

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE *Morus nigra* L.
(Moraceae) E BIOPROSPECÇÃO NA MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM
TEÓRICA E EXPERIMENTAL**

SÃO LUÍS

2021

FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE *Morus nigra* L.
(Moraceae) E BIOPROSPECÇÃO NA MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM
TEÓRICA E EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Química da Universidade
Federal do Maranhão, para obtenção do título
de mestre em química.

Orientadora: Profa Dra Cláudia Quintino da
Rocha

SÃO LUÍS

2021

FLÁVIO AUGUSTO PRASERES VIEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATO E FRAÇÕES DE *Morus nigra* L.
(Moraceae) E BIOPROSPECÇÃO NA MENOPAUSA: UMA ABORDAGEM
TEÓRICA E EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós Graduação em
Química da Universidade Federal
do Maranhão, para obtenção do
título de mestre em química.

Aprovada em: 25/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª. Cláudia Quintino da Rocha (Orientadora-UFMA)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima (UFMA)
Universidade Federal do Maranhão - UFMA

Prof^ª. Dr^ª. Joicy Cortez de Sá Sousa (UNICEUMA)
Centro Universitário do Maranhão - UNICEUMA

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Ursulina, que está presente em todos os momentos da minha vida. Que me apoia mesmo quando eu perco as esperanças. Que nunca me deixou desistir de tudo nos recorrentes piores momentos, mas que garantiu com que eu estivesse vivo hoje.

Agradeço à professora Cláudia Quintino pela orientação nesse grande trabalho, por ter me acolhido em seu grupo de pesquisa mesmo com tantos outros trabalhos a orientar. Por possibilitar com que esse estudo tenha desenvolvido ao longo desse mestrado, pelos esclarecimentos nas (muitas) dúvidas que surgiram, pelas oportunidades de crescimento desse trabalho, e pela disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos meus amigos de laboratório Yan e Luna, que apesar da pandemia continuamos conversando, nos ajudando e crescendo uns com outros (a distância).

À professora Haissa Brito e o professor Rui Gil da Costa por serem sempre prestativos e solícitos em uma etapa crucial desse estudo, com as aulas, reuniões e e-mails.

Ao professor Odair que me orientou na graduação, porém continuou em contato sendo mentor e amigo no início da pós-graduação.

A todos do LQPN que me ajudaram nessa jornada.

Ao PROCAD-AM, pelo auxílio concedido em missão científica para UNESP.

RESUMO

A menopausa representa o fim do ciclo reprodutivo feminino e com ele o início de um quadro de distúrbios hormonais que interferem na vida e bem estar das mulheres. Conforme a humanidade busca na natureza meios de preservar a qualidade de vida, na medicina tradicional diversos relatos de plantas com efeitos anti-climatéricos vem se destacando, entre elas a *Morus nigra* L. Apesar de tratar-se de uma enfermidade comum, poucos trabalhos reportados na literatura visam corroborar a química dessa espécie e sua atividade farmacológica. Sendo assim, este trabalho visa elucidar o envolvimento dos metabólitos presentes nas folhas de *M. nigra* nos sintomas da menopausa. Na execução desse trabalho, folhas de *Morus nigra* foram submetidas a percolação em solvente água:etanol, 3:7 (v/v), obtendo-se assim seu extrato bruto, padronizado. Após secagem o extrato bruto foi submetido a um processo de fracionamento utilizando água/metanol 7:3 (v/v) com Acetato de Etila, separando as fases por afinidade intermolecular, obtendo misturas ricas em metabólitos diferenciados como os flavonoides e ácidos fenólicos, os quais a literatura apresenta dados sobre suas possíveis atividade fitoestrogênicas. Partindo desse princípio, realizou-se a caracterização química do extrato e frações por técnicas de cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (HPLC-PDA) e Espectrometria de Massas em múltiplos estágios (MSⁿ). Foram identificados 19 compostos no extrato, possibilitando a realização de ensaios *in silico* de docagem molecular dos metabólitos com receptores estrogênicos ER, observando a conformação desses complexos em comparação e seus efeitos nos receptores hormonais. Os ensaios *in vivo* foram realizados em ratas Wistar ovariectomizadas e tratadas com estro-progestativos e frações acetato e aquosa. resultados dos testes *in vivo* evidenciam atividade antiadipogênico das frações. A fração acetato auxiliou na redução de triglicerídeos, colesterol total e HDL e a fração aquosa nos níveis de triglicerídeos. Em linha com esses resultados, a fração acetato demonstra ser mais promissora no avanço dos estudos envolvendo a menopausa.

Palavras-chave: Produtos naturais, amora, fitoterapia, *in silico*, menopausa, *in vivo*.

ABSTRACT

Menopause indicates the end of women reproductive cycle the beginning of a hormonal imbalance that intervenes the quality of life and the wellbeing of many women. Humanity seeks from mother nature's resources to soothe their pain and maintain the status quo, from traditional medicine multiple reports about plants with anticlimateric effects, *Morus nigra* L. stands out. Even though menopause is a common condition nowadays, not many reports disclose the inner mechanisms about the chemical and pharmacological about this species. Hence, this report shows the relation of metabolites from *Morus nigra*. leaves and their effects on menopause symptoms. In this study, metabolites from leaves of *Morus nigra*. were extracted and standardized by percolation with 7:3 hydroethanolic solution (v/v). After being dried the extract were fractioned with 7:3 water/methanol (v/v) solution and ethyl acetate, isolating metabolites by their intermolecular interactions with those solvents, specially flavonoids and phenolic acid which had multiple reports on literature about their phytoestrogenic activities. After chemical characterization by chromatographic techniques, most main compounds from *Morus nigra* were elucidated and tested by *in silico* docking with Estrogen Receptors. The spatial conformation and intermolecular activities were obtained and their effects under those receptors were elucidated. During the animal experiments ovariectomized Wistar rats were treated with estroprogestative drugs and both aqueous and ethyl acetate fractions. The results showed potential anti adipogenic effects from the rats treated with ethyl acetate partition when the blood levels of total cholesterol, HDL and triglycerides were reduced. Given those results, the ethyl acetate fraction seems to be the most promising towards the study about menopause.

Keywords: Natural products, black mulberry, phytotherapy, *in silico*, menopause, *in vivo*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Frutos e folhas de Amoreira negra.....	18
Figura 2. Fórmulas estruturais dos principais compostos presentes nas folhas de Morus nigra.	19
Figura 3. Estrutura da daidzeína e genisteína.....	21
Figura 4. Estrutura química do estradiol.	22
Figura 5. Representação dos LBDs de ER α (azul) e ER β (magenta) em complexo com o estradiol (verde) (Fonte: SALUM, 2007).....	23
Figura 6. Ligação do estradiol no bolsão hidrofóbico de ER α (Fonte: SALUM, 2007).	23
Figura 7. Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no extrato e fração acetato de etila das folhas de Morus nigra. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H ₂ O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4 μ m), fluxo 1,0 ml.min ⁻¹ , Solventes: A=H ₂ O, B:MeOH, gradiente linear 0-100% de B em 40 min e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes no extrato e fração obtidos em 254 nm.	34
Figura 8. Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no extrato e fração acetato de etila das folhas de Morus nigra. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H ₂ O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4 μ m), fluxo 1,0 ml.min ⁻¹ , Solventes: A: H ₂ O, B: MeOH, gradiente linear 0-100% de B em 40 min e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes no extrato e fração obtidos em 360 nm.	35
Figura 9. Espectros na região do UV para padrões de A) ácido gálico, B).....	36
Figura 10. Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.	36
Figura 11. Espectros de ESI-MS, modo negativo full scan do extrato hidroetanólico das folhas de Morus nigra.....	37
Figura 12. Estruturas de metabólitos identificados no extrato hidroetanólico de Morus nigra.	39
Figura 13. Esquemas representativos de fragmentações a Quercetina-di-O-glucosídeo identificadas no extrato hidroetanólico de Morus nigra.	39
Figura 14. Esquemas representativos de fragmentações o Kampferol 3-O-rutinosídeo identificadas no extrato hidroetanólico de Morus nigra.	40
Figura 15. Esquemas representativos de fragmentações o Ácido Quínico identificadas no extrato hidroetanólico de Morus nigra.....	40

Figura 16. Esquemas representativos de fragmentações o Ácido 3-O-cafeoilquínico identificadas no extrato hidroetanólico de <i>Morus nigra</i> .	41
Figura 17. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ER α com Apigenina (A), Ácido Isoclorogênico (B) e Estradiol (estrutura cristal - C). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas – interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .	44
Figura 18. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ER β com Apigenina (A), Ácido Isoclorogênico (B) e Estradiol (estrutura cristal - C). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas – interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .	45
Figura 19. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ER β com Apigenina (A) e o Ácido Isoclorogênico (B). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas – interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .	46
Figura 20. Representação do ER α humano interagindo com os ligantes da fração de <i>Morus nigra</i> . (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.	47
Figura 21. Representação do ER β humano interagindo com os ligantes da fração de <i>Morus nigra</i> . (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.	47
Figura 22. Representação do PR humano interagindo com os ligantes da fração de <i>Morus nigra</i> . (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.	48
Figura 23. . Peso corporal de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5).	49
Figura 24. Peso do tecido adiposo de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com	

fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 50

Figura 25. Peso do útero de ratas Wista do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 50

Figura 26. Concentração sérica de cálcio em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 51

Figura 27. Concentração sérica de magnésio em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 52

Figura 28. Concentração sérica de triglicéridos em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 53

Figura 29. Concentração sérica de colesterol total em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 53

Figura 30. Concentração sérica de colesterol HDL em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e

símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5) 54

Figura 31. Concentração sérica de albumina em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 55

Figura 32. Concentração sérica de ácido úrico em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias (n=5)..... 56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais compostos em três espécies do gênero <i>Morus</i>	19
Tabela 2. Percentual de rendimento do extrato hidroetanólico e frações oriundos das folhas de <i>Morus nigra</i>	32
Tabela 3. FIA-ESI-IT/MS ⁿ das substâncias existentes no extrato hidroetanólico das folhas de <i>Morus nigra</i>	37
Tabela 4. Energias de ligação livre (ΔG_{bind}) e constante de inibição (K_i) obtidas por docking molecular dos compostos identificados no extrato bruto de <i>Morus nigra</i> com a estrutura dos receptores estrogênicos e de progesterona.....	42

LISTA DE ABREVIACÕES

ACET	Fração Acetato
AVC	Acidente Vascular Cerebral
CENAPAD-UFC	Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho da Universidade Federal do Ceará
CID	Dissociação Induzida por Colisão
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ER α	Receptores de Estrogênio Alfa
ER β	Receptores de Estrogênio Beta
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ESI	<i>Electrospray</i>
ESI-MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial com Ionização por <i>Electrospray</i>
FAQ	Fração Aquosa
FIA	Análise por Injeção em Fluxo Contínuo
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HPLC-PDA	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Com Detecção Por Arranjo De Diodos
IT	<i>Ion-Trap</i>
LDB	<i>Ligand Binding Domain</i>
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
m/m	Massa de extrato bruto por grama de material vegetal
<i>M. nigra</i>	<i>Morus nigra</i>
MS ⁿ	Fragmentações em Múltiplos Estágios
OVX	Ovariectomia
PAD	Arranjo de Fotodiodos
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PR	Receptores de Progesterona
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationships</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SAR	<i>Structure-Activity Relationships</i>
SHAM	Animais Falso-Operados
TFD	Teoria do Funcional da Densidade
TRH	Terapia de Reposição Hormonal

UHPLC	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência
UHPLC-DAD	Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência Com Detecção Por Arranjo De Diodos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Família Moraceae, gênero <i>Morus</i> , espécie <i>Morus nigra</i> L.....	18
2.2 Menopausa.....	20
2.3 Estrogênio e seus receptores	22
2.4 Modelos <i>in silico</i>	23
3. OBJETIVOS	25
4. METODOLOGIAS	26
4.1 Preparo do extrato, frações e determinação do rendimento.....	26
4.2 Identificação dos constituintes químicos de <i>Morus nigra</i>	26
4.2.1 Perfil cromatográfico de extrato e frações de <i>Morus nigra</i>	26
4.2.2 Caracterização química por Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas (ESI-IT-MS/MS).....	27
4.3 Estudo <i>in silico</i>	28
4.3.1 Estrutura dos compostos.....	28
4.3.2 Estrutura dos alvos.....	28
4.3.3 Docagem molecular	28
4.4 Estudo <i>in vivo</i>	29
4.4.1 Drogas	29
4.4.2 Animais.....	29
4.4.3 Procedimento cirúrgico.....	30
4.4.5 Determinação do peso corporal dos animais.....	30
4.4.6 Eutanásia e coleta de amostras biológicas e hormônios.....	31
4.4.7 Determinação do peso dos órgãos	31
4.4.8 Análise estatística.....	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	32

5.1	Rendimento do extrato e frações	32
5.2	Caracterização química.....	32
5.2.1	Perfil cromatográfico do extratos e fração de <i>Morus nigra</i>	32
5.2.2	Identificação dos metabólitos secundários no extrato hidroetanólico das folhas de <i>Morus nigra</i> por FIA-ESI-IT-MS ⁿ	36
5.3	Docagem em receptores de estrogênio e progesterona	41
5.4	Ensaio <i>in vivo</i>	48
5.4.1	Efeito do tratamento com frações de <i>Morus nigra</i> em relação ao peso corporal total.....	48
5.4.2	Efeito do tratamento com frações de <i>Morus nigra</i> sobre o peso do tecido adiposo e do útero	49
5.4.3	Efeito do tratamento com frações de <i>Morus nigra</i> sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio	51
5.4.4	Efeito do tratamento com frações de <i>Morus nigra</i> sobre a concentração plasmática de colesterol e triglicérides	52
5.4.5	Efeito do tratamento com frações de <i>Morus nigra</i> sobre a concentração plasmática de albumina	54
5.4.6	Efeito do tratamento com com frações de <i>Morus nigra</i> sobre a concentração plasmática de ácido úrico.....	55
6.	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Durante a vida da mulher, a passagem do período reprodutivo ao não-reprodutivo pode apresentar diversos sintomas decorrentes da flutuação hormonal e variação dos ciclos menstruais. Após 12 meses desde o último ciclo menstrual, estabelece-se o início da menopausa. Entretanto a menopausa não deve ser considerada uma patologia, mas sim uma condição biológica natural na vida da mulher (Ministério da Saúde, 2008).

As mudanças no estilo de vida como uma rotina de exercícios físicos, uma dieta saudável e o uso de medicamentos fazem parte do tratamento dos sintomas climatéricos assim como a prevenção de doenças relacionadas ao dismetabolismo (LIVINALLI & LOPES, 2007).

Em resposta aos efeitos da menopausa, pacientes recorrem à Terapia de Reposição Hormonal (TRH), que consiste na ingestão de hormônios sintéticos como estrógenos e progesterona em busca de alívio dos sintomas climatéricos (Sociedade Brasileira de Climatério, 2003). Porém, estudos indicam que a TRH representa mais riscos que benefícios à saúde com um aumento significativo do risco de doença arterial coronariana, acidente vascular cerebral (CARVALHO, 2014) e até mesmo uma reposta não eficaz na prevenção da osteoporose (WANNMACHER & LUBIANCA, 2004).

O fitoterápico Soyfemme® produzido pelos Laboratórios Aché que contém isoflavonas de soja (genisteína e daidzeína) apresenta-se tão eficaz quanto a TRH padrão no alívio dos sintomas vasomotores (fogachos e sudorese noturna), interferindo positivamente no perfil lipídico e, principalmente, sem aumentar a espessura do endométrio das pacientes, fator de risco para câncer de endométrio e uma das maiores contra-indicações da prescrição da TRH padrão (ACHÉ, 2011).

A *Morus nigra* L., uma espécie pertencente à família Moraceae, é conhecida popularmente como amoreira-negra ou amora-negra. Originária do Irã, é cultivada na Ásia oriental e serve como alimento de bicho-da-seda (*Bombyx mori* L.) (ALJANE & SDIRI, 2016; SOUTO, 2018). Outras espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional chinesa como antipirético, analgésico, diurético, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2013). De suas folhas são produzidos chás com o intuito de amenizar os sintomas do climatério, cujo efeito pode estar associado a presença de flavonoides, em especial isoflavonas (MIRANDA *et al.*, 2010).

Devido aos efeitos colaterais decorrentes da TRH, a farmacologia busca nos produtos naturais soluções menos adversas ao bem estar feminino no climatério. O interesse na medicina alternativa produz diversos estudos com grande potencial de melhoria da qualidade de vida da sociedade. Com base nos relatos etnofarmacológicos e a diversidade de compostos fenólicos da

M. nigra, propomos que extratos e frações dessa espécie possuem propriedades promissoras no tratamento dos efeitos da menopausa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família Moraceae, gênero *Morus*, espécie *Morus nigra* L.

A espécie *Morus nigra* Linnaeus (Figura 1) é uma planta de origem asiática, plenamente aclimatizada no Brasil. Pertence à família Moraceae, com aproximadamente 61 gêneros e mais de 1000 espécies identificadas. Possui boa representação no Brasil, seja por espécies silvestres quanto por espécies cultivadas (PADILHA *et al.*, 2010; CASTRO, 2016).



Figura 1. Frutos e folhas de Amoreira negra.

As plantas do gênero *Morus* possuem diversas aplicações terapêuticas na medicina popular. Na China, espécies desse gênero são utilizadas com anti-inflamatório, diurético, antitussígeno, analgésico e antipirético. As raízes auxiliam no tratamento de reumatismo, problemas oculares e espasmos infantis, enquanto os frutos contêm compostos fenólicos que apresentaram propriedades antioxidantes, antimutagênicas e anticarcinogênicas bem como a capacidade de modificar a expressão gênica (SUASSUNA, 2011).

Estudos de produtos naturais derivados de espécies do gênero *Morus* revelam a química presente em extratos vegetais de folhas e frutos das plantas. A Tabela 1 compõe dados dos principais metabólitos encontrados nas espécies. Destaca-se a presença predominante de ácidos graxos e ácidos fenólicos nos frutos das espécies de amora,

enquanto nas folhas de *Morus nigra* revela presença de derivados de ácidos fenólicos e flavonoides (Figura 2).

Tabela 1. Principais compostos em três espécies do gênero *Morus*.

Espécie	Compostos	Referência
<i>Morus alba</i> (folhas)	Ácido giberélico, etil ester ácido linoleico.	EMNIYET <i>et al.</i> , 2014
<i>Morus alba</i> (frutos)	Ácido palmítico, metil ester ácido linoleico.	EL-BAZ <i>et al.</i> , 2017
<i>Morus rubra</i> (frutos)	Ácido linoleico, ácido palmítico, palmitato de etila, 9-metil- <i>cis</i> , 11- <i>trans</i> octadecadienato.	EL-BAZ <i>et al.</i> , 2017
<i>Morus nigra</i> (folhas)	Ácido quínico, ácido linoleico, isoquecitrina, , kaempferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo, quercetina.	NASTIĆ <i>et al.</i> , 2018 TALLINI <i>et al.</i> , 2015
<i>Morus nigra</i> (frutos)	Ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico.	ELMACI & ALTUG, 2002

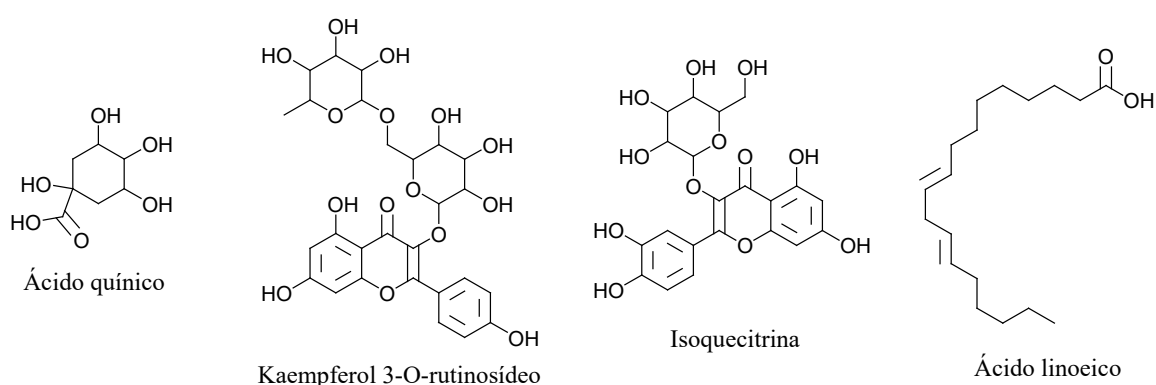


Figura 2. Fórmulas estruturais dos principais compostos presentes nas folhas de *Morus nigra*.

Miranda *et al.*, (2010) destacam o tratamento de faringites e doenças inflamatórias do trato gastrointestinal com o xarope dos frutos da amoreira negra. Os frutos, as folhas e

as cascas da planta também apresentam propriedades sedativas, expectorantes, calmante, diurético, anti-inflamatório, anti-helmíntico, entre outros. Estes órgãos da planta contêm compostos como a 1-deoxinojirimicina, usada no tratamento da diabetes, a morusina, um fenilflavonoide com ação analgésica. Os autores ainda enfatiza as isoflavonas, comumente referenciadas como fitoestrógenos, como substâncias naturais presentes na amoreira negra com efeitos sobre os sintomas do climatério.

Em 2005, Toshio e colaboradores isolaram de algumas espécies de *Morus* uma substância chamada *chalconmoracin*, que apresentou atividade antimicrobiana frente ao *Staphylococcus aureus*. Já em 2015, Tallini e colaboradores identificaram a presença dos flavonoides kaempferol e quercetina em extratos hidrolisados das folhas de *M. nigra* através cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar.

O estudo do potencial anti-inflamatório produzido por Castro (2016) revela a presença de ácido clorogênico, rutina, quercetina e canferol no extrato hidroalcoólico e fração de acetato de etila das folhas de *Morus nigra* L. Neste trabalho, Castro também constatou a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória através da redução do edema de pata de rato induzido por carragenina do extrato e fração, destacando a possibilidade de utilização da espécie no tratamento de processos inflamatórios.

2.2 Menopausa

A menopausa marca um importante período da vida da mulher. A transição para o período não fértil traz consigo diversas consequências como o desequilíbrio hormonal feminino e o risco de desenvolvimento de doenças pós-menopáusicas.

A menopausa é caracterizada por diversos sintomas decorrentes das mudanças endócrinas em função do declínio da atividade ovariana e de mudanças biológicas por consequências da redução da fertilidade, o que corresponde a um intervalo de 2 a 8 anos antes e após a menopausa. Ocorrem modificações nos tecidos, ondas de calor, sudorese, fadiga, irritabilidade, distúrbios do sono, diminuição da libido e ressecamento vaginal (SILVA, 2012; FARIA & OLIVEIRA, 2017).

Em 2014 Pardini revisou os riscos e benefícios apresentados por pacientes climatéricas que recorreram à TRH. Este apresenta aumento em aproximadamente duas vezes no risco de fenômenos tromboembólicos e um acréscimo ainda maior pela terapia combinada ente

estrógeno e progesterona se comparado somente a terapia estrogênica. Este risco também está relacionado a outros fatores como obesidade, trombofilia e idade superior aos 60 anos.

Pardini (2014) evidencia também que o uso de estrógeno sem oposição induz a estímulo do endométrio, aumentando risco de câncer e hiperplasia endometrial. O acidente vascular cerebral (AVC) é uma doença crônica que aumenta exponencialmente com o avançar da idade. Para cada 10.000 mulheres que iniciaram a TRH antes dos 50 anos pode haver 1 caso consequente do tratamento. Entre os 55 e 60 anos são 2 casos e acima de 65 anos são 7 casos.

A literatura relata diversos usos de produtos naturais como alternativas aos sintomas da menopausa. Atmaca *et al.* revisou em 2008 o uso de isoflavonas de soja no controle de osteoporose na pós-menopausa. Foi observado que o consumo diário de laticínios com baixo teor de gordura tem potencial de retardar o início da menopausa em mulheres de até 51 anos (CARWILE *et al.*, 2013). Um estudo revela o potencial dos fitoestrógenos de ligar-se aos Receptores de Estrogênio beta (ER β) graças a suas semelhanças químicas ao hormônio (KUIPER *et al.*, 1998).

Estudos sobre daidzeína e genisteína (Figura 3) provenientes da soja destacam a formação estrutural desses flavonoídes como forte indicador de atividade fitoestrogenica (SALUM, 2007). Sendo a daidzeína eficaz na imunização contra o nematóide *Caenorhabditis elegans* e também na redução dos fogachos em mulheres na menopausa (FISCHER *et al.*, 2012; KHAODHIAR *et al.*, 2008) enquanto a genisteína efetivo agente quimiopreventivo contra melanomas malignos (DANCIU *et al.*, 2017).

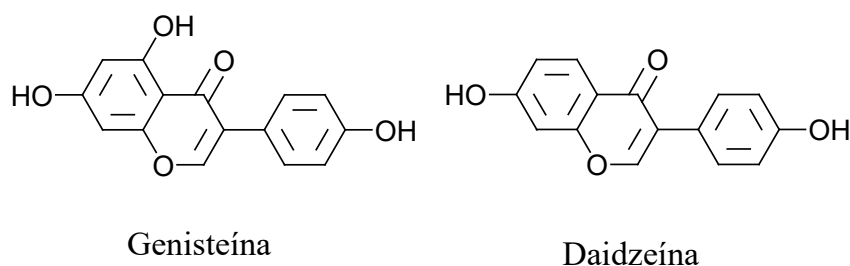


Figura 3. Estrutura da daidzeína e genisteína.

A aplicação de fitoterápicos a base de amoreira negra em mulheres climatéricas é uma alternativa viável ao avaliar os riscos apresentados pela TRH convencional. Silva (2012) avaliou a atividade de fitoestrógenos no extrato de *M. nigra* em ratas ovariectomizadas, propondo o efeito a presença de flavonoides. Assim sendo, acredita-se que um estudo dos mecanismos de interação de metabólitos da *M. nigra* em composições ricas em flavonoides e

outros fitoquímicos, tal qual suas interações com os receptores estrogênicos e aos sintomas do climatério seja de grande importância.

2.3 Estrogênio e seus receptores

Os estrogênios são hormônios naturais responsáveis pelo desenvolvimento e diferenciação de tecidos. Esses hormônios podem atuar nas mamas, nos ossos, no trato gastrointestinal e no sistema reprodutivo. São conhecidos três hormônios da classe, o estradiol, o estriol e a estrona, sendo o estradiol (Figura 4) o mais abundante e atuante nos tecidos (SALUM, 2007).

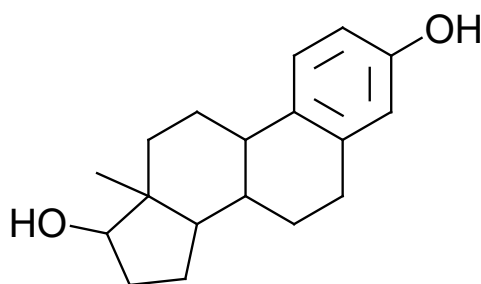


Figura 4. Estrutura química do estradiol.

Os receptores de estrogênio alfa ($ER\alpha$) e beta ($ER\beta$) são macromoléculas capazes de realizar transcrição intermolecular pela conformação de sua estrutura realizada por específicos ligantes. Sua estrutura espacial é dividida em vários domínios, entre eles o domínio de ligação ao ligante (LDB, *Ligand Binding Domain*) onde as interações entre os estrogênios e o receptor são ativadas. A configuração espacial do LDB é formada majoritariamente por α -hélices (Figura 5) e os receptores $ER\alpha$ e $ER\beta$ possuem apenas cerca de 30% de aminoácidos em comum (SALUM, 2007; LAZARI *et al.* 2009).

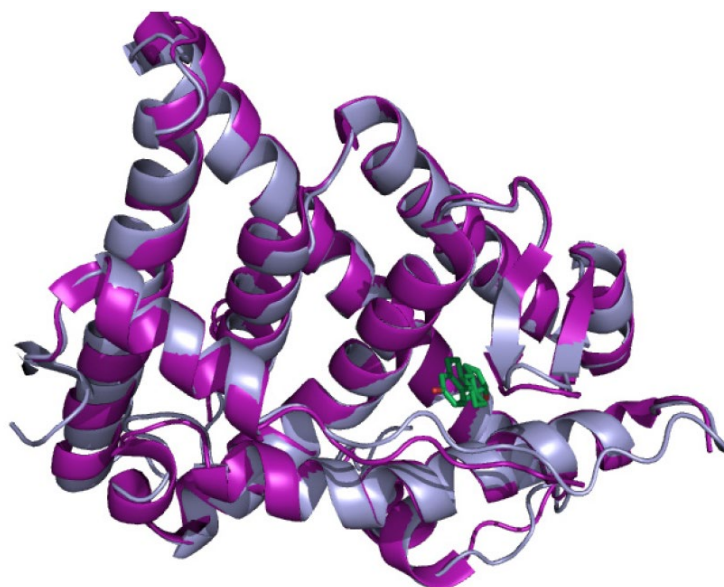


Figura 5. Representação dos LBDs de ER α (azul) e ER β (magenta) em complexo com o estradiol (verde) (Fonte: SALUM, 2007).

Salum em 2007 descreve que a complexação do LBD de ER α com o estradiol é alocado na cavidade por complementaridade estereoquímica e eletrostática. Essa conformação acontece no bolsão hidrofóbico do LBD, aonde a interação acontece nos resíduos Glu353 e Arg394 e o anel D interage com His524 em ER α (Figura 6).

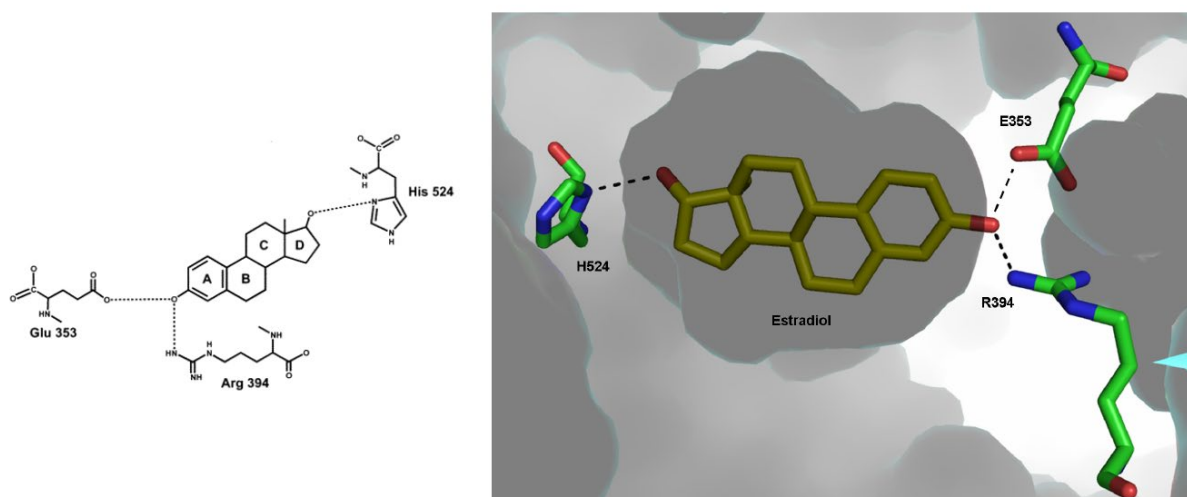


Figura 6. Ligação do estradiol no bolsão hidrofóbico de ER α (Fonte: SALUM, 2007).

2.4 Modelos *in silico*

A docagem molecular trata-se da simulação da posição, orientação e conformidade especial de um ligante dentro de um local alvo de interação, formando um complexo ligante-receptor estável (LOPES, 2020)

A diversidade de estudos *in silico* descritas na literatura fornecem dados que auxiliam na formulação de hipóteses na explicação de mecanismos bioquímicos, tal qual se apresentam como uma alternativa de trabalho sem que haja sacrifício animal envolvido (VALLE, 2009).

Baseado em técnicas computacionais de Relações Estrutura-Atividade (SAR, do inglês, *Structure-Activity Relationships*) e Relações Quantitativas Estrutura-Atividade (QSAR, do inglês, *Quantitative Structure-Activity Relationships*), os modelos *in silico* possibilitam novas estratégias na elucidação de mecanismos bioquímicos de forma complementar ou alternativa aos modelos *in vivo*, *ex vivo*, *in vitro* e *in chemico* (MATOS, 2015).

Para aferir os resultados, são necessários os parâmetros de energéticos e espaciais mais abrangente possíveis. Essa complementariedade estrutural e química exerce a função fundamental na decisão de quais partes do ligante podem interagir em quais partes da proteína, formando um complexo estável (LOPES, 2020).

Desde a síntese de uma molécula até a proposta de um fármaco a bioinformática se tornou fundamental no planejamento, execução e otimização do plano de trabalho. Também é possível determinar parâmetros farmacocinéticos como absorção, distribuição, metabolismo e excreção através dos modelos *in silico* (SALUM, 2007).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

- Avaliar o extrato e frações e de *Morus nigra* L. sobre os efeitos da menopausa.

Objetivos Específicos

- Desenvolver e validar método analítico para aquisição de perfil cromatográfico padrão (*fingerprint*) do extrato padronizado, utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD);
- Caracterizar os compostos majoritários do extrato utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) associada à detecção por espectrometria de massas sequencial com ionização por *electrospray* (ESI-MS/MS);
- Realizar estudos *in silico* (*molecular docking*) com os compostos majoritários, analisando suas interações com receptores envolvidos na menopausa;
- Determinar os efeitos das frações de *M. nigra* em ratas induzidas à menopausa.

4. METODOLOGIAS

4.1 Preparo do extrato, frações e determinação do rendimento

O material vegetal utilizado foi adquirido comercialmente da empresa *All Chemistry*. O material estava padronizado de acordo com a RDC (Resolução da Diretoria Colegiada). Foram utilizados 450g de folhas trituradas de *Morus nigra* na extração por percolação, em temperatura ambiente segundo Prista *et al.* (1995). O processo teve início com o intumescimento prévio de uma quantidade do pó com etanol 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Após esse período, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%). O empacotamento foi feito da forma mais homogênea possível, evitando a formação de bolhas ou buracos no conteúdo colocado dentro do percolador. A altura do enchimento obedeceu a proporção 5:1 (cada 5 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador ficou em 1,0 a 2,0 mL/min/Kg de droga vegetal comum tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

O extrato etanólico bruto (EtOH/H₂O 7:3, v/v) foi submetido à secagem por evaporação e secura no vácuo por 30 minutos em temperatura de 50 °C e em seguida à liofilização (Liofilizador Liotop, K105, Brasil) por 48 horas em temperatura de -95 °C e pressão de 12 µHg.

As partições líquido/líquido foram obtidas com acetato de etila e metanol (H₂O/MeOH 7:3, v/v) e foram submetidos ao mesmo processo de secagem e, então, foram analisados por HPLC-PDA. As frações foram caracterizadas e enviadas para testes *in vivo*.

O rendimento foi determinado pela relação de massa de extrato bruto seco pela massa material vegetal percolado. Para as frações obtém-se o rendimento na relação da massa de fração seca pela massa de extrato bruto seco.

4.2 Identificação dos constituintes químicos de *Morus nigra*.

4.2.1 Perfil cromatográfico de extrato e frações de *Morus nigra*

O extrato bruto e as frações acetato e aquosa de *Morus nigra* foram analisados por HPLC-PDA, para isso foi feita uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. As soluções passaram por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v). Os compostos foram eluídos nos cartuchos

utilizando 1 mL de MeOH/H₂O (1:1, v/v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e então secadas. O extrato e as frações secas foram diluídos para 10 mg/mL em solvente grau HPLC. Aliquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no HPLC-PDA com detecção a 270 nm.

Foi utilizado um sistema HPLC modelo Jasco®, constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba binária, e detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi uma coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4µm), fluxo 1,0 mL.min⁻¹. Os solventes de eluição utilizados foram A (água) e B (metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 0% a 100% de B em 40 min. O fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o software ChromNAV (Jasco).

4.2.2 Caracterização química por Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas (ESI-IT-MS/MS)

O extrato bruto e frações acetato e aquosa foram analisados em um espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific®, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA) que forneceu espectros de massa para as amostras. O analito foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MSⁿ), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi realizado para o extrato bruto e frações para a geração e análise dos espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350 °C, gás de arraste (N₂) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de m/z 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

A infusão de fluxo direto das amostras foi realizada num analisador do tipo *Ion trap* da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Foi utilizado um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL min⁻¹. A análise completa de varrimento foi registrada na gama m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento consiste um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa m/z . O segundo evento de varredura é uma experiência MS/MS

realizada utilizando uma varredura dependente de dados nas moléculas $[M-H]^-$ dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons de produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos do extrato hidroetanólico e frações acetato e aquosa foi feita comparando com a literatura seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas.

4.3 Estudo *in silico*

4.3.1 Estrutura dos compostos

Os compostos identificados por ESI-IT/MS-MS foram estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o *software* GaussView 5.0.8 (DENNINGTON *et al.*, 2016) e tiveram suas propriedades geométricas e vibracionais calculadas (otimização) no vácuo em nível método da Teoria do Funcional da Densidade (TFD) utilizando o funcional híbrido B3LYP combinado com a base 6-31 ++ G (d, p) com o *software* Gaussian 09 (FRISCH *et al.*, 2016), para obtenção das propriedades eletrônicas atômicas e moleculares que estejam correlacionadas com a atividade biológica.

4.3.2 Estrutura dos alvos

Foram utilizadas as estruturas de receptores hormonais (estrogênio alfa, estrogênio beta e progesterona) obtidos por técnicas experimentais disponíveis no *Protein Data Bank* (PDB) códigos 1A52, 5TOA e 1ZUC, respectivamente.

4.3.3 Docagem molecular

Foi realizada docagem com o pacote AutoDock Vina. Foi utilizado o módulo AutoDock Tools 1.5.7 para preparar e analisar os cálculos computacionais. Após otimização, as estruturas dos compostos identificados foram posicionadas na porção central do respectivo sítio catalítico do alvo selecionado, sendo Glu353 para ER α (#1A52), His475 para ER β (#5TOA) e Asn719 para receptor de progesterona (#1ZUC). As cargas *Gasteiger* e os hidrogênios polares, necessários para os cálculos de potencial, foram adicionados após a remoção de moléculas de água, fármacos e/ou artefatos das estruturas dos alvos. O algoritmo genético lamarckiano foi

escolhido para procurar as melhores conformações, com 100 execuções para cada ligante (algoritmo genético com pesquisa local) (MORRIS *et al.*, 1998).

As estruturas dos receptores foram mantidas rígidas, enquanto os ligantes (compostos identificados em *Morus nigra*) não tiveram sua mobilidade restringida, permanecendo livres. As conformações de melhor energia de interação dos complexos ‘ligante + receptor’ identificados na docagem molecular foram selecionados com base em energia livre de ligação e constantes de inibição, por inspeção visual e análises de resíduos que melhor interagiram com o ligante (CALADO *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2019, 2020). Análises moleculares e representações complexas foram obtidas usando o pacote UCSF Chimera (PETTERSEN *et al.*, 2004), vs. 1.14. e PoseView (STIERAND & RAREY, 2010).

O estudo *in silico* foi realizado utilizando os recursos computacionais do Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho da Universidade Federal do Ceará (CENAPAD-UFC).

4.4 Estudo *in vivo*

4.4.1 Drogas

Estrogênio conjugado associado ao acetato de medroxiprogesterona (estroprogestativo): Foi utilizado estrogênio conjugado 0,45 mg associado com acetato de medroxiprogesterona 1,5 mg, em forma de comprimido com o nome comercial SELECTA que foi fornecido gratuitamente pelo laboratório LIBBS S/A.

4.4.2 Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (n=5) provenientes do Biotério Central da UFMA, com pesos variando entre 250 e 300 gramas e 25 e 35 gramas, respectivamente, com acesso *ad libitum* à comida (ração) e água e, mantidas em ciclos alternados de luminosidade de 12 horas, com temperatura de 20 a 25 °C. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as orientações para o cuidado com animais de laboratório e com as considerações éticas descritas nos protocolos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão e pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais foram distribuídos em 5 grupos conforme descrição a seguir:

Grupo 1: Falso-operado (SHAM): Falso operado (*sham operated*) e tratado com óleo mineral (veículo): Constituído por ratas submetidas a uma falsa cirurgia tratadas subcutaneamente com óleo mineral.

Grupo 2: Ovariectomizadas (OVX SAL) e tratado com óleo mineral (veículo): Os animais administrados, por via subcutânea, com óleo mineral que será o veículo utilizado para a solubilização e diluição dos hormônios (efeito placebo), em volume de 0,1 ml/ 100g de peso dos animais.

Grupo 3: Ovariectomizadas e tratado com estrogênio conjugado associado com acetato de medroxiprogesterona (estro-progestativos) (OVX E2 + P): Após 21 dias da ooforectomia as ratas foram injetadas diariamente, por um período de 1 mês, com o hormônio na dose de 20 µg/Kg de peso do animal.

Grupo 4: Ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ): Após 21 dias da ooforectomia as ratas foram injetadas diariamente, por um período de 1 mês, com a fração na dose de 400 mg/Kg de peso do animal.

Grupo 5: Ovariectomizadas e tratadas com fração acetato (OVX ACET): Após 21 dias da ooforectomia as ratas foram injetadas diariamente, por um período de 1 mês, com a fração na dose de 100 mg/Kg de peso do animal.

4.4.3 Procedimento cirúrgico

As ratas foram submetidas e mantidas em anestesia por cetamina/xilasina (60/7,5 mg/kg, intraperitoneal), durante todo o período cirúrgico. Foi feita a assepsia da região ventral dos animais (supra-púbica) para posterior laparotomia de aproximadamente 2 cm na linha mediana. Os ovários e as trompas foram identificados. As trompas foram ligadas com fio de sutura e os ovários isolados e retirados após a ligadura. Posteriormente a incisão foi suturada. Animais falso-operados) foram submetidos à laparotomia exploratória, mas os ovários e as trompas permaneceram intactas. Após a cirurgia, durante 3 dias foi administrado o anti-inflamatório ibuprofeno 30 mg/kg, via oral.

4.4.5 Determinação do peso corporal dos animais

Foi realizado o controle de peso corporal e ingestão alimentar das ratas durante todo o período de tratamento. Os animais foram pesados diariamente para a determinação do volume das drogas que foram administradas.

4.4.6 Eutanásia e coleta de amostras biológicas e hormônios

Após serem previamente anestesiados os animais foram eutanasiados. Amostras de sangue foram coletadas a partir da veia cava posterior utilizando seringas heparinizadas e o plasma foi imediatamente separado por centrifugação a 2000 g, a temperatura ambiente durante 20 min. Os níveis plasmáticos dos hormônios estradiol, progesterona e testosterona foram dosados pelo método de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Abbott Laboratories, Illinois, E.U.A.) e a reação foi realizada de acordo com as instruções dos fabricantes. As dosagens quantitativas foram realizadas utilizando-se o espectrofotômetro UV-VIS para a determinação dos seguintes parâmetros bioquímicos: Albumina, Colesterol, Triglicérides, Ácido úrico, Cálcio e Magnésio; utilizando-se a técnica, comprimento de onda e referências de acordo com o elemento dosado e orientação do fabricante dos reagentes (LABTEST®).

4.4.7 Determinação do peso dos órgãos

Após a indução de anestesia e eutanásia dos animais, o útero e o tecido adiposo foram coletados e devidamente pesados.

4.4.8 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os dados serão analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias (*Two-way*) para medidas repetidas, seguida do teste de Bonferroni ou Newman-Keuls, para comparações múltiplas. O nível de significância adotado será de 5% ($\alpha = 0,05$). Todos os cálculos estatísticos serão realizados utilizando o programa estatístico GraphPad Prism version 6.00 for Windows, San Diego, California, E.U.A.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Rendimento do extrato e frações

Após extração e secagem do extrato e frações os rendimentos foram determinados (Tabela 2). Enquanto a extração por extrato hidroetanólico apresentou rendimento de 2,88% de massa de extrato bruto por grama de material vegetal (m/m) por massa de extrato bruto por massa de folhas secas, para as partições líquido/líquido o rendimento foi de 17,16% para a acetato e 72,57% para a aquosa. Em linha com estes resultados, Nastić e colaboradores (2018) obtiveram um extrato bruto por maceração em 60 minutos e solução de EtOH 75% com rendimento 6,98% (m/m). Os autores destacam que o extrato bruto é rico em ácidos fenólicos e polifenóis glicosilados, compostos polares e semi-polares que podem ser fracionados em solventes polares visando a obtenção de frações ricas em ácidos ou flavonoides. Devido à presença desses metabólitos é possível definir que o extrato bruto das folhas de *Morus nigra* trata-se de uma matriz rica em compostos polares.

Tabela 2. Percentual de rendimento do extrato hidroetanólico e frações oriundos das folhas de *Morus nigra*.

Espécie	Extrato hidroetanólico Rendimento %	Fr-Acetato Rendimento %	Fr-Aquosa Rendimento %
<i>Morus nigra</i> (folhas)	2,88	17,16	72,57

5.2 Caracterização química

5.2.1 Perfil cromatográfico do extratos e fração de *Morus nigra*

Após avaliação por HPLC-PDA do extrato e fração de *Morus nigra*, observa grande complexidade e diversidade na composição química das matrizes avaliada devido ao grande número de picos eluídos ao longo da corrida cromatográfica. Com o auxílio do detector de arranjo de fotodiodos (PAD) acoplado ao sistema HPLC, pôde-se processar os dados

cromatográficos e obter os cromatogramas em comprimentos de onda seletivos para uma determinada classe de metabólito secundário. Nos cromatogramas do extrato das folhas e fração acetato de etila, processados em 254 nm (Figura 7) e 360 nm (Figura 8) respectivamente, observa-se um menor número de picos eluídos no início da corrida, e uma melhor resolução cromatográfica. Uma característica observada nos cromatogramas é o fato de que no extrato das folhas a intensidade de absorção é da ordem de 100.000 mAu enquanto que na fração acetato de etila, a absorção foi 150.000 mAu, Esse fato sugere que há uma menor concentração de metabólitos no extrato quando comparado a fração acetato de etila, uma vez que ambos foram preparados na mesma concentração. A verificação da presença de flavonoides e derivados de ácidos fenólicos foi constatada pela presença de espectros com bandas características dessas classes em todos os extratos.

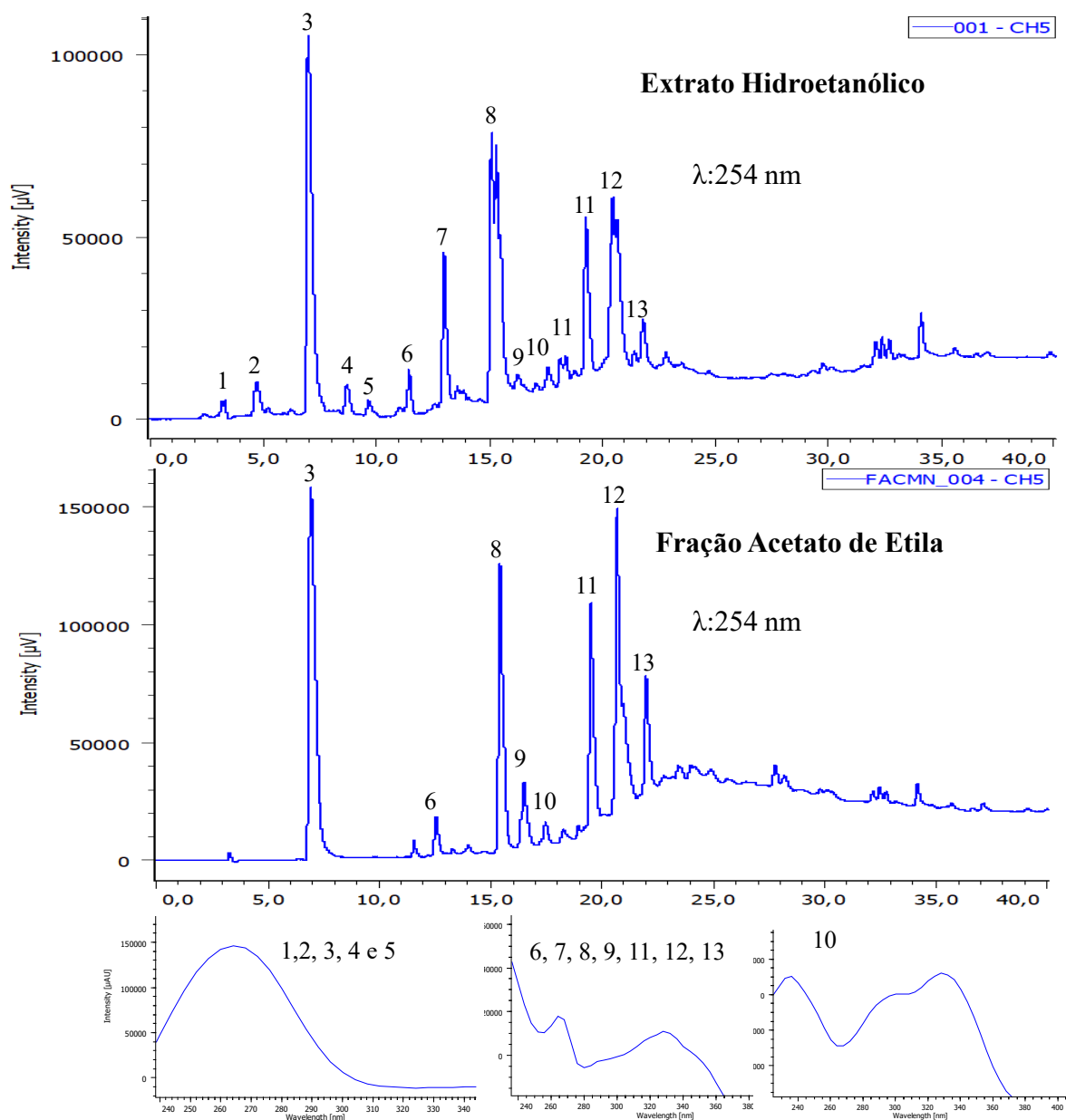


Figura 7. Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no extrato e fração acetato de etila das folhas de *Morus nigra*. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4μm), fluxo 1,0 ml.min⁻¹ , Solventes: A=H₂O, B:MeOH, gradiente linear 0-100% de B em 40 min e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes no extrato e fração obtidos em 254 nm.

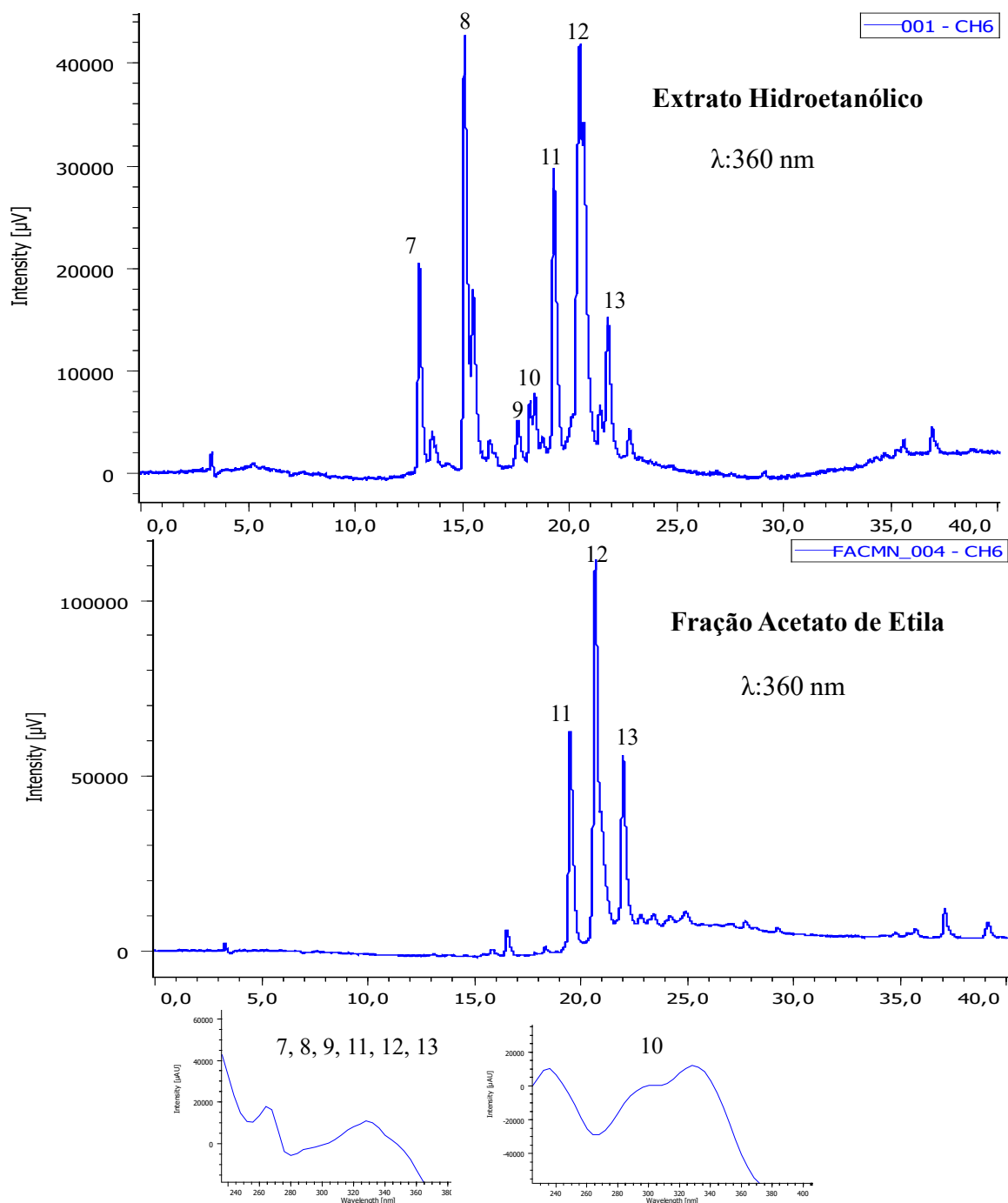


Figura 8. Cromatograma de separação dos constituintes químicos presentes no extrato e fração acetato de etila das folhas de *Morus nigra*. Clean-up por SPE-RP18, eluída com H₂O: MeOH 9/1, v/v), obtidos por HPLC-PDA (Jasco®), Coluna Phenomenex® Synergi Hydro RP-18 (250 x 4,6mm i.d. ; 4 μm), fluxo 1,0 ml.min⁻¹, Solventes: A: H₂O, B: MeOH, gradiente linear 0-100% de B em 40 min e espectros no UV das classes mais proeminentes presentes no extrato e fração obtidos em 360 nm.

Derivados de ácidos fenólicos apresentam uma única banda de absorção referente ao sistema benzílico, com máximo na região do UV variando entre 260-280 nm (Figura 9A). Flavonoides, por sua vez, são reconhecidos por apresentarem no geral, duas bandas de absorção referentes aos dois sistemas aromáticos encontrados em agliconas; a Banda II, com máximos

na faixa espectral de 240-290 nm, atribuída ao anel A e a Banda I, com máximos na faixa espectral de 300-390 nm, atribuída ao anel B (Figura 9B; MERKEN & BEECHER 2000). A Banda I é associada à absorção do Anel B, que possui o sistema cinamoil com maior extensão da conjugação eletrônica. A banda II é atribuída ao Anel A, que envolve a absorção do sistema benzoil de menor conjugação (Figura 10)

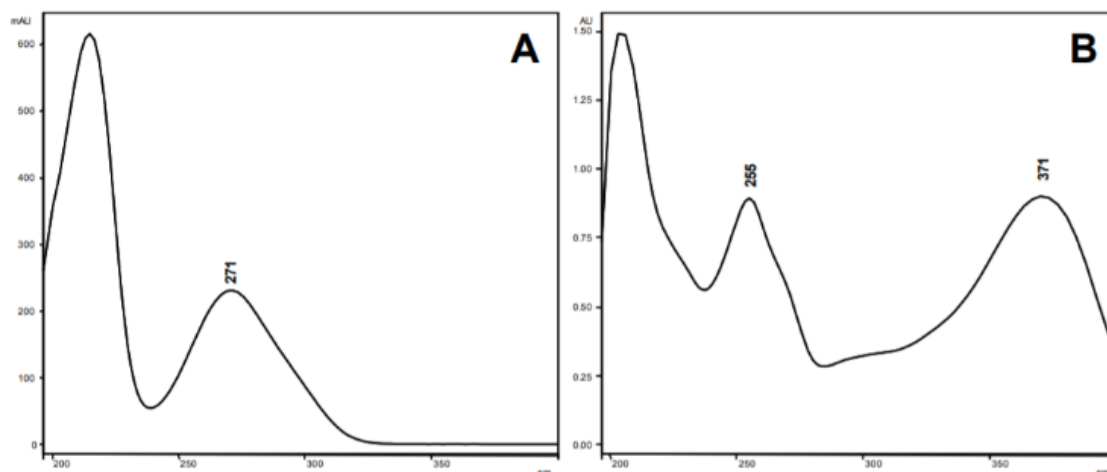


Figura 9. Espectros na região do UV para padrões de A) ácido gálico, B).

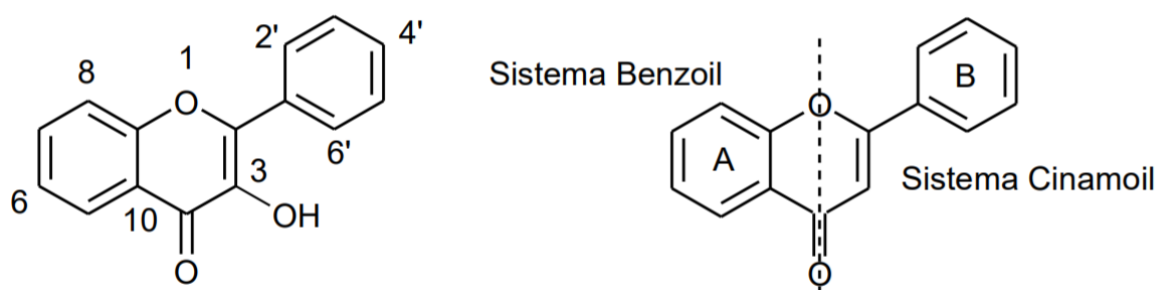


Figura 10. Estrutura de um flavonol com sistema benzoil e cinamoil.

5.2.2 Identificação dos metabólitos secundários no extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra* por FIA-ESI-IT-MSⁿ

A espectrometria de massas tem se destacado nos últimos anos como uma valiosa ferramenta para a análise de diversos compostos presentes na natureza. Aplica-se esta técnica para se obter a fragmentação de substâncias em análise existentes em matrizes complexas como por exemplo, um extrato vegetal.

Com a utilização da técnica de FIA-ESI-IT-MSⁿ foi possível identificar diversos compostos no extrato de *M. nigra* (Figura 11, Tabela 3). A maioria dos compostos determinados

foram flavonoides e ácidos fenólicos. Para todas as substâncias conhecidas, utilizou-se comparação de seus dados de fragmentação com os já existentes na literatura.

EBMN_NEG_03092019 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,25E5
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-2000,00]

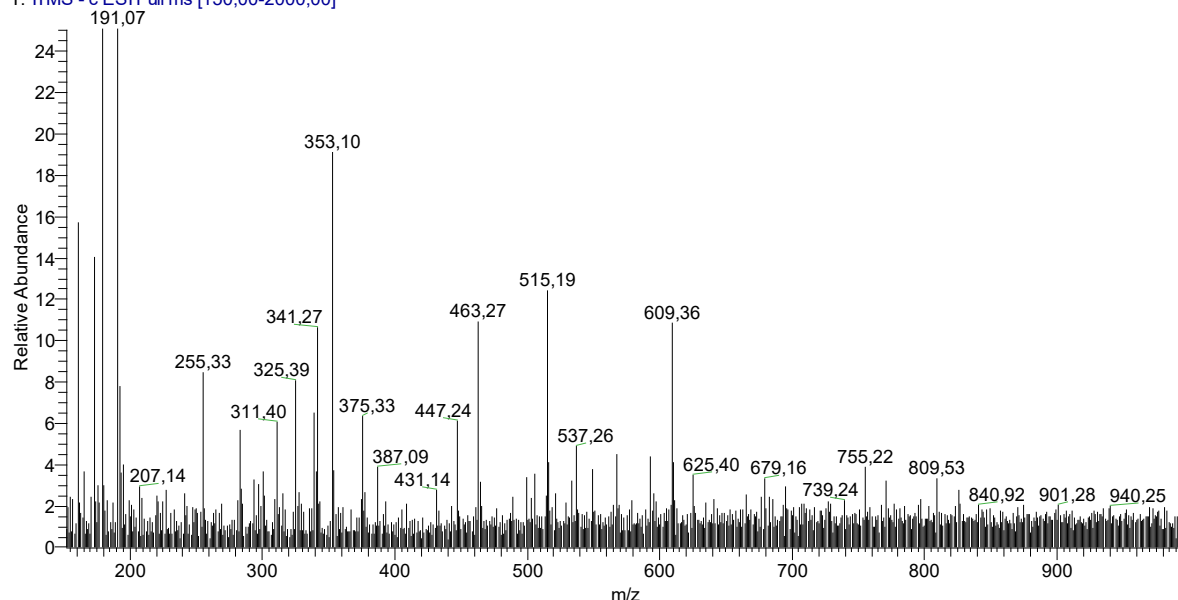


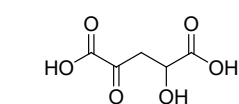
Figura 11. Espectros de ESI-MS, modo negativo full scan do extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*.

Tabela 3. FIA-ESI-IT/MSⁿ das substâncias existentes no extrato hidroetanólico das folhas de *Morus nigra*.

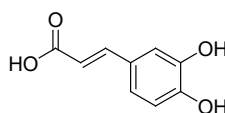
Pico	[M-H] ⁻	Fragmentos MS ⁿ	Proposta
1	161	143; 133; 117	Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutarico
2	179	161; 135; 109	Ácido caféico
3	191	173; 171; 127	Ácido quínico
4	283	265; 263; 165	Derivado de iridóide
5	325	183; 163	Ácido p-coumaroil-glucosídeo
6	341	179; 161; 143; 113	Cafeoil- <i>O</i> -hexosídeo
7	353	191; 173; 135	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico
12	431	387; 363; 341; 197	Apigenina-C-glucosídeo
14	447	327; 285; 267; 257; 229	Kaempferol 3- <i>O</i> -glucosídeo
15	463	301; 179; 151	Isoquercitrina
16	477	300, 153	Quercetina-3- <i>O</i> -glucoronil
	477	409; 341; 315	Isorhamnetina-3- <i>O</i> -glucosídeo
18	489	285; 267; 257; 163	Kaempferol 3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetil)glucosídeo
20	505	301; 179; 151	Quercetina- <i>O</i> -glucosídeo

21	515	553; 191; 179; 173	Ácido dicafeoil-quínico
22	533	371; 353; 191	n.i
28	609	447; 301	Rutina
29	625	463; 301; 179	Quercetina-di- <i>O</i> -glucosídeo
30	683	653; 503; 271	n.i
32	755	609; 301; 179; 151	Quercetina-3- <i>O</i> -(6'''-trans- <i>p</i> -coumaroil-2''-glucosil)raminosídeo
33	593	285; 257	Kampferol 3- <i>O</i> -rutinosídeo

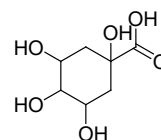
*n.i: não identificado



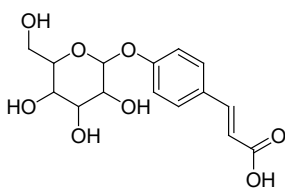
Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutarico



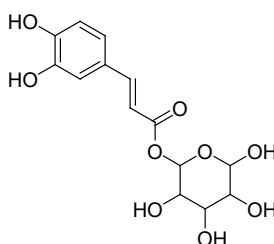
Ácido caféico



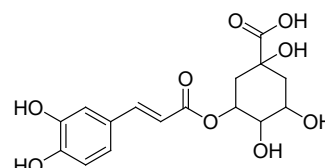
Ácido quínico



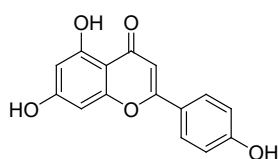
Ácido p-coumaroil-glucosídeo



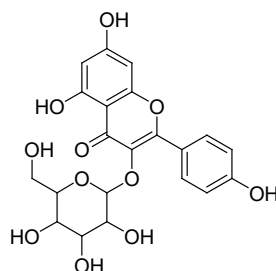
Cafeoil-O-hexosídeo



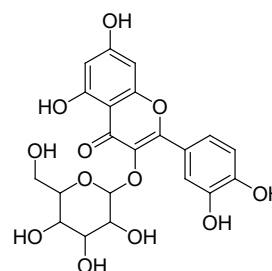
Ácido 3-O-cafeoilquínico



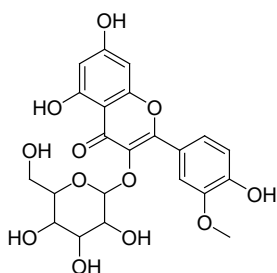
Apigenina



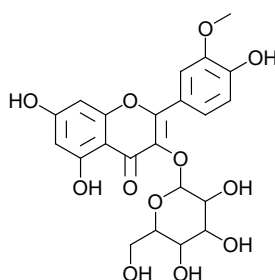
Kaempferol 3-*O*-glucosídeo



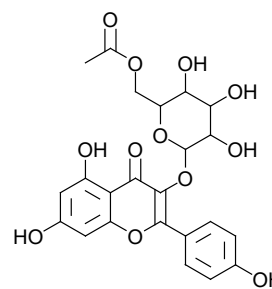
Isoquercitrina



Quercetina-3-*O*-glucoronil



Isorhamnetina-3-*O*-glucosídeo



Kaempferol 3-*O*-(6''-*O*-acetil)glucosídeo

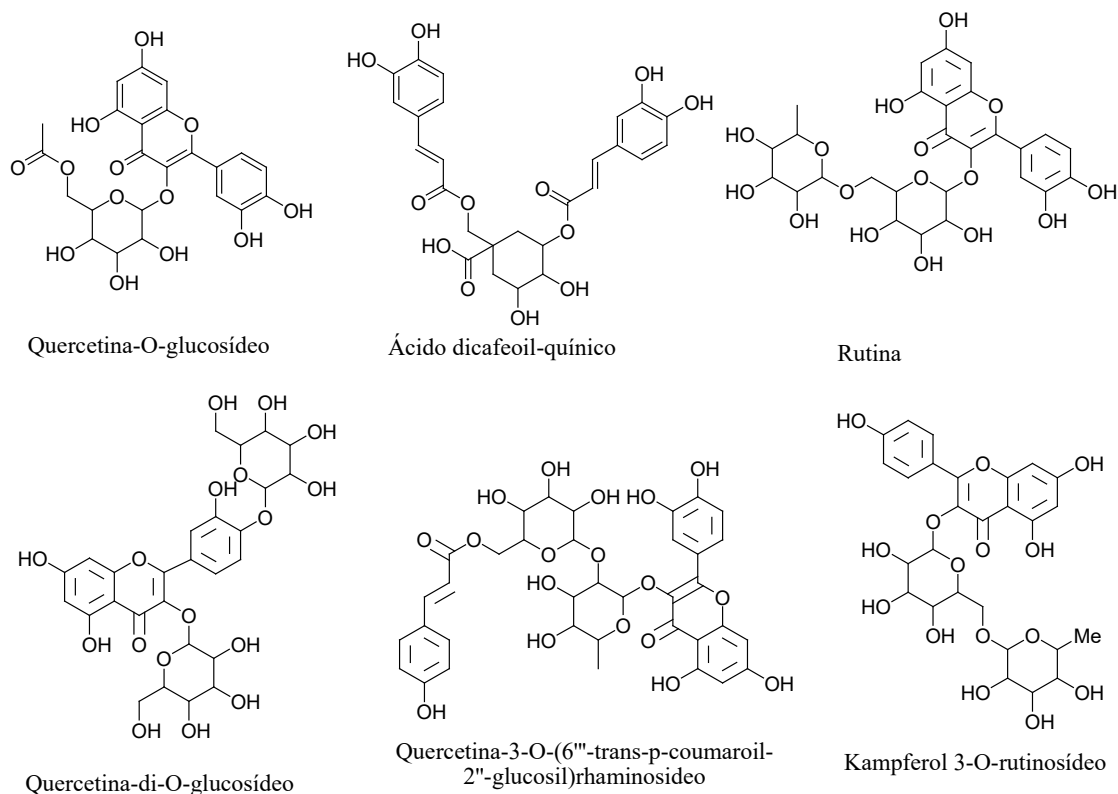


Figura 12. Estruturas de metabólitos identificados no extrato hidroetanólico de *Morus nigra*.

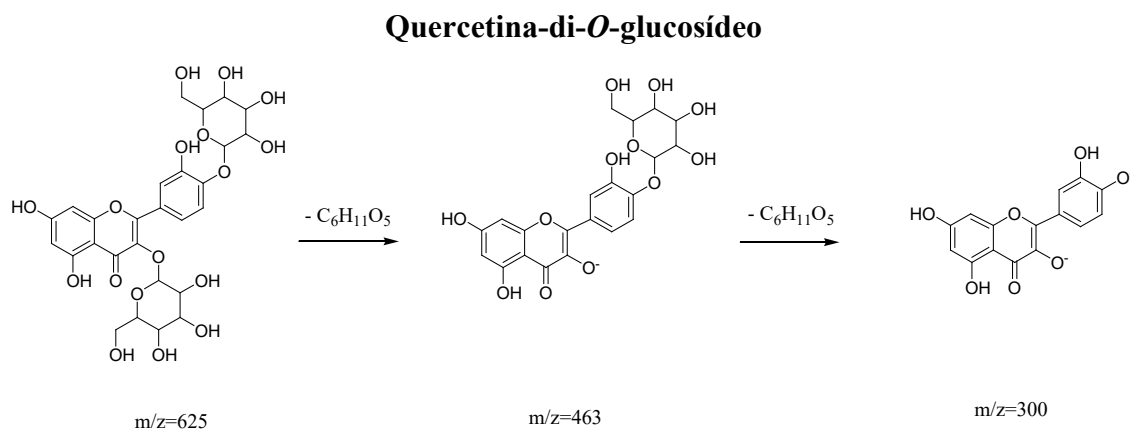


Figura 13. Esquemas representativos de fragmentações a Quercetina-di-O-glucosídeo identificadas no extrato hidroetanólico de *Morus nigra*.

O composto do pico 29 apresenta m/z 625, sendo proposto como Quercetina-di-O-glucosídeo (Figura 13), sendo duas unidades glicosídicas ligadas por um heteroátomo de oxigênio nos anéis B e C do flavonoide. Em destaque, o pico base em m/z 463 após a perda integral da primeira glicose (162 Da) no anel C, seguida pela subsequente perda da segunda unidade glicosídica ligada ao anel B, com sinal de m/z 300. As ligações carbono-oxigênio são

mais susceptíveis à quebra comparadas as ligações carbono-carbono, prevalecendo a rota de fragmentação com perdas de glicose sem que haja cisão do fragmento. Em 2018 Nastić e colaboradores identificaram a presença de isômeros deste metabólito nas folhas de *M. nigra*.

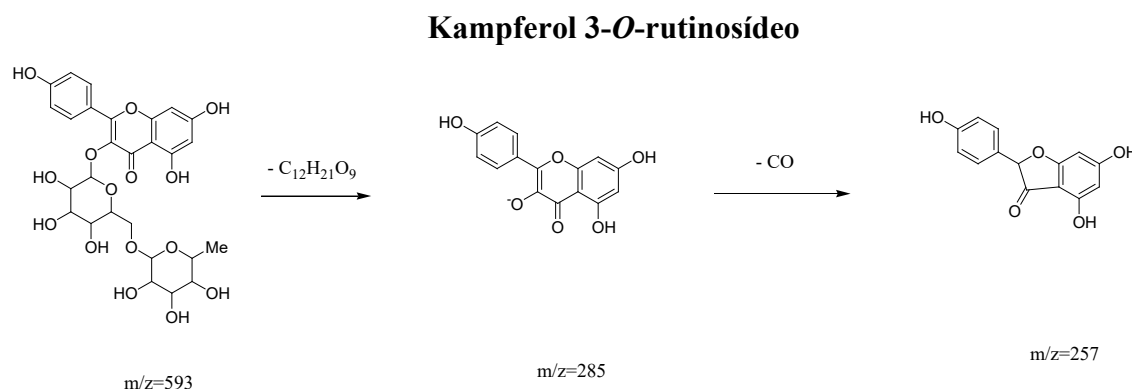


Figura 14. Esquemas representativos de fragmentações o Kampferol 3-O-rutinosídeo identificadas no extrato hidroetanólico de *Morus nigra*.

O metabólito de íon m/z 593 trata-se do Kampferol 3-O-rutinosídeo (Figura 14), com pico base de m/z 285 e subsequente sinal em m/z 257. A fragmentação de 308 Da é caracterizado pela saída íntegra do di-glicosídeo ligado ao anel C, sem a quebra das duas unidades de açúcar. A perda de 28 Da corre pela saída de uma carbonila proveniente do rearranjo do anel C do flavonoide. Isômeros desse composto foram identificados em amostras das folhas de *M. nigra*. (NASTIĆ *et al.*, 2018). Esse metabólito também pôde ser encontrado em frutas de *Morus nigra* e *Morus alba* (PAWLOWSKA *et al.*, 2008).

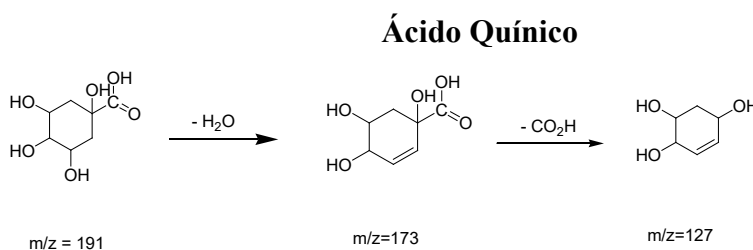


Figura 15. Esquemas representativos de fragmentações o Ácido Quínico identificadas no extrato hidroetanólico de *Morus nigra*.

O pico de m/z 191 é proposto como sendo o Ácido quínico (Figura 15). A perda de 18 Da é representado pela saída de água no carbono 4 seguido da formação de ligação sp^2 no ciclo. A fragmentação da carboxila gera uma perda de 46 Da. A literatura relata a presença deste metabólito. Nastić e colaboradores identificaram este ácido em 2018 nas folhas de *M. nigra*.

Enquanto em 2015 Miljkovic e colaboradores constataram a presença do composto, porém em frutos de diversas espécies do gênero *Morus*.

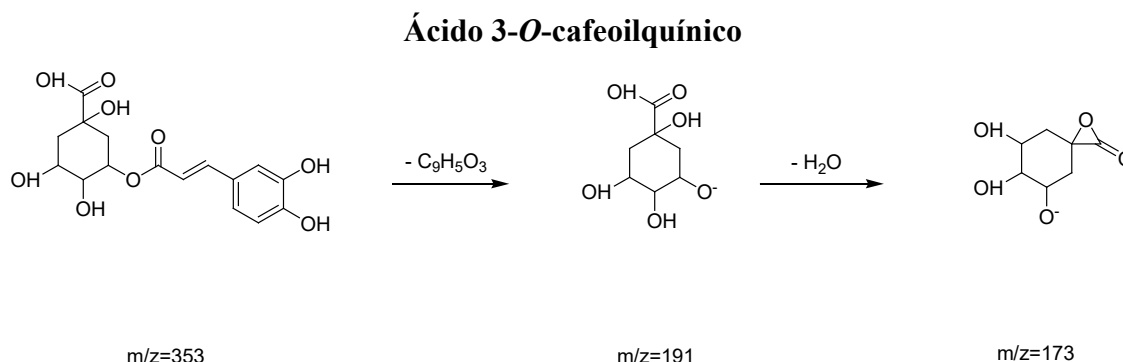


Figura 16. Esquemas representativos de fragmentações o Ácido 3-*O*-cafeoilquínico identificadas no extrato hidroetanólico de *Morus nigra*.

O pico de m/z 353 trata-se do íon de Ácido 3-*O*-cafeoilquínico. Após a saída do agrupamento cafeoil com 162 Da, o íon de ácido quínico apresenta m/z 191. A subsequente desidratação ocorre pelo rearranjo da carboxila com a hidroxila no carbono 4, resultando num heterociclo ligado a carbonila. Isômeros deste fitoquímico foram isolados em frutos de *Morus nigra* e *Morus alba* (PAWLOWSKA *et al.*, 2008).

5.3 Docagem em receptores de estrogênio e progesterona

Para a análise de *docking* molecular, usamos todos os compostos majoritários identificados por MS/MS no extrato bruto de *Morus nigra*. Para o composto Apigenina-C-glucosídeo a aglicona derivada foi utilizada nos ensaios *in silico*. Em geral, todos os compostos mostraram alto parâmetro de afinidade com a estrutura ER α , ER β e PR (Receptores de Progesterona), destacando a Apigenina e Ácido Isoclorogênico com valores de energia de ligação livre mais próximos dos respectivos hormônios nos receptores.

Os resultados dos valores de energia de ligação de todos os compostos majoritários são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Energias de ligação livre (ΔG_{bind}) e constante de inibição (K_i) obtidas por docking molecular dos compostos identificados no extrato bruto de *Morus nigra* com a estrutura dos receptores estrogênicos e de progesterona.

Ligante ER α	ΔG_{bind}^*	K_i	Ligante ER β	ΔG_{bind}^*	K_i	Ligante PR	ΔG_{bind}^*	K_i
Apigenina	-8,8	14,861	Apigenina	-9,1	15,368	Apigenina	-9,5	16,043
Ácido Isoclorogênico	-8,4	14,186	Ácido Isoclorogênico	-8,5	14,354	Ácido Isoclorogênico	-8,7	14,692
1-cafeoil- β -D-glicose	-7,9	13,341	1-cafeoil- β -D-glicose	-7,9	13,341	1-cafeoil- β -D-glicose	-7,9	13,341
Quercetina-3-O-glucosil-6''-acetato	-7,9	13,341	Ácido cafeico	-6,4	10,808	Ácido <i>trans</i> -p-cumárico-4-glicosídeo	-7,8	13,172
Isoquercetina	-7,5	12,666	Ácido <i>trans</i> -p-cumárico-4-glicosídeo	-6,4	10,808	Ácido cafeico	-7,0	11,821
Ácido isoclorogênico A ou Ácido 3,5-dicafeoil-quínico	-7,4	12,497	Quercetina-3-O-glucosil-6''-acetato	-6,0	10,133	Ácido isoclorogênico A ou Ácido 3,5-dicafeoil-quínico	-6,5	10,977
Quercetina-3,4'-O-di- β -glicosídeo	-7,2	12,159	Isoquercetina	-5,7	9,626	Quercetina-3,4'-O-di- β -glicosídeo	-6,4	10,808
Ácido <i>trans</i> -p-cumárico-4-glicosídeo	-7,1	11,990	Rutina	-5,6	9,457	Rutina	-6,2	10,470
Kaempferol-3-O-galactosídeo (Trifolina)	-6,9	11,652	Quercetina-3,4'-O-di- β -glicosídeo	-5,6	9,457	Kaempferol-3-O-galactosídeo (Trifolina)	-5,9	9,964
Isorhamnetina-3-galactosídeo (Cacticina)	-6,8	11,484	Ácido quínico	-5,4	9,119	Isoquercetina	-5,8	9,795
Ácido cafeico	-6,4	10,808	Isorhamnetina-3-galactosídeo (Cacticina)	-5,4	9,119	Isorhamnetina-3-galactosídeo (Cacticina)	-5,8	9,795
Rutina	-6,1	10,301	Ácido isoclorogênico A ou Ácido 3,5-dicafeoil-quínico	-5,2	8,782	Ácido quínico	-5,6	9,457
Ácido quínico	-5,5	9,288	Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutático	-5,1	8,613	Quercetina-3-O-glucosil-6''-acetato	-5,1	8,613
Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutático	-4,7	7,937	Kaempferol-3-O-galactosídeo (Trifolina)	-5,1	8,613	Ácido 4-hidroxi-2-oxoglutático	-4,8	8,106

17- βEstadriol (redocagem)	-10,9	18,407	17- βEstadriol (redocagem)	-11,2	18,914	Progesterona	-10,2	17,225
*kcal.mol⁻¹								

De acordo com nossos resultados, tanto a Apigenina quanto o Ácido Isoclorogênico realizaram interações com importantes resíduos de sítios ativos do receptor e com resíduos vizinhos. Tais interações permitem formular a hipótese de que uma mistura rica em flavonoides e ácidos fenólicos possa haver sinergismo capaz de potencializar os efeitos farmacológicos dos metabólitos no ciclo hormonal feminino.

A Apigenina interagiu por forças de van der Waals com os resíduos de Leu384, Leu387, Ala350 e Phe404 de ER α , enquanto a hidroxila agregada ao anel C realizou ligações de hidrogênio ao carboxilato do resíduo Glu353 e o anel fenólico com o anel aromático de Phe404 por interações π - π (Figura 17A).

O Ácido Isoclorogênico apresentou seis interações, sendo quatro através de ligações de hidrogênio: duas no anel fenólico com a carbonila de Leu387 e com o grupo amino de Arg394, uma com o carboxilato de Thr347 e uma com a hidroxila do ciclo com o nitrogênio do grupo imidazol no resíduo de His524. Também houve interações de van der Waals entre o ácido e o resíduo de Phe404 além de interações π - π entre o anel aromático desse resíduo e o anel do ácido (Figura 17B).

Como referência, o 17-βEstadriol assim como a Apigenina demonstra realizar ligações de hidrogênio com carboxilato de Glu353 e assim como Ácido Isoclorogênico com o imidazol de His524 (Figura 17C). A conformação espacial de Apigenina e 3-O-cafeoilquínico com a estrutura de ER α é mostrada na Figura 20.

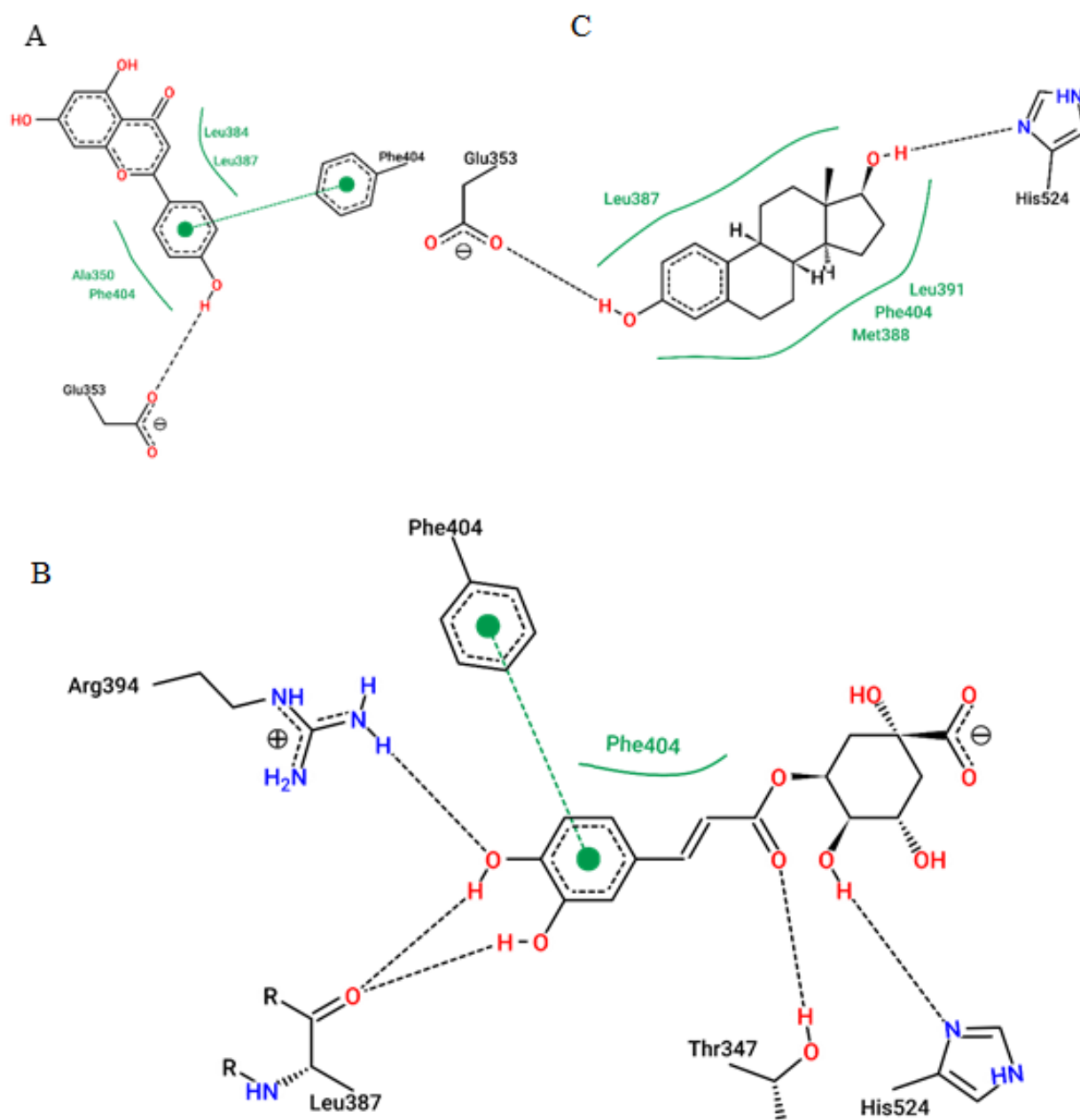


Figura 17. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ERα com Apigenina (A), Ácido Isoclorogênico (B) e Estradiol (estrutura cristal - C). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas - interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .

No receptor ER β , o Ácido Isoclorogênico interage por ligações de hidrogênio com resíduos de imidazol em His475A, carbonila em Gly472A e Leu339A, e com o grupo amino em Arg346A. As interações de van der Waals acontecem nos sítios próximos ao resíduo Phe356A (Figura 18A).

A Apigenina realiza ligações de hidrogênio com enxofre do resíduo Met295A, com o carboxilato de Glu305A e o grupo amino de Arg346A. Destaca-se, também, as interações de van der Waals com os aminoácidos Leu339A e Met336A (Figura 18B).

Comparando resultados, o 17- β Estadriol interagiu com estes mesmos sítios, em adição as interações π - π com o grupo benzoil de Phe356A (Figura 18C)

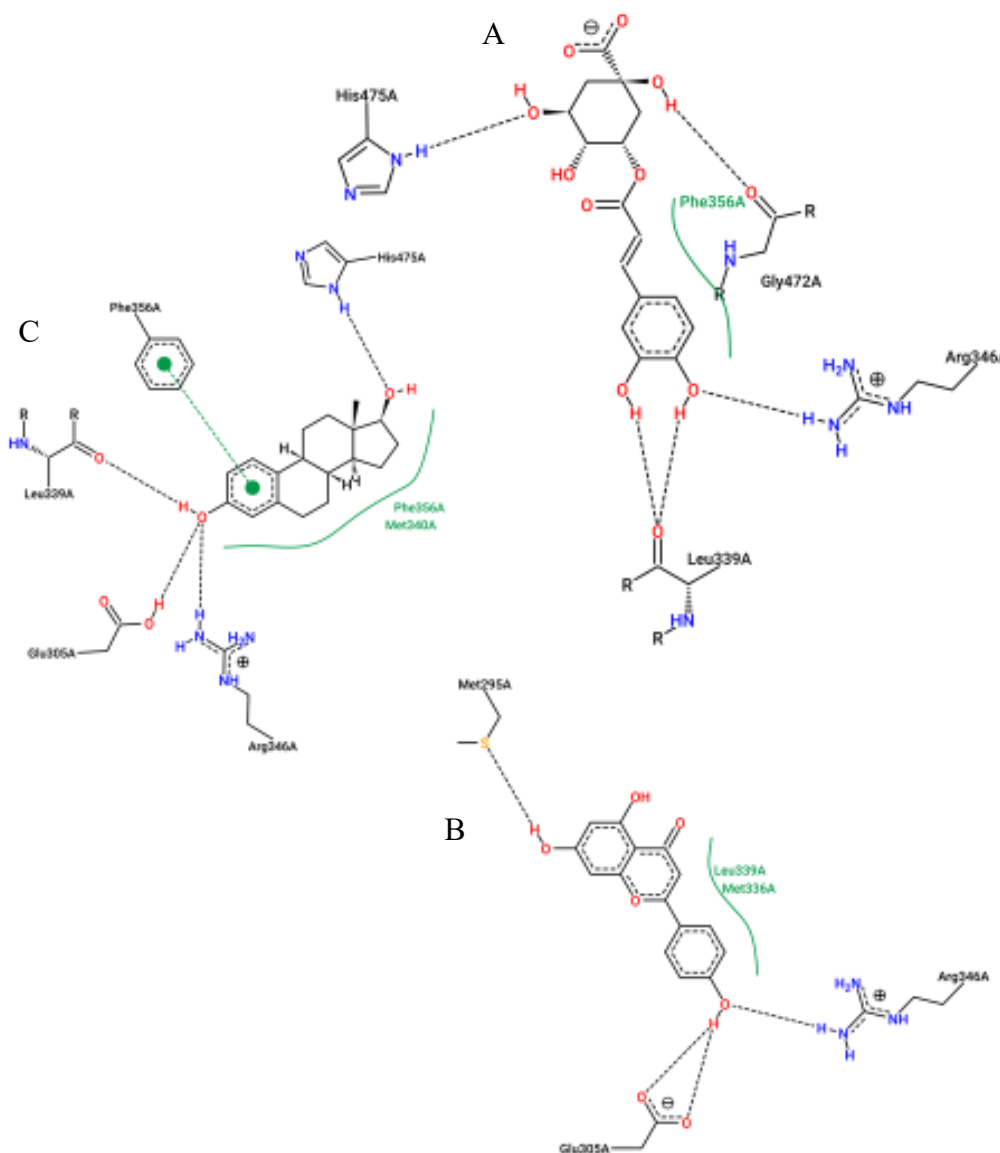


Figura 18. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ER β com Apigenina (A), Ácido Isoclorogênico (B) e Estradiol (estrutura cristal - C). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas – interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .

Já os ensaios com a PR indicam que houveram interações entre a Apigenina e o receptor, com ligações de hidrogênio entre a carbonila do Asn719A, ao grupo amino de Arg766A e ao grupo amido de Gin725A. As interações de van der Waals entre o metabólito e o receptor

ocorreram entre dos resíduos de Leu718A, Phe778A (e interações π - π) e Met759A.(Figura 19B). O Ácido Isoclorogênico realizou ligações de hidrogênio com a carbonila de Leu718A e o grupo amino de Arg766A e o grupo amido de Gin725A. As interações de van der Waals ocorrem, principalmente, no resíduo de Met759A (Figura 19A).

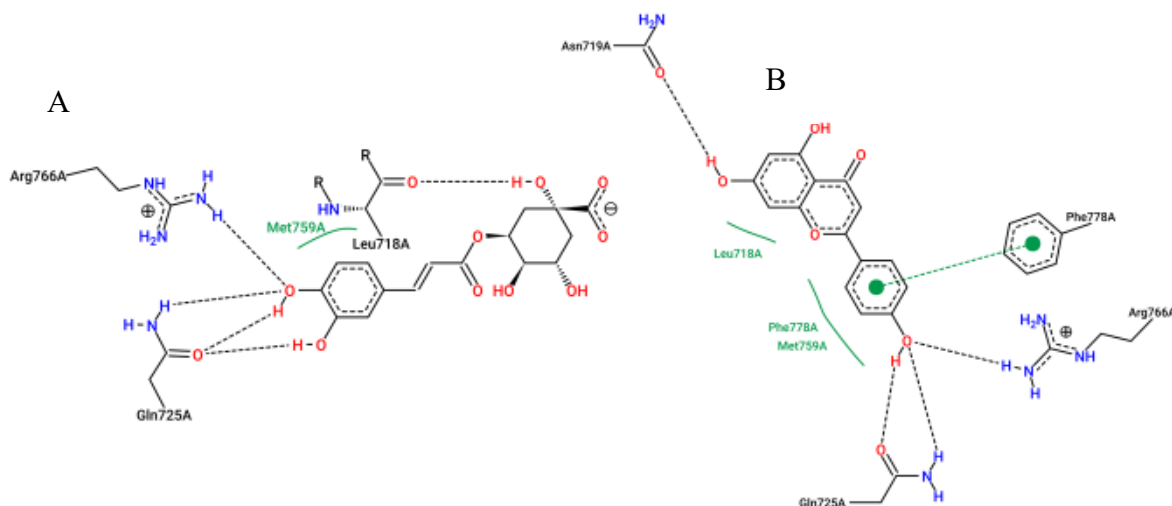


Figura 19. Diagrama bidimensional de contatos de resíduos de aminoácidos do sítio ativo do ERβ com Apigenina (A) e o Ácido Isoclorogênico (B). Linhas pretas tracejadas - ligações de hidrogênio; linhas verdes contínuas – interações de van der Waals; linha verde tracejada - interações π - π .

Os resultados preliminares forneceram dados sobre a conformação geométrica da Apigenina e Ácido Isoclorogênico sobrepostos ao estradiol *redocking* e estrutura cristal (Figura 20B).

No modelo tridimensional da ERα é possível destacar a α -hélice na região LDB do receptor. Observa-se na (Figura 20A) a complexação na LDB do receptor com os ligantes sobrepostos. Destaca-se também, a conformação dos ligantes ao ERβ (Figura 21) e ao PR (Figura 22).

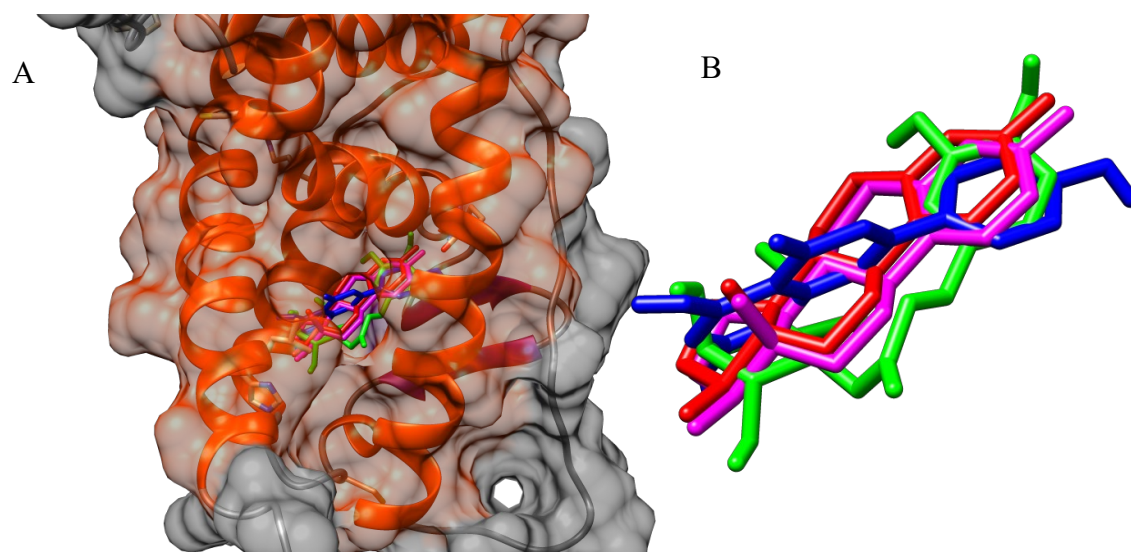


Figura 20. Representação do ER α humano interagindo com os ligantes da fração de *Morus nigra*. (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.

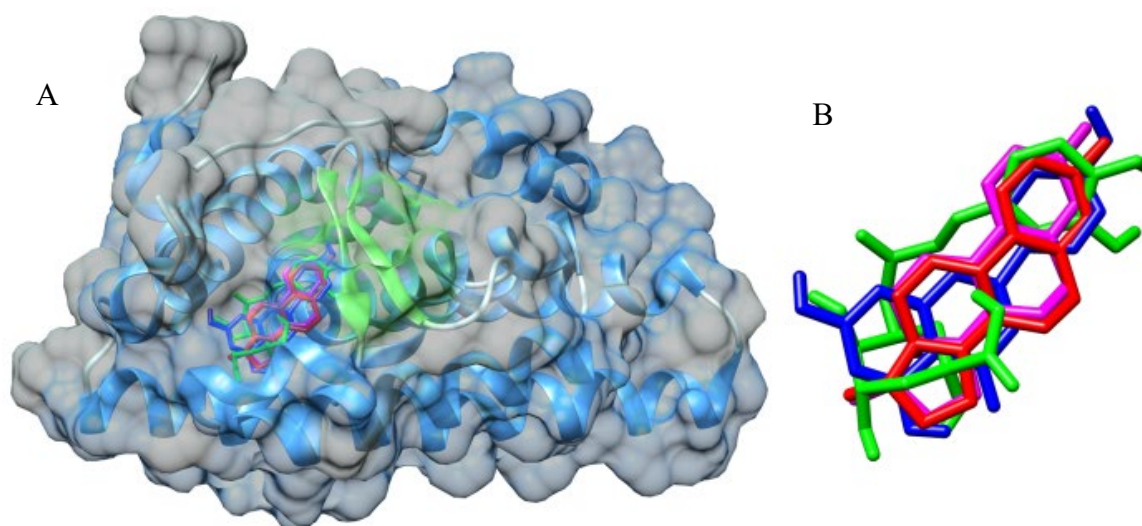


Figura 21. Representação do ER β humano interagindo com os ligantes da fração de *Morus nigra*. (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.

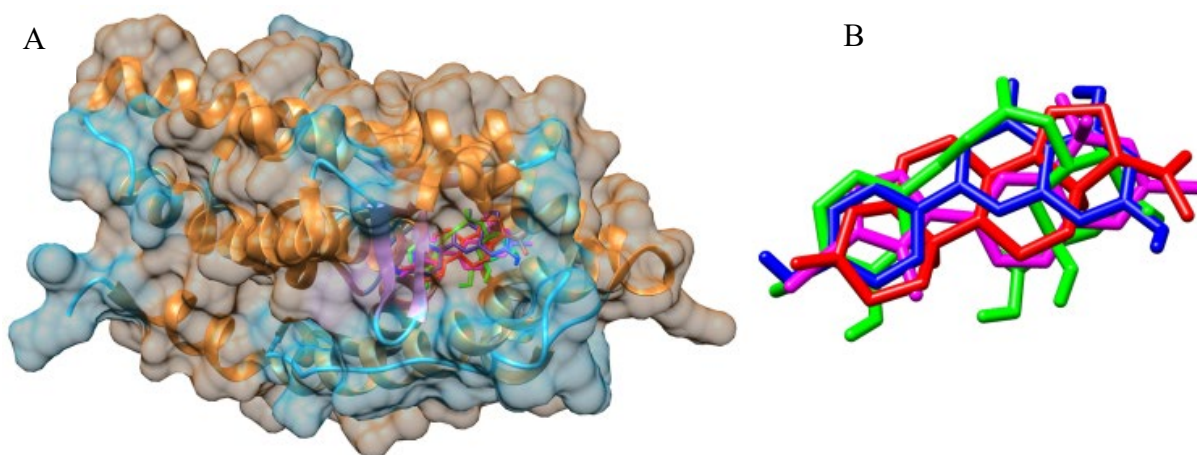


Figura 22. Representação do PR humano interagindo com os ligantes da fração de *Morus nigra*. (A); Ampliação da conformação dos ligantes obtida por docking molecular (B) Apigenina – azul; Ácido Isoclorogênico – verde; estradiol (redocking) – vermelho; estradiol (estrutura cristal) – magenta.

Este núcleo hidrofóbico é complexado aos modelos dos metabólitos de forma similar ao estradiol. Salum, 2007 atribuí as variações conformacionais dos receptores com seus diferentes ligantes capaz de produzir diversas respostas biológicas. Ao adquirir conformação específica que possibilita a transcrição dos genes-alvo nos tecidos pode-se dizer que o ligante atuou como agonista do receptor.

5.4 Ensaios *in vivo*

5.4.1 Efeito do tratamento com frações de *Morus nigra* em relação ao peso corporal total

Os animais falso-operados (SHAM) não aumentaram seu peso corporal. Como esperado, a ovariectomia (OVX) promoveu um importante aumento na massa corporal em comparação aos animais SHAM, com significância estatística quando comparados ao grupo SHAM. O tratamento com estroprogestativos reduziu ligeiramente o peso corporal em relação aos animais tratados com salina. Este efeito de redução do peso assumiu significância estatística nos grupos tratados com as frações acetato (ACET) e aquosa (FAQ) de *M. nigra* (Figura 23).

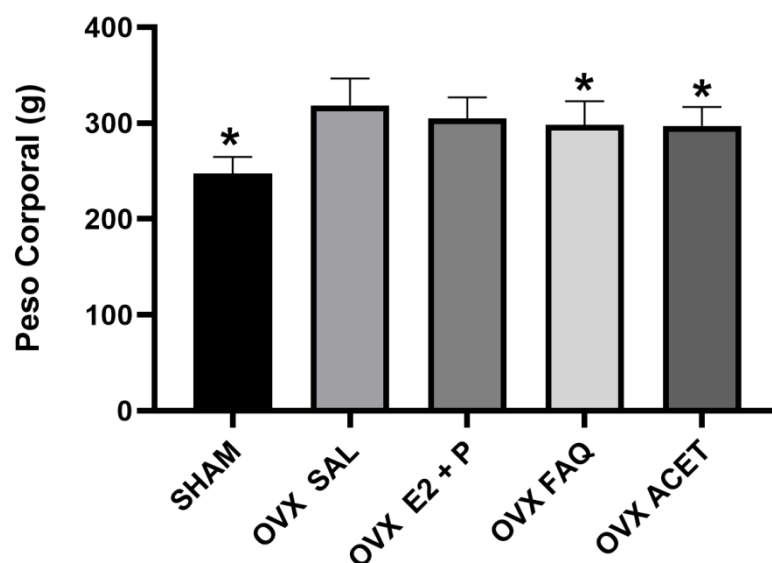


Figura 23. . Peso corporal de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

5.4.2 Efeito do tratamento com frações de *Morus nigra* sobre o peso do tecido adiposo e do útero

Os animais submetidos a ovariectomia (OVX SAL) apresentaram peso de tecido adiposo significativamente aumentado em comparação ao grupo SHAM (Figura 24). O tratamento com estroprogestativo e com a fração acetato reduziu significativamente o peso do tecido adiposo. O tratamento com a fração aquosa tende a reduzir o peso do tecido adiposo mas não atingiu significância estatística.

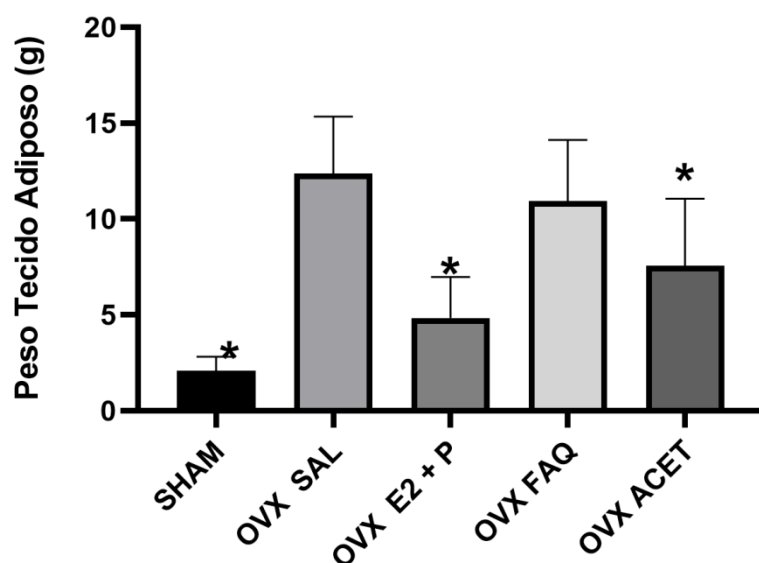


Figura 24. Peso do tecido adiposo de ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

Em relação ao peso do útero, verificou-se que a ovariectomia induziu a diminuição significativa do peso deste órgão (Figura 25). O tratamento com estroprogestativo permitiu recuperar o peso uterino enquanto o tratamento com as frações não afetaram o peso deste órgão.

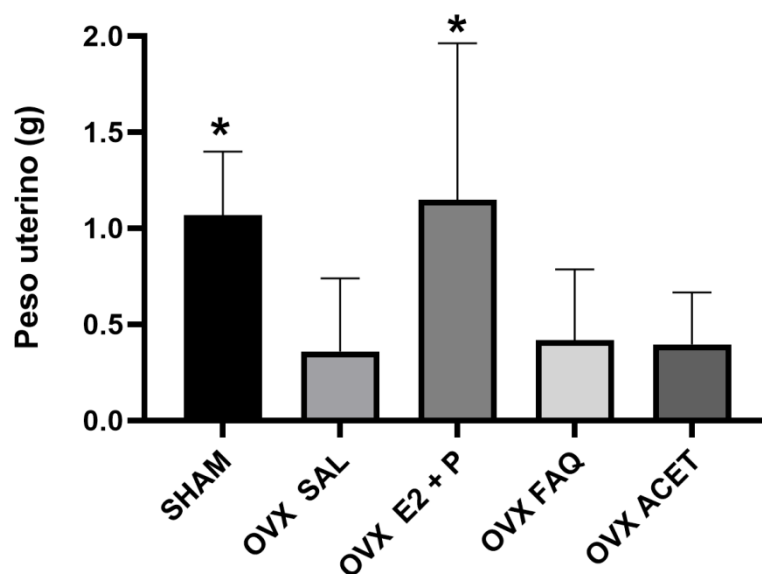


Figura 25. Peso do útero de ratas Wista do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

5.4.3 Efeito do tratamento com frações de *Morus nigra* sobre a concentração plasmática de cálcio e magnésio

Os níveis séricos de cálcio dos animais submetidos a ovariectomia (OVX SAL) baixaram significativamente em relação ao grupo SHAM (Figura 26). Os animais tratados com a fração acetato apresentam valores ainda menores, significativamente mais baixos que o grupo OVX SAL.

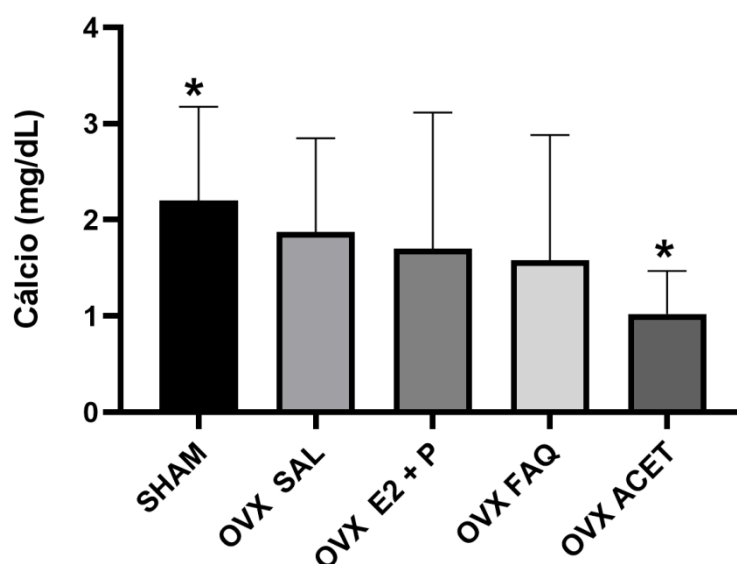


Figura 26. Concentração sérica de cálcio em ratos Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

Os níveis séricos de magnésio dos animais submetidos aos tratamentos propostos no presente estudo não apresentaram diferença estatística significativa (Figura 27).

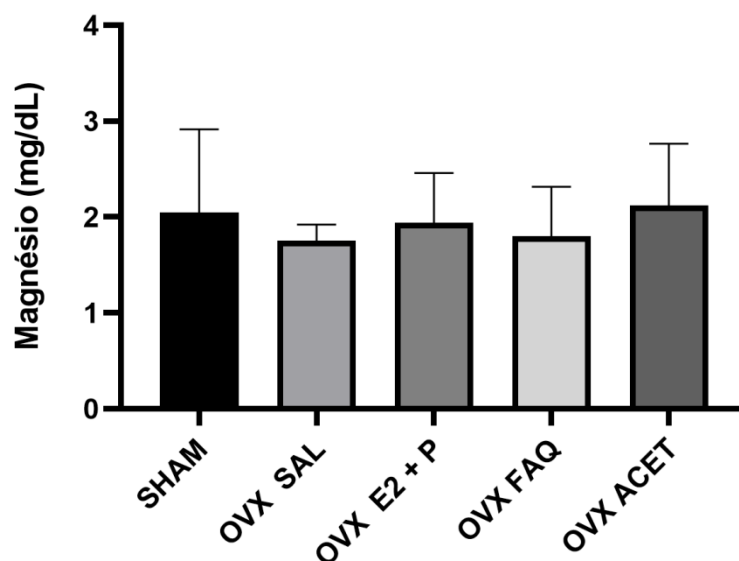


Figura 27. Concentração sérica de magnésio em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

5.4.4 Efeito do tratamento com frações de *Morus nigra* sobre a concentração plasmática de colesterol e triglicérides

Os níveis séricos de triglicéridos aumentaram significativamente nos animais ovariectomizados (OVX SAL) em relação ao grupo SHAM e o tratamento com estroprogestativos não reduziu este efeito típico da menopausa (Figura 28). O tratamento com as duas frações reduziu significativamente os níveis de triglicéridos para níveis próximos do grupo SHAM.

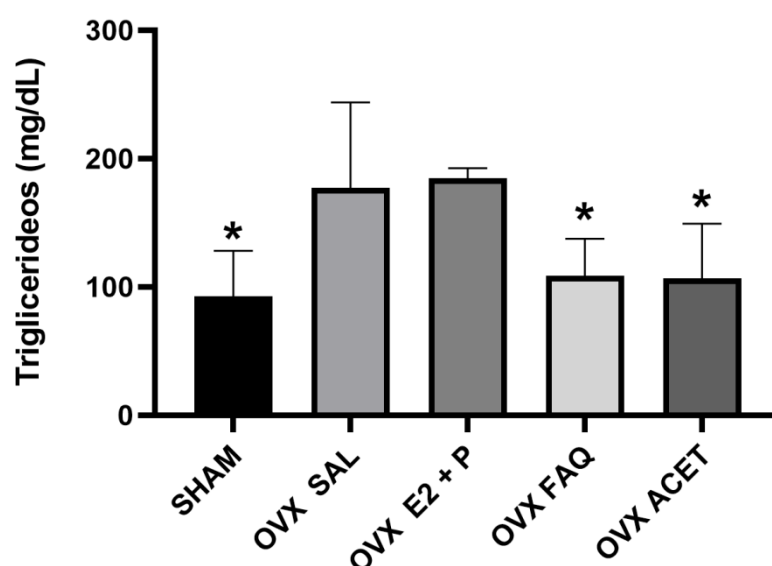


Figura 28. Concentração sérica de triglicéridos em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

Os níveis de colesterol total aumentaram significativamente nos animais OVX SAL em relação ao grupo SHAM. A fração aquosa não alterou significativamente este efeito (Figura 29), mas a fração acetato reduziu significativamente o colesterol total em relação ao grupo OVX SAL.

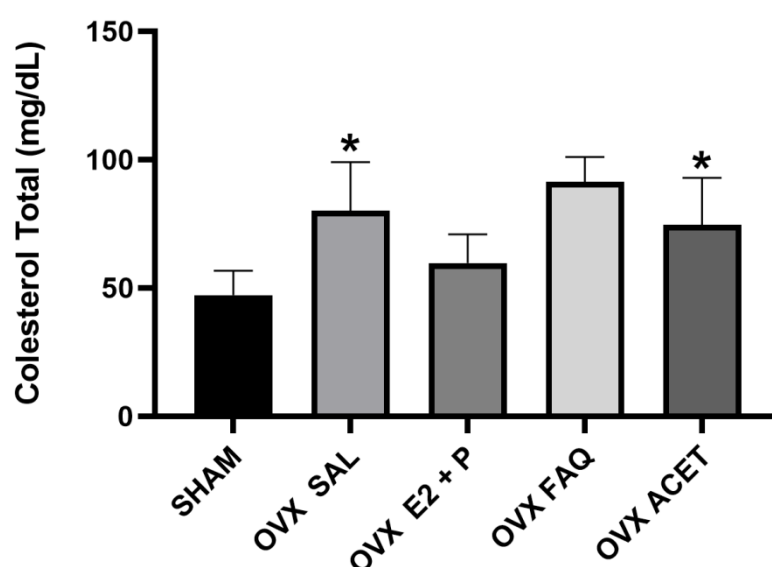


Figura 29. Concentração sérica de colesterol total em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

Os níveis de colesterol HDL (lipoproteína de alta densidade) aumentaram significativamente nos animais OVX SAL em relação ao grupo SHAM. A fração aquosa não alterou significativamente este efeito (Figura 30) mas a fração acetato reduziu o colesterol HDL.

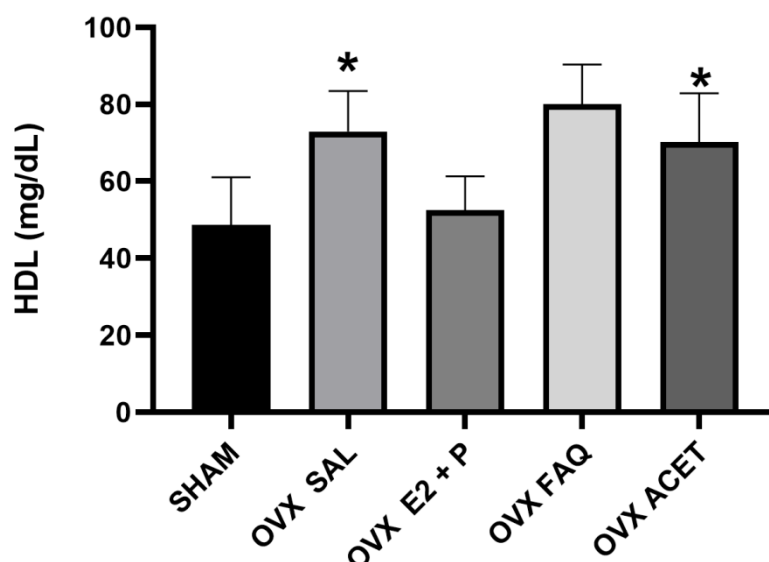


Figura 30. Concentração sérica de colesterol HDL em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

5.4.5 Efeito do tratamento com frações de *Morus nigra* sobre a concentração plasmática de albumina

Os níveis de séricos de albumina não variaram em função da ovariectomia, mas reduziram-se significativamente nos animais tratados com as duas frações em relação ao grupo OVX SAL (Figura 31).

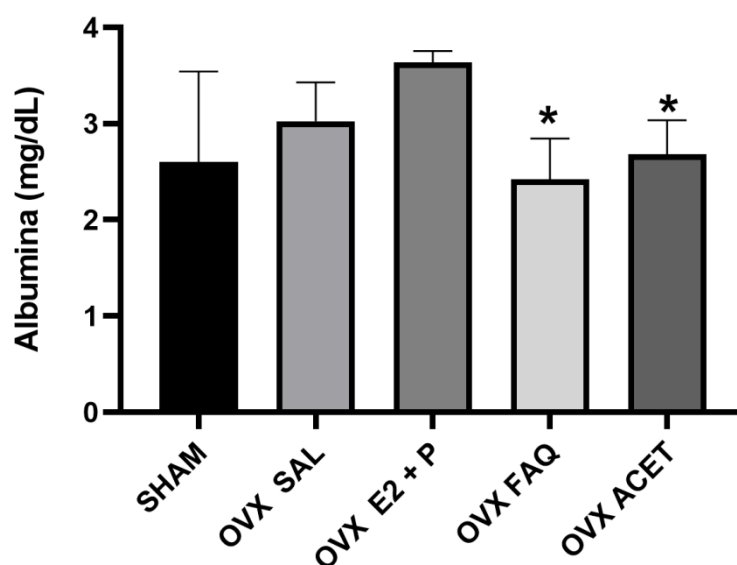


Figura 31. Concentração sérica de albumina em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e colunas e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

5.4.6 Efeito do tratamento com com frações de *Morus nigra* sobre a concentração plasmática de ácido úrico

Os níveis de séricos de ácido úrico aumentaram significativamente em função da ovariectomia, e reduziram-se significativamente nos animais tratados com as duas frações em relação ao grupo SHAM (Figura 32).

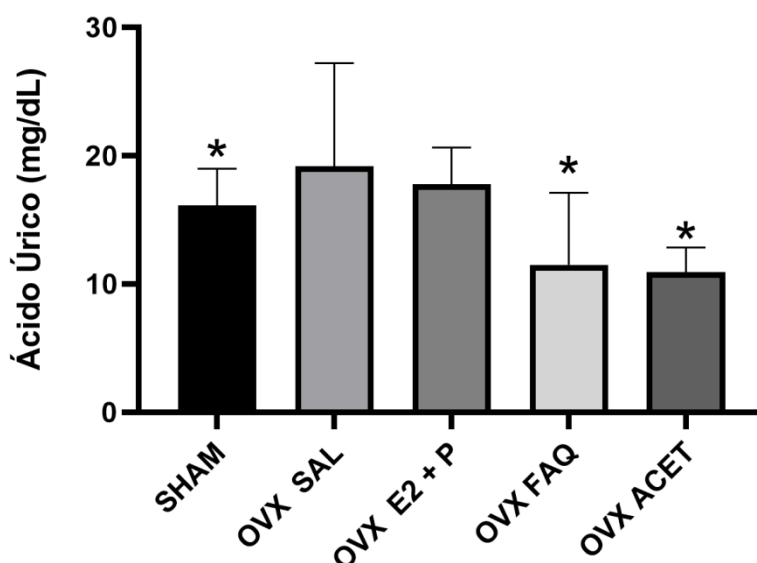


Figura 32. Concentração sérica de ácido úrico em ratas Wistar do grupo Falso-operado (SHAM) que receberam solução NaCl 0,9%; ovariectomizadas (OVX SAL) que receberam NaCl 0,9%; ovariectomizadas tratadas estroprogestativo (OVX E2 + P), ovariectomizadas tratadas com fração aquosa (OVX FAQ) e com fração acetato (OVX ACET). Cada linha e símbolo e barras verticais respectivamente, representam a média $\pm$ erro padrão das médias ($n=5$).

Neste presente estudo, foi investigado o efeito do tratamento das frações aquosa e acetato do extrato hidroalcoólico da *Morus nigra* L. em animais com menopausa. Inicialmente, verificamos que os animais com ovários preservados apresentaram uma redução de peso corporal, enquanto animais na menopausa aumentaram de peso. Quando estes animais foram tratados com ambas as frações, observou-se uma redução no peso corporal induzida pela menopausa, o que correlaciona com peso do tecido adiposo total dos animais, aonde foi verificada uma redução na formação de tecido adiposo de animais tratados com ambas as frações, porém, com maior redução na fração acetato. Estes resultados sugerem que a fração acetato apresenta potencial antiadipogênico.

Em linha com estes resultados, o tratamento do extrato da *Morus nigra* L. em suínos também demonstrou a redução do tamanho de adipócitos (FAN *et al.*, 2020). Segundo Larco *et al.*, (2012) a ovariectomia em animais funciona como modelo para estudo de obesidade e menopausa, ao induzir o aumento de peso. Os mesmos autores relatam que ratas OVX apresentam maior consumo de ração, devido a deficiência estrogênica após a ovariectomia por falta de estimulação estrogênica. Diante disso, há menor ação do estrogênio sobre o controle do consumo de alimentos pelo hipotálamo, com maior acúmulo de tecido adiposo.

No que diz respeito ao peso uterino, nenhuma das frações parece exercer efeito estrogênico nesse tecido, quando comparado com o grupo controle tratado com estrogênio, que aumentou o peso do útero. O efeito da terapia de reposição hormonal para mulheres que entram

na menopausa porém possuem útero é à base unicamente do uso de estrogênio. Devido a isso, qualquer tratamento a ser buscado se espelha na fórmula estrutural dos estrogênios para exercer efeitos benéficos e reduzir seus efeitos colaterais.

No que diz respeito à investigação quanto à função óssea, avaliamos os níveis no sangue de cálcio e magnésio. Wang *et al.*, (2005) enfatizam a importância da terapia de reposição hormonal para obter ligação aos receptores de estrogênios nas células ósseas e inibir a absorção óssea, aumentar a densidade óssea e reduzir o risco de fratura vertebral.

No presente estudo, o cálcio permanece dentro dos valores normais nos animais com ovários preservados, mas quando o retiramos, observamos uma redução. Já o tratamento com a fração aquosa aumentou os níveis de cálcio, mas não a fração acetato. Entretanto, nenhuma das frações exerceu efeito nos níveis de magnésio. Estes resultados são pouco conclusivos relativamente à capacidade das frações estudadas para prevenir a osteoporose associada à menopausa, sendo necessários estudos adicionais. Nosso próximo passo, foi avaliar a função hepática, através da dosagem de albumina sérica, a qual estava fisiologicamente reduzida no grupo de animais que não estavam na menopausa e elevada no grupo de animais menopausados. Entretanto, os animais tratados com as frações reduziram os níveis de albumina. O mesmo comportamento pode ser evidenciado nos níveis plasmáticos do ácido úrico que avaliam a função renal.

Por último, foram avaliados alguns parâmetros relacionados à função cardiovascular e lipídica, com as dosagens de triglicerídeos, colesterol total e HDL. (PEDERSEN *et al.*, 1996), refere que os hormônios sexuais estão associados com o perfil lipídico das mulheres durante e após a menopausa. O acúmulo de gordura visceral está relacionado a maior concentração sérica de triglicéridos e menor concentração de colesterol HDL em mulheres pré e pós-menopausa. O nível elevado do colesterol associado a lipoproteína de baixa densidade (LDL) é o principal fator de risco cardiometabólico após a menopausa, enquanto o HDL tem um papel protetor. Nas três dosagens realizadas no presente estudo, o perfil lipídico dos grupos controle com ovários preservados, se encontravam reduzidos, diferente dos animais na menopausa que se encontravam elevados. Já os animais ovariectomizados tratados com a fração acetato apresentaram uma redução nos níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL. Além disso, a fração aquosa também auxiliou na redução dos níveis de triglicerídeos. Estes resultados estão de acordo com a redução também observada no peso do tecido adiposo, reforçando o papel antiadipogênico das frações estudadas.

6. CONCLUSÕES

- ✓ Os resultados obtidos neste trabalho fornecem dados importantes sobre o estudo de fitoquímicos presentes em folhas de *Morus nigra* e corrobora com as descobertas relatadas na literatura acerca da espécie.
- ✓ A Apigenina e o Ácido 3-*O*-cafeoilquínico se destacam nos ensaios *in silico*. Partindo do princípio de que tanto uma aglicona quanto um ácido fenólico tiveram resultados notáveis, é levantada a hipótese de que a formulação de rica em ambos possa ser mais biologicamente ativa que suas partições. Nesse caso o extrato bruto seria o candidato mais viável.
- ✓ Os ensaios *in vivo* evidenciam que frações de amora possuem potencial antiadipogênico. A fração acetato de etila reduziu os níveis de triglicerídeos, colesterol total e HDL enquanto a fração aquosa auxiliou na redução dos níveis de triglicerídeos. O tratamento com a fração aquosa aumentou os níveis de cálcio, já o tratamento com a fração acetato não expressou essa alteração. Nenhuma das frações exerceram efeito nos níveis de magnésio, mas esses resultados são pouco conclusivos à capacidade das frações estudadas para prevenir a osteoporose associada à menopausa, sendo necessários estudos adicionais. Nenhuma das frações apresentou efeitos quanto ao peso uterino dos animais.
- ✓ Tendo em vista as mudanças apresentadas pelos animais tratados com ambas as frações, animais tratados com fração acetato se sobressaíram nos testes, sendo assim proposto que uma fração rica em flavonoides tenha melhores resultados no controle dos sintomas da menopausa. Essa conclusão, entretanto, não descarta a hipótese formulada através dos ensaios *in silico*, tendo em vista que animais tratados com fração aquosa também apresentou resultados, porém não tão expressivos quanto a fração acetato.
- ✓ Este estudo fornece dados complementares a literatura, sendo a espécie *Morus nigra* diversamente estudada, porém poucos trabalhos com ênfase em química visam desvendar a complexa bioquímica envolvida nos principais metabólitos da espécie e seus efeitos na menopausa.

REFERÊNCIAS

ALJANE F, SDIRI N. *Morphological, Phytochemical and Antioxidant Characteristics of White (Morus Alba L.), Red (Morus rubra L.) and Black (Morus nigra L.) Mulberry Fruits Grown in Arid Regions of Tunisia*. *Journal of new sciences, Agriculture and Biotechnology*, v. 35, n. 4, p. 1940-1947, 2016.

ATMACA, A.; KLEEREKOPER, M.; BAYRAKTAR, M.; KUCUK, O. *Soy isoflavones in the management of postmenopausal osteoporosis*. *The Journal of The North American Menopause Society*, v. 15, p. 748-757, 2008.

ACHÉ, Laboratórios Farmacêuticos S.A. **Soyfemme confirma alívio aos sintomas do climatério**. <https://www.ache.com.br/noticias/soyfemme-confirma-alivio-aos-sintomas-do-climaterio/>. Acesso em 16/01/2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações Programáticas Estratégicas. **Manual de atenção a mulher no climatério / menopausa**. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 192p.

CALADO, G. P.; LOPES, A. J. O.; JUNIOR, L. M. C.; DAS CHAGAS A. LIMA, F.; SILVA, L. A.; PEREIRA, W. S.; DO AMARAL, F. M. M.; GARCIA, J. B. S.; DO SOCORRO DE S. CARTÁGENES, M.; NASCIMENTO, F. R. F. *Chenopodium ambrosioides L. Reduces synovial inflammation and pain in experimental osteoarthritis*. PLoS ONE, v. 10, n. 11, p. 5–6, 2015.

CARVALHO, H. V. M. **As evidências dos benefícios do consumo das isoflavonas da soja na saúde da mulher: Revisão de Literatura**. *Cient Ciênc Biológ da Saúde*, v. 16, n. 4, p. 353-359, 2014.

CARWILE, J. L.; WILLETT, W. C.; MICHELS, K. B. *Consumption of Low-Fat Dairy Products May Delay Natural Menopause*. *The Journal of Nutrition*, v. 143, p. 1642-1650, 2013.

CASTRO, A. S. **Efeitos de *Morus nigra* L. (amoreira negra) sobre a resposta inflamatória e modulação de neutrófilos: estudos *in vivo* e *in vitro*.** 126 f. Tese (Doutorado). Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2016.

DANCIU, C. *et al. New Insights Regarding the Potential Health Benefits of Isoflavones.* 2017.

DENNINGTON, R.; KEITH, T. A.; AND; MILLAM, J. M. *GaussView5 Shawnee Mission, KSSemichem Inc.*, 2016.

D.O. LARCO, D.F. CRUTHIRDS, M.J. WEISER, R.J. HANDA, Wu TJ. *The effect of chronic immobilization stress on leptin signaling in the ovariectomized (OVX) rat.* *Endocrine*; 42, 717–725. 2012

EL-BAZ, F. K.; HASSAN, A. Z.; ABD-ALLA, H. I.; ALY, H. F.; MAHMOUD, K. *Phytochemical Analysis, Assessment of Antiproliferative and Free Radical Scavenging Activity of Morus Alba and Morus Rubra Fruits.* *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* v. 10, 2017.

ELMACI, Y.; ALTUĞ, 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.* p. 632-635, 2002

EMNIYET, A. A.; AVCI, E.; OZCELIK, B.; AVCI, G. A.; KOSE, D. A. *Antioxidant and Antimicrobial Activities with GC/MS Analysis of the Morus alba L. Leaves.* *Hittite Journal of Science and Engineering*, v. 1, n. 1, p. 37-41, 2014

FARIA, A. C. P.; OLIVEIRA, F. Q. **Fitoestrogênios como alternativa na terapia de reposição hormonal no climatério.** *Revista Brasileira de Ciências da Vida*, [S.l.], v. 5, n. 1, 2017.

FISCHER, M.; REGITZ, C.; KAHL, M.; WERTHEBACH, M.; BOLL M.; WENZEL, U. *Phytoestrogens genistein and daidzein affect immunity in the nematode *Caenorhabditis**

elegans via alterations of vitellogenin expression. Molecular Nutrition & Food Research. v. 56, p. 957-965, 2012.

FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; LI, X.; CARICATO, M.; MARENICH, A.; BLOINO, J.; JANESKO, B. G.; *et al.* **Gaussian 09.** Wallingford CT Gaussian, Inc., 2016.

KHAODHIAR, L.; RICCIOTTI, H. A.; LI, L.; PAN, W.; SCHICKEL, M.; ZHOU, J. BLACKBURN, G. L. *Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. Menopause.* v. 15, n. 1, p. 125-32, New York, 2008

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S.H; SAAG, P. T. V. D.; BURG, B. V. D.; GUSTAFSSON, J. A. *Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor β .* *Endocrinology*, v. 139, p. 4252-4263. 1998.

LAZARI, M. F. M.; LUCAS, T. F. G.; YASUHARA, F.; GOMES, G. R. O.; SIU, E. R.; ROYER, C.; FERNANDES, S. A. F.; PORTO, C. S. *Estrogen receptors and function in the male reproductive system.* *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 53, n. 8, p. 923-933. São Paulo, 2009.

LIVINALLI, A.; LOPES, L. C. *Avaliação das prescrições de isoflavonas para mulheres no climatério em cidade de médio porte do Estado de São Paulo.* *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n. 2, p.185-191, 2007.

LOPES, A. J. O. *Atividade Anti-Inflamatória E Antinociceptiva Do Pólen Coletado Por Abelhas Sem Ferrão: estudos in silico, in vitro e in vivo.* 109 f. Tese (Doutorado). – Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2020.

LOPES, A. J. O.; VASCONCELOS, C. C.; PEREIRA, F. A. N.; SILVA, R. H. M.; QUEIROZ, P. F. DOS S.; FERNANDES, C. V.; GARCIA, J. B. S.; RAMOS, R. M.; ROCHA, C. Q. DA; LIMA, S. T. DE J. R. M.; CARTÁGENES, M. DO S. DE S.; RIBEIRO, M. N. DE S. *Anti-*

Inflammatory and Antinociceptive Activity of Pollen Extract Collected by Stingless Bee *Melipona fasciculata*. International Journal of Molecular Sciences, v. 20, n. 18, 2019.

LOPES, A. J. O.; VASCONCELOS, C. C.; GARCIA, J. B. S.; DÓRIA PINHEIRO, M. S.; PEREIRA, F. A. N.; CAMELO, D. DE S.; MORAIS, S. V. DE; FREITAS, J. R. B.; ROCHA, C. Q. DA; DE SOUSA RIBEIRO, M. N.; DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES, M. ***Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity of Pollen Extract Collected by *Scaptotrigona affinis postica*: in silico, in vitro, and in vivo Studies. Antioxidants*** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 2, 24 jan. 2020.

MATOS, C. E. **Diretrizes e boas práticas para aplicação e validação de modelos *in silico* no Brasil com fins regulatórios.** Intertox. <
https://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/29206/5287799_410075.pdf>. 2015

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. ***Measurement of Food Flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. Journal of Agricultural and Food Chemistry***, 48(3), 2000.

MILJKOVIC, V.; NIKOLIC, L.; RADULOVIĆ, N.; ARSIC, B.; NIKOLIĆ, G.; KOSTIC, D.; BOJANIC, Z.; ZVEZDANOVIĆ, J. ***Flavonoids in mulberry fruit. Identification of nonanthocyanin phenolics in some mulberry fruit species (*Morus alba L.*, *Morus rubra L.* and *Morus nigra L.*). Agro Food Industry Hi Tech***, v. 26, p. 38-42. 2015.

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

MORRIS, G. M.; GOODSELL, D. S.; HALLIDAY, R. S.; HUEY, R.; HART, W. E.; BELEW, R. K.; OLSON, A. J. ***Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. Journal of Computational Chemistry***, v. 19, n. 14, p. 1639–1662, 1998.

MORRIS, G. M.; RUTH, H.; LINDSTROM, W.; SANNER, M. F.; BELEW, R. K.; GOODSELL, D. S.; OLSON, A. J. ***Software news and updates AutoDock4 and***

AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

NASTIĆ, N.; LINARES, I. B.; SÁNCHEZ J. L. ; GAJIĆ, J. S.; CARRETERO, A. S.

Optimization of the extraction of phytochemicals from black mulberry (*Morus nigra* L.) leaves. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, v. 68, p. 282-292. 2018.

O. TROTT, A. J. OLSON, **AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization and multithreading,** *Journal of Computational Chemistry* 31 (2010) 455-461

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

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

PARDINI, D. **Terapia de reposição hormonal na menopausa.** *Arq Bras Endocrinol Metab.* v. 58, n. 2. 2014.

PAWLOWSKA, A.M.; OLESZEK, W; BRACA, A. **Quali-quantitative analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) fruits.** *J Agric Food Chem.* v. 56(9), p. 3377-3380. 2008.

PEDERSEN S.B, FUGLSIG S., SJØGREN P., RICHELSEN B. **Identification of steroid receptors in human adipose tissue,** *Eur. J. Clin. Invest.* v. 26, p. 1051-1056. 1996

PETTERSEN, E. F.; GODDARD, T. D.; HUANG, C. C.; COUCH, G. S.; GREENBLATT, D. M.; MENG, E. C.; FERRIN, T. E. UCSF Chimera?A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.

PRISTA, L. N. *et al.* **Tecnologia farmacêutica**. Fundação Calouste-Goubenkian, 1995.

SALUM, L. B. **Estudos *in silico* no planejamento de candidatos a novos fármacos na terapia do câncer de mama e de reposição hormonal**. 140 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos, 2007.

SILVA, S. N. **Atividade Fitoestrogênica de *Morus Nigra* L, Moraceae, em ratas ovariectomizadas**. 126 f. Tese (Doutorado) – Ponto Focal Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2012.

Sociedade Brasileira de Climatério (SOBRAC). **Consenso brasileiro multidisciplinar de assistência à mulher climatérica**. São Paulo: SOBRAC; 2003.

SOUTO, I. S. **Estudo teórico da atividade anti-inflamatória de *Morus nigra* L**. 38 f. Tese (Doutorado) – UnB. Brasília, 2018.

STIERAND, K.; RAREY, M. ***PoseView - molecular interaction patterns at a glance***. *Journal of Cheminformatics*. 2, p.50. 2010.

SUASSUNA, L. V. **Uso da amoreira-preta (*Morus nigra* L.) como coadjuvante no tratamento de transtornos da menopausa**. Monografia (Graduação) – UEPB. Campina Grande, 2011.

TALLINI, L. R.; PEDRAZZA, G. P. R.; BORDIGNON, S. A. L.; COSTA, A. C. O.; STEPPE, M.; FUENTEFRIA, A.; ZUANAZZI, J. A. S. ***Analysis of flavonoids in Rubus erythrocladus and Morus nigra leaves extracts by liquid chromatography and capillary electrophoresis***. *Rev. bras. farmacogn.*, Curitiba, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2015.

TOSHIO F, KIYOSHI K, SUMIO T, 2005. ***Antimicrobial activity of 2-arylbenzofurans from Morus species against methicillin-resistant Staphylococcus aureus***. *Fitoterapia* n. 76, p. 708-711. 2005.

VALLE, M. ***In silico*** – uma alternativa viável aos experimentos in vivo?. Blog da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. (Online). 2009.

WANG H, KEISER JA. *Vascular endothelial growth factor upregulates the expression of matrix metalloproteinases in vascular smooth muscle cells: role of flt-1*. *Circ Res*. 83:832–884. 1998.

WANNMACHER, L; Lubianca, J. N. **Terapia de reposição hormonal na menopausa: evidências atuais**. *Uso Racional de Medicamentos: Temas Seleccionados*. v. 1, n.6, p. 1-6. 2004.