

MINISTÉRIO DA SAÚDE

MONOGRAFIA DA ESPÉCIE *Morus nigra* L. (AMOREIRA)

Organização: Ministério da Saúde e Anvisa

Fonte do recurso: Ação 20K5 (DAF/SCTIE/MS)/2013

BRASÍLIA

2015

CATALOGAÇÃO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Fotos das folhas (1A e 1B) e fruto (1C) da espécie <i>Morus nigra</i> L.....	2
Figura 2 – Mapa de registro em herbários da espécie <i>Morus nigra</i> L.....	4
Figura 3 – Identificação microscópica das folhas de <i>Morus nigra</i> L., Moraceae.....	7
Figura 4 – Identificação microscópica das folhas de <i>Morus nigra</i> L., Moraceae:.....	8
Figura 5 – Estruturas químicas de alguns constituintes químicos isolados de <i>Morus nigra</i> L.	36
Quadro 1 – Principais procedimentos para a obtenção de extratos de <i>Morus nigra</i> L.....	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de macronutrientes nas folhas e frutos de *Morus nigra* (em ppm).....12

Tabela 2 – Conteúdo de micronutrientes e metais pesados nas folhas de *Morus nigra* L.....13

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT/TGP – Alanina transaminase

AST/TGO – Aspartato transaminase

°C – graus Celsius

CCD – Cromatografia em camada delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

DL₅₀ – Dose letal 50%

DMSO - Dimetilsulfóxido

ESI-MS – Electrospray ionization coupled to mass spectrometry

EtOH – Etanol

g - gramas

HCl – Ácido clorídrico

HPLC – High performance liquid chromatography

HPLC-DAD – High performance liquid chromatography coupled to diode array detector

H₂SO₄ – Ácido sulfúrico

Kg – quilogramas

L - litros

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

MDA - Malondialdeído

mL – Mililitro

MTT - Metiltetrazólio

NaCl – Cloreto de sódio

ppm – Partes por milhão

rpm – Rotações por minuto

TA – Ácido tânico

VLDL – Lipoproteína de muito baixa densidade

SUMÁRIO

1 IDENTIFICAÇÃO.....	1
1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA.....	1
1.2 SINONÍMIA BOTÂNICA.....	1
1.3 FAMÍLIA.....	1
1.4 FOTO DA PLANTA.....	2
1.5 NOMENCLATURA POPULAR.....	3
1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	3
1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS.....	4
2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS.....	5
2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL.....	5
2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA.....	5
2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA.....	5
2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES.....	9
3 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE.....	10
3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL.....	10
3.1.1 Caracteres organolépticos.....	10
3.1.2 Requisitos de pureza.....	10
3.1.2.1 <i>Perfil de contaminantes comuns</i>	10
3.1.2.2 <i>Microbiológico</i>	10

3.1.2.3 <i>Teor de umidade</i>	10
3.1.2.4 <i>Metal pesado</i>	10
3.1.2.5 <i>Resíduos químicos</i>	10
3.1.2.6 <i>Cinzas</i>	11
3.1.3 <i>Granulometria</i>	11
3.1.4 <i>Prospecção fitoquímica</i>	11
3.1.5 <i>Testes físico-químicos</i>	11
3.1.6 <i>Testes de identificação</i>	11
3.1.7 <i>Testes de quantificação</i>	12
3.1.7.1 <i>Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não</i>	
3.1.8 <i>Outras informações úteis para o controle de qualidade</i>	13
3.2 <i>DERIVADO VEGETAL</i>	13
3.2.1 <i>Descrição</i>	13
3.2.2 <i>Método de obtenção</i>	14
3.2.3 <i>Caracteres organolépticos</i>	32
3.2.4 <i>Requisitos de pureza</i>	32
3.2.4.1 <i>Perfil de contaminantes comuns</i>	32
3.2.4.2 <i>Microbiológico</i>	32
3.2.4.3 <i>Teor de umidade</i>	32
3.2.4.4 <i>Metal pesado</i>	32
3.2.4.5 <i>Resíduos químicos</i>	32
3.2.5 <i>Testes físico-químicos</i>	32
3.2.6 <i>Prospecção fitoquímica</i>	33

3.2.7 Testes de identificação.....	33
3.2.8 Testes de quantificação.....	33
3.2.8.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	
3.3 PRODUTO FINAL.....	39
3.3.1 Forma farmacêutica.....	39
3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica.....	39
3.3.3 Requisitos de pureza.....	39
3.3.4 Resíduos químicos.....	39
3.3.5 Prospecção fitoquímica.....	39
3.3.6 Testes de identificação.....	39
3.3.7 Testes de quantificação.....	39
3.3.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não	
4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA.....	40
4.1 USOS POPULARES E/OU TRADICIONAIS.....	40
4.2 PRESENÇA EM NORMATIVAS SANITÁRIAS BRASILEIRAS.....	41
4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS.....	41
4.3.1 Estudos toxicológicos.....	41
4.3.1.1 Toxicidade aguda.....	41
4.3.1.2 Toxicidade subcrônica.....	42
4.3.1.3 Toxicidade crônica.....	43
4.3.1.4 Genotoxicidade.....	43
4.3.1.5 Sensibilização dérmica.....	43
4.3.1.6 Irritação cutânea.....	43

4.3.1.7 Irritação ocular.....	43
4.3.2 Estudos farmacológicos.....	44
4.3.2.1 Ensaio <i>in vitro</i>	44
4.3.2.2 Ensaio <i>in vivo</i>	46
4.3.2.3 Ensaio <i>ex vivo</i>	52
4.4 ESTUDOS CLÍNICOS.....	53
4.4.1 Fase I.....	53
4.4.2 Fase I.....	53
4.4.3 Fase III.....	53
4.4.4 Fase IV.....	53
4.4.5 Estudos observacionais.....	53
4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO	
4.5.1 Vias de Administração.....	54
4.5.2 Dose Diária.....	54
4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo).....	54
4.5.4 Período de Utilização.....	54
4.5.5 Contra Indicações.....	54
4.5.6 Grupos de Risco.....	55
4.5.7 Precauções de Uso.....	55
4.5.8 Efeitos Adversos Relatados.....	55
4.5.9 Interações Medicamentosas.....	55
4.5.9.1 Descritas.....	55
4.5.9.2 Potenciais.....	55

4.5.10 Informações de Superdosagem.....	55
4.5.10.1 <i>Descrição do quadro clínico</i>	56
4.5.10.2 <i>Ações a serem tomadas</i>	56
5 INFORMAÇÕES GERAIS.....	57
5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS /FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA.	57
5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS.....	57
5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO.....	57
5.4 ROTULAGEM.....	57
5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS.....	57
5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL.....	57

1 IDENTIFICAÇÃO

1.1 NOMENCLATURA BOTÂNICA

Morus nigra L. (1, 2)

1.2 SINONÍMIA BOTÂNICA

Informação não descrita nas referências consultadas.

1.3 FAMÍLIA

Moraceae (1, 2)

1.4 FOTO DA PLANTA



Figura 1 – Fotos das folhas (1A e 1B) e fruto (1C) da espécie *Morus nigra* L.

Fonte: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

1.5 NOMENCLATURA POPULAR

No Brasil, a espécie *Morus nigra* L. é conhecida popularmente como amora, amoreira, amoreira preta, amoreira negra (2) e sarça mora (4). Na região do Vale do São Francisco é conhecida como amora miúra (5). Em países da Europa, Estados Unidos e Ásia a planta é conhecida popularmente como mulberry, black mulberry, hei sang, yao-sang, shanxiguosang, luoyu hao (6) e shahtoot (1, 7).

1.6 DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O gênero *Morus* é amplamente distribuído na Ásia, Europa, América do Norte, América do Sul e África (Figura 2), e plantas desse gênero são extensivamente cultivadas na Ásia para a produção da seda. *Morus nigra* é uma espécie vegetal que tem sua origem na Ásia, frutificando com maior intensidade e abundância, sobretudo na Ásia Menor e estando plenamente aclimatizada no Brasil (8). O cultivo dessa espécie no Brasil começou com a migração japonesa para o país (9). A planta pode ser encontrada em regiões temperadas e subtropicais da Ásia, África e América do Norte, e pode crescer em uma grande variedade de condições climáticas, topográficas e de solo (10). As amoreiras se espalham por todas as regiões dos trópicos até o sub-ártico, podendo ser encontradas desde o nível do mar até regiões de altitudes de até 4000 m. Amoreiras são cultivadas em altitudes consideravelmente elevadas na região do Himalaia-Hindu, enquanto no Paquistão elas são amplamente cultivadas em regiões do norte (11). Devido a essa capacidade de adaptação a diferentes climas e altitudes, *M. nigra* pode ser considerada uma espécie cosmopolita (12). Essa espécie também tem sido muito difundida na China, Paquistão, Irã e Afeganistão (7). Em muitos países, em particular na Índia e China, as amoreiras são usadas devido às suas folhas, que servem para alimentar o bicho da seda (*Bombyx mori* L.). Por outro lado, em muitos países europeus, incluindo Turquia e Grécia, as amoreiras são usadas mais para a produção de frutos do que para a produção de folhas. O cultivo dessa planta na Turquia é conhecido há mais de 400 anos (10).

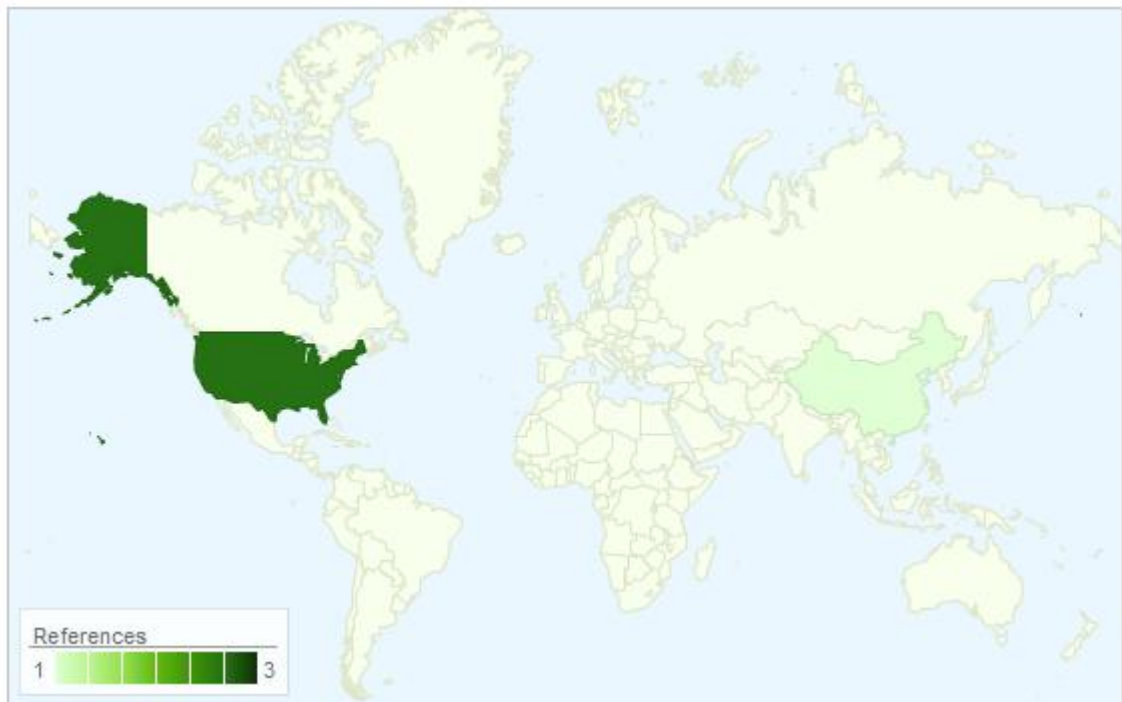


Figura 2 – Mapa de registro em herbários da espécie *Morus nigra* L.

Fonte: <http://www.tropicos.org/MapsCountry.aspx?maptype=4&lookupid=21300470>

1.7 OUTRAS ESPÉCIES CORRELATAS DO GÊNERO, NATIVAS OU EXÓTICAS ADAPTADAS

Informação não descrita nas referências consultadas.

2 INFORMAÇÕES BOTÂNICAS

2.1 PARTE UTILIZADA / ÓRGÃO VEGETAL

O material vegetal de interesse farmacológico são as folhas e os frutos.

2.2 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

“As folhas apresentam o limbo simples, com coloração verde escuro na face ventral e coloração verde claro na face dorsal, flexível e membranácea (Figura 3). O limbo apresenta-se íntegro, superfície rugosa e forma oval. Em média, as folhas atingem 16,0 x 8,0 cm. A margem é serrilhada, apresentando base arredondada e ápice acuminado. A nervação é peninérvia, apresentando cor mais clara que o limbo. O pecíolo apresenta coloração verde claro, torcido e curto, podendo aparecer exemplares com pecíolos em tamanho mediano. Atingem em média 9 cm, possui superfície pilosa, inserção lateral e é biconvexo em secção transversal” (13).

2.3 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA DA PARTE DA PLANTA UTILIZADA

“Em secção paradérmica, as células epidérmicas apresentam contorno levemente ondulado e paredes finas (Figura 4). Os estômatos anomocíticos localizam-se exclusivamente na face abaxial e inserem-se no mesmo nível das células circunvizinhas, podendo estar rodeados de 3, 4, 5 até 6 células. A análise possibilitou a observação de cutícula estriada na epiderme inferior e cutícula lisa na epiderme superior. A folha em seção transversal apresenta mesofilo heterogêneo bifacial, com aproximadamente 50% de parênquima paliádico. As células da epiderme inferior se apresentam menores que as células da epiderme superior. No mesofilo observou-se presença de litocistos com cristólitos em forma de pêndulo ou badalo de sino. Em cortes transversais da nervura central observou-se a presença de tricomas tectores simples. A nervura central tem secção semi-convexa e a epiderme possui as mesmas características previamente descritas.

Subjacente ao sistema de revestimento, nota-se o colênquima angular, formado por cerca de 5 a 6 camadas junto a face adaxial e 4 a 5 no lado oposto. No parênquima fundamental encontra-se um feixe vascular colateral em arco aberto. Interno ao arco formado por esse sistema vascular principal, voltado para a face adaxial, observam-se pequenos cordões de xilema e floema. Observou-se a presença de drusas no parênquima fundamental. Observou-se também a presença de tricomas tectores simples em secções transversais do pecíolo. Este revela organização interna mostrando feixes vasculares do tipo colateral, separados por raios de parênquima fundamental. Apresenta epiderme uniestratificada com cutícula espessada. O colênquima é do tipo angular, e formado por aproximadamente 12 camadas, seguido de células parenquimáticas” (13).

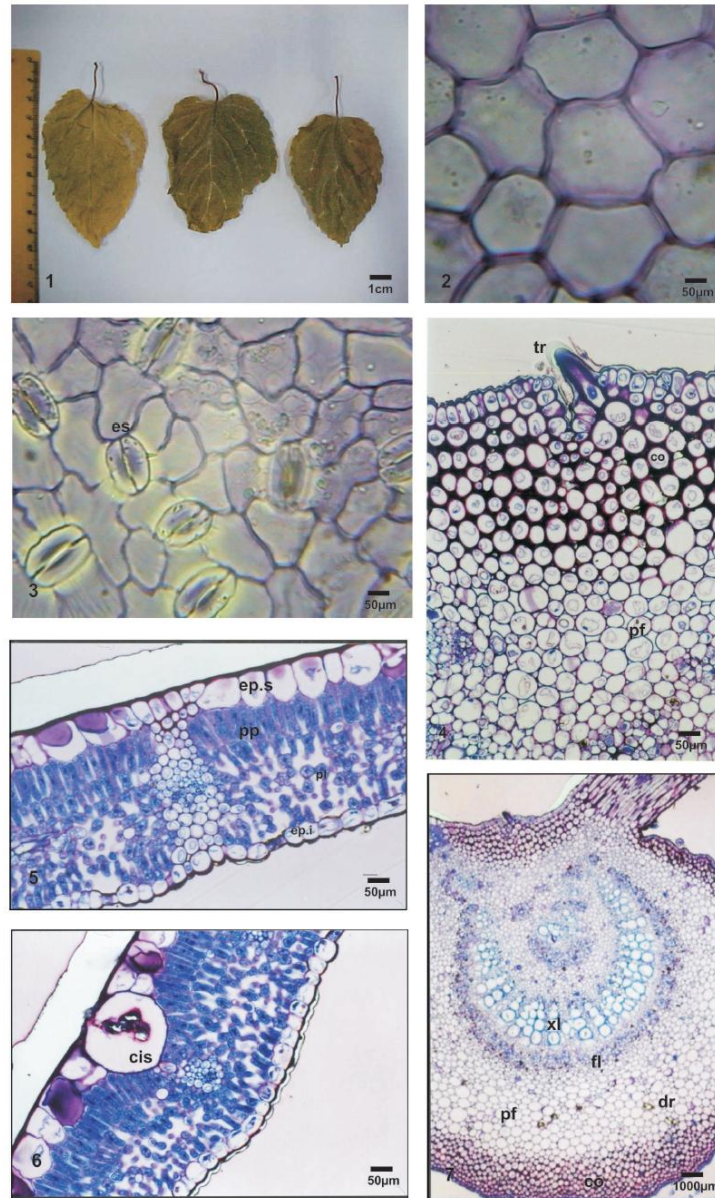


Figura 3. Identificação microscópica das folhas de *Morus nigra* L., Moraceae: 1. droga vegetal; 2. face epidérmica adaxial; 3. face epidérmica abaxial; 4. nervura central, em secção transversal, indicando a epiderme com tricoma, colênquima e parênquima fundamental; 5, 6. secção transversal do mesofilo dorsiventral; mostrando epiderme, parênquimas paliçádico e lacunoso, feixe vascular marginal e detalhe do cistólito em forma de pêndulo; 7. secção transversal da nervura central semi-convexa. cis: cistólito; co: colênquima; dr: drusas; ep.i: epiderme inferior; ep.s: epiderme superior; es: estômato; fl: floema; pf: parênquima fundamental; pl: parênquima lacunoso; pp: parênquima paliçádico; tr: tricomas; xi: xilema.

Fonte: Adaptado da referência (13).

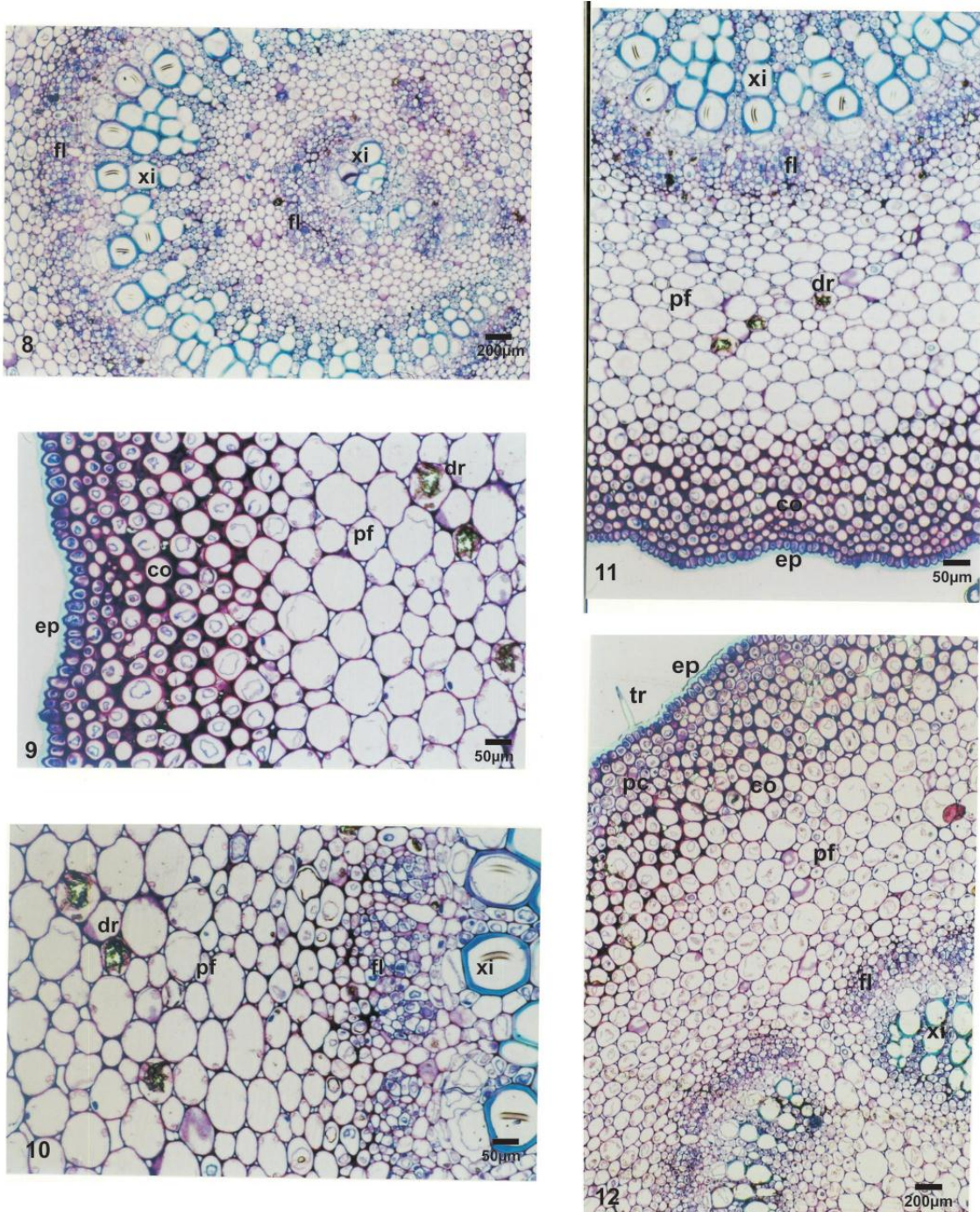


Figura 4. Identificação microscópica das folhas de *Morus nigra* L., Moraceae: 8, 9, 10 e 11. nervura central, em secção transversal, onde se notam detalhes dos feixes vasculares e drusas; 12. pecíolo, em secção transversal, onde se evidencia feixes vasculares do tipo colateral e presença de tricomas. co: colênquima; dr: drusas; ep: epiderme; fl: floema; pc: parênquima clorofiliano; pf: parênquima fundamental; tr: tricoma; xi: xilema.

Fonte: Adaptado da referência (13).

2.4 INFORMAÇÕES SOBRE POSSÍVEIS ESPÉCIES VEGETAIS SIMILARES QUE POSSAM SER UTILIZADAS COMO ADULTERANTES

Informação não descrita nas referências consultadas.

3 CARACTERIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE

3.1 ESPÉCIE VEGETAL / DROGA VEGETAL

3.1.1 Caracteres organolépticos

A parte da planta mais utilizada na medicina popular são as folhas. No entanto, na literatura consultada não foram encontradas informações sobre caracteres organolépticos das mesmas. Os frutos da espécie são comestíveis, de sabor agridoce, muito sumosos e refrescantes (14).

3.1.2 Requisitos de pureza

3.1.2.1 Perfil de contaminantes comuns

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.2 Microbiológico

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.3 Teor de umidade

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.4 Metal pesado

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.5 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.2.6 Cinzas

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.3 Granulometria

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.4 Prospecção fitoquímica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.1.5 Testes físico-químicos

Um estudo realizado por Imran *et al.* (11) analisou o pH e a acidez dos frutos. Para a determinação do pH, os frutos foram espremidos para a extração do suco, e posteriormente foi realizada uma filtração. As medições de pH foram feitas usando um medidor de pH digital calibrado com tampões de pH 4 e 7. A acidez titulável foi medida pelo método de titulação (15) e expressa como porcentagem de ácido cítrico. Os valores de pH dos frutos de *M. nigra* variaram de 3,60 – 3,80 para os frutos coletados na Turquia, e 3,10 – 3,36 para os frutos coletados na Espanha, valores aceitáveis para o trabalho. Em um estudo anterior, valor de pH igual a 3,52 foi reportado na literatura (10). A acidez titulável dos frutos foi de $1,51 \pm 0,14$ em porcentagem de ácido cítrico.

3.1.6 Testes de identificação

Foi realizada a caracterização estrutural da folha, de modo a contribuir na morfodiagnose para o controle de qualidade. A folha apresenta estômatos anomocíticos na face abaxial, tricomas tectores, mesofilo bifacial, drusas, nervura central semi-convexa e o pecíolo exibe feixes vasculares em arco fechado. As características gerais da folha não destoam do gênero como um todo. Cristais de carbonato de cálcio foram encontrados na epiderme das folhas. Esses cristais são encontrados apenas em algumas famílias botânicas como Moraceae, Urticaceae e Acanthaceae (13).

3.1.7 Testes de quantificação

3.1.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

Foram realizados testes para a determinação do conteúdo de açúcares e pectina; determinação de vitamina, fenóis e alcaloides totais, bem como análise de minerais (11). Para a determinação do conteúdo de açúcares e pectina, a extração e determinação de açúcares totais solúveis em água, açúcares redutores e pectina foram realizadas pelos métodos da AOAC (15). Os açúcares não redutores foram obtidos por subtração dos açúcares redutores a partir do total de açúcares solúveis em água. O teor de açúcares totais foi de 6,64 g/ 100 g de frutos frescos; e o de pectina foi de 0,76 g/ 100 g.

Vitaminas (riboflavina e niacina) foram determinadas como descrito por Okwu (2005) (16), enquanto que o ácido ascórbico (vitamina C) foi quantificado através do método espectrofotométrico descrito por Hussain *et al.* (17). O conteúdo de fenóis totais dos frutos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, como descrito por Okwu (2005) usando ácido tânico (TA) como padrão. O conteúdo de alcaloides foi determinado por gravimetria. O teor de fenóis totais foi de 880 mg/ 100 g; de alcaloides totais foi de 630 mg/ 100 g. Também foi detectada a presença das vitaminas riboflavina ($0,040 \pm 0,000$ mg/ 100 g), niacina ($1,60 \pm 0,10$ mg/ 100 g) e ácido ascórbico ($15,37 \pm 0,89$ mg/ 100 g).

Para a análise de minerais foi usado o método descrito previamente por Hussain; Khan, (2010) (18). A composição mineral dos frutos em mg/ 100 g foi a seguinte: K ($1270 \pm 9,36$), Ca ($470 \pm 6,95$), Na ($272 \pm 5,32$), Mg ($240 \pm 3,51$), Fe ($77,6 \pm 1,98$), Zn ($59,20 \pm 2,25$) e Ni ($1,60 \pm 0,11$). Em outro estudo mais recente (12) a composição elementar (conteúdo de minerais) das folhas e frutos foi determinada usando um método de fluorescência por raios-X. Os resultados estão apresentados nas tabelas 1 e 2, abaixo:

Tabela 1 – Conteúdo de macroelementos nas folhas e frutos de *Morus nigra* (em ppm).

Parte da planta	P	K	Ca	Mg
Folhas	$2540,8 \pm 39,3$	$15902,1 \pm 213,0$	$19041,3 \pm 309,3$	$5192,9 \pm 324,3$
Frutos	$2292,8 \pm 41,3$	$13253,1 \pm 313,0$	$3970,6 \pm 62,3$	$1170,9 \pm 99,3$

Tabela 2 – Conteúdo de microelementos e metais pesados nas folhas e frutos de *Morus nigra* (em ppm).

Parte da planta	Na	Al	Si	S	Cl	Cr	Fe	Mn	Sr	Zn
Folhas	170,9 ± 7,9	253,1 ± 11,2	1362,2 ± 17,2	704,5 ± 12,5	780,6 ± 9,9	2,5 ± 0,3	77,7 ± 6,7	32,2 ± 1,7	11,5 ± 2,6	30,4 ± 5,7
Frutos	201,9 ± 2,0	147,3 ± 10,2	480,2 ± 9,2	603,5 ± 14,5	160,6 ± 8,9	1,20 ± 0,50	44,5 ± 8,7	26,0 ± 4,0	9,2 ± 1,6	36,3 ± 7,1

Em outro estudo, foi realizada a determinação de fenóis totais, conteúdo de gorduras totais e ácidos graxos totais, bem como a determinação do teor de ácido ascórbico nos frutos (10). O teor de compostos fenólicos foi de 1422 mg de equivalentes de ácido gálico/ 100 g de fruto fresco e 276 mg de equivalentes de quercetina/ 100 g de frutos frescos. O teor de gorduras totais foi de 0,95%. Os principais ácidos graxos encontrados foram os ácidos oleico (8,41%), linoleico (54,2%) e palmítico (19,8%).

3.1.8 Outras informações úteis para o controle de qualidade

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2 DERIVADO VEGETAL

3.2.1 Descrição

Não há monografias em farmacopeias oficiais para os derivados de *M. nigra*. Nos artigos consultados, diferentes derivados foram obtidos: decocto (5), aquosos (19, 20, 21, 22, 23), liofilizados (24), secos (25, 26, 27, 28, 29, 30), alcoólicos (10, 22, 23, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39), hidroalcoólicos (3, 7, 22, 23, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46) e orgânicos (9, 41, 47, 48). Em alguns casos, a droga vegetal foi previamente tratada com ácido (49, 50, 51, 52, 53) visando

uma extração direcionada de determinadas frações enriquecidas em metabólitos alvos do estudo. Tanto as folhas quanto os frutos foram utilizados para as diferentes extrações.

3.2.2 Método de obtenção

Diversos métodos de extração foram utilizados. Os principais procedimentos para a obtenção dos extratos estão descritos no Quadro 1, abaixo.

Quadro 1 – Principais procedimentos para a obtenção de extratos de *Morus nigra* L.

Referência	Tipo	Solvente	Relação matéria-prima: solvente	Forma de extração
5	Decocto	Água quente	12 g/ 1000 mL	Extração com água quente a 100 °C por decocção durante 10 minutos
19	Infuso	Água quente	2 folhas médias para 250 mL de água	Infusão (duas folhas médias para 250 mL de água)
25	Extrato seco	Metanol (80%)	5 g/ 50 mL	Extração realizada por sonicação em um banho ultrassônico por 45 minutos à temperatura ambiente. Após filtração por meio de um filtro de membrana de nylon 0,45 mm, os extratos foram secos sob pressão reduzida a 45 °C usando um evaporador rotatório e foram estocados a -20 °C antes das análises.
47	Extrato	Acetona ou metanol (80%, v/v)	1:10 (massa:volume)	Extrato contendo compostos fenólicos extraídos dos frutos a uma

				temperatura de 50 °C durante 30 minutos.
3	Extrato hidroalcoólico	Etanol 70%	50 g de folhas secas e pulverizadas	Extração em aparelho de Soxhlet. O solvente foi evaporado em rotavapor. O resíduo final foi dissolvido em água destilada nas concentrações de 25, 50, 75, 350 e 700 mg/ Kg para a realização de experimentos.
26	Extrato seco do suco dos frutos	N.D.	N.D.	Obtido por spray dryer. Um mini spray dryer equipado com dois atomizadores de fluido foram usados para o processo de desidratação do suco dos frutos.
54	Extrato das folhas secas	N.D.	10 g de folhas secas e pulverizadas	N.D.
40	Extrato hidroalcoólico	Etanol 70%	250 g de folhas	Folhas e culturas de células da planta (250 g) foram separadamente extraídas por maceração com álcool etílico 70% à temperatura ambiente.
18	Extrato aquoso	Água	50 g do pó das folhas	As folhas da planta foram secas a 50 °C por um período de 24 horas em um fogão aerado, e o pó foi

				<p>preparado de modo semelhante ao método de preparação da medicina popular. O extrato aquoso de <i>Morus nigra</i> foi preparado por fervura de 50 g do pó das folhas da planta em um frasco contendo 1 L de água durante 5 minutos. O extrato foi agitado e coberto até que atingisse a temperatura ambiente. O resíduo foi removido por filtração e o extrato foi, em seguida, concentrado em um evaporador rotativo (concentração final: 50 mg/mL). O extrato foi dividido em alíquotas armazenadas a -20 °C até a sua utilização.</p>
31	Extrato	Etanol 95%	8,0 Kg de galhos secos para cada 90 L	Percolação à temperatura ambiente. O filtrado foi evaporado a vácuo para produzir um resíduo (800 g).
41	Extrato	Etanol:água 50% e diclorometano	N.D.	As folhas foram secas a 40 °C e pulverizadas. O pó foi extraído com solução hidroetanólica 50%, seguido por percolação com diclorometano à

				temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida para obter o extrato:-
32	Extrato	Etanol 95%	N.D.	Obtenção do extrato sob refluxo. O resíduo foi dissolvido em água quente e então extraído com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e <i>n</i> -butanol, sucessivamente.
27	Extrato seco	EtOH 95%	474 g de raízes moídas para 1,5 L	A extração foi realizada por ultrassom em um frasco de vidro. O processo foi repetido três vezes, e os extratos foram combinados e concentrados em rotaevaporador a 40 °C sob vácuo.
49	Extrato	Ácido metafosfórico 3%: ácido acético ou metanol acídico (99:1, metanol:HCl)	N.D.	Aproximadamente 300 g dos frutos foram colhidos e homogeneizados em um liquidificador durante 1 minuto. Uma quantidade dos homogeneizados foi misturada com os solventes de extração.
21	Extrato aquoso	Água quente	100 g de folhas secas / 1,5 L	Método de extração contínuo a quente. O extrato foi evaporado até securo em um recipiente com um banho de água fervente em frente a uma

				<p>corrente de ar. O resíduo do extrato semi-sólido foi obtido (3,7 g). O mesmo foi estocado entre 0-4 °C até ser usado. Quando necessário, o resíduo do extrato foi dissolvido em água destilada e usado em estudos.</p>
33	Extrato	Metanol gelado	1:20 (peso:volume)	<p>Amostras das cascas, folhas e frutos foram extraídas individualmente com metanol gelado durante 24 horas a 30 °C. A extração foi repetida 3 vezes para completa extração. O solvente foi evaporado sob vácuo.</p>
34	Extrato	Metanol	N.D.	<p>Pedaços dos frutos <i>in natura</i> foram pesados e homogeneizados em um homogeneizador contendo cerca de 10 mL de metanol. O extrato metanólico foi então submetido à sonicação por 5 minutos e centrifugado em 10000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e evaporado.</p> <p>A suspensão aquosa resultante foi acidificada até pH 2 com ácido</p>

				<p>clorídrico para protonação dos fenolatos livres. A suspensão acídica foi saturada com NaCl e extraída com éter dietílico (1:1); este procedimento de extração do solvente foi repetido em triplicata.</p> <p>Todas as 3 frações orgânicas foram combinadas e evaporadas sob fluxo de nitrogênio. O resíduo seco foi suspenso em 1 mL de etanol:água deionizada (1:1) e filtrado em uma membrana de 0,45 micrômetros para fornecer a fração de ácidos fenólicos livres.</p>
9	Extrato	Diclorometano	N.D.	<p>As folhas de <i>Morus nigra</i> foram secas à temperatura de 40 °C e pulverizadas. O pó seco foi extraído por percolação com diclorometano à temperatura ambiente. O solvente foi removido sob pressão reduzida para obter o resíduo usado na determinação da bioatividade.</p>

6	Suco	N.D.	N.D.	<p>100 gramas dos frutos foram passados através de 3 camadas de gaze sob pressão. O suco do fruto foi centrifugado em 6700 g por 10 minutos, estocado a 4 °C, e então analisados imediatamente.</p>
48	Extrato	Metanol/água/ácido acético (70:30:5 v/v)	10 g/100 mL de solvente	<p>Os frutos (10 g) foram extraídos duas vezes por 2 minutos usando um homogeneizador em um banho de gelo. O homogenato foi filtrado sob pressão reduzida em um papel de filtro Whatman n. 06. O extrato foi concentrado sob vácuo usando um rotavapor a 40 °C e adicionou-se 25 mL de água destilada para extração em fase sólida. Uma alíquota do extrato (12,5 mL) foi passada através de uma coluna de poliamida (10 g/ 60 mL) previamente condicionada com 10 mL de metanol e 200 mL de água destilada.</p> <p>Impurezas foram removidas com 200 mL de água destilada, e os flavonoides retidos foram</p>

				<p>eluídos com metanol acidificado com 0,1% de HCl (150 mL). Cada eluato foi evaporado até securo sob pressão reduzida a 40 °C e redissolvido em água destilada.</p>
55	Extrato	Etanol 95%	3,75 Kg de cascas	<p>Extração sob refluxo. Após evaporação do solvente sob vácuo, o resíduo (650 g) foi dissolvido em água quente e então extraído com éter de petróleo, clorofórmio, acetato de etila e <i>n</i>-butanol, sucessivamente.</p>
28	Extrato seco	Metanol	115 g de frutos liofilizados / 500 mL	<p>Os frutos liofilizados foram desengordurados à temperatura ambiente com <i>n</i>-hexano e extraídos com metanol por maceração exaustiva (5 x 500 mL) para produzir 76 g de resíduo.</p>

56	Suco	NaCl 0,9% gelado	50 g de frutos frescos / 50 mL	<p>O suco foi preparado a partir dos frutos frescos por meio de homogeneização. O homogenato foi filtrado. O filtrado foi então centrifugado em 2000 g durante 10 minutos e ao sobrenadante foi adicionado 100 mL de solução salina normal, que foi estocada a -20 °C até o uso. A concentração dessa preparação foi considerada como sendo de 500 mg/mL com base no peso do material inicial (50 g/100 mL). Para a preparação do extrato polifenólico, 50 g dos frutos frescos foram adicionados de solução salina normal/DMSO (90:10 v/v) para atingir a concentração de 50 mg/mL. Para o extrato hidroalcoólico, 50 g dos frutos frescos foram adicionados de solução salina normal/DMSO (90:10 v/v) para atingir a concentração de 50 mg/mL.</p>
----	------	------------------	--------------------------------	--

29	Extrato seco	Metanol:H ₂ O	N.D.	As folhas foram lavadas e pulverizadas (3,2 Kg). As folhas pulverizadas foram molhadas em 8 L de metanol aquoso (70:30) durante 7-10 dias com agitação ocasional. A solução foi filtrada, e o filtrado foi evaporado com a ajuda de um evaporador rotativo a 70 °C. No final da evaporação, uma geleia de cor marrom foi obtida e armazenada em frasco de cor âmbar para análise posterior.
30	Extrato seco	Metanol	4,1 Kg de pó seco do cerne / 12,5 L	O pó seco do cerne de <i>Morus nigra</i> (4,1 Kg) foi extraído com metanol à temperatura ambiente durante 24 horas (3 x 12,5 L). Os extratos metanólicos foram evaporados sob pressão reduzida para fornecer um resíduo marrom escuro (153 g).
24	Extrato liofilizado	Metanol	10:1 (solvente:frutos)	Os compostos fenólicos foram extraídos usando metanol como solvente na proporção de 10:1. A extração foi feita usando um agitador à temperatura

				<p>ambiente por 24 horas seguida de filtração em papel de filtro Whatman n. 01. O resíduo foi re-extraído da mesma maneira e os dois filtrados foram reunidos.</p>
22	Extrato líquido	Etanol, etanol:água (50:50 v/v) ou água	10 g de frutos / 30 mL	<p>Cada solvente foi acidificado com 0,5 mL de HCl concentrado antes do uso. Em cada caso, a extração foi realizada três vezes com 30 mL de solvente em um banho ultrassônico por 15 minutos. A suspensão foi filtrada em um funil usando um papel de filtro Whatman n. 01 e os extratos líquidos foram estocados em um refrigerador a 5 °C até que eles fossem usados.</p>
23	Extrato	Metanol, metanol:água (50:50, v/v), etanol, etanol:água (50:50, v/v) e água	10 g de frutos / 100 mL	<p>Amostras dos frutos secos foram armazenadas em sacolas plásticas sob resfriamento até o uso. O material foi homogeneizado usando um liquidificador. Todos os solventes utilizados para extração foram acidificados com 1 mL de</p>

				HCl concentrado. Extração usando um ultrassom por 30 minutos. A suspensão foi filtrada, e os extratos obtidos foram estocados até o seu uso.
7	Extrato	Metanol:água (70:30)	N.D.	Maceração dos frutos. O extrato foi seco em evaporador rotatório e uma massa sólida foi obtida.
57	Extrato	H ₂ SO ₄ 0,009 N	5 g de frutos / 10 mL	Cerca de 200 g dos frutos foram mantidos a -20 °C até a realização das análises. As amostras foram fragmentadas e 5 g foram transferidos para tubos de centrífuga. 10 mL de H ₂ SO ₄ 0,009 N foram adicionados e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas a 15000 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi filtrado.
42	Extrato	Metanol 80%	50 g de frutos congelados / 250 mL	Os frutos congelados foram homogeneizados em metanol e centrifugados em 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi concentrado sob pressão reduzida a 50 °C usando um rotavapor. Cada extrato foi ressuspenso em DMSO

				para produzir uma solução estoque, que foi estocada a -20 °C para análise posterior.
51	Extrato	Metanol:ácido fórmico:água (50:5:45)	5 g / 25 mL	5 g dos frutos foram homogeneizados em 1200 rpm por 3 minutos com 25 mL do solvente de extração estabilizado com 2 g/ L de <i>terc</i> -butilhidroquinona. O homogenato foi agitado por 15 minutos e centrifugado (15 min, 0 °C, 2800 g). Duas extrações adicionais foram feitas para cada amostra com 25 mL do solvente de extração.
33	Extrato	Etanol	N.D.	As folhas foram coletadas e estocadas sob condição de refrigeração até o uso. Extração com etanol em aparelho de Soxhlet. O solvente foi evaporado em um banho de água quente e o extrato bruto foi obtido.

58	Óleo das sementes	N.D.	N.D.	15 g das sementes foram extraídas com hexano em um Soxhlet durante 8 horas. O óleo foi recuperado após evaporação do solvente em rotavapor a 60 °C.
59	Extrato das cascas do caule	Acetona e etanol	N.D.	As cascas do caule secas e pulverizadas (3,1 Kg) foram extraídas com acetona (7 L) por 3 dias, seguido por etanol (5 L) por 3 dias. Os extratos combinados foram evaporados em rotavapor para produzir 136,7 g de uma geleia preta. O extrato bruto foi suspenso em água e submetido à partição líquido-líquido com hexano e acetato de etila para produzir resíduos de 10,3 e 91,6 g, respectivamente. O resíduo aquoso pesou 23,8 g.
36	Extrato	Etanol	N.D.	As folhas secas e pulverizadas foram extraídas com etanol 95% durante 3 dias. Foram feitas 3 extrações a cada 72 horas. A solução extrativa foi concentrada em rotavapor e após

				evaporação do solvente forneceu 69 g de extrato etanólico bruto.
52	Extrato	Metanol acidificado, água acidificada e metanol:água não acidificado	N.D.	10 g dos frutos foram misturados em 100 mL de diferentes solventes: metanol acidificado com HCl 0,5%; água acidificada com HCl 0,5%; e metanol:água (70:30) sem adição de ácido.
43	Extrato	Metanol 80%	N.D.	Os frutos e folhas secas foram extraídos por 3 diferentes métodos. 25 g de cada material foram liofilizados a -30 °C e após a secagem, submetidos à extração por ultrassom, com agitação magnética e por homogeneização.
60	Frutos	N.D.	N.D.	Os frutos foram amassados em um homogeneizador e preparados para as análises.
42	Extrato	Etanol:água (8:2)	3 Kg de folhas secas pulverizadas	Percolação das folhas secas durante 24 horas. Após filtração, a solução foi concentrada sob pressão reduzida para fornecer 990 g de extrato.

61	Frutos	N.D.	N.D.	Os frutos maduros foram congelados e estocados a -30 °C antes das análises. Os frutos foram homogeneizados em um liquidificador e foram posteriormente usados para as análises.
45	Extrato	Etanol:água (90:10)	100 g de planta seca	Maceração por 48 horas, 3 vezes. Os extratos brutos foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida a 40 °C.
46	Extrato	Metanol 80% e água	1 g / 35 mL	Extração por meio de maceração sob agitação durante 36 horas a 30 °C. O extrato foi filtrado através de 4 camadas de gase. O volume final do filtrado foi ajustado para 50 mL. Os filtrados foram centrifugados a 4000 rpm por 10 minutos e os sobrenadantes foram estocados a -20 °C até a realização das análises.
10	Extrato	Metanol	100 g dos frutos	Cerca de 100 g dos frutos foram extraídos em um Soxhlet com metanol a 60 °C por 6 horas. O extrato foi filtrado e concentrado a vácuo a 45 °C. Finalmente, os

				extratos foram liofilizados e deixados no escuro a 4 °C até a realização dos ensaios.
62	Fração enzimática	N.D.	N.D.	Os frutos (cerca de 50 g) foram colocados em um frasco dewar sob nitrogênio líquido por 10 minutos. Os frutos refrigerados foram homogeneizados em 50 mL de tampão fosfato de potássio gelado 50 mM (pH 6), contendo 2 mM de EDTA, 1 mM de MgCl ₂ , 1 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil e Triton X-114 6%, por 2 minutos a 4 °C. Antes da homogeneização, 0,1 g de vivipolipirrolidona foi adicionado na mistura para 1 g de frutos. O homogenato foi filtrado e deixado a 4 °C por 1 hora antes de ser centrifugado a 17000 rpm por 30 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi usado como enzima bruta.

53	Extrato	Metanol:água:ácido acético (70:30:5 v/v)	5 g de frutos / 100 mL	Cerca de 5 g dos frutos foram extraídos 3 vezes com 100 mL de metanol:água:ácido acético (70:30:5 v/v) por 2 minutos em um banho de gelo. O homogenato foi filtrado sob pressão reduzida em papel de filtro. O extrato foi concentrado até a evaporação do metanol sob vácuo a 40 °C em rotavapor e completado para 50 mL com água destilada para aplicação em colunas de extração em fase sólida.
38	Extrato	Metanol	N.D.	As cascas foram extraídas com metanol sob agitação durante 3 horas. O solvente foi evaporado em rotavapor a 40 °C até seca.
48	Extrato	Etanol	50 g de frutos / 100 mL	Extração líquido-líquido em triplicata. O resíduo foi transferido para o tubo do extrator. Os compostos aromáticos foram extraídos com 75 mL de hexano e a extração foi continuada por 6 horas.

N.D. = não determinado.

3.2.3 Caracteres organolépticos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4 Requisitos de pureza

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.1 Perfil de contaminantes comuns

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.2 Microbiológico

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.3 Teor de umidade

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.4 Metal pesado

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.4.5 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.5 Testes físico-químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.2.6 Prospecção fitoquímica

Vários métodos podem ser utilizados para avaliar a presença de constituintes químicos nos extratos. Os métodos mais comuns são cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC) e prospecção fitoquímica preliminar, onde são usados reagentes e sistemas de solventes específicos para cada classe de metabólitos secundários. A presença de ácidos fenólicos e flavonoides nos extratos pode ser confirmada usando HPLC (47). Em outros experimentos foi realizada a triagem fitoquímica para avaliar a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, heterosídeos, triterpenoides, esteroides, saponinas, alcaloides, fenóis, óleos voláteis e antraquinonas (3, 7, 29, 41, 35, 36). A presença de flavonoides também pode ser visualizada borrifando-se em placa de CCD (cromatografia em camada delgada) uma solução de cloreto de alumínio 1%. Os flavonoides foram separados por CCD usando clorofórmio:metanol:água (8:2:0,5) como eluente (40).

3.2.7 Testes de identificação

Na literatura foram encontrados vários métodos para a identificação de constituintes químicos em *Morus nigra* utilizando tanto CLAE quanto espectrofotometria no ultravioleta. Vários métodos espectrofotométricos são usados para realizar a estimativa do conteúdo de fenóis totais, estimativa do conteúdo de flavonoides totais, antocianinas totais, ácidos fenólicos e quantificação de outras substâncias, como o ácido ascórbico, açúcares, ácidos orgânicos e vitaminas (22, 23, 24, 25, 35, 46, 47, 49, 57). Outros métodos como a CCD e HPLC podem ser utilizados para a determinação do perfil de compostos fenólicos, separação e identificação de flavonoides em extratos da planta (6, 27, 28, 29, 40, 41, 43, 51). Um novo método que tem sido bastante empregado na determinação do perfil de compostos fenólicos em extratos vegetais é a eletroforese capilar. Essa técnica também pode ser empregada para extratos de *M. nigra* (34). A presença de compostos voláteis também pode ser analisada pelo uso da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) (48).

3.2.8 Testes de quantificação

3.2.8.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

Resultados de triagem fitoquímica mostraram reação positiva para a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, triterpenoides e esteroides (3). Os principais constituintes químicos isolados ou descritos para a espécie estão listados a seguir. A partir do estudo fitoquímico das cascas foram isolados e identificados um novo estilbeno, o 2,3,4,5,5-

pentahidroxi-*cis*-estilbeno, juntamente com 13 compostos conhecidos: resveratrol, oxiresveratrol, norartocarpina, kuwanona C, morusina, cudraflavona A, kuwanona G, albaflurano C, mulberrofurano G, 3-*O*-acetil- α -amirina, 3-*O*-acetil- β -amirina, ácido ursólico-3-*O*-acetato e uvaol (63). α -Tocoferol, decaprenol e sitosterol também foram descritos como constituintes químicos da planta (54), além de rutina, quercetina, morusina e ciclomorusina (40). Dez novos flavonoides isoprenilados (Nigrasins A-J), além dos compostos sanggenol H, cudraflavona C e macaranona B foram isolados dos galhos da planta (31). Ácido betulínico, β -sitosterol e germanicol foram isolados das folhas da planta coletada em Alfenas-MG (41). Um novo derivado 2-arilbenzofurano Mornigrol D, juntamente com duas novas flavonas, Mornigrol G e Mornigrol H, e mais seis compostos conhecidos (norartocarpina, dihidrokaempferol, albanin A, albanin E, moracin M, albafluran C) foram isolados das cascas da espécie coletada na China (32).

A partir do estudo fitoquímico das raízes um novo composto, o 5'-geranil-5,7,20,40-tetrahidroxiflavona, e mais 28 compostos fenólicos conhecidos foram isolados: estepogenina-di-7,4'-*O*- β -*D*-glicosídeo; 5,7-dihidroxicumarina-7-(6-*O*- β -*D*-apiofuranosil- β -*D*-glicopiranosídeo); mulberrosídeo A; mulberrosídeo B; 7-[[6-*O*-(6-desoxi-*R-L*-mannopiranosil)-*O*- β -*D*-glicopiranosil]-oxi]-2H-1-benzopirano-2-ona; xerobosídeo; morina-7-*O*- β -*D*-glicosídeo; 5,7-dihidroxicumarina-7-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo; estepogenina-7-*O*- β -*D*-glicosídeo; moracina M; moracinosídeo M; 2,4,20,40-tetrahidroxichalcona; moracina O; norartocarpina; kuwanona G; moracina C; cudraflavona C; moracina N; kuwanona H; mulberrofurano G; morachalcona A; mulberrofurano J; cudraflavona B; kuwanona U; kuwanona E; oxiresveratrol-2-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo; oxiresveratrol-3'-*O*- β -*D*-glicopiranosídeo; e mulberrofurano B (27). Estudo utilizando a técnica de eletroforese capilar levou à separação de 8 compostos fenólicos da planta: ácido vanílico, ácido gálico, ácido sirínico, ácido protocatecuico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido clorogênico (34). Oxiresveratrol, resveratrol, rutina, 1-deoxinojirimicina, cianidina-3-*O*- β -glicosídeo, cianidina-3-*O*- β -rutinosídeo foram identificados nos frutos utilizando HPLC (6). Os compostos morunigrol A, morunigrol B, Morunigrol C, albaflurano A, albaflurano B e mulberrofurano L foram isolados das cascas da espécie coletada na China (55).

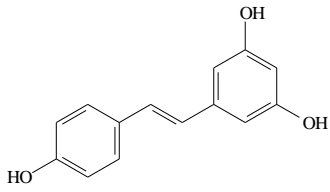
Quercetina-3-*O*-glicosídeo, quercetina-3-*O*-rutinosídeo, kaempferol-3-*O*-rutinosídeo, ácido 5-*O*-cafeoilquínico, cianidina-3-*O*-glicosídeo, cianidina-3-*O*-rutinosídeo, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo e pelargonidina-3-*O*-rutinosídeo foram identificados nos frutos da espécie utilizando as técnicas de HPLC-DAD e ESI-MS (28). Morusina é o principal prenilflavonoide presente nas cascas do caule da espécie coletada na Itália (4). Os compostos quercetina,

luteolina e isoramnetina foram identificados no extrato metanol:água da espécie coletada no Paquistão (29), enquanto os compostos norartocarpanona e euchrenona a7 foram identificados na planta coletada na Indonésia (30). Cianidina-3-glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, quercetina-3-glicosídeo, quercetina-3-rutinosídeo e rutina juntamente com ácido cafeico e outros derivados do ácido cinâmico e ácido elágico foram identificados na planta após o processo de fermentação alcoólica (51).

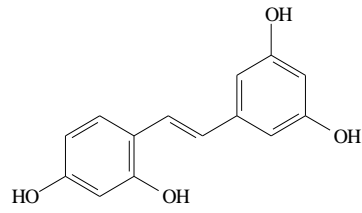
Em outro estudo, o conteúdo de vitamina C no extrato etanólico foi considerado alto (0,173 mg/ g de tecido) (35). As propriedades físico-químicas e a composição de ácidos graxos do óleo das sementes também foram avaliados. O conteúdo de óleo nas sementes variou de 27,5-33%, o conteúdo de proteínas variou de 20,2-22,5% de proteína bruta, o conteúdo de carboidratos foi de 42,4-46,6% e o teor de fenóis totais foi de 112,2-152 mg de fenóis totais/ 100 g. Vinte diferentes ácidos graxos foram identificados, e os constituintes majoritários foram o ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico e ácido esteárico. O menor conteúdo foi o de ácido mirístico. O conteúdo de tocoferol variou de 0,17-0,20 mg/ 100 g de óleo. Os principais esteroides encontrados foram β -sitosterol, avenasterol, 5,24-estigmastadienol, eleroesterol e 5,24-estigmastadienol (58).

Oxiresveratrol, moracina M, ciclomorusina, morusina, kuwanon C, ácido betulínico, acetato de α -amirina e β -sitosterol-3-*O*-beta-glicosídeo foram identificados na espécie coletada em Botsuana (59). Foi avaliado o perfil de compostos fenólicos da espécie coletada no Paquistão. Os principais compostos fenólicos identificados nas folhas e frutos foram os ácidos gálico, protocatecuico, *p*-hidroxibenzoico, vanílico, clorogênico, siríngico, *p*-cumárico e *m*-cumárico. O ácido clorogênico foi o composto majoritário em todos os extratos (43). Dois novos prenilflavonoides Mornigrol E e Mornigrol F foram isolados das cascas do caule da espécie coletada na China (37).

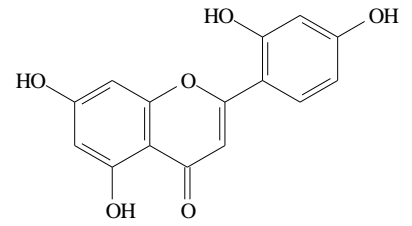
As estruturas químicas de alguns constituintes químicos isolados da espécie *Morus nigra* podem ser visualizadas na Figura 5, abaixo.



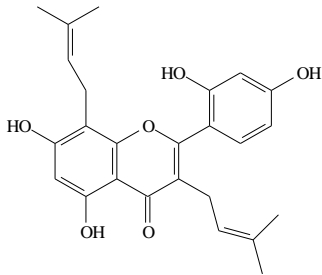
Resveratrol



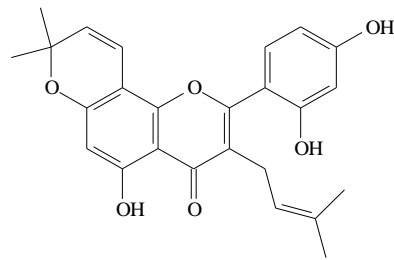
Oxiresveratrol



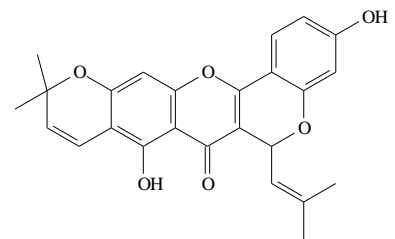
Norartocarpina



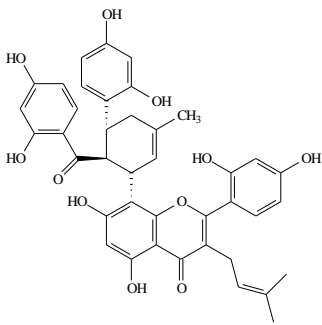
Kuwanona C



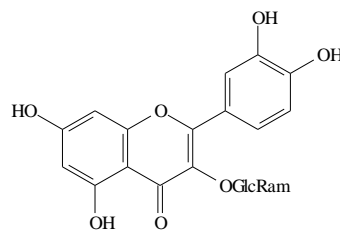
Morusina



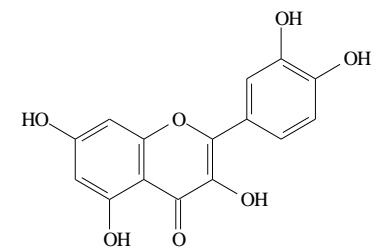
Cudraflavona A



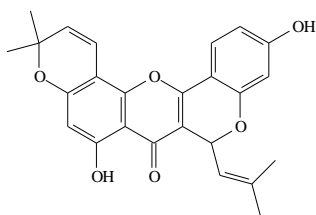
Kuwanona G



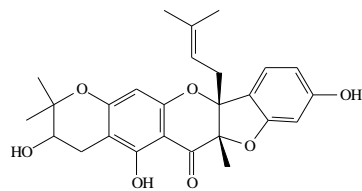
Rutina



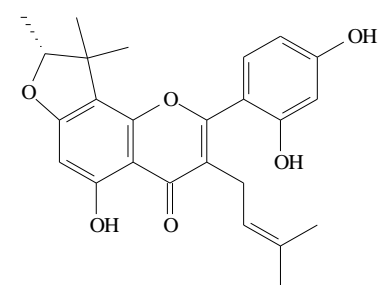
Quercetina



Ciclomorusina

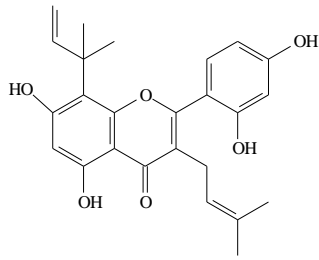


Nigrasina A (15R)

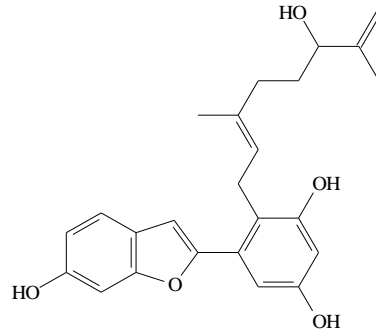


Nigrasina H

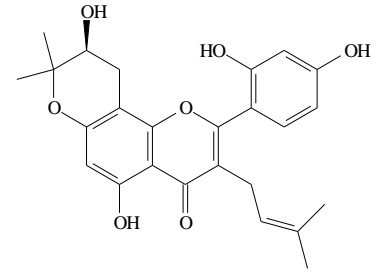
Nigrasina B (15S)



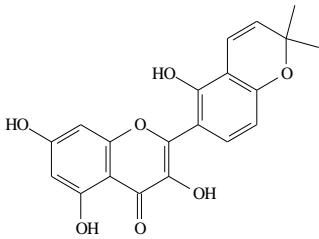
Nigrasina I



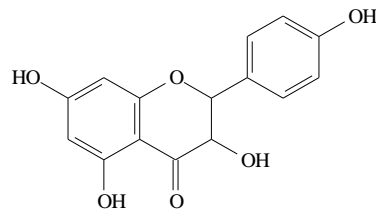
Morunigrol D



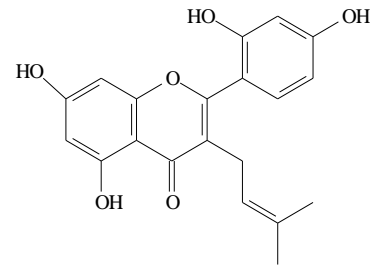
Morunigrol G



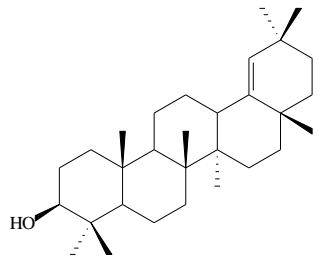
Morunigrol H



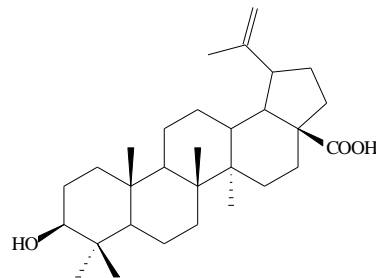
Dihidrokaempferol



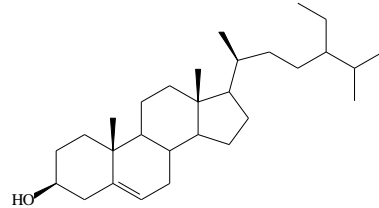
Albanina A



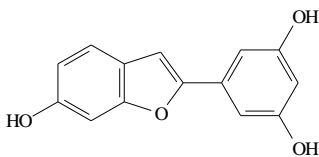
Germanicol



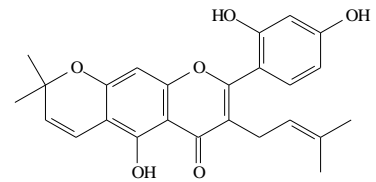
Ácido betulínico



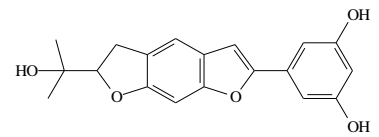
β-Sitosterol



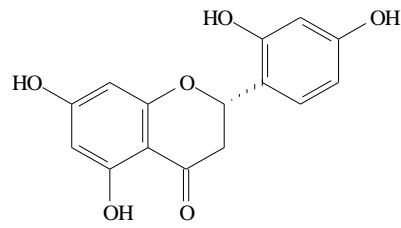
Moracina M



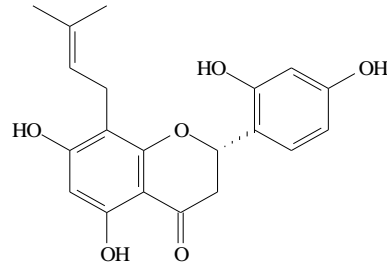
Cudraflavona B



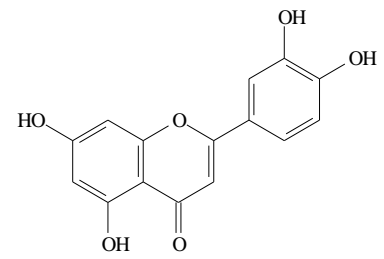
Moracina O



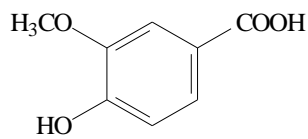
Norartocarpona



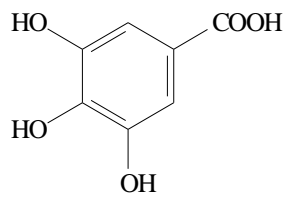
Euchrenona a7



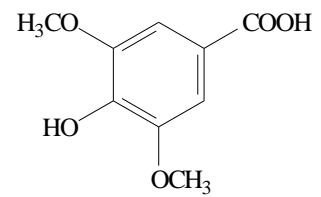
Luteolina



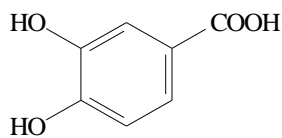
Ácido vanílico



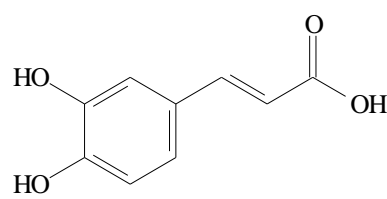
Ácido gálico



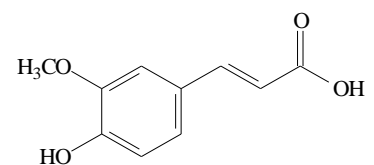
Ácido sirínico



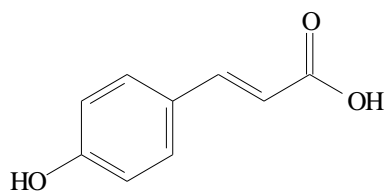
Ácido protocatecuico



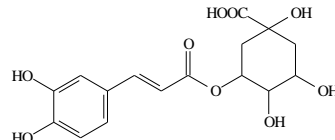
Ácido cafeico



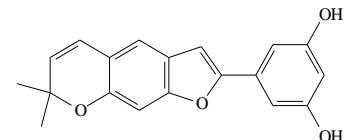
Ácido ferúlico



Ácido p-cumárico



Ácido clorogênico



Morunigrol C

Figura 5 – Estruturas químicas de alguns constituintes isolados de *Morus nigra* L.

Fonte: Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

3.3 PRODUTO FINAL

3.3.1 Forma farmacêutica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.2 Testes específicos por forma farmacêutica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.3 Requisitos de pureza

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.4 Resíduos químicos

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.5 Prospecção fitoquímica

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.6 Testes de identificação

Informação não descrita nas referências consultadas.

3.3.7 Testes de quantificação

3.3.7.1 Componentes químicos e suas concentrações: descritos e majoritários, ativos ou não

Informação não descrita nas referências consultadas.

4 INFORMAÇÕES DE SEGURANÇA E EFICÁCIA

4.1 USOS POPULARES E/OU TRADICIONAIS

Morus nigra é uma espécie bastante utilizada na medicina popular, sendo muitos usos da planta já comprovados por meio de estudos pré-clínicos, e outros ainda com necessidade de estudos mais aprofundados. Existem informações de uso popular da planta por mulheres no climatério, para substituir a terapêutica da reposição hormonal convencional (13). As folhas são empregadas externamente em gargarejos, para combater aftas e amigdalite, no combate à febre e à dor de dente. Da infrutescência é feito um xarope, utilizado em diarreias e como vermífugo, além de ser expectorante e adstringente. Em estudos recentes, foi descoberto que o xarope possui capacidade de regulação da hiperglicemia e retardo da catarata. O xarope dos frutos também é útil no tratamento de faringites e doenças inflamatórias do trato gastrointestinal. A decocção da casca da raiz tem efeito purgativo e vermífugo (19, 64).

Os frutos, folhas, cascas e raízes são citados como laxativo, sedativo, expectorante, refrescante, emoliente, calmante, diurético, hipoglicemiante, antisséptico, anti-inflamatório, antioxidante, emético, tônico, anti-helmíntico, bem como no tratamento de eczema e inflamações orais. Essas partes da planta também são usadas para o tratamento do diabetes, pois contêm substâncias como a 1-deoxinojirimicina, um alcalóide com efeito hipoglicemiante (3, 64).

A planta tem sido usada na medicina popular como antidiabético, analgésico, diurético, antitussígeno, sedativo, ansiolítico, hipotensor e anti-inflamatório (4, 7, 9, 41), para tratamento do colesterol alto, pressão alta, reposição hormonal da mulher, e para prevenir derrames (65). Também tem sido usada para tratamento de febre e câncer (29). O fruto da amoreira tem sido usado como remédio popular para o tratamento de doenças orais e dentais, diabetes, hipertensão, artrite e anemia (22, 23). A planta é usada para tratar tosse, asma e reumatismo. A decocção das folhas possui propriedades de purificação do sangue, reduz a febre e é diurética. Extratos das folhas são conhecidos por terem atividade antibacteriana e fungicida (59).

Morus nigra é amplamente usada na medicina tradicional do Brasil para o tratamento do diabetes. Na região do Vale do São Francisco, *M. nigra* é popularmente conhecida como amora-miúra, e o chá das folhas (decocto) é bastante utilizado pela população local para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (5, 36).

A planta é usada como parte da medicina tradicional chinesa para o tratamento de artrite, diabetes e reumatismo (25, 30, 37), e também como anti-hipertensiva, antienvhecimento e anti-inflamatória (31). Na Europa, as folhas dessa espécie têm sido usadas para estimular a produção de insulina no tratamento do diabetes. O efeito hipoglicemiante das folhas é similar à atividade antidiabética da glibenclamida em pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (20). A planta é usada para tratamento de inflamação, coagulante do sangue, dor de dente, e como antídoto para picadas de cobra (56).

A planta é usada como antidiabético e diurético na medicina popular do Paquistão. Também usada como laxante, antidiarreico, anti-inflamatório, antirreumático e antitussígeno (33). O xarope dos frutos é usado na medicina popular do Paquistão como laxante, e no tratamento de constipação (66). Usado para tratamento de tumores da face, aftas, asma, gripe, tosse, diarreia, dispepsia, edema, febre, dor de cabeça, hipertensão e como adstringente (43). Os frutos são usados na medicina popular da Turquia para tratar febre, como hepatoprotetor, diurético e para baixar a pressão sanguínea (60), bem como para tratamento de parasitoses, como remédio para disenteria, laxante, para dor de dente, anti-helmíntico, expectorante, hipoglicemiante e emético (67).

4.2 PRESENÇA EM NORMATIVAS SANITÁRIAS BRASILEIRAS

A espécie não se encontra na lista de registro simplificado da ANVISA (IN 02/2014).

4.3 ESTUDOS NÃO-CLÍNICOS

4.3.1 Estudos toxicológicos

4.3.1.1 Toxicidade aguda

Na avaliação da toxicidade aguda do extrato diclorometânico das folhas de *M. nigra*, o extrato foi administrado oralmente a um grupo de camundongos de ambos os sexos. Os principais parâmetros comportamentais observados foram convulsão, hiperatividade, sedação, *grooming*, perda do reflexo de endireitamento, aumento ou diminuição da respiração durante um período de 8 horas. As observações foram realizadas também durante o período de 7 dias. Nesse período, alimento e água foram fornecidos *ad libitum*. O extrato, nas doses de 0,5 – 5 g/Kg, administrado por via oral, não provocou alteração nas respostas comportamentais durante

o período de observação de 8 horas e 7 dias após a administração. Nenhuma morte foi observada durante o período de 7 dias de observação, assim, a DL₅₀ (dose letal 50%) foi estimada ser maior que 5 g/ Kg por via oral (9). Na avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto das folhas, o extrato foi administrado nas doses de 2 g/ Kg por via intraperitoneal e 5 g/ Kg via oral em dose única. O extrato foi administrado a um grupo de camundongos machos (n= 10) nas doses estabelecidas. O número de mortes foi observado durante 72 horas. Ao final do experimento (7 dias) os animais tiveram o sangue retirado através do plexo braquial para a avaliação de parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol, triglicerídeos, aspartato transaminase, alanina transaminase, ureia, creatinina e albumina) e hematológicos (contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas). A DL₅₀ foi estimada ser maior que 2 g/ Kg por via intraperitoneal e 5 g/ Kg por via oral. Não houve mortes nos grupos tratados com o extrato, nem alteração nos parâmetros observados, indicando baixa toxicidade do extrato (36).

4.3.1.2 Toxicidade subcrônica

O estudo de toxicidade subcrônica foi realizado com o chá das folhas. O chá foi preparado diariamente da mesma maneira como é preparado pela população. As folhas foram secas à sombra e depois foram trituradas manualmente. Em seguida, o pó (12 g) foi submetido a uma extração por decocção em água (1000 mL) a 100 °C durante 10 minutos. Após o resfriamento, o decocto foi administrado diariamente aos animais durante 30 dias. Os ratos foram divididos em 4 grupos de 5 animais cada. Os animais dos grupos experimentais receberam diariamente 500 mL do chá das folhas em garrafas de polipropileno e 200 g de ração. O peso dos animais, o consumo de líquido e de alimento foi observado durante 30 dias. Após o período experimental, os animais foram anestesiados e tiveram o sangue coletado para a avaliação de parâmetros hematológicos como: número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média, concentração de hemoglobina corpuscular média, leucócitos, neutrófilos bastonetes, neutrófilos segmentados, eosinófilos, linfócitos típicos, monócitos e plaquetas. Os parâmetros bioquímicos analisados em amostras de soro foram: glicose, colesterol, triglicerídeos, AST/TGO, ALT/TGP, ureia, ácido úrico, creatinina, albumina e amilase. Com base nos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que o chá das folhas de *Morus nigra* pode ser considerado de baixa toxicidade, pois a administração subcrônica durante o período de 30 dias por via oral não produziu mortes nem

sinais de toxicidade nos animais. Além disso, não provocou alteração nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados (5).

4.3.1.3 Toxicidade crônica

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.3.1.4 Genotoxicidade

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.3.1.5 Sensibilização dérmica

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.3.1.6 Irritação cutânea

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.3.1.7 Irritação ocular

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.3.2 Estudos farmacológicos

4.3.2.1 Ensaaios *in vitro*

Atividade anti-inflamatória

A partir das cascas do caule de *Morus nigra* foram obtidos nove compostos, os quais foram submetidos a testes para avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*. O método utilizado foi o da liberação da enzima β -glicuronidase a partir de leucócitos polimorfonucleares induzida pelo fator de ativação de plaquetas. Os compostos mornigrol D e norartocarpina mostraram potente atividade anti-inflamatória no modelo usado, com valores de inibição de 65,9% e 67,7%, respectivamente, na concentração de 10^{-5} mol/ L (32). Nesse experimento não houve avaliação do extrato, sendo avaliados apenas os compostos isolados.

Atividade antioxidante

Os efeitos antioxidantes de três diferentes extratos dos frutos de *Morus nigra* (suco da fruta, extrato polifenólico e extrato hidroalcoólico) foram investigados. Os estudos de atividade antioxidante foram realizados através da avaliação do efeito sobre a glicosilação da hemoglobina, hemólise induzida pelo peróxido de hidrogênio, efeito sobre a susceptibilidade à oxidação do LDL e efeito sobre a peroxidação lipídica de hepatócitos. Foram utilizadas células sanguíneas de voluntários humanos saudáveis, bem como de hepatócitos de ratos. Os resultados mostraram que os extratos polifenólico e hidroalcoólico inibiram a glicosilação da hemoglobina induzida pela glicose em diferentes graus, porém, o suco não foi efetivo. A hemólise de eritrócitos humanos induzida pelo peróxido de hidrogênio também foi inibida por todos os extratos. A produção de malondialdeído (MDA) durante o dano peroxidativo da membrana também foi inibida. Os resultados sugerem que os extratos de *M. nigra* possuem ação protetora contra o dano peroxidativo de membranas e biomoléculas, e que os efeitos observados podem estar relacionados à presença de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, nos extratos (56).

Atividade citotóxica

A citotoxicidade de duas flavanonas isoladas da madeira de *Morus nigra* foi investigada. A atividade citotóxica dos flavonoides norartocarpanona e euchrenona a7 foi avaliada contra células murinas de leucemia P-388 usando o método do MTT. O composto euchrenona a7 foi mais citotóxico do que a norartocarpanona com valores de IC₅₀ de 7,8 e 12,7 µg/ mL, respectivamente. Os resultados sugerem que a presença do grupo prenila na estrutura da flavanona aumenta a citotoxicidade. Resultados semelhantes foram observados em um *screening* de atividade antitumoral de algumas flavanonas (30).

Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos extratos obtidos em acetona e etanol, e dos compostos isolados (oxiresveratrol, moracina M, ciclomorusina, morusina, kuwanona C, ácido betulínico, acetato de α -amirina e β -sitosterol-3-*O*- β -*D*-glicosídeo) foi avaliada pelo método de microdiluição. Os microrganismos testados foram: *Staphylococcus aureus* (NCTC 4163), *Bacillus subtilis* (NCTC 10073), *Micrococcus flavus* (NCTC 2665), *Streptococcus faecalis* (NCTC 775), *Salmonella abony* (NCIMB 6017) e *Pseudomonas aeruginosa* (NCIMB 10421). A atividade antibacteriana foi expressa como valores de concentração inibitória mínima (CIM). Tanto os extratos brutos quanto os compostos oxiresveratrol, moracina M e um derivado da kuwanona C apresentaram atividade antibacteriana contra todos os microrganismos testados (59).

Inibição da enzima α -amilase

Foi investigado um possível efeito do extrato de *M. nigra* sobre a quebra do amido, através do estudo da atividade inibitória da enzima α -amilase. Para isso, uma solução de amido (0,5%, p/v) foi obtida por aquecimento de 0,25 g de amido solúvel em 50 mL de água deionizada durante 15 minutos. A solução da enzima (0,5 unidades/ mL) foi preparada pela mistura de 0,001 g de α -amilase em 100 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 6,9) contendo 6,7 mM de cloreto de sódio. O extrato foi dissolvido em DMSO. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da enzima α -amilase. O extrato nas concentrações de 11,8; 14,7; 18,4 e 23 mg/ mL apresentou percentuais de inibição de 46,56; 34,81; 25,76 e 20,19,

respectivamente, não sendo possível determinar o valor de IC₅₀. Embora se tenha observado inibição da enzima, o resultado não foi dependente de concentração (45).

4.3.2.2 *Ensaio in vivo*

Avaliação do potencial estrogênico

Informações de uso popular indicam que a infusão de *Morus* sp. é utilizada por mulheres durante o climatério, na substituição da terapêutica de reposição hormonal convencional, com efeito semelhante ao obtido com o uso de estrogênio. Na avaliação do potencial estrogênico de *Morus nigra* em ratas Wistar, a infusão das folhas foi administrada por via intragástrica. Cada rata recebeu 2,8 mL/ Kg de peso corporal de infusão das folhas, diariamente, durante 20 dias consecutivos. Para a realização do experimento, as ratas adultas foram ooforectomizadas e, após 17 dias de recuperação, distribuídas aleatoriamente em quatro grupos: controle negativo (ooforectomizadas, sem tratamento); controle positivo (10-3 µg/ g de 17β-estradiol); infuso (2,8 mL/ Kg de infusão de folhas de amora) e veículo (1 mL de água destilada por via intragástrica). Todos os grupos, exceto o controle negativo, foram tratados por 20 dias consecutivos, período em que foi realizado, diariamente, o esfregaço vaginal para determinação da fase do ciclo. No 20º dia de tratamento, as ratas foram submetidas a excesso de inalação de éter para eutanásia. O útero e a vagina foram removidos e fixados para análise histopatológica e histomorfométrica. As seguintes variáveis foram observadas: 1) identificação de fases estrogênica (proestro e estro) e progesterônica (diestro); 2) espessura do epitélio glandular do útero; 3) espessura do epitélio vaginal; 4) descrição dos aspectos histológicos observados no útero e na vagina. Os resultados obtidos mostraram que não houve diferença significativa na morfologia do útero e vagina, nem na proporção de fase estrogênica, com o uso do infuso de folhas de *Morus* sp., evidenciando, dessa forma, ausência de indícios de efeito estrogênico. Os pesquisadores concluíram que, no modelo experimental e na dose utilizada, a infusão das folhas não apresentou efeito estrogênico (19). Em um estudo mais recente, foram realizados ensaios para avaliação do efeito estrogênico do extrato hidroalcoólico da planta, bem como sobre o sistema reprodutivo e desenvolvimento embrionário de ratas Wistar. A avaliação fitoquímica do extrato mostrou a presença de flavonoides, taninos, cumarinas, esteroides e triterpenos. Ratas foram tratadas oralmente com o extrato nas doses de 25, 50, 75, 350 e 700 mg/ Kg durante 15 dias, e continuou até o 14º dia de gestação. Esfregaços vaginais foram feitos diariamente e o peso do corpo dos animais foi avaliado a cada 5 dias. No 15º dia de gestação, as fêmeas foram mortas e seus rins, fígado, baço

e ovários foram removidos e pesados. O número de implantes e de fetos vivos e mortos foi avaliado. Foi realizada a análise histológica do ovário. Medidas da altura do epitélio uterino e da vagina foram realizadas para avaliar a atividade estrogênica. Os resultados mostraram que a administração do extrato da planta não alterou significativamente as variáveis analisadas, não provocou morte nem efeito tóxico. No estudo, as doses mais altas (350 e 700 mg/ Kg) não produziram mudanças morfológicas nem interferiram com o ciclo vaginal dos animais. Flavonoides e triterpenos são conhecidos por possuírem efeito estrogênico, no entanto, o extrato não exibiu atividade estrogênica, mesmo possuindo essas classes de metabólitos em sua composição. Além disso, não exerceu efeito tóxico sobre o sistema reprodutivo e sobre o desenvolvimento embriogênico das ratas. Os estudos experimentais são controversos a respeito dos testes empregados para verificar o efeito estrogênico sobre animais ooforectomizados e pubescentes, mas os resultados apresentados mostraram que o extrato não exibiu efeito estrogênico após o período de tratamento que cobriu, pelo menos, três ciclos estrais (3).

Atividade hipoglicemiante

Um dos principais usos populares de *Morus nigra* é para o tratamento de diabetes (68). O efeito do extrato hidroalcoólico 80% obtido a partir das folhas sobre os níveis de glicose sanguínea foi avaliado em ratos. O extrato foi administrado por via oral nas doses de 5, 10, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/ Kg, em dose única durante 1 semana (período curto) e 8 semanas (período longo). Em todos os animais, os níveis de glicose sanguínea foram medidos. O extrato foi avaliado em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina na dose de 50 mg/ Kg administrada por via intraperitoneal. Os resultados mostraram que o extrato na dose de 400 mg/ Kg (em um curto período de tempo) e 600 mg/ Kg (em um período mais longo) diminuiu os níveis de glicose no sangue, em comparação com o controle, demonstrando que *M. nigra* tem constituintes químicos potencialmente antidiabéticos (44). Estudo realizado avaliou o efeito hipoglicemiante do extrato hidroalcoólico 70% obtido a partir das folhas. O extrato foi administrado por via oral nas doses de 100-600 mg/ Kg/ dia, diariamente, durante 10 dias consecutivos. A atividade antidiabética de ambas as folhas e as culturas de células de *M. nigra* tratadas com metiljasmonato foi avaliada após a administração oral de estreptozotocina em ratos. Os parâmetros avaliados foram: concentração de glicose no sangue e níveis de insulina no soro. A administração de 500 mg/ Kg/ dia de extrato de folhas reduziu a concentração de glicose de $370 \pm 7,31$ mg/dL (controle) para $154 \pm 6,27$ mg/dL e produziu um aumento

significativo no nível de insulina de $11,3 \pm 0,31 \mu\text{U/mL}$ (controle) para $14,6 \pm 0,43 \mu\text{U/mL}$. A atividade antidiabética dos extratos de folhas administrados a ratos diabéticos durante 10 dias aumentou com doses crescentes do extrato até 500 mg/ Kg/ dia (40). Estudo realizado por Almeida *et al.* (2011) avaliou o efeito hipoglicemiante do extrato etanólico bruto das folhas. Uma triagem fitoquímica preliminar foi realizada para avaliar a presença de alcaloides, flavonoides, fenóis, esteroides e terpenoides. O extrato foi administrado em ratos Wistar por via oral nas doses de 200 e 400 mg/ Kg em dose única. O extrato foi avaliado no teste oral de tolerância à glicose. A análise fitoquímica preliminar mostrou que o extrato possui fenóis, flavonoides, esteroides e terpenoides. Os resultados mostraram que o extrato produziu uma pequena redução na glicemia sanguínea, porém, o efeito foi menor do que o hipoglicemiante oral metformina, usado como droga padrão nos experimentos (36). Em outro estudo que avaliou a atividade antidiabética do extrato aquoso da planta, o extrato foi administrado na dose 400 mg/ Kg de peso por via oral, diariamente, durante 20 dias consecutivos. O diabetes foi induzido com estreptozotocina na dose de 40 mg/ Kg dissolvida em tampão citrato, administrada em ratas Wistar virgens. O extrato aquoso das folhas de *M. nigra* (400 mg/ Kg) foi administrado a partir do dia 0 a 20 de gestação. No 21º dia de gestação, todas as ratas foram anestesiadas e sacrificadas para obter amostras de sangue e dados materno-fetais. Os principais parâmetros avaliados foram: parâmetros bioquímicos e gestação das fêmeas. Após o tratamento com extrato de *M. nigra*, os ratos não diabéticos e diabéticos não apresentaram alterações glicêmicas. Os fetos de mães diabéticas, independentemente do tratamento com *M. nigra*, eram pequenos para a idade gestacional. Em animais diabéticos, o tratamento com a planta causou reduzidos níveis de malondialdeído (MDA), colesterol, triglicérides e VLDL e diminuição do índice placentário e do peso em relação ao grupo diabético. Os fetos de ratas diabéticas tratadas com o extrato tiveram menor frequência de anomalias esqueléticas e viscerais em relação ao grupo diabético (20).

Adipogênese

O estudo fitoquímico da planta levou ao isolamento de dez flavonoides isoprenilados (Nigrasins A-J), juntamente com mais três compostos conhecidos. Os compostos nigrasina H e nigrasina I promoveram diferenciação de adipócitos (adipogênese), caracterizada pelo aumento de gotículas de gordura e do conteúdo de triglicerídeos em células 3T3L1, e induziu-se regulação da expressão de genes específicos de adipócitos aP2 e GLUT-4 (31).

Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória do extrato diclorometânico das folhas nas doses de 30, 100 e 300 mg/ Kg, administrado por via oral em dose única, foi avaliada. A inflamação foi induzida pela injeção intraplantar de carragenina e pela implantação de um pellet de algodão no dorso do animal. Foram realizados testes fitoquímicos preliminares para avaliar a presença de taninos, alcaloides, saponinas, flavonoides, esteroides e triterpenoides. Um cromatograma obtido por cromatografia líquida de alta eficiência também foi usado para a análise fitoquímica do extrato. Os parâmetros avaliados foram: volume do edema e formação de tecido granulomatoso. O extrato de *Morus nigra*, nas doses de 100 e 300 mg/ Kg demonstrou efeito anti-inflamatório ao reduzir o edema de pata induzido por carragenina e inibir a formação de tecido granulomatoso. No efeito sobre o edema de pata, os resultados foram similares àqueles exibidos pelo grupo tratado com indometacina. O extrato também reduziu a formação de tecido granulomatoso, indicando que ele pode inibir as fases proliferativas da inflamação. Os constituintes germanicol, ácido betulínico e β -sitosterol, isoladas da planta, podem ser responsáveis pelo efeito anti-inflamatório observado. Os mecanismos precisos pelos quais o extrato produz efeito anti-inflamatório ainda não estão completamente entendidos, mas podem ser atribuídos à presença desses constituintes químicos no extrato (41).

Atividade antinociceptiva

O efeito antinociceptivo da morusina, o principal prenilflavonoide presente nas cascas do caule de *Morus nigra*, foi investigado em modelos clássicos de dor em camundongos. O flavonoide foi administrado por via intraperitoneal em doses que variaram de 23,8-142,9 mmol/ Kg, em dose única. Foram utilizados modelos clássicos de dor como contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, teste da formalina e teste da placa quente. Os parâmetros observados foram: número de contorções abdominais, tempo de lambida da pata e tempo de retirada da pata. O composto exerce efeito antinociceptivo nos diferentes modelos animais *in vivo*. A morusina apresentou um interessante perfil analgésico quando administrada pela via intraperitoneal, sendo duas vezes mais potente do que algumas drogas empregadas clinicamente contra processos dolorosos, as quais foram usadas como padrão nesse estudo. O seu mecanismo de ação permanece indeterminado, mas os resultados apresentados no estudo sugerem

fortemente que pode envolver a participação do sistema opioide (4). A atividade antinociceptiva do extrato diclorometânico das folhas nas doses de 30, 100 e 300 mg/ Kg, administrado por via oral em dose única, foi avaliada. A atividade antinociceptiva foi avaliada através do teste da formalina, placa quente, imersão da cauda e contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os parâmetros observados foram: comportamento nociceptivo, caracterizado por contorções abdominais, lambida da pata, retirada da cauda e retirada da pata. O extrato de *Morus nigra*, nas doses de 100 e 300 mg/ Kg demonstrou efeito antinociceptivo em todos os testes, incluindo modelos de dor visceral e dor central, gerada por estímulos químicos (ácido acético e formalina) ou pela exposição a estímulos térmicos (teste de imersão da cauda e placa quente). Na dose de 300 mg/ Kg o efeito antinociceptivo foi mais forte que a indometacina (5 mg/ Kg, via oral) e morfina (10 mg/ Kg, via oral). Entretanto, estudos posteriores devem ser realizados para investigação do mecanismo molecular de ação do extrato e sua participação nos mecanismos inibitórios da dor no sistema nervoso central (9).

Atividade hepatoprotetora

Morus nigra é popularmente usada para o tratamento de icterícia. Levando-se em consideração o perfil fitoquímico e o uso tradicional da planta no tratamento de injúria hepática, a atividade hepatoprotetora do extrato hidrometanólico das folhas de *M. nigra* foi avaliada contra a hepatotoxicidade induzida pelo paracetamol em camundongos. A triagem fitoquímica foi utilizada para detectar a presença de fenóis, flavonoides, saponinas, alcaloides, resinas, taninos, cumarinas, óleos voláteis e terpenoides. Na triagem fitoquímica foi identificada a presença de fenóis, flavonoides, saponinas e alcaloides. Os flavonoides são importantes compostos presentes nas plantas que possuem atividade hepatoprotetora. Nesse estudo, moderada quantidade de flavonoides foi encontrada nas folhas da planta. A determinação qualitativa desses flavonoides foi conduzida através de análises por HPLC, a qual revelou a presença de luteolina, quercetin e isoramnetina. Duas doses de 250 e 500 mg/ Kg por via oral mostraram que o extrato produz significativa redução das enzimas hepáticas alanina transaminase (ALT), aspartato transaminase (AST), e fosfatase alcalina (ALP), bem como na concentração de bilirrubina total induzida pelo paracetamol, e os resultados são comparáveis com a silimarina. Os resultados foram confirmados por análises histopatológicas, que suportam os achados na investigação bioquímica. O extrato pode produzir uma proteção hepática se o mesmo for administrado aos camundongos antes da injeção de paracetamol. Hepatite

significativa pode ser vista nos fígados dos animais quando não foi realizado o pré-tratamento com o extrato. O estudo mostrou que o extrato de *M. nigra* possui atividade hepatoprotetora, que pode ser devido à presença dos flavonoides luteolina, quercetina e isoramnetina. *M. nigra* possui efeito hepatoprotetor contra a injúria hepática induzida pelo paracetamol em camundongos (29).

Atividade cardiovascular

Morus nigra tem sido tradicionalmente usada na medicina popular da China, Paquistão, Irã e Afeganistão por ser efetiva em reduzir a pressão sanguínea. Assim, foi realizado um estudo para investigar os efeitos do extrato hidrometanólico de *Morus nigra* sobre a atividade cardiovascular de rãs de ambos os sexos. Foi preparado o extrato metanol:água (70:30), o qual foi administrado nas doses de 5, 15, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900 e 1000 mg/ mL. Foram realizados testes de triagem fitoquímica para avaliar a presença de diferentes constituintes, tais como flavonoides, açúcares redutores, taninos, compostos fenólicos, saponinas, alcaloides e glicosídeos cardíacos. O estudo foi conduzido para investigar os efeitos do extrato sobre o coração de rã. O coração dos animais foi exposto por uma incisão na linha média. O pericárdio foi removido com cuidado e o coração foi perfundido continuamente com solução de Ringer. Um grampo foi então anexado ao ápice cardíaco para medir a força de contração (g) e frequência cardíaca (batimentos/min) pelo transdutor de força-deslocamento. Depois da estabilização, as diferentes doses de extrato foram aplicadas para avaliar vários parâmetros cardíacos. Os resultados indicaram que o extrato produziu uma diminuição dependente da dose na atividade cardíaca (efeito cronotrópico negativo), sem afetar a contratilidade do coração. A porcentagem máxima de redução foi observada na dose de 1000 mg/ mL quando comparada ao controle. A análise fitoquímica também revelou que o extrato contém princípios ativos tais como saponinas, alcaloides, compostos fenólicos, glicosídeos cardíacos e flavonoides. Estes achados indicam que o extrato pode ter compostos similares à ivabradina, que causa bradicardia no coração de rãs. Estudos posteriores são necessários para isolamento desses compostos, bem como para a determinação do seu exato mecanismo de ação (7).

3.2.3 Ensaios ex vivo

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.4 ESTUDOS CLÍNICOS

4.4.1 Fase I

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.4.2 Fase II

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.4.3 Fase III

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.4.4 Fase IV

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.4.5 Estudos observacionais

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5 RESUMO DAS AÇÕES E INDICAÇÕES POR DERIVADO DE DROGA ESTUDADO

Os estudos encontrados para a espécie foram apenas pré-clínicos, conduzidos na maioria das vezes com extratos aquosos, etanólicos, hidroalcoólicos e secos das folhas e frutos. A ação mais bem fundamentada em ensaios pré-clínicos é a sua ação hipoglicemiante, e em menor grau de evidência a sua ação antinociceptiva, anti-inflamatória, estrogênica, e antimicrobiana.

4.5.1 Vias de Administração

Via oral (5, 64).

4.5.2 Dose Diária

12 g de folhas para cada 1000 mL de água por infusão (5).

4.5.3 Posologia (Dose e Intervalo)

3 vezes ao dia (5).

4.5.4 Período de Utilização

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.5 Contra Indicações

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.6 Grupos de Risco

Como não existem estudos sobre a segurança reprodutiva em humanos, o uso de *Morus nigra* não é recomendado em mulheres grávidas ou em período de lactação, ou ainda em crianças e idosos sem supervisão médica.

4.5.7 Precauções de Uso

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.8 Efeitos Adversos Relatados

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.9 Interações Medicamentosas

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.9.1 Descritas

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.9.2 Potenciais

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.10 Informações de Superdosagem

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.10.1 Descrição do quadro clínico

Informação não descrita nas referências consultadas.

4.5.10.2 Ações a serem tomadas

Informação não descrita nas referências consultadas.

5 INFORMAÇÕES GERAIS

5.1 FORMAS FARMACÊUTICAS /FORMULAÇÕES DESCRITAS NA LITERATURA

Informação não descrita nas referências consultadas.

5.2 PRODUTOS REGISTRADOS NA ANVISA E OUTRAS AGÊNCIAS REGULADORAS

Não há registro de produtos para a espécie.

5.3 EMBALAGEM E ARMAZENAMENTO

Informação não descrita nas referências consultadas.

5.4 ROTULAGEM

Informação não descrita nas referências consultadas.

5.5 MONOGRAFIAS EM COMPÊNDIOS OFICIAIS E NÃO OFICIAIS

A espécie *Morus nigra* não consta em compêndios oficiais e farmacopeias. Foram consultadas a Farmacopeia Brasileira, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Americana, Farmacopeia Japonesa, Monografias da OMS, Monografias da Commission E e Monografias da ESCOP.

5.6 PATENTES SOLICITADAS PARA A ESPÉCIE VEGETAL

A lista de patentes a seguir foi compilada a partir de uma busca feita em dezembro de 2014 no banco de dados do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), European Patent Office (ESPACENET), LatiPat United States Patent and Trademark Office (USPTO), Japan Patent Office (JPO) e World Intellectual Property Organization (WIPO), usando como palavra chave o termo “*Morus nigra*” como “Tópico”. A busca retornou 44 registros. Inicialmente uma triagem destes registros foi realizada, e todos os registros que envolveram usos não medicinais da espécie foram removidos. Esta triagem resultou em 13 registros que estão aqui listados.

1. HOU, AIJUN, WANG HEYAO et al. Use of flavonoid compound in preparation of metabolic disease resistance medicines. CN103393637(A) (69).

2. STEFANUT, MARIANA NELA, CATA ADINA ELENA et al. Nutritive supplement with hypoglycemic and antioxidant properties and process for preparing the same. RO128709 (A2) (70).
3. AN, JEONG TAE. Natural Medicinal Herb House. KR101136199 (B1) (71).
4. BAK, WOM CHA, RYANG. Diabetes functional beverage. KR20110011249 (A) (72).
5. LEKO, VLADIMIR. Herbal composition and medicament against diabetes mellitus type II manufactured thereof. US2002102315 (A1); US6576270 (B2) (73).
6. LEKO, VLADIMIR. Process and product extracted from herbal composition useful in controlling diabetes mellitus type II. US2003206976 (A1); US7056539 (B2) (74).
7. ITO, YOKO OGAWA SUSUMU. Tyrosinase inhibitor and its production. JPH11246424 (A) (75).
8. LEKO, VLADIMIR. Capsulated herbal composition as auxiliary medicament against diabetes mellitus type (I) and (II). WO2005034973 (A1) (76).
9. LEKO, VLADIMIR. Herbal composition and medicament against diabetes mellitus type II manufactured thereof. WO9955351 (A1) (77).
10. KILB, KATRIN; MARIANI FRANCA. Detoxifying phytotherapeutic composition from two plant extracts and process for preparing the same. EP1338303 (A1); EP1338303 (B1) (78).
11. ABREU, IRACELLE CARVALHO BENEVIDES; RENATA OHANA ALVES. Formulação de composição farmacêutica de liofilizado do extrato hidroalcoólico e/ou frações ativas das folhas trituradas ou moídas de *Morus nigra* e seu uso no alívio dos sintomas da menopausa. BRPI1105827 (A2) (79).
12. AN, JEONG TAE. Natural medicinal herb house having excellent antibacterial effect, deodorization effect, warm-keeping effect, and preventing skin diseases effect. 1020120013527 (80).
13. BAK, WOM CHA RYANG. Diabetes prevention functional beverage with active ingredients of natural materials. 1020090068801 (81).

REFERÊNCIAS

1. <http://www.tropicos.org/Name/21300470>. Acesso em 20/12/2014.

2.

http://www.ipni.org/ipni/simplePlantNameSearch.do;jsessionid=836DA2424EB34D2B3B029EE94CDCC085?find_wholeName=morus+nigra&output_format=normal&query_type=by_query&back_page=query_ipni.html. Acesso em 20/12/2014.

3. Queiroz GT, Santos TR, Macedo R, Peters VM, Leite MN, Sá RCS, Guerra MO. Efficacy of *Morus nigra* L. on reproduction in female Wistar rats. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(3-4):816-22.
4. Souza MM, Bittar M, Cechinel-Filho V, Yunes RA, Messana I, Delle Monache F, Ferrari F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z Naturforsch C* 2000;55c:256-60.
5. Oliveira ACB, Oliveira AP, Guimarães AL, Oliveira RA, Silva FS, Reis SAGB, Ribeiro LAA, Almeida JRGS. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Rev. Bras. Pl. Med.* 2013;15(2):244-49.
6. Song W, Wang HJ, Bucheli P, Zhang PF, Wei DZ, Lu YH. Phytochemical profiles of different mulberry (*Morus* sp.) species from China. *J. Agric. Food Chem.* 2009;57(19):9133-40.
7. Malik MNH, Alamgeer US, Qayyum A, Samreen S. Phytochemical analysis and cardiac depressant activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* L. fruit. *J. Appl. Pharm. Sci.* 2012;2(12):39-41.
8. Cruz GL. Dicionário de plantas úteis no Brasil. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira. 599 p, 1979.
9. Padilha MM, Vilela FC, da Silva MJ, Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of the extract of *Morus nigra* leaves in mice. *J. Med. Food* 2009;12(6):1381-85.
10. Ercsili S, Orhan E. Chemical composition of the white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chem.* 2007;103(4):1380-84.
11. Imran M, Khan H, Shah M, Khan R, Khan F. Chemical composition and antioxidant activity of certain *Morus* species. *Journal of Zhejiang University Science B* 2010;11(12):973-80.

12. Yigit D, Akar F, Baydas E, Buyukyildiz M. Elemental composition of various mulberry species. *Asian J. Chem.* 2010;22(5):3554-60.
13. Padilha MM, Moreira LQ, Morais FF, Araújo TH, Alves-da-Silva, GE. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2010;20(4):621-26.
14. Morgan R. Enciclopédia das ervas e plantas medicinais. São Paulo, Hemus Editora, 555 p., 1982.
15. AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. *Official Methods of Analysis International*, 17th Ed. AOAC, Washington, DC.
16. Okwu DE. Phytochemicals, vitamins and mineral contents of two Nigerian medicinal plants. *Int. J. Mol. Med. Adv. Sci.* 2005;1(4):375-81.
17. Hussain I, Khan L, Marwat GA, Ahmed N, Saleem M. Comparative study of vitamin C contents in fruits and medicinal plants. *J. Chem. Soc. Pak.* 2008;30(3):406-09.
18. Hussain I, Khan H. Investigation of heavy metals content in medicinal plant, *Eclipta alba* L. *J. Chem. Soc. Pak.* 2010;32(1):28-33.
19. Silva IO, Santos IC, Peters VM, Faria RE, Andrade ATL. Avaliação do potencial estrogênico de *Morus* sp. em ratas wistar: estudo histológico e histomorfométrico. *Revista Centro de Biologia da Reprodução.* 2007;26(1/2):19-23.
20. Volpato GT, Calderon IM, Sinzato S, Campos KE, Rudge MV, Damasceno DC. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal-fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2011;138(3):691-96.
21. El-Khawaga OY, Abou-Seif MAM. Biochemical studies on antioxidant and oxidant activities of some plant extracts. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences.* 2010;14(9):731-38.

22. Kostić DA, Dimitrijević DS, Mitić SS, Stojanović GS, Živanović AV. Phenolic content and antioxidant activities of fruit extracts of *Morus nigra* L (Moraceae) from Southeast Serbia. Trop. J. Pharm. Res. 2013;12(1):105-110.
23. Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Omid M, Kalbasi-Ashtari A. Polyphenol contents and antioxidant activity of five fresh fruit *Morus* spp. (Moraceae) extracts. Agro Food Industry Hi-Tech. 2013;24(5):34-7.
24. Mahmoud MY. Natural antioxidants effect of mulberry fruits (*Morus nigra* and *Morus alba* L.) on lipids profile and oxidative stress in hypercholesterolemic rats. Pakistan J. Nutr. 2013;12(7):665-72.
25. Iqbal S, Younas U, Sirajuddin, Chan KW, Sarfraz RA, Uddin K. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. Int. J. Mol. Sci. 2012;13(2):6651-64.
26. Fazaeli M, Emam-Djomeh Z, Kalbasi-Ashtari A, Omid M. Effect of process conditions and carrier concentration for improving drying yield and other quality attributes of spray dried black mulberry (*Morus nigra*) juice. Int. J. Food Engineer. 2012;8(1):1-20.
27. Zheng ZP, Cheng KW, Zhu Q, Wang XC, Lin ZX, Wang M. Tyrosinase inhibitory constituents from the roots of *Morus nigra*: a structure-activity relationship study. J. Agric. Food Chem. 2010;58(9):5368-73.
28. Pawlowska AM, Oleszek W, Braca A. Quali-quantitative analyses of flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits. J. Agric. Food Chem. 2008;56(9):3370-3380.
29. Mallhi TH, Qadir MI, Khan YH, Ali M. Hepatoprotective activity of aqueous methanolic extract of *Morus nigra* against paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. Bangladesh J. Pharmacol. 2014;9:60-6.
30. Ferlinahayati YMS, Juliawaty LD, Hakim EH. Flavanones from the wood of *Morus nigra* with cytotoxic activity. Indonesian J. Chem. 2013;13(3):205-8.

31. Hu X, Wu JW, Zhang XD, Zhao QS, Huang JM, Wang HY, Hou AJ. Isoprenylated flavonoids and adipogenesis-promoting constituents from *Morus nigra*. J. Nat. Prod. 2011;74(4):816-24.
32. Wang L, Yang Y, Liu C, Chen RY. Three new compounds from *Morus nigra* L. J. Asian Nat. Prod. Res. 2010;12(6):431-7.
33. Iqbal S, Asghar MN, Khan IU, Zia I. Antioxidant potential profile of extracts from different parts of black mulberry. Asian J. Chem. 2010;22(1):353-64.
34. Fukuji TS, Tonin FG, Tavares MFM. Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. J. Pharm. Biomed. Anal. 2010;51(2):430-38.
35. Kumar A, Chauhan PK, Bhardwaj VS, Kumar R, Tyagi A. *In vitro* antioxidant and phytochemical investigations of ethanolic extracts of *Viola serpens* and *Morus nigra*. J. Chem. Pharm. Res. 2011;3(4):166-71.
36. Almeida JRGS, Guimarães AL, Oliveira AP, Araújo ECC, Silva FS, Neves LF, Oliveira RA, Sá PGS, Quintans-Júnior LJ. Evaluation of hypoglycemic potential and pre-clinical toxicology of *Morus nigra* L. (Moraceae). Lat. Am. J. Pharm. 2011;30(1):96-100.
37. Wang L, Gong T, Chen RY. Two new prenylflavonoids from *Morus nigra* L. Chin. Chem. Lett. 2009;20:1469-71.
38. Sývacý A, Sökmen M. Seasonal changes in antioxidant activity, total phenolic and anthocyanin constituent of the stems of two *Morus* species (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). Plant Growth Regulation. 2004;44:251-56.
39. Muntean D, Csedo C. Isolation and identification of isoquercitrin from extracts obtained from leaves of *Morus alba* (L.) and *Morus nigra* (L.). Acta Horticult. 2003;597:105-14.

40. Abd El-Mawla AM, Mohamed KM, Mostafa AM. Induction of Biologically Active Flavonoids in Cell Cultures of *Morus nigra* and Testing their Hypoglycemic Efficacy. *Scientia Pharmaceutica*. 2011;79(4):951-61.
41. Padilha MM, Vilela FC, Rocha CQ, Dias MJ, Soncini R, dos Santos MH, Alves-da-Silva G, Giusti-Paiva A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytother. Res.* 2010;24:1496-1500.
42. Aydin S, Yilmaz O, Gökçe Z. Effectiveness of matured *Morus nigra* L. (black mulberry) fruit extract on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and hydroxyl (OH) radicals as compared to less matured fruit extract. *Afr. J. Biotechnol.* 2011;10(71):16037-44.
43. Memon AA, Memon N, Luthria DL, Bhangar MI, Pitafi AA. Phenolic acids profiling and antioxidant potential of mulberry (*Morus laevigata* W., *Morus nigra* L., *Morus alba* L.) Leaves and fruits grown in Pakistan. *Polish J. Food Nutr. Sci.* 2010;60(1):25-32.
44. Hoseini HF, Saeidnia S, Gohari AR, Yazdanpanah M, Hadjiakhoondi A. Investigation of antihyperglycemic effect of *Morus nigra* on blood glucose level in streptozotocin diabetic rats. *Pharmacologyonline*. 2009;3:732-6.
45. Nickavar B, Mosazadeh G. Influence of three *Morus* species extracts on α -amylase activity. *Iranian J. Pharm. Res.* 2009;8(2):115-19.
46. Al-Mustafa AH, Al-Thunibat OU. Antioxidant activity of some Jordanian medicinal plants used traditionally for treatment of diabetes. *Pakistan J. Biol. Sci.* 2008;11(3):351-8.
47. Arfan M, Khan R, Rybarczyk A, Amarowicz R. Antioxidant activity of mulberry fruit extracts. *Int. J. Mol. Sci.* 2012;13(2):2472-80.
48. Elmac Y, Altu T. Flavour evaluation of three black mulberry (*Morus nigra*) cultivars using GC/MS, chemical and sensory data. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2002;82:632-35.

49. Shivashankara KS, Jalikop SH, Roy TK. Species variability for fruit antioxidant and radical scavenging abilities in mulberry. *International Journal of Fruit Science*. 2010;10:355-66.
50. Hassimotto NM, Genovese MI, Lajolo FM. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutrition Research*. 2008;28(3):198-207.
51. Pérez-Gregorio MR, Regueiro J, Alonso-González E, Pastrana-Castro LM, Simal-Gándara J. Influence of alcoholic fermentation process on antioxidant activity and phenolic levels from mulberries (*Morus nigra* L.). *LWT - Food Science and Technology*. 2011;44:1793-1801.
52. Kutlu T, Durmaz G, Ateş B, Yilmaz I, Çetin MS. Antioxidant properties of different extracts of black mulberry (*Morus nigra* L.). *Turkish J. Biol.* 2011;35:103-10.
53. Hassimotto NMA, Genovese MI, Lajolo FM. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra* L.) growing in Brazil. *Food Science and Technology International*. 2007;13(11):17-25.
54. Mamatkulova NM, Khidyrova NK, Mukarramov NI, Shakhidoyatov KhM. Polyisoprenoids from leaves of *Morus alba* and *M. nigra*. *Chem. Nat. Compounds*. 2012;48(1):106-7.
55. Wang L, Cui XQ, Gong T, Yan RY, Tan YX, Chen RY. Three new compounds from the barks of *Morus nigra*. *J. Asian Nat. Prod. Res.* 2008;10(9):897-902.
56. Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Oroojy H, Afshin-Nia F. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra*. *Phytother. Res.* 2004;18(5):365-69.
57. Gundogdu M, Muradoglu F, Sensoy RIG, Yilmaz H. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra* L., *Morus alba* L. and *Morus rubra* L. by HPLC. *Scientia Horticult.* 2011;132:37-41.
58. Gecgel U, Velioglu SD, Velioglu HM. Investigating some physicochemical properties and fatty acid composition of native black mulberry (*Morus nigra* L.) seed oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 2011;88:1179-87.

59. Mazimba O, Majinda RRT, Motlhanka D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. Afr. J. Pharm. Pharmacol. 2011;5(6):751-54.
60. Ercisli S, Tosun M, Duralija B, Voća S, Sengul M, Turan M. Phytochemical content of some black (*Morus nigra* L.) and purple (*Morus rubra* L.) Mulberry Genotypes. Food Technol. Biotechnol. 2010;48(1):102-6.
61. Özgen M, Serçe S, Kaya C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* and *Morus rubra* fruits. Scientia Horticult. 2009;119:275-79.
62. Colak A, Kolcuoglu Y, Faiz Ö, Özen A, Dincer B. Comparative characterization of diphenolases from two mulberry fruits (*Morus alba* L. and *Morus nigra* L.). Asian J. Chem. 2007;19(4):2961-72.
63. Abbas GM, Abdel Bar FM, Baraka HN, Gohar AA, Lahloub MF. A new antioxidant stilbene and other constituents from the stem bark of *Morus nigra* L. Nat. Prod. Res. 2014;28(13):952-9.
64. Miranda MA, Vieira GV, Alves MS, Yamamoto CH, Pinho JJRG, Sousa OV. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. HU Revista. 2010;36(1):61-8.
65. Albertasse PD, Thomaz LD, Andrade MA. Medicinal plants and their uses in Barra do Jucu community, Vila Velha Municipality, Espírito Santo State, Brazil. Rev. Bras. Pl. Med. 2010;12(3):250-60.
66. Khan I, Imran M, Azizullah Saeed M. Nutritional evaluation of *Morus nigra* and *Vitis vinifera*. J. Chem. Soc. Pakistan. 2008;30(4):637-41.
67. Ercisli S, Orhan E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. Food Chem. 2007;103:1380-84.

68. Almeida JRGS, Souza GR, Araujo ECC, Silva FS, Lima JT, Ribeiro LAA, Nunes XP, Barbosa-Filho JM, Quintans-Junior LJ, Santos MRV. Medicinal Plants and Natural Compounds from the Genus *Morus* (Moraceae) with Hypoglycemic Activity: A Review. In: Sureka Chackrewarthy. (Org.). Glucose Tolerance. 1ed. Rijeka - Croatia: InTech - Open Access Publisher, 2012, v. 1, p. 189-206.
69. Hou A, Wang H et al. Use of flavonoid compound in preparation of metabolic disease resistance medicines. CN103393637(A).
70. Stefanut MN, Cata AE et al. Nutritive supplement with hypoglycemic and antioxidant properties and process for preparing the same. RO128709 (A2).
71. An JT. Natural Medicinal Herb House. KR101136199 (B1).
72. Bak WCR. Diabetes functional beverage. KR20110011249 (A).
73. Leko V. Herbal composition and medicament against diabetes mellitus type II manufactured thereof. US2002102315 (A1); US6576270 (B2).
74. Leko V. Process and product extracted from herbal composition useful in controlling diabetes mellitus type II. US2003206976 (A1); US7056539 (B2).
75. Ito YOS. Tyrosinase inhibitor and its production. JPH11246424 (A).
76. Leko V. Capsulated herbal composition as auxiliary medicament against diabetes mellitus type (I) and (II). WO2005034973 (A1).
77. Leko V. Herbal composition and medicament against diabetes mellitus type II manufactured thereof. WO9955351 (A1).
78. Kilb KMF. Detoxifying phytotherapeutic composition from two plant extracts and process for preparing the same. EP1338303 (A1); EP1338303 (B1).

79. Abreu ICB, Alves RO. Formulação de composição farmacêutica de liofilizado do extrato hidroalcoólico e/ou frações ativas das folhas trituradas ou moídas de *Morus nigra* e seu uso no alívio dos sintomas da menopausa. BRPI1105827 (A2).

80. An JT. Natural medicinal herb house having excellent antibacterial effect, deodorization effect, warm-keeping effect, and preventing skin diseases effect. 1020120013527.

81. Bak WCR. Diabetes prevention functional beverage with active ingredients of natural materials. 1020090068801.