

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA  
CURSO DE QUÍMICA**

---



**IGOR COSTA RIBEIRO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE  
*Morus nigra***

**São Luís - MA  
2019**

**IGOR COSTA RIBEIRO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE  
*Morus nigra***

Monografia apresentada ao curso de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção da graduação em Química Bacharelado.

Orientadora: Profa Dra. Cláudia Quintino da Rocha

**SÃO LUÍS  
2019**

Ribeiro, Igor Costa

Obtenção e caracterização de extrato padronizado de  
*Morus nigra* / Igor Costa Ribeiro. - 2019.

37 f.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do  
Maranhão, São Luís - MA, 2019.

1. HPLC-MS. 2. *Morus nigra* L. 3. Padronização. Rocha, Cláudia Quintino  
da.

II. Título.

**IGOR COSTA RIBEIRO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE  
*Morus nigra***

Monografia apresentada ao curso de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal do Maranhão, como requisito para obtenção da graduação em Química Bacharelado

Aprovado em: 12 / 12 / 2019

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Cláudia Quintino da Rocha – UFMA - Orientadora

---

Prof. Dr. Roberto Sigfrido Gallegos Olea – UFMA - Examinador

---

Bel. Flávio Augusto Praseres Vieira- UFMA - Examinador

**DEDICO**

Aos meus heróis, José e  
Iolinda

“Tudo o que não nos destrói, torna-nos mais fortes.”  
(Friedrich Nietzsche)

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar a Deus, por me abençoar com uma família exemplar, que sempre me guiaram e ensinaram o caminho correto.

Aos meus queridos e amados pais, José e Iolinda, meus heróis, aqueles que me ensinaram os valores da honestidade e perseverança, me possibilitaram seguir neste trabalho e sempre me apoiaram e deram suporte para que eu chegasse até aqui.

À Jeniffer, minha namorada e companheira para todas as horas, compreensiva e sempre disposta a ajudar, meu maior incentivo.

Aos meus eternos amigos, Andrey, Bia, Edelson e Wendell, sem o apoio de vocês eu não teria conseguido, jamais esquecerei de todos os momentos.

Aos meus colegas e amigos do LAEC, Marta, Lucas, Sara, Luís Gustavo e à professora Teresa Cristina, que me apoiou e abriu as portas da iniciação científica para mim.

A todos os meus colegas do LQPN em especial Flávio, Aldilene e o prof. Marcos, sempre dispostos a ajudar.

À minha orientadora e professora Cláudia pela oportunidade, obrigado pelo comprometimento, responsabilidade e disposição sempre que precisei.

Aos professores da UFMA pelos ensinamentos, profissionalismo e sobretudo comprometimento com a prática docente, vocês são a base da Universidade, obrigado.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram pra que eu alcançasse meus objetivos.

# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Morus nigra*

IGOR COSTA RIBEIRO

## RESUMO

“Medicamentos fitoterápicos” é o termo usado para designar partes de uma planta medicinal como folhas, caule, raízes etc. usados como fitofármacos após passar por diversos processos. Todavia também se inclui nesse grupo, extratos brutos derivados de plantas como óleos essenciais, resinas, gorduras etc. Hoje, mais de 80% da população mundial utilizam fitoterápicos para ter uma vida saudável. A *Morus nigra* possui diversas aplicações terapêuticas, dentre elas a utilização do chá de folhas da planta para o tratamento dos sintomas do climatério. Neste trabalho, buscou-se a padronização do extrato hidroalcoólico 70% bem como sua caracterização via HPLC-MS. Inicialmente foi feito a padronização do tamanho das partículas do pó da espécie, onde obtivemos 84,8% do material retido na tamise de abertura 250µm, sendo classificado como um pó moderadamente grosso. O Teor de cinzas totais foi feito com objetivo de mensurar a matéria inorgânica presente no pó das folhas da planta, foi feito em triplicata e a partir da média, o teor encontrado foi de 8,84%, o que está dentro dos padrões estabelecidos pela farmacopeia brasileira. O extrato hidroetanólico foi obtido através do processo de percolação com vazão constante de 9 gotas/min tendo como solvente etanol 70%. O extrato bruto foi submetido a uma primeira análise em HPLC-PDA para definição das possíveis classes de compostos majoritários. Por fim, o extrato obtido pela extração com solvente, foi caracterizado por HPLC-UV-MS. 6 compostos, dentre eles, ácidos orgânicos e flavonoides foram identificados experimentalmente com base na interpretação dos seus espectros de massa e padrão de fragmentação.

**Palavras-chave:** *Morus nigra* L., padronização, HPLC-MS.



# OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATO PADRONIZADO DE *Morus nigra*

IGOR COSTA RIBEIRO

## ABSTRACT

“Phytotherapeutic medicines” is the term used to designate parts of a medicinal plant such as leaves, stem, roots, etc. used as plant protection drugs after undergoing various processes. However, this group also includes crude extracts derived from plants such as essential oils, resins, fats, etc. Today, more than 80% of the world's population uses herbal medicines to live a healthy life. *Morus nigra* has several therapeutic applications, including the use of plant leaf tea to treat climacteric symptoms. In this work, we sought to standardize the 70% hydroalcoholic extract as well as its characterization via HPLC-MS. Initially it was made the standardization of the particle size of the dust of the species, where we obtained 84.8% of the material retained in the opening sieve 250µm, being classified as a moderately coarse powder. The total ash content was made in order to measure the inorganic matter present in the leaves of the plant, it was made in triplicate and from the average, the content was 8.84%, which is within the standards established by Brazilian pharmacopoeia. The hydroethanolic extract was obtained through the percolation process with constant flow rate of 9 drops / min with 70% ethanol as solvent. The crude extract was subjected to a first HPLC-PDA analysis to define possible classes of major compounds. Finally, the extract obtained by solvent extraction was characterized by HPLC-UV-MS. 6 compounds, among them, organic acids and flavonoids were experimentally identified based on the interpretation of their mass spectra and fragmentation pattern.

**Keywords:** *Morus nigra* L., standardization, HPLC-MS

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas e frutos da espécie <i>Morus nigra</i> . .....	5
Figura 2- Gráfico granulométrico Abertura x Massa do pó retido .....	12
Figura 3 - Cromatograma de picos base .....	14
Figura 4- Espectro de massa de primeira ordem para o Ácido Quínico (1).....	15
Figura 5- Mecanismo de fragmentação proposto para o Ácido Quínico.....	16
Figura 6- Espectro de massa de primeira ordem para o Ácido Clorogênico (2).....	16
Figura 7- Mecanismo de fragmentação proposto para o Ácido Clorogênico ....	17
Figura 8- Espectro de massa de primeira ordem para o Kaempferol 3-O-glucosídeo (3).....	17
Figura 9-Mecanismo de fragmentação proposto para o Kaempferol 3-O-glucosídeo .....	18
Figura 10- Espectro de massa de primeira ordem para a Isoquercitrina (4) ....	18
Figura 11-Mecanismo de fragmentação proposto para a Isoquercitrina .....	19
Figura 12-Espectro de massa de primeira ordem para o Kaempferol 3-O-rutinosídeo (5) .....	19
Figura 13-Mecanismo de fragmentação proposto para o Kaempferol 3-O-Rutinosídeo .....	20
Figura 14- Espectro de massa de primeira ordem para a Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -glucopiranosídeo (6) .....	20
Figura 15- Mecanismo de fragmentação proposto para o composto Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -Glucopiranosídeo .....	21

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Revisão química da espécie <i>Morus nigra</i> .....	6
Tabela 2- Resultados da granulometria para o pó de folhas de <i>Morus nigra</i> ...	11
Tabela 3- Compostos caracterizados de extrato de folhas de <i>Morus nigra</i> obtidos pela técnica de extração usando HPLC – MS. ....	15

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	1
2.	REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1.	Padronização .....	3
2.2.	<i>Morus nigra</i> L. ....	3
2.3.	Revisão química/ farmacológica.....	6
3.	OBJETIVOS.....	7
3.1.	Objetivo Geral.....	7
3.2.	Objetivos Específicos .....	7
4.	METODOLOGIAS.....	8
4.1.	Etapa farmacognóstica.....	8
4.1.1.	Padronização do tamanho de partícula do pó das espécies .....	8
4.1.2.	Teor de cinzas totais .....	8
4.2.	Preparo do extrato .....	8
4.3.	Padronização química dos extratos – estabelecimento dos perfis cromatográficos .....	9
4.3.1.	Identificação dos constituintes químicos de <i>Morus nigra</i> .....	9
4.3.1.1.	HPLC-PDA.....	9
4.3.1.2.	HPLC-UV-MS.....	9
4.4.	Tamanho das partículas do pó .....	11
4.5.	Teor de cinzas totais.....	12
4.6.	Obtenção e caracterização do extrato por HPLC-UV-MS .....	13
5.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	22
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## 1. INTRODUÇÃO

A Fitoterapia é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Ao longo do tempo têm sido registrados variados procedimentos clínicos tradicionais utilizando plantas medicinais, entretanto os estudos literários evidenciaram divergentes informações sobre a origem da Fitoterapia como prática medicinal. Alguns autores mencionam que os primeiros relatos do uso de plantas com finalidades terapêuticas datam aproximadamente no ano 3000 a.C. [6].

O termo "medicamentos fitoterápicos" indica plantas ou partes de plantas que foram convertidas em fitofármacos por meio de processos simples que envolvem colheita, secagem e armazenamento. Uma prática além da definição inclui também outros produtos brutos derivados de plantas, que não apresentam nenhuma estrutura orgânica, como óleos essenciais, gordurosos e resinas. Há uma crescente conscientização e aceitabilidade do uso de medicamentos fitoterápicos na prática médica de hoje. Embora, a maioria dessas aplicações seja pouco ortodoxa, é, no entanto, um fato conhecido que mais de 80% da população mundial depende de fitoterápicos e produtos para uma vida saudável. Este aumento no uso de produtos à base de plantas também deu origem a várias formas de abusos e adulteração dos produtos, levando à decepção dos consumidores e fabricantes e, em alguns casos consequências fatais. O desafio é inumerável e enorme, tornando o mercado global de ervas inseguro. A avaliação dos medicamentos à base de plantas é uma ferramenta importante na formulação de produtos à base de plantas de alta qualidade. É grande a necessidade de estabelecer parâmetros de qualidade com a ajuda de ferramentas analíticas avançadas e métodos de padronização bem definidos para garantir a segurança dos produtos fitoterápicos no mercado global [14].

É importante lembrar ainda dos processos de garantia de qualidade e padronização de fitoterápicos e produtos que utilizando de vários métodos espectroscópicos, cromatográficos e eletroforéticos, conseguem de fato aumentar a confiabilidade e reprodutibilidade, algo que não é simples pois o campo do controle de qualidade dos fitoterápicos é realmente uma pesquisa interdisciplinar. Precisa-se de cruzamento de química, farmacologia, medicina e

até estatística para fornecer uma plataforma para o controle de qualidade de fitoterápicos tradicionais.

Atualmente, as substâncias vegetais, são amplamente empregadas na indústria farmacêutica como matéria prima para a extração de princípios ativos e principalmente, para a produção de fitoterápicos e extratos. Cada vez mais o interesse nessas substâncias é maior por parte de profissionais da saúde e também por órgãos governamentais como um recurso terapêutico muito valioso para a população nos serviços de saúde [2]. Porém, para que isto ocorra de fato, os compostos vegetais devem devidamente padronizados de acordo com as normas vigentes, com a caracterização qualitativa e quantitativa dos seus princípios ativos, fornecendo qualidade, efetividade e segurança exigidos em uma preparação farmacêutica moderna [1].

No Brasil, chá de folhas de amora é largamente usado na medicina popular como repositor hormonal durante o climatério e também para aliviar seus sintomas (principalmente os fogachos), além de amenizar os sintomas de cefaléia e irritação que ocorrem no período pré-menstrual [7].

O interesse nos tratamentos alternativos com *Morus Nigra L.* gera cada vez mais estudos farmacológicos objetivando uma busca constante de soluções visando a melhoria da qualidade de vida feminina, os resultados desses estudos colaboram para evitar os efeitos negativos da tradicional Terapia de Reposição Hormonal (TRH), que gera diversos efeitos colaterais e aumento significativo do risco de algumas doenças. Frente às evidências atuais, a Associação Americana de Cardiologia está alertando contra a prescrição de hormonioterapia para a prevenção secundária de doença cardíaca. Ainda está recomendando suspender a TRH e instituir profilaxia para trombose venosa em mulheres que desenvolveram evento coronariano agudo durante o uso da terapia [16].

Tendo em vista diversos agravantes decorrentes dos tratamentos convencionais, faz-se necessário esforços mais incisivos no estudo e padronização de extratos e frações, sobretudo de *Morus Nigra L.* espécie definitivamente promissora no combate aos efeitos do climatério.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Padronização

Dados mostram que o uso das plantas medicinais em países industrializados constitui cerca de 20% do total de prescrições médicas. Tendo em vista a prática da Fitoterapia segura numa época em que se vivencia a expansão da medicina baseada em evidências, não se deve ter dúvidas sobre a eficácia e a segurança de intervenções terapêuticas, incluindo aquelas com medicamentos fitoterápicos. Logo, as provas da sua eficácia e segurança devem ser obtidas preferencialmente a partir de ensaios clínicos devidamente conduzidos, embora a legislação isente tais estudos para fitoterápicos de uso tradicional ou de uso bem estabelecido [6].

A padronização de formulações à base de plantas é essencial para avaliar medicamentos de qualidade, com base na concentração do seu princípio ativo, padronização física, química, físico-química e parâmetros in vitro e in vivo. Os produtos naturais têm sido nossa fonte mais bem-sucedida de medicamentos. Cada planta é como uma fábrica capaz de sintetizar número ilimitado de substâncias químicas altamente complexas e incomuns. É necessário manter a eficácia e a segurança dos fitofármacos reprodutíveis, portanto, se tiverem que considerar um medicamento racional, devem ser padronizados e a qualidade farmacêutica deve ser aprovada [14].

Um fitoterápico padronizado é o que apresenta teor conhecido dos princípios ativos e se enquadra dentro de critérios pré-estabelecidos. Apresenta substâncias marcadoras características, e não possui substâncias estranhas [3].

### 2.2. *Morus nigra* L.

*Morus nigra* L. é uma espécie pertencente ao gênero *Morus*, família Moraceae. Esse gênero possui cerca de 24 espécies e uma subespécie, com pelo menos 100 variedades conhecidas. A planta pode ser encontrada em regiões temperadas e subtropicais e pode crescer em uma grande variedade de condições climáticas, topográficas e de solo [5].

A amoreira-negra teve sua origem no continente Asiático, mais precisamente na China, e apesar de ser originária de clima temperado, se adapta bem em regiões de clima tropical e subtropical. Esta planta é perfeitamente cultivável no Brasil, e se encontra bem representada tanto por espécies indígenas como por espécies cultivadas [15].

Segundo Lorenzi (2003), quanto à sua descrição morfofisiológica, a árvore é caducifolia e apresenta uma altura que varia entre 7 e 12 metros, com tronco revestido por uma casca fina, quase lisa, de cor acinzentada. É provida de ramos mais ou menos horizontais com as extremidades pendentes, formando uma copa achatada, morfológicamente. As folhas são simples, cartáceas, obovadas, variáveis e profundamente lobadas em amostras jovens e de margens serradas em plantas adultas, com nervação saliente e superfície superior brilhante, que varia entre 6 e 12cm de comprimento, com pecíolo de 1 a 2cm. Sua inflorescência é formada entre os meses de julho e agosto, com flores pequenas, quase sempre de um só sexo, agrupadas em inflorescências. Apresentam-se, portanto, como drupas compostas de formato cilíndrico e de superfície tuberculada, inicialmente vermelhos e pretos quando maduros, de 1 a 2 cm de comprimento, de polpa carnosa e agridoce.

Sistemática botânica de *Morus nigra* L. [9]:

- Reino: Plantae
- Filo: Tracheophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Rosales
- Família: Moraceae
- Gênero: *Morus* L.
- Espécie: *Morus nigra* L.
- Nome comum: black mulberry (inglês), amora ou amora-preta (português)



Figura 1 - Folhas e frutos da espécie *Morus nigra*.



Fonte: Habitat Aid

Em geral, as plantas do gênero *Morus* possuem diversas indicações terapêuticas, na medicina chinesa, por exemplo, as espécies desse grupo são utilizadas como antiinflamatório, diurético, antitussígeno, analgésico e antipirético [12].

O chá de folhas de amora é comumente usado na medicina tradicional como repositor hormonal por conta da menopausa a fim de aliviar seus sintomas, principalmente os fogachos, que ocorrem neste período, dentre outros sintomas. Os resultados obtidos da pesquisa etnofarmacológica confirmam a utilização de *Morus nigra* L. no tratamento de sintomas do climatério, sendo assim um produto natural com alto potencial para estudos químicos e farmacológicos [11].

### 2.3. Revisão química/ farmacológica

Tabela 1- Revisão química da espécie *Morus nigra*

Parte da planta	Componente	Atividade	Referencia
<b>Folhas</b>	Ácido betulínico, $\beta$ -sitosterol e germanicol	Antiinflamatório	[13]
<b>Frutos</b>	Antocianinas	Antioxidante	[8]
<b>Raíz</b>	Morusina	Antinociceptivo	[4]
<b>Caule</b>	Compostos fenólicos	Antioxidante e propriedades antibacterianas	[10]

Fonte: do autor

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral**

- Obter extratos padronizados de acordo com a farmacopeia brasileira.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Obter o extrato hidroetanólico 70%, padronizado pela farmacopeia brasileira;
- Traçar o perfil por HPLC-PDA para avaliação dos metabólitos presentes;
- Caracterizar o extrato por LC-MS.

## **4. METODOLOGIAS**

### **4.1. Etapa farmacognóstica**

#### **4.1.1. Padronização do tamanho de partícula do pó das espécies**

A padronização do tamanho das partículas do pó da espécie foi executada segundo critérios descritos na Farmacopeia quarta edição de 1988. De uma maneira geral, os pós obtidos após a moagem foram submetidos a tamises de malhas diferentes, providos de tampas e recipiente para a coleta do pó. Com agitação, em movimentos horizontais rotativos de no mínimo 20 minutos ou o tempo necessário para que a operação seja completada. Após essa etapa, o tamanho das partículas foi mensurado, tendo como referências as descrições feitas na farmacopeia quarta edição item V.2.11.

#### **4.1.2. Teor de cinzas totais**

O procedimento adotado para a determinação do teor de cinzas foi executado conforme descrito na Farmacopeia quarta edição de 1988, no item V.4.2.4. De uma maneira geral, foi pesado aproximadamente 3g da droga vegetal pulverizada, transferiu-se para um cadinho de porcelana previamente calcinado e resfriado. Esse material foi então submetido a incineração em uma temperatura de 450°C até que todo o carvão fosse eliminado e o cadinho mantivesse peso constante.

### **4.2. Preparo do extrato**

Foram utilizados 450g de folhas trituradas de *Morus nigra* na extração por percolação, em temperatura ambiente segundo Prista *et al.* (1995). Foi utilizado etanol 70% como solvente na extração, definido pela farmacopeia brasileira. O extrato foi submetido ao processo de percolação com vazão constante de 9 gotas/min até sua total descoloração. Por fim o extrato etanólico bruto (EtOH/H<sub>2</sub>O 7:3, v/v) foi submetido à secagem por rotaevaporador em temperatura de 40 °C, liofilizado e posteriormente analisado por HPLC.

### **4.3. Padronização química dos extratos – estabelecimento dos perfis cromatográficos**

#### **4.3.1. Identificação dos constituintes químicos de *Morus nigra***

##### **4.3.1.1. HPLC-PDA**

O extrato bruto de *Morus nigra* foi analisado por HPLC-PDA, para isso realizou-se uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. Inicialmente o extrato passou por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v). Os compostos foram eluídos dos cartuchos utilizando 1 mL de MeOH/H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) com um volume final de 5 mL. A amostra então foi filtrada através de um filtro PTFE de 0,22 µm e seca posteriormente. O extrato seco foi diluído para 10 mg/mL em solvente grau HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no HPLC-PDA com detecção a 270 nm.

Utilizou-se um sistema HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba binária, e detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi uma Luna 5 µm C18 100 A (150 mm x 4,6 mm). Os solventes de eluição utilizados foram A (água) e B (metanol). A amostra foi eluída de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 60% de B em 60 min. Utilizou-se um fluxo de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção das amostras foi de 20 µL. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o software LC Solution (Shimadzu).

##### **4.3.1.2. HPLC-UV-MS**

O extrato bruto foi analisado por LC-MS em um espectrômetro de massas LCQ Fleet, Thermo Scientific®. A separação por HPLC foi realizada utilizando coluna cromatográfica Kinetex® C18 100 Å com poros de 5µm, e dimensões de 4,6mm x 100 mm. A fase móvel utilizada consiste em água,

ácido fórmico 0,1% (A) e acetonitrila mais ácido fórmico 0,1% (B), acrescentadas de ácido fórmico 0,1%, em gradiente exploratório, iniciando com 10% a 100% de B em 60 minutos, em um fluxo de 1,0 mL/min.

O espectro de massa foi obtido no espectrômetro de massas LCQ Fleet da Thermo Scientific®, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA). A amostra foi ionizada por electrospray (ESI) e as fragmentações foram obtidas em múltiplos estágios (MSn), em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). Foi escolhido o modo negativo para o extrato bruto, para a geração e análise dos espectros. As condições experimentais foram: voltagem do capilar -35 V, voltagem do spray -5000 V, temperatura do capilar a 350 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) e fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi de m / z 100-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectro.

A infusão de fluxo direto das amostras foi realizada num analisador do tipo *Ion trap* da Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo negativo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma tensão de pulverização de 5,00 kV, uma tensão capilar de 90 V, uma lente de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL min<sup>-1</sup>. A análise completa de varrimento foi registrada na gama m / z de 100-1000. As fragmentações em estados múltiplos (ESI-MSn) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de íons. O primeiro evento foi um espectro de massa de varredura completa para adquirir dados sobre íons nessa faixa m / z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS / MS realizada utilizando uma varredura dependente de dados nas moléculas [M+H] dos compostos de interesse com uma energia de colisão de 30% e um tempo de ativação de 30 ms. Os íons de produto foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. Identificou-se os diferentes compostos do extrato hidroetanólico comparando com a literatura seus tempos de retenção, espectros no UV e fragmentos obtidos na Espectrometria de Massas.

## RESULTADOS

### 4.4. Tamanho das partículas do pó

A análise granulométrica consiste na determinação dos tamanhos das partículas do material vegetal e nos respectivos cálculos estatísticos. Basicamente, determinar as dimensões aproximadas das partículas retidas em cada nível de abertura das tamises.

A massa da amostra pesada em balança analítica foi de 189,26g, transferiu-se para a tamise de maior abertura e iniciou-se a agitação, que durou cerca de 5 minutos, tempo suficiente para o pó percorresse todas as malhas.

Com os valores da massa da peneira e a massa após pesagem, por diferença temos a massa do pó retido para cada peneira, e com o valor das massas retidas em cada peneira utilizada, foi possível calcular o percentual do material retido através de uma relação simples:

$$\begin{array}{l} 100\% \longrightarrow 189,26\text{g} \\ X \longrightarrow \text{massa do pó retido} \end{array}$$

Tabela 2- Resultados da granulometria para o pó de folhas de *Morus nigra*

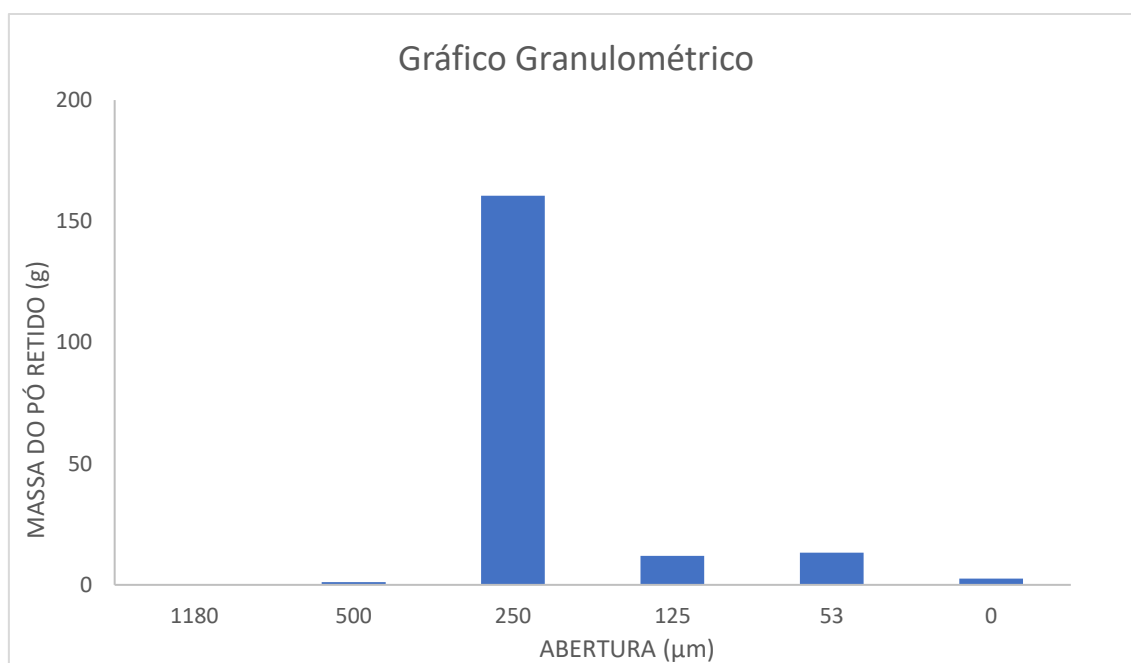
Malha	Abertura (µm)	Massa da tamise (g)	Massa após pesagem (g)	Massa do pó retido (g)	Porcentagem do pó retido
16	1180	426,71	426,91	0,2	0,1
35	500	377,18	378,33	1,15	0,6
60	250	286,39	446,99	160,6	84,8
120	125	274,74	286,67	11,93	6,3
270	53	360,47	373,73	13,26	7,0
0	0	445,73	448,26	2,53	1,3

Fonte: do autor

De acordo com a tabela 1, obteve-se a menor retenção do pó nas malhas 16 e 35, com 0,1% e 0,6% respectivamente, a maior quantidade de pó retido obteve-se na malha 60 com abertura de 250 $\mu$ m, cerca de 84,8% do total de material vegetal utilizado.

O gráfico da figura 1 obtido através dos dados da Tabela 1, confirmam os resultados:

Figura 2- Gráfico granulométrico Abertura x Massa do pó retido



Fonte: do autor

Portanto, o pó encontra-se majoritariamente na tamise de abertura 250 $\mu$ m, onde tivemos 84,8% de todo o material vegetal retido e de acordo com a farmacopeia brasileira, item V.2.11. trata-se de um pó moderadamente grosso.

#### 4.5. Teor de cinzas totais

Apesar das drogas estudadas em Farmacognosia serem produtos orgânicos, apresentam componentes de natureza inorgânica, representados



por carbonatos, fosfatos, cloretos e óxidos de: silício, magnésio, cálcio, potássio, alumínio, ferro e sódio.

Esse componente inorgânico próprio da constituição da droga é denominado de intrínseco e difere do componente inorgânico de origem externa, por exemplo, areia, pedra, gesso e terra. Estes últimos são originários de más preparações ou falsificações.

Levando-se em consideração o componente inorgânico intrínseco de cada droga, fixou-se o limite máximo que, excedido, determina a reprovação do produto.

A quantificação do conteúdo inorgânico fez-se por meio da determinação do resíduo pela incineração ou cinzas. Assim, a droga calcinada à alta temperatura teve toda a sua matéria orgânica transformada em CO<sub>2</sub>, restando apenas compostos minerais na forma de cinzas. Portanto, a determinação do conteúdo em cinzas mostra principalmente o cuidado que foi dedicado na preparação da droga vegetal.

Quanto à determinação do teor de cinzas totais, a mesma foi feita em triplicata e a partir da média, o teor encontrado foi de 8,84%. A droga vegetal, portanto, está aprovada quanto a esse parâmetro avaliado, uma vez que a sociedade brasileira de farmacognosia indica um limite máximo de 10%. A determinação do teor de cinzas totais é de extrema importância para o controle de qualidade, uma vez que o objetivo do mesmo é verificar a presença de impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar contaminando a droga vegetal.

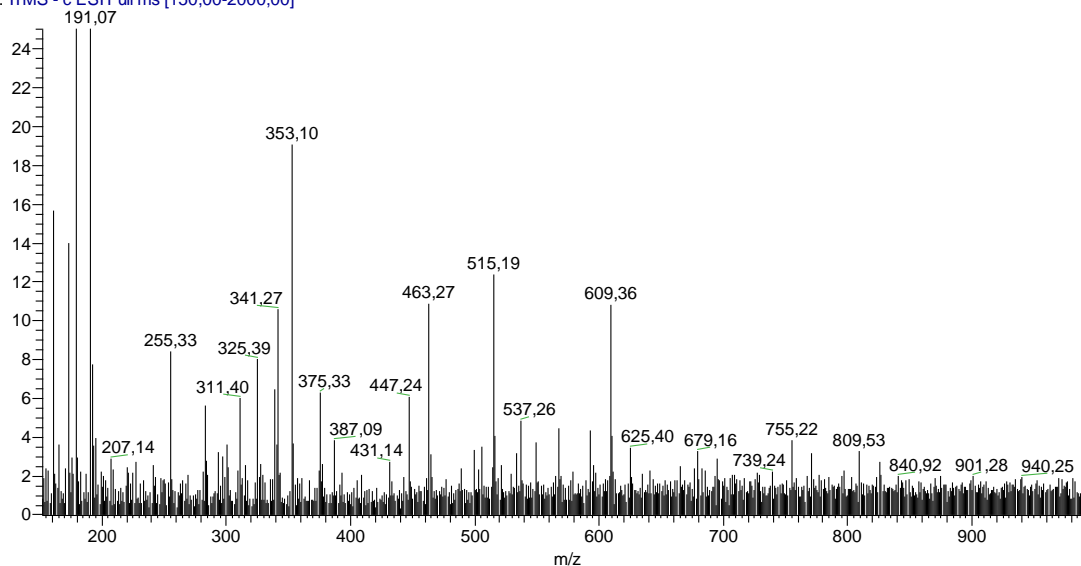
#### **4.6. Obtenção e caracterização do extrato por HPLC-UV-MS**

O extrato de folhas de *Morus nigra* obtido pela extração com solvente, foi caracterizado por HPLC-UV-MS. Os compostos foram identificados experimentalmente com base na interpretação dos seus espectros de massa e padrão de fragmentação obtidos em MS<sup>2</sup>, a fórmula molecular foi obtida por

software juntamente com os dados relatados na literatura. O cromatograma de picos base estão expostos na Figura 3.

Figura 3 - Cromatograma de picos base

EBMN\_NEG\_03092019 #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 1,25E5  
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-2000,00]



Fonte: do autor

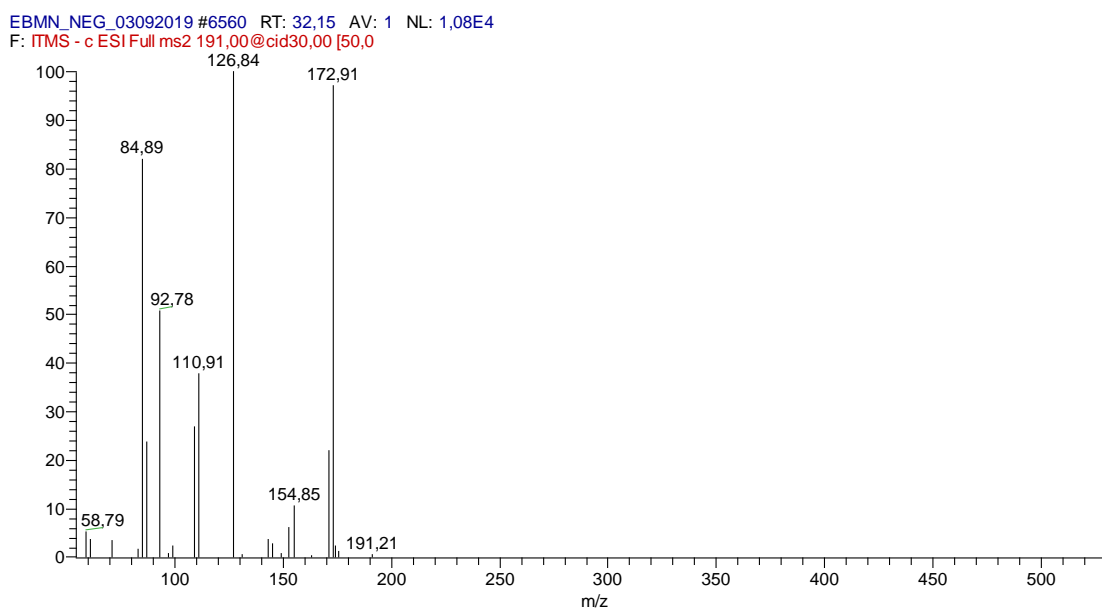
A tabela 2 inclui uma lista com os íons moleculares  $[M-H]^-$  encontrados no extrato com m/z experimental e seus respectivos fragmentos. Foram identificados 6 compostos no extrato de folhas de *Morus nigra*. Esses pertenciam a diferentes classes químicas, em geral flavonoides.

Tabela 3- Compostos caracterizados de extrato de folhas de *Morus nigra* obtidos pela técnica de extração usando HPLC – MS.

Pico	[M-H] <sup>-</sup>	Fragmentos MS <sup>2</sup>	Proposta de estrutura
1	191	173; 171; 127	Ácido Quínico
2	353	191; 179; 173	Ácido Clorogênico
3	447	284; 255	Kaempferol 3-O-glucosídeo
4	463	301; 300; 273	Isoquercitrina
5	593	284; 285; 257	Kaempferol 3-O-rutinosídeo
6	625	463; 445; 300	Quercetina-3,4'-O di-β-glucopiranosídeo

Fonte: do autor

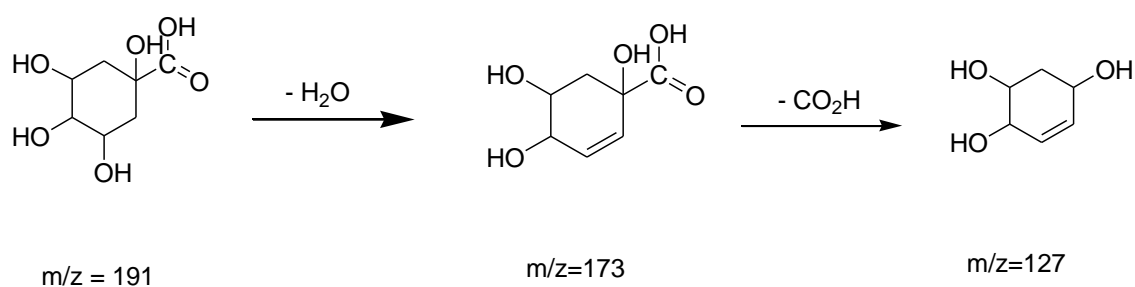
Figura 4- Espectro de massa de primeira ordem para o Ácido Quínico (1)



Fonte: do autor

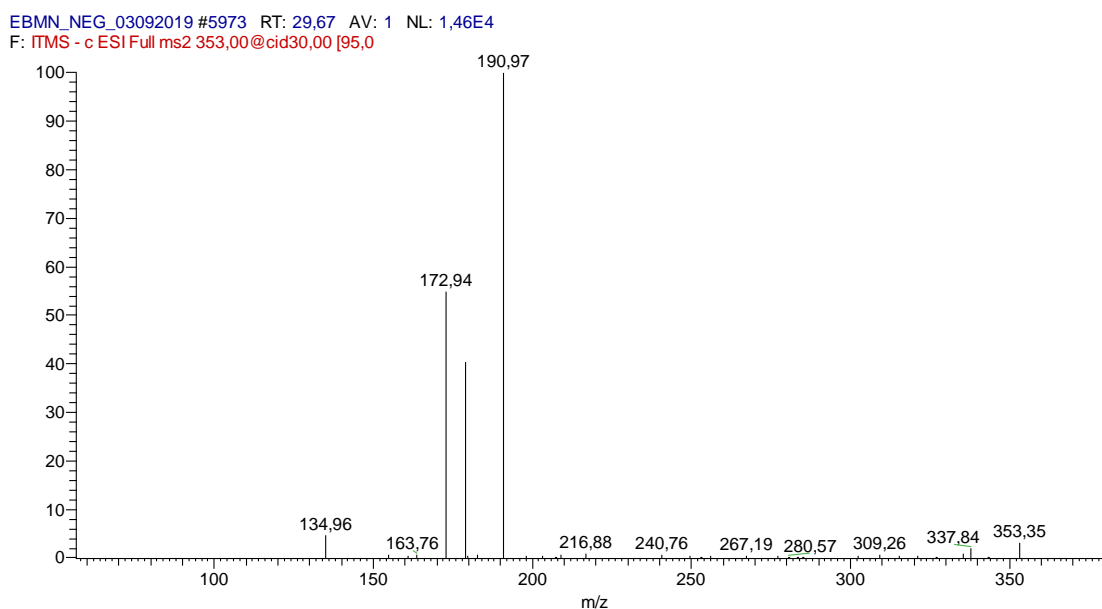
As análises permitiram também, a tentativa de identificação de ácidos orgânicos. O pico 1, com um íon em  $m/z$  191, foi proposto como sendo ácido quínico. Os dados do MS2 coletados demonstraram diferentes fragmentos em  $m/z$  173, 171 e 127. Portanto um padrão de fragmentação típico do ácido quínico, como mostra o mecanismo sugerido na Figura 5.

Figura 5- Mecanismo de fragmentação proposto para o Ácido Quínico



Fonte: do autor

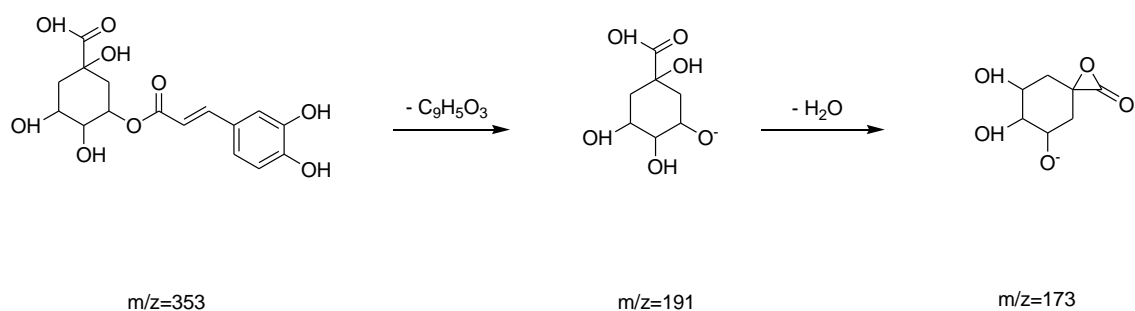
Figura 6- Espectro de massa de primeira ordem para o Ácido Clorogênico (2)



Fonte: do autor

O composto do pico 2 de fórmula molecular em  $m/z$  353 foi detectado apresentando diferentes fragmentos, dentre eles  $m/z$  191, que corresponde ao ácido caféico,  $m/z$  179 e 173, o último correspondendo à perda de uma molécula de água como indicado na Figura 7.

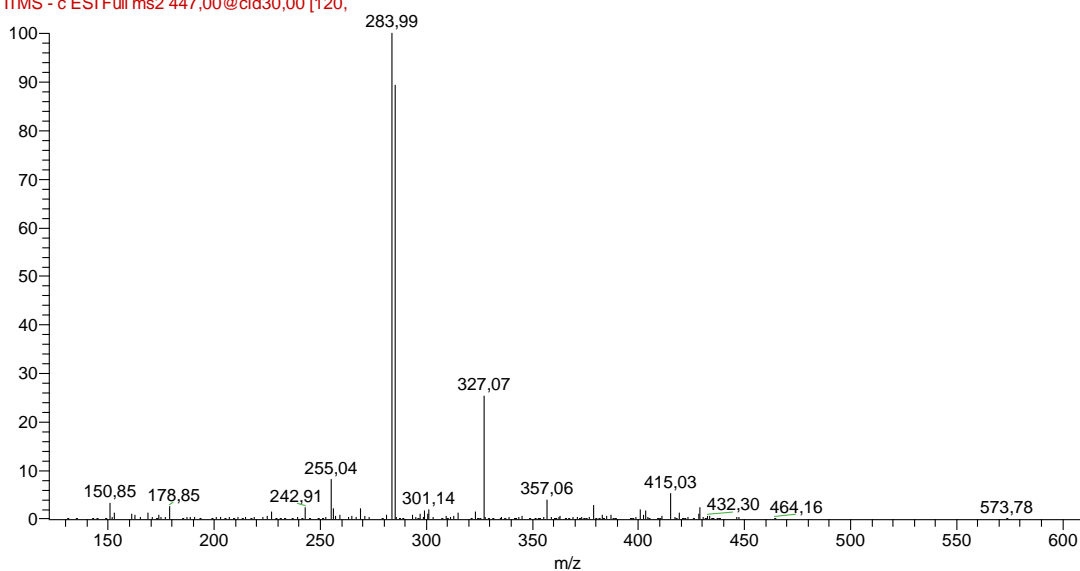
Figura 7- Mecanismo de fragmentação proposto para o Ácido Clorogênico



Fonte: do autor

Figura 8- Espectro de massa de primeira ordem para o Kaempferol 3-O-glucosídeo (3)

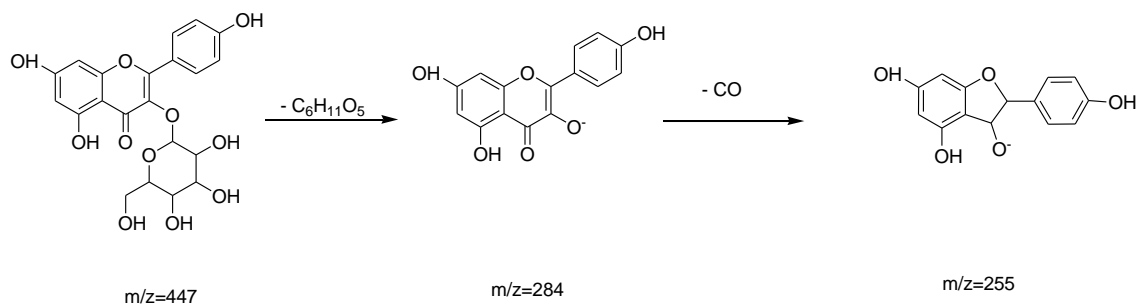
EBMN\_NEG\_03092019 #4598 RT: 23,21 AV: 1 NL: 2,57E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 447,00@cid30,00 [120,



Fonte: do autor

O pico 3, com um íon em  $m/z$  447 foi proposto como sendo Kaempferol 3-O-glucosídeo, mostrando diferentes fragmentos dentre eles  $m/z$  284 e 255 que provavelmente correspondeu à perda de resíduo e CO respectivamente, como mostra o mecanismo sugerido na Figura 9.

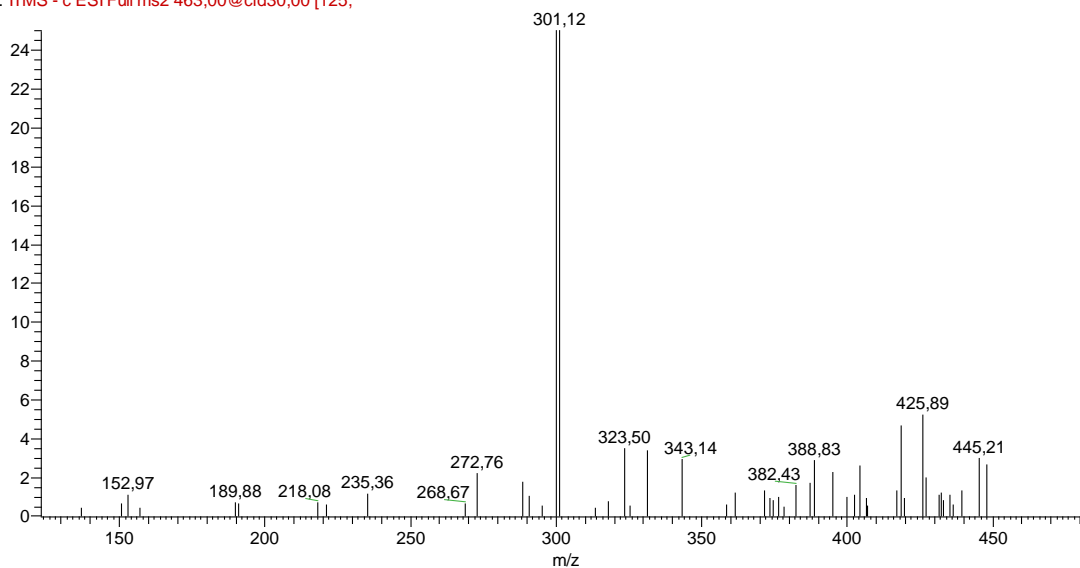
Figura 9-Mecanismo de fragmentação proposto para o Kaempferol 3-O-glucosídeo



Fonte: do autor

Figura 10- Espectro de massa de primeira ordem para a Isoquercitrina (4)

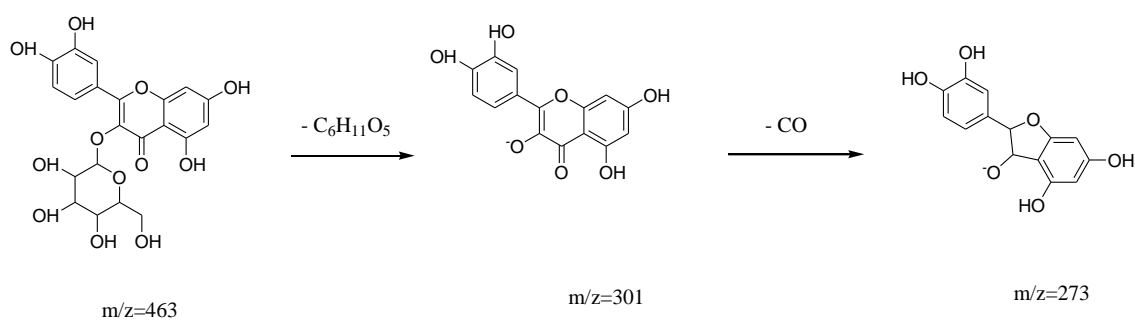
EBMN\_NEG\_03092019 #4177 RT: 21,35 AV: 1 NL: 3,31E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 463,00@cid30,00 [125,



Fonte: do autor

O composto do pico 4 foi identificado como sendo a Isoquercitrina, com o íon em  $m/z$  463 e fragmentos em  $m/z$  301 através de perda de massa, 300 e 273, sendo o último representando a provável perda de CO como mostra o mecanismo da figura 11.

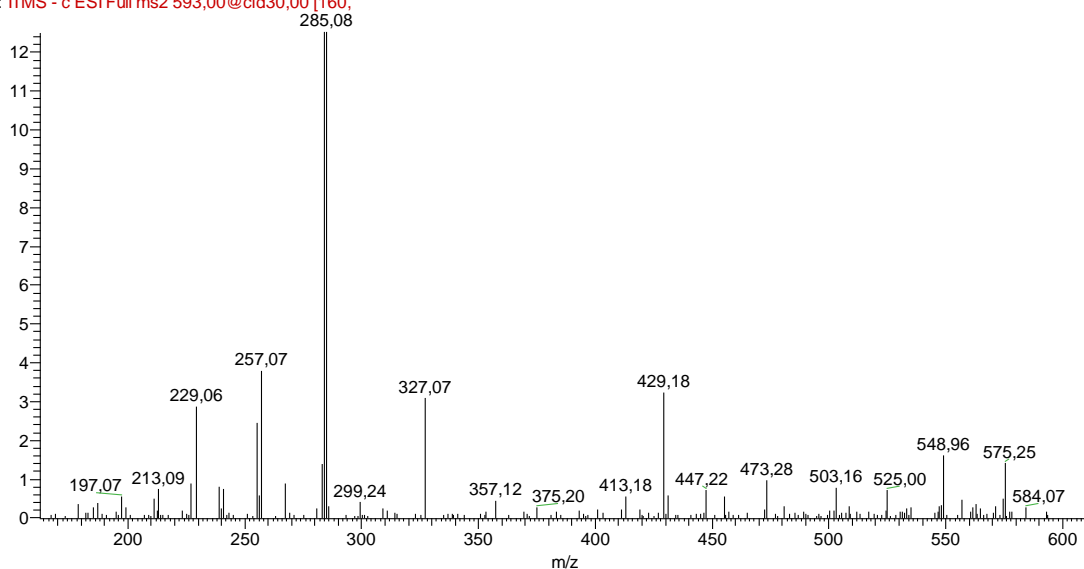
Figura 11-Mecanismo de fragmentação proposto para a Isoquercitrina



Fonte: do autor

Figura 12-Espectro de massa de primeira ordem para o Kampferol 3-O-rutinosídeo (5)

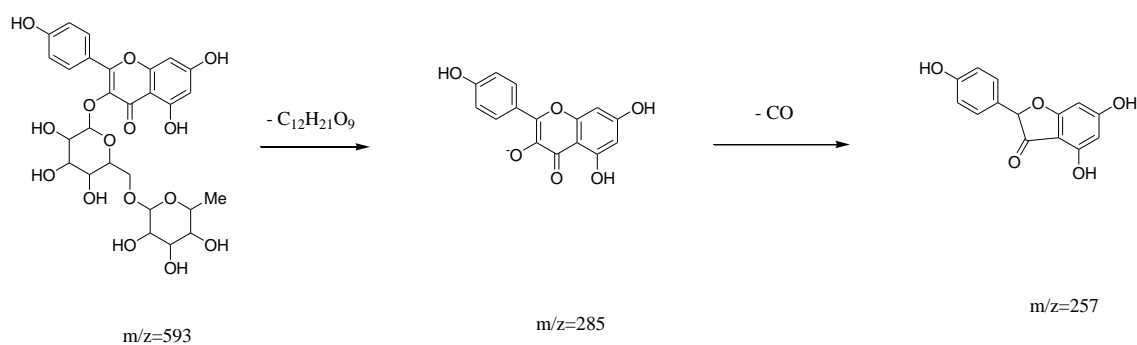
EBMN\_NEG\_03092019 #2045 RT: 10,94 AV: 1 NL: 2,89E3  
F: ITMS - c ESI Full ms2 593,00@cid30,00 [160,



Fonte: do autor

Para o composto do pico 5, com íon em  $m/z$  593, foi proposto como sendo o Kampferol 3-O-rutinosídeo, o mesmo apresenta um pico base em  $m/z$  285 que corresponde a uma grande perda de massa, um sinal em  $m/z$  284 que sugere a perda de um próton e em  $m/z$  257 que sugere a perda de CO, como segue no mecanismo proposto.

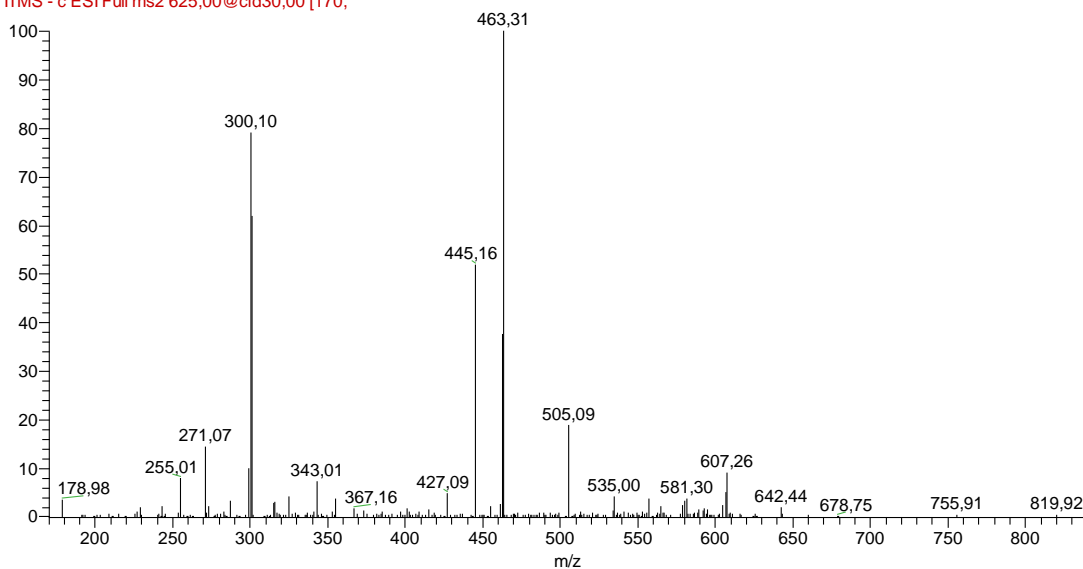
Figura 13-Mecanismo de fragmentação proposto para o Kampferol 3-O-Rutinosídeo



Fonte: do autor

Figura 14- Espectro de massa de primeira ordem para a Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -glucopiranosídeo (6)

EBMN\_NEG\_03092019 #1409 RT: 7,90 AV: 1 NL: 6,46E2  
F: ITMS - c ESI Full ms2 625,00@cid30,00 [170,

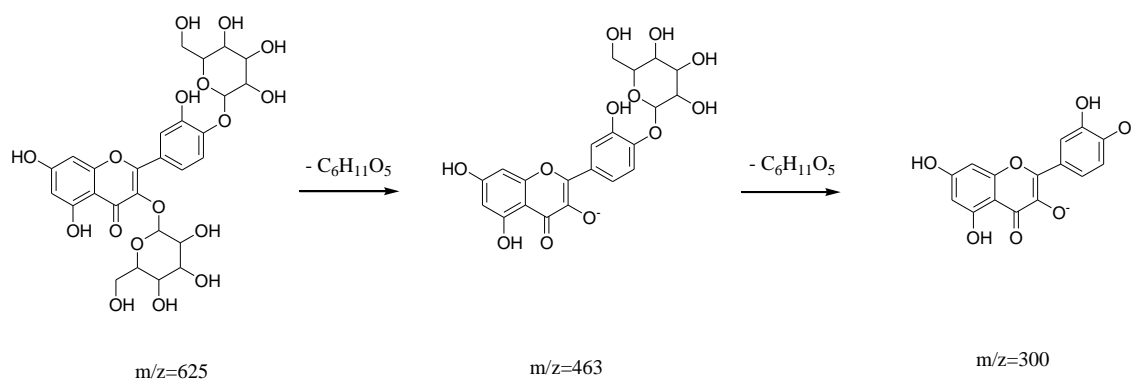


Fonte: do autor



Por fim, para o composto do pico 6, com íon em  $m/z$  625, foi proposto como sendo Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -glucopiranosídeo, o mesmo apresenta um pico base em  $m/z$  463 e outro sinal em  $m/z$  300, ambos correspondem à perda de grupos iguais como mostra o mecanismo de fragmentação proposto.

Figura 15- Mecanismo de fragmentação proposto para o composto Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -Glucopiranosídeo



Fonte: do autor

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foi possível a obtenção do extrato hidroetanólico e a caracterização de 6 compostos, realizada por HPLC – MS. Os principais compostos detectados no extrato foram identificados como ácidos fenólicos e flavonoides, sendo eles: Ácido Quínico, Ácido Clorogênico, Kaempferol-3-O-Glucosídeo, Isoquercitrina, Kaempferol 3-O-Rutinosídeo e Quercetina-3,4'-O-di- $\beta$ -Glucopiranosídeo. O presente trabalho, destaca a importância da produção de extratos padronizados, pois representa um campo em expansão. O processo de padronização de extratos vegetais é de extrema importância pois garante a eficácia de produtos naturais através de diversos parâmetros de controle de qualidade de todas as etapas que envolvem a produção de um medicamento fitoterápico. Destaca-se ainda a potencial aplicação de extratos padronizados de *Morus nigra* como fonte de diversos fitoquímicos para projeção de novos medicamentos de combate aos sintomas do climatério.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1]. BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução da Diretoria Colegiada n. 48, de 16 de março de 2004. Regulamenta o registro de produtos fitoterápicos no Brasil, Diário Oficial da União; Poder Executivo, Brasília, 18 de março de 2004.

[2]. BRASIL, Ministério da Saúde, Proposta de política nacional de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, 1º ed., 2001.

[3]. BUTLER, M.S. Natural products to drugs: natural product-derived compounds in clinical trials. *Natural Product Reports*, v. 25, p. 475-516, 2008.

[4]. DE SOUZA, M. M.; BITTAR, M.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A.; MESSANA, I.; DELLE MONACHE, F.; FERRARI, F. Antinociceptive properties of morusin, a prenylflavonoid isolated from *Morus nigra* root bark. *Z Naturforsch C*, 55: 256-60, 2000.

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

[6]. FELTRIN, E. P.; CHORILLI, M. Extratos secos padronizados: tendência atual em fitoterapia. *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologia da Saúde*, v. 7, n. 1, p. 109-115, 2010.

[7]. FRANZOTTI, Elaine Maria. Identificação de agonistas e antagonistas de receptores nucleares em extratos de plantas medicinais: morus nigra L., plectranthus ornatus codd., ipomoea cairica (L) sweet e pouteria torta (mart.) radlk. 2006. 108 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde)-Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

[8]. HASSIMOTTO, N. M.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Absorption and metabolism of cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside extracted from wild mulberry (*Morus nigra* L.) in rats. *Nutr Res*, 28: 198-207, 2008.

[9]. INTERAGENCY TAXONOMIC INFORMATION SYSTEM - ITIS. Disponível em:

[https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=19069#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=19069#null). Acesso em: 07 de Setembro 2019.

LORENZI, HARRI. SOUZA, HERMES MOREIRA, et al. Árvores exóticas do Brasil: madeiras, ornamentais e aromáticas. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2003.

[10]. MAZIMBA, O.; MAJINDA, R. R. T.; MOTLHANKA, D. Antioxidant and antibacterial constituents from *Morus nigra*. African Journal of Pharmacy and Pharmacology, 5: 751-4, 2011.

[11]. MIRANDA, M. A.; VIEIRA, D. G.; ALVES, M. S.; YAMAMOTO, C. H.; DE PINHO, J.J. R. G.; DE SOUSA, V. O. Uso etnomedicinal do chá de *Morus nigra* L. no tratamento dos sintomas do climatério de mulheres de Muriaé, Minas Gerais. Brasil. HU Revista (UFJF. Impresso), 36: 61-8, 2010.

[12]. MOREIRA, L. Q.; PADILHA, M. M.; MORAIS F. F.; ARAÚJO T. H.; SILVA G. A. Estudo farmacobotânico das folhas de amoreira-preta, *Morus nigra* L., Moraceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, Volume 20, No. 4, Páginas 621-626, Agosto-Setembro, 2010.

[13]. PADILHA, M. M.; VILELA, F. C.; ROCHA, C. Q.; DIAS, M. J.; SONCINI, R.; DOS SANTOS, M. H.; ALVES-DA-SILVA, G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. Phytother Res, 24: 1496-500, 2010.

[14]. SHULAMMITHI R, SHARANYA M, TEJASWINI R, KIRANMAI M. Standardization and quality evaluation of herbal drugs. IOSR J Pharm Biol Sci 2016;11:89-100.

[15]. VANONI, ANA PAULA NUNES BITENCOURT. Avaliação da atividade fitoestrogênica do extrato hidroalcoólico e da infusão das folhas de *Morus nigra* L. Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2006. Disponível em: <<https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/8621>>. Acesso em: 27 de setembro de 2019.

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