

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Kássia Caroline Figueiredo

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E  
COMPORTAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Morus nigra*  
Linnaeus FRENTE À SOBRECARGA DE FERRO**

Santa Maria, RS  
2017

**Kássia Caroline Figueiredo**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E  
COMPORTAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* Linnaeus  
FRENTE À SOBRECARGA DE FERRO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Liliane de Freitas Bauermann  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Gilberti Helena Hübscher Lopes

Santa Maria, RS  
2017

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Figueredo, Kássia Caroline

AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E  
COMPORTAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Morus nigra*  
*Linnaeus* FRENTE À SOBRECARGA DE FERRO / Kássia Caroline  
Figueredo.- 2017.

94 p.; 30 cm

Orientadora: Liliane de Freitas Bauermann

Coorientadora: Gilberti Helena Hübscher Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2017

1. Moraceae 2. Folhas 3. Toxicidade 4. Hepcidina 5.  
Citocinas I. Bauermann, Liliane de Freitas II. Lopes,  
Gilberti Helena Hübscher III. Título.

**Kássia Caroline Figueiredo**

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E  
COMPORTAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* Linnaeus  
FRENTE À SOBRECARGA DE FERRO**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

**Aprovada em 28 de julho de 2017:**

---

**Liliane de Freitas Bauermann, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

---

**Gilberti Helena Hübscher Lopes, Dr<sup>a</sup> (UFSM)**  
(Coorientadora)

---

**Gabriela Trevisan dos Santos, PhD (UFSM)**

---

**Michele Rorato Sagrillo, Dr<sup>a</sup> (UNIFRA)**

Santa Maria, RS  
2017

## **DEDICATÓRIA**

*A minha família, pelo apoio incondicional em todos os momentos,  
principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos  
caminhos.*

*Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, minha eterna gratidão pela oportunidade da vida, de poder aprender e evoluir como ser humano.

A minha mãe Neusa, que como uma boa mãe, não mede esforços para que eu alcance meus objetivos.

Ao meu pai do coração Lori, que mesmo sem a responsabilidade, cumpre o papel de me amar e me apoiar.

Ao meu amor Rodrigo, pela compreensão com minha ausência, apoio, amor e por caminhar sempre ao meu lado.

A minha orientadora Liliane, por ser muito mais que orientadora, nossa segunda mãe, pela generosidade e amor pela educação, obrigada pela oportunidade, humanidade e carinho de sempre.

Coorientadora Gilberti, obrigada pelo conhecimento adquirido, apoio e amizade.

A equipe LaFEx pelos momentos de aprendizado, pelo companheirismo nos momentos alegres e difíceis que atravessamos.

Fernanda, Gabi e Andreia, companheiras de laboratório, pela amizade e companheirismo durante estes dois anos.

A minha companheira de vários momentos vividos durante o mestrado, Camille, (que merecia mais do que um parágrafo), pelo apoio, colaboração e amizade cultivada nestes anos, se tornando meu braço direito nesta caminhada.

As minhas amigas Gabi, Ingrid e Patrícia, que me mostraram que amizade é torcer pelo outro, independente da distância e da convivência diária.

Ao meu gato Morus que nasceu junto com este desafio e se mostrou a companhia mais doce que eu poderia ter.

O meu respeito aos animais que contribuíram para a realização deste trabalho.

*“A vida não é tão simples,  
viver não é só sorrir,  
a lagarta que rasteja,  
rasteja pra evoluir,  
se transforma em borboleta,  
depois voa por aí.”*

(Bráulio Bessa)



(Armandinho)

## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO, TOXICIDADE E COMPORTAMENTO DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *Morus nigra* Linnaeus FRENTE À SOBRECARGA DE FERRO

AUTORA: Kássia Caroline Figueiredo

ORIENTADORA: Liliane de Freitas Bauermann

COORIENTADORA: Gilberti Helena Hübscher Lopes

*Morus nigra* é uma planta conhecida popularmente como “amoreira preta”. É utilizada na medicina popular para suavizar efeitos da menopausa, como anti-inflamatório, antidiabético e antihipertensivo. Porém informações relativas a doses e uso seguro ainda são precárias. A sobrecarga de ferro é um quadro clínico que ocasiona danos no tecido hepático devido ao estresse oxidativo. A terapia para controle da sobrecarga de ferro ainda é insatisfatória. O objetivo do estudo foi realizar estudo fitoquímico, toxicológico e avaliação do efeito na sobrecarga de ferro do extrato das folhas de *M. nigra* (EEMN). O perfil cromatográfico revelou ácido cafeico e queracetina como compostos marjoritários no EEMN. No estudo toxicológico agudo (2000 mg/kg) e subagudo, o extrato foi administrado via oral. Para subagudo, testou-se o EEMN em ratos machos e fêmeas, nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg, durante 28 dias. Mudanças comportamentais, teste de reconhecimento de objetos, avaliações de tecido renal e hepático, dosagens bioquímicas e hematológicas foram determinadas. No tratamento agudo o EEMN foi classificado como seguro. No estudo subagudo ocorreu diminuição da atividade da AST em machos (750 e 1000 mg/kg) e fêmeas (1000 mg/kg), redução do colesterol total em fêmeas (750 e 1000 mg/kg), aumento da atividade da CAT renal e hepática sem alterar os níveis de LPO. O EEMN apresentou ação potencialmente protetora de órgãos e possui suposta atividade hipocolesterolêmica. Para avaliação da sobrecarga de ferro, foram utilizados ratos Wistar machos, divididos em 6 grupos. Para induzir sobrecarga de ferro, os grupos induzidos receberam ferro dextran (50 mg/kg/dia) e não sobrecarregados receberam solução salina 0,9%, ambos intraperitoneal (i.p.). Para testar tratamento, etanol 53% foi usado como veículo. Os grupos foram divididos da seguinte forma: I (CG): Veículo; II (IOV): Sobrecarregado + veículo; III (NO500): Não sobrecarregado + EEMN 500 mg/kg; IV (IO500): Sobrecarregado + EEMN 500 mg/kg; V (IO1000): Sobrecarregado + EEMN 1000 mg/kg; VI (DFO): Sobrecarregado + Desferroxamina (10 mg/kg/dia). O veículo e EEMN foram administrados por gavagem oral, DFO foi administrado via i.p. Foram analisados, relação de peso corporal, índice hepatossomático, ferro sérico, marcadores hepáticos, citocinas, fatores interferentes no metabolismo do ferro, avaliações enzimáticas e histopatológicas. O modelo experimental utilizado mostrou aumento dos níveis de ferro sérico e hepcidina, da atividade da ALT e citocinas pró-inflamatórias, a histopatologia mostrou que a sobrecarga de ferro causa dano no tecido hepático. O tratamento com EEMN mostrou restaurar os níveis de ferro, hepcidina e citocinas, atenuando o dano no tecido hepático. Nossas descobertas ilustram uma nova ação terapêutica e economicamente viável das folhas de *M. nigra* na sobrecarga hepática de ferro, porém, os compostos existentes na planta responsáveis pela ação farmacológica ainda precisam ser elucidados.

**Palavras-chave:** Moraceae. Folhas. Toxicidade. *In vivo*. Hepcidina. Citocinas.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF THE PHYTOCHEMICAL PROFILE, TOXICITY AND PERFORMANCE OF THE EXTRACT OF *Morus nigra* Linnaeus LEAVES AGAINST IRON OVERLOAD

AUTHOR: Kássia Caroline Figueiredo  
ADVISOR: Liliane de Freitas Bauermann  
CO-ADVISOR: Gilberti Helena Hübscher Lopes

*Morus nigra* is a plant popularly known as "amoreira preta". It is used in folk medicine to soften the effects of menopause, such as anti-inflammatory, antidiabetic and antihypertensive. However, information on safe doses and use is still precarious. Iron overload is a clinical condition that causes damage to the liver tissue due to oxidative stress. Therapy to control iron overload is still unsatisfactory. The objective of the study was to perform a phytochemical, toxicological and evaluation of the effect on iron overload of the extract of the leaves of *M. nigra* (EEMN). The chromatographic profile revealed caffeic acid and quercetin as major compounds in the EEMN. In the acute toxicological study (2000 mg/kg) and subacute, the extract was administered by oral gavage. For subacute, EEMN was tested in male and female rats at doses of 500, 750 and 1000 mg/kg for 28 days. Behavioral changes, object recognition test, renal and hepatic tissue assessments, biochemical, and hematological were determined. In the acute treatment the EEMN was classified as safe. In the sub-acute study, there was a decrease in AST in males (750 and 1000 mg/kg) and females (1000 mg/kg), reduction of total cholesterol in females (750 and 1000 mg/kg), increase in renal and hepatic change the LPO levels. The EEMN presented potentially protective action of organs and supposed hypocholesterolemic activity. For evaluation of iron overload, male Wistar rats were divided into 6 groups. To induce iron overload, the induced groups received iron dextran (50 mg/kg/day) and not overloaded received 0.9% saline intraperitoneal (i.p.). To test treatment, ethanol 53% was used as vehicle. The groups were divided as follows: I (CG): Control group (ethanol 53% - 10 mL/kg); II (IOV): Iron overload + vehicle (ethanol 53% - 10 mL/kg); III (NO500): Non-overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); IV (IO500): Iron overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); V (IO1000): Iron overload + EEMN 1000 mg/kg (10 mL/kg); VI (DFO): Iron overload + DFO (10 mg/kg/day). The vehicle and EEMN were administered by oral gavage, DFO was administered via i.p. They were analyzed body weight, hepatosomatic index (HSI), serum iron, hepatic markers, cytokines, interfering factors in iron metabolism, enzymatic and histopathological evaluations. The experimental model showed increased levels of serum iron, hepcidin, ALT and proinflammatory cytokines (IOV), histopathology showed that iron overload causes damage to the liver tissue. Our findings illustrate a new therapeutic action and economically viable if the leaves of *M. nigra* in hepatic iron overload, however the compounds in the plant responsible for the pharmacological action still need to be elucidated.

**Keywords:** Moraceae. Leaves. Toxicity. *In vivo*. Hepcidin. Cytokines.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1 - <i>Morus nigra</i> ( amoreira preta) – Aspecto geral. Disponível em: <a href="https://jb.utad.pt/especie/morus_nigra">https://jb.utad.pt/especie/morus_nigra</a> .....	18
Figura 2 - Visão global do metabolismo do Fe.....	22
Figura 3 - Metodologia.....	29

### MANUSCRITO 1

Figure 1. Representative high performance liquid chromatography profile of EEMN detection UV was at 327 nm. Cyanidin ( $t_R = 6,03$ min; peak 1), catechin ( $t_R = 11,47$ min; peak 2), caffeic acid ( $t_R = 24,86$ min; peak 3), coumaric acid ( $t_R = 29,15$ min; peak 4), quercetin ( $t_R = 43,79$ min; peak 5) e kaempferol ( $t_R = 48,91$ min; peak 6).....	47
Figure 2. Effects of EEMN on Object Recognition Memory. The rats were exposed to two different objects (A e B) for 5 minutes in the training session. Twenty-four hours later a long-term memory test was performed: The animals were exposed to a familiar object (A) and a new object (C) for 5 minutes. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. of the percentage of operating time to a particular object in relation to the total operating time. A t-test was performed and later for comparison between groups, posterior one-way ANOVA followed by Tukey test (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when $p < 0.05$ . <u>a</u> = female and <u>b</u> = male.....	48

Figure 3. Effects of EEMN on hepatic tissue (A1, B1) and renal (A2, B2) of mice in a 28-day repeat dose oral toxicity study. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. One-way ANOVA variance test followed by Tukey test (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when $p < 0.05$ . Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Catalase activity (CAT). TBARS levels expressed in nmol MDA/mg protein. CAT activity expressed in U CAT/mg PTN. *Different from the control group.....	49
---	----

### MANUSCRITO 2

Figure 1. Effects of treatment with EEMN on assessment of body iron and hepatic markers in rats in iron overload. Levels of serum iron (A), serum hepcidin (B), alanine aminotransferase (ALT) (C), aspartate aminotransferase (AST) (D). Serum iron was expressed as umol/L, hepcidin as ng/mL, AST and ALT were expressed as U/L. Results are expressed as mean $\pm$ S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n = 5). The values were considered to be significantly different when $p < 0.05$ . * Different from the overload group.....	72
--	----

Figure 2. Effects of treatment with EEMN on the evaluation of cytokines and interfering factors in iron metabolism in rats in iron overload. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (E), Interleukin 6 (IL-6) (F), Interleukin 10 (IL-10) (G), Interferon gamma (INT- $\gamma$ ), (TNF- $\alpha$ ) (I). IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were expressed as pg/mL, INT- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as  $\mu$ g / mL. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n = 5). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . \* Different from the control..... 73

Figure 3. Effects of treatment with EEMN on the evaluation of LPO (J), Catalase (CAT) (K) and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activities ( $\delta$ -ALA-D) (L) in rats in iron overload. Levels of LPO expressed in nmol MDA/mg protein. CAT activity expressed in U CAT/mg ptn.  $\delta$ -ALA-D activity expressed in nmol PBG/mg ptn/hour. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's (n = 5). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . \* Different from the control..... 74

Figure 4. Effects of EEMN on histopathological changes of mouse liver stained with H&E. Representative microscopic photographs of liver stained with H&E (magnification 200). Groups: CG (M), IOV (N), NO500 (O), IO500 (P), IO1000 (Q) e DFO (R)..... 75

## LISTA DE TABELAS

### MANUSCRITO 1

<b>Table 1.</b> Components of the ethanolic extract of the leaves of <i>Morus nigra</i> L.....	50
<b>Table 2.</b> Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of <i>Morus nigra</i> L. leaves on biochemical parameters (serum analysis) of Wistar rats.....	51
<b>Table 3.</b> Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of <i>Morus nigra</i> L. leaves of leukocyte parameters (total and differential cell count) in Wistar rats.....	52
<b>Table 4.</b> Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of <i>Morus nigra</i> L. leaves of erythrocyte parameters and platelet levels in Wistar rats.....	53

### MANUSCRITO 2

<b>Table 1.</b> Effect of EEMN on body weight and hepatosomatic index in iron-overloaded rats.....	71
--	----

## LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

<b>ALT</b>	Alanina aminotransferase, do inglês <i>alanine aminotransferase</i>
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferase, do inglês <i>aspartate aminotransferase</i>
<b>ANOVA</b>	Análise de variância, do inglês <i>analysis of variance</i>
<b>Apo-Tf</b>	Apo-transferrina, do inglês <i>apo-transferrin</i>
<b>BC</b>	Bastonetes, do inglês <i>band cell</i>
<b>BRATS</b>	Boletim brasileiro de avaliação de tecnologias em saúde
<b>BUN</b>	Níveis de ureia, do inglês <i>blood urea nitrogen levels</i>
<b>CAT</b>	Catalase
<b>Chol</b>	Colesterol total
<b>CRE</b>	Creatinina
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose letal média
<b>DFO</b>	Desferroxamina
<b>DMT1</b>	Proteína transportadora de metal divalente, do inglês <i>Divalent Metal Transporter 1</i>
<b>EEMN</b>	Extrato etanólico de folhas de <i>Morus nigra</i>
<b>EROs/ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio, do inglês <i>reactive oxygen species</i>
<b>FDA</b>	Administração de Comidas e Remédios, do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
<b>Fe</b>	Ferro
<b>GLU</b>	Níveis de glicose no sangue, do inglês <i>blood sugar levels</i>
<b>GPx</b>	Glutatona peroxidase, do inglês <i>glutation peroxidase</i>
<b>GSH</b>	Glutation
<b>H&amp;E</b>	Eosina e hematoxilina, do inglês <i>hematoxylin and eosin</i>
<b>HBG</b>	Hemoglobina, do inglês <i>hemoglobin</i>
<b>HCT</b>	Hematócrito, do inglês <i>hematocrit</i>
<b>HO-1</b>	Heme oxigenase, do inglês <i>heme oxygenase</i>
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>INT-γ</b>	Interferon gamma
<b>IL-1β</b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>LIP</b>	Ferro livre intracitosólico
<b>MDA</b>	Malondialdeído
<b>MCV</b>	Volume corpuscular médio, do inglês <i>mean corpuscular volume</i>
<b>MCHC</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média, do inglês <i>mean corpuscular hemoglobin concentration</i>
<b>NTBI</b>	Ferro não ligado à transferrina, do inglês <i>non transferrin bound iron</i>
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxigênio
<b>OECD</b>	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento, do inglês <i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
<b>OH·</b>	Radical hidroxil
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>PBG</b>	Porfobilinogênio
<b>PL</b>	Peroxidação lipídica
<b>PLT</b>	Plaquetas, inglês <i>platelet</i>
<b>PPT</b>	Proteínas totais, do inglês <i>total protein</i>
<b>RBC</b>	Eritrócitos, do inglês <i>total red cell count</i>

<b>RDW</b>	Variação de tamanho de hemácias, do inglês <i>red blood cell amplitude</i>
<b>RENISUS</b>	Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS
<b>RLs</b>	Radicais livres
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>RSS</b>	Espécies reativas de enxofre
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>SUS</b>	Sistema Único de Saúde
<b>TBARS</b>	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>WBC</b>	Contagem total de leucócitos, do ingles <i>total white blood cell count</i>
<b><math>\delta</math>-ALA-D</b>	Delta-aminolevulínico-desidratase
<b><math>\beta</math>-TM</b>	Beta-talassemia Maior

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
1.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	15
<b>1.1.2 Estudo toxicológico de plantas medicinais.....</b>	16
<b>1.1.3 Descrição da família Moraceae e espécie <i>Morus nigra</i> L.....</b>	17
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE .....	19
1.3 PAPEL BIOLÓGICO DO FERRO .....	21
<b>1.3.1 Sobrecarga de Ferro .....</b>	23
<b>1.3.2 Terapia quelante .....</b>	25
<b>1.3.3 Compostos naturais na terapia quelante (fitoqueladores).....</b>	27
1.4 JUSTIFICATIVA.....	28
1.5 OBJETIVOS .....	28
<b>1.5.1 Objetivo geral.....</b>	29
<b>1.5.2 Objetivos específicos .....</b>	29
2 MANUSCRITOS .....	29
2.1 MANUSCRITO 1 - SAFETY ASSESSMENT OF <i>Morus nigra</i> L. LEAVES: ACUTE AND SUBACUTE ORAL TOXICITY STUDIES IN WISTAR RATS.....	30
2.2 MANUSCRITO 2 - <i>Morus nigra</i> LEAVES ATTENUATES HEPATOTOXICITY IN IRON OVERLOAD-INDUCED RATS .....	55
3 DISCUSSÃO .....	77
4 CONCLUSÕES .....	80
REFERÊNCIAS.....	82
ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UFSM .....	91
ANEXO B - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UFSM .....	92
ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO <i>Journal of Ethnopharmacology</i> .....	94

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso dos recursos naturais é uma prática histórica, percorrendo todo o processo evolutivo, tais experiências são relatadas em diversos registros históricos, entre eles estão as obras *Pen Ts'ao* (2.800 a.C.), o Papiro de Ebers (1.500 a.C.) e “Matéria Médica” (1.100 a.C.) (CASTRO, 1981). O Brasil é um país de grande diversidade vegetal, somando-se a isso, possui uma ampla variedade de etnias e culturas, resultando em uma população que detém um valioso conhecimento acerca do uso de plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Para populações de países em desenvolvimento, muitas vezes, o uso de plantas medicinais constitui única forma de terapia, no ocidente, o consumo de plantas medicinais vem aumentando substancialmente, onde aproximadamente 40% da população faz uso regular de preparações à base de plantas (ARAÚJO et al., 2014).

Mesmo com avanços da fitoterapia, as plantas medicinais continuam sendo utilizadas sem confirmação científica, persistindo a concepção de que o seu uso no tratamento de doenças é natural e seguro (TOVAR e PETZEL, 2009), ainda, frequentemente essas plantas são utilizadas para fins diferentes dos empregados pela população nativa, assim, a toxicidade de plantas torna-se um problema de saúde pública (CAMPOS et al., 2016).

Estudos toxicológicos comprovam que as plantas podem ser nocivas ou mesmo letais a saúde (CHANDA et al., 2015; LAKSHMANAN et al., 2016). A Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância do uso tradicional de plantas medicinais, porém enfatiza que para o emprego de uma planta para fins terapêuticos é essencial o estabelecimento de sua segurança, eficácia e garantia de qualidade (RATES, 2001).

Com a intenção de promover pesquisas com as plantas medicinais, garantindo assim o uso correto e seguro, além de implantar a utilização das terapias complementares no Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde elaborou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada pelo Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006 (BRASIL, 2006). Posteriormente o Ministério da

Saúde elaborou a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) com o objetivo de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença, a lista é composta por 71 plantas medicinais (BRASIL, 2009), assim, a relação é composta de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS). Com a expansão da assistência farmacêutica e a oferta de fitoterápicos pelo SUS, acredita-se que ocorra um aumento na demanda (MELLO, 2013), na RENISUS encontra-se o gênero *Morus* (Moraceae), incluem-se as espécies *Morus nigra* ( amoreira-preta), *Morus alba* ( amoreira-branca) e *Morus rubra* ( amoreira-vermelha) (GUNDOGDU et al., 2011).

### **1.1.2 Estudo toxicológico de plantas medicinais**

A toxicidade é um parâmetro necessário para qualquer análise *in vivo* ou *in vitro*, o estudo das plantas tóxicas vem ganhando importância, uma vez que, além de esclarecer diferentes aspectos dos casos de intoxicações pode ainda fornecer compostos potenciais para o desenvolvimento de fármacos (VEIGA et al., 2005). No Brasil, esses estudos são de grande importância, devido a grande diversidade vegetal existente, consequentemente alimenta o amplo comércio, que na maioria das vezes ocorre em grandes feiras livres, em diversas partes do país (LEITÃO et al., 2014).

Existem protocolos que podem ser seguidos, a fim de facilitar pesquisas científicas, dentre eles encontra-se os protocolos da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD). A OECD é um grupo composto por trinta países, que determina acordos e recomendações internacionais em áreas onde acordos multilaterais são necessários para que países possam contribuir para o progresso da economia mundial. Dentre os estudos preconizados pela OECD, estão os protocolos de toxicidade oral aguda (423) e subaguda (407), sendo métodos reconhecidos pela eficácia e que visam à diminuição do sofrimento e número de animais experimentais (VALADARES, 2006).

Os estudos de toxicidade aguda são capazes de fornecer informações preliminares sobre órgãos alvos de toxicidade e são úteis para auxiliar no estudo de

doses a serem utilizadas posteriormente (OGA, 2008). O guia 423, consiste em método onde 3 animais do mesmo sexo são utilizados por etapa, as etapas são estabelecidas de acordo com a mortalidade e morbidade da análise durante os 14 dias de observação, quando possível, estima-se a DL<sub>50</sub> (dose capaz de produzir óbito em 50% dos indivíduos) (OECD, 2001).

O guia 407 (toxicidade oral de doses repetidas de 28 dias) a substância de teste é administrada em doses graduadas em vários grupos experimentais. Durante o período de administração qualquer sinal de toxicidade nos animais é observado. O teste pode fornecer informações sobre a seleção de concentrações para estudos posteriores e de longo prazo (OECD, 2008).

Na última década muitas plantas medicinais foram testadas através da utilização destes guias (HARIZAL et al., 2010; HOR et al., 2011; SILVA et al., 2011; PING et al., 2013; SILVA et al., 2016; BRONDANI et al., 2017). Considerando que a espécie *M. nigra* é utilizada pela população no tratamento de várias patologias e a escassez de estudos de toxicidade, os resultados deste trabalho são úteis por avaliar a sua segurança de uso oral.

### 1.1.3 Descrição da família Moraceae e espécie *Morus nigra* L.

A família Moraceae, conhecida como família das figueiras, é de ampla distribuição geográfica, mais concentrada nas regiões tropicais e subtropicais, comprehende aproximadamente 1.050 a 1.100 espécies, distribuídas em 37 gêneros, 19 destes gêneros estão presentes no Brasil (LI, 1998; MARTINS e PIRANI, 2010). A família contém espécies frutíferas com vários usos comerciais e alimentares, tais como *Morus* ssp (amora), *Ficus* ssp (figo), *Artocarpus altilis* (fruta-pão) e *Artocarpus heterophyllus* (jaca) (CASTRO, 2001).

As plantas pertencentes ao gênero *Morus* (Moraceae), são conhecidas no Brasil popularmente como amoreiras e seu fruto é conhecido como amora (GUNDOGDU et al., 2011). A *Morus nigra* é conhecida popularmente como amoreira preta ou amora miúra e é uma árvore nativa do oeste da Ásia, porém bem adaptada ao clima brasileiro (ERCISLI e ORHAN, 2008; VOLPATO et al., 2011). A árvore pode medir até 9 metros de altura, apresentando folhas ovaladas, flores monoicas ou dioicas e frutos de coloração roxa a preta no estágio máximo de maturação, apresentando sabor levemente ácido (KUMAR e CHAUHAN, 2008; ÖZGEN et al.,

2009). É considerada uma planta de jardim, principalmente pelo efeito outonal de sua folhagem em regiões de clima ameno como no sul e sudeste do Brasil, tolerando bem a poluição atmosférica (MOHIUDDIN et al., 2011).

A *M. nigra* apresenta propriedades medicinais descritas na literatura científica, utilizada em larga escala na medicina popular mundial (VANONI, 2006; WANG et al., 2014). Suas folhas são utilizadas para minimizar efeitos da menopausa (MIRANDA et al., 2010), como anti-inflamatória (PADILHA et al., 2010), diurética e expectorante (VANONI, 2006) e no tratamento de diabetes e hipertensão (KOSTIĆ et al., 2013), Volpato e colaboradores (2011) descrevem que as folhas também são utilizadas por povos nativos do Brasil, como antídoto para envenenamento de picada de cobra, no tratamento de lesões bucais e na contenção de sangramento.

Em estudo, os frutos de *M. nigra* mostraram bons resultados frente a células de câncer de próstata, revelando possível propriedade antiproliferativa (TURAN et al., 2017). Também é descrita ação antimicrobiana (KHALID et al., 2011; MINHAS et al., 2016) e anti-aterosclerótica (JIANG et al., 2017). Em 2002, a *M. nigra* (folha e fruto) foi considerada pelo Ministério da Saúde chinês não um mero alimento, mas uma droga com potencial terapêutico (WANG et al., 2014).

A planta apresenta elevada quantidade de compostos fenólicos, responsáveis pela adstringência e sabor ácido que o fruto apresenta (ÖZGEN et al., 2009). Quando comparada a outras espécies do gênero, a *M. nigra* apresenta maiores teores de compostos fenólicos totais e flavonoides (ERCISLI e ORHAN, 2007). Em outro estudo comparativo observou-se que a presença de antioxidantes é bastante superior na *M. nigra* aos de *M. alba* e *M. rubra*, destacando-se os ácidos fenólicos, rutina e quercetina (GUNDOGDU et al., 2011).

A ação antioxidante do extrato dos frutos de *M. nigra* foi verificada obtendo-se como resultado a inibição da glicosilação da hemoglobina induzida pela glicose em diferentes graus, a hemólise de eritrócitos humanos também foi inibida, sugerindo que os frutos de *Morus nigra* apresentam uma ação protetora contra os danos oxidativos (NADERI, 2004). Segundo Hassimotto et al. (2007) a *M. nigra* possui atividade antioxidante superior a compostos isolados já reconhecidos, como a quercetina e outros antioxidantes sintéticos.

A *M. nigra* apresenta atividade antiespasmódica e hipotensora relacionadas à presença de compostos isolados, do tipo “*diels-alder*”, provenientes de uma reação

de cicloadição, como o *kuwanon G.*, *chalcomoracin* e *kuwanon E.* (PARK et al., 2003).

O extrato de folhas de *M. nigra*, mostrou-se inibição da enzima tirosinase, assim revela-se como um potencial agente de despigmentação da pele nas indústrias farmacêutica e cosmética e como agente antibranquecedor de frutas, vegetais e bebidas na indústria de alimentos (FREITAS et al., 2016).

No entanto, até o momento, são escassos estudos que estabeleçam doses de segurança e possíveis reações toxicológicas das folhas de *M. nigra* (Figura 1).

Figura 1 - *Morus nigra* ( amoreira preta) – Aspecto geral.



Fonte: Disponível em: <[https://jb.utad.pt/especie/morus\\_nigra](https://jb.utad.pt/especie/morus_nigra)>

## 1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESA ANTIOXIDANTE

O termo Radical livre (RL) compreende a uma série de átomos, moléculas ou íons que possuem elétrons desemparelhados na sua última camada eletrônica, por isso, são instáveis e altamente reativos, buscando estabilidade ao capturar ou ceder elétrons (VASCONCELOS et al., 2007). Sob condições normais, os RLs são fundamentais para o funcionamento dos sistemas biológicos, entretanto, quando em excesso, gera um processo conhecido como estresse oxidativo, assim, passa a acometer células sadias, causando danos em proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (NAIR et al., 2007; JONES, 2008).

Os RLs são derivados do metabolismo do oxigênio, nitrogênio e enxofre, fazendo parte de grupos denominados “espécies reativas de oxigênio” (ROS – reactive oxygen species), “espécies reativas de enxofre” (RSS – reactive sulphur species) e “espécies reativas de nitrogênio” (RNS – reactive nitrogen species) (JONES, 2008). Sendo ROS considerado o grupo mais importante devido sua maior ocorrência, inclui-se neste grupo, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o radical hidroperoxil ( $HO_2\cdot$ ), o radical hidroxil ( $OH\cdot$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e oxigênio singlet ( $^1O_2$ ) (VASCONCELOS et al., 2007; PHAM-HUY et al., 2008).

Os efeitos deletérios dos RLs são bem conhecidos, estando relacionados a inúmeras patologias, como câncer, patologias sanguíneas, hemocromatose, complicações cardíacas, aterosclerose, doença de Alzheimer, Parkinson, problemas renais e hepáticos, hipertensão, doenças autoimunes, processos inflamatórios, diabetes e também está relacionado ao envelhecimento (SAYRE et al., 2007; NAIR et al., 2007; PHAM-HUY et al., 2008; FORBES et al., 2008; HENRIKSEN et al., 2011; PISOSCHI e POP, 2015).

O aumento dos ROS provoca peroxidação lipídica (PL) na membrana celular (degradação oxidativa dos lípidos), processo através do qual os RLs capturam elétrons dos lipídeos da parede celular. O malondialdeído (MDA), produto de degradação dos lipídeos, é utilizado como biomarcador para mensurar a PL. O radical hidroxil ( $OH\cdot$ ) é um dos principais radicais envolvidos na PL, formado através da reação de Fenton, como resultado da interação entre  $H_2O_2$  e íons (NAIR et al., 2007; JONES, 2008).

Com o objetivo de prevenir ou reduzir o dano oxidativo causado pelas ROS, os sistemas biológicos, desenvolveram formas de defesa antioxidant que inclui a atividade enzimática, a quelação de minerais, a ação *scavenger* (transformação de RL em outro menos reativo) e *quencher* (neutralização completa do RL através da absorção de toda a energia de excitação) (BIRBEN et al., 2012).

O sistema enzimático é o primeiro a agir, nele encontram-se diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutationa peroxidase (GPx) (AHMAD et al., 2010; BIRBEN et al., 2012).

A CAT é uma enzima antioxidante, localizada nos peroxissomos, (principal organela responsável pela desintoxicação celular), que contém quatro grupos

de heptina (ferro) que permitem que a enzima reaja sobre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> transformando em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub> (SALVI et al., 2007; AHMAD et al., 2010).

A SOD é responsável por catalisar a dismutação do O<sub>2</sub><sup>-</sup> em H<sub>2</sub>O e O<sub>2</sub>, podendo ocorrer sob diferentes isoformas, dependendo do metal associado a ela, cobre e zinco no citoplasma de eucariontes, manganês na matriz mitocondrial e ferro em bactérias (VASCONCELOS et al., 2007; AHMAD et al., 2010).

Já a GPx é uma enzima localizada no citosol e na matriz mitocondrial que reduz o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e hidropeptídeos orgânicos utilizando o glutation (GSH), os principais locais de ação da GPx são o fígado e eritrócitos porém, também está presente em outros órgão como coração e músculo (JONES, 2008; HUBER et al., 2008; AHMAD et al., 2010).

O estresse oxidativo ainda mostra-se um importante fator para a alteração na atividade da enzima delta-aminolevulínico-desidratase ( $\delta$ -ALA-D) (SOUZA et al., 2007), enzima envolvida na síntese do heme, responsável por catalisar a condensação de delta-aminolevulínico ( $\delta$ -ALA) até a formação de seu produto, o porfobilinogênio (PBG). Devido aos dois grupamentos tiol da sua estrutura, sua atividade catalítica é muito sensível a agentes oxidantes, deste modo, torna-se um importante marcador de toxicidade (SASSA, 1982; SILVA et al., 2007; FERNÁNDEZ et al., 2010).

### 1.3 PAPEL BIOLÓGICO DO FERRO

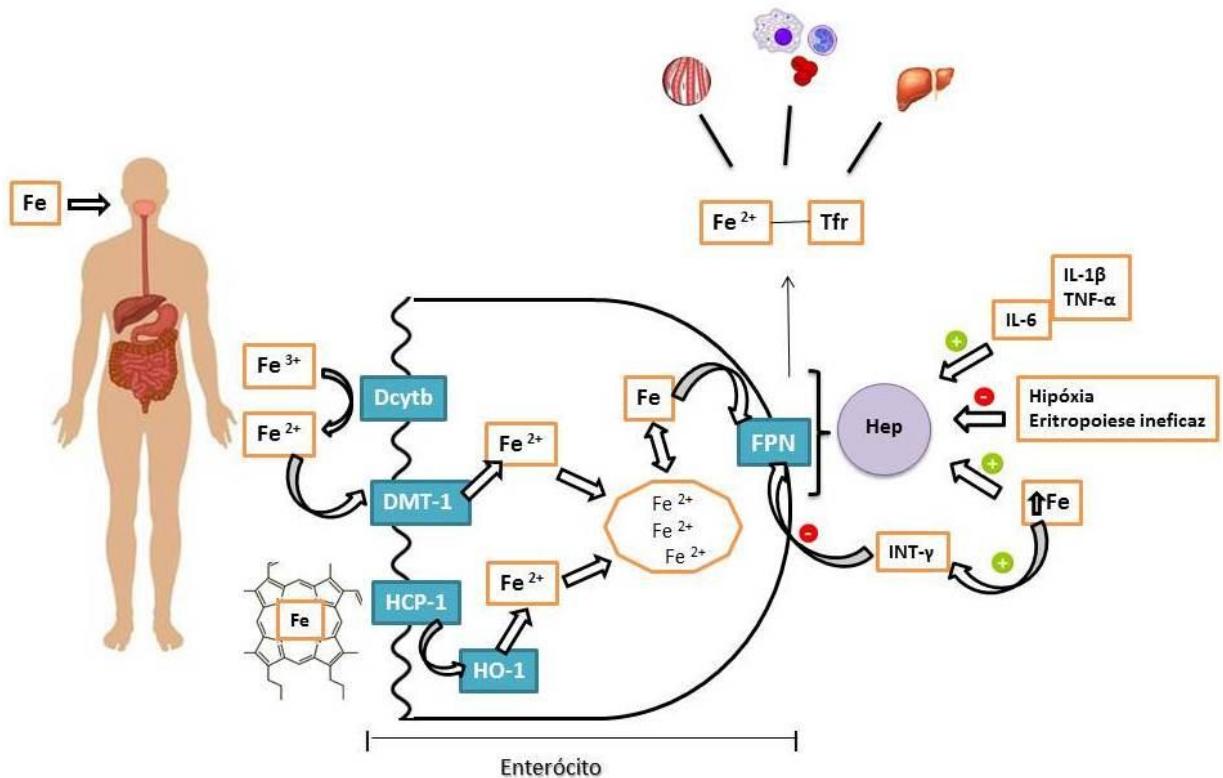
O íon ferro (Fe) é um elemento essencial para a maioria das formas de vida e é amplamente utilizado por proteínas para realização de inúmeras funções (GEISSLER e SINGH, 2011), considerado essencial para a formação do heme (grupo prostético funcionalmente crítico para proteínas de ligação do oxigênio como hemoglobina e mioglobina), também contribui para a formação de complexos ferro-enxofre, atuantes como mediadores dos processos de transferência de elétrons (AROSIO et al., 2015; SANGARTIT et al., 2016; EID et al., 2017).

Mesmo sendo essencial no metabolismo celular e no transporte de oxigênio, o Fe pode ser altamente nocivo ao organismo quando encontrado na forma livre, também chamado de Fe não ligado a transferrina (NTBI – *non transferrin bound iron*), para que isto não ocorra, existem mecanismos capazes de manter o Fe ligado à proteína transportadora (tranferrina) ou de armazenamento (ferritina ou

hemossiderina), assim limitando a participação do Fe em processos oxidativos (ANDREWS, 1999; CANÇADO e JESUS, 2007; EID et al., 2017). Desta forma, o armazenamento de Fe tem a finalidade de fornecer reserva interna, que possa ser mobilizada quando necessário e proteger o organismo dos efeitos tóxicos do NTBI (ANDREWS, 1999; GROTTO, 2008; EID et al., 2017). Em adultos normais, a quantidade total de Fe é de aproximadamente 3,5 g a 4,0 g e o reabastecimento diário proveniente da dieta é correspondentemente a 1-2 mg por dia (GROTTO, 2008; DAINTY et al., 2014).

Basicamente o Fe é ingerido na dieta sob duas formas: Fe heme e não heme. O Fe heme é transportado pela proteína transportadora de heme-1 (HCP-1) e o Fe não heme pela proteína transportadora de metal divalente 1 (DMT-1). Ao mesmo tempo, nas vilosidades dos enterócitos duodenais estão presentes enzimas ferroredutases como a citocromo b duodenal (Dcytb) que convertem o Fe férrico em ferroso. O Fe é removido do heme intracelular pela heme oxigenase (HO-1). O Fe livre fica acessível para uso na célula e para transporte para a corrente sanguínea via ferroportina (FPN). Quando o aporte de Fe aumenta o fígado produz hepcidina (Hep), que se liga à ferroportina e promove a internalização e degradação do Fe (Feedback negativo). Uma grande concentração de Fe aumenta a síntese de hepcidina, já a hipóxia e a eritropoiese ineficaz diminui sua síntese. A interleucina-6 (IL-6) liberada durante processos inflamatórios também estimula diretamente a produção de Hep. Outras proteínas de fase aguda (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), também podem contribuir para aumento da Hep. O Fe que sai da célula é transportado pela transferrina (Tfr), assim sendo distribuído no organismo e armazenado principalmente nas células do sistema retículoendotelial, hepatócitos e músculo esquelético sendo encontrado como ferritina e hemossiderina (Figura 2).

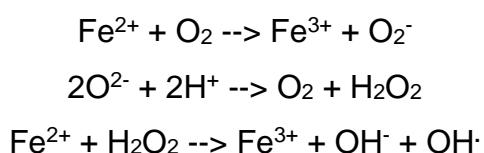
Figura 2 - Visão global do metabolismo do Fe.



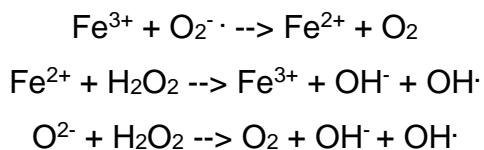
Fonte: Do autor.

### 1.3.1 Sobrecarga de Ferro

Fisiologicamente, o organismo humano não é capaz de aumentar a excreção de Fe, mesmo em condições de sobrecarga deste metal, portanto, o aumento progressivo do aporte de Fe leva inevitavelmente à condição patológica de sobrecarga de Fe, uma vez que o NTBI pode doar ou aceitar um elétron de moléculas vizinhas para causar danos ou para gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) (PORTER, 2001), através das reações de Fenton e Haber-Weiss, que descrevem a formação de radicais livres dentro de uma célula com a participação de Fe (KEHRER, 2000). A reação de Fenton pode ser caracterizada pela seguinte reação química:



A reação de Haber-Weiss, por sua vez, pode ser caracterizada pela reação química abaixo:



O excesso de Fe livre é absorvido, como resposta ao estresse crônico, deste modo, a sobrecarga de Fe é considerada uma complicação que se desenvolve em diversas patologias (CANÇADO e CHIATTONE, 2010). As principais situações clínicas ligadas à sobrecarga de Fe são hemocromatose hereditária ou primária e hemocromatose secundária ou adquirida, esta última situação ocorre em consequência de outras patologias. As doenças mais comumente associadas à sobrecarga secundária são talassemia, anemia falciforme e aplásica refratária, síndromes mielodisplásicas, aplasia pura de série eritroide e leucemias agudas, enquanto na hemocromatose hereditária o tratamento da sobrecarga de Fe é feito por sangrias (flebotomia), já os quelantes são essenciais no controle da hemocromatose secundária (ANDREWS, 1999; PORTER, 2001; CANÇADO E JESUS, 2007; EID et al., 2017).

O fígado mostra-se como principal alvo de acúmulo de Fe, assim, causando processos inflamatórios, fibrose, cirrose, câncer hepático, isto ocorre porque o estresse oxidativo induzido pelo Fe causa necrose celular parenquimatosa, ativa células efetoras (células estreladas hepáticas, fibroblastos, células de Kupffer) e mediadores importantes da fibrogênese hepática (MILIC et al., 2016). Logo, a citotoxicidade e genotoxicidade de Fe também são responsáveis por potenciais carcinogênicos do Fe (KEW, 2014).

Ainda, outros órgãos podem ser afetados pela sobrecarga de Fe, estudos indicam que a mesma aumenta a incidência de doenças inflamatórias crônicas, diabetes, distúrbios neurológicos como o Alzheimer e Parkinson, problemas reprodutivos, insuficiência cardíaca, bem como pode aumentar a resposta a uma série de outros compostos tóxicos (SHEFTEL et al., 2012; COATES, 2014; WARD et al., 2014; LI et al., 2014; FERNÁNDEZ-REAL e MANCO, 2014; WANG et al., 2014; KNUTSON, 2016; EID et al., 2017; MARTIN-BASTIDA et al., 2017).

Em pacientes com talassemia que sofrem com transfusão sanguínea desde a infância, doença hepática induzida pelo Fe e os distúrbios endócrinos se desenvolvem durante a infância e são quase que inevitavelmente, seguido na adolescência pela morte por cardiomiopatia, já em pacientes com anemia falciforme, embora as complicações induzidas pelo Fe pareçam se desenvolver mais tarde, doença hepática como cirrose, bem como deposição de Fe cardíaco e pancreático são frequentes (DARBARI et al., 2006; BRITTENHAM, 2011). Nos Estados Unidos custos anuais por paciente para tratamento de complicações proveniente se sobrecarga de Fe é estimada em US \$ 15.000 a US \$ 20.000 (DELEA et al., 2007; BRITTENHAM, 2011).

### **1.3.2 Terapia quelante**

O desenvolvimento de estratégias quelantes de Fe vem proporcionando o aumento da longevidade de pacientes em quadro de sobrecarga, o objetivo da quelação visa diminuir o NTBI e prevenir o acúmulo patológico nos tecidos, assim a terapia deve oferecer maior tempo possível de cobertura ferroquelante durante o dia e menor tempo de exposição do organismo ao NTBI (CANÇADO e JESUS, 2007; PORTER, 2001; COATES, 2014).

Até o fim dos anos 90, apenas a Desferroxamina (DFO) estava disponível como terapia, uso de DFO subcutâneo permitiu aos pacientes a possibilidade de aumento na expectativa de vida, entretanto, esse resultado depende da adesão ao DFO, para garantir maior sobrevida, em geral, são necessárias em torno de 225 aplicações subcutâneas por ano, assim, a falta de adesão ao tratamento é a principal causa de insucesso dessa terapia (CANÇADO E JESUS, 2007; MURPHY e OUDIT, 2010; MEERPOHL et al., 2014). No Brasil, a oferta do equipamento é restrita e sua aquisição ocorre por meio de importação, além da dificuldade de manutenção do aparelho, seu preço é inacessível para a maioria da população brasileira (BRASIL, 2009).

Segundo Elalfy e colaboradores (2015), a introdução de quelação de Fe com DFO para o tratamento de β-talassemia Maior (β-TM), embora parenteral, melhora significativamente a sobrevivência dos pacientes, no entanto, complicações cardíacas e morbidades endócrinas e hepáticas permaneceram a causa mais comum de morte. Ademais, estudos comprovaram que o DFO é um sideróforo

microbiano podendo ser usado pela *Yersinia enterocolitica* e pela *Candida albicans*, assim, é bem reconhecido o aumento da incidência de infecções em pacientes com sobrecarga de Fe recebendo DFO (HOLBEIN e MIRA, 2010; LAWSON et al., 2016). Tais fatores motivaram a busca por regimes quelantes menos agressivos que proporcionassem eficácia e segurança, mas de administração oral, sem o inconveniente da necessidade de infusões subcutâneas por tempo prolongado. Entre os estudados, a Deferiprona e o Deferasirox passaram a contribuir na terapia disponível para pacientes em quadro de sobrecarga de Fe (CANÇADO e JESUS, 2007).

A Deferiprona, fármaco de administração oral, é um quelante bidentado, tendo capacidade de ligação ao Fe menor que o DFO, uma vez que são necessárias três moléculas de Deferiprona para se ligar a uma de Fe (ELALFY et al., 2015). Os eventos adversos mais frequentemente associados ao uso de Deferiprona são gastrintestinais, articulares, neutropenia e agranulocitose enfatizando a necessidade do controle semanal da contagem de neutrófilos em todos os pacientes tratados, alterações dermatológicas, deficiência de zinco e elevação da enzima aspartato aminotransferase (AST), muitos desses eventos levam à interrupção da terapia (CANÇADO e JESUS, 2007; EL-BESHLAWY et al., 2013; RAZA et al., 2014; LI e REICHMANN, 2016; EID et al., 2017).

Nos Estados Unidos a Deferiprona não foi aprovada como terapia para talassemia, na Europa é utilizada somente como segunda escolha para pacientes que não toleraram o uso de DFO e no Brasil a decisão foi semelhante à europeia (CANÇADO e JESUS, 2007). Ricchi e colaboradores (2010) confirmaram que a Deferiprona pode piorar o quadro clínico de pacientes com β-TM.

O Deferasirox é um novo quelante tridentado, ativo na forma oral, requerendo duas moléculas para formar um complexo estável com cada átomo de Fe, a eliminação do Fe quelado é principalmente pela bile (CANÇADO e JESUS, 2007; ELALFY et al., 2015; SHINODA et al., 2017). Contudo, dados de reações adversas do Deferasirox pós-comercialização apontaram casos fatais, agudos e irreversíveis de insuficiência renal, citopenias, mais gravemente agranulocitose e trombocitopenia (KONTOGHIORGHES, 2007). A agência norte-americana Food and Drug Administration (FDA) detalhou essas reações adversas, exigindo o registro duplo do mesmo evento adverso (CANÇADO e JESUS, 2007). Segundo o Boletim Brasileiro

de Avaliação de Tecnologias em Saúde (BRATS) os efeitos prevalentes envolveram o sistema gastrointestinal, hepático, renal e sanguíneo, assim a bula foi atualizada e induziu maior sensibilização dos profissionais de saúde em relatarem qualquer reação adversa, no Brasil, o laboratório fabricante do medicamento também alterou a bula do produto (BRASIL, 2009).

Ao que se trata a farmacoeconomia, no Brasil, o Deferasirox pode custar até 9.968,04 reais/ano/paciente, a Deferiprona 2.764,94 reais/ano/paciente e o DFO 11.874,69 reais/ano/paciente, sem contar os custos provenientes das complicações induzidas pela sobrecarga de Fe (BRASIL, 2009). Em vista disto, é de imprescindível relevância, o desenvolvimento de novas estratégias, preferencialmente orais e de baixo custo para o tratamento da sobrecarga de Fe.

### **1.3.3 Compostos naturais na terapia quelante (fitoqueladores)**

Devido às dificuldades estabelecidas pelos fármacos disponíveis, viu-se a necessidade de novas pesquisas, estudos recentes demonstram que os polifenóis estão em destaque nesta busca. Em estudo *in vitro*, Baccan e colaboradores (2012) demonstraram que flavonóides contendo o catecol queracetina e rutina são confiáveis para diminuição do NTBI, também demonstraram que o complexo ferro-queracetina pode cruzar membranas biológicas, tais achados sugerem que a queracetina poderia representar um quelante útil para terapia de ferro-redistribuição, a relevância destes resultados depende de experiências com modelos *in vivo* de sobrecarga de Fe.

Posteriormente Tang e colaboradores (2014), demonstraram que a queracetina impediu a hepatotoxicidade induzida pela sobrecarga de Fe em ratos, diminuindo os níveis de NTBI e a expressão do receptor de transferrina (TfR1) responsável pela absorção de Fe hepático em condições fisiológicas normais, também se observou a diminuição da expressão de transportadores de metal (DMT-1 e ZIP14) do NTBI e a liberação suprimida do LIP-Fe (um equivalente intracitosólico de NTBI), mediada pelo receptor TRPML1 (Receptor de Potencial Transitório Mucolipina 1).

A baicalina, composto extraído da raiz da *Scutellaria baicalensis*, foi testado em ratos em sobrecarga de Fe, tratados por 50 dias, a mesma, mostrou a diminuição da proporção de peso hepático e corporal e da PL, enquanto a atividade de CAT e o estado de antioxidante total mostraram melhora, assim, concluiu-se que a baicalina

possui efeito hepatoprotetor, o resultado foi justificado devido às atividades de quelação e poder antioxidante do composto (ZHAO et al., 2005).

A raiz seca de *Salvia miltiorrhiza*, conhecida como “Danshen”, rica em ácidos fenólicos, foi analisada frente a um modelo animal de sobrecarga de Fe, evidenciou a que o Danshen foi capaz de restaurar a função anormal e melhorar as alterações patológicas do fígado (GAO et al., 2013). Em outro estudo, foram identificados três compostos em HPLC-UV, Danshensu, aldeído protocatecuico e o ácido salvianólico B, tais compostos foram associados à atividade antifibrótica em fígados de ratos em sobrecarga de Fe (ZHANG et al., 2013).

Das et al. (2016), avaliou os efeitos do flavonoide resveratrol em camundongos, usando um modelo de hemocromatose genética (camundongos knockout de hemojuvelina) e outro não genética (carga secundária), em estágio crônico e estado avançado da doença, onde, foi observado que o resveratrol detém a fibrogênese principalmente através da inibição de proliferação celular não parenquimatosa induzida pelo Fe, em todos os modelos utilizados o resveratrol atenuou a doença hepática.

Com base nisso, avaliamos o efeito as folhas de *M. nigra* em modelo de sobrecarga de Fe.

#### 1.4 JUSTIFICATIVA

Devido aos fatos relatados, foram associados alguns pontos que justificam a escolha da planta em estudo e dos procedimentos experimentais seguidos:

- A *Morus nigra* L. estar entre as plantas relacionadas na RENISUS e apresentar elevada quantidade de compostos fenólicos.
- Os estudos insuficientes que comprovem as suas doses de segurança e atividades farmacológicas.
- A escassa disponibilidade e os inúmeros problemas relacionados aos fármacos ferroquelantes.
- Os polifenóis em destaque na busca de novas terapias ferroquelantes.

#### 1.5 OBJETIVOS

### **1.5.1 Objetivo geral**

Avaliar o perfil fitoquímico, toxicidade aguda e subaguda das folhas de *Morus nigra* L., bem como avaliar o seu efeito na sobrecarga de ferro.

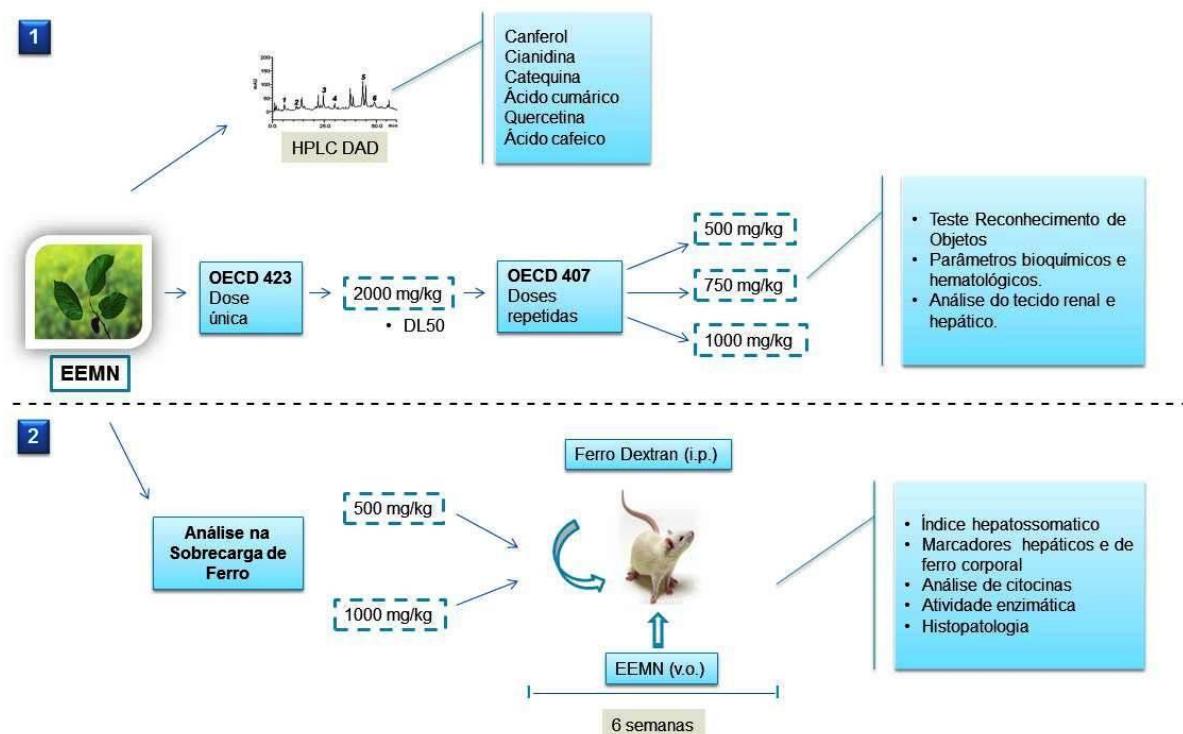
### **1.5.2 Objetivos específicos**

- Determinar o perfil cromatográfico da planta por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).
- Avaliar a toxicidade oral aguda *in vivo* das folhas de *Morus nigra* de acordo com o Guia OECD 423 e a toxicidade oral subaguda *in vivo* do extrato bruto das folhas de *Morus nigra* como preconiza o Guia OECD 407.
- Avaliar o efeito hepatoprotetor das folhas de *Morus nigra* na sobrecarga de ferro em modelo animal.
- Comparar a carga de ferro corporal dos animais em seus diferentes grupos.
- Realizar análise de peroxidação lipídica, atividade antioxidante enzimática, marcadores inflamatórios e de ferro corporal.
- Analisar parâmetros bioquímicos, hematológicos e histopatológicos.

## **2 MANUSCRITOS**

Os materiais, métodos e resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob forma de manuscritos. Cada manuscrito está estruturado de acordo com as normas dos periódicos escolhidos para submissão (Figura 3).

Figura 3 – Metodologia.



Fonte: do Autor.

## 2.1 MANUSCRITO 1 - SAFETY ASSESSMENT OF *Morus nigra* L. LEAVES: ACUTE AND SUBACUTE ORAL TOXICITY STUDIES IN WISTAR RATS

O presente manuscrito foi submetido ao periódico “*Journal of Ethnopharmacology*”.

### Safety assessment of *Morus nigra* L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats

Kassia Caroline Figueiredo<sup>a</sup>, Camille Gaube Guex<sup>a</sup>, Fernanda Ziegler Reginato<sup>a</sup>, Andreia Regina Haas da Silva<sup>a</sup>, Gabriela Buzatti Cassanego<sup>a</sup>, Cibele Lima Lhamas<sup>b</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>a</sup>, Gilberti Helena Hübscher Lopes<sup>c</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

**Corresponding author:**

Kássia Caroline Figueredo

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Tel.: 55-55-3220-9380

E-mail: kassia.tquimica@yahoo.com.br

**Abstract**

*Ethnopharmacological relevance:* *Morus nigra* L. is a plant native to Asia, and well adapted to the Brazilian climate. It is popularly known as "amoreira preta", and is part of the National List of Plants of Interest to the Brazilian Unified Health System. It is used in folk medicine mainly to soften the effects of menopause, as anti-inflammatory, antidiabetic and antihypertensive. However, information on safe doses and use is still precarious.

*Aim of the study:* To identify the chemical composition of the ethanolic extract of *Morus nigra* L. leaves (EEMN), as well as perform a toxicological study in male and female rats.

*Materials and methods:* The chemical composition of the extract was performed by HPLC/DAD. In the acute study, the dose administered was 2000 mg/kg, and signs of toxicity and mortality was observed. In the sub-acute study, the extract was administered at doses of 500, 750 and 1000 mg/kg for 28 days. Behavioral changes, object recognition test, renal and hepatic tissue assessments, biochemical and hematological parameters were determined. The extract was administered orally to male and female rats in both studies.

*Results:* Quercetin and caffeic acid showed as major compounds in the extract. In the acute treatment, the extract was classified as safe (category 5), according to the protocol. In the subacute study, there was a decrease in AST in males (750 and 1000

mg/kg) and females (1000 mg/kg), reduction of total cholesterol in females (750 and 1000 mg/kg), and increase in renal and hepatic change the LPO levels.

**Conclusion:** The present investigation showed that EEMN did not present significant toxic effects when administered orally. Moreover, presented a potentially protective action of organs and possesses hypocholesterolemic activity, thus, it is shown as a promising natural source to be used in pharmacology.

**Keywords:** *Morus nigra*, Moraceae, Leaves, Toxicity, Rats.

**Chemical compounds studied in this article:** Caffeic acid (PubChem CID: 689043), Coumaric acid (PubChem CID: 637542), Quercetin (PubChem CID: 5280343), Cyanidin (68247), Catechin (PubChem CID: 73160), Kaempferol (PubChem CID: 5280863).

## 1 Introduction

Although herbal preparations are commercialized as natural products, they may be associated with many adverse effects (Lakshmanan et al., 2016; Chanda et al., 2015). In order to promoting the research of medicinal plants, guaranteeing the correct and safe use, the Brazilian government prepared the National List of Plants of Interest to the Unified Health System (RENISUS), composed of plant species with the potential to advance in the stages of the production chain and, consequently, generate products of interest to health. Among the species listed, there is *Morus nigra* L., which belongs to the family Moraceae (Brazil, 2009).

Studies have reported numerous activities attributed to the *Morus* genus, such as vasodilator (Kurniati et al., 2014), antidiabetic (Jiao et al., 2017) and cardioprotective (Zheng et al., 2017).

*Morus nigra* L., popularly known as "amoreira preta" is a native tree of western Asia, well adapted to the Brazilian climate, concentrating on the region known as "Vale do Rio São Francisco". It can measure up to 9 meters in height, presenting oval leaves, monoecious or dioecious flowers and dark colored fruits, and a slightly acidic flavor, it is considered a garden plant, mainly due to the autumnal effect of its foliage, tolerating atmospheric pollution well (Volpato et al., 2011; Mohiuddin et al., 2011).

Several parts of the tree are used for medicinal purposes by popular culture; its leaves are used to minimize the effects of menopause (Miranda et al., 2010), as anti-inflammatory (Padilha et al., 2010), as an antidote to snakebite poisoning (Volpato et al., 2011), and in the treatment of diabetes and hypertension (Kostić et al., 2013). It is also shown to be a promising bleaching agent of natural origin against skin hyperpigmentation (Freitas et al., 2016) and an anticancer agent (Turan et al., 2017). Its fruits have antimicrobial (Khalid et al., 2011) and anti-atherosclerotic action (Jiang et al., 2017). In 2002, *M. nigra* (leaf and fruit) was considered by the Chinese Ministry of Health to be not mere food, but a drug with therapeutic potential (Wang et al., 2014).

However, to date, there are few studies that establish safety doses and possible toxicological reactions of *M. nigra* leaves. Therefore, the aim of this work was to perform a toxicological study through the evaluation of biochemical and hematological parameters, as well as to evaluate the renal and hepatic health of rats treated with ethanolic extract of the leaves of *M. nigra* (EEMN).

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Plant Material

The EEMN was obtained in the year of 2016 through the company Gamma Comércio, Importação e Exportação LTDA. (Chácara Monte Alegre, São Paulo, SP, Brazil), registered under the number 6699T1/15. The requirements assessed for quality analysis certification performed by Gamma were: chemical physical analysis (sensory analysis, density, amount of dry matter, pH, alcohol content, identification of tannins) and microbiological analysis (total counts of bacteria, fungi and yeasts, presence of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*).

### 2.2 General Chemistry, Apparatus and Procedures

All chemical reagents were analytical grade. Acetonitrile, formic acid, coumaric acid and caffeic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Cyanidin,

Kaempferol, Catechin and Quercetin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (CLAE-DAD) was performed with a HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) and Shimadzu self-injector (SIL-20A), equipped with alternative pumps (Shimadzu LC-20AT) connected to a degasser (20A5 DGU) with an integrator (CBM 20A), diode arrangement detector (SPD-M20A) and software (LC Solution SP1 1.22). Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV system (Merck Millipore, Darmstadt, Germany).

### *2.3 Quantification of compounds by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)*

Chromatographic analyzes were performed in reverse phase under gradient conditions using C18 (4.6 mm x 150 mm) column loaded with particles of 5 µm diameter, the mobile phase used was water containing 2% formic acid (A) and acetonitrile (B), and the composition gradient was: 5% (B) for 5 min, 20% (B) to 10 min, 40, 50, 60, 70 and 100% (B) every 10 min, following the method described by Thabti et al. (2012) with minor modifications. The EEMN was analyzed using the flow rate of 0.6 ml/min, the injection volume of 20 µl and the wavelength was 280 nm for catechin, 325 nm for caffeic acid and cumaric acid, 365 nm for quercetin and kaempferol and 520 nm for cyanidin. Samples and the mobile phase were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and then degassed by ultrasonic bath prior to use. Reference solutions were prepared in the mobile phase for HPLC at the concentrations of 0.050 300 mg/mL. Chromatographic peaks were confirmed by comparison of their retention time with those of the reference standards and by DAD spectra (200 to 500 nm). All chromatographic operations were performed at room temperature and in triplicate. Calibration curve for Cyanidin:  $y = 15427x + 4789.3$  ( $r = 0.9994$ ); Catechin:  $y = 19673x - 16952$  ( $r = 0.9987$ ); Caffeic acid:  $y = 24781x + 5028.3$  ( $r = 0.0991$ ); Cumaric acid:  $y = 19469x + 4785.7$  ( $r = 0.9993$ ); Quercetin:  $y = 30586x + 2149.0$  ( $r = 0.9997$ ); Kaempferol:  $y = 26369x - 1087.4$  ( $r = 0.9985$ ).

### *2.4 Animals*

Wistar rats, aged 6 weeks, of both sexes and weighing between 150 and 200 g, were obtained from Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria. The animals were randomly distributed in different experimental groups in polypropylene cages with environmental enrichment at a controlled temperature ( $22 \pm 3$  °C) in a 12h light/dark cycle and with free access to the food (standard diet) and filtered water. The study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria, Brazil (CEUA, UFSM) under the No. 8472100616. All procedures were carried out in accordance with the humanitarian principles of animal experimentation.

### *2.5 Evaluation in single dose (acute study)*

As per OECD 423 guideline (OECD, 2001) the EEMN was administered as a single dose, by oral gavage, in female rats ( $n = 3$ ). The groups were divided as follows: Group I or control group ( $n = 3$ ): ethanol 53%. Group II ( $n = 3$ ): treated with EEMN at the dose of 2000 mg/kg, this experiment was performed in duplicate, according to protocol. After administration, the animals were observed individually at least once during the first 30 minutes, periodically during the first 24 hours, with special attention during the first 4 hours, and daily thereafter, totaling 14 days. Body weight, relative organ weight and food intake were observed, as well as macroscopic evaluation of organs after euthanasia.

### *2.6 Repeated dose evaluation (28 days)*

EEMN and ethanol were administered daily by oral gavage for 28 days as per OECD 407 (OECD, 2008). 20 male and 20 female rats were divided into 4 groups ( $n = 5$ ).

Group I: treated with ethanol 53%;

Group II: treated with EEMN at a dose of 500 mg/kg;

Group III: treated with EEMN at a dose of 750 mg/kg;

Group IV: treated with EEMN at a dose of 1000 mg/kg.

At the end of the treatment, all the animals were submitted to a short period of fasting. After this period, rats were anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg,

intraperitoneal (i.p.)), and received analgesia of tramadol (8 mg/kg i.p.). Euthanasia was performed by cardiac puncture. The blood collected was used to perform biochemical and hematological tests, livers and kidneys were excised for macroscopic analysis, relative organ weight and other biochemical evaluations.

#### *2.6.1 Observation study*

During the treatment, animals are observed individually, throughout the period of the experiment, totaling 28 days. The observations included changes in skin and hair, eyes and mucous membranes, the respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems, somatomotor activity and behavior. The weight of each animal was evaluated, as well as water and food consumption.

#### *2.6.2 Object recognition test (RO)*

On the 21st day, object recognition test was performed according to Dere et al. (2005). All animals were previously habituated; on the first day (training), animals were placed in the arena containing two different objects (A and B), after 24 hours, one of the objects was replaced by a new one (C), all analyzes were standardized in the time of 5 minutes of exploration.

#### *2.6.3 Biochemical and hematological parameters*

The blood collected was separated into two tubes: one containing ethylene diamine tetra acetic acid anticoagulant (EDTA) and the other without additive. Serum was used for biochemical measurements (GLU), total cholesterol (Chol), urea (BUN), creatinine (CRE), total protein (PPT), aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). Total white blood cell count (WBC), % of lymphocytes, neutrophils, monocytes, eosinophils, basophils and band cell. And erythrocyte parameters (total red cell count (RBC), hemoglobin (HBG), hematocrit (MCT), mean corpuscular volume (MCV), total protein (PPT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red blood cell amplitude (RDW), platelet count (PLT)).

#### *2.6.4 Analysis of hepatic and renal tissue*

Estimation of lipoperoxidation (LPO) of hepatic and renal tissue was performed using the Thiobarbituric Acid Reactive Substances test (TBARS) quantified according to Ohkawa et al. (1979). The catalase (CAT) activity was determined according to Aebi (1984), the activity of delta-aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) was assayed according to Sassa (1982) and Superoxide Dismutase (SOD) activity was evaluated according to the method of Sun and Zigman (1978).

#### *2.7 Statistical analysis*

The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. For test of object recognition, the time of each object exploration in the task was converted to percentage of total time of exploration and, therefore, for comparison between control group and test, *Student t* test was used. Later, for comparison between groups, a one-way analysis of variance (ANOVA) was used. For other tests, the results were analyzed using one-way variance test (ANOVA), followed by the Tukey post-hoc test. Kruskal-Wallis and Dunn's were used as statistic tests when the requirements to perform a parametric test were not satisfied (*GraphPad Prism Software, Inc., version 5.0.1*). The differences between groups were considered to be statistically significant when  $p < 0.05$ .

### **3 Results**

#### *3.1 Quantification of compounds by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD)*

The EEMN chromatograms revealed the presence of cyanidin ( $t_R = 6.03\text{min}$ , peak 1), catechin ( $t_R = 11.47\text{min}$ , peak 2), caffeic acid ( $t_R = 24.86\text{min}$ , peak 3), cumaric acid ( $TR = 29.15\text{min}$ , peak 4), quercetin ( $t_R = 43.79\text{min}$ , peak 5) and kaempferol ( $t_R = 48.91\text{min}$ , peak 6) (Fig. 1 and Table 1) shows the amount of each compound, where quercetin and caffeic acid are observed as major compounds, respectively.

### *3.2 Single dose evaluation (acute study)*

Administration of a single oral dose of EEMN at 2000 mg/kg, even after the experiment was repeated, did not induce mortality or signs of toxicity during the observation period (14 days). There were also no indications of animal morbidity or suffering. Body weight, relative organ weight, and food intake were not affected by plant ingestion. In addition, macroscopic assessment of organs after euthanasia did not demonstrate any significant pathological signs (data not shown).

### *3.3 Evaluation in repeated doses (28 days)*

#### *3.3.1 Observation study*

Oral administration of EEMN at doses of 500, 750 and 1000 mg/kg in the subacute period did not cause any signs of adverse effects, altered signs of behavior and mortality. Body weight for both sexes showed growth compatible with the physiological tendency, as well as water and food intake, relative organ weight also did not present significant difference (data not shown).

#### *3.3.2 Object recognition test (RO)*

EEMN administered at doses of 750 and 1000 mg/kg showed a slight increase in the time of observation of the non-familiar object (C), but this result was not statistically significant for the 28-day treatment (Fig. 2).

#### *3.3.4 Biochemical and hematological parameters*

Our study showed a decrease in total cholesterol levels (chol) in females (750 and 1000 mg/kg), decrease of urea (BUN) in males (1000 mg/kg), as well as AST decreases in males (750 and 1000 mg/kg) and females (1000 mg/kg) when compared to the control group. The other biochemical parameters analyzed did not present a significant difference in relation to the control group and in group-group relation (Table 2).

In relation to the leukocyte analysis (Table 3), for male rats, an increase in the neutrophil level was observed in animals receiving EEMN 500 mg/kg, in female rats WBC levels decreased at 1000 mg/kg when compared to the control group. Percentage of the other leukocyte cells (lymphocytes, monocytes, eosinophils, basophils and band cell) were not altered. Erythrocyte parameters also did not present statistically significant results, in both sexes when compared to the control group and group-group (Table 4).

### 3.3.5 Analysis of hepatic and renal tissue

Oral administration of EEMN at doses of 500, 750 and 1000 mg/kg did not significantly alter LPO levels in any of the analyzed tissues of both sexes (figures 3, A1 and A2). The activity of the δ-ALA-D and SOD enzymes also did not present significant difference when compared to the control group (data not shown). However, both renal and hepatic CAT activity increased in female rats at dose of 750 mg/kg and in males at 1000 mg/kg (figures 3, B1 and B2).

## 4 Discussion

Even with advances in herbal medicine, medicinal plants continue to be often used without scientific basis, based only on their popular use perpetuated by generations. However, toxicological studies prove that many plants can be harmful or even lethal due to their toxicity (Lakshmanan et al., 2016; Jayesh et al., 2017). Even the most effective traditional plants should not be used as therapeutic if their toxicological parameters are not well estimated, therefore, a complete scientific toxicological evaluation is an imperative prerequisite before a plant is used for its medicinal effects (Chanda et al., 2015; Jayesh et al., 2017). Based on this, we evaluated the toxicological profile of the EEMN, through *in vivo* evaluations by analysis of biochemical and hematological parameters, relating it to the chemical composition identified.

In the acute toxicity experiment, oral administration of a single dose of EEMN (2000 mg/kg) did not cause mortality or any type of behavioral and body weight changes. According to OECD 423, since all animals survived until the end of the

experiment, the extract has low toxicity and should be included in category 5 with an estimated LD<sub>50</sub> greater than 2000 mg/kg. The same protocol was followed by Oliveira et al. (2015) to evaluate the ethanolic extract of *Morus alba* leaves, with no mortality occurring, thus corroborating our study.

Quercetin and caffeic acid are shown as more quantity major compounds of EEMN, supporting previous studies (Khalid et al., 2011; Sánchez-Salcedo et al., 2017), these polyphenols have been widely described in the literature due to its neuroprotective ability, since their antioxidant actions protect against cell damage, so this mechanism is essential in the prevention and recovery of brain pathologies. According to Mehta et al. (2017), quercetin attenuated memory dysfunction, which was attributed to its potential for relieving insulin resistance, improving hippocampal insulin signaling and thus preventing neuronal damage. According to Palle and Neerati (2017), it offers potential in clinical application in human neurodegenerative diseases such as Alzheimer's. Caffeic acid improves memory impairment and cognition in rats due to the ability to restore acetylcholine levels (Deshmukh et al., 2016). For RO testing, a slight improvement in long memory was observed, although not statistically significant, when compared to the control group, thus, it is believed that a chronic study is needed to better elucidate the EEMN behavior in memory performance in rats.

Biochemical parameters are decisive indicators of organ dysfunction or damage. Renal toxicity is indicated by elevated levels of creatinine, urea and uric acid in the bloodstream due to the scarce clearance of these residues by compromised kidneys (Feriani et al., 2017), whereas the serum enzymes AST and ALT are considered to be sensitive markers of hepatocyte toxicity and their increased activity indicates hepatic injury (Ramaiah, 2011). In our study, all the biochemical parameters used to evaluate liver and kidney functions were found to comply with levels considered non-toxic (Brondani et al., 2017). The results of this work suggest that the EEMN does not present nephrotoxicity, since the BUN dosage decreased in males (1000 mg/kg), being in agreement with the literature (Brondani et al., 2017).

Subacute treatment showed a decrease in AST in males (750 and 1000 mg/kg) and females (1000 mg/kg), suggesting that EEMN does not cause hepatotoxicity and may still have some hepatoprotective properties (Brondani et al., 2017; Silva et al., 2016). In an *in vitro* study, Tag (2015) observed that *M. nigra* has a

hepatoprotective action, we believe that this activity can be justified by the presence of quercetin and caffeic acid, compounds that are known as liver protectors (Zhao et al., 2014; Ali et al., 2016).

Prolonged administration of EEMN showed a reduction in total cholesterol in females (750 and 1000 mg/kg), corroborating with our study, Volpato et al. (2011) showed that the aqueous extract of *M. nigra* caused a reduction in cholesterol levels in rats descendants of diabetic lineages, such fact was justified due to the high concentration of flavonoids found in the leaves of *M. nigra*. This result suggests that *M. nigra* may be useful in the prevention and treatment of pathologies associated with hyperlipidemia. Caffeic acid and quercetin have been associated with a hypcholesterolemic effect through different metabolic pathways, regulating hepatic cholesterol metabolism, mainly through the pathway that promotes the conversion of cholesterol to bile acid and cholesterol efflux (Hsieh et al., 2016; Zhang et al., 2016). Quercetin also showed lowering of cholesterol levels by inhibition of the NF- $\kappa$ B pathway associated with the reduction of oxidative stress (Carrasco-Pozo et al., 2016).

Regarding the altered leukocyte parameters, all are shown in accordance with the literature, demonstrated as physiological changes without indicative of pathologies (Brondani et al., 2017).

The decrease of LPO is considered an important mechanism of cellular damage resulting from the action of free radicals, therefore, its non-alteration associated with the increase of antioxidant enzymes has been related to beneficial health effects, since the increase of the antioxidant action promoted by the enzymes can control the production of free radicals (Emad et al., 2017; Shahid et al., 2017). In this study, we observed that EEMN increased renal and hepatic CAT measurements without altering LPO levels, suggesting that *M. nigra* does not contribute to oxidative stress. According to Iqbal et al. (2012), *M. nigra* exerts superiority in antioxidant capacity *in vitro* when compared to other species of the genus *Morus*, exerting great preventive potential in pathologies, this fact was later confirmed by Sánchez-Salcedo et al. (2017).

The differences found between males and females can be explained by the hormonal actions that occur in the physiology of sex. Stanimirovic et al. (2016) justifies such changes due to the effects of estradiol on different etabolic pathways.

Recent study have demonstrated the effects of sex hormones on metabolism, which can act as modulators in different pathways, thus altering lipid and carbohydrate metabolism, which may result in different biochemical and hemodynamic responses, thus corroborating our results (Afonso- Pereira et al., 2016).

## 5 Conclusion

The present investigation showed that EEMN contains the phenolic compounds quercetin and caffeic acid as major compounds, respectively. In addition, our results demonstrate that the EEMN did not present significant toxic effects when administered orally to male and female rats. Furthermore, the extract presented potentially protective action against oxidative processes, also showed hypcholesterolemic activity and possible neuroprotection, thus, it is shown as a promising natural source to be used in pharmacology.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES/Brazil and Bioclin/Quibasa for the donation of commercial kits.

## References

- Aebi H.E., 1984. Catalase *in vitro*. Methods. Enzymol., (105), 121-126. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- Afonso-Pereira, F., Murdan, S., Sousa, J., Veiga, F., Basit, A.W., 2016. Sex differences in excipient effects: Enhancement in ranitidine bioavailability in the presence of polyethylene glycol in male, but not female, rats. Int. J. Pharm., 506 (1–2), 237–241. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.04.022>
- Ali, F.T., Hassan, N.S., Abdrabou, R.R., 2016. Hepatoprotective and antiproliferative activity of moringinine, chlorogenic acid and quercetin. Int. J. Res. Med. Sci., 4 (4), 1147–1153. DOI: [10.18203/2320-6012.ijrms20160799](https://doi.org/10.18203/2320-6012.ijrms20160799)
- Brazil. Brazilian Ministry of Health [Official Website of the Health Ministry of Brazil]. RENISUS – National List of Medicinal Interest to SUS. May 10, 2009. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf> (accessed 03.06.17).

Brondani, J.C., Reginato, F.Z., Brum, E.S., Vencato, M.S., Lhamas, C.L., Viana, C., Rocha, M.I.U.M., Bauermann, L.F., Manfron M.P., 2017. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. *J. Ethnopharmacol.*, 202, 147–153. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.03.011>

Carrasco-Pozo, C., Tan, K.N., Farias, M.R., Jara, N.D.L., Ngo, S.T., Garcia-Diaz, D.F., Llanos, P., Cires, M.J., Borges, K., 2016. The deleterious effect of cholesterol and protection by quercetin on mitochondrial bioenergetics of pancreatic  $\beta$ -cells, glycemic control and inflammation: *In vitro* and *in vivo* studies. *Redox Biol.*, 9, 229–243. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.08.007>

Chanda, S., Parekh, J., Vaghasiya, Y., Dave, R., Baravalia, Y., Nair, R., 2015. Medicinal plants - from traditional use to toxicity assessment: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.*, 6 (7), 2652–2670. DOI: [10.13040/IJPSR.09758232.6\(7\).2652-70](https://doi.org/10.13040/IJPSR.09758232.6(7).2652-70)

Dere, E., Huston, J.P., Silva, M.A.S., 2005. Integrated memory for objects, places, and temporal order: Evidence for episodic-like memory in mice. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 84 (3), 214-221. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nlm.2005.07.002>

Deshmukh , R., Kaundal, M., Bansal, V., Samardeep., 2016. Caffeic acid attenuates oxidative stress, learning and memory deficit in intra-cerebroventricular streptozotocin induced experimental dementia in rats. *Biomed. Pharmacother.*, 81, 56–62. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.03.017>

Emad, S., Qadeer, S., Sadaf, S., Batool, Z., Haider, S., Perveen, T., 2017. Attenuation of stress induced memory deficits by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rats: Role of antioxidant enzymes. *Pharmacol. Rep.*, 69 (2), 300–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.009>

Feriani, A., Contreras, M.M., Talhaoui, N., Gómez-Caravaca, A.M., Taamalli, A., Segura-Carretero, A., Ghazouani, L., 2017. Protective effect of *Globularia alypum* leaves against deltamethrininduced nephrotoxicity in rats and determination of its bioactive compounds using high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem quadrupole–time-of-flight mass spectrometry. *J. Funct. Foods*, 32, 139–148. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.02.015>

Freitas, M.M., Fontes, P.R., Souza, P.M., Fagg, C.W., Guerra, E.N.S., Nóbrega, Y.K.M., Silveira, D., Bazzo, Y.F., Simeoni, L.A., Mello, M.H., Magalhães, P.O., 2016. Extracts of *Morus nigra* L. Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. *PLoS ONE*, 11 (9). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0163130>

Hsieh, Y.L., Yeh, Y.H., Lee, Y.T., Huang, C.Y., 2016. Dietary potato peel extract reduces the toxicity of cholesterol oxidation products in rats. *J. Funct. Foods*, 27, 461–471. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.09.019>

Iqbal, S., Younas, U., Sirajuddin, Chan, K.W., Sarfraz, R.A., Uddin, K., 2012. Proximate Composition and Antioxidant Potential of Leaves from Three Varieties of

Mulberry (*Morus* sp.): A Comparative Study. Int. J. Mol. Sci., 13 (6), 6651–6664. DOI: [10.3390/ijms13066651](https://doi.org/10.3390/ijms13066651)

Jayesh, K., Helen, L.R., Vysakh, A., Binil, E., Latha, M.S., 2017. *In vivo* toxicity evaluation of aqueous acetone extract of *Terminalia bellirica* (Gaertn.) Roxb. Fruit. Regul. Toxicol. Phar., 86, 349-355. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.04.002>

Jiang, Y., Dai, M., Nie, W.J., Yang, X.R., Zeng, X.C., 2017. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra* L.) fruit on experimental atherosclerosis in rats. J. Ethnopharmacol., 200, 228-235. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.037>

Jiāo, Y., Wang, X., Jiang, X., Kong, F., Wang, S., Yan, C., 2017. Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet-and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. J. Ethnopharmacol., 99, 119–127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.003>

Khalid, N., Fawad, S.A., Ahmed, I., 2011. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. Pak. J. Bot., 43, 91–96.

Kurniati, N.F., Suryani, G.P., Sigit, J.I., 2014. Vasodilator effect of ethanolic extract of mulberry leaves (*Morus alba* L.) in rat and rabbit. Procedia Chem., 13, 142-146. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.proche.2014.12.018>

Kostić, D.A., Dimitrijević, D.S., Mitić, S.S., Mitić, M.N., Stojanović, G.S., Živanović, A.V., 2013. A survey on macro- and micro-elements, phenolic compounds, biological activity and use of *Morus* spp. (Moraceae). Fruits, 68 (4), 333-347. DOI: <https://doi.org/10.1051/fruits/2013079>

Lakshmanan, H., Raman, J., Pandian, A., Kuppamuthu, K., Nanjian, R., Sabaratnam, V., Naidu, M., 2016. Aqueous extract of *Senecio candicans* DC induce liver and kidney damage in a sub-chronic oral toxicity study in Wistar rats. Regul. Toxicol. Pharmacol., 79, 25-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.010>

Mehta, V., Parashar, A., Sharma, A., Singh, T.R., Malairaman, U., 2017. Quercetin ameliorates chronic unpredicted stress-mediated memory dysfunction in male Swiss albino mice by attenuating insulin resistance and elevating hippocampal GLUT4 levels independent of insulin receptor expression. Horm. Behav., 89, 13–22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2016.12.012>

Miranda, M.A., Vieira, G.D., Alves, M.S., Yamamoto, C.H., Pinho, J.J.R.G., Sousa, O.V., 2010. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais, Brasil. HU Revista, 36 (1), 61–68.

Mohiuddin, E., Usmanghani, K., Akram, M., Asif, H.M., Akhtar, N., Shah, P.A., Uzair, M., 2011. *Morus nigra* - L. A. J. Med. Plant. Res., 5 (20), 5197-5199.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development., (2001). Guideline for testing of chemicals: Acute oral toxicity-acute toxic class method. Adopted 423: 1-14.

OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development., (2008). Guideline for the testing of chemicals: Repeated dose 28-day oral toxicity in rodents. Adopted 407: 1-13.

Ohkawa, H. Ohishi, H., Yagi, K., 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95 (2), 351–358. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

Oliveira, A.M., Mesquita, M.S., Silva, G.C., Lima, E.O., Medeiros, P.L., Paiva, P.M.G., Souza, I.A., Napoleão, T.H., 2015. Evaluation of Toxicity and Antimicrobial Activity of an Ethanolic Extract from Leaves of *Morus alba* L. (Moraceae) J. Evid. Based Complementary Altern. Med., 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/513978>

Padilha, M.M., Vilela, F.C., Rocha, C.Q., Dias, M.J., Soncini, R., Alves-da-Silva, G., Giusti-Paiva, A., 2010. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytother. Res.*, 24, 1496–1500. DOI: [10.1002/ptr.3134](https://doi.org/10.1002/ptr.3134)

Palle, S., Neerati, P., 2017. Quercetin nanoparticles attenuates scopolamine induced spatial memory deficits and pathological damages in rats. *Bull. Fac. Pharm. Cairo Univ.*, 55 (1), 101–106. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.10.004>

Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. *Clin. Lab. Med.*, 31 (1), 161–172. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2010.10.004>

Sánchez-Salcedo, E.M., Amorós, A., Hernández, F., Martínez, J.J., 2017. Phytochemical properties of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves, a new food supplement. *J.F.N.R.*, 5 (4), 253-261. DOI: [10.12691/jfnr-5-4-7](https://doi.org/10.12691/jfnr-5-4-7)

Sassa S., 1982. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. *Enzyme*, 28 (2-3), 133-145.

Shahid, F., Farooqui, Z., Rizwan, S., Abidi, S., Parwez, I., Khan, F., 2017. Oral administration of *Nigella sativa* oil ameliorates the effect of cisplatin on brush border membrane enzymes, carbohydrate metabolism and antioxidant system in rat intestine. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 69 (5), 299–306. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.etp.2017.02.001>

Silva, A.R.H., Reginato, F.Z., Guex, C.G., Figueiredo, K.C., Araldi, I.C.C., Freitas, R.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Mazzanti, C.M.A., Hübscher, G.H., Bauermann, L.F., 2016. Acute and sub-chronic (28 days) oral toxicity evaluation of tincture *Baccharis trimera* (Less) Backer in male and female rodent animals. *Regul. Toxicol. Phar.*, 74, 170-177. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.10.024>

Stanimirovic, J., Obradovic, M., Jovanovic, A., Milovanovic, E.S., Zafirovic, S., Pitt, S.J., Stewart, A.J., Isenovic, E.R., 2016. A high fat diet induces sex-specific

differences in hepatic lipid metabolism and nitrite/nitrate in rats. Nitric Oxide, 54, 51–59. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.02.007>

Sun, M., Zigman, S., 1978. An improved spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on epinephrine autoxidation. Anal. Biochem., 90 (1), 81-89. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90010-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90010-6)

Tag, H.M., 2015. Hepatoprotective effect of mulberry (*Morus nigra*) leaves extract against methotrexate induced hepatotoxicity in male albino rat. BMC Complement. Altern. Med., 15, (1). DOI: 10.1186/s12906-015-0744-y

Thabti, I., Elfalleh, W., Hannachi, W., Ferchichi, A., Campos, M.G., 2012. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. J. Funct. Foods, (4), 367-374. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2012.01.006>

Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N.A., Yaman, S.O., Akbulut, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., Deger, O., 2017. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. Saudi Pharm. J., 25 (2), 241-248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>

Volpato, G.T., Calderon, I.M.P., Sinzato, S., Campos, K.E., Rudge, M.V.C., Damasceno, D.C., 2011. Effect of *Morus nigra* aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin induced diabetic rats. J. Ethnopharmacol., 138 (3), 691–696. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.09.044>

Wang, S., Liu, X.M., Zhang, J., Zhang, Y.Q., 2014. An Efficient Preparation of Mulberroside A from the Branch Bark of Mulberry and Its Effect on the Inhibition of Tyrosinase Activity. PLoS One, 9 (10). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0109396>

Zhang, M., Xie, Z., Gao, W., Pu, L., Wei, J., Guo, C., 2016. Quercetin regulates hepatic cholesterol metabolism by promoting cholesterol-to-bile acid conversion and cholesterol efflux in rats. Nutr Res., 36 (3), 271–279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2015.11.019>

Zhao, J., Zhang, Z., Dai, J., Wang, L., Zhang, C., Ye, Y., Li, L., 2014. Synergistic protective effect of chlorogenic acid, apigenin and caffeic acid against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in male mice. RSC Adv., 4, 43057–43063. DOI: [10.1039/C4RA07261H](https://doi.org/10.1039/C4RA07261H)

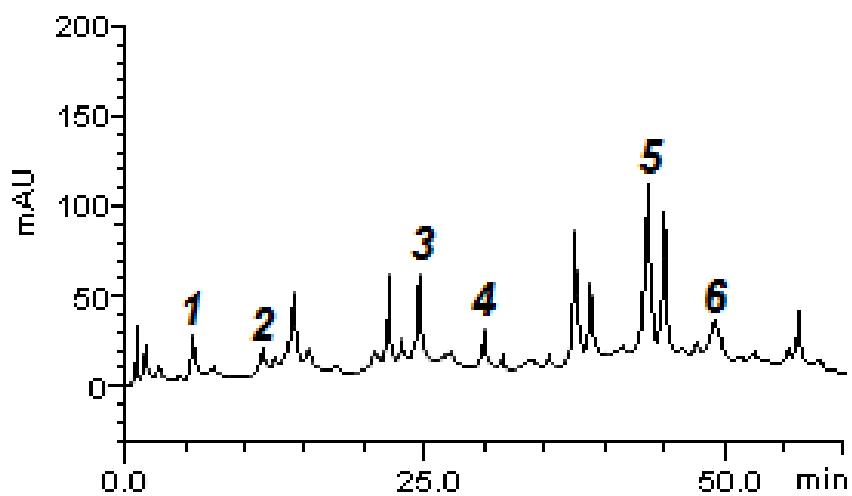
Zheng, X.K., Cao, Y.G., Ke, Y.Y., Zhang, Y.L., Li, F., Gong, J.H., Zhao, X., Kuang, H.X., Feng, W.S., 2017. Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* L. and their cardioprotective activity *in vitro*. Phytochemistry, 135, 128-134. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2016.12.006>

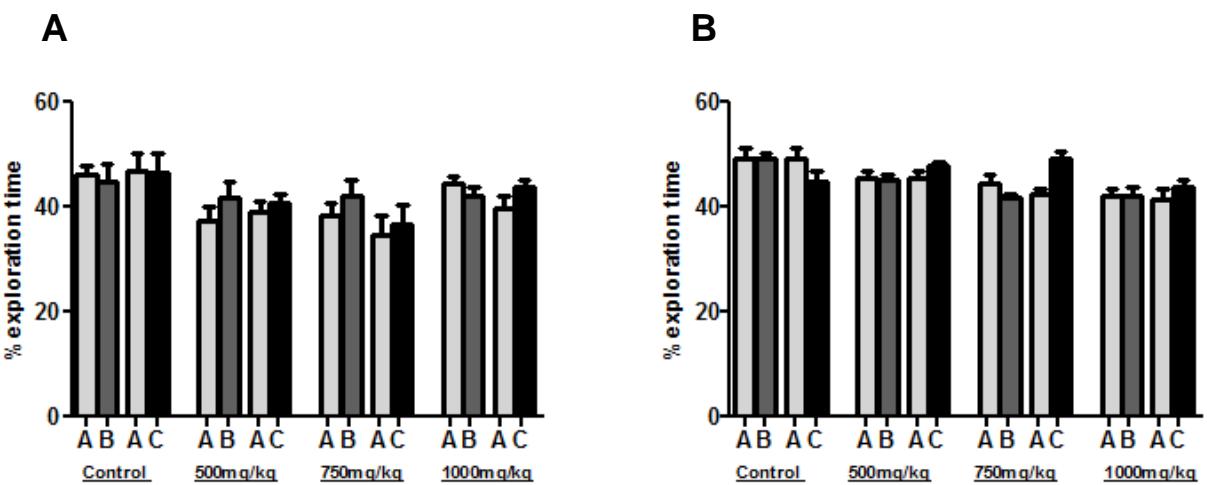
## Legends

**Figure 1.** Representative high performance liquid chromatography profile of EEMN detection UV was at 327 nm. Cyanidin ( $t_R = 6,03$  min; peak 1), catechin ( $t_R = 11,47$  min; peak 2), caffeic acid ( $t_R = 24,86$  min; peak 3), coumaric acid ( $t_R = 29,15$  min; peak 4), quercetin ( $t_R = 43,79$  min; peak 5) e kaempferol ( $t_R = 48,91$  min; peak 6).

**Figure 2.** Effects of EEMN on Object Recognition Memory. The rats were exposed to two different objects (A e B) for 5 minutes in the training session. Twenty-four hours later a long-term memory test was performed: The animals were exposed to a familiar object (A) and a new object (C) for 5 minutes. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. of the percentage of operating time to a particular object in relation to the total operating time. A t-test was performed and later for comparison between groups, posterior one-way ANOVA followed by Tukey test (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . A = female and B = male.

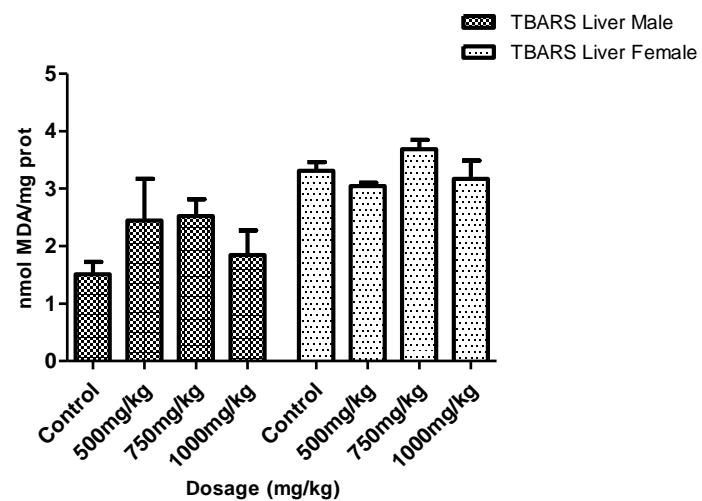
**Figure 3.** Effects of EEMN on hepatic tissue (C1, D1) and renal (C2, D2) of mice in a 28-day repeat dose oral toxicity study. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA variance test followed by Tukey test (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Thiobarbituric Acid Reactive Substances (TBARS) and Catalase activity (CAT). TBARS levels expressed in nmol MDA/mg protein. CAT activity expressed in U CAT/mg PTN. \*Different from the control group

**Figure 1.**

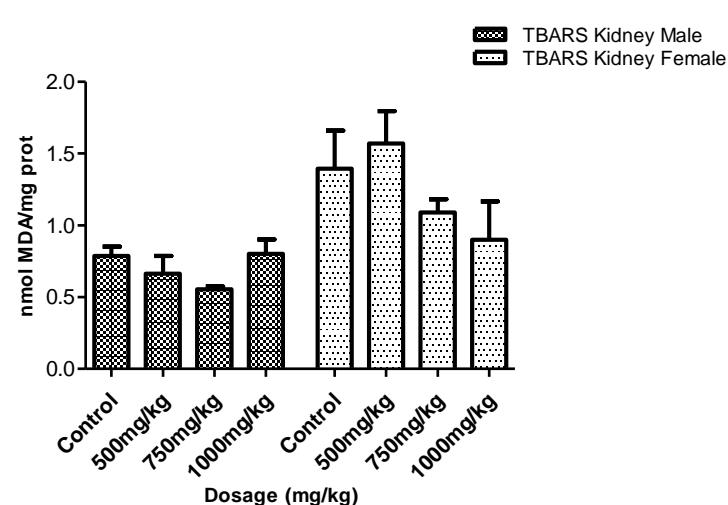
**Figure 2.**

**Figure 3.**

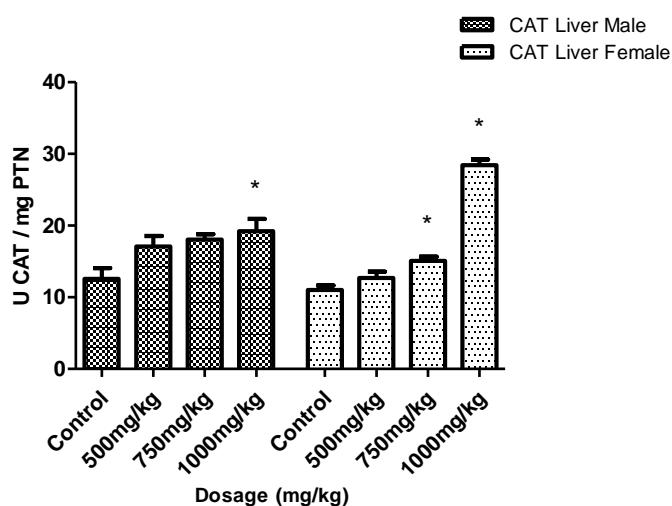
C1



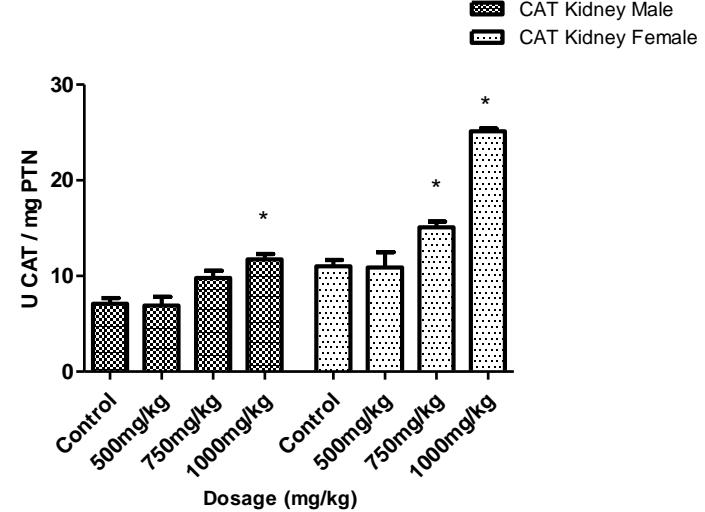
C2



D1



D2



**Table 2** Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of *Morus nigra* L. leaves on biochemical parameters (serum analysis) of Wistar rats.

Sex	Biochemical parameters	Study group			
		Control	500 mg/kg	750 mg/kg	1000 mg/kg
Male	GLU (mg/dL)	205.40±21.87	244.20±47.92	242.40±59.07	242.00±53.77
	Chol (mg/dL)	73.20 ±10.66	69.20± 9.88	73.20± 18.86	67.20± 6.05
	BUN (mg/dL)	57.94±2.90	54.16±4.80	54.96±5.80	49.64±3.66*
	CRE (mg/dL)	0.78±0.08	0.66±0.05	0.68±0.04	0.68±0.08
	AST (U/L)	108.40±12.01	105.80±19.92	95.80±6.38*	89.80±4.65*
	ALT (U/L)	43.80±4.71	43.80±6.22	41.40±5.85	37.40±6.69
	PPT (g/dL)	6,36±0,41	6,08±0,52	6,14±0,15	6,04±0,27
Female	GLU (mg/dL)	180.80±52.98	248.60±40.35	214.00±27.02	204.80±35.45
	Chol (mg/dL)	101.80±9.12	92.60±11.70	76.50±10.80*	79.40±9.45*
	BUN (mg/dL)	60.28±7.51	58.92±5.13	53.18±3.51	58.90±5.29
	CRE (mg/dL)	0.62±0.08	0.62±0.08	0.70±0.0	0.66±0.08
	AST (U/L)	104.50 ±7.85	95.40±9.96	94.75 ±2.66	79.00±9.22*
	ALT (U/L)	45.80±11.39	54.00±19.54	42.75±9.811	39.00±5.33
	PPT (g/dL)	6.28±0.75	6.14±0.84	6.47±0.67	6.66±0.68

Results are expressed as mean ± S.D. One-way ANOVA variance test was performed followed by Tukey or Kruskal-Wallis test followed by Dunns, when appropriate (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when p <0.05. Blood sugar levels (GLU), total cholesterol (Chol), blood urea nitrogen (BUN), creatinine (CRE), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total protein (PPT). \*Different from the control group.

**Table 3** Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of *Morus nigra* L. leaves of leukocyte parameters (total and differential cell count) in Wistar rats.

Sex	Leucocytes parameters	Study group			
		Control	500 mg/kg	750 mg/kg	1000 mg/kg
Male	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	8.78 $\pm$ 2.22	10.02 $\pm$ 1.88	10.74 $\pm$ 1.83	10.52 $\pm$ 1.65
	Lymphocytes (%)	78.00 $\pm$ 4.84	72.00 $\pm$ 5.47	75.80 $\pm$ 2.95	77.20 $\pm$ 2.38
	Neutrophils (%)	15.00 $\pm$ 3.31	20.60 $\pm$ 7.63*	19.60 $\pm$ 3.84	17.40 $\pm$ 2.70
	Monocytes (%)	5.80 $\pm$ 3.42	2.80 $\pm$ 3.11	2.20 $\pm$ 1.09	4.20 $\pm$ 1.30
	Eosinophils (%)	1.00 $\pm$ 0.70	0.40 $\pm$ 0.54	1.80 $\pm$ 0.83	1.20 $\pm$ 1.0
	Basophils (%)	0.20 $\pm$ 0.44	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
	BC (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.44	0.60 $\pm$ 0.89	0.0 $\pm$ 0.0
Female	WBC ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	12.62 $\pm$ 3.62	9.76 $\pm$ 1.09	10.42 $\pm$ 2.18	6.76 $\pm$ 1.59*
	Lymphocytes (%)	77.20 $\pm$ 9.91	75.60 $\pm$ 8.38	73.60 $\pm$ 2.96	75.00 $\pm$ 6.40
	Neutrophils (%)	15.00 $\pm$ 6.81	18.20 $\pm$ 7.05	19.40 $\pm$ 2.60	19.00 $\pm$ 6.00
	Monocytes (%)	5.80 $\pm$ 2.38	4.60 $\pm$ 2.30	5.20 $\pm$ 1.48	4.00 $\pm$ 2.73
	Eosinophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.03 $\pm$ 0.05	0.0 $\pm$ 0.0	0.009 $\pm$ 0.02
	Basophils (%)	0.0 $\pm$ 0.0	0.40 $\pm$ 0.54	0.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.44
	BC (%)	0.20 $\pm$ 0.44	0.0 $\pm$ 0.0	0.20 $\pm$ 0.44	0.0 $\pm$ 0.0

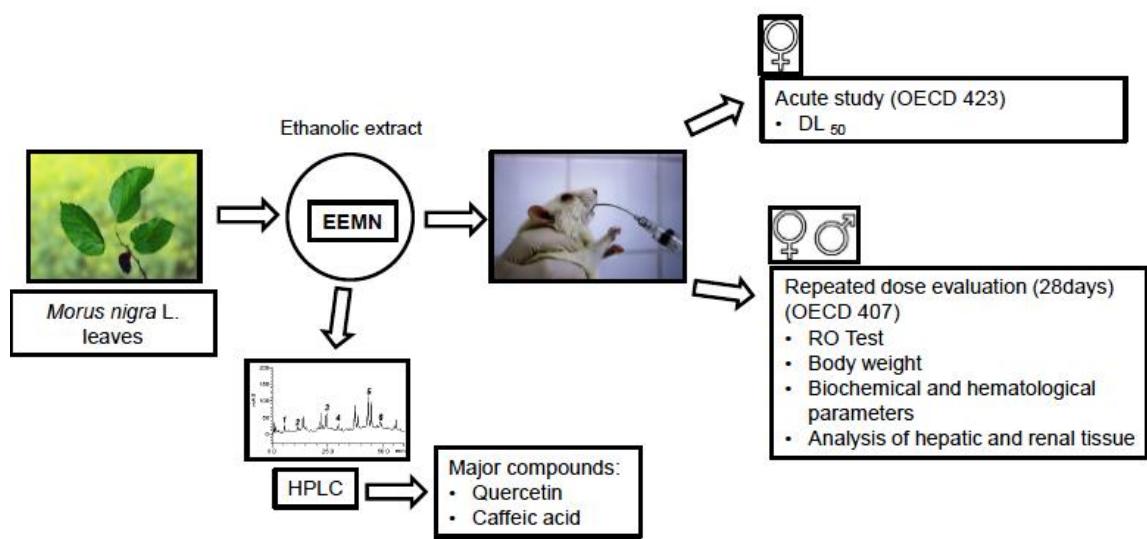
Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA variance test was performed followed by Tukey or Kruskal-Wallis test followed by Dunns, when appropriate (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Total white blood cell count (WBC), band cell (BC). \*Different from the control group.

**Table 4** Effects of oral administration (28 days) of ethanolic extract of *Morus nigra* L. leaves of erythrocyte parameters and platelet levels in Wistar rats.

Sex	Erythrocytes parameters	Study group			
		Control	500 mg/kg	750 mg/kg	1000 mg/kg
Male	RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.88 $\pm$ 0.24	8.98 $\pm$ 0.36	8.68 $\pm$ 0.64	8.81 $\pm$ 0.41
	HBG (g/dL)	14.38 $\pm$ 0.42	14.66 $\pm$ 0.19	14.14 $\pm$ 0.57	14.26 $\pm$ 0.49
	HCT (%)	47.60 $\pm$ 1.51	48.80 $\pm$ 0.44	47.20 $\pm$ 1.92	48.40 $\pm$ 2.40
	MCV (fL)	53.36 $\pm$ 0.74	53.94 $\pm$ 1.83	54.42 $\pm$ 2.47	54.88 $\pm$ 0.54
	PPT (g/dL)	6.56 $\pm$ 0.21	6.80 $\pm$ 0.14	6.68 $\pm$ 0.22	6.64 $\pm$ 0.21
	MCHC (g/dL)	30.28 $\pm$ 0.10	30.00 $\pm$ 0.47	29.94 $\pm$ 0.55	29.44 $\pm$ 0.50
	RDW (%)	13.34 $\pm$ 0.78	13.52 $\pm$ 0.64	12.84 $\pm$ 1.19	12.90 $\pm$ 1.07
	PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1.431 $\pm$ 0.08	1.306 $\pm$ 0.06	1.206 $\pm$ 0.27	1.201 $\pm$ 0.20
Female	RBC( $\times 10^6/\mu\text{L}$ )	8.32 $\pm$ 0.26	8.63 $\pm$ 0.08	8.45 $\pm$ 0.58	8.21 $\pm$ 0.59
	HBG (g/dL)	14.08 $\pm$ 0.48	14.52 $\pm$ 0.71	13.90 $\pm$ 1.36	13.26 $\pm$ 0.66
	HCT (%)	46.60 $\pm$ 1.51	48.80 $\pm$ 1.78	47.00 $\pm$ 3.39	45.00 $\pm$ 2.44
	MCV (fL)	58.04 $\pm$ 0.99	57.94 $\pm$ 2.19	58.20 $\pm$ 2.51	56.36 $\pm$ 2.33
	PPT (g/dL)	6.80 $\pm$ 0.31	7.44 $\pm$ 0.21	6.90 $\pm$ 0.62	6.84 $\pm$ 0.32
	MCHC (g/dL)	30.18 $\pm$ 0.60	29.70 $\pm$ 0.57	29.23 $\pm$ 0.78	29.44 $\pm$ 0.34
	RDW (%)	11.04 $\pm$ 0.15	11.06 $\pm$ 0.88	12.58 $\pm$ 1.90	11.38 $\pm$ 0.65
	PLT ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	1.163 $\pm$ 0.14	1.26 $\pm$ 0.08	1.224 $\pm$ 0.17	1.07 $\pm$ 0.16

Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA variance test was performed followed by Tukey or Kruskal-Wallis test followed by Dunns, when appropriate (N=5). The differences between groups were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Total red cell count (RBC), hemoglobin (HBG), hematocrit (HCT), mean Corpuscular Volume (MCV), total protein (PPT), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), red blood cell amplitude (RDW), platelet count (PLT). \*Different from the control group.

## Graphical abstract



## 2.2 MANUSCRITO 2 - *Morus nigra* LEAVES ATTENUATES HEPATOTOXICITY IN IRON OVERLOAD-INDUCED RATS

O presente manuscrito será submetido ao periódico “*Phytomedicine*”.

### ***Morus nigra* leaves attenuates hepatotoxicity in iron overload-induced rats**

Kassia Caroline Figueiredo<sup>a</sup>, Camille Gaube Guex<sup>a</sup>, Cibele Lima Lhamas<sup>b</sup>, Roberto Marinho Maciel<sup>c</sup>, Gilberti Helena Hübscher Lopes<sup>d</sup>, Liliane de Freitas Bauermann<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>b</sup>Veterinary Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Pathology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>d</sup>Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

### **Corresponding author:**

Kássia Caroline Figueiredo

Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, CEP 97105-900, RS, Brasil.

Tel.: 55-55-3220-9380

E-mail: kassia.tquimica@yahoo.com.br

**Abstract:** *Morus nigra* is a plant popularly known as "amoreira preta", it shows itself as a plant with high antioxidant power, being rich in polyphenols. Iron overload is a clinical condition that causes damage to the liver tissue due to oxidative stress. Therapy to control iron overload is still unsatisfactory. For this, the extract of the leaves of *M. nigra* was tested in iron overload model. For evaluation of iron overload, male Wistar rats were divided into 6 groups. To induce iron overload, the induced groups received iron dextran (50 mg/kg/day) and not overloaded received 0.9% saline intraperitoneal (i.p.). To test treatment, ethanol 53% was used as vehicle. The groups were divided as follows: I (CG): Control group (ethanol 53% - 10 mL/kg); II (IOV): Iron overload + vehicle (ethanol 53% - 10 mL/kg); III (NO500): Non-overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); IV (IO500): Iron overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); V (IO1000): Iron overload + EEMN 1000 mg/kg (10 mL/kg); VI (DFO): Iron overload + DFO (10 mg/kg/day). The vehicle and EEMN were administered by oral gavage, DFO was administered via i.p. They were analyzed body weight, hepatosomatic index (HSI), serum iron, hepatic markers, cytokines, interfering factors in iron metabolism, enzymatic and histopathological evaluations. The experimental model showed increased levels of serum iron, hepcidin, ALT and proinflammatory cytokines (IOV), histopathology showed that iron overload causes damage to the liver tissue. Our findings illustrate a new therapeutic action and economically viable ff the leaves of *M. nigra* in hepatic iron overload, however the compounds in the plant responsible for the pharmacological action still need to be elucidated.

**Keywords:** *Morus nigra*, Iron overload, Hepatotoxicity.

## 1 Introduction

Iron is an essential element, for most living organisms, playing important roles, especially in cellular metabolism and oxygen transport, but in the free form it can be highly harmful, causing damage to biological tissues (Gao et al., 2010; Arosio et al., 2015; Sangartit et al., 2016; Eid et al., 2017).

Physiologically, the organism is not able to increase the excretion of Fe, thus, the progressive increase of the iron contribution leads inevitably to the pathological condition of the iron overload, also known as hemochromatosis (Cançado, 2007; Shander et al. 2012; Gao et al., 2013; Eid et al., 2017).

Excess iron deposition leads to liver impairment, and the main mechanism involved in the pathophysiology of iron overload is lipid peroxidation (LPO), which acts through membrane damage (Corradini and Pietrangelo, 2012; Gao et al., 2013). The iron chelation therapy is shown as the main available alternative for the treatment of patients, however, it is still unsatisfactory due to use restrictions and adverse effects (Kontoghiorghe et al., 2007; Cançado, 2007; Murphy and Oudit, 2010; Meerpohl et al., 2014). Therefore, the investigation for new non-toxic iron chelating agents and by oral administration is still needed, then natural compounds, especially polyphenols, are highlighted in this search (Zhang et al., 2006; Baccan et al., 2012; Gao, 2013; Tang et al., 2014). Thus, research for new oral chelators is essential, in vitro studies suggest that flavonoids and phenolic compounds are possible metal chelators (Baccan et al., 2012; Symonowicz and Kolanek, 2012).

*Morus nigra*, popularly known as "amoreira preta" is a plant well adapted to the brazilian climate, possessing numerous applications in folk medicine (Volpato et al., 2011; Turan et al., 2017). It presents high amount of phenolic compounds like rutin, quercetin, caffeic acid, anthocyanins, kaempferol, and possess important antioxidant activity, providing a protective action against oxidative damage (Özgen et al, 2009; Khalid et al, 2011; Sánchez-Salcedo et al., 2017).

Therefore, due to the characteristics presented by *M. nigra*, it was chosen as the target of our study, where we observed the activity of the ethanolic extract of the leaves of *M. nigra* (EEMN) against a model of iron overload in Wistar rats.

## 2 Materials and methods

## 2.1 Chemicals

The standard product Desferoxamine was purchased from the company (Desferral® Novartis Pharmaceuticals Corporation, USA) and iron dextran was purchased from Ferrodex® Fabiani Saúde Animal LTDA - Santo Amaro, São Paulo, Brazil. All reagents and chemicals used were of high analytical grade.

## 2.2 Plant Material

The EEMN was obtained in 2016 from the company Gamma Comércio, Importação e Exportação LTDA. (Chácara Monte Alegre, São Paulo, SP, Brazil), registered under the number 6699T1/15. For the approval of the quality analysis, the requirements evaluated by the company were: physical chemical analysis (sensory analysis, density, amount of dry residue, pH, alcohol content, tannin identification) and microbiological analysis (total bacterial count, fungus and yeast, presence of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*).

## 2.3 Animals

Male Wistar rats, aged 6 weeks and weighing between 150 - 200g, were obtained from the Biotério Central da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). The animals were randomly distributed in different experimental groups in polypropylene cages with environmental enrichment at a controlled temperature ( $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$ ) in a 12h light/dark cycle and were allowed free access to standard food and filtered water. The study was approved by the Ethics and Animal Welfare Committee of the Federal University of Santa Maria, Brazil (CEUA, UFSM) under no. 9343070616. All procedures were carried out in accordance with the humanitarian principles of animal experimentation.

## 2.4 Experimental design

A total of 48 male Wistar rats were divided into 6 groups ( $n=8$ ), acclimatized for 1 week before the initiation of the experiment. In order to induce iron overload,

induced groups received iron dextran (50 mg/kg/day) via intraperitoneal (i.p.) and non-overload groups received isovolumic saline 0.9% (i.p.). The experimental groups were divided as follows: I (CG): Control group (ethanol 53% - 10 mL/kg); II (IOV): Iron overload + vehicle (ethanol 53% - 10 mL/kg); III (NO500): Non-overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); IV (IO500): Iron overload + EEMN 500 mg/kg (10 mL/kg); V (IO1000): Iron overload + EEMN 1000 mg/kg (10 mL/kg); VI (DFO): Iron overload + DFO (10 mg/kg/day). The vehicle and EEMN were administered by oral gavage. The experiment lasted for six weeks, a time that mimics chronic disease in iron overload and its aggravations (Ibrahim et al., 1979).

At the end of the experiment, animals were submitted to a short period of fasting and anesthetized with sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.), euthanasia was performed by cardiac puncture. The blood collected was used for biochemical analysis, livers were excised and separated for histopathology, and a sample was homogenized in Tris-HCl buffer 50 mM, pH 7.4 (1/10, w/v) and centrifuged at 3.200 g x 10 nim, for analysis of the parameters of oxidative stress in hepatic tissue.

### *2.5 Observation study*

During the treatment, the animals were observed individually, throughout the period of the experiment, totaling 42 days. The consumption of water and food was evaluated. Other observations included changes in the skin and hair, eyes and mucous membranes, respiratory, circulatory, autonomic and central nervous systems and somatomotor activity.

### *2.6 Relationship of body weight and hepatosomatic index*

The animals were weighed on the first day of treatment, on the 21st day corresponding to half the treatment time and on the 42nd day, end of treatment. To calculate the hepatosomatic index (HSI), was use the following formula: HSI = (Liver weight (g)/body weight (g)) × 100.

### *2.7 Assay of iron status and liver markers*

To prove the effectiveness of the experimental treatment, serum iron was determined using a commercial kit (Bioclin® Diagnostic Laboratory K017/Quibasa, Minas Gerais, Brazil), which iron is released from transferrin in acid medium and reduced to its ferrous state by the action of hydroxylamine. Subsequently, it reacts with ferrozine leading to the formation of a violaceous complex. Hepcidin levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay with competitive ELISA Kit (DRG® Instruments GmbH DRG International, Germany).

Serum levels of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured using a commercial kit (Bioclin® Diagnostic Laboratory K048 and K049/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) by an automatic biochemical analyzer (Cobas Mira®).

#### *2.8 Analysis of cytokines and interfering factors in iron metabolism*

For quantification of cytokines and other inflammatory markers, were used kits for sandwich immunoenzymatic assay (ELISA) for Interleukin (IL)-1 $\beta$  (ProteinTech KE00021), IL-6 (ProteinTech KE00007), IL-10 (ProteinTech KE000012), interferon (INT)- $\gamma$  (ProteinTech KE00063) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  (ProteinTech KE00068).

#### *2.9 Reactive Thiobarbituric Acid Substances (TBARS)*

Liver lipoperoxidation (LPO) was estimated using the TBARS assay, which the colorimetric reaction of the LPO product malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA) is quantified. This reaction produces a colored compound that absorbs the maximum at 532 nm, expressed as nmol MDA/mg protein (Ohkawa et al., 1979).

#### *2.10 Catalase activity (CAT)*

Hepatic CAT activity was assayed spectrophotometrically by the method of Aebi (1984), which involves monitoring the consumption of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by CAT in the presence of supernatant at 240 nm. The enzymatic reaction was initiated by adding an aliquot of S1 (50  $\mu$ L) and the substrate (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) at concentration of 0.3 mM in a

medium containing phosphate buffer 50 mM (pH 7.0). The enzyme activity was expressed in units (U CAT/mg protein), where one unit decomposes 1  $\mu$ mol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per minute at pH 7.0 at 25 °C.

#### *2.11 $\delta$ -aminolevulinate dehydratase ( $\delta$ -ALA-D) activity*

Hepatic  $\delta$ -ALA-D activity was assayed by the modified method of Sassa (1982) by measuring the rate of formation of porphobilinogen (PBG), in 100 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 and 2.4 mM of aminolevulinic acid (ALA) were used (Barbosa et al., 1998). Incubations of liver were carried out for 60 min at 37 °C. The reaction product was determined by using modified Ehrlich's reagent at 555 nm, with a molar absorption coefficient of  $6.1 \times 10^4$ /M for the Ehrlich-porphobilinogen salt.

#### *2.12 Histopathological analysis*

Hepatic tissue sections were fixed in 10% formalin, dehydrated and embedded in paraffin for light microscopic examination. Then, were sectioned at 4  $\mu$ m thickness and stained by Hematoxylin and Eosin (H&E) for general histological structure (Drury and Wallington, 1980).

#### *2.13 Statistical analysis*

The results were analyzed using one-way ANOVA, followed by Tukey *post-hoc* test. Kruskal-Wallis followed by the Dunn's *post-hoc* test was used when the requirements for parametric testing were not satisfied. Data are expressed as mean  $\pm$  S.D. The differences between groups were considered statistically significant when p <0.05.

### **3 Results**

#### *3.1 Observation study*

During the treatment period, no mortality in any experimental group, no differences were observed in water consumption and ration when comparing all groups (data not shown).

### *3.2 Body weight and hepatosomatic index (HSI)*

Regarding body weight and HSI, the DFO and IO1000 groups showed increased values when compared to the IOV group (Table 1).

### *3.3 Assay of iron status and liver markers*

Our experimental model showed reduction of serum iron levels and expression of hepcidin in all groups when compared to the IOV group (Figure 1A and B). Administration of iron dextran increased ALT levels when compared to non-overload groups, while the DFO group was able to restore these levels, the IO1000 group showed a decrease in ALT, however was not statistically significant. No changes were observed in levels of AST in any of the groups studied (Figure 1C and D).

### *3.4 Analysis of cytokines and interfering factors in iron metabolism*

Expression of IL-1 $\beta$  and IL-6 decreased in all groups when compared to the IOV group, whereas IL-10 levels were increased in the CG, IO1000 and DFO groups when compared to the IOV group (Figures 2 E, F and G).

INT- $\gamma$  levels statistically decreased in non-overload groups (CG and IO500) when compared to the induced group (IOV), the test groups IO500 and IO1000 maintained levels close to the DFO group. Levels of TNF- $\alpha$  increased in the group that was administered only dextran iron (IOV group) when compared to other groups (Figures 2 H and I).

### *3.5 Estimation of LPO, CAT and $\delta$ -ALA-D activities*

Administration of iron dextran (IOV group) increased LPO levels when compared to the IO500 group, while in the IO500 and IO1000 groups the levels were

similar to the DFO group. The hepatic CAT activity did not present a statistically significant result between groups, however there was an apparent decrease in the IOV group. As for the activity of δ-ALA-D, its levels are decreased in the IOV group, when compared to the groups IO500 and IO1000. It was observed that the EEMN at the dose of 1000 mg/kg was more effective to restore δ-ALA-D activity than the dose of 500 mg/kg (Figures 3 J, K and L).

### *3.6 Histopathological Analysis*

Animals of the groups CG (M) and NO500 (O) showed normal hepatocytes; rats of the group IOV (N) showed hepatocyte derangements and degenerations; rats of DFO (R) group showed improvement in liver damage; rats treated with different doses of EEMN (P, Q) tend to restore normal hepatocyte integrity (Figure 4).

## **4 Discussion**

The high deposition of iron in the hepatocytes leads to inflammatory processes, hepatic injury and in chronic situations may cause fibrosis, cirrhosis, carcinoma, liver failure and death (Das et al., 2016; Eid et al., 2017). In recent studies, medicinal plants with high antioxidant capacity and some isolated natural compounds have been studied as new alternatives for the control of iron overload (Gao et al., 2013; Badria et al., 2015; Sangartit et al., 2016; Das et al., 2016; Bhowmik et al., 2017; Sheikh et al., 2017; Jabeen et al., 2017). Therefore, *M. nigra*, a plant rich in antioxidant compounds (Khalid et al., 2011; Sánchez-Salcedo et al., 2017) was tested against an iron overload model in Wistar rats.

After 42 days of experimentation, we verified that the body weight and HSI were increased in the IO1000 and DFO groups when compared to the IOV group. This result is in agreement with the literature, which the pathological condition of the iron overload can lead to weight loss and hepatomegaly (Sheikh et al., 2017; Das et al., 2016; Cançado, 2007). The treatment with EEMN at dose of 1000 mg/kg was able to control this complication by approximate the values close to those of the DFO group.

Hepcidin is a circulating peptide hormone composed by 25 aminoacids, synthesized in the liver and detectable in the blood, studies evidence hepcidin as the main regulator of iron transport, by the small intestine and macrophages by interaction with the main iron exporter protein: ferroportin (Antunes and Canziani, 2016; Eid et al., 2017). The experimental model showed a reduction of serum iron and hepcidin levels in all groups when compared to the IOV group, similar levels between test groups (IO500, IO1000 and DFO), demonstrating the reliability of the experimental model and that the EEMN may reduce levels of circulating iron.

The ALT and AST transaminases have a large tissue distribution, their increase in serum may be indicative of hepatocellular membrane damage (Liu et al., 2014; Regateiro et al., 2017). The results of this study establish that iron overload may cause an increase in ALT; however, its levels have been recovered in the DFO group, while in the IO1000 group was observed a decrease, although it was not statistically significant. No changes were observed in levels of AST (Figures 1C and D). ALT is found mainly in the hepatocyte cytoplasm, whereas AST is present in the mitochondria, thus, in hepatocellular damage, the first presented in the serum is the cytoplasmic (ALT), this fact explains the different response that we found in our study (Robert and Hustead, 2011).

It is known that pro and anti-inflammatory cytokines, derived from macrophages or T cells, in addition to acute phase proteins, are involved in iron's homeostasis disorders (Eid et al., 2017). IL-1 $\beta$  and IL-6 are able to modulate the translation of ferritin acting on the 5' untranslated portion of ferritin RNAm (Winter et al., 2014). IL-10, an anti-inflammatory cytokine, limits the production of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and INT- $\gamma$ , in order to control the immune response (Nairz et al., 2014; Eid et al., 2017).

Our study showed that treatment with EEMN improved levels of inflammatory markers, by reducing the levels of pro-inflammatory cytokines (IL-1 $\beta$  and 6) and increasing IL-10, an anti-inflammatory cytokine; also, improved TNF- $\alpha$  levels, when compared to the IOV group. Regarding the INT- $\gamma$ , EEMN was able to maintain the levels close to the DFO group. These events indicate that the EEMN can act by decreasing iron serum levels through an anti-inflammatory mechanism, reinforcing its hepatoprotective effect, through the regulation of cytokines. Studies with isolated natural compounds, in similar experimental models, obtained results close to ours

(Zhang et al., 2006; Bhowmik et al., 2017). Thus, in this experimental model, it is believed that the possible antioxidant and anti-inflammatory action of the EEMN plays an important role in the decrease of free iron, consequently, reducing the oxidative damage in the hepatic tissue.

This result is corroborated when it is observed that the levels of LPO in rats of the IOV group are increased when compared to the other groups. Since the production of reactive oxygen species (ROS) catalyzed by iron, mainly hydroxyl radical ( $\text{HO}\cdot$ ), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) and superoxide ion ( $\text{O}_2^-$ ), increases LPO levels, depleting the antioxidant reserves, the LPO it is an important marker of pathological signal (Emad et al., 2017). The antioxidant defense system has the function of reducing the damages caused by the deleterious action of the ROS. CAT is an antioxidant enzyme that plays an important role, preventing the accumulation of  $\text{H}_2\text{O}_2$ . This action is of great importance, since this reactive species, through the reactions of Fenton and Haber-Weiss, and the participation of metals such as iron, culminates in the generation of the  $\text{OH}\cdot$  radical, which there is no enzymatic defense system, so when there is an increase in the antioxidant system, it may be associated with the longevity of living organisms (Ribeiro et al., 2015).

In our study, hepatic CAT activity showed a decrease, however, not statistically significant in the IOV group when compared to the other groups. In study performed by Badria et al (2015), in a model of iron overload and curcumin, was observed that the groups overloaded showed reduced levels of the antioxidant enzyme CAT and LPO levels were shown to be increased, however, these levels were recovered by administration of curcumin, this fact was attributed to the high antioxidant capacity of this natural compound, thus supporting our study.

The  $\delta$ -ALA-D is a thiol enzyme that catalyzes one of the initial reactions of heme biosynthesis, low levels are found in intoxication situations (Oliveira et al., 2016). In the study, the iron-dextran group showed a decrease in the activity of the  $\delta$ -ALA-D enzyme, showing that iron can decrease its activity, while in the IO1000 group the  $\delta$ -ALA-D levels were restored, reinforcing that the EEMN may offer hepatoprotection.

The histopathological analysis corroborates with the rest of our results, showing that the EEMN can attenuate the damage in the hepatic tissue. Thus the leaves of *M. nigra* are shown as a potential source for the decrease of free iron, thus

promoting hepatoprotection. Although it is not clear which component of the EEMN shows this pharmacological activity, a study showed that quercetin, a compound also present in the EEMN, can attenuate hepatotoxicity in iron overload induced by ethanol (Tang et al., 2014).

According to Kontoghiorghe et al. (2015), some polyphenols of the flavonoid class, have iron binding sites, for example, cannaphene, have a  $\alpha$ -ketohydroxy group on the C-ring and a p-ketohydroxy between rings A and C, potential binding sites for iron. Likewise, quercetin contains the same iron binding sites of kerapol, but also contains a metal binding site of the catechol region on the B ring, such structural features, make them potential phytochelators. Fustinoni-Reis et al (2016), when analyzing a brazilian fruit rich in flavonoids, known as “Tucum-do-Cerrado” (*Bactris setosa* Mart.), observed that the antioxidant effect attributed to the fruit can attenuate the oxidative stress in the liver of animals on a high iron diet.

The relationship between the antioxidant properties of polyphenols, associated with their iron-binding properties, is shown as an additional advantage to avoid oxidative stress catalyzed by iron (Kontoghiorghe et al., 2015). Thus, we have shown that the leaves of *M. nigra* play a fundamental role in the attenuation of oxidative stress induced by iron, by improving serum parameters and liver markers. However, the compounds responsible for this activity are not still elucidated, being necessary the analysis of the isolated compounds and possible synergism between compounds.

## 5 Conclusion

The results of the present study demonstrated that EEMN can significantly decrease HSI, improving pathologic complications due to iron overload. Furthermore, it is believed that EEMN can improve hepcidin levels by modulating cytokines. Our findings illustrate a novel therapeutically and economically viable action of *M. nigra* leaves on hepatic iron overload, however the compounds in the plant responsible for the pharmacological action still need to be elucidated.

## References

- H. Aebi **Catalase *in vitro***. Methods Enzymol., 105 (1984), pp. 121-126. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)
- S.A. Antunes, M.E.F. Canziani **Hepcidin: an important iron metabolism regulator in chronic kidney disease**. J. Bras. Nefrol., 38, (3) (2016), pp. 351-355. DOI: [10.5935/0101-2800.2016005314](https://doi.org/10.5935/0101-2800.2016005314)
- P. Arosio, F. Carmona, R. Gozzelino, F. Maccarinelli, M. Poli, **The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection**. Biochem. J., 472 (2015), pp. 1–15. DOI: [10.1042/BJ20150787](https://doi.org/10.1042/BJ20150787)
- M.M Baccan, O.C. Neto, R.M.S. Pereira, B.P. Espósito **Quercetin as a shuttle for labile iron**. J. Inorg. Biochem., 107 (2012), pp. 34–39. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.014>
- F.A. Badria, A.S. Ibrahim, A.F. Badria, A.A. Elmarakby **Curcumin Attenuates Iron Accumulation and Oxidative Stress in the Liver and Spleen of Chronic Iron-Overloaded Rats**. PLoS ONE 10, (7) (2015). DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134156>
- N.V., Barbosa, J.B.T., Rocha, G., Zeni, T., Emanuelli, M.C., Beque, A.L. Braga **Effect of organic forms of selenium on daminolevulinate dehydratase from liver, kidney and brain of adult rats**. Toxicol. Appl. Pharmacol., 149, (1998), pp. 243-253.
- A. Bhowmik, D. Ojha, D. Goswami, R. Das, N.S. Chandra, T.K. Chatterjee, A. Chakravarty, S. Chakravarty, D. Chattopadhyay **Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice**. Biomed. Pharmacother., 87 (2017), pp. 443-450. DOI: [Https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.125](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.125)
- R.D. Cançado **Iron overload and iron chelation in sickle cell disease**. Rev. bras. hematol. hemoter., 29, (3) (2007), pp. 316-326.
- E. Corradini, A. Pietrangelo **Iron and steatohepatitis**. J. Gastroenterol. Hepatol., 27, (2) (2012), pp. 42–46. DOI: [10.1111/j.1440-1746.2011.07014.x](https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2011.07014.x)
- S.K. Das, J. DesAulniers, J.R. Dyck, Z. Kassiri, G.Y. Oudit **Resveratrol mediates therapeutic hepatic effects in acquired and genetic murine models of iron-overload**. Liver Int., 36, (2) (2016), pp. 246–257. DOI: [10.1111/liv.12893](https://doi.org/10.1111/liv.12893)
- R.A.B. Drury, E.A. Wallington **Carleton Histological Technique**. (fifth ed.), Oxford University Press, Oxford, New York, Toronto (1980).
- R. Eid, N.T.T. Arab, M.T. Greenwood **Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms**. BBA-MOL. CELL. RES., 1864, (2) (2017), pp. 399–430. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.12.002>

S. Emad, S. Qadeer, S. Sadaf, Z. Batool, S. Haider, T. Perveen **Attenuation of stress induced memory deficits by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in rats: Role of antioxidant enzymes.** Pharmacol. Rep., 69, (2) (2017), pp. 300–305. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2016.11.009>

A.M. Fustinoni-Reis, S.F. Arruda, L.P.S. Dourado, M.S.B. da Cunha, E.M.A Siqueira **Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa Mart.*) Consumption Modulates Iron Homeostasis and Prevents Iron-Induced Oxidative Stress in the Rat Liver.** Nutrients, 8, (38) (2016), pp. 1-14. DOI: [10.3390/nu8020038](https://doi.org/10.3390/nu8020038)

X. Gao, M. Qian, J.L. Campian, J. Marshall, Z. Zhou, A.M. Roberts, Y.J. Kang, S.D. Prabhu, X.F. Sun, J.W. Eaton **Mitochondrial dysfunction may explain the cardiomyopathy of chronic iron overload.** Free Radic. Biol. Med., 49 (3) (2010), pp. 401-407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.04.033>

Y. Gao, N. Wang , Y. Zhang , Z. Ma, P. Guan, J. Ma, Y. Zhang, X. Zhang, J. Wang, J. Zhang, L. Chu. **Mechanism of protective effects of Danshen against iron overload-induced injury in mice.** J. Ethnopharmacol., 145 (2013), pp. 254–260. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.060>

N.G. Ibrahim, S.T. Hoffstein, M.L. Freedman **Induction of liver cell haem oxygenase in iron-overloaded rats.** Biochem. J., 180 (1979), pp. 257–263.

E. Jabeen, N.K. Janjua, S. Ahmed, I. Murtaza, T. Ali, S. Hameed. **Radical scavenging propensity of Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> complexes of flavonoids and in-vivo radical scavenging by Fe<sup>3+</sup>-primuletin Spectrochimica.** Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc., 171 (2017), pp. 432–438. DOI: [10.1016/j.saa.2016.08.035](https://doi.org/10.1016/j.saa.2016.08.035)

N. Khalid, S.A. Fawad, I. Ahmed **Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra L.*) fresh juice.** Pak. J. Bot., 43, (9) (2011), pp. 91–96.

G.J. Kontoghiorghes **Deferasirox: uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other toxicities.** Expert. Opin. Drug Saf., 6, (3) (2007), pp. 235-239. DOI: [10.1517/14740338.6.3.235](https://doi.org/10.1517/14740338.6.3.235)

C.N. Kontoghiorghe, A. Kolnagou, G.J. Kontoghiorghes **Phytochelators intended for clinical use in iron overload, other diseases of iron imbalance and free radical pathology.** Molecules, 20, (11) (2015), pp. 20841-20872.

Z. Liu, S. Que, J. Xu, T. Peng **Alanine Aminotransferase-Old Biomarker and New Concept: A Review.** Int. J. Med. Sci., 11, (9) (2014), pp. 925-935. DOI: [10.7150/ijms.8951](https://doi.org/10.7150/ijms.8951)

J.J. Meerpohl, L.K. Schell, G. Rücker, E. Motschall, N. Fleeman, C.M. Niemeyer, D. Bassler **Deferasirox for managing transfusional iron overload in people with sickle cell disease.** Cochrane Database Syst. Rev., 5, (5) (2014). DOI: [10.1002/14651858.CD007477.pub3](https://doi.org/10.1002/14651858.CD007477.pub3)

C.J. Murphy, G.Y. Oudit **Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment.** J. Card. Fail., 16 (2010), pp. 888–900 DOI: [10.1016/j.cardfail.2010.05.009](https://doi.org/10.1016/j.cardfail.2010.05.009)

M. Nairz, D. Haschka, E. Demetz, G. Weiss **Iron at the interface of immunity and infection.** Front Pharmacol., 5, (152) (2014). DOI: [10.3389/fphar.2014.00152](https://doi.org/10.3389/fphar.2014.00152)

H. Ohkawa, H. Ohishi, K. Yagi **Assay for lipid peroxide in animal tissues thiobarbituric acid reaction.** Anal. Biochem., 95 (2) (1979), pp. 351–358. DOI: [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(79\)90738-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(79)90738-3)

L.S. Oliveira, G.R. Thomé, T.F. Lopes, K.P. Reichert, J.S. Oliveira, A.S. Pereira, J. Baldissareli, C.C Krewer, V.M. Morsch, M.R.C. Schetinger, R.M. Spanevello **Effects of gallic acid on delta – aminolevulinic dehydratase activity and in the biochemical, histological and oxidative stress parameters in the liver and kidney of diabetic rats.** Biomed. Pharmacother., 84 (2016), pp. 1291–1299. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.021>

M. Özgen, S. Serçe, C. Kaya **Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra L.* and *Morus rubra* fruits.** Sci. Hortic., 119, (3) (2009), pp. 275-279. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2008.08.007>

F.S. Regateiro, S. Belkaya, Né. Neves, S. Ferreira, P. Silvestre, S. Lemos, M. Venâncio, J.L. Casanova, I. Gonçalves, E. Jouanguy, L. Diogo, **Recurrent elevated liver transaminases and acute liver failure in two siblings with novel bi-allelic mutations of NBAS.** Eur. J. Med. Genet., (2017). DOI: [10.1016/j.ejmg.2017.05.005](https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.05.005).

T.P. Ribeiro, C. Fernandes, K.V. Melo, S.S. Ferreira, J.A. Lessa, R.W. Franco, A. Horn **Iron, copper, and manganese complexes with in vitro superoxide dismutase and/or catalase activities that keep *Saccharomyces cerevisiae* cells alive under severe oxidative stress.** Free Radic. Biol. Med., 80, (2015), pp. 67-76.

C.O. Robert, T.R. Hustead **Causes and Evaluation of Mildly Elevated Liver Transaminase Levels.** Am. Fam. Physician., 84, (9) (2011), pp. 1003-1008.

S. Sassa **Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay.** Enzyme, 28 (2-3) (1982), pp.133-145.

E.M. Sánchez-Salcedo, A. Amorós, F. Hernández , J.J. Martínez **Phytochemical properties of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves, a new food supplement.** J.F.N.R., 5 (4) (2017), pp. 253-261. DOI: [10.12691/jfnr-5-4-7](https://doi.org/10.12691/jfnr-5-4-7)

W. Sangartit, P. Pakdeechote, V. Kukongviriyapan, W. Donpunha, S. Shibahara, U. Kukongviriyapan **Tetrahydrocurcumin in combination with deferiprone attenuates hypertension, vascular dysfunction, baroreflex dysfunction, and oxidative stress in iron-overloaded mice.** Vascul. Pharmacol., 87, (2016), pp. 199-208. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vph.2016.10.001>

A. Shander, U. Berth, J. Betta, M. Javidroozi **Iron overload and toxicity: implications for anesthesiologists.** J. Clin. Anesth., 24, (5) (2012), pp. 419–425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclinane.2011.12.005>

N.A. Sheikh, T.R. Desai, P.R. Tirgar **Evaluation of iron chelating and antioxidant potential of Epilobium hirsutum for the management of iron overload disease.** Biomed. Pharmacother., 89, (2017), pp. 1353–1361. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.079>

M.B. Soares, A.P. Izaguirry, L.M. Vargas, A.S.L. Mendez, C.C. Spiazzi, F.W. Santos **Catechins are not major components responsible for the beneficial effect of Camellia sinensis on the ovarian d-ALA-D activity inhibited by cadmium.** Food Chem. Toxicol., 55, (2013), pp. 463–469. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2013.01.032>

M. Symonowicz, M. Kolanek **Flavonoids and their properties to form chelate complexes.** Biotechnol. Food Sci., 76 (2012), pp. 35–41.

Y. Tang, Y. Li, H. Yu, C. Gao, L. Liu, M. Xing, L. Liu; P. Yao **Quercetin attenuates chronic ethanol hepatotoxicity: Implication of “free” iron uptake and release.** Food Chem. Toxicol., 67 (2014), pp. 131–138. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2014.02.022>

P.R. Tirgar, T.R. Desai, **Investigation into iron chelating activity of Triticum aestivum (wheat grass) in iron-dextran induce iron overload model of thalassaemia.** J. Pharm. Res., 4, (9) (2011), pp. 3066–3069.

I. Turan, S. Demir, K. Kilinc, N.A. Burnaz, S.O. Yaman, K. Akbulut, A. Mentese, Y. Aliyazicioglu, O. Deger **Antiproliferative and apoptotic effect of Morus nigra extract on human prostate cancer cells.** Saudi Pharm. J., 25 (2) (2017), pp. 241–248. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>

G.T. Volpato, I.M.P. Calderon, S. Sinzato, K.E. Campos, M.V.C. Rudge, D.C. Damasceno **Effect of Morus nigra aqueous extract treatment on the maternal–fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin induced diabetic rats.** J. Ethnopharmacol., 138 (3) (2011), pp. 691–696.

G. Weiss, V.R. Gordeuk **Benefits and risks of iron therapy for chronic anaemias.** Eur. J. Clin. Invest., 35, (3) (2005), pp. 36–45.

W.E. Winter, L.A. Bazydlo, N.S. Harris, **The molecular biology of human iron metabolism.** Lab. Med., 45, (2) (2014), pp. 92–102.

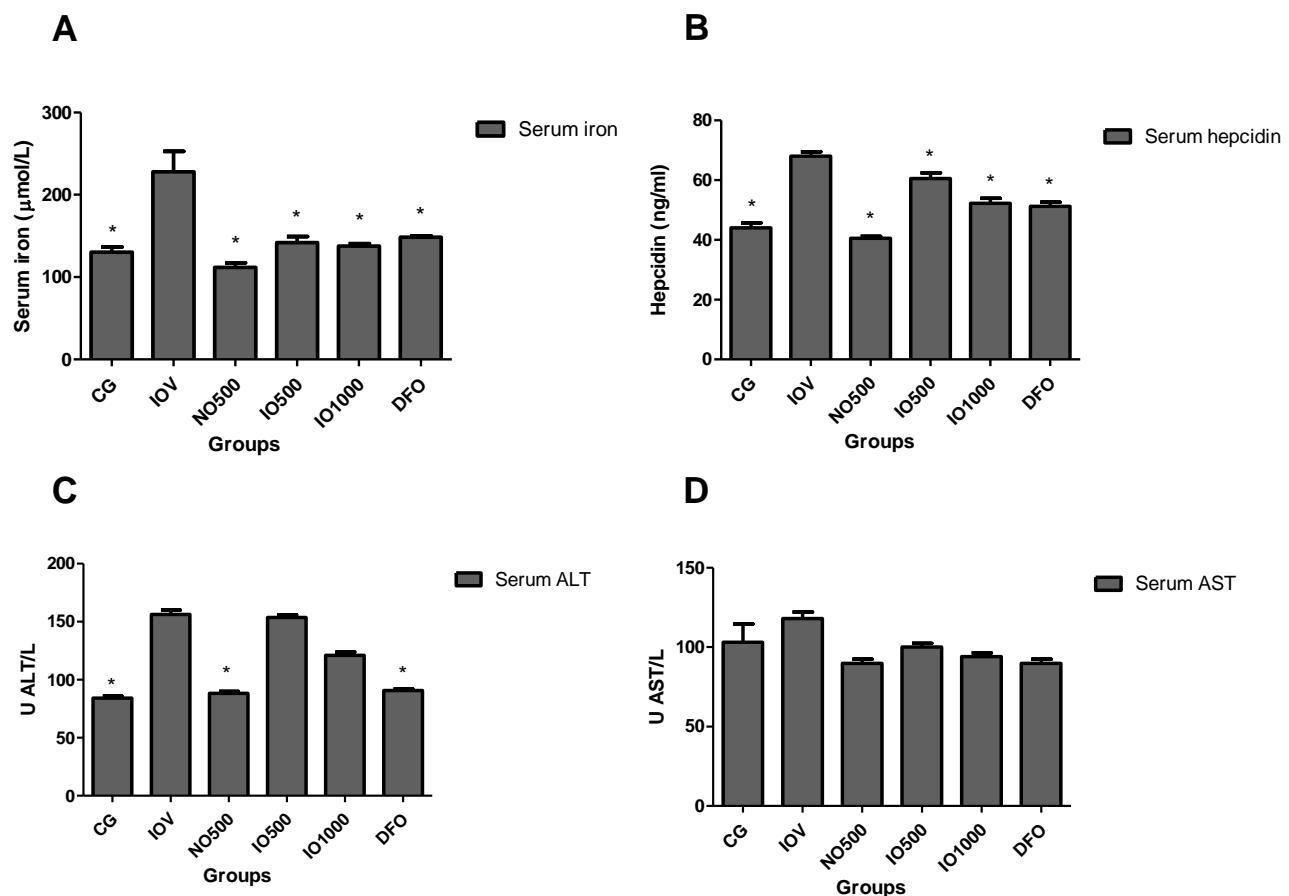
Y. Zhang, H. Li, Y. Zhao, Z. Gao **Dietary supplementation of baicalin and quercetin attenuates iron overload induced mouse liver injury.** Eur. J. Pharmacol., 535, (1–3) (2006), pp. 263–269. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.01.067>

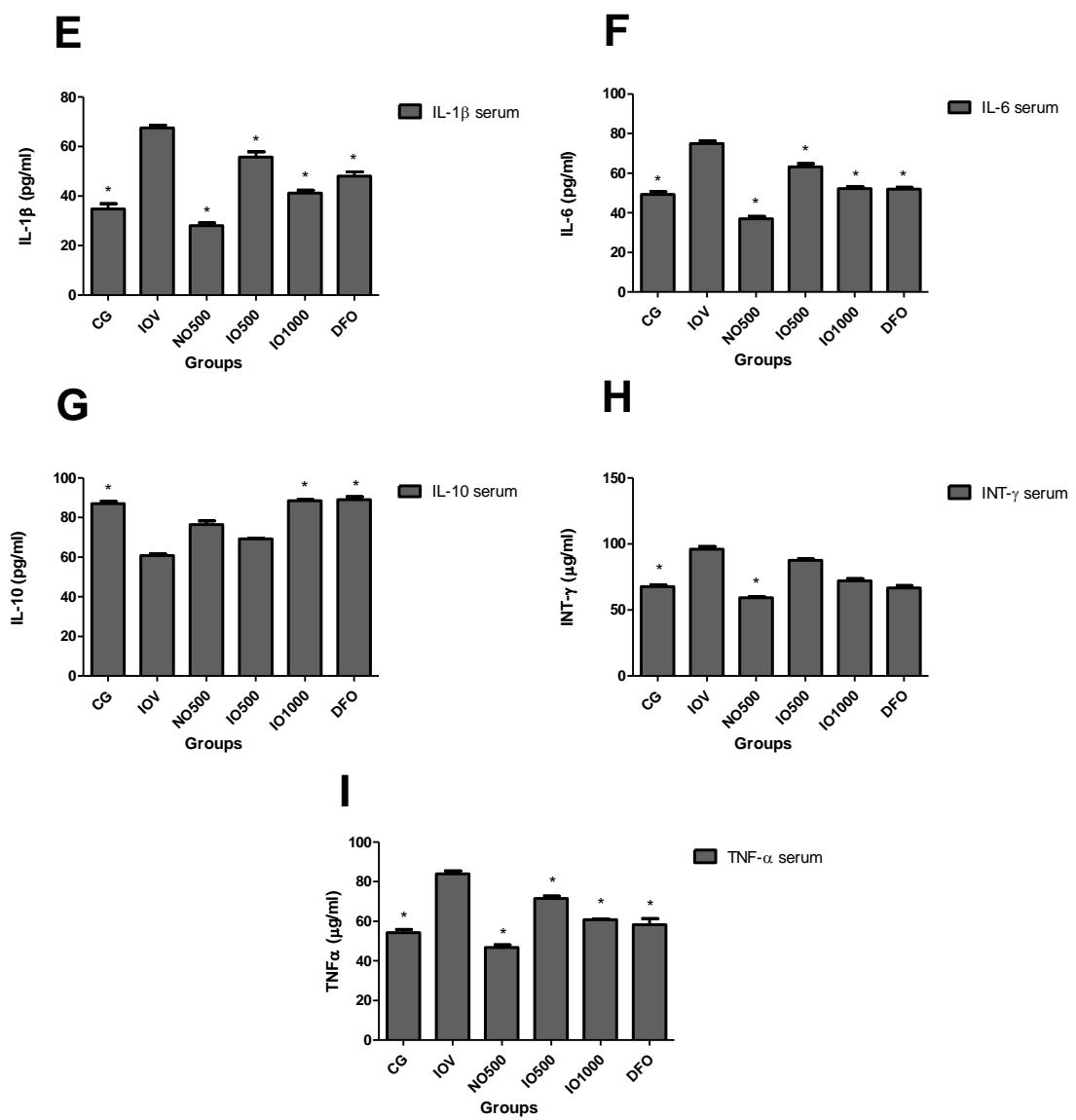
**Table 1** Effect of EEMN on body weight and hepatosomatic index in iron-overloaded rats.

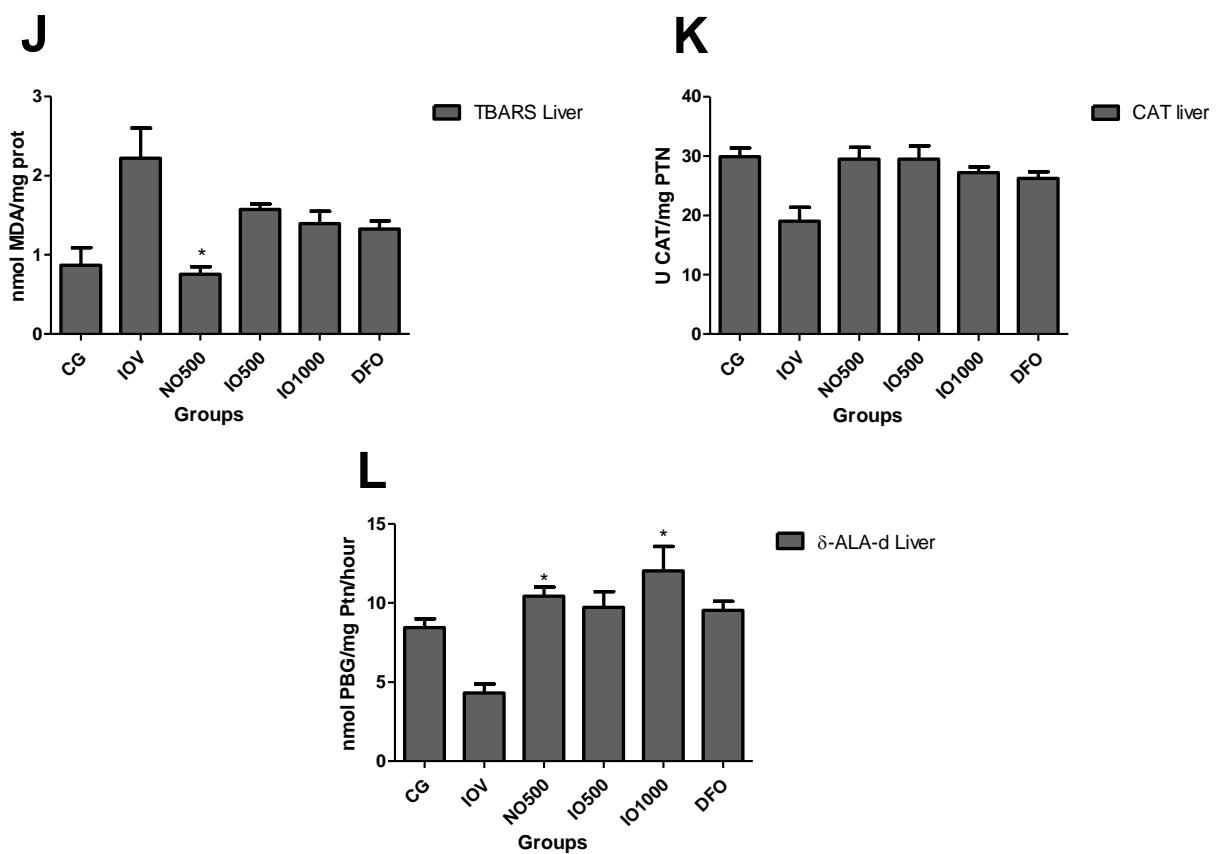
Groups	N	Body weight (g)			HSI (%)
		0th day	21th day	42th day	
CG	8	199,4±14,46	270,1±29,27	370,6±35,00	4,364±0,50
IOV	8	197,5±15,87	250,9±25,89	324,3±28,99	6,632±0,28
NO500	8	196,4±12,79	258,5±13,48	367,9±42,16	4,191±0,83
IO500	8	194,1±18,99	248,4±17,47	378,8±24,07	4,032±0,22
IO1000	8	194,3±15,10	255,8±18,59	384,0±20,78*	3,797±0,36*
DFO	8	192,3±18,88	248,4±23,69	374,0±25,83*	3,672±0,39*

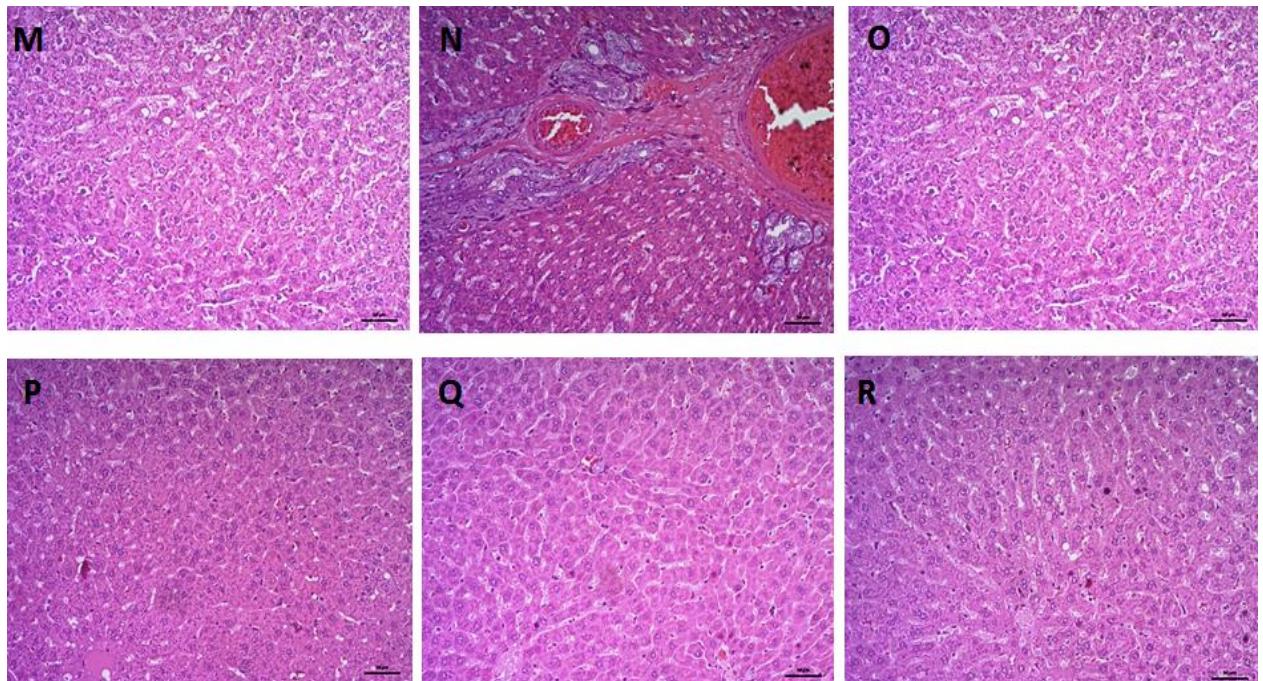
The results are expressed as mean ± S.D (n = 8). HSI (hepatosomatic index).

\* p < 0.01 when compared to IOV group.

**Figure 1**

**Figure 2**

**Figure 3**

**Figure 4**

## Legends

Figure 1. Effects of treatment with EEMN on assessment of body iron and hepatic markers in rats in iron overload. Levels of serum iron (A), serum hepcidin (B), alanine aminotransferase (ALT) (C), aspartate aminotransferase (AST) (D). Serum iron was expressed as umol/L, hepcidin as ng/mL, AST and ALT were expressed as U/L. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's ( $n = 5$ ). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . \* Different from the overload group.

Figure 2. Effects of treatment with EEMN on the evaluation of cytokines and interfering factors in iron metabolism in rats in iron overload. Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) (E), Interleukin 6 (IL-6) (F), Interleukin 10 (IL-10) (G), Interferon gamma (INT- $\gamma$ ) (TNF- $\alpha$ ) (I). IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were expressed as pg/mL, INT- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  as  $\mu$ g / mL. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's ( $n = 5$ ). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . \* Different from the control.

Figure 3. Effects of treatment with EEMN on the evaluation of LPO (J), Catalase (CAT) (K) and  $\delta$ -aminolevulinate dehydratase activities ( $\delta$ -ALA-D) (L) in rats in iron overload. Levels of LPO expressed in nmol MDA/mg protein. CAT activity expressed in U CAT/mg ptn.  $\delta$ -ALA-D activity expressed in nmol PBG/mg ptn/hour. Results are expressed as mean  $\pm$  S.D. One-way ANOVA/Kruskal-Wallis followed by Tukey test/Dunn's ( $n = 5$ ). The values were considered to be significantly different when  $p < 0.05$ . \* Different from the control.

Figure 4. Effects of EEMN on histopathological changes of mouse liver stained with H&E. Representative microscopic photographs of liver stained with H&E (magnification 200). Groups: CG (M), IOV (N), NO500 (O), IO500 (P), IO1000 (Q) e DFO (R).

### 3 DISCUSSÃO

As plantas medicinais são de grande importância para tratamento e prevenção de patologias, principalmente em localidades mais pobres e desprovidas de acesso a outras alternativas de tratamento, porém, muitas vezes são utilizadas indiscriminadamente (VEIGA JUNIOR et al., 2005). Estudos toxicológicos são importantes para validar a segurança e eficácia das plantas medicinais, assim auxiliando o seu uso. Com base nisso, avaliamos o perfil toxicológico do EEMN, através dos protocolos da OECD 407 e 423, onde, avaliaram-se parâmetros bioquímicos e hematológicos *in vivo*, relacionando-a com a composição química identificada na cromatografia.

Os cromatogramas de EEMN revelaram a presença de canferol, cianidina, catequina, ácido cumárico, queracetina e ácido cafeico, sendo os dois últimos, compostos marjoritarios da *M. nigra* apoiando com estudos anteriores (KHALID et al., 2011; SÁNCHEZ-SALCEDO et al., 2017).

No estudo de toxicidade aguda, na dose de 2000 mg/kg o EEMN mostrou não provocar mortalidade nem morbidade nos animais. Assim, o EEMN pode ser classificado na categoria 5, onde estima-se que a dose oral letal aguda é superior a 2000 mg/kg (OECD, 2008).

O tratamento oral subagudo ocorreu no período de 28 dias, nas doses de 500, 750 e 1000 mg/kg, durante o período experimental não foram observados óbitos nem alterações significativas no consumo de água e ração. Ocorreu diminuição da AST em machos (750 e 1000 mg/kg) e fêmeas (1000 mg/kg), redução do colesterol total em fêmeas (750 e 1000 mg/kg), aumento da atividade da CAT renal e hepática sem alterar os níveis de LPO. Nas doses estudadas, o EEMN não apresentou efeitos tóxicos significativos quando administrado oralmente, ainda, apresentou ação potencialmente protetora de órgãos e possui suposta atividade hipocolesterolêmica, assim, mostra-se como uma fonte natural promissora a ser empregada na farmacologia.

A sobrecarga de Fe é um transtorno metabólico, que está relacionado a inúmeras patologias, como diabetes, insuficiência cardíaca, artrite, osteoartrite, osteoporose, cirrose e câncer de fígado, depressão, impotência sexual, infertilidade, hipotiroidismo, hipogonadismo, excesso de Fe no cérebro também está associado a

doenças neurodegenerativas como Alzheimer, início precoce de Parkinson, epilepsia, esclerose múltipla e doença de Huntington (POWELL et al., 2006; BONINI-DOMINGOS, 2007; CANÇADO E CHIATTONE, 2010; BACON et al., 2011; EID et al., 2017).

A terapia quelante de Fe mostra-se como principal alternativa disponível para tratamento dos pacientes, porém, mostra-se ainda insatisfatória, devido às restrições de uso e efeitos adversos (CANÇADO E CHIATTONE, 2010). O uso de plantas (fitoqueladores) para tratamento da sobrecarga de Fe é recente, antioxidantes naturais e plantas ricas em flavonoides tem sido estudadas para este fim (BACCAN et al., 2012), assim, a *M. nigra* foi escolhida como alvo de estudo, onde, observou-se a atividade do EEMN frente a um modelo de sobrecarga de Fe em ratos *Wistar*.

Foram utilizados 48 ratos *Wistar* machos, divididos em 6 grupos (N=8), de modo a induzir sobrecarga de Fe, grupos induzidos receberam ferro dextran (50 mg/kg/dia) via intraperitoneal (i.p.) e grupos controle receberam salina 0,9% (i.p.). Para testar tratamento neste modelo de sobrecarga de Fe, grupos controle receberam etanol 53% (10 mL/Kg/dia) via oral, grupo controle com droga padrão recebeu Desferroxamina (DFO 10 mg/kg/dia i.p.) e grupos testes receberam doses de 500 e 1000 mg/kg/dia de EEMN via oral. O experimento perdurou por seis semanas. Abaixo segue resumo dos grupos experimentais:

- CG) sem sobrecarga de Fe + veículo (etanol 53% 10 mL/kg);
- IOV) com sobrecarga de Fe + veículo (etanol 53% 10 mL/kg);
- NO500) sem sobrecarga de Fe + EEMN na dose de 500 mg/Kg (10 mL/kg);
- IO500) com sobrecarga de Fe + EEMN na dose 500 mg/Kg (10 mL/kg);
- IO1000) com sobrecarga de Fe + EEMN na dose de 1000 mg/Kg (10 mL/kg);
- DFO) com sobrecarga de Fe + DFO (10 mg/kg/dia).

Após 42 dias de experimento, verificou-se que o peso corporal e IHS mostraram-se aumentados nos grupos IO1000 e DFO quando comparado ao grupo IOV e o EEMN na dose de 1000 mg/kg conseguiu controlar esta complicação equiparando-se ao medicamento controle (DFO).

O modelo experimental utilizado mostrou redução dos níveis de Fe sérico e de hepcidina em todos os grupos quando comparado ao grupo IOV, níveis equiparados entre grupos testes, IO500, IO1000 e grupo DFO foram evidenciados. Ocorreu

aumento da ALT no grupo IOV, entretanto, seus níveis mostram-se recuperados no grupo DFO. Contudo não ocasionou aumento de AST em nenhum dos grupos.

Os níveis das citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6 reduziram em todos os grupos quando comparado ao grupo IOV, enquanto que os níveis IL-10 mostraram-se aumentados nos grupos CG, IO1000 e DFO quando comparado ao grupo IOV.

Grupos que não receberam sobrecarga de Fe (CG e NO500) mostraram níveis estatisticamente menores de INT- $\gamma$  quando comparado ao grupo sobrecarregado (IOV), os grupos testes IO500 e IO1000 mantiveram níveis próximos ao grupo DFO. Para TNF- $\alpha$ , o grupo que recebeu apenas ferro dextran (IOV) mostrou níveis mais altos de quando comparados com todos os outros grupos.

A inflamação tem um efeito potente sobre a homeostase do Fe, alterando sua absorção intestinal, seqüestro nos macrófagos e os níveis séricos. Sabe-se que esses efeitos da inflamação também são mediados por hepcidina (EID et al., 2017).

Acredita-se que citocinas pró- e anti-inflamatórias, além de proteínas de fase aguda, estão envolvidas nos distúrbios da homeostase do Fe, sabe-se que a IL-1 e a IL-6 são capazes de modular a tradução de ferritina alterando a porção 5' não traduzida do RNA mensageiro, ainda a IL-6 é fator de grande importância para a regulação da hepcidina (FIGUEIREDO, 2010). Além disso, sabe-se que a ação do INT- $\gamma$  é particularmente importante, uma vez que, ele atua diminuindo a expressão da ferroportina, única proteína exportadora de Fe em mamíferos, impedindo a liberação de Fe sistêmico (WEISS e GORDEUK, 2005).

Tais eventos nos indicam que o EEMN pode atuar diminuindo os níveis de Fe sérico através da regulação de citocinas, reforçando seu efeito hepatoprotetor. Estudos com compostos naturais isolados, em modelos experimentais similares, obtiveram resultados próximos aos nossos (ZHANG et al., 2006; BHOWMIK et al., 2017), de tal modo, neste modelo experimental, acredita-se que a possível ação antioxidante e anti-inflamatório do EEMN desempenha função importante na diminuição de Fe livre, consequentemente, diminuindo o dano oxidativo no tecido hepático.

Tal resultado é corroborado quando se percebe que os níveis de LPO em ratos do grupo IOV mostram-se aumentados quando comparado aos outros grupos e a atividade da CAT hepática mostrou diminuição, porém, não estatisticamente significativa no grupo IOV quando comparado aos outros grupos.

Em estudo, o ácido cafeico, atenuou a neuroinflamação em camundongos, onde se observou que o tratamento com ácido cafeico reduziu significativamente a expressão de marcadores inflamatórios no soro e no cérebro, melhorou a defesa antioxidante e reverteu os níveis elevados TNF- $\alpha$  e IL-6, sugerindo que o ácido cafeico pode prevenir as alterações neurodegenerativas induzidas por neuroinflamação (MALLIK et al., 2016).

No estudo, o grupo tratado com Fe dextran apresentou diminuição na atividade da enzima  $\delta$ -ALA-D, mostrando que o Fe pode diminuir a sua atividade, enquanto que no grupo IO1000 os níveis de  $\delta$ -ALA-D foram restaurados, reforçando que o EEMN pode oferecer hepatoproteção.

A análise histopatológica corrobora com o restante de nossos resultados, mostrando que o EEMN pode atenuar o dano no tecido hepático.

Os resultados demonstraram que EEMN pode diminuir significativamente o IHS, melhorar as complicações patológicas decorrentes da sobrecarga de Fe. Ainda, acredita-se na possibilidade de que o EEMN possa melhorar os níveis de hepcidina, através da modulação de citocinas. Nossas descobertas ilustram uma nova ação terapêutica e economicamente viável das folhas de *M. nigra* na sobrecarga hepática de Fe, porém, os compostos existentes na planta responsáveis pela ação farmacológica ainda precisam ser elucidados.

#### **4 CONCLUSÕES**

- Perfil cromatográfico revelou a presença de cianidina, catequina, ácido cumárico, canferol, ácido cafeico e quercetina, os dois últimos mostram-se marjoritários.
- No tratamento de dose única com EEMN, não foi observada mortalidade/morbidade nos grupos, alterações comportamentais também não foram evidenciadas.
- Os animais tratados com EEMN, em dose única ou repetidas, não apresentaram anormalidades ou mudança de comportamento quando comparados ao grupo controle nas doses testadas, ainda, apresentou ação

potencialmente protetora de órgãos e suposta atividade hipocolesterolêmica, assim, mostra-se como uma fonte natural promissora a ser empregada na farmacologia.

- O modelo de indução de sobrecarga de ferro foi capaz de refletir as complicações clínicas que ocorrem em pacientes com sobrecarga de ferro, tal fato foi evidenciado pelo aparecimento de hepatomegalia, aumento dos níveis de ferro sérico e hepcidina no grupo IOV.
- Os níveis de citocinas e outros marcadores inflamatórios mostraram-se aumentados nos grupos sobreacarregados, bem como os marcadores de ferro corporal, essas alterações foram atenuadas nos grupos tratados com EEMN.
- A suposta hepatoproteção evidenciada no estudo de toxicidade aguda e subaguda foi confirmada no estudo da sobrecarga de ferro.

## REFERÊNCIAS

- AHMAD, P. et al. Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. **Critical reviews in biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 161-175, 2010.
- ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **New England Journal of Medicine**, n. 1, p. 986-995, 1999 .
- ARAÚJO, E.J.F. et al. Aspectos toxicológicos da planta medicinal Casearia sylvestris Swartz: revisão de literatura. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 35, p. 355, 2014.
- AROSIO, P. et al. The importance of eukaryotic ferritins in iron handling and cytoprotection. **Biochemical Journal**, v. 472, p. 1–15, 2015.
- BACCAN, M.M. et al. Quercetin as a shuttle for labile iron. **Journal of Inorganic Biochemistry**, n. 107, p. 34–39, 2012.
- BACON, B.R. et al. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. **Hepatology**, v. 54, n. 1, p. 328-343, 2011.
- BEUTLER, E.; HOFFBRAND A.V.; COOK, J.D. Iron deficiency and overload. **Hematology**, p. 40-61, 2003.
- BHOWMIK, A. et al. Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, n. 87, p. 443-450, 2017.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.
- BONINI-DOMINGOS, C.R. Iron increases, hereditary hemochromatosis and HFE gene disorders: what do we know of the Brazilian population? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 4, p. 341-342, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60p.
- BRASIL. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, DF, 4 maio 2006. Seção 1, p. 20-5.

BRASIL. Boletim Brasileiro de Avaliação de Tecnologias em Saúde, BRATS. **Deferasirox para o tratamento da sobrecarga de ferro.** Ano IV, n. 7, p. 1- 11, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Direção de Administração e Finanças. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.** 2009. 1p.

BRITTENHAM, G.M. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. **New England Journal of Medicine**, v. 364, n. 2, p. 146-156, 2011.

BRONDANI, J.C. et al. Evaluation of acute and subacute toxicity of hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 202, p. 147-153, 2017.

CAMPOS, S.C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373-382, 2016.

CANÇADO, R.D.; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 3, p. 204-206, 2007.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Visão atual da hemocromatose hereditária. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 6, p. 469-475, 2010.

CASTRO, J.L. **Medicina vegetal: teoria e prática conforme a naturoterapia.** 2<sup>º</sup> ed. Rio de Janeiro: Europa-América. 1981, 304p.

CASTRO, R.M. **Flora da Bahia-Moraceae.** 2001. 146p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Bahia. 2001.

CHANDA, S.J. et al. Medicinal plants - from traditional use to toxicity assessment: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 6, n. 7, p. 2652–2670, 2015.

COATES, T.D. Physiology and pathophysiology of iron in hemoglobin-associated diseases. **Free Radical Biology and Medicine**, n. 72, p. 23–40, 2014.

DAINTY, J.R. et al. Estimation of dietary iron bioavailability from food iron intake and iron status. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

DARBARI D.S. et al. Circumstances of death in adult sickle cell disease patients. **American Journal of Hematology**, v. 81, p. 858-63, 2006.

DAS, S.K. et al. Resveratrol mediates therapeutic hepatic effects in acquired and genetic murine models of iron-overload. **Liver International**, v. 36, n. 2, p. 246-257, 2016.

DELEA, T.E. et al. Cost effectiveness of once-daily oral chelation therapy with deferasirox versus infusional deferoxamine in transfusion-dependent thalassaemia patients: US healthcare system perspective. **Pharmacoeconomics**, v. 25, p. 329-342, 2007.

EID, R.; ARAB, N.T.T.; GREENWOOD, M.T. Iron mediated toxicity and programmed cell death: A review and a re-examination of existing paradigms. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1864, n. 2, p. 399–430, 2017.

ELALFY, M.S.; ADLY, A.M.; WALI, Y. Efficacy and safety of a novel combination of two oral chelators deferasirox/deferiprone over deferoxamine/deferiprone in severely iron overloaded young beta thalassemia major patients. **European journal of haematology**, v. 95, n. 5, p. 411-420, 2015.

EL-BESHLAWY, M. et al. Continuation of deferiprone therapy in patients with mild neutropenia may not lead to a more severe drop in neutrophil count Amal. **European Journal of Haematology**, v. 92, p. 337–340, 2013.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Some physico-chemical characteristics of black mulberry (*Morus nigra L.*) genotypes from Northeast Anatolia region of Turkey. **Scientia Horticulturae**, v. 116, n. 1, p. 41-46, 2008.

ERCISLI, S; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra L.*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 4, p. 1380-1384, 2007.

FERNÁNDEZ-REAL, J.M; MANCO, M. Effects of iron overload on chronic metabolic diseases. **The Lancet Diabetes e Endocrinology**, v. 2, n. 6, p. 513-526, 2014.

FERNÁNDEZ, B.; MARTÍNEZ-GÓMEZ, C.; BENEDICTO, J. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity (ALA-D) in red mullet (*Mullus barbatus*) from Mediterranean waters as biomarker of lead exposure. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 115, p. 209-216, 2015.

FIGUEIREDO, M.S.. Impacto da inflamação na regulação do ferro e deficiência funcional de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, p.18-21, 2010.

FORBES, J.M.; COUGHLAN, M.T.; COOPER, M.E. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. **Diabetes**, v. 57, n. 6, p. 1446-1454, 2008.

FREITAS, M.M. et al. Extracts of *Morus nigra L.* Leaves Standardized in Chlorogenic Acid, Rutin and Isoquercitrin: Tyrosinase Inhibition and Cytotoxicity. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, 2016.

GAO, Y. et al. Mechanism of protective effects of Danshen against iron overload-induced injury in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 254–260, 2013.

GEISSLER, C.; SINGH, M. Iron, meat and health. **Nutrients**, n. 3, p. 283–316, 2011.

- GROTTO, H.Z.W. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.
- GUNDOGDU, M. et al. Determination of fruit chemical properties of *Morus nigra L.*, *Morus alba L.* and *Morus rubra L.* by HPLC. **Scientia Horticulturae**, v. 132, n. 1, p. 37-41, 2011.
- HARIZAL, S.N. et al. Acute toxicity study of the standardized methanolic extract of *Mitragyna speciosa* Korth in rodent. **Journal of ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 404-409, 2010.
- HASSIMOTTO, N.M.A., GENOVESE, M.I., LAJOLO, F.M. Identification and characterisation of anthocyanins from wild mulberry (*Morus nigra L.*) growing in Brazil. **Revista de Agroquímica y Tecnología de Alimentos**, v. 13, n. 1, p. 17-25, 2007.
- HENRIKSEN, E.J. et al. Oxidative stress and the etiology of insulin resistance and type 2 diabetes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 993-999, 2011.
- HOLBEIN B.E; MIRA, O.R. Effect of trace iron levels and iron withdrawal by chelation on the growth of *Candida albicans* and *Candida vini*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 307, p. 19-24, 2010.
- HOR, S.Y. et al. Acute and subchronic oral toxicity of *Coriolus versicolor* standardized water extract in Sprague-Dawley rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1067-1076, 2011.
- HUBER, P.C.; ALMEIDA, W.P.; FÁTIMA, A. Glutationa e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1170-1179, 2008.
- JIANG, Y. et al. Effects of the ethanol extract of black mulberry (*Morus nigra L.*) fruit on experimental atherosclerosis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 228-235, 2017.
- JONES, D.P. Radical-free biology of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 295, n. 4, p. C849-C868, 2008.
- KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, p. 43–50, 2000.
- KEW, M.C. Hepatic Iron Overload and Hepatocellular Carcinoma. **Liver Cancer**, v. 3, p. 31-40, 2014.
- KHALID, N.; FAWAD, S.A.; AHMED, I. Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra L.*) fresh juice. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 91–96, 2011.

- KONTOGHIORGHES G. J. Deferasirox: uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other toxicities. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 3, n. 6, p. 235-239, 2007.
- KNUTSON, M. Non-Transferrin-Mediated Iron Delivery. **Blood**, v. 128, n. 22, p. 22, 2016.
- KOSTIĆ, D.A. et al. A survey on macro- and micro-elements, phenolic compounds, biological activity and use of *Morus* spp. (Moraceae). **Fruits**, v. 68, n. 4, p. 333-347, 2013.
- KUMAR, V.; CHAUHAN, S. Mulberry: Life enhancer. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 10, p. 271-278, 2008.
- LAKSHMANAN, H. et al. Aqueous extract of *Senecio candicans* DC induce liver and kidney damage in a sub-chronic oral toxicity study in Wistar rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 79, p. 25-34, 2016.
- LAWSON, M.K. et al. **Chelators in Iron and Copper Toxicity**. Current Pharmacology Reports, v. 2, n. 6, p. 271–280, 2016.
- LEITÃO, F. et al. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro, Brazil: an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 225-247, 2014.
- LI, K.; REICHMANN, H. Role of iron in neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 123, p. 389–399, 2016.
- LI, L.N. Biologically active components from traditional Chinese medicines. **Pure and Applied Chemistry**, n. 70, p. 547–554, 1998.
- MALLIK, S.B. et al. Caffeic acid attenuates lipopolysaccharide-induced sickness behaviour and neuroinflammation in mice. **Neuroscience letters**, v. 632, p. 218-223, 2016.
- MARTINS, E.G.A.; PIRANI, J.R. Flora da serra do cipó, minas gerais: Moraceae. **Boletim de botânica da Universidade de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 69-86, 2010.
- MARTIN-BASTIDA, A. et al. Brain iron chelation by deferiprone in a phase 2 randomised doubleblinded placebo controlled clinical trial in Parkinson's disease. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1398, 2017.
- MEERPOHL, J.J. et al. Deferasirox for managing transfusional iron overload in people with sickle cell disease. **The Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 5, n. 5, 2014.
- MELLO, M.R.F. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF): Uma oportunidade de geração de renda para a agricultura familiar em assentamentos rurais da Mata Sul de Pernambuco. **Revista de Ciência, Tecnologia e Humanidades do IFPE**, v. 5, n. 1, p. 125-137, 2013.

MILIC S. et al. The Role of Iron and Iron Overload in Chronic Liver Disease. **Medical Science Monitor**, v. 22, p. 2144-2151, 2016.

MINHAS, M.A. et al. Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens Pakistan. **Journal of Zoology**, v. 48, n. 5, p. 1381-1388, 2016.

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, Brasil. **HU Revista**, v. 36, n. 1, p. 61–68, 2010.

MOHIUDDIN, E. et al. *Morus nigra* L. - L. A. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 20, p. 5197-5199, 2011.

MURPHY, C.J.; OUDIT, G.Y. Iron-overload cardiomyopathy: pathophysiology, diagnosis, and treatment. **Journal of Cardiac Failure**, v. 16, p. 888–900, 2010,

NAIR, U.; BARTSCH, H.; NAIR, J. Lipid peroxidation-induced DNA damage in cancer-prone inflammatory diseases: a review of published adduct types and levels in humans. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 43, n. 8, p. 1109-1120, 2007.

NADERI, G. A. Antioxidant activity of three extracts of *Morus nigra* L. **Phytotherapy Research**, v. 5, n. 18, p. 365-369, 2004.

OECD. **Guideline for Testing of Chemicals: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity in Rodents**. Test No. 407, adopted in 1981, and revised method adopted 3rd October 2008. OECD, Paris.

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

OGA, S. (Ed.) – **Fundamentos de toxicologia**. 3º ed. São Paulo: Atheneu. 2008.

ÖZGEN, M.; SERÇE, S.; KAYA, C. Phytochemical and antioxidant properties of anthocyanin-rich *Morus nigra* L. and *Morus rubra* fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 119, n. 3, p. 275-279, 2009.

PADILHA, M.M. et al. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1496–1500, 2010.

PARK, K.M. et al. Kuwanon G: an antibacterial agent from the root bark of *Morus alba* against oral pathogens. **Journal of ethnopharmacology**, v. 84, n. 2, p. 181-185, 2003.

PHAM-HUY, L.A.; HUA, H.E.; PHAM-HUY, C. Free radicals, antioxidants in disease and health. **International journal of biomedical science: IJBS**, v. 4, n. 2, p. 89, 2008.

- PISOSCHI, A.M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 97, p. 55-74, 2015.
- POWELL, L.W. et al. Screening for hemochromatosis in asymptomatic subjects with or without a family history. **Archives of Internal Medicine**, v. 166, n. 3, p. 294-301, 2006.
- PORTER J.B. Practical management of iron overload. **British Journal of Haematology**, n. 115, p. 239-52, 2001.
- RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 57-69, 2001.
- RAZA, M. et al. Cellular iron homeostasis and therapeutic implications of iron chelators in cancer. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 15, p. 1125–1140, 2014.
- RICCHI, P. et al. The impact of previous or concomitant IFN therapy on deferiprone-induced agranulocytosis and neutropenia: a retrospective study. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 9, n. 6, p. 875-881, 2010
- SALVI, M., et al. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. **Journal of biological chemistry**, v. 282, n. 33, p. 24407-24415, 2007.
- SÁNCHEZ-SALCEDO, E.M. et al. Phytochemical properties of white (*Morus alba*) and black (*Morus nigra*) mulberry leaves, a new food supplement. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 5, n. 4, p. 253-261, 2017.
- SANGARTIT, W. et al. Tetrahydrocurcumin in combination with deferiprone attenuates hypertension, vascular dysfunction, baroreflex dysfunction, and oxidative stress in iron-overloaded mice. **Vascular Pharmacology**, v. 87, p. 199-208, 2016.
- SASSA, S. Delta-aminolevulinic acid dehydratase assay. **Enzyme**, v. 28, n. 2-3, p.133-145, 1982.
- SAYRE, L.M.; PERRY, G.; SMITH, M.A. Oxidative stress and neurotoxicity. **Chemical research in toxicology**, v. 21, n. 1, p. 172-188, 2007.
- SHEFTEL, A.D.; MASON, A.B.; PONKA, P. The long history of iron in the Universe and in health and disease. **Biochimica Biophysica Acta**, n. 1820, p. 161–187, 2012.
- SHINODA, S. et al. Sa1315-Deferasirox (DFX), A Newly Oral Iron Chelator, with Gemcitabine (GEM) Inhibited Pancreatic Cancer Cell Proliferation and Induced Apoptosis in vitro and in vivo. **Gastroenterology**, v. 152, n. 5, p. S273-S274, 2017.
- SILVA, A.C., et al. Oxidative stress and δ-ALA-D activity in chronic renal failure patients. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 61, n. 2–3, p. 180-185, 2007.

- SILVA, M.G. et al. Acute and subacute toxicity of Cassia occidentalis L. stem and leaf in Wistar rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 341-346, 2011.
- SILVA, A.R.H. et al. Safety Assessment of Esporão de Galo (*Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent) Crude Extract from Leaves: Acute and Subacute Toxicity Studies in Male Rats. **Journal Glycomics and Lipidomics**, v. 1, n. 137, 2016.
- SOUZA, J.B. et al. Delta-aminolevulinate dehydratase (delta-ALA-D) activity in diabetes and hypothyroidism. **Clinical Biochemistry**, v. 40, p. 321-325, 2007.
- TANG Y. et al. Quercetin attenuates chronic ethanol hepatotoxicity: Implication of “free” iron uptake and release. **Food and Chemical Toxicology**, n. 67, p. 131–138, 2014.
- TOVAR R.T.; PETZEL, R.M. Herbal toxicity. **Disease-a-month**, v. 55, n. 10, p. 592–641, 2009.
- TURAN, I. et al. Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 241-248, 2017.
- VALADARES, M.C. Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.
- VANONI, A.P.N.B. **Avaliação da atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de Morus nigra L.** 2006. 71p. Dissertação (Mestrado: Ciências Veterinárias) - Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2006.
- VASCONCELOS, S.M.L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.
- VOLPATO, G.T. et al. Effect of *Morus nigra* L. aqueous extract treatment on the maternal – fetal outcome, oxidative stress status and lipid profile of streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of ethnopharmacology**, v. 138, n. 3, p. 691-696, 2011.
- VEIGA, V.F.J.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. PLANTAS MEDICINAIS: CURA SEGURA? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- PING K.Y. et al. Acute and subchronic toxicity study of *Euphorbia hirta* L. methanol extract in rats. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- WANG S. et al. An Efficient Preparation of Mulberroside A from the Branch Bark of Mulberry and Its Effect on the Inhibition of Tyrosinase Activity. **PLoS One**, v. 9, n. 10, 2014.

WARD, R.J. et al. The role of iron in brain ageing and neurodegenerative disorders. **The Lancet Neurology**, n. 13, p. 1045–1060, 2014.

WEISS, G.; GORDEUK, V.R. Benefits and risks of iron therapy for chronic anaemias. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 35, n. 3, p. 36-45, 2005.

ZHANG, Y. et al. Dietary supplementation of baicalin and quercetin attenuates iron overload induced mouse liver injury. **European journal of pharmacology**, v. 535, n. 1, p. 263-269, 2006.

ZHANG, Y. et al. Multitargeted inhibition of hepatic fibrosis in chronic iron-overloaded mice by *Salvia miltiorrhiza*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 148, p. 671–681, 2013.

ZHAO, Y. et al. Effects of dietary baicalin supplementation on iron overload-induced mouse liver oxidative injury. **European journal of pharmacology**, v. 509, n. 2, p. 195-200, 2005.

## ANEXO A – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UFSM



*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
da  
*Universidade Federal de Santa Maria*

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E TOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE *Morus nigra Linnaeus*.", protocolado sob o CEUA nº 8472100616, sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann** - que envolve produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 07/07/2016.

We certify that the proposal "PROFILE PHYTOCHEMICAL EVALUATION AND TOXICITY EXTRACT OF CRUDE *Morus nigra Linnaeus* SHEETS.", utilizing 52 Heterogenics rats (males and females), protocol number CEUA 8472100616, under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 07/07/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **09/2015** a **08/2017**      Área: **Fisiologia**

Procedência: **Biotério Central UFSM**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**      idade: **6 a 7 semanas**      N: **52**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **150 a 200 g**

Resumo: A *Morus nigra L.* é pertencente à família Moraceae, conhecida popularmente como amora preta, mostrando-se rica em compostos fenólicos, a mesma está presente na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), sua raiz é empregada popularmente como laxativo, vermífuga, hipertensão e dores de dente, as folhas são identificadas como capazes de reduzir os níveis de glicose e colesterol sanguíneos e os frutos podem apresentar ação anticâncer e serem utilizados no tratamento de lesões bucais, na contenção de sangramento e na inflamação. Tendo em vista a sua utilização popular e o fato de estar presente na RENISUS, nota-se a importância de estudos que avaliem a sua toxicidade. Portanto, objetiva-se nesse trabalho avaliar a toxicidade aguda e subaguda in vivo do extrato bruto das folhas de *Morus nigra L.*, da forma como preconizam os Guias da OECD 423 e 407.

Local do experimento: No laboratório de fisiologia experimental (LaFex), sala 5229, prédio 21.

Santa Maria, 11 de julho de 2016

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

## ANEXO B - CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - UFSM



*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
da  
*Universidade Federal de Santa Maria*

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DE Morus nigra Linnaeus FRENTE A SOBRECARGA DE FERRO EM MODELO ANIMAL.", protocolada sob o CEUA nº 9343070616, sob a responsabilidade de **Liliane de Freitas Bauermann** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (CEUA/UFSM) na reunião de 25/08/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF CRUDE EXTRACT OF Morus nigra Linnaeus SHEETS FACE TO ANIMAL MODEL IRON OVERLOAD.", utilizing 64 Heterogenics rats (64 males), protocol number CEUA 9343070616, under the responsibility of **Liliane de Freitas Bauermann** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Maria (CEUA/UFSM) in the meeting of 08/25/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **08/2016** a **08/2017**      Área: **Fisiologia**

Origem:	<b>Biotério Central UFSM</b>	sex:	<b>Machos</b>	idade:	<b>5 a 6 semanas</b>	N:	<b>64</b>
Espécie:	<b>Ratos heterogênicos</b>						
Linhagem:	<b>Wistar</b>				<b>Peso: 150 a 200 g</b>		

Resumo: A Morus nigra L. é pertencente à família Moraceae, conhecida popularmente como amoreira preta, mostrando-se rica em compostos fenólicos, a mesma está presente na Relação Nacional de Plantas de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), sua raiz é empregada popularmente como laxativo, vermicífuga, hipertensão e dores de dente, as folhas são identificadas como capazes de reduzir os níveis de glicose e colesterol sanguíneos e os frutos podem apresentar ação anticâncer e serem utilizados no tratamento de lesões bucais, na contenção de sangramento e na inflamação. A sobrecarga de ferro é uma complicação que se desenvolve em várias doenças e pode estar implicada em determinadas lesões orgânicas e no aumento da mortalidade, tendo a terapia de quelação de ferro papel indispensável na sobrevida destes pacientes (BEUTLER, et al. 2003). Hoje se encontram no mercado três quelantes de ferro utilizados no tratamento, Desferroxamina (DFO), Deferiprona e Deferasirox, no entanto, os dois últimos possuem inúmeras restrições no seu uso (CANÇADO et al., 2007; KONTOGHIORGHES, 2007) e o DFO mesmo sendo o mais antigo tratamento possui a desvantagem de ser administrado através de aparelho infusor, situação que causa desconforto e consequente diminuição de adesão ao tratamento (EHLERS et al., 1991; OLIVIERI et al., 1997). Devido a gravidade da situação de pacientes em situação de sobrecarga de ferro e a escassa disponibilidade de fármacos ferroquelantes é de imperativa relevância a pesquisa por novas moléculas que possam auxiliar na produção de novos fármacos, ou mesmo, o tratamento auxiliar através da fitoterapia. Observando as dificuldades estabelecidas pelos fármacos disponíveis, viu-se a necessidade de pesquisas na busca por novos quelantes, estudos recentes demonstram que os polifenóis estão em destaque nesta busca (BACCAN et al., 2012). Portanto, objetiva-se nesse deve-se avaliar o efeito frente à sobrecarga de ferro em modelo animal segundo Pucheu et al. (1993). BACCAN, M. M.; NETO, O. C.; PEREIRA R. M. S. et al. Quercetin as a shuttle for labile iron. Journal of Inorganic Biochemistry n. 107, p. 34-39, 2012. BEUTLER E.; HOFFBRAND A. V.; COOK J. D. Iron deficiency and overload. Hematology. p. 40-61, 2003. CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. v. 29, n. 3, São José do Rio Preto July/Sept. 2007. EHLERS K. H.; GIARDINA P. J.; LESSER M. L. et al. Prolonged survival in patients with beta-thalassemia major treated with deferoxamine. J. Pediatr. n. 118, p. 540-550, 1991. KONTOGHIORGHES G. J. Deferasirox: uncertain future following renal failure fatalities, agranulocytosis and other toxicities. Expert Opin Drug Saf. n. 6, v. 3, p. 235-9, 2007. PUCHEU S.; COUDRAY C.; TRESALLET N.; et al. Effect of iron overload in the isolated ischemic and reperfused rat heart. Cardiovasc Drug Ther. n. 7, p. 701-711, 1993. OLIVIERI N. F.; BRITTENHAM G. M. Iron-chelating therapy and the treatment of thalassemia. Blood. n. 89, p. 739-61, 1997

Local do experimento: No laboratório de fisiologia experimental (LaFex), sala 5229, prédio 21.

Santa Maria, 26 de agosto de 2016



*Comissão de Ética no Uso de Animais*

*da*

*Universidade Federal de Santa Maria*

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Daniela Bitencourt Rosa Leal".

Profa. Dra. Daniela Bitencourt Rosa Leal  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

A handwritten signature in cursive script, appearing to read "Denis Broock Rosemberg".

Prof. Dr. Denis Broock Rosemberg  
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Santa Maria

**ANEXO C – COMPROVANTE DO MANUSCRITO SUBMETIDO AO PERIÓDICO**

***Journal of Ethnopharmacology***

**Submission JEP\_2017\_2093 received by Journal of Ethnopharmacology**

De: "Journal of Ethnopharmacology" <EvideSupport@elsevier.com>

Para: kassia.tquimica@yahoo.com.br

Segunda-feira, 3 de Julho de 2017 17:10 ● ★

Mensagem bruta Visualização para impressão

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: JEP\_2017\_2093

Title: Safety assessment of Morus nigra L. leaves: Acute and subacute oral toxicity studies in Wistar rats

Journal: Journal of Ethnopharmacology

Dear Miss. Figueiredo,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Journal of Ethnopharmacology. Your submission was received in good order. What happens next: Your paper will undergo a screening process by the managing editors of the journal. During this stage the manuscript is rigorously checked for alignment with aims and scope of the journal, plagiarism, checking the completeness of the general submission, adherence to authors guidelines etc. Due to the high influx of papers, please allow 2-3 weeks for this process to be completed. Once the pre-screen is completed the paper will either be returned to you or be assigned to an Associate Editor.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: [http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation NavController.jspx?JRNL\\_ACR=JEP](http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation NavController.jspx?JRNL_ACR=JEP) and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Journal of Ethnopharmacology

**Have questions or need assistance?**

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2017 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)  
Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.