

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA**

**Validação de metodologias analíticas para quantificação de quercetina e canferol
em extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus*
e *Morus nigra* e *screening* antifúngico destes extratos**

LUCIANA RUSCHEL TALLINI

Porto Alegre

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
FACULDADE DE FARMÁCIA

**Validação de metodologias analíticas para quantificação de quercetina e canferol
em extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus*
e *Morus nigra* e *screening* antifúngico destes extratos**

Dissertação para obter o grau de Mestre em
Ciências Farmacêuticas pelo Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LUCIANA RUSCHEL TALLINI

Orientador: Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi

Porto Alegre

2014

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27 de fevereiro de 2014, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Miriam Apel

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Cássia Virginia Garcia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Pesquisadora Dra. Marina Scopel

University of California

CIP - Catalogação na Publicação

Tallini, Luciana Ruschel

Validação de metodologias analíticas para quantificação de quercetina e canferol em extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* e screening antifúngico destes extratos / Luciana Ruschel Tallini. -- 2014.

132 f.

Orientador: José Angelo Silveira Zuanazzi.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Rubus. 2. Morus. 3. Flavonoides. 4. Validação.
I. Zuanazzi, José Angelo Silveira, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido com orientação do Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi, no Laboratório de Farmacognóse e na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Os experimentos de eletroforese capilar foram realizados com a colaboração da Profa. Dra. Ana Carolina de Oliveira Costa no Laboratório de Química de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina e também com a colaboração do Prof. Dr. Martim Steppe no Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O *screening* de atividade antifúngica foi realizado com a colaboração do Prof. Dr. Alexandre Fuentesfria no Laboratório de Micologia da Faculdade de Farmácia e no Laboratório de Fitosanidade da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

A autora recebeu bolsa de estudos da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos a Deus, à minha família, ao meu orientador, à Dra. Grazielle Ramos Pedrazza, à Dra. Maribete Homrich Holzschuh e a todos outros que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

Dedico este trabalho aos meus pais!

RESUMO

Neste trabalho utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a eletroforese capilar (EC) como ferramentas analíticas para avaliação de flavonoides em extratos hidrolisados de folhas de *Rubus* e de *Morus*. Os extratos foram preparados por hidrólise ácida em ultrassom e analisados por CLAE-DAD e EC-DAD. Os métodos elaborados foram validados e aplicados. Quercetina e canferol foram identificados nestes extratos por CLAE-DAD, EC-DAD e CLUE-DAD/EM. Em *Rubus erythrocladus* quantificou-se $848,43 \pm 66,68 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $304,35 \pm 17,29 \mu\text{g.g}^{-1}$ de quercetina e canferol, respectivamente, por CLAE-DAD e $836,37 \pm 149,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ de quercetina por EC-DAD. Em *Rubus idaeus* quantificou-se $698,32 \pm 1,29 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $184,20 \pm 4,34 \mu\text{g.g}^{-1}$ de quercetina e canferol, respectivamente, por CLAE-DAD. Em *Morus nigra* quantificou-se $2323,90 \pm 145,35 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1446,36 \pm 59,00 \mu\text{g.g}^{-1}$, de quercetina e canferol, respectivamente, por CLAE-DAD e $2552,82 \pm 275,30 \mu\text{g.g}^{-1}$ e $1188,67 \pm 99,21 \mu\text{g.g}^{-1}$ de quercetina e canferol, respectivamente, por EC-DAD. Não foi observada diferença significativa entre a quantificação por CLAE-DAD e por EC-DAD, porém o método por CLAE-DAD se mostrou muito mais sensível do que o método por EC-DAD. Os mesmos compostos também foram identificados nestes extratos por CLUE-DAD/EM. Por esta ferramenta analítica se pode observar uma diferença entre o perfil químico das amostras de *Rubus* e de *Morus*. Quatro amostras comerciais de folhas de amora foram analisadas, observando grandes variações nas concentrações de quercetina e de canferol presentes nestes extratos. Além disso, através de um *screening* de atividade antifúngico verificou-se que os extratos não hidrolisados de *Rubus erythrocladus* e *Rubus idaeus* apresentaram ação contra três espécies de fungos filamentosos patógenos humanos: *Thichophyton rubrum* 51, *Microsporium gypseum* 01 e *Microsporium canis* 40.

Palavras-chave: *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus*, *Morus nigra*, flavonoides, *screening* antifúngico, CLAE-DAD e EC-DAD.

ABSTRACT

In this work we used the high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary electrophoresis (CE) as analytical tools to evaluate the hydrolyzed flavonoids in extracts of *Rubus* and *Morus* leaves. The extracts were prepared by acid hydrolysis in ultrasound and analyzed by HPLC- DAD and CE -DAD. The developed methods were validated and applied. Quercetin and kaempferol were identified in these extracts by HPLC-DAD, EC-DAD and UPLC-DAD/MS. In *Rubus erythrocladus* were quantified $848.43 \pm 66.68 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $304.35 \pm 17.29 \mu\text{g.g}^{-1}$ of quercetin and kaempferol, respectively, by HPLC-DAD and $836.37 \pm 149.43 \mu\text{g.g}^{-1}$ of quercetina by CE -DAD. In *Rubus idaeus* were quantified $698.32 \pm 1.29 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $184.20 \pm 4.34 \mu\text{g.g}^{-1}$ of quercetin and kaempferol, respectively, by HPLC-DAD. In *Morus nigra* were quantified $2323.90 \pm 145.35 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $1446.36 \pm 59.00 \mu\text{g.g}^{-1}$ of quercetin and kaempferol, respectively, by HPLC-DAD and $2552.82 \pm 275.30 \mu\text{g.g}^{-1}$ and $1188.67 \pm 99.21 \mu\text{g.g}^{-1}$ of quercetin and kaempferol, respectively, by CE -DAD. No significant difference in quantification by HPLC-DAD and CE-DAD was observed, but the HPLC-DAD method proved to be more sensitive than EC-DAD method. The same compounds were also identified in these extracts by UPLC-DAD/EM. Using this analytical tool, it was possible to observe a difference in the chemical profile of *Rubus* and *Morus* extracts. Commercial samples of blackberry leaves tea were analyzed by HPLC-DAD and it was observed big variation in the concentrations of quercetin and kaempferol in these extracts. Moreover, through a *screening* antifungal activity, it was found that no hydrolyzed extracts of *Rubus idaeus* and *Rubus erythrocladus* showed action against three species of filamentous fungal human pathogens: *Thichophyton rubrum* 51, *Microsporium gypseum* 01 and *Microsporium canis* 40.

Keywords: *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus*, *Morus nigra*, flavonoids, *screening* antifungal, HPLC-DAD and CE-DAD.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1. NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONOIDES. | 47 |
| FIGURA 2. BIOSÍNTESE DOS FLAVONOIDES..... | 48 |
| FIGURA 3. EXEMPLOS DE FLAVONOIDES DERIVADOS DE QUERCETINA E CANFEROL.. .. | 49 |
| FIGURA 4. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO FLUXO ELETROOSMÓTICO. | 51 |
| FIGURA 5. FLUXOGRAMA DO PROCESSO DE HIDRÓLISE ÁCIDA DOS EXTRATOS DE <i>RUBUS</i> E <i>MORUS</i> | 61 |
| FIGURA 6. CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE REFERÊNCIA POR CLAE. | 71 |
| FIGURA 7. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV POR CLAE-DAD..... | 71 |
| FIGURA 8. ELETROFEROGRAMA DOS PADRÕES DE REFERÊNCIA POR EC-DAD | 72 |
| FIGURA 9. ESPECTRO DE ABSORÇÃO NO UV, EC-DAD. | 72 |
| FIGURA 10. GRÁFICOS REFERENTES À CURVA DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA E DE CANFEROL, POR CLAE. | 73 |
| FIGURA 11. GRÁFICOS REFERENTES À CURVA DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA E DE CANFEROL, POR EC-DAD. | 73 |
| FIGURA 12. ESPECTROS REPRESENTANDO A ESPECIFICIDADE E A SELETIVIDADE DA QUERCETINA E DO CANFEROL, RESPECTIVAMENTE, NOS EXTRATOS DE: (A) <i>RUBUS</i> <i>ERYTHROCLADUS</i> , (B) <i>RUBUS IDAEUS</i> E (C) <i>MORUS NIGRA</i> | 76 |
| FIGURA 13. ESPECTROS REPRESENTANDO A ESPECIFICIDADE E A SELETIVIDADE DOS PICOS DAS AMOSTRAS: (A) QUERCETINA EM <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> E (B1 E B2) CANFEROL E QUERCETINA, RESPECTIVAMENTE, EM <i>MORUS NIGRA</i> , POR EC, E INFORMAÇÕES SOBRE A PUREZA DOS PICOS. | 77 |
| FIGURA 14. CROMATOGRAMAS OBTIDOS DOS EXTRATOS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> (1), <i>RUBUS</i> <i>ERYTHROCLADUS</i> (2) E <i>MORUS NIGRA</i> (3), POR CLAE A 370 NM. | 84 |
| FIGURA 15. ELETROFEROGRAMAS OBTIDOS DOS EXTRATOS: A) <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> E B) <i>MORUS NIGRA</i> , POR EC-DAD A 200 NM..... | 85 |
| FIGURA 16. IMAGEM DO MATERIAL VEGETAL ANALISADO.. | 87 |
| FIGURA 17. CROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS COMERCIAIS.. | 89 |
| FIGURA 18. CROMATOGRAMA, 200 A 400 NM, DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> | 90 |

| | |
|--|----|
| FIGURA 19. CROMATOGRAMA DE MASSAS DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> | 91 |
| FIGURA 20. ESPECTRO DE MASSA E DE UV DA QUERCETINA, <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> | 91 |
| FIGURA 21. ESPECTRO DE MASSA E DE UV DO CANFEROL, <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> | 92 |
| FIGURA 22. CROMATOGRAMA, 200 A 400 NM, DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> | 93 |
| FIGURA 23. CROMATOGRAMA DE MASSAS DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>RUBUS IDAEUS</i> | 93 |
| FIGURA 24. ESPECTRO DE MASSAS E DE UV DA QUERCETINA, <i>RUBUS IDAEUS</i> | 94 |
| FIGURA 25. ESPECTRO DE MASSAS DO CANFEROL, <i>RUBUS IDAEUS</i> | 94 |
| FIGURA 26. CROMATOGRAMA, 200 A 400 NM, DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i> | 95 |
| FIGURA 27. CROMATOGRAMA DE MASSAS DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>MORUS NIGRA</i> | 95 |
| FIGURA 28. ESPECTRO DE MASSAS E UV DA QUERCETINA, <i>MORUS NIGRA</i> | 96 |
| FIGURA 29. ESPECTRO DE MASSAS E DE UV DO CANFEROL, <i>MORUS NIGRA</i> | 96 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| TABELA 1. GRADIENTE UTILIZADO PARA A ANÁLISE DE QUERCETINA E CANFEROL POR CLAE..... | 58 |
| TABELA 2. GRADIENTE UTILIZADO PARA A ANÁLISE DE QUERCETINA E CANFEROL POR CLUE..... | 59 |
| TABELA 3. RESULTADOS DE LINEARIDADE OBTIDOS A PARTIR DAS CURVAS DE CALIBRAÇÃO DE QUERCETINA E CANFEROL POR CLAE E EC..... | 74 |
| TABELA 4. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CURVA PADRÃO DE QUERCETINA, POR CLAE..... | 74 |
| TABELA 5. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CURVA PADRÃO DE QUERCETINA, POR EC..... | 74 |
| TABELA 6. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CURVA PADRÃO DE CANFEROL, POR CLAE..... | 75 |
| TABELA 7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA (ANOVA) PARA A CURVA PADRÃO DE CANFEROL, POR EC..... | 75 |
| TABELA 8. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DA CONFORMIDADE DO SISTEMA DE CLAE E DE EC..... | 78 |
| TABELA 9. RESULTADOS OBTIDOS NA ANÁLISE DA PRECISÃO INTRA E INTER-DIA DA QUERCETINA E DO CANFEROL POR CLAE E EC..... | 78 |
| TABELA 10. RESULTADOS DOS ENSAIOS DE RECUPERAÇÃO DA QUERCETINA E DO CANFEROL POR CLAE E EC..... | 79 |
| TABELA 11. RESULTADOS DOS LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO DA QUERCETINA E DO CANFEROL OBTIDOS POR CLAE E EC..... | 80 |
| TABELA 12. RESULTADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO DE CLAE AVALIADA ATRAVÉS DOS PADRÕES DE REFERÊNCIA, QUERCETINA E CANFEROL..... | 81 |
| TABELA 13. RESULTADOS DA ROBUSTEZ DO MÉTODO DE EC AVALIADA ATRAVÉS DOS PADRÕES DE REFERÊNCIA, QUERCETINA E CANFEROL..... | 82 |
| TABELA 14. RESULTADOS DA ANÁLISE DA PRECISÃO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE QUERCETINA E CANFEROL DO EXTRATO HIDROLISADO DE FOLHAS DE <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> POR CLAE..... | 82 |

| | |
|--|----|
| TABELA 15. QUANTIDADE DE QUERCETINA E CANFEROL ENCONTRADOS NOS EXTRATOS HIDROLISADOS DE FOLHAS DE <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> , <i>RUBUS IDAEUS</i> E <i>MORUS NIGRA</i> | 83 |
| TABELA 16. QUANTIDADE DE QUERCETINA E CANFEROL ENCONTRADOS EM 1,0 G DE PLANTA SECA (P.S.) POR CLAE NAS AMOSTRAS DE FOLHAS DE AMORA COMERCIALIZADAS. | 89 |
| TABELA 17. MASSA EXATA DE QUERCETINA E DE CANFEROL, <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i> | 92 |
| TABELA 18. MASSA EXATA DE QUERCETINA E DE CANFEROL, <i>RUBUS IDAEUS</i> | 94 |
| TABELA 19. MASSA EXATA DE QUERCETINA E DE CANFEROL, <i>MORUS NIGRA</i> | 96 |
| TABELA 20. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS FRENTE A DUAS CEPAS DE <i>FUSARIUM</i> | 97 |
| TABELA 21. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS FRENTE A FUNGOS PATÓGENOS HUMANOS..... | 98 |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| INTRODUÇÃO | 21 |
| 1. OBJETIVO | 25 |
| 1.1. OBJETIVO GERAL | 27 |
| 1.2 ESPECÍFICOS | 27 |
| 2. REVISÃO DO TEMA | 29 |
| 2.1. ASPECTOS BOTÂNICOS | 31 |
| 2.2. USO POPULAR | 32 |
| 2.3. COMPOSIÇÃO QUÍMICA | 32 |
| 2.4. ESTUDOS BIOLÓGICOS | 36 |
| 2.4.1. AÇÃO ANTIOXIDANTE | 36 |
| 2.4.2. AÇÃO ANTICÂNCER | 37 |
| 2.4.3. AÇÃO NO SISTEMA CIRCULATÓRIO | 38 |
| 2.4.4. AÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA | 39 |
| 2.4.5. AÇÃO HIPOGLICÊMICA | 39 |
| 2.4.6. AÇÃO NO SISTEMA NERVOSO | 40 |
| 2.4.7. AÇÃO GASTROINTESTINAL | 41 |
| 2.4.8 AÇÃO ANTIPOBESIDADE | 41 |
| 2.4.9. AÇÃO ANTIMICROBIANA | 42 |
| 2.5. AÇÃO TOXICOLÓGICA | 45 |
| 2.6. ESTUDO DE BIOTECNOLOGIA | 45 |
| 2.7. ESTUDOS DE ESTRESSE ABIÓTICO | 46 |
| 2.8. BIOSÍNTESE DOS FLAVONOIDES | 46 |
| 2.9. ELETROFORESE CAPILAR (EC) | 49 |
| 3. MATERIAL E MÉTODO | 55 |
| 3.1. AMOSTRAS | 57 |
| 3.2. REAGENTES E PADRÕES | 57 |
| 3.3. PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES | 57 |
| 3.4. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS - CLAE | 57 |
| 3.5. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS - CLUE | 58 |
| 3.6. CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS - EC | 59 |

| | |
|--|------------|
| 3.7. PREPARO DAS AMOSTRAS..... | 60 |
| 3.7.1. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA AS ANÁLISES QUÍMICAS | 60 |
| 3.7.2. PREPARO DAS AMOSTRAS PARA O ENSAIO ANTIFÚNGICO | 61 |
| 3.8. VALIDAÇÃO..... | 62 |
| 3.8.1. LINEARIDADE..... | 62 |
| 3.8.2. SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE..... | 62 |
| 3.8.3. PRECISÃO | 63 |
| 3.8.4. EXATIDÃO | 64 |
| 3.8.5. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO | 64 |
| 3.8.6. ROBUSTEZ..... | 65 |
| 3.9. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA | 65 |
| 3.9.1. PROCEDIMENTOS..... | 65 |
| 4. RESULTADOS | 69 |
| 4.1. VALIDAÇÃO..... | 71 |
| 4.1.1. LINEARIDADE..... | 73 |
| 4.1.2. SELETIVIDADE E ESPECIFICIDADE..... | 75 |
| 4.1.3. PRECISÃO | 77 |
| 4.1.4. EXATIDÃO | 79 |
| 4.1.5. LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO | 80 |
| 4.1.6. ROBUSTEZ..... | 80 |
| 4.2. PRECISÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO | 82 |
| 4.3. ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE <i>RUBUS ERYTHROCLADUS</i>, <i>RUBUS IDAEUS</i> E <i>MORUS NIGRA</i> | 83 |
| 4.4. ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIALIZADAS | 86 |
| 4.5. ANÁLISE DOS EXTRATOS POR CLUE-DAD/EM..... | 89 |
| 4.6. <i>SCREENING</i> ANTIFÚNGICO..... | 97 |
| 5. DISCUSSÃO | 99 |
| 6. CONCLUSÃO | 111 |
| PERSPECTIVAS | 115 |
| REFERÊNCIAS | 119 |

INTRODUÇÃO

Devido ao grande potencial de prevenção e cura de doenças, os compostos químicos presentes nos vegetais se tornaram importante alvo de estudo, tanto para descoberta de seus efeitos benéficos à saúde, como para o entendimento dos seus mecanismos de ação (KALE; GAWANDE; KOTWAL, 2008). A avaliação dos dados farmacológicos de plantas medicinais e a descoberta de novos compostos biologicamente ativos são o objetivo de pesquisa de muitos cientistas no mundo (CALIXTO, 2001).

Para estimular o desenvolvimento e o consumo dos fitoterápicos no Brasil, o governo brasileiro publicou o Decreto nº 5813 (BRASIL, 2006) que incentiva o cultivo, a formação técnico-científica e capacitação de recursos humanos visando o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos; assim como incentiva o estabelecimento de estratégias de comunicação para a divulgação deste setor. Para cumprir o proposto, o governo brasileiro tenta promover a interação entre o setor público e a iniciativa privada, universidades, centros de pesquisa e organizações não governamentais na área de plantas medicinais e desenvolvimento de fitoterápicos.

Em 2005, a Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos, por meio do Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos, elaborou uma lista de espécies vegetais que apresentam relato de uso pela população brasileira. A partir deste documento, em 2008 houve a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, Rénisus.

A Rénisus apresenta a função de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da Renafito, Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, o desenvolvimento e a inovação na área de plantas medicinais e fitoterápicos. Ou seja, se trata de uma lista de plantas que o governo brasileiro apresenta interesse de que sejam estudadas. Entre as plantas citadas nesta lista encontram-se as do gênero *Morus* (PORTAL DA SAÚDE, 2013).

O gênero *Morus* pertencente à família Moraceae, tem sua origem na Ásia, está plenamente aclimatada no Brasil e é popularmente conhecido como o gênero das amoras. As espécies mais comuns de *Morus* são a amora-branca (*Morus alba*), amora-vermelha (*Morus rubra*) e amora-preta (*Morus nigra*) (GUNDOGDU et al., 2011).

Morus nigra é conhecida na região do Vale do Rio São Francisco (Brasil) como amora-miúra. Ela foi trazida para esta região por imigrantes japoneses e adaptou-se bem às condições de clima e solo locais, entretanto, existem poucos estudos envolvendo a composição química e a avaliação das propriedades biológicas e farmacológicas de *Morus nigra* (OLIVEIRA et al., 2013).

Sabe-se que os nomes populares das plantas variam muito nas diferentes regiões do país. Um mesmo nome popular pode indicar espécies e até mesmo gêneros diferentes, o que pode acarretar em erros no uso de plantas medicinais (OLIVEIRA; AKISUE, 1997). Plantas dos gêneros *Morus* e *Rubus* são algumas vezes identificadas como amora, devido à semelhança entre os seus respectivos frutos.

Plantas do gênero *Rubus* são amplamente distribuídas pelo mundo, tanto na forma selvagem como na forma cultivada. O cultivar de *Rubus* considerado o mais importante é o de framboesa-vermelha, do subgênero *Idaeobatus*, muito presente em regiões de clima temperado da Europa, Ásia e América do Norte, e fortemente representado pela espécie *Rubus idaeus* Linnaeus (DEIGHTON et al., 2000). *Rubus erythrocladus* Martius é uma espécie nativa do Brasil e distribuída na região sul e sudeste deste país, abrangendo áreas do Cerrado e da Mata Atlântica. Esta planta é popularmente conhecida como amora-branca e amora-do-mato (REFLORA, 2014). Há muitos estudos a respeito dos frutos de plantas do gênero *Rubus*, porém ainda são poucas as informações que se tem sobre estas folhas (DURGO et al., 2012).

Em pesquisas que envolvem a composição química de plantas medicinais, o controle de qualidade assume particular importância. Parâmetros essenciais que definem a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, do produto final, podem variar quanto à composição química, pureza e características fenotípicas, dependendo da procedência do material, bem como quanto a fatores externos como: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem, transporte e parte da planta utilizada, por exemplo (CALIXTO, 2001). Dessa forma, análises botânicas e químicas de espécies vegetais são de grande importância para a identificação e controle de qualidade de plantas medicinais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

1. OBJETIVO

1.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar quimicamente os extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e eletroforese capilar (EC) como ferramentas analíticas, além de realizar um *screening* antifúngico destas folhas.

1.2 Específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica contendo dados de estudos químicos e biológicos de folhas de *Rubus* sp. e *Morus* sp.;
- Realizar a extração dos flavonoides presentes nas folhas destas plantas por hidrólise ácida;
- Desenvolver método analítico por CLAE para identificar e quantificar os flavonoides presentes nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*;
- Desenvolver método analítico por EC para identificar e quantificar os flavonoides presentes nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*;
- Obter mais informações do perfil químico destes extratos por CLUE-DAD/EM.
- Validar os métodos analíticos desenvolvidos por CLAE e por EC segundo os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação e de detecção e robustez;
- Aplicar os métodos validados por CLAE e EC na determinação dos flavonoides presentes nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*;
- Comparar os resultados obtidos por CLAE com os obtidos por EC;
- Analisar amostras adquiridas comercialmente de folhas de amora;
- Realizar ensaio de *screening in vitro* para verificar a atividade dos extratos de hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* contra fungos filamentosos do campo e filamentosos patógenos humanos.

2. REVISÃO DO TEMA

2.1. Aspectos botânicos

O gênero *Rubus* pertence à família Rosaceae e é popularmente conhecido como gênero das framboesas. A framboeseira é um arbusto que atinge de 2 a 3 metros de altura. Seu caule, que mergulha no solo, faz com que nasçam outros caules, aéreos e eretos, guarnecidos de pequenos espinhos. Possui ramos, em abundância, compridos, roliços e sem penugens. Suas folhas se dispõem alternadamente, apresentando as superiores e inferiores oito folíolos ao todo. Produz flores de cor branca, formando cachos dispostos no ápice dos ramos, e frutos aromáticos formados por drupas pequenas, vermelhas, roxas, brancas e amarelas. Esta planta é originária da Europa e aclimatada no Brasil, vegetando nos lugares úmidos e sombreados. Os frutos são doces e agradáveis ao paladar (CRUZ, 1982).

Em 1753, Linnaeus classificou 15 espécies de *Rubus* L. das quais cinco eram oriundas da América do Norte (*Rubus canadensis*, *Rubus dalibarda*, *Rubus hispidus*, *Rubus occidentalis* e *Rubus odoratus*), quatro europeias (*Rubus fruticosus*, *Rubus maximus*, *Rubus idaeus* e *Rubus caesius*), uma da América Tropical (*Rubus jamaicensis*), duas da China e Japão (*Rubus parpifolius* e *Rubus japonicus*) e três das regiões boreal-temperada (*Rubus saxatilis*, *Rubus articus* e *Rubus chamaemorus*) (FUKS et al., 1984).

O gênero *Morus* pertencente à família Moraceae, tem sua origem na Ásia, está plenamente aclimatada no Brasil e é popularmente conhecido como o gênero das amoras. É uma árvore de copa ampla, com folhas mais compridas do que ovais, revestidas de pelos finos e possui flores em cachos. Produz um fruto ácido e comestível, sendo as folhas aproveitadas para alimentar o bicho-da-seda, *Bombix mora* (CRUZ, 1982).

As árvores de amora são de crescimento rápido quando jovem, e mais lento com o passar do tempo. Raramente excedem 10 a 15 metros de altura e seus frutos apresentam de 2 a 3 cm de comprimento. Em várias espécies, seus frutos são inicialmente brancos a amarelo pálido com bordas rosa, tornando-se vermelho durante o amadurecimento e escuro quando completamente maduros (PAWLOWSKA; OLESZEK; BRACA, 2008). No mundo, existem 24 espécies de *Morus* e elas são

encontradas em regiões de clima temperado e subtropical, podendo se desenvolver em diversas condições climáticas (ERCISLI; ORHAN, 2007).

2.2. Uso popular

O chá feito a partir de folhas de *Rubus idaeus* é utilizado na medicina popular para o tratamento de feridas, diarreia, cólica, estomatite, amigdalite, conjuntivite e como relaxante uterino. Muitas mulheres o consomem durante a gravidez na crença de que ele encurte e facilite o trabalho de parto (VENSKUTONIS; DVARANAUSKAITE; LABOKAS, 2007; HOLST; HAAVIK; NORDENG, 2009).

O chá de folhas, cascas e ramos de *Morus alba* vêm sendo utilizados pela medicina tradicional chinesa para proteger o fígado, melhorar a visão, fortalecer articulações, baixar a pressão arterial, como antitérmico e como diurético (KATSUBE et al., 2010). No Brasil, o chá das folhas de *Morus nigra* é bastante utilizado pela população para o tratamento de diabetes, colesterol, problemas cardiovasculares, obesidade e gota (OLIVEIRA et al., 2013).

2.3. Composição química

Em 1982, quercetina e canferol foram identificados na espécie *Rubus ulmifolius* por cromatografia em camada delgada (CCD). Esta descoberta foi feita com base na extração etanólica por soxhlet dos compostos presentes nas folhas desta planta, da separação deles por CCD e da identificação diante da comparação das amostras com substâncias de referência (TZOUWARA-KARAYANN; PHILIANOS, 1982).

Décadas depois, lançando mão de ferramentas analíticas mais modernas, pesquisadores identificaram e determinaram a quantidade de flavonoides e taninos presentes no extrato hidrolisado de folhas de espécies de *Rubus* por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Entre as plantas analisadas, estavam *Rubus saxatilis*, *Rubus idaeus*, *Rubus occidentalis*, *Rubus fruticosus*, *Rubus caesius*, *Rubus nessensis* e *Rubus odoratus*; e entre as substâncias identificadas estavam quercetina, canferol e ácido gálico. A maior e a menor concentração de quercetina e canferol foram encontradas nas espécies *Rubus nessensis* (1,06%) e *Rubus fruticosus* (0,27%), respectivamente, estes valores representam a soma destas agliconas. Já a maior e a

menor concentração de ácido elágico foram encontradas nas amostras de *Rubus nessensis* (6,89%) e *Rubus occidentalis* (2,06%), respectivamente, demonstrando o quanto as folhas de *Rubus* são ricas em compostos fenólicos (GUDEJ; TOMCZYK, 2004).

Em 2007, autores identificaram a presença de quercetina glicuronídeo, quercetina-3-O-glicosídeo e rutina no extrato etanólico de folhas de *Rubus idaeus* por CLAE (VENSKUTONIS; DVARANAUSKAITE; LABOKAS, 2007). Dois anos depois, pesquisadores analisaram o extrato orgânico de folhas de *Rubus ulmifolius* e identificaram e quantificaram ácido gálico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido elágico, rutina, quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo, quercetina e canferol nesta amostra por CLAE-DAD e espectro de massas (EM). O composto detectado em maior concentração no extrato foi o ácido elágico (0,167%, p/p) seguido de quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (0,135%, p/p) e em menor foi o canferol (0,001%, p/p) seguido de quercetina (0,002%, p/p) (MARTINI et al., 2009).

Por meio de ensaios espectrofotométricos, cientistas analisaram a quantidade de flavonoides totais presentes no extrato aquoso de folhas de *Rubus idaeus*. Como resultado, obtiveram 24,46 mg de EAG (equivalente em ácido gálico)·g⁻¹ de planta seca. Por CLAE, verificaram que os derivados de quercetina eram os principais flavonoides presentes neste extrato (DURGO et al., 2012).

Outros pesquisadores realizaram a percolação do extrato metanólico de folhas de *Rubus ulmifolius* e, a partir das frações obtidas, identificaram os compostos quercetina-3-O-β-D-glucuronídeo, canferol-3-O-β-D-glucuronídeo, ácido gálico, ácido ferúlico e tilirosídeo nesta planta por ressonância magnética nuclear, RMN (PANIZZI et al., 2002).

Também por RMN, os compostos quercetina 3-O-β-D-glicosídeo, quercetina 3-O-β-D-galactosídeo, canferol 3-O-β-D-galactosídeo, canferol 3-O-β-L-arabinopiranosídeo, canferol 3-O-β-D-(6'-E-p-cumaroil)-glicosídeo (tilirosido) e galato de metila foram identificados a partir da percolação do extrato de folhas de *Rubus idaeus* (GUDEJ, 2003).

Em um trabalho recente, isolou-se os compostos ácido salicílico, canferol, quercetina, tirosina, quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo e canferol-3-O-β-D-

glicopiranosídeo a partir da fração etanol 70% (v/v) do extrato aquoso de folhas de *Rubus chingii* e identificou-se os mesmos por RMN (HAN et al., 2012).

Ainda são poucos os estudos a respeito da composição química das folhas de *Rubus* sp. Observando os trabalhos publicados nas últimas décadas é possível perceber que os flavonoides derivados da quercetina e do canferol são os metabólitos secundários mais relatados nas diversas espécies de *Rubus*.

Existem alguns trabalhos a respeito da presença de terpenoides em folhas de *Rubus* sp. Em 1984, um triterpeno, identificado como ácido rubínico, foi isolado de folhas de *Rubus fruticosus* e sua estrutura química foi determinada como ácido 7- α -hidroxiursonico por RMN (MUKHERJEE et al., 1984).

Tempo depois, dez outros diterpenos glicosídicos foram identificados nas folhas de *Rubus suavissimos* por RMN. Estes autores, além de identificar as estruturas presentes na folha desta espécie, se preocuparam também em atribuir características organolépticas a estes compostos. As estruturas identificadas foram denominadas de suaviosídeos B, C₁, D₁, D₂, E, F, G, H, I e J. Os compostos B, G, H, I e J foram classificados como de sabor doce, C, D₂ e F como de sabor amargo e D₁ e E como de sabor ruim (OHTANI et al; 1992). Lien e colaboradores (1999) identificaram a presença de cinco triterpenos derivados do ácido ursólico em folhas de *Rubus cochinchinensis*, incluindo o novo composto 2-O-acetilsuavissimosídeo F1, por RMN.

Os estudos químicos a respeito das folhas de *Morus* são recentes. Pesquisadores extraíram flavonoides e ácidos fenólicos presentes nas folhas das espécies *Morus alba* variedade *alba*, *Morus alba* variedade *rosa* e *Morus rubra* com solução metanólica 50% (v/v) e os analisaram por CLAE-DAD/EM. Os compostos identificados foram: ácido 1- cafeoilquinico, ácido cafeico, ácido 5- cafeoilquinico, ácido 4- cafeoilquinico, quercetina-3-O-ramnosídeo-7-O-glicosídeo, quercetina-3,7-D-O- β -D-glicopiranosídeo, canferol-7-O-glicosídeo, rutina, quercetina-3-O-glicosídeo, quercetina-3-O-(6-malonil)- β -D-glicopiranosídeo, quercetina-3-O-glicosídeo-7-O-ramnosídeo, canferol-3-O-glicopiranosil-(1,6)- β -D-glicopiranosídeo e canferol-3-O-(6-malonil)-glicosídeo (THABTI et al., 2012).

Também por CLAE-DAD, autores descreveram a presença de astragalina no extrato metanólico de folhas de *Morus alba*, assim como de canferol e de quercetina

(CHOI et al. 2013). Skupien e colaboradores (2008) analisaram o extrato hidrolisado de folhas de *Morus alba* por CLAE-DAD e identificaram a presença de ácido neoclorogênico, derivados do ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido cafeico, derivados de quercetina, quercetina e canferol.

Katsube e colaboradores (2006) relataram a presença de rutina, isoquercetrina, quercetina 3-(6-malonilglicosídeo) e astragalina no extrato de folhas de *Morus alba* por técnicas de CLAE, EM e RMN. Dat e colaboradores (2010) isolaram onze flavonoides presentes em folhas de *Morus alba* e identificaram estes compostos como: 3'-geranil-3-prenil-2',4',5,7- tetrahidroxiflavona; 3',8-diprenil-4',5,7- trihidroxiflavona; kuwanon S; 8-geranilapigenina; ciclomulberrina; sanggenona J; sanggenona K; ciclomorusina; morusina; atalantoflavona e canferol, por RMN.

Também por RMN, foi identificada a substância 1-deoxynojirimicina (DNJ) em espécies de *Morus*. Este composto é capaz de gerar alta inibição da glicosidase e efeitos antioxidante, antimicrobianos e anti-inflamatórios. Ele foi quantificado em 132 variedades de nove espécies de *Morus* e como resultado os autores verificaram que a quantidade de DNJ presente nestas folhas variou entre 0,1341 a 1,472 mg g⁻¹ de folha seca e que as folhas mais jovens continham concentrações mais elevadas de DNJ do que as mais antigas. Além disto, segundo estes autores, o conteúdo de DNJ nas folhas se mostrou diretamente relacionado com a variedade analisada e sem nenhuma relação óbvia com a espécie e o seu local de origem (HU et al., 2013).

Suntornsuk, Kasemsook e Wongayal (2003) quantificaram o composto quercetina presente no extrato hidrolisado de folhas de *Morus alba* por eletroforese capilar. Os autores utilizaram ácido bórico 150 mM (pH 10,0) como eletrólito e os eletroferogramas foram analisados a 270 nm. O método foi validado e, quando aplicado na amostra, os autores encontraram 0,452 g de quercetina em 100 g de planta seca.

Fazendo uso de outras condições eletroforéticas, pesquisadores identificaram rutina, ácido clorogênico, apigenina, luteolina, quercetina, morina, ácido cafeico e ácido gálico, no extrato etanólico de folhas de *Morus alba*. O eletrólito de corrida foi H₃BO₃-NaB₄O₇ a 50 mmol L⁻¹ e as análises foram realizadas utilizando-se detector amperométrico. O composto detectado em maior concentração na amostra foi rutina e

em menor luteolina 179,1 e 2,1 $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta seca, respectivamente (CHU et al., 2006).

Em 2010, autores brasileiros identificaram a presença dos terpenoides ácido betulínico, β -sitosterol e germanicol no extrato das folhas de *Morus nigra*, feito com diclorometano, por CLAE-DAD e por RMN (PADILHA et al., 2010).

Diante destes estudos é possível observar que o gênero *Rubus* vem sendo quimicamente estudado através de técnicas analíticas como CCD, CLAE, UV, EM e RMN. Já o gênero *Morus* vem sendo caracterizado quimicamente através de ferramentas como CLAE, UV, EM RMN e EC. Além disso, é possível observar uma grande semelhança química entre estes dois gêneros, uma vez que suas espécies costumam apresentar metabólitos secundários derivados de quercetina e de canferol.

Frente aos estudos químicos de folhas de plantas do gênero *Rubus* e *Morus*, é possível observar que não se tem relatos na literatura a respeito da composição química de folhas de *Rubus erythrocladus* e nem a respeito de flavonoides em folhas de *Morus nigra*.

2.4. Estudos biológicos

2.4.1. Ação antioxidante

Atualmente, os flavonoides e demais compostos fenólicos presentes nas plantas têm recebido muita atenção devido a sua capacidade antioxidante. Este efeito deve-se principalmente às propriedades redutoras e estrutura química destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

Autores avaliaram a atividade antioxidante de amostras *Rubus idaeus* coletadas em diferentes lugares na Lituânia. O extrato foi feito com etanol e a capacidade antioxidante foi medida por ABTS e DPPH. Todos os extratos se mostraram ativos, de 20,5 a 82,5% em DPPH e 8,0 a 42,7% em ABTS (VENSKUTONIS; DVARANAUSKAITE; LABOKAS, 2007).

Martini e colaboradores (2009) determinaram a capacidade antioxidante do extrato de folhas de *Rubus ulmifolius* e de seus compostos isolados através do ensaio da descoloração do reagente ABTS, a 751 nm. Os resultados mostraram que os compostos isolados apresentaram maior atividade do que o extrato (0,122 ET –

equivalente em Trolox). As substâncias que apresentaram maior e menor capacidade antioxidante foram ácido gálico (4,88 ET) e canferol (1,60 ET), respectivamente.

Para avaliar a capacidade antioxidante das folhas de *Morus alba*, pesquisadores elaboraram diferentes extratos desta planta a partir de diferentes concentrações de solução aquosa de etanol. Os melhores resultados foram obtidos com etanol 60% (v/v) que apresentou alta atividade antioxidante do LDL e os flavonoides rutina, isoquercetrina e quercetina 3-(6-malonilglicosídeo) foram os principais responsáveis por esta ação terapêutica do extrato (KATSUBE et al., 2006).

Choi e colaboradores (2013) pesquisaram a respeito das propriedades antioxidantes do extrato metanólico das folhas de *Morus alba*, bem como dos flavonoides isolados a partir deste extrato. A atividade antioxidante foi realizada através de hemólise oxidativa de células vermelhas humanas normais induzida por AAPH [2,2'azobil (2-amidinopropano) dihidroclorido]. Os resultados mostraram que o extrato metanólico de *Morus alba* e os flavonoides isolados desta planta, principalmente a astragalina, produzem um efeito protetor, ou seja, antioxidante.

2.4.2. Ação anticâncer

Recentemente, a framboesa-vermelha recebeu atenção de pesquisadores e consumidores por conter níveis elevados de ácido elágico, conhecido como agente anticâncer. A ação do extrato de folhas de *Rubus idaeus* em células humanas de carcinoma na laringe (HEp2) e no colo (SW 480) demonstra que estas são mais suscetíveis ao extrato, indicando que a resposta celular depende do tipo de célula a que o extrato está sendo exposto (DURGO et al., 2012).

Em outro estudo, pesquisadores isolaram flavonoides presentes em extratos de folhas de *Morus alba* e verificaram a ação de cada composto em células humanas de adenocarcinoma cervical, hepatocarcinoma e carcinoma mamário. O canferol foi a substância que menos apresentou ação contra estes três carcinomas. O composto morusina apresentou melhores resultados contra o adenocarcinoma cervical, o sanggenona K contra o câncer de mama e o 8-geranilapigenina contra o hepatocarcinoma. Estes resultados indicam que os flavonoides com o grupo prenila e geranila aumentam a citotoxicidade da flavona - a citotoxicidade foi avaliada pelo método

MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) 2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (DAT et al., 2010).

Skupien e colaboradores (2008) determinaram a atividade antileucêmica do extrato hidrolisado obtidos a partir de folhas de *Morus alba*. Os ensaios foram realizados utilizando linhagem de células promielocíticas (HL60) e multirresistentes a fármacos: HL60/VINC e HL60/DOX. Os autores observaram que o extrato se mostrou ativo *in vitro* contra a linhagem de células sensíveis e as resistentes.

2.4.3. Ação no sistema circulatório

Muitas plantas vêm sendo estudadas como fontes naturais de compostos antiangiogênicos. Dentro deste contexto, Liu e colaboradores (2006) analisaram a atividade antiangiogênica do extrato aquoso de folhas de *Rubus suavissimus*. O extrato vegetal elaborado foi fracionado, e duas frações a 0,1% (p/v) apresentaram resposta significativa na inibição da angiogênese em cultura de tecido humano. Este resultado foi atribuído à presença de ácido gálico na fração ativa, e os autores sugerem a presença de outro composto que esteja contribuindo para potencializar o efeito antiangiogênico - porém não conseguiram identificá-lo.

Han e colaboradores (2012) verificaram a atividade antitrombótica de folhas de *Rubus chingii*. A fração etanol 70% (v/v) obtida a partir do extrato aquoso das folhas de *Rubus chingii* foi a que apresentou melhor atividade antitrombótica, tanto *in vitro*, pelo teste do tempo de recalcificação do plasma de coelhos, como *in vivo*, pelo teste em ratos utilizando embolia pulmonar aguda induzida por adenosina difosfato. Assim, os autores concluem que os flavonoides presentes nesta fração tem uma forte contribuição como agentes antitrombóticos, e que substâncias presentes em traços também podem estar contribuindo para a ação terapêutica.

O efeito vasoativo do extrato de folhas de *Morus alba*, feito com acetato de etila, foi relatado por alguns pesquisadores. Através de experimentos em ratos, eles verificaram que este extrato tem um efeito positivo no relaxamento de anéis da aorta. Ainda indicam que ele estaria agindo diretamente sobre as células do músculo liso vascular para induzir a este relaxamento, e não por mediadores como óxido nítrico e prostaciclina (XIA et al., 2008).

2.4.4. Ação anti-inflamatória

O uso de plantas medicinais como anti-inflamatórios é uma prática bastante comum na medicina popular brasileira. Entretanto, os compostos ativos muitas vezes são ainda desconhecidos (CALIXTO, 2001). Pesquisadores brasileiros verificaram a atividade anti-inflamatória do extrato de folhas de *Morus nigra* feito com diclorometano em modelos animais. Doses de 100 a 300 mg kg⁻¹ foram administradas via oral e houve redução do edema na pata de rato, induzido por carragenina, e inibição significativa da formação de tecido granulomatoso induzido. Os autores sugerem que a presença de ácido betulínico, β-sitosterol e germanicol no extrato podem estar contribuindo para o este efeito anti-inflamatório (PADILHA et al., 2010).

2.4.5. Ação hipoglicêmica

Muitas espécies de plantas são utilizadas popularmente para tratar dos sintomas do diabetes mellitus. Ao serem avaliadas farmacologicamente demonstram ter atividade hipoglicemiante e apresentam constituintes químicos que podem ser utilizados como modelos para novos agentes hipoglicemiantes (NEGRI, 2005). Em um trabalho publicado em 2002, cientistas analisaram o efeito hipoglicêmico da administração oral do extrato aquoso de folhas de *Rubus fruticosus* em ratos com diabetes mellitus, induzida por estreptozotocina, e em ratos normais. Os ratos com diabetes mostraram uma normalização dos níveis de glicose no sangue depois de nove dias de tratamento, entretanto, os níveis de insulina não sofreram alteração tanto nos animais com diabetes quanto nos normais. O resultado obtido neste estudo mostrou que os efeitos farmacológicos do extrato aquoso de folhas de *Rubus fruticosus* foram mais potentes do que a metiformina. Nenhuma ação tóxica deste extrato foi observada nas doses utilizadas (JOUAD; MAGHRANI; EDDOUKS, 2002).

Em 2011, autores investigaram o efeito da administração de extrato aquoso de folhas de *Morus nigra* em ratas gestantes. Os pesquisadores induziram diabetes em ratas fêmeas Wistar e administraram o extrato a 400 mg kg⁻¹ por dia. Eles observaram que depois deste tratamento, tanto os ratos diabéticos como os não diabéticos apresentaram alterações glicêmicas. Entre os diabéticos, o tratamento gerou uma diminuição significativa nos níveis de MDA (malonil-dialdeído), colesterol,

triglicerídeos e VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade). Entre os não diabéticos e tratados com o extrato, os autores não observaram nenhuma ação hipoglicemiante e verificaram que os mesmos apresentaram um aumento dos níveis de sua atividade antioxidante. Segundo estes pesquisadores, o efeito antioxidante do extrato serviu para reduzir a incidência de anomalias na prole das ratas diabéticas (VOLPATO et al., 2011).

Recentemente, foi divulgado um estudo no qual cientistas avaliaram o efeito do extrato aquoso de folhas de *Morus alba* sobre a glicose pós-prandial em indivíduos saudáveis. Como resultado, observaram que depois da administração do extrato, aos 30 e 60 minutos, houve uma melhora do controle da glicemia (CHUNG et al., 2013).

2.4.6. Ação no sistema nervoso

Ansiedade e depressão são frequentemente identificadas como transtornos do humor relacionados ao estresse do cotidiano. Estima-se que mais de 20% da população adulta sofra de tais condições em algum momento da sua vida (DANG et al., 2009). Na busca de novas moléculas úteis para o tratamento de distúrbios neurológicos, a pesquisa com plantas medicinais continua apresentando progressos (GALDINO et al., 2009).

Autores brasileiros investigaram o efeito ansiolítico das folhas de *Rubus brasiliensis* em ratos e em camundongos. Os extratos foram obtidos através do processo de infusão das folhas e de maceração com etanol, que foi fracionado com butanol e água. A metodologia utilizada nos ensaios biológicos foi o teste do labirinto em cruz elevado. Os extratos e frações foram administrados a ratos Wistar e a camundongos Swiss por via oral a 50, 100 e 150 mg.kg⁻¹ (30 minutos antes da avaliação comportamental). Tanto a infusão, como as frações apresentaram efeito ansiolítico ao serem administradas nos animais (NOGUEIRA et al., 1998).

Nogueira e Vassilieff (2000) avaliaram o efeito hipnótico, anticonvulsivante e relaxante da fração hexânica do extrato etanólico de folhas de *Rubus brasiliensis* em camundongos Swiss. Na dose de 300 mg.kg⁻¹, esta fração apresentou tanto efeito hipnótico, como anticonvulsivante e relaxante muscular (efeitos similares foram observados para o diazepam). Estes cientistas sugerem que ela estaria atuando de

forma agonista ao receptor GABA_A, receptor benzodiazepínico. Entretanto, ela não foi capaz de induzir estes efeitos em doses abaixo de 150 mg.kg⁻¹.

Em outro estudo, o efeito do extrato aquoso de folhas de *Morus alba* sobre a depressão, ansiedade, atividade de escala, resposta térmica, coordenação e resistência muscular foi testado em camundongos. Os animais receberam uma única injeção intraperitoneal do extrato de *Morus* e, trinta minutos após, foram testados em modelos experimentais. Os resultados sugerem que o extrato apresenta um efeito antidepressivo, sem ação ansiolítica. Em altas doses, contudo, o extrato mostra efeito sedativo e altera outras funções como resistência muscular, atividade do animal no labirinto e resposta a dor (SATTAYASAI; TIAMKAO; PUAPAIROJ, 2008).

2.4.7. Ação gastrointestinal

Cientistas avaliaram *in vitro* a ação do extrato de folhas de *Rubus idaeus* no ileum de porcos. Estes pesquisadores realizaram ensaios bioguiados com extratos feitos com solventes de diferentes polaridades. Os melhores resultados foram obtidos para o extrato metanólico, indicando que os compostos ativos são de natureza relativamente polar. A partir destes dados, os autores realizaram o fracionamento deste extrato metanólico com clorofórmio e metanol em diferentes proporções e obtiveram evidências de que há pelo menos dois componentes neste extrato que exibem ação gastrointestinal relaxante *in vitro*, porém não os identificaram (ROJAS-VERA; PATEL; DACKE, 2002).

2.4.8 Ação antiobesidade

A obesidade vem se tornando um grande problema de saúde pública e sua prevalência tem crescido acentuadamente nas últimas décadas até mesmo nos países em desenvolvimento, o que a levou à categoria de epidemia global. Neste contexto, plantas que são popularmente conhecidas como auxiliares na perda de peso se tornam alvo de pesquisas para o desenvolvimento de novas moléculas eficientes no tratamento da obesidade (SOUZA et al., 2012).

Pesquisadores avaliaram a ação antiobesidade do extrato etanólico de folhas de *Morus alba* em ratos com obesidade induzida. Este estudo demonstrou que este extrato

exerce ação antagônica ao receptor MCH₁, alvo terapêutico importante da obesidade, e que a administração crônica deste extrato em ratos com obesidade induzida fez diminuir o peso corporal, o consumo alimentar e a adiposidade deles. A partir destes resultados, os autores sugerem que o extrato etanólico de folhas de *Morus alba* pode ser um alvo de estudo promissor para um novo fármaco antiobesidade (OH et al., 2009).

Em 2013, Tsuduki e colaboradores divulgaram um estudo a respeito do efeito antiobesidade do composto 1-deoxinojirimicina (DNJ) extraído de folhas de *Morus alba*. Esta ação foi avaliada através do modelo da dieta induzida em ratos, sendo este composto administrado em ratos obesos durante 12 semanas. Como resultado, o DNJ diminuiu o peso de gordura visceral e o tamanho dos adipócitos dos animais. Com a finalidade de avaliar a influência do DNJ no metabolismo dos lipídeos, os pesquisadores analisaram parâmetros de lipídeos no plasma e no fígado e a atividade de várias moléculas relacionada ao metabolismo dos lipídeos no fígado. Eles observaram que o composto DNJ ativou o sistema de β -oxidação, suprimiu o acúmulo de lipídeos no fígado e reduziu as quantidades de triglicerídeos plasmáticos. Os níveis de adiponectina no plasma foram verificados e os autores observaram que a quantidade deste composto no plasma aumentou com a ingestão de DNJ, sugerindo que DNJ promove um aumento de adiponectina e ativa o sistema de β -oxidação. Por fim, estes pesquisadores demonstraram que DNJ previne a obesidade induzida por dieta através do aumento da adiponectina.

2.4.9. Ação antimicrobiana

Vários óleos e extratos vegetais vêm sendo utilizados como antissépticos tópicos ou relatam possuir propriedades antimicrobianas. O interesse em terapias naturais e uma maior preocupação com a elaboração de produtos seguros tem feito crescer a necessidade de informações a respeito dos produtos naturais. Assim, se torna cada vez mais importante investigar cientificamente espécies vegetais a fim de obter fontes de novos compostos antimicrobianos (HAMMER; CARSON; RILEY, 1999).

Martini e colaboradores (2009) pesquisaram a respeito da atividade antimicrobiana das folhas de *Rubus ulmifolius* contra duas cepas de *Helicobacter*

pylori (CagA⁺ e CagA⁻). Os compostos fenólicos presentes no extrato foram identificados e quantificados. A ação antimicrobiana foi testada para os compostos isolados e para o extrato. O extrato de *Rubus ulmifolius* e seus compostos isolados apresentaram significativas propriedades antimicrobianas. O isolado rutina foi o único que apresentou atividade contra a cepa mais virulenta de *Helicobacter*, já o ácido elágico mostrou baixa atividade contra ambas as cepas.

No Brasil, pesquisadores avaliaram o extrato de folhas de *Rubus rosaefolius* como conservante natural em formulações tópicas, gel e emulsão. As formulações foram preparadas utilizando 0,2% (p/p) do extrato da planta e os microrganismos testados foram *Escherichia coli* ATCC 100536, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Candida albicans* ATCC 10231 e *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Tanto o gel, quanto a emulsão contendo extrato de *Rubus rosaefolius* apresentaram ação antimicrobiana de acordo com critérios oficiais, como a Farmacopeia Europeia. Este extrato apresentou ação contra cepas Gram-negativas e Gram-positivas, apresentando efeito letal dois dias após a inoculação. O efeito antifúngico não se mostrou de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Farmacopeia Europeia, entretanto, teria sido aprovado dentro dos padrões USP. A partir destes resultados, os autores realçam a importância de se utilizar extratos vegetais como conservantes em formulações farmacêuticas com a ideia de gerar produtos mais seguros ao consumidor (OSTROSKY et al., 2011).

Thiem e Goslinska (2004) estudaram o efeito antibacteriano da fração butanólica do extrato metanólico de folhas de *Rubus chamaemorus*. Esta fração apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* ATCC 9538, *Staphylococcus epidermidis* NCTC 11047, *Micrococcus luteus* NCTC 9341, *Escherichia coli* NCTV 8196, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Candida albicans* ATCC 10231. As concentrações inibitórias mínimas (MIC) da fração variaram de 0,58 a 2,33 mg mL⁻¹ e as concentrações bactericidas mínimas (MBC) variaram de 0,58 a 4,66 mg mL⁻¹ frente os microrganismos testados.

Em outro estudo, cientistas avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato de folhas de *Rubus ulmifolius* e de seus constituintes isolados (Fração I: triterpenos,

Fração II: quercetina-3-*O*- β -D-glucuronídeo, canferol-3-*O*- β -D-glucuronídeo, ácido gálico, ácido ferúlico e tilirosídeo, Fração III: taninos). Os microrganismos utilizados foram *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*. Os autores observaram que os melhores resultados de atividade antimicrobiana foram obtidos pelas frações II e III. Entre os compostos isolados da fração II, quercetina-3-*O*- β -D-glucuronídeo e canferol-3-*O*- β -D-glucuronídeo se mostraram sem ação frente todos os microrganismos testados, e o ácido ferúlico foi a substância que apresentou melhor resultados frente a estes patógenos (PANIZZI et al., 2002).

Omidiran e colaboradores (2012) realizaram ensaios de atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de folhas de *Morus alba* produzidos de três maneiras diferentes: (1) água fria, (2) água quente e (3) etanol. Os extratos tiveram ação contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aureginosa*, *Streptococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Proteus vulgaricus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium oxalicum*. O extrato etanólico apresentou maior ação contra *Pseudomonas aureginosa* e *Streptococcus faecium*, e menor ação contra *Aspergillus tamari*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium oxalicum*. Os valores de MIC para os extratos aquosos foram menores do que para o extrato etanólico, indicando a maior potência daqueles extratos.

Diante do potencial biológico dos flavonoides e da ampla ação antimicrobiana dos gêneros *Morus* e *Rubus*, optou-se por realizar ensaios de atividade antifúngica dos extratos de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*.

Os fungos se desenvolvem em meios especiais de cultivo formando colônias de dois tipos: leveduriformes e filamentosas. As primeiras geralmente são pastosas ou cremosas e caracterizam o grupo das leveduras. As colônias filamentosas, que identificam os bolores, podem ser algodonosas, aveludadas, pulverulentas e com os mais variados tipos de pigmentação (GOMPertz et al., 2005).

O fitopatógeno *Fusarium graminearum* está entre os mais importantes na cultura do milho, causando doenças como podridão radicular, morte de plântulas, podridão de espiga, podridão de colmo, podendo levar a reduções na produtividade e qualidade de grãos nas lavouras (JÚNIOR et al., 2013).

Tanto em humanos quanto em animais, os fungos são capazes de invadir e infectar tecidos queratinizados como pelo, pele e unhas, causando as chamadas dermatofitoses (BALAKUMAR et al., 2011). As infecções causadas por dermatófitos são de difícil tratamento e frequentemente apresentam recorrência, sendo a cura espontânea muito improvável (JAMALIAN et al., 2012). Logo, existe um grande interesse na investigação da atividade antifúngica de extratos vegetais com a finalidade de se disponibilizar no mercado novos tratamentos contra estes patógenos.

2.5. Ação toxicológica

Oliveira e colaboradores (2013) realizaram um ensaio toxicológico pré-clínico para avaliar a toxicidade do extrato aquoso de folhas de *Morus nigra*. A toxicidade subcrônica da infusão foi avaliada durante 30 dias por via oral em ratos. Ao final dos experimentos, o sangue dos animais foi retirado para análise de parâmetros hematológicos e bioquímicos. Não houve mortalidade, alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Como não apresentou sinais de toxicidade, o extrato aquoso de *Morus nigra* foi considerado de baixa toxicidade.

2.6. Estudo de biotecnologia

Pesquisadores analisaram por citometria de fluxo o DNA de *Rubus chamaemorus*. A citometria de fluxo se revelou um método rápido e preciso para estimar o tamanho do genoma desta planta. As análises mostraram que não há variação de ploidia entre as diferentes culturas de células analisadas, todas diploides, e estimam um tamanho para o genoma desta planta (THIEM; SLIWINSKA, 2003).

Autores avaliaram a sequência de gene remorina (*MiREM*) localizado na membrana plasmática de todos os órgãos vegetais de *Morus indica*. A análise da expressão de *MiREM* foi feita por Northern Blot e revelou que a transcrição deste gene aumenta sob diferentes condições de estresse abiótico, especialmente durante a desidratação e estresse salino (CHECKER; KHURANA, 2013).

2.7. Estudos de estresse abiótico

Pesquisadores relacionaram os efeitos da deficiência e do excesso de Manganês (Mn), com a produção de espécies reativas de oxigênio em *Morus alba*. Plantas cultivadas com baixos níveis de Mn apresentaram pequena concentração de Mn e clorofila, e grande concentração de Fe, Zn e Cu. Tanto os níveis de peróxido de hidrogênio, quanto os de peroxidação lipídica foram maiores em plantas com deficiência de Mn. Os autores sugerem que a deficiência e o excesso de Mn induz estresse oxidativo através do aumento dos índices de espécies reativas de oxigênio (TEWARI; KUMAR; SHARMA, 2013).

Guha, Sengupta e Reddy (2010) estudaram fatores que contribuem para manter a estabilidade na produção de folhas de amora mesmo em condições de seca. Os ensaios foram realizados utilizando quatro cultivares de *Morus indica*. Diminuição da temperatura das folhas, aumento da relação interna/ambiente de CO₂ e aumento da atividade dos estômatos foram associados com melhores taxas de fotossíntese, gerando rendimento máximo das folhas. Os autores também observaram que o aumento do acúmulo foliar de α -tocoferol e ácido ascórbico gerou menor peroxidação lipídica e melhor rendimento das folhas.

2.8. Biossíntese dos flavonoides

Os flavonoides são metabólitos secundários presentes em plantas vascularizadas. São compostos fenólicos que apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, tendo por base a estrutura flavona (DI CARLO et al., 1999). Eles podem ocorrer na forma aglicona, glicosídica ou como derivados metilados. Os flavonoides na forma aglicona são formados por um anel benzênico (A), condensado com um anel de 6 membros (C) que, por sua vez transporta um anel fenílico (B) como substituinte na posição 2, **Figura 1** (CUNHA, 2005). Os diferentes tipos de flavonoides diferem em relação aos seus substituintes e na natureza da composição do açúcar ligado à aglicona, podendo ocorrer na forma de *O*-glicosídeo ou *C*-glicosídeo, a primeira é quanto a glicose se liga a agliconas por meio de uma hidroxila e a segunda é quando esta ligação ocorre através de uma molécula de carbono (SAMUELSSON, 1999).

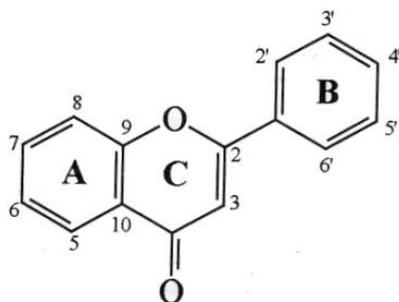


Figura 1. Núcleo fundamental dos flavonoides. FONTE: ZUANAZZI; MONTANHA, 2007.

O núcleo fundamental dos flavonoides é representado por dois anéis aromáticos ligados por uma ponte de três carbonos ($C_6-C_3-C_6$) sendo resultante de duas rotas biossintéticas: a do ácido chiquímico e a do acetato via ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este o responsável pelo anel aromático B e a ponte de três carbonos e o anel aromático A é formado pela rota do acetato.

O ácido chiquímico é o precursor de muitos compostos químicos presentes nas plantas, que apresentam anel aromático. A formação do ácido chiquímico procede dos precursores de três e quatro átomos de carbono, o fosfoenolpiruvato (PEP) e a eritrose-4-fosfato, respectivamente, através de uma série de etapas. A relação do ácido chiquímico com o fosfoenolpiruvato conduz a formação do chiquimato 3-fosfato, na presença da corismato sintase, sofre a perda do ácido fosfórico produzindo o corismato. O corismato, na presença de corismato mutase, sofre um rearranjo de Claisen formando o prefenato. A aminação redutiva do prefenato forma a fenilalanina. O ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina, em presença da L-fenilalanina amônia liase (PAL) a qual é capaz de catalisar a remoção da amônia (MANN, 1987).

O primeiro flavonoide formado na biossíntese é a chalcona. Todos os outros são derivados desta molécula através de várias rotas. A chalcona é formada pela condensação de 4-cumaroil CoA com três moléculas de malonil CoA, na presença de chalcona sintase. A ciclização da chalcona durante a síntese da flavanona é catalisada pela chalcona isomerase encontrada fortemente complexada com a chalcona sintase. A flavanona é precursora de três diferentes classes de flavonoides: flavonas, isoflavonas e diidroflavonóis. Os diidroflavonóis são formados pela ação de uma flavanona-3-

hidroxilase e dão origem aos flavonóis através da flavonol sintase, que por sua vez dão origem a flavonoides como canferol e quercetina, **Figura 2** (BRUNETON, 2001).

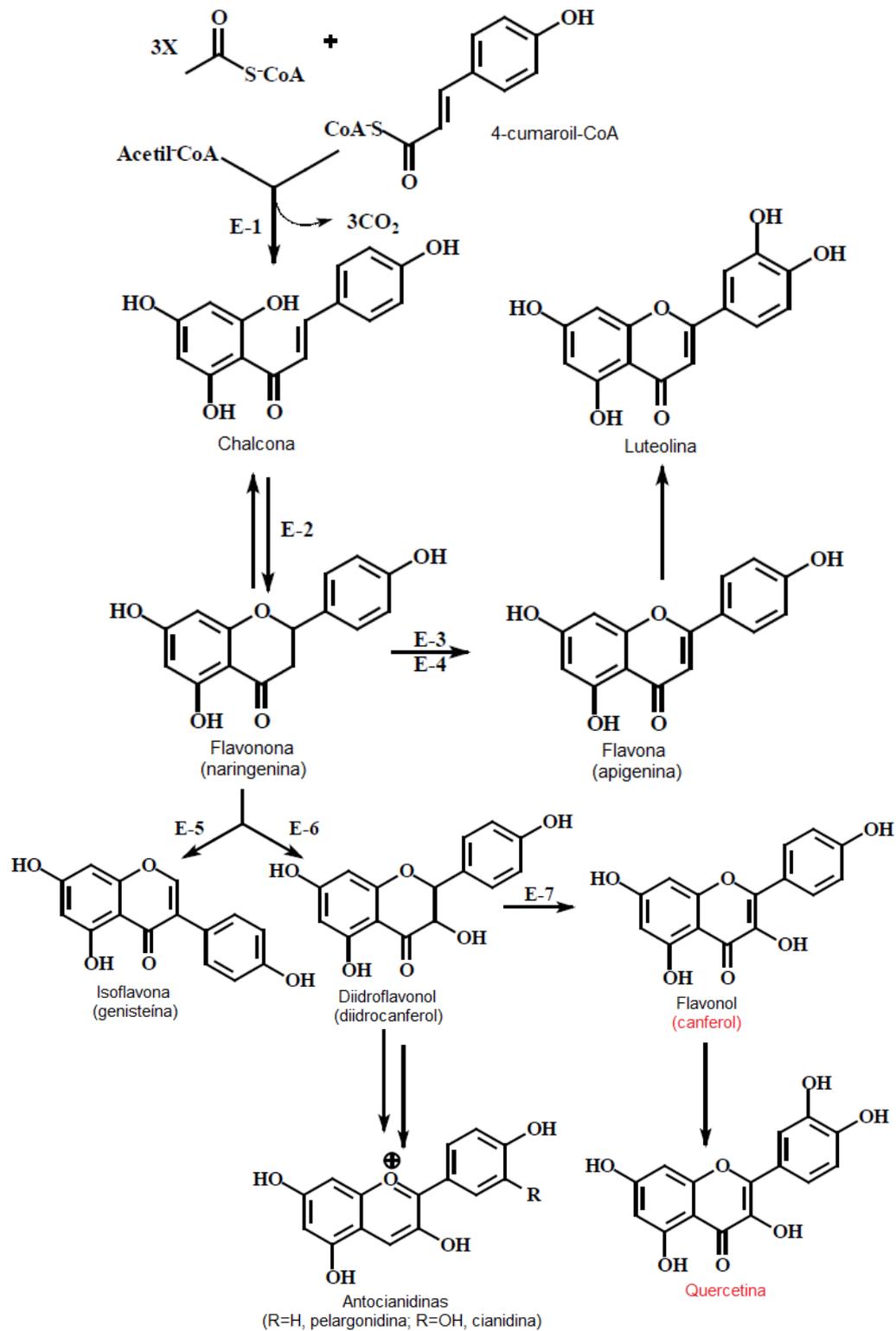
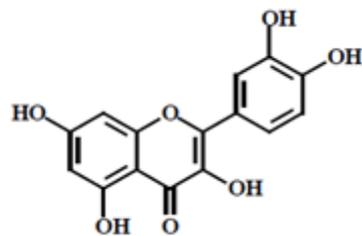


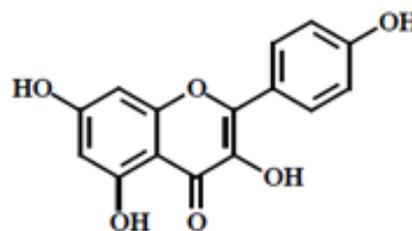
Figura 2. Biossíntese dos flavonoides. E-1: chalcona sintase; E-2: chalcona isomerase; E-3: flavona sintase I; E-4: flavona sintase II; E-5: isoflavonas sintase; E-6: flavanona-3-hidroxilase e E-7: flavonol sintase. Fonte: LIANDA, 2009.

A seguir estão dispostos exemplos de flavonoides derivados de quercetina e de canferol, **Figura 3**.



Quercetina

- 5,7,3',4'-tetra-OH - Quercetina
- 5,7,8,3',4'-penta-OH - Gossipetina
- 3'-Me-quercetina - Isoramnetina
- 5,7,3',4',5'-penta-OH - Miricetina
- 3-O-ram-miricetina - Miricetrina
- 3-O-ram-quercetina - Quercetrina
- 7-Me-quercetina - Ramnetina
- 3-O-rutinosídeo-quercetina - Rutina



Canferol

- 5,7,4'-tri-OH - Canferol
- 3-O-gli-canferol - Astragalina
- 5,7,8,4'-tetra-OH - Herbacetina
- 5,7,2',4'-tetra-OH - Morina

Figura 3. Exemplos de flavonoides derivados de quercetina e canferol. FONTE: ZUANAZZI; MONTANHA, 2007, adaptado.

2.9. Eletroforese Capilar (EC)

A separação por eletroforese foi desenvolvida inicialmente pelo químico sueco Arne Tiselius, na década de 1930, para o estudo de proteínas do soro sanguíneo. Este cientista ganhou o Prêmio Nobel de Química em 1948 por este trabalho (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A separação eletroforética é realizada pela introdução de uma pequena quantidade da amostra em uma solução tampão contida em um tubo estreito ou em um meio de suporte poroso e plano, como papel ou um gel semi-sólido. Uma alta diferença de potencial é aplicada sobre a extensão do tampão, por meio de um par de eletrodos localizados em cada extremidade do sistema e este campo faz com que os íons da amostra migrem. A velocidade de migração de cada espécie depende de sua carga e de seu tamanho, assim as separações são baseadas nas diferenças da razão carga/tamanho dos vários analitos em uma amostra. Quanto maior for esta razão, mais

rápido o íon migra no campo elétrico (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009; SKOOG et al., 2006).

Técnicas que fazem uso de eletromigração em capilares têm se tornado cada vez mais comum em Química Analítica (SILVA et al.; 2007). A eletroforese capilar surgiu na década de 1980 e tem passado por rápidos avanços devido à sua simplicidade e, principalmente, a variedade dos métodos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar (TAVARES, 1997).

A utilização de capilares (normalmente de sílica fundida) na execução da técnica introduziu uma importante peculiaridade, a geração do chamado fluxo eletrosmótico (FEO). A parede de sílica fundida contém grupos silanóis com pKa entre 3 e 5 que se ionizam de acordo com o pH da solução. Os cátions do tampão se agregam em uma camada elétrica dupla adjacente à superfície negativa do capilar. Os cátions na camada de difusão externa à dupla camada são atraídos na direção do cátodo ou do eletrodo negativo e, por estarem solvatados arrastam o solvente juntamente com eles. A velocidade de migração no fluxo eletrosmótico é geralmente maior do que a velocidade de migração eletroforética dos íons individuais e este fenômeno torna-se efetivamente a bomba da “fase móvel” em eletroforese capilar (ALTRIA, 1996).

Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície de um capilar, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletrosmótico (FEO) que faz com que compostos se movimentem dentro do capilar, **Figura 4** (TAVARES, 1995).

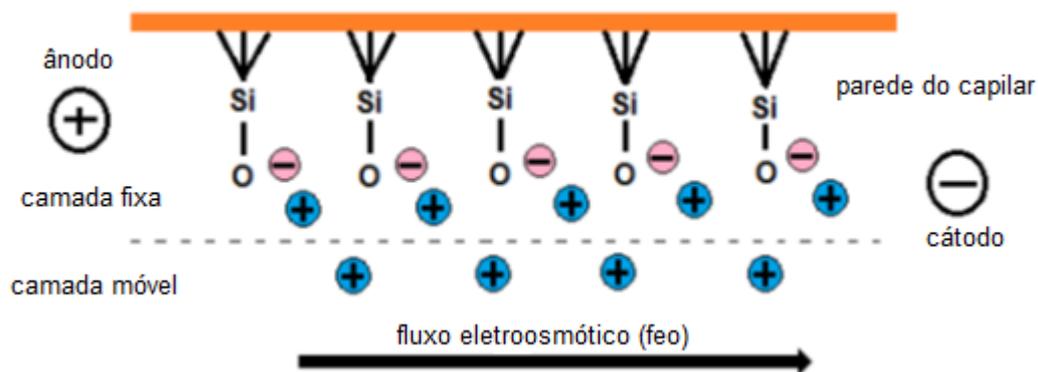


Figura 4. Representação esquemática do fluxo eletroosmótico. FONTE: HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009, adaptado.

Se uma solução contendo íons ou moléculas orgânicas, com diferentes tamanhos e cargas é posicionada na extremidade anódica do capilar, e uma diferença de potencial for aplicada, os íons da solução migrarão através do capilar em sentidos diferentes. A taxa e direção de migração dependem do tamanho dos íons e da magnitude e sinal das cargas. Espécies positivamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo de carga negativa, o cátodo, e as espécies negativamente carregadas migrarão em direção ao eletrodo de carga positiva, o ânodo. Os íons menores migrarão mais rápido que íons maiores de mesma carga, e um íon com maior número de cargas irá migrar mais rápido do que um com menor carga se possuir o mesmo tamanho. Cátions migram mais rápido do que o fluxo eletroosmótico, neutros na mesma velocidade, e os ânions migram mais lentamente, e a ordem de migração é, portanto, cátions, neutros e ânions (TAVARES, 1995).

O perfil plano do FEO origina-se da distribuição uniforme das cargas na parede do capilar, na qual a dupla camada eletroquímica, formada pela solvatação dos íons da camada de sílica, gera uma velocidade uniforme do fluxo e, conseqüentemente, picos mais eficientes (SHINTANI; POLONSKY, 1997). Já na CLAE, o fluxo laminar move-se mais lentamente próximo a coluna e mais rapidamente no centro, resultando em diferentes velocidades do soluto ao longo da coluna, gerando picos com um perfil mais largo (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

A introdução da amostra no capilar pode ocorrer de duas maneiras: por injeção hidrodinâmica ou por injeção eletrocínética. Na injeção hidrodinâmica, o capilar é

mergulhado em um frasco contendo a amostra o qual é submetido ao vácuo gerando a entrada de um certo volume 10 a 100 nL no capilar. Na injeção eletrocinética, o capilar e o eletrodo são introduzidos no frasco da amostra e em seguida ocorre a aplicação de uma voltagem através da qual solutos neutros são arrastados pelo FEO e solutos carregados irão migrar para dentro do capilar (SKOOG et al., 2006; TAVARES, 1995).

Quando os analitos migram pela janela de detecção do capilar, as informações obtidas são processadas por um software e é gerado um eletroferograma, diferente da cromatografia líquida, na qual se produz um cromatograma. A eletroforese capilar agrupa um grande número de separações eletrodirigidas utilizando diferentes mecanismos de separação. O intervalo de aplicações desta técnica varia desde a análise de moléculas pequenas até moléculas de milhares de Daltons. Os modos podem ser agrupados em subclasses:

- Eletroforese capilar de zona:

Na eletroforese capilar de zona, a composição do tampão é constante ao longo da região de separação e o campo aplicado faz com que cada um dos diferentes componentes iônicos da mistura migre de acordo com a sua mobilidade e se separe em zonas que podem ser completamente resolvidas ou que podem estar sobrepostas;

- Eletroforese capilar em gel:

A eletroforese capilar em gel é geralmente realizada em uma matriz polimérica porosa de gel cujos poros contêm uma mistura tampão. Este tipo de meio exerce uma ação de peneira molecular que retarda a migração dos analitos em vários graus, dependendo do tamanho do poro do polímero e do tamanho dos íons dos analito. Esta ação de peneiramento é particularmente útil na separação de macromoléculas, como proteínas, fragmentos de DNA e oligonucleotídeos;

- Focalização isoelétrica capilar:

A focalização isoelétrica capilar é empregada para separar espécies anfipróticas e a separação é realizada em uma mistura de tampões cujo pH varia continuamente ao longo o comprimento do capilar;

- Isotacoforese capilar:

Na isotacoforese capilar todas as bandas de analito migram na mesma velocidade e tanto cátions como ânions podem ser separados, mas não ao mesmo tempo. Para que a separação ocorra, a amostra é injetada entre duas soluções tampão. Na separação de ânions, os íons cloreto devem estar na primeira solução tampão e os íons heptanoatos, que se movem lentamente, devem estar na solução tampão final e a solução do eletrólito inicial deve estar em contato com o ânodo e a solução final em contato com o cátodo.

- Cromatografia eletrocinética micelar:

A cromatografia eletrocinética micelar permite que espécies neutras sejam separadas tão bem quanto espécies carregadas. Tensoativos são adicionados ao tampão em quantidades que excedem a concentração micelar crítica, como o dodecil sulfato de sódio (SDS). A superfície de uma micela iônica deste tipo apresenta uma carga negativa elevada, que lhe atribui uma mobilidade eletroforética grande.

- Eletrocromatografia capilar:

A eletrocromatografia capilar é um híbrido da cromatografia líquida de alta eficiência e da eletroforese capilar que oferece algumas das melhores características destes dois métodos. A técnica é aplicada para separar espécies neutras ou carregadas, o capilar é recheado com uma fase reversa, como C8, e o solvente é impulsionado pelo fluxo eletrosmótico (SILVA, et al. 2007; HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Amostras

As amostras autênticas de *Rubus erythrocladus* M. e *Rubus idaeus* L. (cultivar Golden Bliss) foram fornecidas pela Embrapa Clima Temperado de Pelotas-RS, através da pesquisadora Dra. Maria Bassols Raseira. As amostras de *Morus nigra* L. foram coletadas em Porto Alegre-RS, identificadas pelo botânico Dr. Sérgio Bordignon e depositadas no Herbário da UFRGS (número de identificação: 176765). Também se trabalhou com quatro amostras comerciais de folhas de amora.

3.2. Reagentes e padrões

Os solventes utilizados foram ácido fórmico e acetonitrila ultra pura da Merck, metanol ultra puro da Panreac, acetato de etila e metanol grau analítico da Merck, diclorometano grau analítico da Synth, ácido clorídrico grau analítico da Fmaia, e ácido trifluoroacético grau analítico da Vetec, tetraborato de sódio decahidratado e hidróxido de sódio Merck. Os padrões utilizados foram quercetina (Sigma, pureza $\geq 98\%$) e canferol (Sigma, pureza $\geq 97\%$).

3.3. Preparo das soluções padrões

Os padrões de referência de quercetina e canferol foram dissolvidos em metanol e preparados na concentração de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ como soluções estoque. A partir das soluções estoque preparou-se as soluções de trabalho de quercetina e de canferol nas concentrações de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol, para as análises no CLAE. Para as análises na EC, preparou-se soluções de trabalho de quercetina e de canferol nas concentrações de 15, 20, 30, 50, 75, 100 e $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, em metanol.

3.4. Condições cromatográficas - CLAE

As análises cromatográficas foram conduzidas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) da Waters, modelo 2695, com detector Dual, modelo 2487, e arranjo de diodos (DAD), modelo 996, e *software* Empower para aquisição e tratamento dos dados. Utilizou-se uma coluna de fase reversa, C18 (Phenomenex, 15 cm x 4,6 mm; 4 μm). Utilizou-se injetor automático (volume de injeção foi de 10 μL),

as amostras foram analisadas a 370 nm, à temperatura ambiente e o fluxo utilizado foi de 0,6 mL min⁻¹.

A fase móvel A constituiu-se de água com 0,01% (v/v) de ácido trifluoracético e a B de acetonitrila com 0,08% (v/v) de ácido trifluoracético. Diferentes tempos de análises e proporções de fase móvel foram testados até obter-se a melhor resolução dos picos de interesse. Na **Tabela 1**, está representado o sistema de gradiente utilizado para a separação cromatográfica.

Tabela 1. Gradiente utilizado para a análise de quercetina e canferol por CLAE.

| Tempo (minutos) | Fase A (%) | Fase B (%) |
|--------------------|---------------|---------------|
| 0 | 50 | 50 |
| 2 | 40 | 60 |
| 4 | 20 | 80 |
| 7 | 5 | 95 |

3.5. Condições cromatográficas - CLUE

Para as análises por cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE) utilizou-se o *software* Acquity UPLC Columns Calculator v.1.1.1 para transpor o método de CLAE, descrito no item 4.4., para um método de CLUE. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna de fase reversa, C18 (Acquity UPLC beh, 50 x 2,1 mm; 1,7 µm), o cromatógrafo utilizado foi da marca Waters, UPLC Acquity Waters, equipado com um detector de arranjo de diodos (DAD), acoplado a um espectrômetro de massas (EM Q-ToF Micro-Micromass) e utilizou-se a técnica de eletrospray no modo positivo (ES +). Utilizou-se o *software* Mass Lynx v. 4.1 para o tratamento e aquisição dos dados e os cromatogramas por DAD foram analisados no comprimento de onda de 200 a 400 nm.

A fase móvel A constituiu-se de água com 0,1% (v/v) de ácido fórmico e a B de acetonitrila com 0,1% (v/v) de ácido fórmico. A temperatura da coluna foi mantida a 25°C, o fluxo de fase móvel foi constante, 0,294 mL min⁻¹, e o volume de injeção foi de 1,0 µL. Na **Tabela 2**, está representado o sistema de gradiente utilizado.

Tabela 2. Gradiente utilizado para a análise de quercetina e canferol por CLUE.

| Tempo (minutos) | Fase A (%) | Fase B (%) |
|--------------------|---------------|---------------|
| 0 | 50 | 50 |
| 0,09 | 40 | 60 |
| 0,38 | 20 | 80 |
| 0,80 | 5 | 95 |

3.6. Condições eletroforéticas - EC

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (sistema EC^{3D} Hewlett Packard, Waldbronn, Alemanha), equipado com detector de arranjo de diodos e software HP ChemStation (rev A.06.03) para tratamento e aquisição de dados. O aparelho possui sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar, sendo a temperatura mantida constante durante as análises.

Os capilares utilizados foram de sílica fundida (Polymicro Technology, Phoenix, AZ, E.U.A.), revestidos externamente com poliimida, 50 µm de diâmetro interno, 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector, comprimento efetivo, o qual foi ativado por 30 minutos com NaOH 1M, 30 minutos com H₂O e 30 minutos com o eletrólito de corrida antes da primeira análise.

O eletrólito utilizado para as análises foi tetraborato de sódio (TBS) 20 mM com 10% (v/v) de acetonitrila. As amostras foram introduzidas no capilar por injeção hidrodinâmica utilizando pressão de 50 mbar por 3 segundos no modo direto. A temperatura no cassete do equipamento foi mantida a 25°C durante as análises. A tensão aplicada no inlet do capilar foi de +30,0 kV, gerando uma corrente elétrica em torno de 40 V durante as análises. No início de cada corrida, condicionou-se o capilar por 60 segundos com NaOH 1M, 120 segundos com H₂O e 60 segundos com o eletrólito de corrida.

O tempo de cada corrida foi de cerca de 5 minutos e os eletroferogramas foram analisados no comprimento de onda de 200 nm. Como padrão interno, utilizou-se o

metilparabeno (composto sintético e muitas vezes utilizado como conservante em formulações farmacêuticas).

3.7. Preparo das amostras

3.7.1. Preparo das amostras para as análises químicas

As amostras foram secas durante 10 dias a temperatura ambiente, moídas em moinho de facas e armazenadas. Para a extração dos flavonoides do material vegetal, utilizou-se o processo de hidrólise ácida no ultrassom. A extração foi feita de maneira quantitativa, através de vidrarias volumétricas e balança analítica.

Os extratos foram elaborados da seguinte maneira: pesou-se 100 mg de planta seca triturada, adicionou-se 10 mL de água fervente, tampou-se o frasco e deixou-se o mesmo em repouso durante 15 minutos. Em seguida, filtrou-se a amostra para um funil de separação e adicionou-se 20 mL de acetato de etila. Realizou-se partição do solvente aquoso com o orgânico, reservando sempre a fase orgânica. Este procedimento foi feito 5 vezes. Evaporou-se a fase orgânica, em rota evaporador, solubilizou-se a amostra com 1 mL de metanol, adicionou-se 14 mL de ácido clorídrico (50%, v/v) e deixou-se a amostra hidrolisando em ultrassom por 2 horas.

Na sequência, transferiu-se a amostra novamente para um funil de separação e adicionou-se 20 mL de diclorometano. Realizou-se partição do solvente aquoso com o orgânico, reservando sempre a fase orgânica. Este procedimento foi feito 5 vezes. Evaporou-se a fase orgânica, em rota evaporador, dissolveu-se a amostra com 5 mL de metanol, filtrou-se o extrato com membrana de 0,22 μm e injetou-se no CLAE, no CLUE e na EC, **Figura 5**.

0,1g de planta seca + 10 mL H₂O a 100°C

↓ 15 minutos

Partição com Acetato de Etila

↓ 5 x 20,0 mL

Resíduo orgânico + 1 mL MeOH

↓ Hidrólise (HCl 50 %, v/v)

Partição com DCM

↓ 5 x 20,0 mL

Resíduo orgânico + 5 mL MeOH

Figura 5. Fluxograma do processo de hidrólise ácida dos extratos de *Rubus* e *Morus*.
MeOH = metanol; HCl = ácido clorídrico; DCM = diclorometano.

A precisão do método de extração proposto foi avaliada. Para isso, realizou-se a extração dos flavonoides quercetina e canferol presentes nas folhas de *Rubus erythrocladus* em triplicada e em três dias consecutivos e avaliou-se o desvio padrão relativo obtido.

3.7.2. Preparo das amostras para o ensaio antifúngico

Para realizar o ensaio de atividade antifúngica, os extratos foram elaborados de acordo com o procedimento anteriormente descrito no item 4.7.1., porém no final do processo de extração, ao invés do extrato ser dissolvido com metanol, ele foi solubilizado com solução etanólica 1% (v/v), congelado e liofilizado, dando origem ao que se denominou de extrato hidrolisado.

Também tesou-se a atividade antifúngica do extrato não hidrolisado das espécies. Ou seja, depois da etapa de partição com acetato de etila, evaporou-se o solvente orgânico e solubilizou-se o resíduo orgânico com solução etanólica 1% (v/v), congelou-se os extratos e, por fim, liofilizou-se os mesmos. É importante relatar que para os experimentos de atividade antifúngica, o material liofilizado foi solubilizado totalmente com solução de Tween 20 a 1% (v/v).

3.8. Validação

A necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade, está sendo cada vez mais reconhecida e exigida. Para garantir que o método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser validado (RIBANI et al., 2004). Dessa maneira, tanto o método de CLAE como o método de EC propostos neste trabalho foram validados de acordo com os parâmetros de linearidade, seletividade e especificidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação e robustez.

3.8.1. Linearidade

A linearidade de um método analítico é considerada como sendo sua capacidade de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra dentro de um intervalo especificado (BRASIL, 2003). A faixa de trabalho linear da curva de calibração deve, necessariamente, contemplar a faixa de concentração esperada para a amostra de ensaio. Sempre que possível, o valor esperado para a amostra de ensaio deve situar-se em torno do centro da curva de calibração (RIBANI et al., 2004).

Para a análise da linearidade dos métodos analíticos, preparou nove soluções padrões de quercetina e de canferol na concentração de 1 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para serem analisadas por CLAE e 7 soluções padrões de quercetina e de canferol na concentração de 15 a 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para serem analisadas por EC.

3.8.2. Seletividade e especificidade

A especificidade e a seletividade de um método analítico é a capacidade do mesmo em medir exatamente um composto em presença de outros componentes, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (BRASIL, 2003).

Quando se trabalha com uma amostra complexa que apresenta várias substâncias de interesse, deve-se observar se os compostos da amostra não estão saindo no mesmo tempo de retenção de outros compostos. A seletividade deve garantir que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Já um método

que produz resposta para uma única substância de interesse, pode ser chamado de específico (RIBANI et al., 2004).

Para verificar a seletividade e a especificidade do método, realizou-se uma varredura dos picos de interesse obtendo-se vários espectros de absorção no UV do mesmo pico e sobrepondo-se estes espectros. Este parâmetro analítico foi testado utilizando-se um detector de arranjo de diodos tanto por CLAE, como por EC. Além disso, o *software* do equipamento de EC também gerou informações a respeito da pureza dos picos.

3.8.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla da mesma amostra (BRASIL, 2003). Diante de um processo de validação de método analítico para identificação e quantificação de compostos em matéria-prima vegetal, é importante observar que não existe limite máximo estabelecido para o desvio padrão relativo obtido. Neste trabalho estabeleceu-se $\leq 15\%$ como sendo o valor máximo.

A conformidade do sistema foi avaliada considerando a resolução dos cromatogramas e eletroferogramas, o desvio padrão relativo da área do pico e do tempo de retenção dos compostos de interesse em dez injeções seguidas.

Por CLAE, a precisão intra-ensaio (repetibilidade) foi estabelecida pelas injeções de duas soluções padrões em três concentrações diferentes, 100, 50 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quercetina e para o canferol, preparadas em triplicata. A precisão inter-ensaio (intermediária) foi determinada através de 3 injeções de soluções padrão de quercetina e canferol a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por três dias consecutivos.

Por EC, a precisão intra-ensaio (repetibilidade) foi estabelecida através da injeção de duas soluções padrões preparadas na mesma concentração, 100, 75 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para quercetina e para canferol, preparadas em triplicata. A precisão inter-ensaio (intermediária) foi determinada através de 3 injeções de soluções padrão de quercetina e canferol a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, por três dias consecutivos.

3.8.4. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Ela é aceita dentro de certos limites, a um dado nível de confiança, ou seja, aparece sempre associada a valores de precisão (RIBANI et al., 2004).

A exatidão dos métodos analíticos foi avaliada através de ensaios de recuperação. Para as análises realizadas no CLAE, trabalhou-se com o extrato hidrolisado de *Rubus erythrocladus*, e para as análises por EC utilizou-se o extrato hidrolisado de *Morus nigra*.

Para avaliar a recuperação por CLAE adicionou-se concentrações de 20, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e de canferol ao extrato de *Rubus erythrocladus* e por EC adicionou-se concentrações de 30, 60 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e de canferol ao extrato de *Morus nigra*. Como branco, injetou-se extratos de *Rubus erythrocladus*, por CLAE, e de *Morus nigra*, por EC, para calcular a capacidade de recuperação do método analítico.

3.8.5. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de quantificação de um método analítico é dado pela menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas, e é expresso como concentração do analito na amostra. Já o limite de detecção de um método é dito como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

Os limites de detecção e de quantificação podem ser obtidos de três formas: visualmente, através da relação sinal/ruído da linha de base ou pela curva analítica. Neste trabalho, optou-se por calculá-los a partir de parâmetros da curva analítica, formulas A e B, respectivamente:

$$(A) LD = 3,3 \times (s/S) \quad (B) LQ = 10 \times (s/S)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da

equação. S, por sua vez, é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004).

3.8.6. Robustez

Como importante parâmetro de validação, a robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando a sua confiança durante o uso normal (BRASIL, 2003).

Por CLAE, a robustez do sistema cromatográfico foi avaliada a partir da injeção de soluções padrão a $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto de quercetina, quanto de canferol. Os parâmetros modificados do método analítico foram quatro: concentração de ácido na fase móvel A e B, fluxo da fase móvel e modelo do equipamento.

Por EC, a robustez do sistema foi avaliada a partir de injeções de soluções padrão a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e de canferol, contendo $45,46 \mu\text{g mL}^{-1}$ de padrão interno (PI). Os parâmetros modificados do método analítico foram três: temperatura do cassete, tempo de injeção e concentração de solvente orgânico na composição do eletrólito.

3.9. Atividade antifúngica

3.9.1. Procedimentos

Todos os procedimentos realizados para os ensaios de atividade antifúngica foram feitos de acordo com os protocolos padronizados pelo documento M38-A, determinado pelo *Clinical Laboratory Standart Institute* (CLSI, 2008).

3.9.1.1. Microrganismos testados

A atividade antifúngica dos extratos foi testada frente aos seguintes fungos: *Thichophyton mentagrophytes* (TME 32), *Thichophyton rubrum* (TRU 51), *Microsporium gypseum* (MGY 01), *Microsporium canis* (MCA 40), *Fusarium graminearum* (09 TR 110) e *Fusarium graminearum* (09 TR 107), sendo os dois últimos fito-patógenos.

3.9.1.2. Meio de cultivo

O meio de cultivo sintético RPMI-1640 é considerado satisfatório para ensaios com fungos filamentosos, sendo este o meio padronizado pela CLSI-M38. Para o preparo do meio dissolveu-se 10,4 g de meio RPMI-1640 em pó em 900 mL de água destilada. Adicionou-se 34,53 g de tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) e agitou-se até completa dissolução. Ajustou-se o pH para 7,0 a 25°C, utilizando-se hidróxido de sódio 1,0 mol/L. Adicionou-se água até completar um volume final de 1 L. Filtrou-se o meio com membranas de 0,22 µL e armazenou-se o mesmo a 4°C até o uso.

3.9.1.3. Preparo do inóculo

Para induzir a formação de conídios e esporangiosporos os fungos foram cultivados em ágar batata-dextrose durante 7 dias, a 35°C. As espécies de *Fusarium* foram incubadas de 48 a 72 horas a 35°C e depois, até o sétimo dia, a temperatura de 25 a 28°C.

As colônias de sete dias foram cobertas com aproximadamente 1 mL de solução salina estéril a 0,85% (p/v) mexendo-se delicadamente as colônias com uma alça flambada para o preparo de uma suspensão. A mistura resultante de conídios ou esporangiosporos e fragmentos de hifas foi retirada e transferida para um tubo de ensaio estéril. Quando as partículas mais pesadas se depositaram no fundo, após 3 a 5 minutos, a suspensão homogênea superior foi transferida para um tubo estéril e homogeneizada em um agitador de tubos durante 15 segundos.

As densidades das suspensões de conídios ou esporangiosporos foram lidas em espectrofotômetro a 532 nm e ajustadas para que a transmitância ficasse entre 80 e 82% para as espécies *Thichophyton mentagrophytes*, *Thichophyton rubrum*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, e entre 68 a 70% para as cepas de *Fusarium graminearum*. Essas suspensões foram diluídas no meio de cultura, RPMI, na proporção de 1 para 50.

3.9.1.4. Ensaio de *Screening*

Estes ensaios foram realizados em microplacas contendo 96 poços, distribuídos entre 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Para a análise das amostras, os poços foram preenchidos com 100 µL de inóculo em meio RPMI e 100 µL de amostra. Para a melhor interpretação dos resultados, foram feitos três controles: controle do diluente, controle positivo e controle negativo.

No controle do diluente adicionou-se 100 µL de inóculo em meio RPMI e 100 µL de solução aquosa contendo 1% (v/v) de Tween 20. No controle positivo do meio adicionou-se 100 µL de meio RPMI e 100 µL de inóculo em meio RPMI. Já no controle negativo do meio, adicionou-se somente 200 µL de meio RPMI.

Depois de inoculadas, as microplacas foram incubadas em estufas. As cepas de *Fusarium* foram mantidas a 25°C por 3 dias e os demais patógenos foram mantidos a 35°C por 7 dias.

4. RESULTADOS

4.1. Validação

As substâncias identificadas nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* foram quercetina e canferol. Os extratos foram preparados de acordo com o item 4.7.1. e foram analisados de acordo com as metodologias descritas nos itens 4.4. e 4.6. Primeiramente, estão apresentados o cromatograma e o eletroferograma das substâncias de referência identificadas nos extratos, **Figura 6 e 8**, respectivamente, bem como o espectro de UV referente a cada analito e obtidos por CLAE-DAD e por EC-DAD, **Figura 7 e 9**, respectivamente.

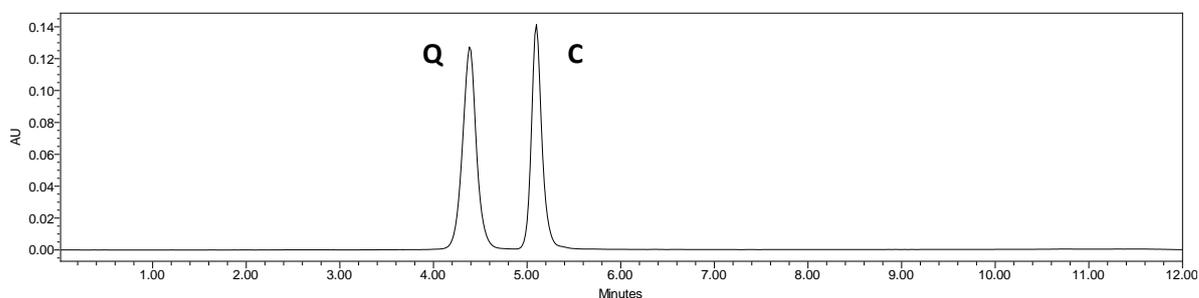


Figura 6. Cromatograma dos padrões de referência por CLAE a 370 nm. C = canferol e Q = quercetina.

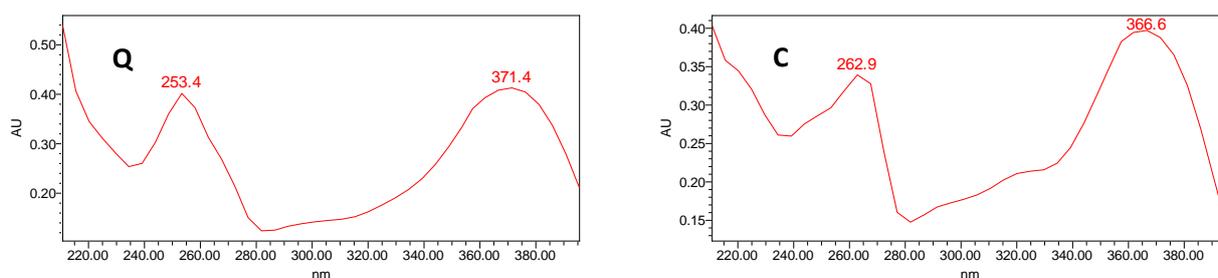


Figura 7. Espectro de absorção no UV de quercetina (Q) e de canferol (C), por CLAE-DAD.

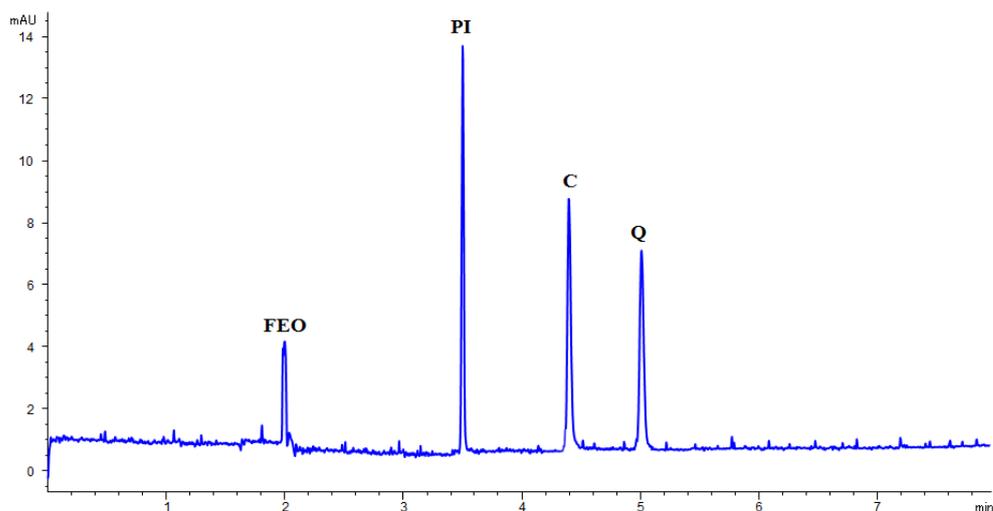


Figura 8. Eletroferograma dos padrões de referência por EC-DAD a 200nm. FEO = fluxo eletrosmótico, # = não identificado, C = canferol e Q = quercetina

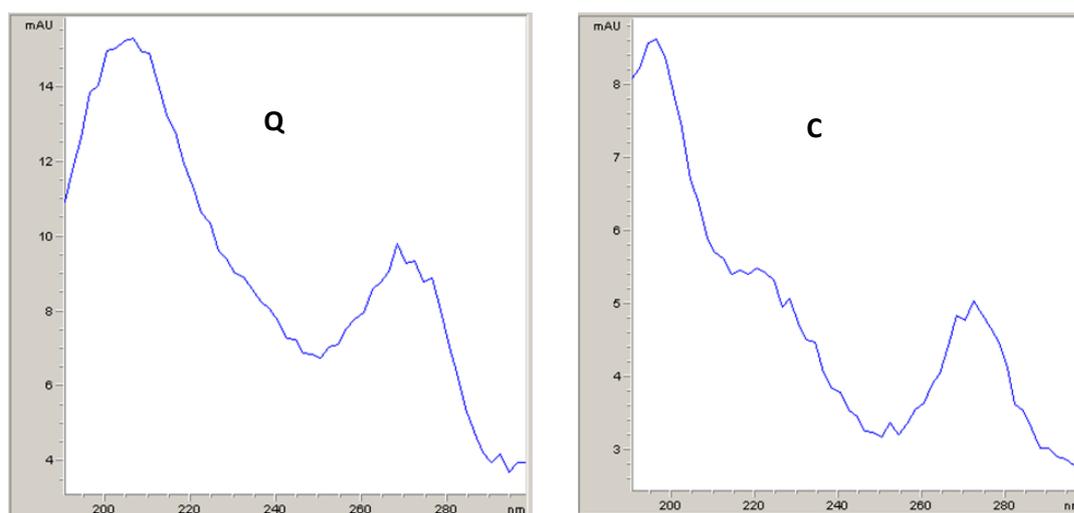


Figura 9. Espectro de absorção no UV de quercetina (Q) e de canferol (C), EC-DAD.

Assim, as metodologias analíticas elaboradas neste trabalho para detecção de quercetina e de canferol nas amostras hidrolisadas de folhas de *Rubus* e de *Morus* foram validadas segundo os seguintes parâmetros: linearidade, seletividade e especificidade, precisão, exatidão (ensaio de recuperação), limite de detecção, limite de quantificação e robustez. Os resultados obtidos estão expressos nas figuras e tabelas destes próximos subitens.

4.1.1. Linearidade

Foi obtida relação linear entre a área e a concentração dos compostos na faixa analisada. Para a CLAE utilizou-se nove concentrações entre 1 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e entre 1 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canferol, **Figura 10**. Para a EC, utilizou-se sete concentrações entre 15 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e entre 15 e 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canferol, **Figuras 11**.

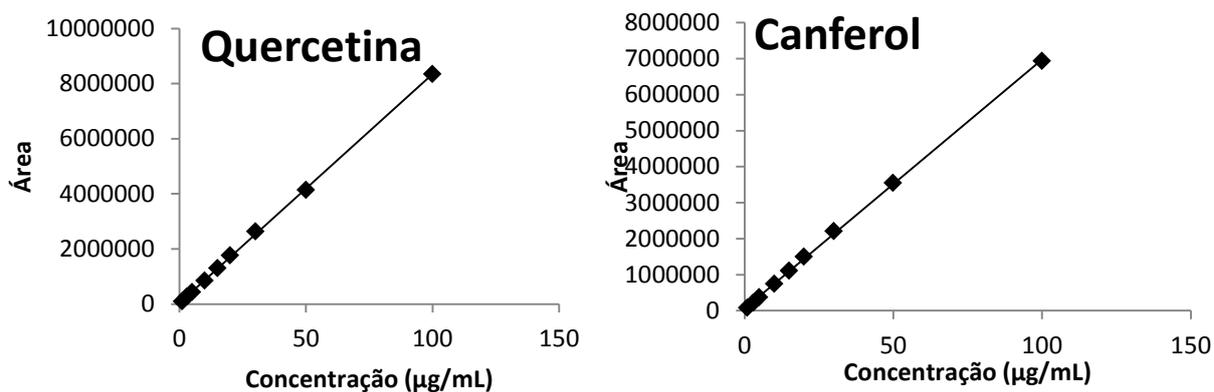


Figura 10. Gráficos referentes à curva de calibração de quercetina e de canferol, por CLAE.

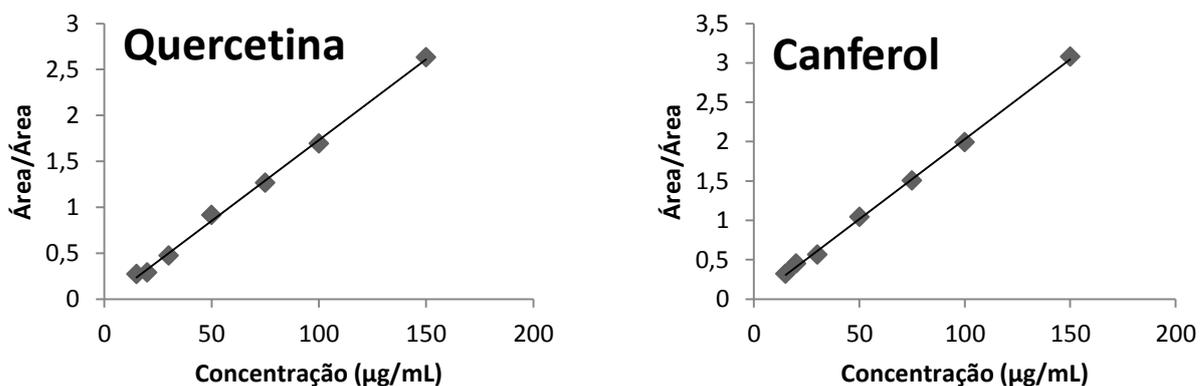


Figura 11. Gráficos referentes à curva de calibração de quercetina e de canferol, por EC-DAD.

Na tabela a seguir estão representadas as equações da reta obtidas para as curvas de calibração e os valores de r^2 , **Tabela 3**.

Tabela 3. Resultados de linearidade obtidos a partir das curvas de calibração de quercetina e canferol por CLAE e EC.

| | Flavonoide | Equação da reta | r^2 |
|------|------------|------------------------|--------|
| CLAE | Quercetina | $y = 83082x + 42829$ | 0,9996 |
| | Canferol | $y = 69225x + 56605$ | 0,9995 |
| EC | Quercetina | $y = 0,0176x + 0,0276$ | 0,9979 |
| | Canferol | $y = 0,0203x + 0,005$ | 0,9987 |

A linearidade do método também foi avaliada através da análise das áreas da curva de calibração dos padrões de referência, utilizando o método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA), **Tabelas 4 a 7**.

Tabela 4. Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão de quercetina, por CLAE.

| | <i>gl</i> | <i>SQ</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>F de significação</i> |
|-----------|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------|---------------------------|
| Regressão | 1 | $5,57452 \times 10^{13}$ | $5,57452 \times 10^{13}$ | 18911,01612 | $2,83644 \times 10^{-13}$ |
| Resíduo | 7 | 20634348380 | 2947764054 | | |
| Total | 8 | $5,57658 \times 10^{13}$ | | | |

**gl* = grau de liberdade; *SQ* = soma dos quadrados das médias; *MQ* = média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 5. Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão de quercetina, por EC.

| | <i>gl</i> | <i>SQ</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>F de significação</i> |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Regressão | 1 | 4,47962874 | 4,47962874 | 2330,597387 | $7,20512 \times 10^{-8}$ |
| Resíduo | 5 | 0,009610473 | 0,001922095 | | |
| Total | 6 | 4,489239213 | | | |

**gl* = grau de liberdade; *SQ* = soma dos quadrados das médias; *MQ* = média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 6. Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão de canferol, por CLAE.

| | <i>gl</i> | <i>SQ</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>F de significação</i> |
|-----------|-----------|--------------------------|--------------------------|-------------|----------------------------|
| Regressão | 1 | 3,87014x10 ¹³ | 3,87014x10 ¹³ | 15484,82404 | 5,70811 x10 ⁻¹³ |
| Resíduo | 7 | 17495191582 | 2499313083 | | |
| Total | 8 | 3,87189x10 ¹³ | | | |

* *gl* = grau de liberdade; *SQ* = soma dos quadrados das médias; *MQ* = média quadrada da soma dos quadrados.

Tabela 7. Análise de variância (ANOVA) para a curva padrão de canferol, por EC.

| | <i>gl</i> | <i>SQ</i> | <i>MQ</i> | <i>F</i> | <i>F de significação</i> |
|-----------|-----------|-------------|-------------|-------------|--------------------------|
| Regressão | 1 | 5,952575104 | 5,952575104 | 3737,346064 | 2,21642x10 ⁻⁸ |
| Resíduo | 5 | 0,007963639 | 0,001592728 | | |
| Total | 6 | 5,960538743 | | | |

* *gl* = grau de liberdade; *SQ* = soma dos quadrados das médias; *MQ* = média quadrada da soma dos quadrados.

4.1.2. Seletividade e especificidade

Por CLAE, utilizando-se o detector de arranjo de diodos e realizando uma varredura dos picos de interesse e sobrepondo os espectros obtidos, demonstrou-se a pureza dos picos e a ausência de substâncias interferentes. Na figura a seguir, está representada a seletividade dos picos de quercetina e de canferol dos extratos hidrolisados, **Figura 12**.

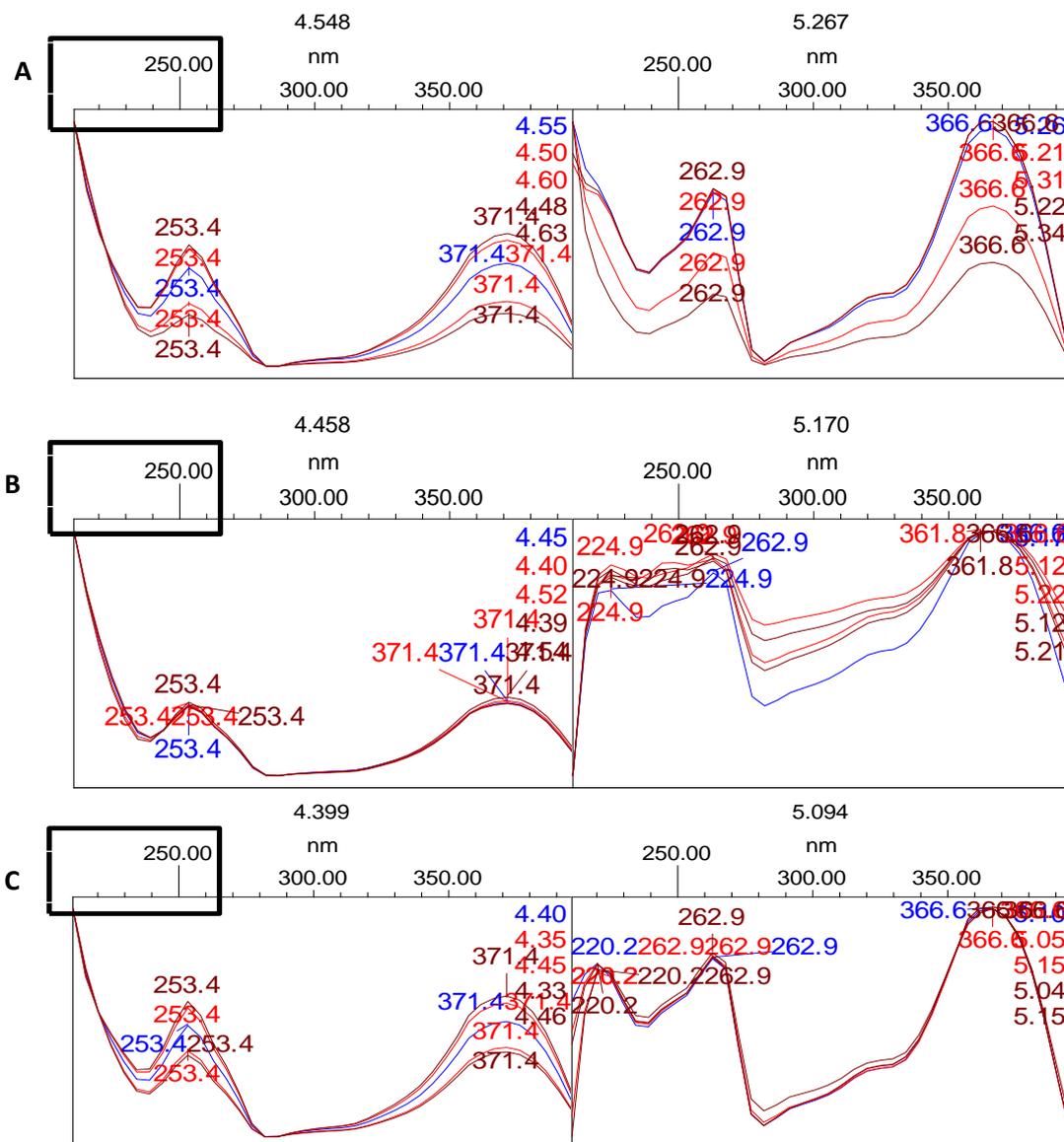


Figura 12. Espectros representando a especificidade e a seletividade da quercetina e do canferol, respectivamente, nos extratos de: (A) *Rubus erythrocladus*, (B) *Rubus idaeus* e (C) *Morus nigra*.

Por EC, a seletividade e a especificidade foram analisadas da mesma maneira que por CLAE. A partir do software do equipamento de EC, foi possível obter mais informações a respeito da pureza dos picos. Na **Figura 13**, estão representados estes resultados.

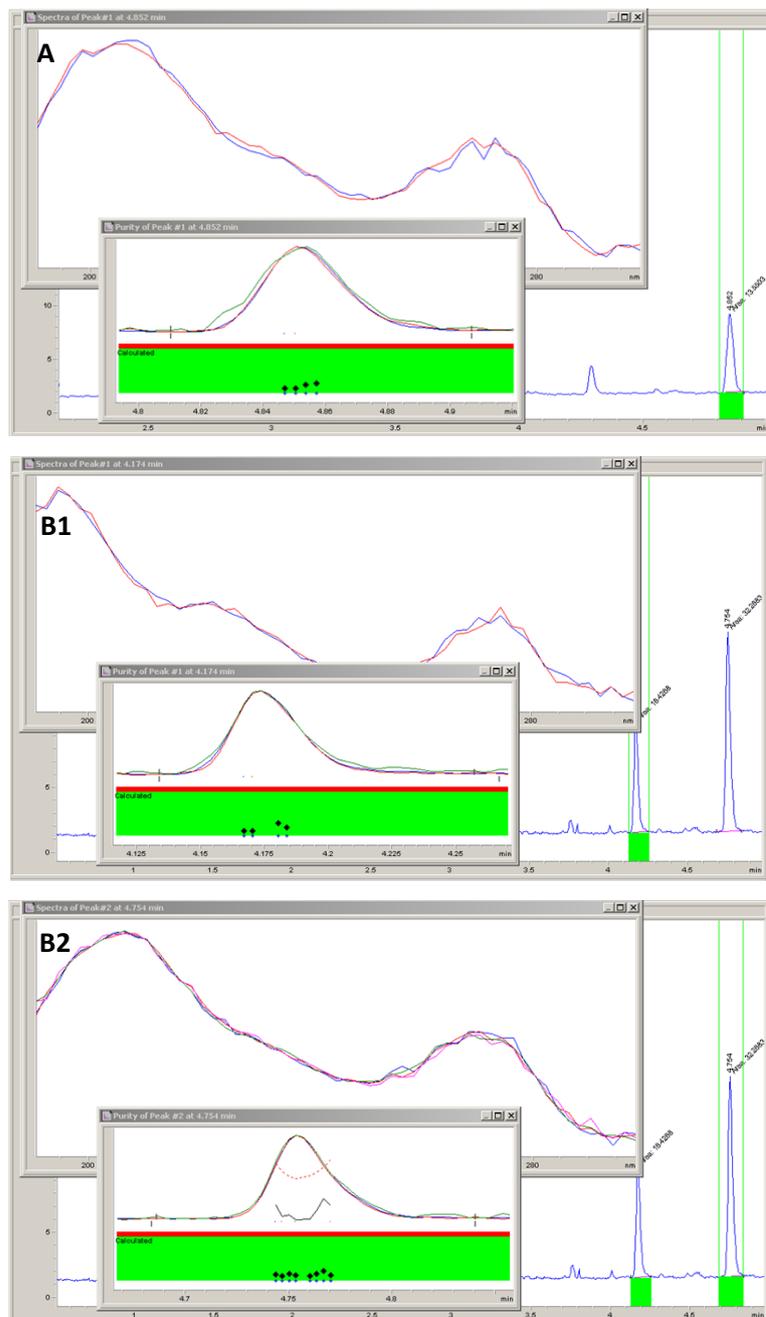


Figura 13. Espectros representando a especificidade e a seletividade dos picos das amostras: (A) quercetina em *Rubus erythrocladus* e (B1 e B2) canferol e quercetina, respectivamente, em *Morus nigra*, por EC, e informações sobre a pureza dos picos.

4.1.3. Precisão

Por CLAE, a conformidade do sistema foi avaliada pela injeção do extrato de *Rubus erythrocladus* e o desvio padrão relativo (DRP%) da área e do tempo para a quercetina foram 1,3656 e 0,2799, respectivamente, já para o canferol, foram 0,6630 e

0,2729, respectivamente. Por EC, este parâmetro foi avaliado pela injeção do extrato de *Morus nigra* e os resultados para quercetina foram 1,0958 e 0,4524, respectivamente, e para o canferol foram 1,5827 e 0,1593, respectivamente. Estes resultados estão expressos na a seguir, **Tabela 8**.

Tabela 8. Resultados obtidos na análise da conformidade do sistema de CLAE e de EC. Valores expressos em DPR%.

| | Analito | Área ^a | Tempo ^a |
|------|------------|-------------------|--------------------|
| CLAE | Quercetina | 1,3656 | 0,2799 |
| | Canferol | 0,6630 | 0,2729 |
| EC | Quercetina | 1,0958 | 0,4524 |
| | Canferol | 1,5827 | 0,1593 |

^a(n=10)

Por CLAE, a precisão intra-ensaio dos picos foi de 0,30 e 0,23 DPR% para quercetina e para o canferol, respectivamente. A precisão inter-ensaio foi de 1,69 e 2,02 DPR% para quercetina e para o canferol, respectivamente. Por EC, a precisão intra-ensaio dos picos foi de 2,48 e 3,68 DPR% para quercetina e para o canferol, respectivamente. A precisão inter-ensaio foi de 7,76 e 8,44 DPR% para quercetina e para o canferol, respectivamente. A **Tabela 9** apresenta os resultados da precisão intra-ensaio e inter-ensaio por CLAE e por EC.

Tabela 9. Resultados obtidos na análise da precisão intra e inter-dia da quercetina e do canferol por CLAE e EC. Valores expressos em DPR%.

| | Analito | Precisão Intra-dia * | Precisão Inter-dia * |
|------|------------|-------------------------|-------------------------|
| CLAE | Quercetina | 0,30 | 1,69 |
| | Canferol | 0,23 | 2,02 |
| EC | Quercetina | 2,48 | 7,76 |
| | Canferol | 3,68 | 8,44 |

* (n = 9)

4.1.4. Exatidão

Por CLAE, as porcentagens de recuperação obtidas foram 95,91, 94,54 e 95,60% quando adicionados, respectivamente, 20, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e 91,47, 98,19 e 97,61% quando adicionados, respectivamente, 20, 40 e 60 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canferol. Por EC, as porcentagens de recuperação obtidas foram 104,97, 108,53 e 106,34% quando adicionados, respectivamente, 30, 60 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de quercetina e 97,94, 103,78 e 96,19% quando adicionados, respectivamente, 30, 60 e 90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de canferol. Estes resultados da porcentagem de recuperação estão apresentados na **Tabela 10** e demonstram a confiabilidade do método para a determinação destes metabólitos secundários nos extratos vegetais analisados.

Tabela 10. Resultados dos ensaios de recuperação da quercetina e do canferol por CLAE e EC.

| Analito | Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$ | | Recuperação (%) média \pm desvio | DPR(%) | Média \pm desvio (%) | |
|---------|------------------------------------|------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|
| | Adicionada | Encontrada | | | | |
| CLAE | Quercetina | 20 | 19,18 | 95,91 \pm 2,87 | 2,99 | 95,35 \pm 2,88 |
| | | 40 | 37,81 | 94,54 \pm 3,09 | 3,27 | |
| | | 60 | 57,36 | 95,60 \pm 2,69 | 2,81 | |
| | Canferol | 20 | 18,29 | 91,47 \pm 2,94 | 3,21 | |
| | | 40 | 39,28 | 98,19 \pm 3,26 | 3,33 | |
| | | 60 | 58,57 | 97,61 \pm 2,11 | 2,16 | |
| EC | Quercetina | 30 | 31,49 | 104,97 \pm 2,65 | 2,52 | 104,31 \pm 1,66 |
| | | 60 | 65,12 | 108,53 \pm 0,19 | 0,18 | |
| | | 90 | 95,71 | 106,34 \pm 0,22 | 0,20 | |
| | Canferol | 30 | 29,38 | 97,94 \pm 4,65 | 4,75 | |
| | | 60 | 62,27 | 103,78 \pm 0,58 | 0,56 | |
| | | 90 | 86,57 | 96,19 \pm 3,22 | 3,34 | |

4.1.5. Limite de detecção e limite de quantificação

Por CLAE, os valores obtidos quanto ao LD para a determinação de quercetina e canferol nas amostras de *Rubus* e *Morus* foram de 0,9519 e 1,0519 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Já o LQ deste método analítico foi de 2,8844 e 3,1876 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Por EC, o LD do método para a análise de quercetina e de canferol foi de 5,3043 e 4,1887 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e o LQ foi de 16,0737 e 12,6931 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados do LD e do LQ estão representados na **Tabela 11** e demonstram uma menor sensibilidade da EC do que a CLAE frente a estes analitos.

Tabela 11. Resultados dos limites de detecção e limites de quantificação da quercetina e do canferol obtidos por CLAE e EC.

| | Parâmetro | Quercetina ($\mu\text{g mL}^{-1}$) | Canferol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) |
|------|-----------|--------------------------------------|------------------------------------|
| CLAE | LD | 0,9519 | 1,0519 |
| | LQ | 2,8844 | 3,1876 |
| EC | LD | 5,3043 | 4,1887 |
| | LQ | 16,0737 | 12,6931 |

4.1.6. Robustez

Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 12** e representados em porcentagem, considerando 100 % como sendo as condições normais do método.

Tabela 12. Resultados da robustez do método de CLAE avaliada através dos padrões de referência, quercetina e canferol.

| Parâmetro | Quercetina (%) média ± desvio | DPR% | Canferol (%) média ± desvio | DPR% |
|-----------------------------------|----------------------------------|------|--------------------------------|-------|
| Robustez | | | | |
| Fluxo 0,55 mL min ⁻¹ * | 109,40 ± 0,34 | 0,31 | 109,40 ± 0,49 | 0,45 |
| Fluxo 0,65 mL min ⁻¹ * | 92,35 ± 0,24 | 0,26 | 92,38 ± 0,02 | 0,02 |
| Fase móvel A | | | | |
| 0,005% TFA * | 95,89 ± 7,39 | 7,70 | 93,50 ± 10,83 | 11,58 |
| 0,015% TFA * | 101,57 ± 0,13 | 0,13 | 100,14 ± 0,39 | 0,39 |
| Fase móvel B | | | | |
| 0,04% TFA * | 102,96 ± 0,63 | 0,61 | 100,89 ± 0,69 | 0,69 |
| 0,12% TFA * | 104,90 ± 0,17 | 0,16 | 104,28 ± 0,05 | 0,05 |
| Condições normais | | | | |
| PDA * | 94,27 ± 0,75 | 0,54 | 94,29 ± 1,00 | 0,71 |

*(n = 3)

Os resultados obtidos estão descritos na **Tabela 13** e estão representados em porcentagem, considerando 100% como sendo as condições normais do método.

Tabela 13. Resultados da robustez do método de EC avaliada através dos padrões de referência, quercetina e canferol.

| Parâmetro | Quercetina (%) média ± desvio | DPR% | Canferol (%) média ± desvio | DPR% |
|-------------------|----------------------------------|------|--------------------------------|------|
| Temperatura | | | | |
| 25,5°C * | 97,63 ± 0,25 | 0,26 | 106,27 ± 0,07 | 0,07 |
| 24,5°C * | 98,39 ± 0,62 | 0,63 | 106,37 ± 0,75 | 0,71 |
| Tempo de injeção | | | | |
| 2 segundos * | 95,76 ± 1,80 | 1,87 | 107,73 ± 0,15 | 0,14 |
| 4 segundos * | 97,94 ± 0,24 | 0,25 | 103,19 ± 4,26 | 4,12 |
| Solvente orgânico | | | | |
| 5,0% * | 99,30 ± 3,54 | 3,71 | 98,73 ± 2,37 | 2,41 |
| 15,0% * | 98,77 ± 1,41 | 1,43 | 104,76 ± 0,86 | 0,16 |

* (n = 3)

4.2. Precisão do método de extração

Para garantir que o método de preparo dos extratos elaborados fosse preciso, realizou-se a extração do material vegetal, *Rubus erythrocladus*, em triplicata, três dias seguidos, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, no item 4.6.1., e analisou-se o desvio padrão relativo obtido. Os resultados obtidos para a precisão do método de extração estão representados na **Tabela 14**.

Tabela 14. Resultados da análise da precisão do processo de extração de quercetina e canferol do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus* por CLAE. Valores expressos em área.

| Analito | Média 1° dia * | Média 2° dia * | Média 3° dia * | Média ± desvio | DPR% |
|------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|-------|
| Quercetina | 1590135 | 1480922 | 1286799 | 1452618 ± 153635,9 | 10,58 |
| Canferol | 511269,1 | 476626,4 | 445987,8 | 477961,1 ± 32661,08 | 6,83 |

* (n = 3)

4.3. Análise das amostras de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*

As concentrações ($\mu\text{g g}^{-1}$) de quercetina e canferol presentes nos extratos estão apresentadas na **Tabela 15**.

Tabela 15. Quantidade de quercetina e canferol encontrados nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*. Valores das substâncias estão expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de planta seca (P.S.).

| Analito | | <i>Rubus idaeus</i> | <i>Rubus erythrocladus</i> | <i>Morus nigra</i> |
|---------|------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| | | Média \pm DPR% | Média \pm DPR% | Média \pm DPR% |
| CLAE | Quercetina | 698,32 \pm 1,29 | 848,43 \pm 10,48 ^a | 2323,90 \pm 7,28 ^b |
| | Canferol | 184,20 \pm 4,34 | 304,35 \pm 6,83 | 1446,36 \pm 6,72 ^c |
| EC | Quercetina | N.Q. | 836,37 \pm 9,36 ^a | 2552,82 \pm 7,96 ^b |
| | Canferol | N.Q. | N.Q. | 1188,67 \pm 9,20 ^c |

N.Q. = não quantificável; ^a, ^b e ^c = não há diferença significativa entre as medições.

Na sequência estão dispostos os cromatogramas e eletroferogramas obtidos, **Figuras 14 e 15**.

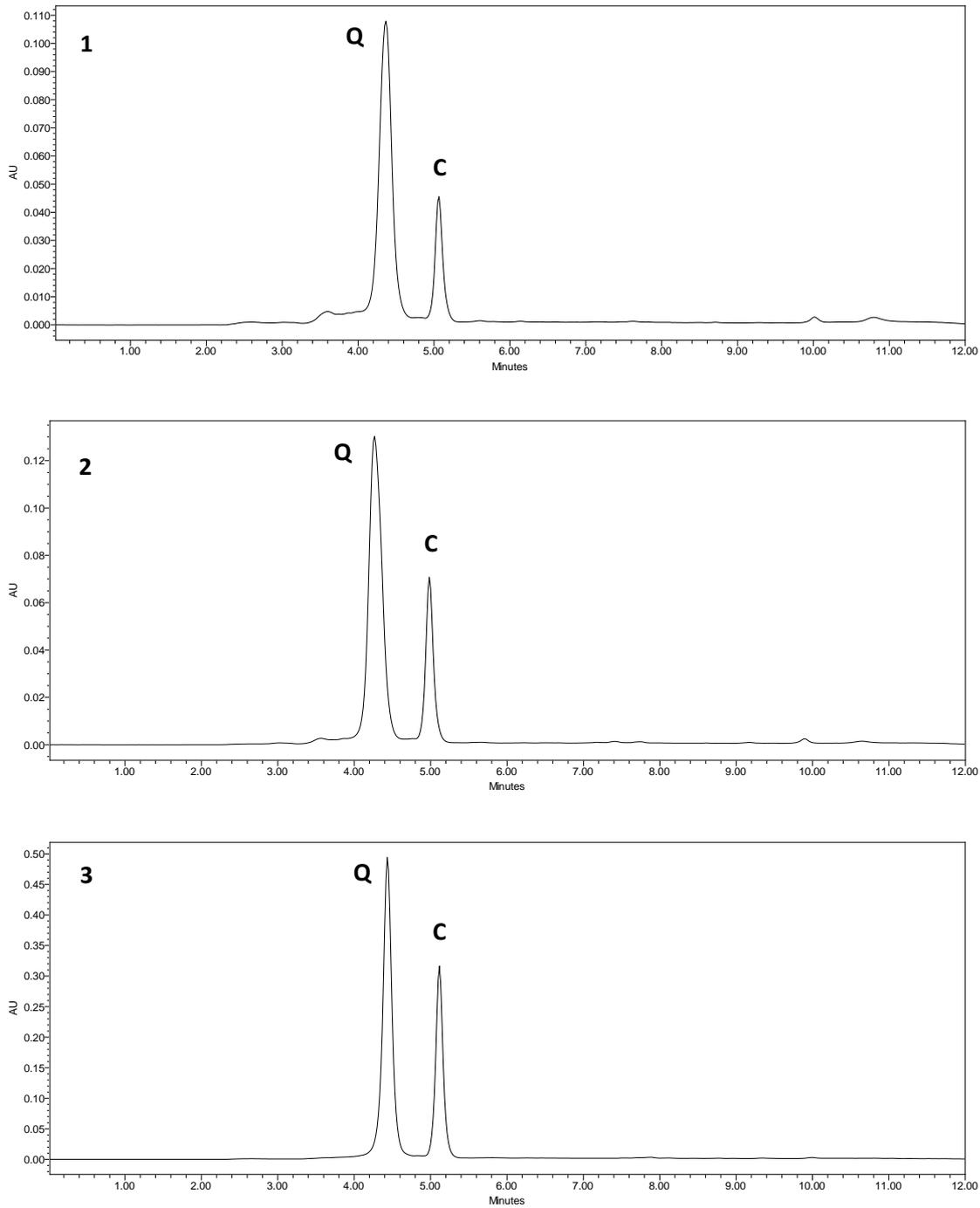


Figura 14. Cromatogramas obtidos dos extratos de *Rubus idaeus* (1), *Rubus erythrocladus* (2) e *Morus nigra* (3), por CLAE a 370 nm. C = canferol e Q = quercetina.

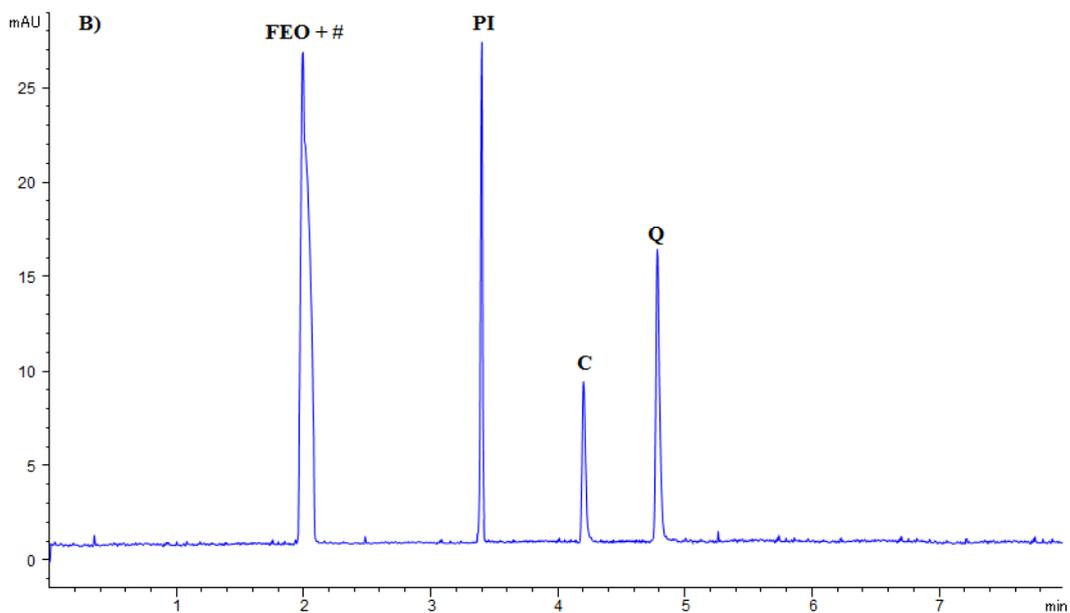
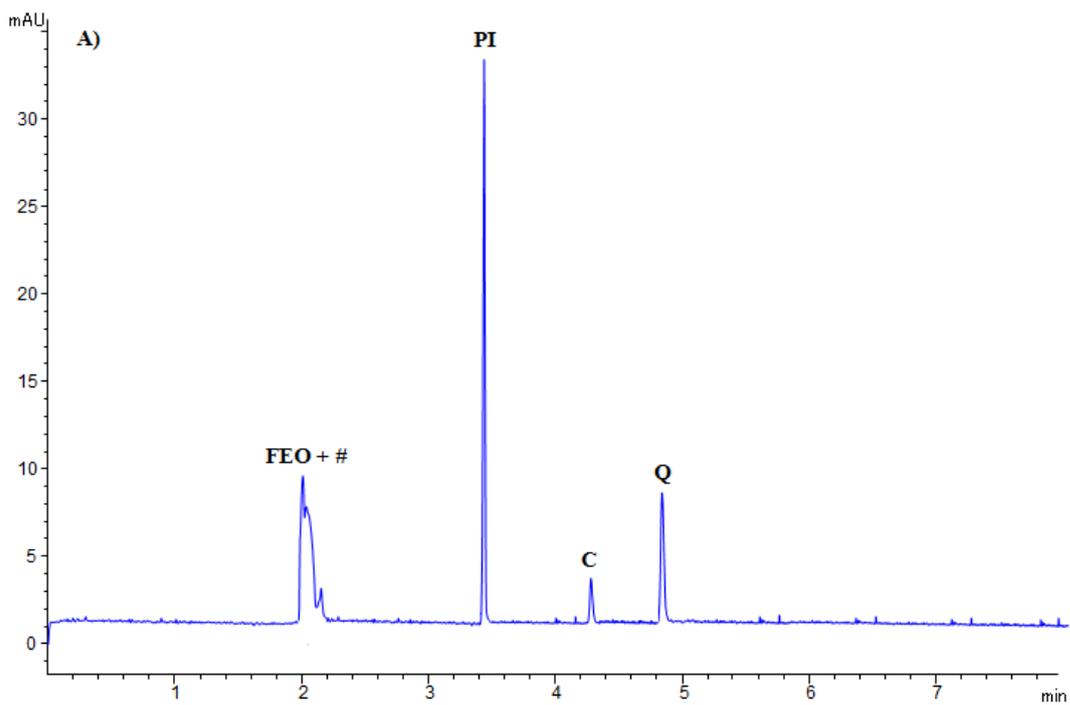


Figura 15. Eletroferogramas obtidos dos extratos: A) *Rubus erythrocladus* e B) *Morus nigra*, por EC-DAD a 200 nm. FEO = fluxo eletro-osmótico, # = não identificado, C = canferol e Q = quercetina.

4.4. Análise de amostras comercializadas

A fim de complementar os resultados deste trabalho, adquiriu-se comercialmente quatro amostras de folhas de amora que foram preparadas de acordo com o item 4.7.1. e analisadas quimicamente de acordo com o item 4.4. O método de análise foi validado conforme descrito entre os itens 5.1.1. a 5.1.6. Para estes experimentos, as amostras foram identificadas de acordo com informações contidas nas respectivas embalagens:

- Amostra A: *Morus celsa alba* (amora-branca);
- Amostra B: amora-branca;
- Amostra C: *Morus nigra* (amoreira);
- Amostra D: amora-branca.

Abaixo, seguem imagens com fotos de cada produto vegetal, **Figura 16**.

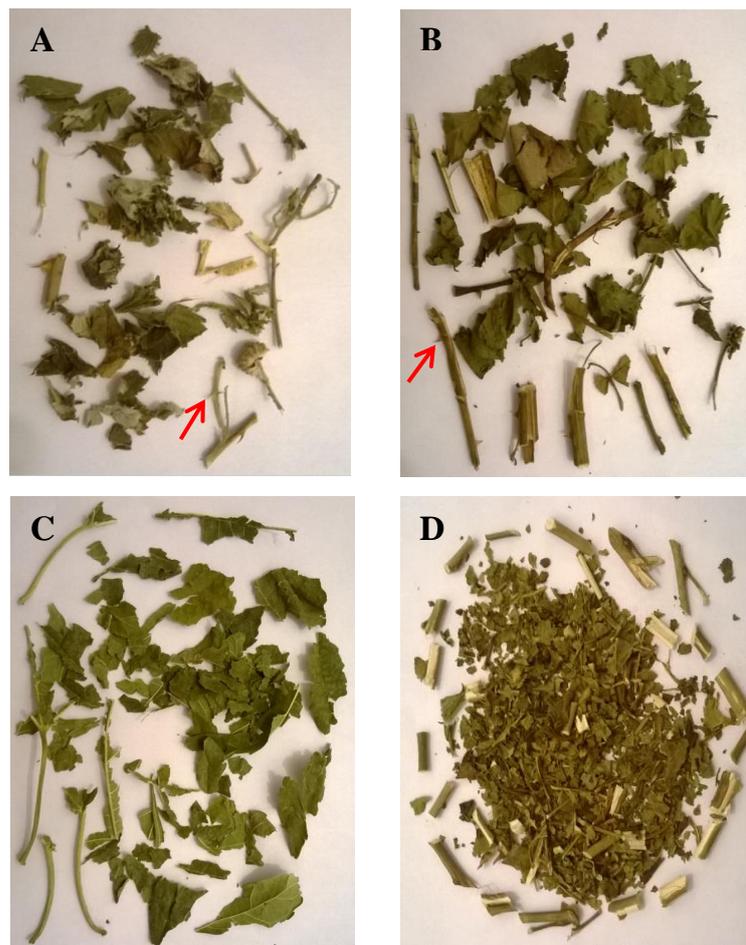
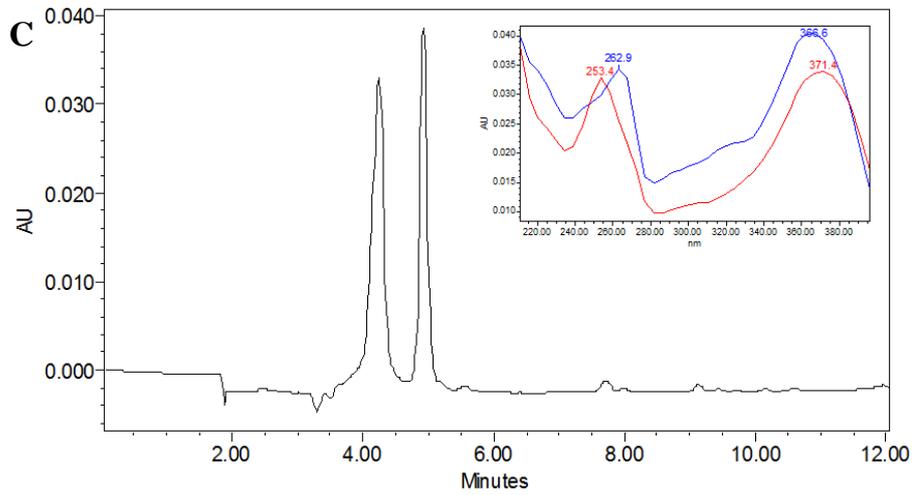
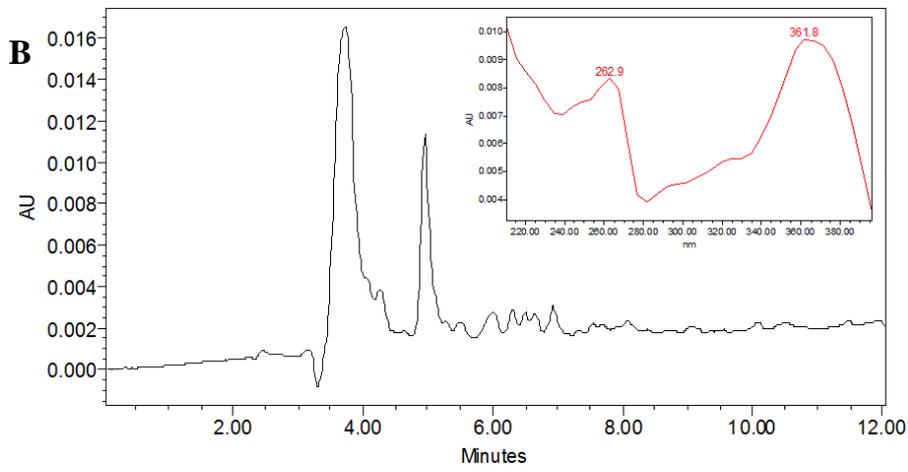
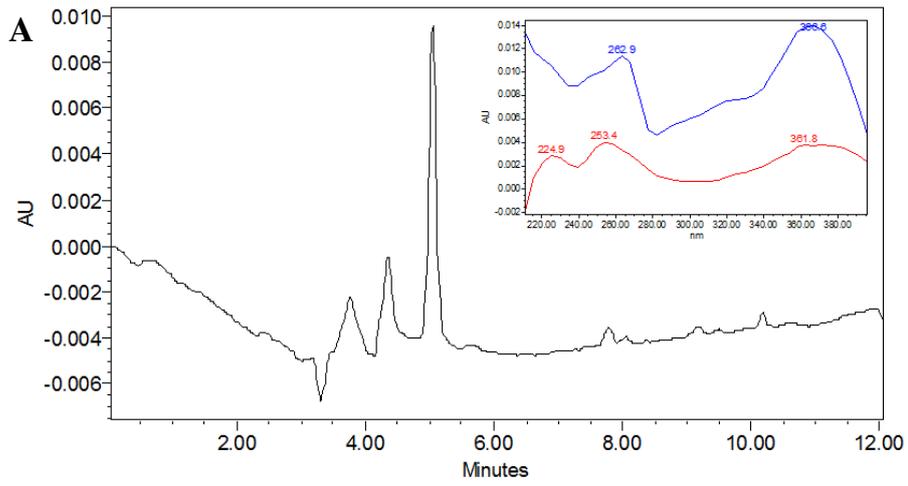


Figura 16. Imagem do material vegetal analisado. Amostra: A) *Morus celsa alba* (amora-branca); B) Amora-branca; C) *Morus nigra* (amoreira) e D) Amora-branca. As setas vermelhas indicam a presença de espinho.

A seguir, são apresentados os cromatogramas obtidos na análise das amostras A, B, C e D, **Figura 17.**



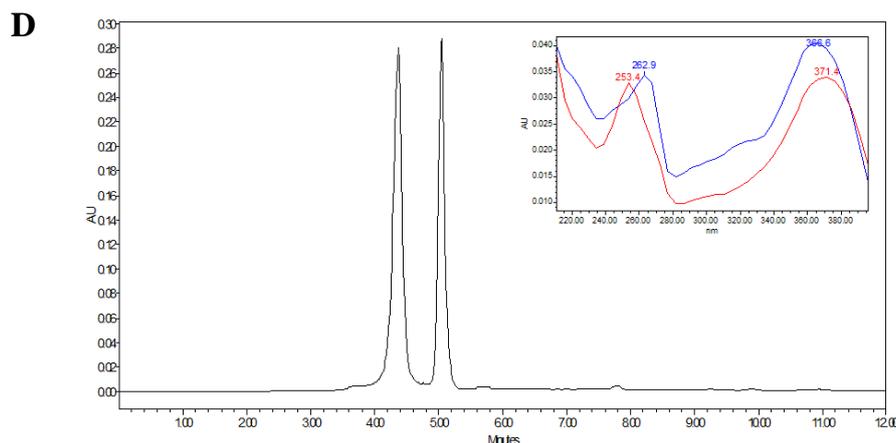


Figura 17. Cromatogramas obtidos para as amostras comerciais de amora. A) Amostra A; B) Amostra B; C) Amostra C e D) Amostra D, respectivamente.

Na **Tabela 16**, são apresentadas as concentrações de quercetina e de canferol detectadas nas amostras comerciais de folhas de amora.

Tabela 16. Quantidade de quercetina e canferol encontrados em 1,0 g de planta seca (P.S.) por CLAE nas amostras de folhas de amora comercializadas.

| Amostra | Quercetina $\mu\text{g g}^{-1}$ P.S. | DPR% | Canferol $\mu\text{g g}^{-1}$ P.S. | DPR% |
|---------|--------------------------------------|------|------------------------------------|-------|
| A* | N.I. | - | 40,25 \pm 6,7 | 16,65 |
| B* | N.I. | - | 23,59 \pm 4,9 | 20,77 |
| C* | 239,62 \pm 17,48 | 7,29 | 195,28 \pm 11,73 | 6,01 |
| D* | 1432,23 \pm 83,59 | 7,50 | 1291,92 \pm 17,43 | 1,76 |

* (n = 3); N.I. = não identificado

4.5. Análise dos extratos por CLUE-DAD/EM

Os extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* foram analisados por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a detectores de arranjo de diodo e de espectro de massas com o objetivo obter-se mais informações químicas a respeito dos extratos vegetais. Para estes experimentos, os extratos foram preparados de acordo com o item 4.7.1. e analisadas quimicamente de acordo com o item 4.5.

A seguir, nos cromatogramas de absorção no UV, os picos em 0,58 e 0,69 minutos representam a presença de quercetina e de canferol no extrato hidrolisado das folhas de *Rubus erythrocladus*, respectivamente, **Figura 18**. Nos cromatogramas de massas, os picos em 0,79 e em 0,91 minutos representam quercetina e canferol, respectivamente, no mesmo extrato, **Figura 19**. Nas **Figuras 20 e 21** é possível verificar o espectro de absorção no UV e o espectro de massa destes picos, quercetina e canferol, respectivamente.

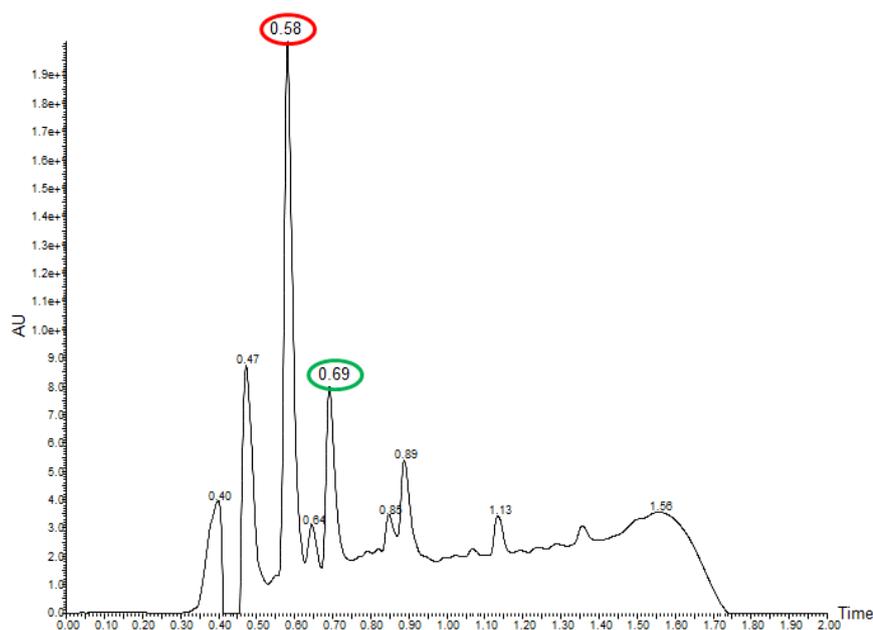


Figura 18. Cromatograma, 200 a 400 nm, do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus*.

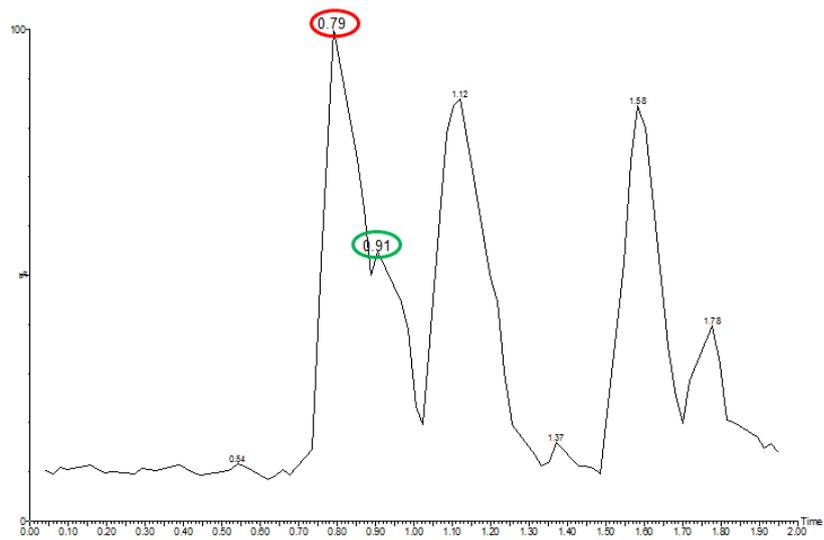


Figura 19. Cromatograma de massas do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus*.

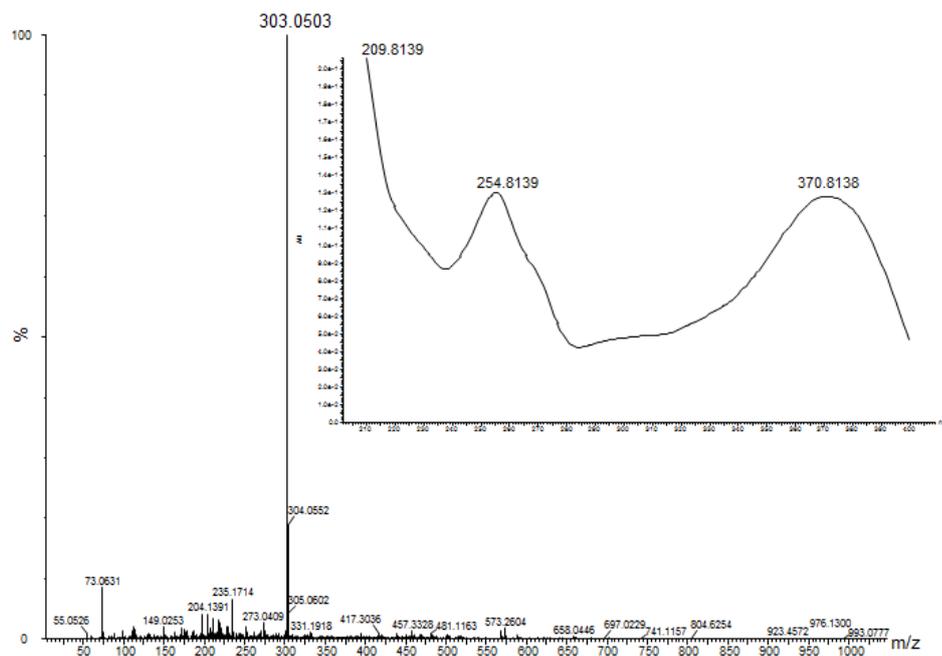


Figura 20. Espectro de massa e de UV referente ao pico de quercetina, $m/z = 303,0512$, *Rubus erythrocladus*.

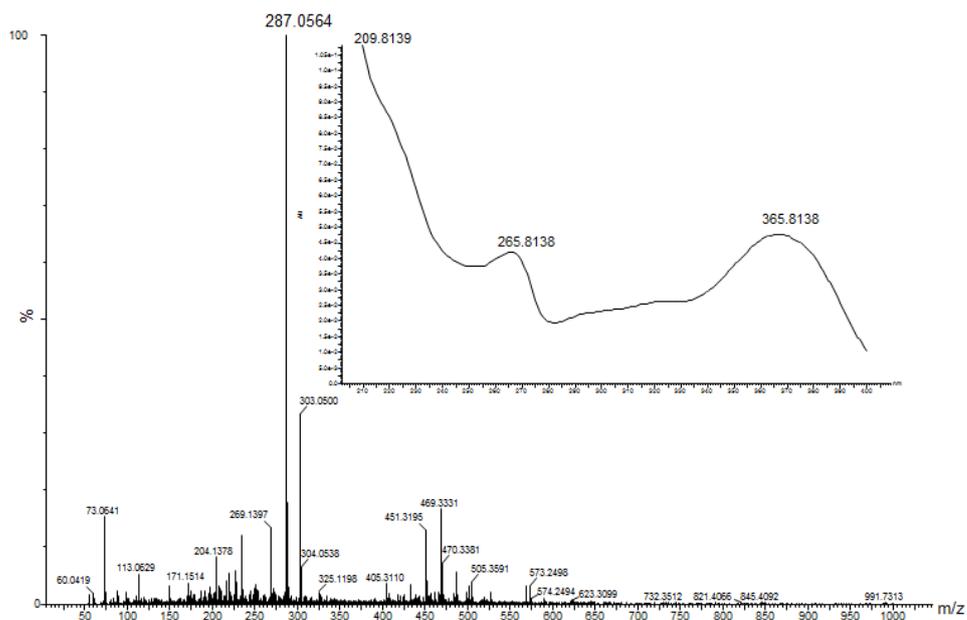


Figura 21. Espectro de massa e de UV referentes ao pico de canferol, $m/z = 287,0564$, *Rubus erythrocladus*.

A partir destes resultados acima, foi possível confirmar a identidade de duas substâncias presentes no extrato de *Rubus erythrocladus*. A diferença de massa inferior a 5 ppm é que possibilita esta informação, **Tabela 17**.

Tabela 17. Massa exata de quercetina e de canferol, *Rubus erythrocladus*.

| | Quercetina | Canferol |
|--------------------|------------|----------|
| Massa calculada | 303,0505 | 287,0556 |
| Massa experimental | 303,0503 | 287,0564 |
| Diferença | 0,65 ppm | 2,78 ppm |

Os extratos hidrolisados de folhas de *Rubus idaeus* e de *Morus nigra* também foram analisados por CLUE-DAD/EM. Nas **Figuras 22 a 25** e na **Tabela 18**, estão expressos os resultados encontrados para o extrato hidrolisado de folhas de *Rubus idaeus*.

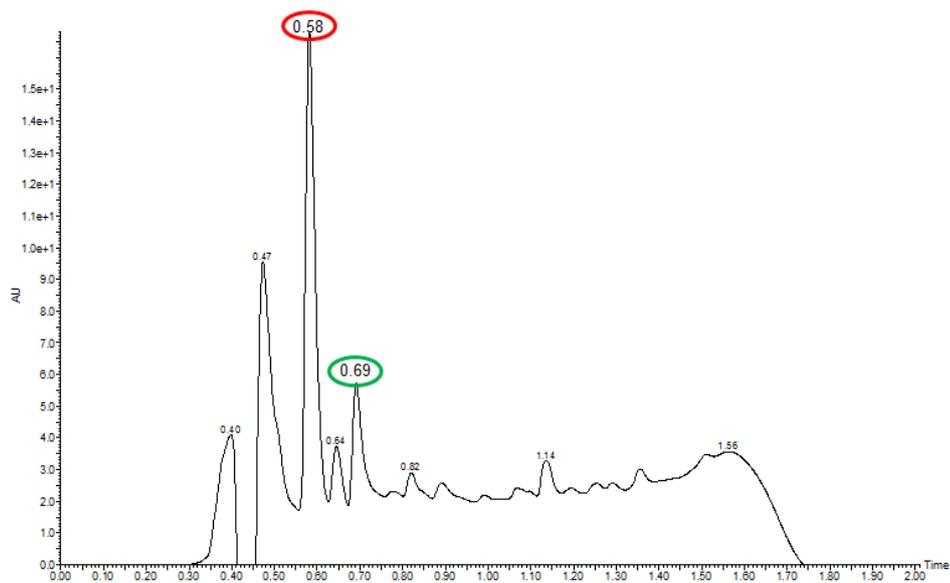


Figura 22. Cromatograma, 200 a 400 nm, do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus idaeus*.

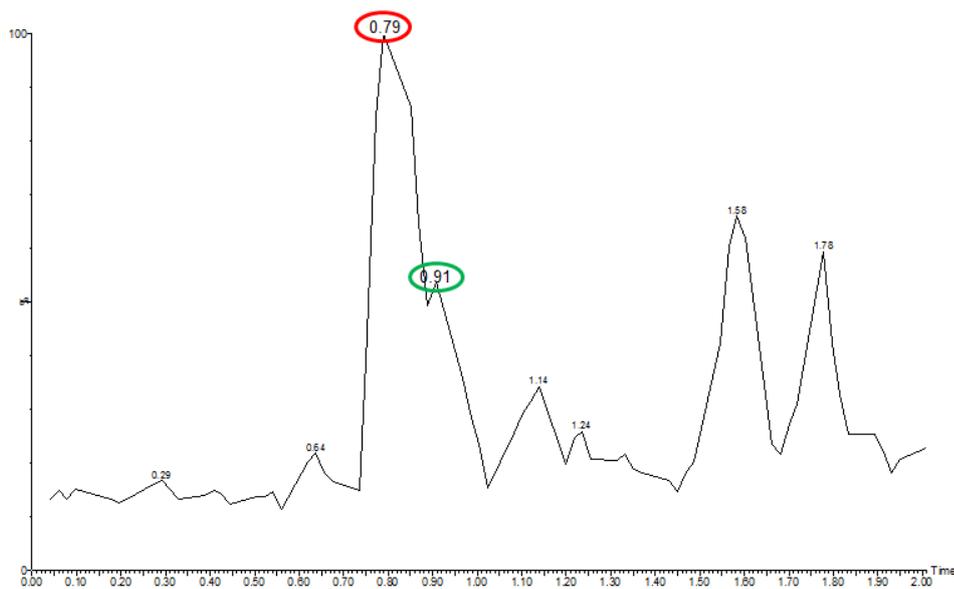


Figura 23. Cromatograma de massas do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus idaeus*.

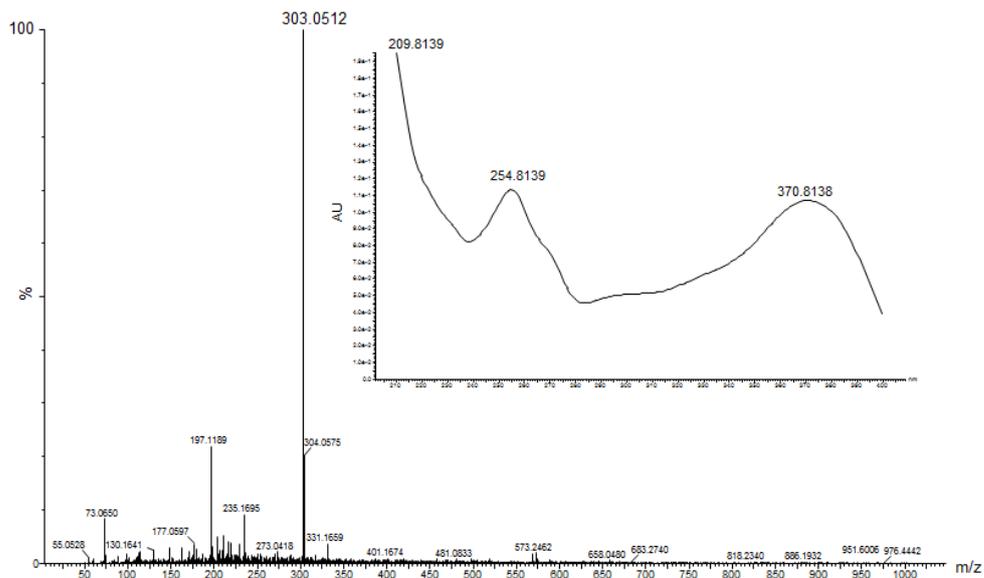


Figura 24. Espectro de massas e de UV da quercetina, *Rubus idaeus*.

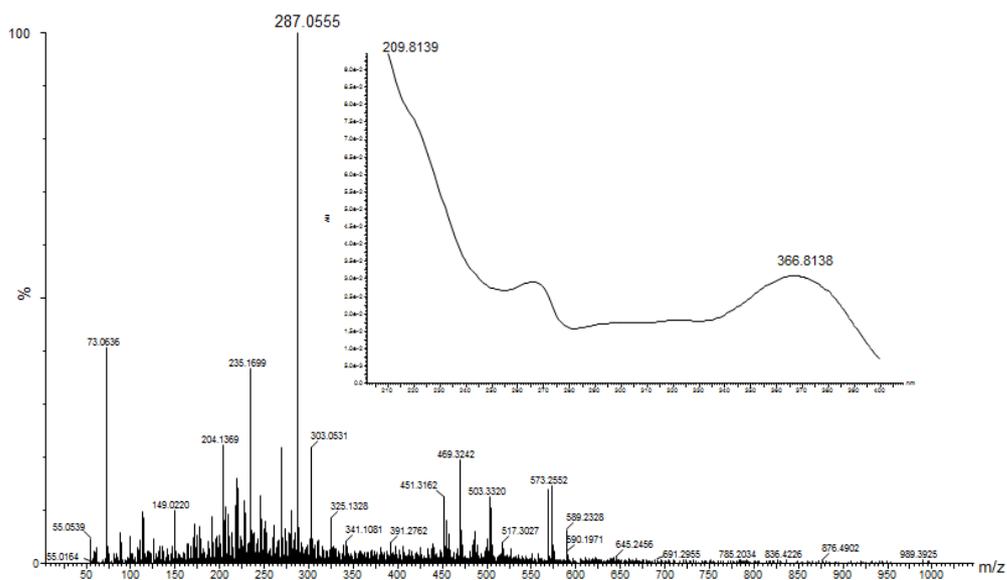


Figura 25. Espectro de massas do canferol, *Rubus idaeus*.

Tabela 18. Massa exata de quercetina e de canferol, *Rubus idaeus*.

| | Quercetina | Canferol |
|--------------------|------------|----------|
| Massa calculada | 303,0505 | 287,0556 |
| Massa experimental | 303,0512 | 287,0555 |
| Diferença | 2,30 ppm | 0,34 ppm |

Os resultados dos extratos hidrolisados de folhas *Morus nigra* estão dispostos nas Figuras 26 a 29, e na Tabela 19.

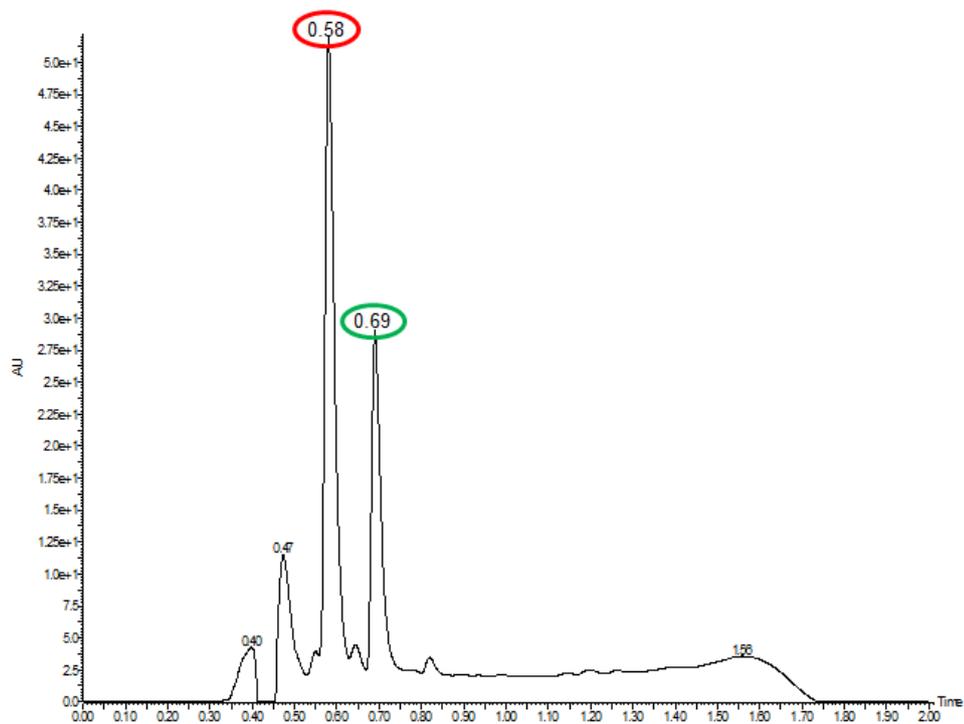


Figura 26. Cromatograma, 200 a 400 nm, do extrato hidrolisado de folhas de *Morus nigra*.

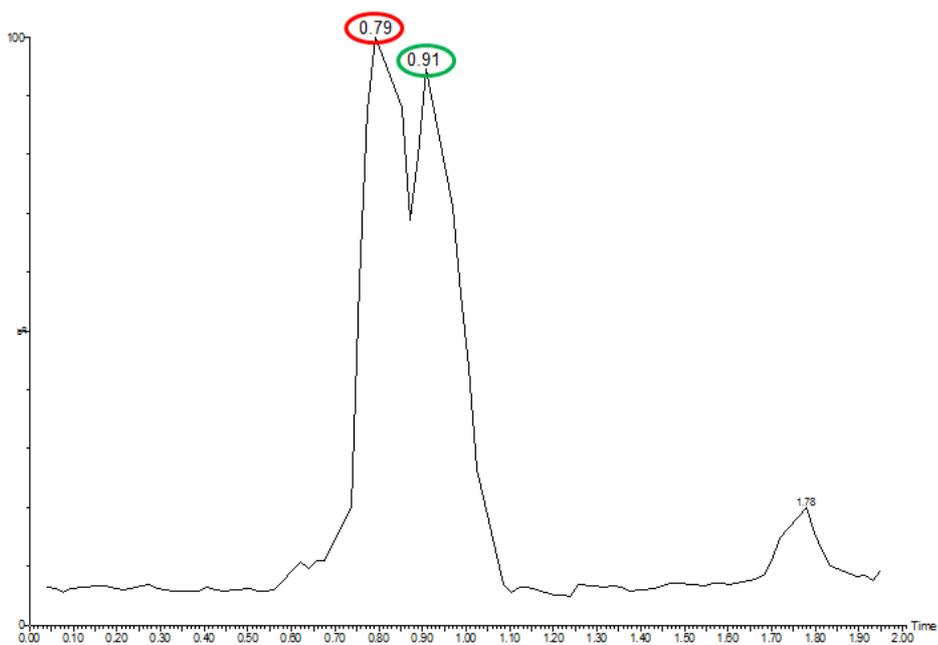


Figura 27. Cromatograma de massas do extrato hidrolisado de folhas de *Morus nigra*.

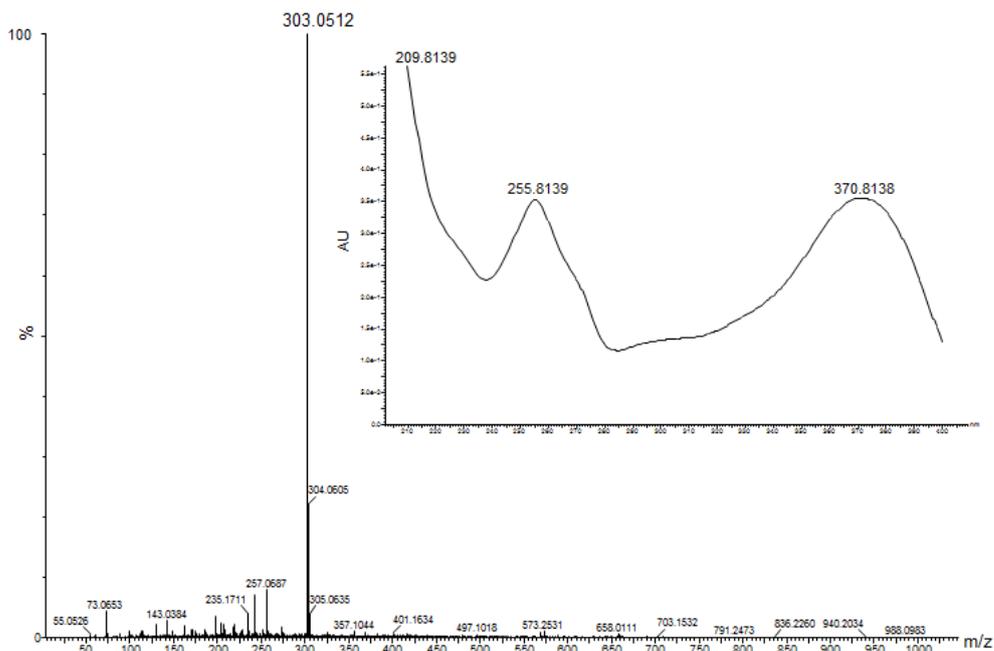


Figura 28. Espectro de massas e UV da quercetina, *Morus nigra*.

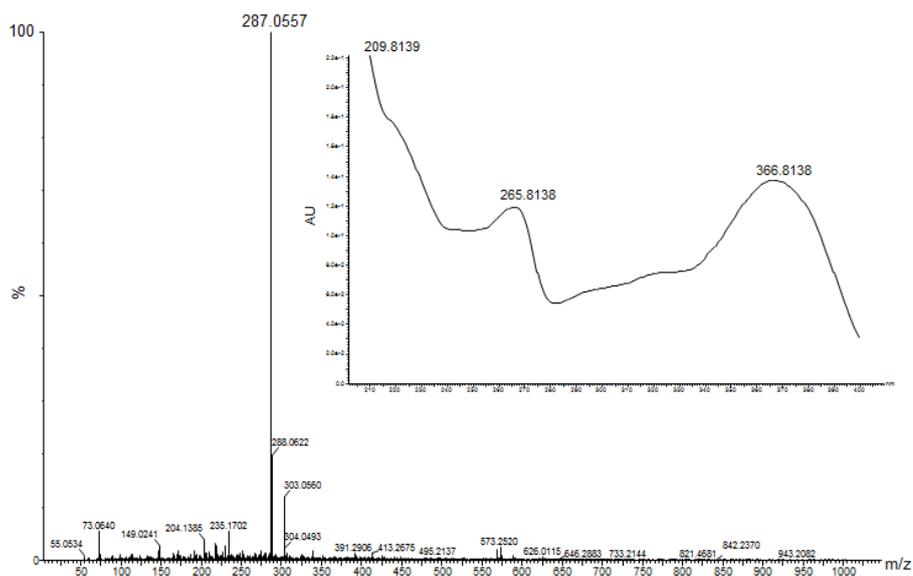


Figura 29. Espectro de massas e de UV do canferol, *Morus nigra*.

Tabela 19. Massa exata de quercetina e de canferol, *Morus nigra*.

| | Quercetina | Canferol |
|--------------------|------------|----------|
| Massa calculada | 303,0505 | 287,0556 |
| Massa experimental | 303,0512 | 287,0557 |
| Diferença | 2,30 ppm | 0,34 ppm |

4.6. Screening antifúngico

Os extratos hidrolisados de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* foram testados contra duas cepas de fungos filamentosos do campo: *Fusarium graminearum* (09 TR 107) e *Fusarium graminearum* (09 TR 110). Os extratos hidrolisados e não hidrolisados de *Rubus erythrocladus* e *Rubus idaeus* e não hidrolisado de *Morus nigra* foram testados frente a quatro cepas de fungos filamentosos patógenos humanos: *Thichophyton mentagrophytes* (TME 32), *Thichophyton rubrum* (TRU 51), *Microsporium gypseum* (MGY 01) e *Microsporium canis* (MCA 40). Os extratos foram preparados a 1 mg.mL⁻¹, resultando em 0,5 mg.mL⁻¹ nos poços e cada fungo foi testado em triplicada frente a cada extrato. Os resultados deste screening estão dispostos nas **Tabelas 20 e 21**.

Tabela 20. Atividade antifúngica dos extratos frente a duas cepas de *Fusarium*.

| Planta | Extrato | (09 TR 107) | (09 TR 110) |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------|
| <i>Rubus erythrocladus</i> | Hidrolisado | - | - |
| <i>Rubus idaeus</i> | Hidrolisado | - | - |
| <i>Morus nigra</i> | Hidrolisado | - | - |
| Controle positivo | | + | + |
| Controle negativo | | - | - |
| Controle do diluente | | + | + |

- = não apresentou atividade.

Tabela 21. Atividade antifúngica dos extratos frente a fungos patógenos humanos.

| Planta | Extrato | TME 32 | TRU 51 | MGY 01 | MCA 40 |
|----------------------------|-----------------|--------|--------|--------|--------|
| <i>Rubus erythrocladus</i> | Não hidrolisado | - | + | + | + |
| | Hidrolisado | - | - | - | - |
| <i>Rubus idaeus</i> | Não hidrolisado | - | + | + | + |
| | Hidrolisado | - | - | - | - |
| <i>Morus nigra</i> | Não hidrolisado | - | - | - | - |
| Controle positivo | | + | + | + | + |
| Controle negativo | | - | - | - | - |
| Controle do diluente | | + | + | + | + |

+ = apresentou atividade; - = não apresentou atividade.

5. DISCUSSÃO

Foi possível identificar os flavonoides quercetina e canferol nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* por técnicas como CLAE-DAD, EC-DAD e CLUE-DAD/EM. Todas as metodologias se mostraram rápidas e eficientes para detecção destes compostos nas matrizes de interesse.

Os tempos de análises dos métodos propostos se mostraram bastante satisfatórios. Por CLAE, ambos os flavonoides presentes nas amostras eluíram em menos de 7 minutos. Já por EC, eles migraram em menos de 5 minutos. Tempos de análises curto e cromatogramas/eletroferogramas eficientes são vantajosos, pois podem gerar informações importantes sobre o perfil químico e até mesmo sobre a identificação botânica das espécies (SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2008).

Analisando-se as **Figura 5** e **7**, que representam o cromatograma e o eletroferograma, respectivamente, dos padrões de referência de quercetina e canferol, é possível perceber uma inversão na sequência da separação destas substâncias. Na **Figura 5**, a quercetina elui antes do que o canferol. Já na **Figura 7**, observa-se que o canferol migra primeiro do que a quercetina. Esta mudança na sequência de detecção dos compostos poder ser justificada pelo fato de que, por CLAE, a separação dos analitos está relacionada com a polaridade dos mesmos e, por EC, a separação está relacionada com a carga iônica e com a massa molecular (MM) das substâncias (TAVARES, 1997).

Por CLAE, observa-se primeiro a eluição do composto quercetina, mais polar, e depois do canferol, menos polar. Na EC, o eletrólito de corrida apresenta pH próximo a 9,0 e o pKa dos compostos, constante de ionização (pKa quercetina igual a 7,76 e pKa canferol igual a 7,89), é muito próximo (TUNGJAI, et al. 2008). Ou seja, em pH próximo a 9,0, ambos os compostos estão ionizados e a massa molecular deles é que passa a determinar suas velocidades de migração. Dessa forma, o canferol (MM = 286,24) migra mais rápido pelo capilar do que a quercetina (MM = 302,2), uma vez que apresenta uma massa molecular menor.

De maneira geral, a identificação de quercetina e canferol nos extratos de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* corrobora com várias

informações encontradas na literatura de que é possível detectar flavonoides derivados de quercetina e/ ou de canferol em folhas das espécies de *Rubus* e *Morus* por diversas ferramentas analíticas (TZOUWARA-KARAYANN; PHILIANOS, 1982; PANIZZI et al., 2002; GUDEJ, 2003; SUNTORNSUK, KASEMSOOK, WONGAYAL; 2003; GUDEJ; TOMCZYK, 2004; CHU et al., 2006; VENSKUTONIS; KATSUBE et al., 2006; DVARANAUSKAITE; LABOKAS, 2007; SKUPIEN et al., 2008; MARTINI et al., 2009; DAT et al., 2010; DURGO et al., 2012; HAN et al., 2012; THABTI et al., 2012; CHOI et al. 2013).

Quanto a validação das metodologias analíticas, a partir das **Figuras 9 e 10**, é possível observar que para todas as curvas de calibração obteve-se coeficiente de determinação (r^2) satisfatório, superiores a 0,99, e interceptos próximos à origem. A partir dos dados obtidos com a análise de variância, constata-se que as curvas de calibração de quercetina e canferol, por CLAE e por EC, apresentam desvio de linearidade não significativos (F tabelado $>$ F calculado), conforme disposto nas **Tabelas 4 a 7**. Além da linearidade dos métodos, diante dos resultados das **Figuras 11 e 12**, é possível observar que ambas as metodologias propostas se mostram seletivas e específicas para a análise dos compostos de interesse, quercetina e canferol, nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*.

A conformidade do sistema, de CLAE e de EC, apresentou desvio padrão relativo menor do que 3% para quercetina e para o canferol nos extratos analisados o que representa que as metodologias propostas são capazes de fornecer dados de qualidade aceitável, **Tabela 8** (RIBANI et al. 2003).

A precisão intra e inter-ensaio por CLAE e por EC apresentaram valores satisfatórios, DPR menor do que 15%, **Tabela 9**. Comparando estes resultados obtidos por CLAE com os obtidos por EC, observou-se que a precisão intra e inter-ensaio por CLAE se mostrou melhor do que por EC, o que representa uma melhor concordância dos resultados obtidos por CLAE do que EC. A exatidão (ensaio de recuperação) por CLAE (aproximadamente 95%) foi menor do que por EC (aproximadamente 104%), ambos os resultados apresentaram DPR menor do que 15%, o que demonstra satisfatória exatidão para os métodos propostos, **Tabela 10**.

O limite de quantificação por CLAE se mostrou melhor do que o por EC e o mesmo ocorreu para os valores dos limites de detecção, **Tabela 11**. Estes resultados representam que o método por CLAE se mostrou mais sensível do que o por EC. A sensibilidade da EC está relacionada com janela de detecção do capilar e com a dispersão do feixe de UV que o atravessa. Quanto menor a janela de detecção, maior a sensibilidade. Da mesma forma, quanto menor for o diâmetro interno do capilar, menor a dispersão do feixe de UV e maior será a sensibilidade da técnica (LI, 1996).

Já para a robustez dos métodos, por CLAE, foi possível observar que os padrões de referência apresentaram menor área com o aumento do fluxo da fase móvel (de 0,60 para 0,65 mL min⁻¹), com a diminuição da concentração de ácido na fase móvel A (de 0,01 para 0,005% de TFA), e com a utilização de outro modelo de equipamento (Waters, modelo 2497, para Waters, modelo 996). Entretanto, houve uma maior área com a diminuição do fluxo da fase móvel (de 0,60 para 0,55 mL min⁻¹), com o aumento da concentração de ácido na fase móvel A (de 0,01 para 0,015% de TFA) e tanto com o aumento quanto com a diminuição da concentração de ácido na fase móvel B (tanto de 0,08 para 0,04% de TFA como de 0,08 para 0,12% de TFA). Submetendo o método a outro equipamento, também foi possível observar uma menor área dos analito de interesse. Os resultados obtidos mantiveram-se dentro dos limites estabelecidos, $\leq 15\%$, e comprovam que o método analítico por CLAE se mostrou robusto, **Tabela 12**.

Por EC, foi possível observar que os padrões de referência apresentaram diferentes resultados diante de pequenas variações no método analítico. Tanto com o aumento quanto com a diminuição da temperatura e do tempo de injeção, obtiveram-se melhores resultados para canferol, entretanto o mesmo não ocorreu para quercetina. Diante da alteração da concentração de solvente orgânico na composição do eletrólito, tanto com o aumento quanto com a diminuição de acetonitrila, a concentração de quercetina obtida foi menor em ambos os casos. Já para o canferol, foi possível observar uma maior área com o aumento da concentração do solvente orgânico. Os resultados obtidos estão dentro dos valores desejáveis, desvio padrão relativo menor do que 15%, e representam a robustez método analítico de EC, **Tabela 13**.

Antes dos métodos validados serem aplicados, verificou-se a precisão do método de extração elaborado. De acordo com os resultados apresentados na **Tabela 14**, o processo de extração proposto se mostrou preciso e apto a ser aplicado, pois apresentou valores de desvio padrão relativo menores do que 15%. Esta etapa de análise do método de extração se torna muito importante, uma vez que, variações notáveis na concentração dos compostos identificados em preparações à base de plantas contendo folhas *Rubus idaeus* indicam que o processo de extração dos metabólitos do vegetal deve ser exaustivamente pesquisado para uma avaliação mais precisa das suas propriedades farmacológicas (VENSKUTONIS; DVARANAUSKAITE; LABOKAS, 2007).

Uma vez que o método de extração se mostrou preciso e as metodologias propostas foram validadas, os processos propostos foram aplicados para a determinação das concentrações de quercetina e canferol presentes nos extratos de *Rubus* e *Morus*. Por CLAE, foi possível quantificar quercetina e canferol nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*. Entretanto, por EC, as quantidades de quercetina e canferol no extrato de *Rubus idaeus* e de canferol no extrato de *Rubus erythrocladus* se apresentaram abaixo do limite de quantificação do método. Desta forma, por EC, pode-se apenas quantificar quercetina na amostra de *Rubus erythrocladus* e quercetina e canferol na de *Morus nigra*, **Tabela 15**.

Por CLAE, o composto mais abundante em todos os extratos foi a quercetina, com concentrações nas amostras variando de 698,32 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 2323,90 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de planta seca. Já o canferol foi encontrado em menor concentração nos extratos, 184,20 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 1446,36 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de planta seca, sendo que, o extrato de *Morus* apresentou maiores concentrações destes compostos quando comparado aos extratos de *Rubus*.

Os resultados obtidos por EC se mostraram de acordo com os obtidos por CLAE. Por EC, quercetina também foi o composto mais abundante nos extratos analisados, com concentrações que variaram de 836,37 $\mu\text{g.g}^{-1}$ a 2552,82 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de planta seca, já o canferol foi quantificado apenas no extrato de *Morus nigra*, 1188,67 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de planta seca.

Convertendo-se para porcentagem as concentrações de quercetina e de canferol quantificadas por CLAE, e somando estes valores, tem-se 0,09% (p/p) destes compostos no extrato de *Rubus idaeus*, 0,12% (p/p) no de *Rubus erythrocladus* e 0,38% (p/p) no de *Morus nigra*. Estas porcentagens se encontram abaixo dos valores detectados por outros autores no extrato hidrolisado de folhas de outras espécies de *Rubus*, uma vez que, de acordo com a literatura, a maior e a menor concentração de quercetina e canferol foram encontradas nas espécies *Rubus nessensis* (1,06%) e *Rubus fruticosus* (0,27%), respectivamente (GUDEJ; TOMCZYK, 2004).

Analisando as quantidades de quercetina e de canferol quantificadas no extrato de *Morus nigra* por EC (2552,82 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e 1188,67 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de planta seca, respectivamente) observou-se valores intermediários em relação aos descritos na literatura para o extrato de folhas de *Morus alba*. Autores detectaram apenas 4,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de planta seca de quercetina e zero de canferol. Por outro lado, também por EC, pesquisadores quantificaram 4520,00 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de planta seca de quercetina no extrato de folhas de *Morus alba* (CHU et al. 2006; SUNTORNSUK, KASEMSOOK; WONGAYAL, 2003).

Até o momento, não foi encontrado na literatura nenhum estudo químico comparando o gênero *Rubus* com o *Morus* por CLAE e EC. Dessa forma, comparando estatisticamente, através do teste t, os resultados das concentrações de quercetina e de canferol quantificados nos extratos analisados, tanto por CLAE como por EC, é possível observar que entre estas duas ferramentas analíticas não há diferença significativa na quantificação destes compostos ($p > 0,05$).

A partir dos resultados de validação e de quantificação dos compostos de interesse nos extratos de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra*, verificou-se que tanto a metodologia por CLAE como a por EC se mostram confiáveis para análise de quercetina e de canferol nestas espécies. Dessa forma, ambas as metodologias apresentadas poderiam ser utilizadas para o controle de qualidade destes compostos nestes produtos naturais. Entretanto, para as análises por EC, sugere-se diluir menos as amostras injetadas, uma vez que esta ferramenta se mostrou menos sensível do que a CLAE.

Mesmo diante de uma menor sensibilidade do método por EC, é possível observar uma maior eficiência da separação dos picos por esta ferramenta analítica. O número de pratos teóricos dos picos obtidos por EC se mostrou visualmente maior do que por CLAE, **Figuras 13 e 14**.

A eletroforese capilar é uma técnica de alto poder de separação, versátil, rápida, de baixo custo e consumo mínimo de amostras, reagentes e solventes. Logo, estas características conferem a ela um grande potencial de aplicação em laboratórios de controle de qualidade de produtos vegetais.

Além disso, também foi possível obter mais informações a respeito do perfil químico do extrato hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* por cromatografia líquida de ultra eficiência. Nas **Figuras 17 e 18**, é possível verificar a presença de outros compostos, além de quercetina e canferol, no extrato hidrolisado de *Rubus erythrocladus*. Na **Figura 18**, os picos referentes a 1,10, 1,12 e 1,58 minutos tiveram suas massas identificadas (m/z 487,3551, m/z 451,3401 e m/z 457,2904, respectivamente) e fragmentadas, porém não foi possível estabelecer a identidade destes compostos.

Semelhante ao perfil apresentado pela amostra de *Rubus erythrocladus*, nas **Figuras 21 e 22** também é possível identificar a presença de quercetina e canferol no extrato de *Rubus idaeus*, além de observar a presença de demais compostos, como no cromatograma de *Rubus erythrocladus*. Analisando os resultados obtidos a partir dos cromatogramas das **Figuras 25 e 26** observa-se a presença de quercetina e de canferol no extrato hidrolisado de folhas de *Morus nigra* e a ausência de pequenos picos no cromatograma deste extrato, como os verificados nos cromatogramas das duas espécies de *Rubus*.

De maneira geral, a identificação de quercetina e canferol nos extratos de *Rubus* e *Morus* sugere a presença de derivados de quercetina e de canferol nas folhas das espécies estudadas. Com base nos resultados obtidos através das análises por CLUEDAD/EM, foi possível observar uma grande semelhança química entre os extratos hidrolisados de folhas de *Rubus* e de *Morus*.

A presença de pequenos picos, além da quercetina e do canferol, nos cromatogramas referentes às amostras de *Rubus* torna possível diferenciar

quimicamente estes dois gêneros em questão. Os cromatogramas sugerem evidências de que as folhas do gênero *Rubus* podem ser um pouco mais complexas do que as do gênero *Morus* no que diz respeito, provavelmente, aos metabólitos secundários presentes no extrato daquelas plantas.

Esta semelhança no perfil químico destas plantas pode estar contribuindo para confusões etnofarmacológicas entre estes dois gêneros. Desta forma, sugere-se que *Rubus* e *Morus* podem estar sendo utilizados para as mesmas finalidades terapêuticas por serem botanicamente semelhantes (devido à anatomia dos seus frutos) e também, de acordo com o apresentado neste trabalho, devido a uma semelhança do conteúdo químico destes dois gêneros.

Em laboratórios de controle de qualidade de produtos naturais, nem sempre os resultados são de simples interpretação. Neste trabalho, na análise de amostras de folhas de amora adquiridas comercialmente, analisando-se a **Figura 15**, percebe-se que na amostra A é possível visualizar a presença de espinhos, seta vermelha, o que sugere que ela pertença ao gênero *Rubus*, e não *Morus*, como descrito na embalagem. Na amostra B, também é possível encontrar espinhos, o que também sugere que ela seja da espécie *Rubus erythrocladus*, e por isso classificada como amora-branca. Nas amostras C e D não foi possível detectar espinhos e elas são classificadas como *Morus nigra* e *Morus alba*, respectivamente, em suas embalagens.

As amostras B e D são identificadas em suas embalagens como sendo amora-branca, entretanto é possível observar uma grande diferença entre a concentração de canferol quantificado na amostra B ($23,59 \pm 4,9 \mu\text{g.g}^{-1}$ P.S) e na amostra D ($1291,92 \pm 17,43 \mu\text{g.g}^{-1}$ P.S), **Tabela 16**. Quando analisadas as amostras de *Rubus erythrocladus* e *Rubus idaeus* (fornecidas pela Embrapa), e a amostra de *Morus nigra* (coletadas em Porto Alegre) obteve-se concentrações muito maior de canferol no gênero *Morus* do que no *Rubus*. Estas informações, juntamente do fato de que na amostra B o material vegetal apresentava espinhos, reforçam a sugestão de que esta amostra pertença ao gênero *Rubus*.

Comparando o perfil químico das amostras C e D, **Figura 16**, percebe-se que ambas as amostras apresentam maiores concentrações de canferol e de quercetina do que as amostras A e B, **Tabela 16**. Informações semelhantes foram obtidas no item

5.3. no qual amostras de *Morus* apresentaram maiores concentrações destes compostos do que as de *Rubus* através da mesma metodologia analítica.

Diante destes resultados, observa-se que análises botânicas e químicas de espécies vegetais são de grande importância para a identificação e controle de qualidade de plantas medicinais (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). Além disso, chama-se a atenção para a importância do controle de qualidade durante o processo de produção dos produtos vegetais, assim como para a importância da otimização do processo de produção da biomassa e de constituintes ativos por meio de estudos edafo-climáticos, de micropropagação e de melhoramento genético das espécies, por exemplo, com a finalidade de garantir a qualidade do produto vegetal (KLEIN et al., 2009).

Além disso, através do ensaio de *screening* para verificar o potencial antifúngico das folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* foi possível obter mais informações a respeito destes dois gêneros de planta. Na **Tabela 20**, é possível verificar que as amostras hidrolisadas não apresentaram atividade contra as duas cepas de *Fusarium graminearum* testadas. Entretanto, Omidiran e colaboradores (2012) verificaram que o extrato etanólico de *Morus alba* apresentou ação antifúngica contra a espécie *Fusarium oxysporum*.

Por outro lado, os resultados expostos na **Tabela 21** demonstram que os extratos não hidrolisados de *Rubus erythrocladus* e de *Rubus idaeus*, apresentaram capacidade de inibir o crescimento dos fungos *Thichophyton rubrum* 51, *Microsporium gypseum* 01 e *Microsporium canis* 40. Já o extrato não hidrolisado de *Morus nigra* não apresentou atividade frente a estes patógenos. Não se encontrou na literatura nenhum estudo anterior a este relatando o potencial de plantas deste gênero frente a estes patógenos.

Estes resultados de ação antifúngica dos extratos de *Rubus* diante de espécies de *Thichophyton* e *Microsporium* se mostraram bastante interessantes, uma vez que esperava-se que fossem derivados de quercetina e de canferol presentes nas amostras não hidrolisadas de *Rubus* e de *Morus* que fossem os responsáveis por gerar ação inibitória sobre o crescimento dos fungos. Portanto, o fato da amostra de *Morus* não ter apresentado a mesma ação antifúngica que as amostras de *Rubus* pode estar

relacionadas com a diferença de perfil químico entre estes dois gêneros, verificada por CLUE-DAD/EM. Ou seja, as atividades antifúngicas obtidas pelos extratos não hidrolisados de *Rubus erythrocladus* e de *Rubus idaeus* podem estar corroborando com a informação sugerida por Han e colaboradores (2012) de que substâncias presentes em traços nos extratos de *Rubus* podem estar contribuindo para a ação terapêutica dessas amostras.

Frente a todas as informações dispostas neste trabalho e ao fato de as espécies pertencentes ao gênero *Morus* se encontrarem listadas na Renisus e de que esta relação de plantas de interesse do governo brasileiro é elaborada através do relato de plantas que são bastante utilizadas pela população, este trabalho de mestrado chama a atenção para a correta utilização das plantas medicinais. Mesmo diante da semelhança do perfil químico dos gêneros *Morus* e *Rubus*, observou-se diferença no potencial antifúngico dos mesmos, realçando a importância do esclarecimento da população a respeito de plantas medicinais com a finalidade de evitar confusões etnofarmacológicas. Além disso, sugere-se maior controle de qualidade, por parte das autoridades brasileiras, a respeito das plantas medicinais que vem sendo comercializadas neste país, pois elas representam fator de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas (KLEIN et al., 2009).

6. CONCLUSÃO

- Foi possível reunir informações a respeito de usos populares, composição química e efeitos biológicos das folhas de plantas do gênero *Rubus* e do gênero *Morus*;
- Identificou-se os flavonoides quercetina e canferol nos extratos hidrolisados de folhas de *Rubus erythrocladus*, *Rubus idaeus* e *Morus nigra* por CLAE-DAD e EC-DAD, bem como validou-se estes métodos elaborados;
- Através das metodologias propostas, foi possível quantificar a presença de quercetina e canferol nos extratos hidrolisados e verificou-se que a amostra de *Morus* apresenta maior concentração destas substâncias em suas folhas do que as de *Rubus*;
- Observou-se que não há diferença significativa entre a quantificação por CLAE e por EC, e que a técnica de cromatografia líquida se mostrou mais sensível do que a de eletroforese capilar;
- Observou-se uma diferença no perfil químico entre as amostras de *Rubus* e de *Morus* por CLUE-DAD/EM, mostrando uma maior complexidade daquele gênero;
- Avaliou-se a concentração de quercetina e de canferol em quatro amostras comerciais de folhas de amora, observou-se uma grande variação na quantidade destes compostos nestes extratos e, até mesmo, possíveis erros na identificação botânica das amostras comercializadas;
- Verificou-se que o extrato não hidrolisado de *Rubus erythrocladus* e *Rubus idaeus* apresenta atividade contra três espécies de fungos filamentosos: *Thichophyton rubrum* 51, *Microsporium gypseum* 01 e *Microsporium canis* 40.

PERSPECTIVAS

Identificar os pequenos picos que aparecem nos cromatogramas de *Rubus* por CLUE-DAD/EM. Realizar análise por eletroforese capilar micelar acoplada a um espectrômetro de massas com a finalidade de separar supostas substâncias que estariam migrando juntamente com o fluxo eletrosmótico e identificá-las. Verificar se há a presença de terpenoides nas folhas de *Rubus* e *Morus*. Identificar os compostos presentes no extrato não hidrolisado de folhas de *Rubus erythrocladus* e de *Rubus idaeus* que apresentaram potencial antifúngico.

REFERÊNCIAS

ALTRIA, K. D. Ed. 1. **Capillary Electrophoresis Guidebook: principles, operation and applications**. New Jersey: Humana Press, 1996, 349 p.

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Antifungal activity of **Aegle marmelos** (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 4, p. 309-312, 2011.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003: Guia para a Validação de Métodos Analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde: Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto n. 5813 de 22 de abril de 2006: Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2006.

BRUNETON, J. **Farmacognosia: Fitoquímica – Plantas Medicinales**. Ed. 2. Zaragoza: Acribia S.A., 2001. 1099 p.

CALIXTO, J. B. Medicamentos fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. 1 Ed. Chapecó: Argos, 2001.

CHECKER, V. G.; KHURANA, P. Molecular and functional characterization of mulberry EST encoding *remorin* (*MiREM*) involved in abiotic stress. **Plant Cell Reports**, v. 32, n. 11, p. 1729 - 1741, 2013.

CHOI, J.; KANG, H. J.; KIM, S. Z.; KWON, T. O.; JEONG, S-I.; JAMG, S-I. Antioxidant effect of astragalins isolated from the leaves of *Morus alba* L. against free radical-induced oxidative hemolysis of human red blood cells. **Archives of Pharmacal Research**, v. 36, n. 1, p. 912-917, 2013.

CHU, Q.; LIN, M.; TIAN, X.; YE, J. Study on capillary electrophoresis-amperometric detection profiles of different parts of *Morus alba* L. **Journal of Chromatography A**, v. 1116, n. 1, p. 286 – 290, 2006.

CHUNG, H. I.; KIM, J.; KIM, J. Y.; KWON, O. Acute intake of mulberry leaf aqueous extract affects postprandial glucose response after maltose loading: Randomized double-blind placebo-controlled pilot study. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 1502-1506, 2013.

CLSI M38-A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne

CRUZ, G. L. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil**. 2 ed. Rio de Janeiro: Editora Civilização Brasileira S. A., 1982.

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e fitoquímica**. Ed. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbernkian, 2005. 670 p.

DANG, H.; SUN, L.; LIU, X.; PENG, B.; WANG, Q.; JIA, W.; CHEN, Y.; PAN, A.; XIAO, P. Preventive Action of Kai Xin San Aqueous Extract on Depressive-Like Symptoms and Cognition Deficit Induced by Chronic Mild Stress. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 1, p. 785 – 793, 2009.

DAT, N. T.; BINH, P. T. X.; QUYNH, L. T. P.; NINH, C. V.; HOUNG, H. T.; LEE, J. J. Cytotoxic prenylated flavonoids from *Morus alba*. **Fitoterapia**, v. 81, n. 1, p. 1224-1227, 2010.

DEIGHTON, N.; BRENNAN, R. FINN, C.; DAVIES, H. V. Antioxidant properties of domesticated and wild *Rubus* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 1, p. 1307 – 1313, 2000.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A.A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Science**, v. 65, n. 1, p. 337 – 353, 1999.

DURGO, K.; BELSCAK-CVITANOVIC, A.; STANCIC, A.; FRANEKIC, J.; KOMES, D. The Bioactive Potential of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves in Exhibiting Cytotoxic and Cytoprotective Activity on Human Laryngeal Carcinoma and Colon Adenocarcinoma. **Journal of Medicinal Food**, v. 15, n. 3, p. 258-268, 2012.

ERCISLI, S.; ORHAN, E. Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. **Food Chemistry**, v. 103, n. 1, p. 1380 – 1384, 2007.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, Ed. 5. Volume I. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010, 546 p.

FUKS, R. *Rubus* L. (Rosaceae) do Estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 36, n.61, p. 3 – 32, 1984.

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; SAMPAIO, B. L.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 581 – 585, 2009.

GOMPERTZ, O. F.; GAMBALE, W.; PAULA, C. R.; CORRÊA, B. Biologia dos Fungos. 4 Ed. In: **Microbiologia**. TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

GUDEJ, Y. Kaempferol and quercetina glycosides from *Rubus idaeus* L. leaves. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 60, n. 4, p. 313-316, 2003.

GUDEJ, J.; TOMCZYK, M. Determination of flavonoids, tannins and ellagic acid in leaves from *Rubus* L. Species. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 11, p. 1114-1119, 2004.

GUHA, A.; SENGUPTA, D.; REDDY, A. R. Physiological optimality, allocation trade-offs and antioxidant protection linked to better leaf yield performance in drought exposed mulberry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 1, p. 2649 – 2659, 2010.

GUNDOGDU, M.; MURADOGLU, F.; GAZIOGLU SENSOY, R. I.; YILMAZ, H. 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.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 985 – 990, 1999.

HAN, N.; GU, Y.; YE, C.; CAO, Y. LIU, Z.; YIN, J. Antithrombotic activity of fractions and components obtained from raspberry leaves (*Rubus chingii*). **Food Chemistry**, v. 132, n. 1, p. 181-185, 2012.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de Análises Instrumental**. Ed. 6. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1056 p.

HOLST, L.; HAAVIK, S.; NORDENG, H. Raspberry leaf – Should it be recommended to pregnant women? **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 15, n. 1, p. 204 – 208, 2009.

HU, X-Q; JIANG, L.; ZHANG, J-G.; DENG, W.; WANG, H-L.; WEI, Z-J. Quantitative determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves from 132 varieties. **Industrial Crops and Products**, v. 49, n. 1, p. 782 - 784, 2013.

JAMALIAN, A.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAIMAND, K.; PASHOOTAN, N.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, n. 1, p. 308 - 315, 2012.

JOUAD, H.; MAGHRANI, M.; EDDOUKS, M. Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p.351-356, 2002.

JÚNIOR, P. R. K.; STUMPF, R.; SPOLTI, P.; PONTE, E. M. D. Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes e plântulas de milho. **Ciência Rural**, v. 43, n. 4, p. 583 – 588, 2013.

KALE, A.; GAWANDE, S.; KOTWAL, S. Cancer Phytotherapeutics: Role for Flavonoids at the Cellular Level. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 567 – 577, 2008.

KATSUBE, T.; IMAWAKA, N.; KAWANO, Y.; YAMAZAKI, Y.; SHIWAKU, K.; YAMANE, Y. Antioxidant flavonol glycosides in mulberry (*Morus alba* L.) leaves isolated based on LDL antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 25-31, 2010.

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

LI, S. F. Y. **Capillary electrophoresis: principles, practice and applications**. Ed. 3. Netherlands: Elsevier, Journal of Chromatography Library, 1996, 592 p.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. Seropédica (RJ): Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro / UFRRJ, 2009. 185 f. Tese (Doutorado).

LIEN, T. P. KAMPERDICK, C.; SUNG, T. V.; ADAM, G. Triterpenes from *Rubus cochinchinensis*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 1, p. 463-465, 1999.

LIU, Z.; SCHWIMMER, J.; LIU, D.; LEWIS, J.; GREENWAY, F.; YORK, D. A.; WOLTERING, E. A. Gallic Acid is Partially Responsible for the Antiangiogenic Activities of Rubus Leaf Extract. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 1, p. 806 – 813, 2006.

MANN, J. **Secondary Metabolism**. Ed. 1. Oxford: Clarendon Press, 8, 1987.

MARTINI, S.; D'ADDARIO, C.; COLACEVICH, A.; FOCARDI, S.; BORGHINI, F.; SANTUCCI, A.; FIGURA, N.; ROSSI, C. Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 50-59, 2009.

MUKHERJEE, M. GHATAK, K. L.; GANGULY, N.; ANTOULAS, S. Rubic acid, a triterpene acid from *Rubus fruticosus*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 11, p. 2581-2582, 1984.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. Revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 121 – 142, 2005.

NOGUEIRA, E.; ROSA, G. J. M.; HARAGUCHI, M.; VASSILIEFF, V. S. Anxiolytic effect of *Rubus brasiliensis* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, n. 1, p. 111-117, 1998.

NOGUEIRA, E.; VASSILIEFF, V. S. Hypnotic, anticonvulsant and muscle relaxant effects of *Rubus brasiliensis*. Involvement of GABAA-system. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, n. 1, p. 275-280, 2000.

OH, K-S.; RYU, S. Y.; LEE, S.; SEO, H. W.; OH, B. K.; KIM, Y. S.; LEE, B. H. Melanin-concentrating hormone-1 receptor antagonism and anti-obesity effects of ethanolic extract from *Morus alba* leaves in diet-induced obese mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, n. 1, p. 216-220, 2009.

OHTANI, K. AIKAWA, Y.; KASAI, R.; CHOU, W-H.; YAMASAKI, K.; TANAKA, O. Minor diterpene glycosides from sweet leaves of *Rubus suavissimus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 5, p. 1533-1559, 1992.

OLIVEIRA, A. C. B.; OLIVEIRA, A. P.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, R. A.; SILVA, F. S.; REIS, S. A. G. B.; RIBEIRO, L. A. A. A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 244-249, 2013.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica**. Ed. 2. São Paulo: Atheneu, 1997, 178 p.

OMIDIRAN, M. O.; BAIYEWU, R. A.; ADEMOLA, I. T.; FAFOREDE, O. C. Phytochemical analysis, nutritional composition and antimicrobial activities of white mulberry (*Morus alba*). **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 11, n. 5, p. 456-460, 2012.

OSTROSKY, E. A.; MARCONDES, E. M. C.; NISHIKAWA, S. de O.; LOPES, P. S.; VARCA, G. H. C.; PINTO, T de J. A.; CONSIGLIERI, T. V. O.; BABY, A. R.; VELASCO, M. V. R.; KANEKO, T. M. *Rubus rosaefolius* Extract as a Natural Preservative Candidate in Topical Formulations. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 12, n. 2, p. 732-737, 2011.

PADILHA, M. M.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q.; DIAS, M. J.; SONCINI, R.; SANTOS, M. H. dos; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory Properties of *Morus nigra* Leaves. **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 1, p. 1496 – 1500, 2010.

PANIZZI, L.; CAPONI, C.; CATALANO, S.; CIONI, P. L.; MORELLI, I. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, n. 1, p. 165-168, 2002.

PAWLOWSKA, A. M.; OLESZEK, W.; BRACA, A. Quali-quantitative Analyses of Flavonoids of *Morus nigra* L. and *Morus alba* L. (Moraceae) Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 1, p. 3377 – 3380, 2008.

PORTAL DA SAÚDE, disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/3487->, acesso em 15 de outubro de 2013.

REFLORA, disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipaUC/PrincipalUC.do?lingua=pt>; acesso em: 19 de dezembro de 2013.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROJAS-VERA, J.; PATEL, A. V.; DACKE, C. G. Relaxant Activity of Raspberry (*Rubus idaeus*) Leaf Extract in Guinea-pig Ileum in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 16, n. 1, p. 665 – 668, 2002.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: A textbook of Pharmacognosy**. Ed. 4. Stockholm: Krustianstads Boktrychery A. B., 1999. 520 p.

SATTAYASAI, J.; TIAMKAO, S.; PUAPAIROJ, P. Biphasic Effects of *Morus alba* Leaves Green Tea Extract on Mice in Chronic Forced Swimming Model. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 487 – 492, 2008.

SHINTANI, H.; POLONSKY, J. **Handbook of Capillary Electrophoresis Applications**. Ed. 1. Ney York: Editora Blackie Academic & Professional, 1997, p. 208.

SILVA, J. A.; COLTRO, W. K. T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351 – 355, 2007.

SOUZA, S. P. de; PEREIRA, L. L. S. SOUZA, A. A.; SOUZA, R. V. de; SANTOS, C. D. dos; Estudo da atividade antiobesidade do extrato metanólico de *Baccharis trimera* (Less.) DC. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 1, p. 27 – 32, 2012.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435 – 440, 2010.

SUNTORNUSUK, L.; KASEMSSOK, S.; WONGYAI, S. Quantitative analysis of aglycone quercetin in mulberry leaves (*Morus alba* L.) by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, n. 1, p. 1236-1241, 2003.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M., HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Ed. 8, Fundamentos de Química Analítica, São Paulo: Editora Thomson, 2006, 999 P.

SKUPIEN, K.; KOSTRZEWA-NOWAK, D.; OSZMIANSKI, J.; TARASIUK, J. *In Vitro* Antileukaemic Activity of Extracts from Chokeberry (*Aronia melanocarpa* [Michx] Elliott) and Mulberry (*Morus alba* L.) Leaves against Sensitive and Multidrug Resistant HL60 Cells. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 689 -694, 2008.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1995.

TAVARES, M. F. M. Mecanismo de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511, 1997.

TEWARI, R. K.; KUMAR, P.; SHARMA, P. N. Oxidative stress and antioxidant responses of mulberry (*Morus alba*) plants subjected to deficiency and excess of manganese. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 35, n. 12, p. 3345 – 3356, 2013.

THABTI, I.; ELFALLEH, W.; HANNACHI, H.; FERCHICHI, A.; CAMPOS, M. da G. Identification and quantification of phenolic acids and flavonol glycosides in Tunisian *Morus* species by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 1, p. 367-374, 2012.

THIEM, B.; SLIWINSKA, E. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) in vitro cultures. **Plant Science**, v. 164, n. 1, p. 129-134, 2003.

THIEM, B.; GOSLINSKA, O. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 94-95, 2004.

TSUDUKI, T. KIKUCHI, I.; KIMURA, T.; NAKAGAWA, K. MIYAZAWA, T. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. **Food Chemistry**, v. 139, n.1, p. 16-23, 2013.

TUNGJAI, M.; POOMPIMON, W.; LOETCHUTINAT, C.; KOTHAN, S.; DECHSUPA, N.; MANKHETKORN, S. Spectrophotometric Characterization of Behavior and the Predominant Species of Flavonoids in Physiological Buffer: Determination of Solubility, Lipophilicity and Anticancer Efficacy. **The Open Drug Delivery Journal**, v. 2, n. 1, p. 10 – 19, 2008.

TZOUWARA-KARAYANNI, S. M.; PHILIANOS, S. M. Isolation of Quercetin and Kaempferol from *Rubus ulmifolius* and their Fluorometric Assay. **Microchemical Journal**, v. 27, n. 1, p. 144-161, 1982.

VENSKUTONIS, P. R.; DVARANAUSKAITE, A.; LABOKAS, J. Radical scavenging activity and composition of raspberry (*Rubus idaeus*) leaves from different locations in Lithuania. **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 162-165, 2007.

VOLPATO, G. T.; CALDERON, I. M. P.; SINZATO, S.; CAMPOS, K. E. RUDGE, M. V. C.; DAMASCENO, D. C. Effect of *Morus nigra* 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. 1, p. 691-696, 2011.

XIA, M.; QIAN, L.; ZHOU, X.; GAO, Q.; BRUCE, I. C.; XIA, Q. Endothelium-independent relaxation and contraction of rat aorta induced by ethyl acetate extract from leaves of *Morus alba* (L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 1, p. 442 – 446, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonóides. Ed. 6. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Porto Alegre: Editora da UFRGS, Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.