta;  $b_0$  é a média das respostas;  $b_1$  a  $b_7$  são os coeficientes de regressão;  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  são os efeitos individuais de cada fator;  $X_1X_2$ ,  $X_2X_3$  e  $X_1X_3$  são as combinações dos efeitos dos fatores; E  $X_2^2$  significa a dependência não linear do fator em questão.

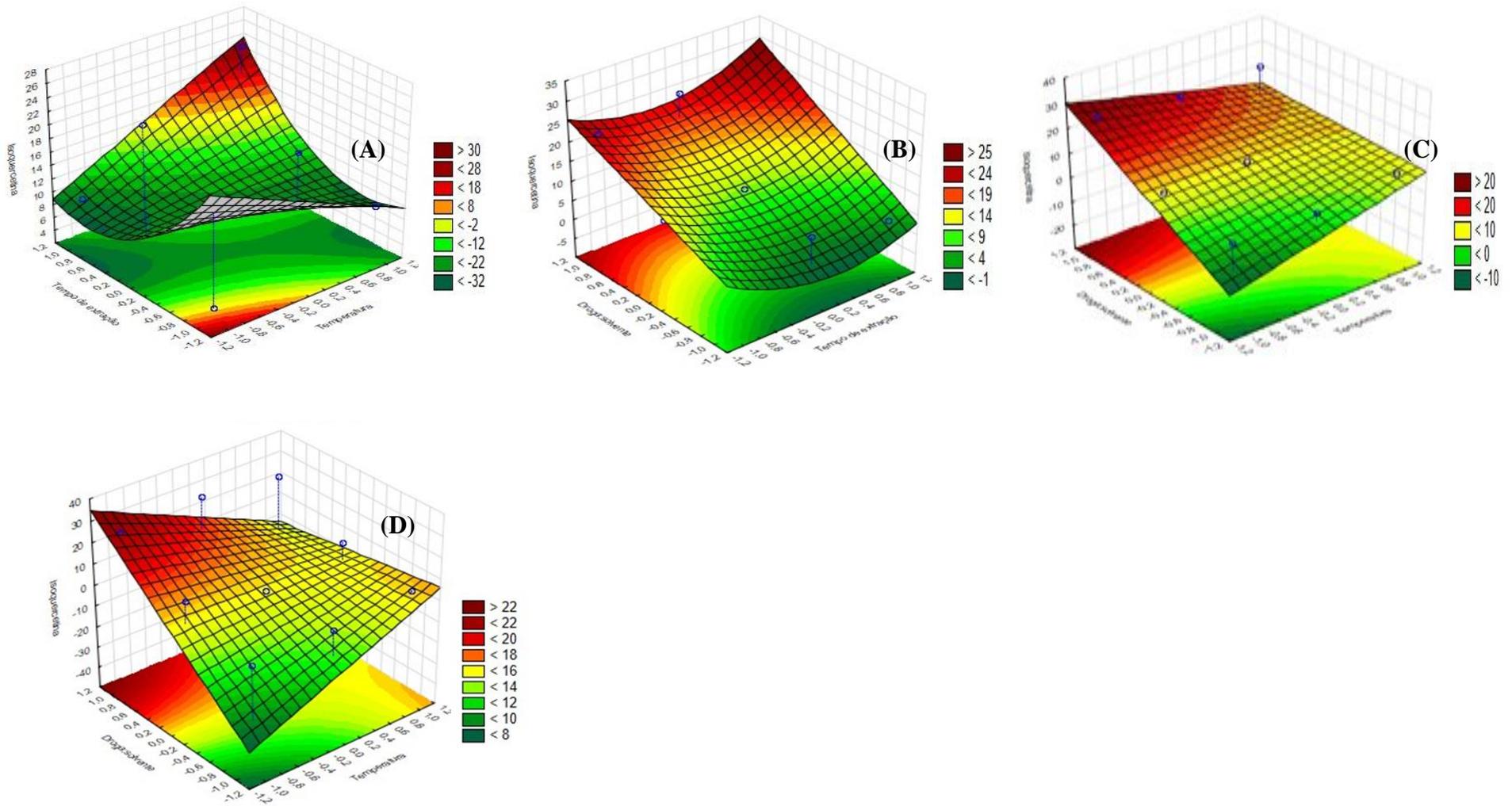
Sendo assim estabelecidas três equações que consideraram apenas as influências significativas das variáveis sobre as respostas de isoquercetina (ISO), rutina (RUT) e ácido clorogênico (AC) para o estado de Pernambuco, são elas:

$$\text{(ISO): } 9,83 + 0,36X_1 + 4,40X_2^2 + 9,42X_3 + 4,76X_1X_2 - 6,42X_1X_2 + 1,38 X_2X_3 \quad (2)$$

$$\text{(RUT): } 8,44 + 4,94X_3 \quad (3)$$

$$\text{(AC): } 90,09 + 78,85X_3 \quad (4)$$

**Figura 3** - Superfícies de resposta que descrevem as interações das variáveis em relação ao teor de isoquercetina para o extrato obtido de Pernambuco (A, B e C) e da Paraíba (D) em função da razão temperatura ( $X_1$ ), tempo de extração ( $X_2$ ) e droga:solvente ( $X_3$ )



## 6.4 Caracterização do extrato líquido

### 6.4.1 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL HIDROGENIÔNICO (PH)

Os valores de pH para os extratos foram  $7,95 \pm 0,10$  para o extrato da Paraíba e de  $8,08 \pm 0,12$  para o extrato de Pernambuco, evidenciando uma natureza levemente básica dos dois extratos. A determinação do potencial hidrogeniônico confere clareza do ponto de vista da estabilidade do extrato estudado, pois quaisquer variações podem indicar a presença de alguma instabilidade seja ela com o extrato em si ou a água utilizada no processo extrativo. (CORRÊA et al., 2021)

### 6.4.2 DETERMINAÇÃO DA DENSIDADE RELATIVA

Os valores para densidade relativa para os extratos aquosos de *Morus nigra* L. foram de  $1,086 \pm 0,02$ g/mL para o extrato da Paraíba e de  $1,011 \pm 0,01$ g/mL no extrato de Pernambuco, sendo os dois resultados próximos da densidade da água, isso ocorre justamente pelo solvente ser a própria água. A diferença de densidades, com vantagem para o extrato da Paraíba em comparação ao extrato de Pernambuco pode ser justificada pela possibilidade de maior presença de substâncias de interesse comercial ou pelo fato deste extrato apresentar-se mais concentrado.

### 6.4.3 DETERMINAÇÃO DO RESÍDUO SECO

A determinação do teor extrativo é o ensaio que revela a potencial extrativo da planta, podendo ser obtidos no material resultante aminoácido, açúcares, flavonóides e outros compostos de interesse. Os dados apresentados por este ensaio servem também como moeda de comparação/avaliação do extrato, pois ele possibilita a associação da qualidade do extrato com a sazonalidade (LIMA, 2019). Dessa forma, foi possível observar um rendimento semelhante entre os extratos analisados neste estudo, o rendimento para o extrato da Paraíba foi de 2,16%, e o rendimento para o extrato de Pernambuco foi de 2,017%.

## 6.5 Determinação dos compostos fenólicos nos extratos de *Morus nigra* L.

Para quantificação dos compostos fenólicos totais dos extratos uma curva analítica ( $y = 101,6x + 0,145$ ;  $R^2 = 0,9979$ ) foi construída com ácido gálico na faixa de concentração de 3,1 a 11,5  $\mu\text{g/mL}$ . A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos como média

$\pm$  desvio padrão em mg de ácido gálico equivalente por g de amostra seca (mg GAE/ g). Os resultados expressos na Tabela 7 mostram que a solução extrativa da Paraíba obteve um quantitativo de compostos fenólicos que superam o dobro do quantitativo do extrato de Pernambuco, indicando assim que o extrato da Paraíba como o extrato de maior interesse.

Souza (2018) em seu trabalho realizou uma quantificação dos compostos fenólicos em extratos aquoso de *Morus nigra* L. e obteve  $11,12 \pm 1,10$  (mg GAE/ g) resultado superior ao encontrado no presente estudo para os extratos da Paraíba e de Pernambuco, esta diferença pode ser justificada pela diferença de método extrativo aplicado, bem como as questões de sazonalidade ou qualidade do material em estudo.

No estudo realizado por Sánchez-Salcedo (2015) foi observado o conteúdo fenólico total em quatro extratos diferentes em folhas de *Morus alba* L. ( $13.46 \pm 0.27$ ;  $12.81 \pm 0.14$ ;  $13.16 \pm 0.41$ ;  $15.50 \pm 0.56$ ) e *Morus nigra* L. ( $13.48 \pm 0.46$ ;  $13.92 \pm 0.72$ ;  $16.13 \pm 0.55$ ;  $14.01 \pm 0.90$ ), onde obteve-se resultados superiores em equivalente mg de ácido gálico da *Morus nigra* L. em comparação com a *Morus alba* L., quando comparamos estes resultados aos valores encontrados no presente estudo para o conteúdo fenólico total em *Morus nigra* L. dos extratos da Paraíba e de Pernambuco (principalmente para o segundo), é notada uma diferença considerável, que pode ser explicada pela diferença de solução extrativa utilizada (metanol), bem como as diferenças geográficas (solo, clima).

**Tabela 7** – Equivalente em ácido gálico dos compostos fenólicos presente nos extratos

Extrato	Concentração de ácido gálico em mg/g de extrato
Paraíba	$7,05 \pm 0,01$
Pernambuco	$3,424 \pm 0,02$

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

## 6.6 Determinação da capacidade antioxidante pelo método de DPPH

Esta metodologia apresenta o radical DPPH que tem coloração violeta e, ao entrar em contato com algum antioxidante, é reduzido passando a ter uma coloração amarelada. Essa diferença na coloração possibilita a leitura da absorbância, sendo feita em 517 nm, podendo assim determinar a concentração de antioxidantes presentes na amostra.

A absorbância observada em alíquota do reagente de DPPH é de 0,832, sendo esse valor adotado como o controle da reação. O padrão utilizado neste experimento foi o

TROLOX, que é um análogo a vitamina E, é utilizado como padrão devido a sua grande capacidade redutora do reagente DPPH, além de sua solubilidade tanto em álcool como em água.

Dessa forma foi calculado o valor de IC50 sendo este o equivalente, em mg da amostra, a capturar 50% do radical de DPPH que estava contida na solução. Os resultados para os IC50 estão descritos na Tabela 8:

**Tabela 8** – Concentração inibitória do radical DPPH dos extratos da Paraíba e Pernambuco

Amostra	IC50 em mg/mL
Padrão (TROLOX)	0,051
Extrato Paraíba	1,07
Extrato Pernambuco	1,80

**Fonte:** Elaborada pelo autor.

Ao relacionar os resultados dos extratos com o resultado do padrão é possível compreende-se que os dois extratos conseguiram valores de concentração de inibição do radical DPPH acima do padrão. Em uma comparação entre os dois extratos, observa-se o extrato da Paraíba obtendo resultado de concentração de inibição menor que o resultado do extrato de Pernambuco, qualificando-o como o extrato de escolha, em se tratando de capacidade antioxidante. No estudo de Dalmagro et al. (2018), onde foi realizada uma análise da variação sazonal sobre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante, foi relatado um valor de IC50 para extrato aquoso de *Morus nigra* L. de 1,25 mg/mL, valores similares aos encontrados para os extratos de Pernambuco e da Paraíba.

Os resultados observados corroboram com a expectativa para os dois extratos, visto que nestes foi detectada quantidade considerável de compostos fenólicos e estes compostos, em geral, possuem capacidade antioxidante (SOARES, et al., 2020). Ainda assim, apesar dos resultados apresentados por estes extratos, torna-se interessante a aplicação de outras metodologias de identificação da capacidade antioxidante que reafirmassem os resultados obtidos neste estudo, trazendo então mais robustez ao mesmo.

## 7 CONCLUSÃO

As plantas medicinais, hoje, são objeto de pesquisa por todo mundo dado o seu potencial para produção de medicamentos, cosméticos, nutracêuticos e afins. Dessa forma é imprescindível a padronização e otimização do método extrativo em plantas medicinais de interesse comercial.

A partir dos resultados apresentados no decorrer deste estudo, conclui-se que foi possível validar o método extrativo bem como otimizar este processo. No processo de otimização da extração, fica claro que a variável proporção droga:solvente surgiu como uma das variáveis mais importantes devido a sua influência sobre as variáveis dependentes, essa influência recaiu sobre as variáveis dependentes dos dois extratos.

Para o efeito das variáveis de entrada sobre o teor de polifenóis as variáveis temperatura e proporção droga:solvente tiveram influência significativa sobre o teor de polifenóis, sendo o teor de isoquercetina relatado como o único estatisticamente relevante. A maximização para o extrato de Pernambuco foi obtida no EaMn2 (temperatura= 70°; droga:solvente= 25:250; tempo 60 min) e para o extrato da Paraíba no EaMn4 (temperatura= 85°; droga:solvente= 25:250; tempo= 30 min),

Os dados apresentados para a determinação dos compostos fenólicos nos extratos demonstram que, apesar de menor do que em outros estudos semelhantes, as quantidades obtidas no presente estudo demonstraram-se interessantes nos dois extratos, sendo o extrato de Paraíba superior ao de Pernambuco.

Quanto à capacidade antioxidante para os extratos de *Morus nigra* L., observou-se resultados promissores, com o extrato da Paraíba mostrando vantagem frente ao extrato de Pernambuco. Essas diferenças podem ser explicadas pelas questões climáticas, pela diferença no manejo do solo, da exposição a agentes externos e outras.

Por fim, neste estudo foi demonstrado evidências de que extratos das folhas de *Morus nigra* L. são fontes relevantes de compostos fenólicos e de antioxidantes, assim como foi possível construir um caminho para maximização de extração destes compostos, estes que são de interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de fitomedicamentos e nutracêuticos.

## 8 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente estudo destaca resultados de padronização farmacognóstica além de buscar as melhores condições possíveis de extração para extratos de *Morus nigra* L. Dessa forma, torna-se interessante a continuidade da pesquisa para que seja efetivada a introdução dos extratos da *Morus nigra* L. em algum tipo de formulação, como por exemplo as nanoestruturas, que apesar de complexas conseguem incorporar variadas substâncias. Para tanto, seria necessário também aprofundar os estudos em técnicas de caracterização de nanopartículas, realizar ensaios de atividade biológica, ensaios de citotoxicidade, bem como desenvolver formas farmacêuticas e realizar os respectivos testes de eficácia e segurança, além de controles de qualidade sobre os processos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, T. et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic content & antioxidante activity of hog plum (*Spondias piannata L. f. kurz*) pulp by response surfasse methodology. **Heliyon**, n. 7, págs. 1-15, 2022.
- ALENN JR, L. V.; POPICH, N. G.; ANSEL, C. **Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 8 ed. Porto Alegre: Artmed, 2007.
- ANGELO, P. M. JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão, **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, págs. 1-9, 2007.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**, volume 1. 6ª Ed. Brasilia, 2019.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada - **RDC Nº 26**, de 13 de maio de 2014. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br/legis](http://www.anvisa.gov.br/legis)> Acessado em: 12 de dezembro de 2021.
- BARROSO L. A.; BARBOSA M. S.; LEMOS I. L.; SILVA M. R.; MORAIS A. H.; Prospecção fitoquímica de infusões aquosas de ramos e folhas de amora (*Morus nigra L.*) utilizando delineamento composto central rotacional **Research, Society and Development**, v. 9, n. 8, 2020.
- BARTH, O. M.; MELO, A. A. M., MTSUDA, A. H.; FREITAS, A. S.; MURADIAN, L. B. A. Capacidade antioxidante da própolis, **Pesq. Agropec. Trop.**, Goiânia, v. 44, n. 3, págs. 341-348, jul./set, 2014.
- BONFANTE, J. W. et al. Plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. *In: II CONAIS – CONGRESSO NACIONAL DE INOVAÇÕES EM SAÚDE*, pg. 1-9, 2021.
- BORGES, L. L.; CARVALHO, T. L.; GIL, E. S.; BARBOSA, F. B. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais enciclopédia biosfera, **Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n.12, 2011.
- BLOIS, M. S.; Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.
- BRANDÃO M. L. P.; ROMANO C. A.; PAZ A. S.; PAULA J. R. What is the impact of research with *Morus nigra*? A scientometric study **Research, Society and Development**, v. 10, n.2, 2021.
- BRASIL. Resolução RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Diário Oficial [da] República do Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Brasília, DF, 14 maio, 2014, seção 1, pág. 52.

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

CEDRIM, P. C. A.; BARROS, E. M. A.; NASCIMENTO, T. G.; Propriedades antioxidantes do açaí (Euterpe oleracea) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.

CORRÊA, T. et al. O estudo fitoquímico, análise farmacognóstica e ensaio toxicológico das cascas da Dalbergia monetária Linnaeus f. (1782), In: \_\_\_\_\_ **Plantas medicinais do estado do Amapá dos relatos da população às pesquisas científicas**, Editora Científica Digital, pág. 93-102, 2021.

DALMAGRO, A. P.; CAMARGO, A.; MOREIRA, T. D.; BINI, L. A.; ZENIL A. L. B.; **Perfil fitoquímico e efeito hipolipidêmico do extrato aquoso de folhas de amoreira-preta (Morus nigra L.)**. In: XXIV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, Belo Horizonte, MG, 2016.

DALMAGRO, P. et al. Seasonal variation in the antioxidant phytochemicals production from the *Morus nigra* leaves. **Industrial Crops and Products**, Blumenau, v. 123, p. 323-330, 2018.

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

GHORBANI A.; HOOSHMAND S.; Protective Effects of *Morus nigra* and Its Phytochemicals against Hepatotoxicity: A Review of Preclinical Studies. **Pharmacology**, v. 106, n. 5-6, pág. 233-243, 2021, DOI: 10.1159/000515032.

GUIDO, Z. N. S.; RIBEIRO, A. T.; RIBEIRO, P. F. A. **Extração de compostos fenólicos da salsa e alecrim por diferentes métodos e solventes**. In: X SIMPÓSIO DE ALIMENTOS, UNIVERSIDADE DE PASSO FUNDO, 2018.

GUIZZO, Pedro Luis et al. Controle de Qualidade e triagem fitoquímica da droga vegetal das folhas de *Morus nigra* L. (MORACEAE). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, 2015.

HAIDA, K. S.; SILVA, F. J.; COELHO, S. R. M.; LIMA, D. S.; ABRÃO, R. M.; HAIDA, K. Y. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de amoreira-preta (*Morus nigra* L.) **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, ano 12, n. 40, abr/jun, 2014.

HAMANN, B. et al. Caracterização dos compostos fenólicos, avaliação da toxicidade e análise da qualidade de amostras de chá de *Miconia albicans*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 4, p. 450-461, 2020.

HARBORNE, J. B. Phenolic Compounds. In: **Métodos Fitoquímicos**. Springer, Dordrecht, 1973.

LIMA, M. J. S.; SILVA, M. Y. C.; MELO, K. R.; CHAGAS, B. F.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R.; SILVA, R. M. F.; Caracterização do extrato seco de libidibia ferrea para terapia antihiperlipidêmica/Characterization of the libidibia ferrea dry extract for antihyperlipidemic therapy. **Brazilian Journal of Development**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 97488–97506, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n12-297. Disponível em:

<https://brazilianjournals.com/ojs/index.php/BRJD/article/view/21506>. Acesso em: 19 oct. 2022.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C. P.; JUNIOR VEIGA, V. F. GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de Estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, págs. 429-438, 2002.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 2, abr./jun., 2008.

MIRANDA A. M.; VIEIRA G. D.; ALVES M. S.; YAMAMOTO C. H.; PINHO J. J. R. G.; SOUSA O. V. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, **Brasil HU Revista**, v. 36, n. 1, jan./mar, págs. 61-68, 2010.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S.B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, págs. 315-320, jan./mar., 2009.

NACZK, M. SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, 1054 (2004) 95–111.

NOMURA, T. Phenolic Compounds of the Mulberry Tree and Related Plants. **Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, págs. 87-201, 1988.

OLIVEIRA, A.C.B. ; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L. OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae), **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.15, n.2, págs.244-249, 2013.

OLIVEIRA, T. N. F.; COSTA, C. C.; ESTEVAM, D. P.; MEDEIROS, I. A. A.; LIMA, E. C. S.; SANTOS, V. M.; OLIVEIRA FILHO, A. A.; OLIVEIRA, H. M. B. F.; *Morus nigra* L.: revisão sistematizada das propriedades botânicas, fitoquímicas e farmacológicas, **Arch Health Invest**, v. 7, n. 10, págs. 450-454, 2018.

PADILHA, M. M.; MOREIRA, L. Q.; MORAIS, F. F.; ARAÚJO, T. H.; SILVA, G. A. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, n. 4, ago./set., 2010.

PEREIRA, P. M. **Aplicabilidade do extrato hidroalcoólico de amora miura (*Morus nigra* L.) em mulheres no climatério**. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia) – Universidade Estadual da Paraíba, 2018.

ROSA, R. C. A.; RIBEIRO, L. R.; SOUZA, A. M. G.; FONSECA, T. A. Triagem fitoquímica dos extratos aquosos de *Bauhinia candicans*, *Foeniculum vulgare*, *Mentha pulegium* e *Morus nigra*, **Revista Conexão Ciência**, v. 11, n. 1, 2016.

SANCHEZ-SALCEDO, E. et al., (Poly)phenolic compounds and antioxidant activity of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves: Their potential for new

products rich in phytochemicals, **Journal of Functional Foods**, n. 18, págs. 1039-1046, 2015.

SCHAFRANSKI, K. **Extração e caracterização de compostos fenólicos de folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, 2019.

SHAMI, N. J. I.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como a gente oxidante. **Rev. Nutr., Campinas**, v. 17, n. 2, abr./jun.; págs. 227-236, 2004.

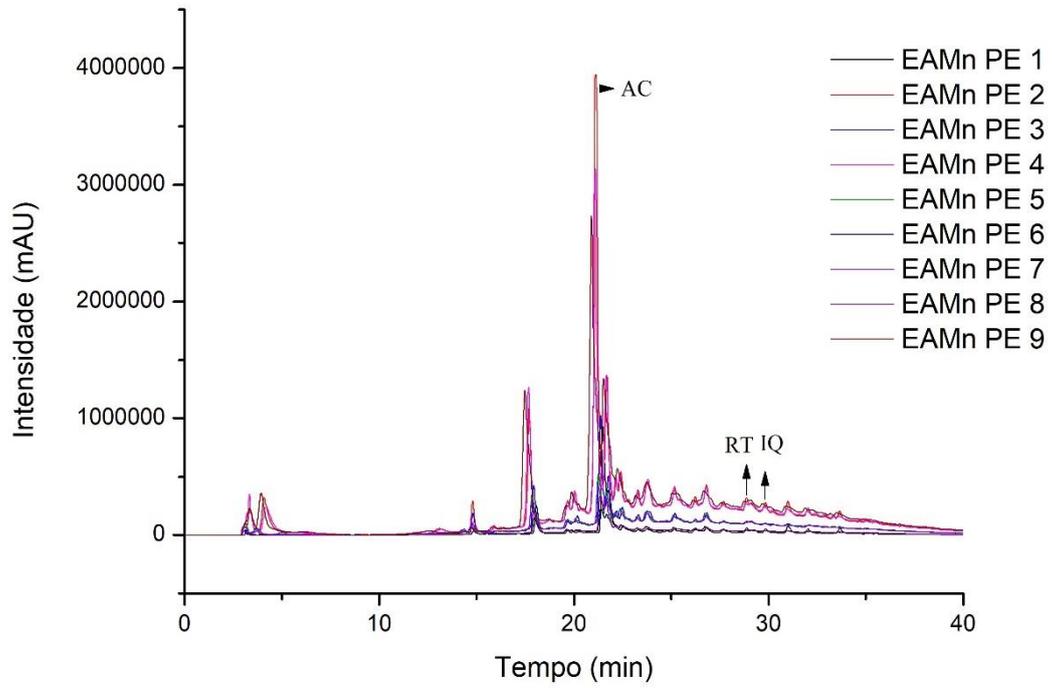
SOARES, M. S. S.; ALVES R. M.; RAMOS, R. S.; OLIVEIRA, A. A.; SANROS, L.; A.; IBIAPINA, A.; APARECIDA, S. M.; MARTINS, G. S.; Correlação entre compostos bioativos e atividade antioxidante de polpa de guapeva (pouteria cf. *guardneriana* radlk): correlação dos compostos bioativos da guapeva. Desafios. **Revista Interdisciplinar da Universidade Federal do Tocantins**, [S. l.], v. 7, n. Especial, p. 11–19, 2020. DOI: 10.20873/uftsupl2020-8473. Disponível em: <https://sistemas.uft.edu.br/periodicos/index.php/desafios/article/view/8473>. Acesso em: 22 out. 2022.

SOUZA, C. I. **Extração aquosa de compostos fenólicos presentes em folhas de amoreira preta (*Morus nigra* L.) e encapsulamento em esferas de alginato de cálcio**. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2018.

SUNG HO, L.; CHOI, C-I. Pharmacological Properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as A Promising Nutraceutical Resource. **Nutrients**, v. 11, n. 2. 437, 2019, DOI: <https://doi.org/10.3390/nu11020437>.

TUPINAMBÁ E. D; MELO, F. O. B.; ARAÚJO, M. V. A. Saber popular e conhecimento científico na comercialização de plantas medicinais para saúde bucal, **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, 2021.

ZATTI, P. H.; FERLITO, J. V. .; BRANCO, C. dos S. . Study of the role of oxidative stress and antioxidants in SARS-CoV-2 infection: a systematic review . **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. e52711831346, 2022. DOI: 10.33448/rsd-v11i8.31346. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/31346>. Acesso em: 23 nov. 2022.

**APÊNDICE A – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Morus nigra* L. de PE**

**APÊNDICE B – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *Morus nigra* L. de PB**

