



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MATÉRIA-PRIMA
VEGETAL, EXTRATO SECO E CÁPSULAS DE GELATINA DURA CONTENDO
EXTRATO SECO DE *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC.**

ORIENTANDA: Susana A. Griebeler

ORIENTADOR: Prof. Dr. George González Ortega

PORTO ALEGRE, JUNHO DE 2005.

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

**VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA MATÉRIA-PRIMA
VEGETAL, EXTRATO SECO E CÁPSULAS DE GELATINA DURA CONTENDO
EXTRATO SECO DE *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC.**

Dissertação apresentada por **Susana
A. Griebeler** para obtenção do
GRAU DE MESTRE em Ciências
Farmacêuticas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. George González Ortega

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 17 de junho de 2005, perante a Comissão Examinadora constituída por:

Prof.^a Dra. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Maragareth Linde Athayde
Universidade Federal de Santa Maria

Prof. Dr. Martin Steppe
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

G848v	<p>Griebeler, Susana A. Validação de metodologia analítica para matéria-prima vegetal, extrato seco e cápsulas de gelatina dura contendo extrato seco de <i>Uncaria tomentosa</i> (Willd) DC./ Susana A. Griebeler – Porto Alegre: UFRGS, 2005.- xvi, 107 p.: il., tab., gráf.</p> <p>Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.</p> <p>1. <i>Uncaria tomentosa</i>. 2. Rubiaceae. 3. Alcalóides. 4. Flavonóides. 5. Métodos espectrofométricos. 6. Cromatografia líquida de alta eficiência. 7. Validação: métodos analíticos. I. Gonzáles Ortega, George. II. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 615.2.074:547.94</p>
-------	--

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. George González Ortega, pela orientação e pelo exemplo de postura ética e profissional.
- Aos demais professores desta faculdade, pelos ensinamentos transmitidos.
- Aos funcionários do Laboratório Tiaraju Ltda, pelo incentivo e compreensão durante minha ausência e à direção, pelo apoio financeiro e exemplo de determinação e empreendedorismo.
- Aos amigos e colegas de Mestrado, Gabriela Gonçalves, Fernanda Gasparotto, Maria das Graças, Silvana Casal, Eneida Leite, Leandro Lozano e Carlos Praes, pelo convívio e, em especial, à Josélia Manfio, pela eterna amizade e apoio em todos os momentos.
- Ao Cabral Pavei, Francilene Amaral e Angélica Couto, pela contribuição na parte experimental deste trabalho.
- Ao Anderson, pelo amor e companheirismo.
- À minha família, pela compreensão e apoio sempre presentes.
- À minha afilhada Lauren H. Lefle, pelo exemplo de luta e superação.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, com suporte financeiro da empresa Laboratório Químico e Farmacêutico Tiaraju Ltda., no marco regimental do Mestrado Profissionalizante em Produção e Controle de Qualidade de Produtos Farmacêuticos PPGCF-UFRGS.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	1
2. OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos Específicos.....	7
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	9
3.1. Aspectos Botânicos.....	11
3.2. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos.....	12
3.3. Aspectos Farmacológicos.....	14
3.4. Aspectos Fitoquímicos.....	17
3.5. Toxicidade.....	18
3.6. Controle de Qualidade.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
4.1. Material.....	25
4.1.1. Matérias-Primas.....	25
4.1.2. Solventes, soluções e reagentes.....	25
4.1.3. Aparelhagem e Equipamentos.....	26
4.2. Métodos.....	26
4.2.1. Identificação botânica da droga rasurada.....	26
4.2.2. Obtenção da droga vegetal seca moída (DVSM).....	27
4.2.2.1. Identificação e caracterização da DVSM.....	27
4.2.3. Obtenção e caracterização da solução extrativa e do extrato seco liofilizado.....	33
4.2.3.1. Preparação da solução extrativa.....	33
4.2.3.1.1. Caracterização da solução extrativa.....	34
4.2.3.2. Obtenção do extrato seco liofilizado.....	35
4.2.3.2.1. Caracterização do extrato seco liofilizado.....	35

4.2.4.	Caracterização do extrato seco comercial (ESC).....	39
4.2.4.1.	Análise granulométrica.....	39
4.2.4.2.	Determinação da perda por dessecação.....	39
4.2.4.3.	Análise por cromatografia em camada delgada.....	39
4.2.5.	Preparação e caracterização das cápsulas contendo ESC.....	43
4.2.6.	Validação de métodos analíticos.....	44
4.3.	Elaboração de fluxograma de des envolvimento de fitoterápico monodroga.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1.	Caracterização do Extrato Seco Comercial (ESC).....	50
5.1.1.	Características macroscópicas.....	50
5.1.2.	Análise granulométrica do ESC.....	50
5.2.	Identificação e Controle de Qualidade para o E xtrato Seco Comercial (ESC).....	52
5.2.1.	Estabelecimento de critérios de identificação baseados na droga vegetal seca moída (DVSM).....	53
5.2.1.1.	Análise por cromatografia em camada delgada da DVSM e do ESC.....	53
5.2.1.2.	Análise granulométrica da DVSM.....	59
5.2.1.3.	Determinação do teor de umidade residual.....	60
5.2.1.4.	Determinação do teor de extrativos.....	61
5.2.1.5.	Determinação do teor de flavonóides.....	61
5.2.1.6.	Determinação do teor de alcalóides para a DVSM.....	65
5.3.	Doseamento do Teor de Fl avonóides e Alcalóides para o ESC.....	66
5.3.1.	Determinação da perda por dessecação do ESC.....	66
5.3.2.	Determinação do teor de flavonóides do ESC.....	66
5.3.3.	Determinação do teor de alcalóides do ESC.....	67
5.3.4.	Resultados de outros testes realizados sobre o ESC (ESC).....	68
5.4.	Validação do método de det erminação do teor de al calóides por espectrofotometria UV.....	68
5.4.1.	Determinação do comprimento de onda de leitura.....	69
5.5.	Determinação do Teor de Alcalóides por Cromatografia Líquida	72

	de Alta Eficiência.....	
5.5.1.	Validação do método por CLAE.....	73
5.5.1.1.	Curva de calibração para substância de referência.....	73
5.5.1.2.	Teste de repetibilidade para o método de CLAE aplicado ao ESC.....	75
5.5.1.3.	Teste de exatidão para o método de CLAE aplicado ao ESC.....	76
5.5.1.4.	Teste de robustez para o método de CLAE aplicado ao ESC	77
5.6.	Validação do sistema cromatográfico.....	79
5.7.	Padronização do Extrato Liofilizado.....	79
5.7.1.	Caracterização da solução extrativa.....	79
5.7.2.	Caracterização do extrato liofilizado.....	80
5.8.	Estudo preliminar de estabilidade do ESC.....	83
5.9.	Cápsulas contendo ESC de <i>Uncaria tomentosa</i>	84
5.10.	Fluxograma de Desenvolvimento de Metodologia de Análise.....	85
6.	CONCLUSÕES.....	89
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	ANEXOS.....	102

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Espécies do gênero <i>Uncaria</i> e seus respectivos usos populares.....	13
TABELA 2.	Principais referências bibliográficas sobre aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos relativos às espécies <i>tomentosa</i> e <i>guianensis</i>	14
TABELA 3.	Principais atividades farmacológicas relatadas para <i>Uncaria tomentosa</i>	17
TABELA 4.	Alcalóides da <i>Uncaria tomentosa</i> DC.....	18
TABELA 5.	Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização da droga vegetal seca moída (DVSM).....	28
TABELA 6.	Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização da DVSM.....	29
TABELA 7.	Condições experimentais de obtenção do produto seco liofilizado.....	35
TABELA 8.	Condições experimentais do método isocrático por CLAE.....	43
TABELA 9.	Análise granulométrica do extrato seco comercial (ESC), por microscopia óptica.....	51
TABELA 10.	Valores de R _f e cores das manchas observadas por CCD para os alcalóides, usando sistema SV e revelador de Dragendorff.....	57
TABELA 11.	Valores de R _f e cores das manchas observadas por CCD para flavonóides usando Sistema X.....	59
TABELA 12.	Análise granulométrica da DVSM, mediante uso de tamises.....	60
TABELA 13.	Teor de flavonóides totais (TFT) da DVSM, determinado pelos métodos espectrofotométricos com hidrólise e sem hidrólise.....	63
TABELA 14.	Teor de alcalóides totais da DVSM, determinado por espectrofotometria, com método por extração ácido-base e com método por extração metanólica.....	65
TABELA 15.	Determinação espectrofotométrica do teor de flavonóides totais (TFT) do ESC pelos métodos com e sem hidrólise.....	67
TABELA 16.	Determinação espectrofotométrica do teor de alcalóides totais para o ESC.....	67

TABELA 17.	Comparação dos testes declarados pelo fornecedor para o ESC, com os resultados relatados no presente trabalho.....	68
TABELA 18.	Valores referentes à curva padrão da isomitrafalina, em 285nm..	69
TABELA 19.	Valores referentes à análise de regressão linear para isomitrafalina, em 285nm.....	70
TABELA 20.	Resultados do teste de precisão intermediária interdias para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm.....	70
TABELA 21.	Resultados do teste de recuperação para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm.....	71
TABELA 22.	Resultados do teste de robustez para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm.....	72
TABELA 23.	Curva de calibração por CLAE para a isomitrafalina.....	74
TABELA 24.	Parâmetros utilizados na validação da linearidade do método por CLAE.....	75
TABELA 25.	Resultados da precisão intermediária do ESC pelo método de CLAE, no 1º e 2º dias de análise.....	76
TABELA 26.	Resultados do teste de exatidão do ESC pelo método de CLAE.....	77
TABELA 27.	Resultados do teste de robustez do ESC pelo método de CLAE.....	78
TABELA 28.	Parâmetros de validação do sistema de separação por CLAE, tendo como referência o pico assinalado para a isomitrafalina....	79
TABELA 29.	Densidade e pH da solução extrativa, obtida com uma proporção droga:solvente de 1:10 (m/v).....	80
TABELA 30.	Resultado da perda por dessecação do liofilizado.....	80
TABELA 31.	Resultado da determinação do teor de flavonóides totais com e sem hidrólise do liofilizado, pelo método espectrofotométrico.....	81
TABELA 32.	Resultado da determinação do teor de alcalóides totais do extrato liofilizado utilizando método espectrofotométrico.....	81
TABELA 33.	Resultado da determinação do teor de alcalóides totais da DVSM, Liofilizado e ESC utilizando método espectrofotométrico.....	82
TABELA 34.	Resultado da determinação do teor de flavonóides totais da DVSM, Liofilizado e ESC.....	83
TABELA 35.	Determinação do peso médio das cápsulas.....	84

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Aspectos das partes aéreas da espécie <i>Uncaria tomentosa</i> DC.....	12
FIGURA 2.	Alcalóides oxindólicos pentacíclicos relatados na literatura para a espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	19
FIGURA 3.	Distribuição granulométrica do extrato seco comercial (ESC), expressa em termos percentual e percentual acumulado.....	51
FIGURA 4.	Aspecto macroscópico da DVSM adquirida no comércio como “casca de <i>Uncaria tomentosa</i> ”.	54
FIGURA 5.	Cromatograma de <i>Uncaria tomentosa</i> para alcalóides.....	56
FIGURA 6.	Cromatograma de <i>Uncaria tomentosa</i> para flavonóides.....	58
FIGURA 7.	Análise granulométrica da DVSM em Termos de fração retida percentual (FrR%)e fração de passagem percentual (FrP%).....	61
FIGURA 8.	Espectro de varredura UV-VIS para a solução de leitura da DVSM hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como branco a mesma solução sem cloreto de alumínio.....	64
FIGURA 9.	Espectro de varredura UV-VIS para a solução de leitura da DVSM não hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como branco a mesma solução sem cloreto de alumínio.....	64
FIGURA 10.	Cromatograma da separação dos alcalóides de ESC de <i>Uncaria tomentosa</i> por CLAE.....	73
FIGURA 11.	Curva de calibração para a substância de referência isomitrafalina, com a respectiva equação da reta obtida por regressão linear.....	74
FIGURA 12.	Doseamento dos alcalóides totais do liofilizado por CLAE.....	82
FIGURA 13.	Perfil dos alcalóides do ESC após exposição à luz UVC por 90 dias.....	84
FIGURA 14.	Cromatograma de ESC, após a exposição de 90 dias, das cápsulas à estabilidade térmica.....	85
FIGURA 15.	Fluxograma de Desenvolvimento.....	88

RESUMO

A espécie *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae) é reconhecida por diversos povos sul-americanos, devido a sua importância etnofarmacológica. Na sua maioria, os estudos realizados com *U. tomentosa* empregam como matéria prima vegetal a casca, devido à fração rica em alcalóides. Entre os constituintes químicos relatados para a espécie destacam-se os flavonóides, triterpenos e alcalóides, aos quais é atribuído um número significativo de propriedades terapêuticas. A escassez de metodologias analíticas para o doseamento do teor de alcalóides de *U. tomentosa* motivou a realização do presente trabalho, que visa à validação de metodologia analítica para matéria prima vegetal (DVSM), extrato seco (ESC) e cápsulas contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa* DC. O estudo propôs a utilização de metodologia espectrofotométrica e cromatográfica para a quantificação de teores totais de alcalóides. Para fins de identificação da espécie foram utilizados métodos cromatográficos por CCD, preconizados para flavonóides e alcalóides. O perfil por CCD encontrado para a DVSM, liofilizado e ESC foi diferente do relatado na bibliografia. O teor de alcalóides do extrato seco comercial (ESC), utilizando método espectrofotométrico foi de 8,41 mg/g, apresentando uma taxa de recuperação de 100,45%. Paralelamente, foi desenvolvido e validado um método de análise por CLAE para o ESC, que permitiu a quantificação da fração alcaloídica, expressa como isomitrafalina. O teor de alcalóides totais encontrado foi de 14,58 mg/g e apresentou taxa de recuperação de 99,95 a 100,44%. No teste de robustez do método analítico por CLAE, o ESC apresentou variações significativas com a variação do pH e da temperatura. O ESC contido em cápsulas de gelatina foi testado quanto à estabilidade térmica, por um período de 90 dias, a 50 ± 2 °C e 90 ± 5 % de umidade relativa. O perfil de alcalóides totais foi obtido por CLAE e ao ser comparado com o ESC, não exposto a condições extremas, apresentou teores equivalentes, porém, com mudança no perfil da fração alcaloídica, o que pode caracterizar produtos de degradação. Um perfil similar foi observado quando o ESC foi exposto à luz UVC por 90 dias.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*, casca, extratos, alcalóides, flavonóides, métodos espectrofotométricos, CLAE, estabilidade.

ABSTRACT

VALIDATION OF ANALYTICAL METHODS FOR THE ANALYSIS OF THE *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC RAW MATERIAL, DRIED EXTRACT AND GELATIN HARD CAPSULES CONTAINING IT

Uncaria tomentosa DC (Rubiaceae; cat's claw) is a climbing bush widespread in the tropical South American countries, in which its ethnopharmacological importance is largely recognized. The main phytochemical studies on *U. tomentosa* revealed a meaningful alkaloid fraction in its aerial parts and especially on its bark. Besides that, other relevant components were also isolated from its bark, including flavonoids and triterpenes, to which several pharmacological properties were formerly ascribed. Notwithstanding the crescent importance in the research of novel drugs, it is to denote the lack of official and validated analytical methods intended for the determination of the alkaloids content in *U. tomentosa*. Thus, the aim of this work was the development and validation of analytical method which allow the analysis and content determination of the main alkaloids in the vegetal raw material (DVSM), a commercial dry extract as well as in gelatin hard capsules containing it. For this purpose, a spectrophotometric method and a chromatographic one were developed and afterwards validated. In both cases the total alkaloids content was expressed as isomitraphiline (reference standard). The identification by CCD analysis was carried out on basis to several methods related earlier in the literature for flavonoids and alkaloids. In general, the comparison from CCD profiles of genuine samples of *U. tomentosa* bark depicted in the literature, DVSM, dry extract and ESC profiles led to partial dissimilar results, which reinforce the need of additional efforts in this way. The alkaloids content calculated spectrophotometrically for the commercial dry extract (ESC) was 8,41 mg/g, with a recover of 100,45%. For the HPLC method, the total alkaloids content correspond to the sum of the area under the peaks previously characterized as alkaloids. The alkaloids content calculated for the same extract by HPLC was 14.58 mg/g, with a recover rate of 99,95 to 100,44%. The method as a whole fulfills the usual ICH validation requirements. The stability test under stress conditions of pH and temperature for the ESC presented a significant variation of the individual area of some peaks. The original peaks assigned to isomitraphiline, pteropodine and isopteropodine showed a decrease in intensity and a concomitant appearance of new peaks, originated from breakdown process presumably.

A similar profile was observed by exposing ESC samples to the wave short UV radiation during 90 days. There are also evidences in favor of degradation signals in non-treated ESC samples.

KEY WORDS: Uncaria tomentosa, bark, extracts, flavonoids, spectrophotometric methods, CLAE, validation, stability.

1. INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

O uso de fitoterápicos revelou um aumento a partir dos anos setenta em diversos países ocidentais, entre eles os EUA, França e Alemanha, o qual também tem se refletido no Brasil. Este fenômeno pode ser atribuído a vários fatores, entre os quais, o custo elevado que o tratamento pela medicina *oficial* vem representando para alguns segmentos da sociedade menos favorecidos, a consolidação de técnicas analíticas e o fortalecimento da tecnologia farmacêutica dos fitofármacos, no âmbito nacional (ELISABETSKY, 1987).

A legislação sobre plantas medicinais e produtos fitoterápicos é objeto de discussão em quase toda a América Latina. A legislação brasileira define como medicamento fitoterápico “todo produto tecnicamente obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, com finalidade profilática, curativa ou para fins de diagnóstico, com benefício para o usuário”. Através da Resolução – RDC nº 17/2000, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) estabeleceu normas específicas para o registro de medicamentos fitoterápicos, classificando-os como medicamento fitoterápico novo, similar ou tradicional.

Com vistas para este cenário, a indústria farmacêutica de fitoterápicos vem procurando se adequar às novas tendências mediante o desenvolvimento de produtos que reflitam os avanços científico-tecnológicos, inerentes ao reconhecimento dos fitoterápicos como medicamento. Junto com essa expansão no arsenal terapêutico brasileiro, cresce também a preocupação com as condições que assegurem a qualidade dos produtos e insumos fitoterápicos através de técnicas modernas e eficientes (SILVA, 1999). Um dos primeiros passos para garantir a qualidade é a validação dos métodos analíticos aplicados ao controle das matérias-primas, produtos intermediários e produto final (PETRY, 1999), a qual é inerente ao desenvolvimento e otimização do próprio método analítico.

As principais dificuldades encontradas no desenvolvimento, otimização e validação de métodos analíticos são a necessidade de estes apresentarem especificidade e a própria escassez de metodologia analítica validada ou oficial que sirva como método de referência para o desenvolvimento de outros métodos, novos ou alternativos. Alia-se a isto o fato de muitas substâncias utilizadas como

marcadores, presentes ou não no farmacógeno, não serem, necessariamente aquelas responsáveis pela ação farmacológica pretendida (ORTEGA, 1993). Essa última situação é bastante freqüente no caso das plantas medicinais originadas da tradição etnofarmacológica dos povos indígenas sul-americanos e que fazem parte, de forma isolada ou em associação, da composição de diversos fitoterápicos.

Entre as plantas medicinais advindas da herança sociocultural encontra-se *Uncaria tomentosa* DC. (unha-de-gato) (SIMÕES e c ol., 2003). Os Incas beneficiaram-se dos princípios ativos da unha-de-gato e a usaram no tratamento de artrite, gastrite, reumatismo e inflamações em geral. No Brasil é utilizada também em pacientes imunodeprimidos, tendo sido registrado por laboratórios de produtos naturais, como medicamento imunoestimulante. Contudo, não se tem conhecimento de estudos analíticos aprofundados e/ou validados destinados ao doseamento dos princípios ativos (REINHARD, 1999).

O presente trabalho de dissertação objetiva ao desenvolvimento e à validação de metodologia analítica aplicados à matéria-prima de origem vegetal, ao extrato seco e às cápsulas duras de gelatina contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa* DC.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver e validar métodos analíticos para matéria-prima de origem vegetal, extrato seco e cápsulas duras de gelatina contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa* DC.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Estabelecer critérios de identificação e de caracterização por métodos cromatográficos (CCD e CLAE) para a espécie *Uncaria tomentosa* DC e do farmacógeno (casca), tendo como referência os perfis cromatográficos das frações alcaloídica e flavonoídica;
- b) Estabelecer e padronizar um método de extração, selecionando um sistema líquido de extração que priorize a extração dos alcalóides, visando à preparação de amostras liofilizadas para fins analíticos;
- c) Desenvolver e validar método espectrofotométrico no ultravioleta para a determinação do teor de alcalóides totais e da fração alcaloídica presentes na matéria-prima, no extrato seco obtido comercialmente e em cápsulas duras de gelatina contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa*;
- d) Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para a determinação do teor de alcalóides na matéria-prima, no extrato seco e em cápsulas contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa*;
- e) Realizar testes preliminares de estabilidade térmica e por luz UVC, com o intuito de estabelecer critérios que indiquem processos de degradação para os principais alcalóides detectados por CLAE;
- f) Propor uma metodologia geral para o estabelecimento de protocolos de validação de métodos analíticos similares, a serem adotados pela indústria patrocinadora da mestranda.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Aspectos Botânicos

Uncaria tomentosa DC. é uma espécie nativa da floresta Amazônica e de outras regiões tropicais da América do Sul e Central, pertencente à família *Rubiaceae*, gênero *Uncaria*. Este gênero reúne cerca de 50 a 60 espécies (ALONSO, 1998). É um arbusto trepador, que cresce apoiado a outras árvores, podendo atingir até 30 m de comprimento.

Apresenta folhas pecioladas, pareadas, ovais ou oblongas acuminadas, de consistência membranosa, de coloração verde claro com presença de estípulas interpeciolares e espinhos axilares maciço-lenhosos levemente curvados. Os talos finais são felpudos; na base dos ramos há um par de espinhos em forma de esporão, de uns dois cm de comprimento. As inflorescências são esféricas de 1,5 a 2 cm, pedunculadas sozinhas, ou às vezes em ramos que nascem nas axilas da base dos pecíolos. As flores são numerosas e pequenas, com ausência total de pêlos e sem pecíolos. O pedicelo é curto; o cálice e a corola são tubulares (PEÑA e col., 1998).

Os frutos são cápsulas unidas, bicarpelares. As sementes são em forma de asa, bicaudadas e numerosas (PEÑA e col., 1998). Seu caule tem textura fibroso-laminar, coloração mesclada de marrom avermelhado e creme, tem a peculiaridade de armazenar água para satisfazer suas próprias necessidades vitais. As raízes são cilíndricas e tem segmentos papilosos (ALONSO, 1998; figura 1).

O nome vem da semelhança de seus espinhos com as unhas do gato, sendo conhecida em diversos países através de nomes populares, tais como *cat's claw*, *uña-de-gato*, *paraguayo*, *garabato*, *garbato-casha*, *tambor-huasca*, *uña-huasca*, *uña-de-gavilán*, *hawk's claw*, *saventaro*, *cipó-de-gato* e *arranha-gato* (KEPLINGER e col., 1999).



Figura 1. Aspectos das partes aéreas da espécie *Uncaria tomentosa* DC. (ALONSO, 1998).

3.2. Aspectos Etnobotânicos e Etnofarmacológicos

O gênero *Uncaria* apresenta algumas espécies com uso referenciado na medicina tradicional de diversos países (tabela 1). No Brasil, a *Uncaria tomentosa* é recomendada na medicina popular como analgésico, antiinflamatório, antitumoral, antiviral, citoprotetor, citostático, depurativo e diurético (DUKE e col., 1994). Na Colômbia, ainda é usada em casos de disenteria e gonorréia (LAUS e col., 1994). Algumas comunidades indígenas peruanas, além de alguns dos usos acima, utilizam a *Uncaria tomentosa* como contraceptivo, anti-hemorrágico e antiasmático (KEPLINGER e col., 1999).

Tabela 1. Espécies do gênero *Uncaria* e seus respectivos usos populares.

Espécie	Uso popular
<i>Uncaria gambir</i>	Antidiarréica
<i>Uncaria perrottetti</i>	Antioxidante
<i>Uncaria sinensis</i>	Antitérmica
<i>Uncaria homomalla</i>	Depurativo do sangue
<i>Uncaria longiflora</i>	Anti-reumática e hipotensora
<i>Uncaria rynchophylla</i>	Antioxidante e inibidora da agregação plaquetária
<i>Uncaria guianensis</i>	Antiinflamatória

Fonte: Reinhard, 1999

Unha-de-gato consta no Catálogo de Plantas Úteis da Amazônia Peruana (MINISTERIO DE EDUCACIÓN, 1995), onde são relacionados usos no tratamento das inflamações da pele e das mucosas (abscessos cutâneos, úlceras gástricas, gonorréia, inflamações urinárias), de dores articulares (artrite, reumatismo, dores nos membros), distúrbios hepáticos e digestivos (colite, cirrose, diarreia, disenteria) e como estimulante geral.

De todas as espécies do Gênero *Uncaria*, a *U. tomentosa* e *U. guianensis* são as espécies com o maior número de ocorrências nas literaturas etnobotânica e etnofarmacológica (tabela 2).

Dentre as atividades relatadas para as espécies do gênero *Uncaria*, destacam-se as potenciais atividades imunomoduladoras, antimutagênicas, antiinflamatórias, antivirais, depressoras do sistema nervoso central e diuréticas (ALONSO, 1998).

Tabela 2. Principais referências bibliográficas sobre aspectos etnobotânicos e etnofarmacológicos relativos às espécies *tomentosa* e *guianensis*.

Espécie estudada	Autor e data da pesquisa
<i>Uncaria tomentosa</i>	Hemingway e Phillipson, 1974; Phillipson e col., 1975; Montenegro e col., 1976; Cerri e col., 1988; Aquino e col., 1990; Rizzi e col., 1993; Keplinger e col., 1994.
<i>Uncaria guianensis</i>	Hemingway e Phillipson, 1974; Phillipson e col., 1975; Montenegro e col., 1976; Wagner e col., 1985.

Cabe citar que vários autores acreditam na determinação de algumas das informações etnofarmacológicas, uma vez que a diferenciação botânica entre as espécies *U. tomentosa* e *U. guianensis* é tida como problemática, pela sua semelhança morfológica.

3.3. Aspectos Farmacológicos

Entre os primeiros estudos farmacológicos de *U. tomentosa* relata-se uma atividade antiinflamatória moderada, associada à fração rica em esteróis, principalmente, β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (SENATORE e col., 1989). Posteriormente, essa atividade foi relacionada aos heterosídeos do ácido quinóico e aos alcalóides. Um extrato rico em heterosídeos mostrou atividade antiinflamatória por via oral, usando o modelo do edema de pata induzido por carragenina em ratas, produzindo uma inibição de 87,2% com doses de 0,16 mg/kg. Porém, na atualidade os dados farmacológicos disponíveis parecem indicar que essa atividade biológica é devida à ação sinérgica de diversos compostos presentes na mesma (AQUINO e col., 1991).

Com relação aos processos inflamatórios, sabe-se que os radicais livres e o estresse oxidativo são fatores importantes no desenvolvimento de artrite e de outros processos inflamatórios do tipo crônico. Portanto, as substâncias que modificam a produção desses fatores e que, conseqüentemente, reduzem o grau de lesão dos

tecidos, serão efetivas no combate à inflamação (QUINTERA e col., 2003). Nesse sentido, estudos *in vitro* recentemente publicados revelaram que os extratos aquoso e hidroalcoólico de cascas do caule de *U. tomentosa* possuem propriedades antiinflamatórias relacionadas com a inibição da produção do fator necrosante alfa (TNF-alfa), principal agente inflamatório envolvido em distúrbios digestivos e artríticos, e tido como responsável pelo seqüestro de radicais livres (SANDOVAL e col., 2000). Do mesmo modo, o extrato das cascas de caule de *U. tomentosa* demonstrou capacidades inibitórias da produção do fator necrosante Kappa-B e de proteção celular perante o estresse oxidativo (SANDOVAL e col., 2000).

Foi demonstrado que extratos de *U. tomentosa* também reduzem a produção de prostaglandina E₂, nos macrófagos estimulados com lipopolissacarídeos, sugerindo uma inibição da expressão da 2-ciclooxigenase. Tanto o extrato etanólico quanto o extrato aquoso inibiram de forma moderada a 1-ciclooxigenase e a 2-ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), porém o extrato aquoso foi mais efetivo sobre a COX-1, enquanto que o extrato etanólico o foi na inibição da COX-2 (AGUILAR e col., 2002).

Recentemente, um estudo duplo-cego com 40 pacientes com artrite reumatóide mostrou uma evolução muito favorável no grupo que recebeu extrato de *Uncaria tomentosa*, com redução significativa da dor articular e da rigidez matinal (MUR e col., 2002).

Da mesma forma, um estudo *in vitro* realizado com células sangüíneas, com o intuito de verificar a ação dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos de *U. tomentosa* sobre os linfócitos, mostrou que os alcalóides pentacíclicos são capazes de induzir um fator de regulação e proliferação de linfócitos. Os tetracíclicos, por sua vez mostraram-se antagonistas destes (WURM e col., 1998).

Alguns trabalhos realizados na Argentina demonstraram que os extratos metanólicos da casca da *U. tomentosa* e da *U. guianensis* apresentam compostos que intervêm na redução da lipoperoxidação e da formação de radicais livres induzidos por etanol, tetracloreto de carbono ou carragenina, assim como do efeito desses sobre as moléculas de DNA, em modelos experimentais *in vitro*. Os

resultados evidenciaram que este extrato apresenta atividade antioxidante em modelos que envolvem a oxidação dos lipídeos componentes de membranas celulares, assim como também prevenindo o dano oxidativo ao DNA (DESMARCHELIER e col., 1997).

Em estudos *in vitro* utilizando extratos de *U. tomentosa* foi observada uma ação inibitória de 90% sobre o crescimento de linhas de células humanas cancerosas. O resultado foi atribuído a uma ação reparadora do DNA, prevenindo a mutação de células e a diminuição do número de glóbulos brancos causados pelo tratamento por quimioterapia (RIZZI e col., 1993).

Nesse mesmo contexto, uma atividade antileucêmica foi relatada para ensaios *in vitro* utilizando alcalóides pentacíclicos de *U. tomentosa* em diferentes concentrações, durante sete dias. Mediante análise colorimétrica observou-se que o alcalóide uncarina mostrou ter o efeito antiproliferativo mais proeminente (KEPLINGER e col., 1999).

Um estudo realizado por Piscoya e col. (2001) comparou, *in vivo*, o efeito de extratos de *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis* em pacientes com osteoartrite de joelho. Os critérios dor e efeitos adversos foram analisados após a primeira, segunda e quarta semanas de tratamento. As inibições de TNF-alfa e de prostaglandinas foram determinadas pelo teste ELISA. Como conclusão o trabalho apresentou equivalência entre as espécies, sendo ambas efetivas como antioxidantes e antiinflamatórias.

Estudos mais recentes avaliaram os possíveis efeitos da *Uncaria tomentosa* sobre a hipertensão. O efeito hipotensor foi atribuído, provavelmente, à presença dos alcalóides rincofilina, hirsutina e mitrafilina, uma vez que os mesmos apresentaram atividade vasodilatadora (TAYLOR, 2002).

Uma relação das principais atividades farmacológicas relatadas para *U. tomentosa* encontra-se resumida na tabela 3.

Tabela 3. Principais atividades farmacológicas relatadas para *Uncaria tomentosa*

Atividade farmacológica	Referência
Imunoestimulante	Keplinger e col., 1994; Lemaire e col., 1999; Sheng e col., 2000.
Inibição do fator de necrose tumoral	Sandoval e col., 2000.
Antimutagênica	Rizzi e col., 1993.
Analgésica e antiinflamatória	Herrera e col., 1998.
Antiinflamatória	Sandoval-Chacon e col., 1998; Piscoya e col., 2001; Mur e col., 2002; Aguilar e col., 2002; Aquino e col., 1997.
Antioxidante	Desmarchelier e col., 1997; Sandoval e col., 2000

3.4. Aspectos Fitoquímicos

Uncaria tomentosa contém diversos metabólitos secundários bioativos. A casca de caule e as raízes apresentam uma composição química variada, indicando predomínio de compostos polifenólicos, ácidos orgânicos, alcalóides oxindólicos tetracíclicos e pentacíclicos, triterpenos, taninos e esteróis (AQUINO e col., 1990,1991; JONES, 1995).

Os flavonóides citados na literatura são rutina, cinchocinas A e B, e catequina (TAYLOR, 2002).

Entre os triterpenos isolados encontram-se os ácidos 19-hidroxiursólico, ursólico e oleanólico.

Os alcalóides oxindólicos são considerados marcadores bioquímicos de *U. tomentosa* e tidos, em parte, como responsáveis pela ação imunomoduladora e citostática (WAGNER e col., 1985; KEPLINGER e col., 1999; LAUS e col., 1994;

JONES, 1995; LEMAIRE e col., 1999). A presença de alcalóides oxindólicos é majoritária nas folhas e raízes (0,13 %), enquanto a casca de caule contém menos (0,015 %). Entre os alcalóides isolados encontram-se corinoxeína, corinanteína, hirsuteína, hirsutina, pteropodina, especiofilina, strictosidina, uncarinas A, D, E e F, diidrocoringanteína, mitrafilina, isomitrafilina, isopteropodina, rincofilina, isorotundifolina e rotundifolina (KEPLINGER e col., 1999; TAYLOR, 2002).

Os alcalóides pentacíclicos e tetracíclicos (tabela 4) apresentam-se nas folhas, cascas e raízes (KEPLINGER e col., 1999). Seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos são referenciados na literatura como os marcadores da unha-de-gato (figura 2).

Tabela 4. Alcalóides da *Uncaria tomentosa* DC.

Alcalóides pentacíclicos	Alcalóides tetracíclicos
pteropodina	rincofilina
isopteropodina	isorrincofilina
especiofilina	corinoxeína
uncarina	isocorinoxeína
mitrafilina	
isomitrafilina	

Fonte: Keplinger e col., 1999

3.5. Toxicidade

Ensaio biológico *in vitro* demonstram ausência de toxicidade da planta e de seus extratos, especificamente, através de testes conduzidos com células de ovário de hamster e com a bactéria *Photobacterium phosphoreum*. Nenhuma toxicidade foi detectada nos testes *Neutral red Assay* (NRA) e de proteínas totais (KB), tetrazólio MTT e Microtox (SANTA MARIA e col., 1997).

A toxicidade aguda (DL₅₀) e a dose máxima tolerada foram avaliadas em testes pré-clínico e clínico, em ratos tratados com extrato aquoso de *U. tomentosa*,

por via oral, em dose única. A DL₅₀ foi estabelecida em 8 g/kg de peso corporal, em ratos (SHENG e col., 2000). Nenhuma toxicidade foi observada com doses inferiores a 8 g/kg. Doses variando entre 10 e 80 mg/kg administradas durante oito semanas e doses de 160 mg/kg, administradas durante quatro semanas, não apresentaram nenhuma toxicidade em ratos, considerando-se ausência de mortes, alterações histopatológicas em fígado, rins, coração e baço. No mesmo estudo foram também conduzidos testes em homens adultos saudáveis. Doses de 5 mg/kg, administradas por via oral durante 6 semanas consecutivas, não provocaram efeitos tóxicos nos pacientes.

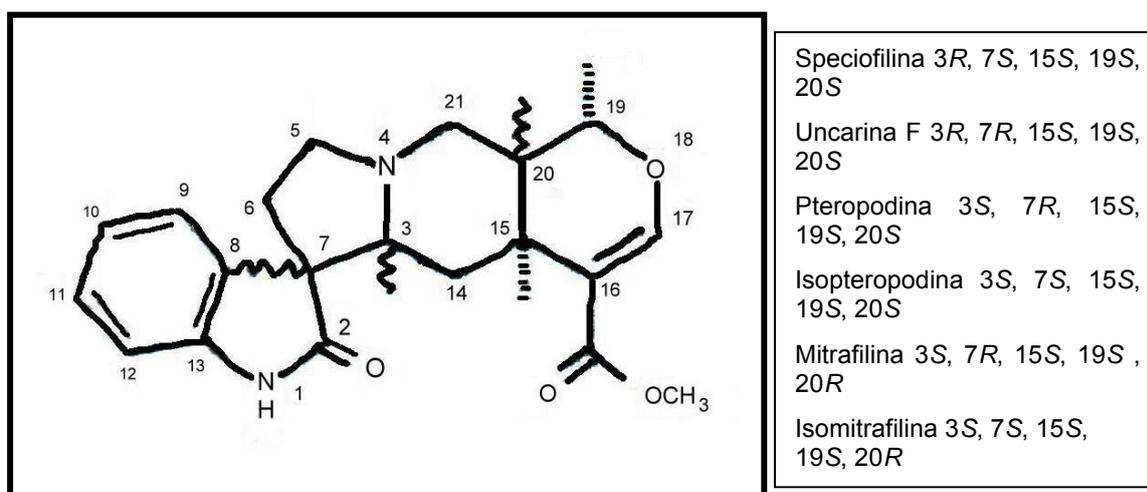


Figura 2. Alcalóides oxindólicos pentacíclicos relatados na literatura para a espécie *Uncaria tomentosa*.

3.6. Controle de Qualidade

Os alcalóides oxindólicos pentacíclicos são tidos como os marcadores típicos para *Uncaria tomentosa*, o que torna o seu doseamento uma etapa minuciosa, devido à escassa estabilidade química e à baixa concentração destes compostos.

Estudos realizados comparando diferentes solventes para a extração dos alcalóides de casca de *U. tomentosa* mostraram que o solvente mais eficiente foi o etanol. Essa conclusão foi baseada na análise comparativa por CLAE, utilizando tampão fosfato 10 mM (pH 7,0) e acetonitrila (55:45, V/V) (SILVA e col., 2002). Os autores também assinalam que as análises diretas de extratos brutos de *U.*

tomentosa por CLAE não costumam ser satisfatórias, devido à baixa concentração dos alcalóides. Por essa razão, é necessário trabalhar com frações enriquecidas de alcalóides, enfatizando a análise dos seis alcalóides majoritários pteropodina, isopteropodina, especiofilina, uncarina F, mitrafilina e isomitrafilina (SILVA e col., 2002).

Laus e K eplinger (1994) relatam um método de isolamento desses seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos majoritários. Para tanto, realizaram extração ácido-base e análise por CLAE, usando sistemas diferentes. Como primeiro sistema usaram acetonitrila:éter:tampão fosfato (pH 7,7) (34:1:65, V/V), fluxo de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 12 °C e detecção em 254 nm. No segundo sistema testado usaram acetonitrila:tampão fosfato (pH 7,0) (45:55, V/V), fluxo de 1,3 mL/min, temperatura da coluna de 80 °C e detecção em 245 nm. Apesar dos dois sistemas apresentarem bons resultados, o segundo sistema levou a uma melhor resolução, com um tempo de análise de apenas 5 minutos.

A extração ácido-base para alcalóides oxindólicos pentacíclicos é contestada na bibliografia consultada, visto tratarem-se de compostos de fácil isomerização, quando aquecidos com meios ácidos e alcalinos (GANZERA e col., 2001). Assim, cascas de *U. tomentosa* submetidas à extração com etanol em Soxhlet foram posteriormente analisadas por CLAE, apresentando uma concentração total de alcalóides de 12,61 mg/g. Desse total, a pteropodina foi responsável por 51,62%, enquanto que a isomitrafilina apareceu com um teor relativo de 2,30% desse total (especificamente, 0,29 mg/g) (LAUS e col., 1994). Por outro lado, teores de alcalóides totais (em média, 11,73 mg/g) foram relatados para a extração ácido-base das cascas de *U. tomentosa*. Desse total, o teor de isomitrafilina foi de 0,21 mg/g de casca (1,79% do total de alcalóides), enquanto que a pteropodina representou 49,01% do total dos alcalóides. De modo geral, a concentração dos seis alcalóides majoritários foi menor quando o método de extração ácido-base foi utilizado em cascas de *U. tomentosa*, o que faz crer que a isomerização é realmente facilitada quando estes são expostos a ácidos e bases (LAUS e col., 1994).

A concentração de alcalóides totais foi também verificada em três variedades de cascas de *Uncaria tomentosa* (variedades vermelho-escura, branca acinzentada

e marrom amarelada). Na primeira, a concentração foi de 20,30 mg/g de casca, na segunda variedade foi de 17,88 mg/g e na terceira de 26,20 mg/g. Neste trabalho a variação no teor calculado por CLAE, em relação à concentração de alcalóides totais, foi de 0,036 a 3,83% (m/m) em relação às cascas secas (LAUS e col., 1994).

Produtos comercializados no Mississippi e na Califórnia foram analisados por CLAE quanto à concentração de alcalóides totais. Neste caso, porém, o método de escolha foi a extração metanólica. Os seis alcalóides majoritários foram isolados e quantificados. O total da fração alcaloídica variou entre 0,156 e 0,962% (GANZERA e col., 2001).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Matérias-Primas

A matéria-prima objeto de estudo foi o extrato seco de Unha-de-gato, adquirido da Distribuidora Galena (São Paulo, Brasil, Lote: 0229051946). Como material de referência foram utilizadas cascas rasuradas com procedência indicada como *Uncaria tomentosa* DC., adquirida da Distribuidora Quimer (São Paulo, Brasil) e pequena amostra autêntica, gentilmente cedida pela Profa. Dra. Amélia T. Henriques (PPGCF, UFRGS). As cápsulas de extrato seco de unha-de-gato foram preparadas utilizando cápsulas de gelatina dura, transparentes, nº. 0 (Braskap, lote: T010298, Brasil), sem adição de adjuvantes.

4.1.2. Solventes, soluções e reagentes

Todos os reagentes utilizados, a não ser que ocorra especificação contrária, foram de grau de pureza pró-análise (p.a.) e de procedência Merck.

Acetato de etila, acetona, acetonitrila, ácido acético glacial, ácido clorídrico concentrado, ácido fórmico, ácido fosfórico concentrado, ácido sulfúrico concentrado, álcool etílico, álcool metílico, amônia concentrada, *n*-butanol, cloreto de alumínio hexaidratado, clorofórmio, diclorometano, dietilamina, éter etílico, metanol, metiletilcetona, solução aquosa de metenamina (hexametilenotetramina) a 0,5% (m/v), solução de macrogol 400 (Delaware) a 5% (m/v), solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v), solução metanólica de difenilboriloxietilamina (Reagente Natural-A) a 0,5% (m/v), soluções tampão fosfato pH 4,0; 5,0; 7,0; 8,0 e 10,0.

Os reagentes de Dragendorff e de Mayer foram preparados segundo metodologia descrita por COSTA (1994).

Como substâncias de referência foram utilizadas isomitrafalina (ITI, lote 09417, válido até 10/2005), e rutina (Sigma, lote 110K1423, válido até 03/2006).

4.1.3. Aparelhagem e Equipamentos

Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal, solução extrativa e cápsulas contendo extrato seco: autoclave (Quimis, mod. Q190, Brasil), balança analítica (AND-HR 120), evaporador rotatório (Büchi, mod. R-114, Suíça), banho de água (Biomatic, mod. 869, Brasil), banho de ultra-som (Branson, mod. 1510R-DTH, EUA), centrífuga (Quimis, mod. Q 222T18/28, Brasil), desintegrador de cápsulas (Nova Ética, mod. 301AC, Brasil), estufas bacteriológicas (Quimis, mod. 316M, Brasil), moinho de facas (Retsch, mod. SK₁, Alemanha), potenciômetro (pHmetro Micronal, mod. B374, Brasil), liofilizador (Edwards, mod. 4K, Inglaterra), termohigrômetro digital (Quimis, mod. 101 TH, Brasil), tamisador vibratório automático (Retsch, mod. 30, Alemanha).

Cromatografia líquida de alta eficiência: Cromatógrafo a líquido de alta eficiência Merck – Hitachi Model D-7000, bomba L-7100, detector UV/VIS L-7400, injetor Rheodyne (10µL) L-7200, coluna Lichrospher® 100 RP-18 (5µm) 125-4, com interface Microsoft Windows NT, versão 4.0.

Cromatografia em camada delgada: Cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄, revelação com auxílio de lâmpada UV_{254/360 nm} e reagentes de Dragendorff e Mayer. Os detalhes específicos relacionados aos métodos utilizados são tratados nos itens respectivos.

Espectrofotometria: Espectrofotômetro Quimis (mod. 108 U2 UV/VIS, Brasil), com cubetas de quartzo, de 1 cm de percurso óptico.

Aquisição e processamento de dados: Pentium 100 MHz, 16 MB de RAM, 1 GIGA. O programa de estatística usado foi o Excel 97 (Microsoft).

4.2. Métodos

4.2.1. Identificação botânica da droga rasurada

A identificação botânica da matéria-prima vegetal (casca rasurada) foi realizada pelo Prof. Evandro José Linhares Ferreira, do departamento de Botânica

da Universidade Federal do Acre (anexo 1) e posteriormente confirmada pela Profa. Dra. L.A. Mentz do Instituto de Botânica da UFRGS.

4.2.2. Obtenção da droga vegetal seca moída (DVSM)

A matéria-prima constituída por casca rasurada foi moída em moinho de facas, provido de tamis de 0,8 mm. O material moído resultante (**DVSM**) foi acondicionado em frascos de polietileno preto e utilizado posteriormente na preparação de soluções extrativas para análise.

4.2.2.1. Identificação e caracterização da DVSM

Ensaio preliminar para detecção de alcalóides

A 1,0 g de DVSM foram adicionados 10,0 mL de HCl 2N. A mistura foi aquecida em banho de água fervente, mantendo-a sob refluxo por 30 minutos. Após resfriada, a solução foi filtrada. O filtrado foi transferido para funil de separação, alcalinizado com solução diluída de hidróxido de amônio a 10% e extraído três vezes com 10,0 mL de éter etílico. As frações orgânicas foram reunidas em funil de separação e extraídas uma vez com 10,0 mL de HCl 2N. A fase aquosa foi dividida em duas frações, que foram testadas com os reagentes de Dragendorff e Mayer (COSTA, 1994).

Análise por cromatografia em camada delgada.

a) Alcalóides

Cerca de 1,0 g de DVSM foi extraído com 10,0 mL de solução de hidróxido de amônio a 20% (v/v). A seguir foram adicionados 25,0 mL de metanol e a mistura foi aquecida a 60 °C em banho de água, durante 5 minutos, e filtrada na sequência (VAN GINKEL, 1997).

Para as análises cromatográficas foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄, sem ativação prévia. O tempo de saturação foi de 30 minutos, com

distância de migração de 15 cm. Após o desenvolvimento as placas foram secas e borrifadas com reagente de Dragendorff. As manchas foram detectadas sob luz ultravioleta (245 e 366 nm). Como referência foi utilizada solução metanólica de 0,25 mg/mL (m/V) de isomitrafalina. Os volumes de amostra e de substância de referência aplicados sobre as placas foram de 15,0 µL, em ambos os casos. Os sistemas eluentes utilizados constam na tabela 5.

Tabela 5. Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização da droga vegetal seca moída (DVSM).

Sistema	Composição (V/V)
SCI	Acetato de etila:metanol (70:30)
SCII	Tolueno:acetato de etila:dietilamina (70:20:10)
SCIII	Acetato de etila:isopropanol:sol.aquosa de NH ₄ OH a 20% (100:2:2)
SCIV	Clorofórmio:metanol (85:15)
SCV	Clorofórmio:etanol (60:40)
SCVI	Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10)
SCVII	Tolueno:clorofórmio:etanol (28,5:57:14,5)

Fonte: Van Ginkel, (1997)

b) Flavonóides

Cerca de 10,0 g da DVSM foram extraídos com 50,0 mL de metanol. A mistura foi aquecida por 20 minutos em banho-maria a 60 °C e filtrada (VAN GINKEL, 1997). Para as análises cromatográficas foram utilizadas cromatofolhas de gel de sílica GF₂₅₄, sem ativação prévia. O tempo de saturação foi de 30 minutos, com distância de migração de 14 cm. Após o desenvolvimento, as placas foram secas e borrifadas, de forma consecutiva, com solução metanólica de reagente Natural-A a 0,5% (m/V) e solução macrogol 400 a 5% (V/V). As manchas foram detectadas sob luz ultravioleta (254 e 366 nm). Como referência foi utilizada solução metanólica de rutina, em concentração de 50,0 µg/mL (WAGNER e BLADT, 1996). Os volumes de amostra e de substâncias de referência aplicados foram de 15,0 µL, em ambos os casos. Os sistemas eluentes utilizados constam na tabela 6.

Avaliação da perda por dessecação

Em pesa-filtro previamente tarado, cerca de 1,0 g de DVSM foi pesado exatamente e, a seguir, colocado em estufa em temperatura de 105 °C, por 2 horas. Após resfriamento durante 30 minutos em dessecador provido de sílica, o pesa-filtro foi novamente pesado, recolocado em estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até peso constante. Os resultados foram expressos como perda da massa percentual, através da média de quatro determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

Tabela 6. Sistemas cromatográficos utilizados para a caracterização da DVSM.

Sistema	Composição (V/V)
SCVIII	Acetato de etila: ácido fórmico:água (88:6:6)
SCIX	Acetato de etila: ácido fórmico:água (80:10:10)
SCX	<i>n</i> -butanol:ácido acético:água (100:10:30).

Fonte: Van Ginkel, (1997).

Análise granulométrica

Uma amostra de 100,0 g de DVSM foi analisada mediante uso de tamises previamente tarados, com abertura de malha de 0,082; 0,106; 0,250; 0,300 e 0,420 mm. A operação foi realizada em tamisador Retsch, a 60 vibrações por segundo, durante 15 minutos, para cada determinação. Os resultados expressos correspondem à média de três determinações (VOIGT, 1993).

Determinação do teor de extrativos

Cerca de 1,0 g da DVSM, exatamente pesado, foi extraído por decocção com 100,0 mL de água, durante 10 minutos. Após o resfriamento o volume foi completado a 100,0 mL. A solução resultante foi filtrada em papel de filtro, sendo desprezados os primeiros 20,0 mL. Do restante do filtrado foi pesada uma alíquota equivalente a 20,0 g, em pesa-filtro tarado. Essa foi evaporada até secura em banho de água fervente, sob agitação ocasional. O resíduo foi colocado em estufa à temperatura de 105 °C, por 2 horas, resfriado em dessecador e pesado (DEUTSCHES, 1992). O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, pela média de três determinações, segundo a equação abaixo:

$$TE = \frac{gFD}{(m - pd)} 100$$

onde:

TE: teor de extrativos (%; m/m); *g*: massa do resíduo seco (g); *m*: massa da amostra (g); *FD*: fator de diluição (5); *pd*: perda por dessecação (g).

Determinação do teor de flavonóides totais

a) método espectrofotométrico com hidrólise ácida (DEUTSCHES, 1992)

Uma amostra de 0,4 g de DVSM, exatamente pesada, foi transferida para balão de fundo redondo de 100,0 mL, acrescentando-se 1,0 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina a 0,5% (m/v), 20,0 mL de acetona R e 2,0 mL de ácido clorídrico R. A mistura foi aquecida em banho de água a 100 °C, durante 30 minutos sob refluxo e, posteriormente, filtrada por algodão para um balão volumétrico de 100,0 mL. O resíduo da extração e o algodão foram tratados, sucessivamente, com duas porções de 20,0 mL de acetona R, com aquecimento até ebulição, sob refluxo, por mais 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas para o balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com acetona R. Esta solução foi denominada solução-mãe (**SM**). Em funil de separação, 20,0 mL de SM foram adicionados de 20,0 mL de água e extraídos com 15,0 mL de acetato de etila R. A extração foi repetida três vezes com 10,0 mL de acetato de etila R. As fases orgânicas foram reunidas e extraídas duas vezes, em funil de separação, com 50,0 mL de água. A fase orgânica resultante deste tratamento foi transferida para balão volumétrico de 50,0 mL, completando-se o volume com acetato de etila R (solução-estoque – **SE**). Uma alíquota de 10,0 mL de SE foi adicionada de 2,0 mL de solução etanólica de cloreto de alumínio a 1,5% (m/v) e o volume completado a 25,0 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v), constituindo a solução-amostra (**SA**). A solução de compensação (**SC**) foi preparada a partir de 10,0 mL de SE transferida para balão volumétrico de 25,0 mL, sendo o volume completado com solução metanólica de ácido acético a 5% (v/v). Após 15 minutos da adição da solução de AlCl₃ procedeu-se a leitura em espectrofotômetro da absorvância de **SA**, no comprimento de onda de 420 nm, utilizando **SC** como branco.

A concentração percentual de flavonóides totais foi expressa como rutina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \text{ FD}}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - \text{pd})} 100$$

onde,

C: concentração percentual m/m de flavonóides totais, expressos em gramas de rutina por 100 g de amostra seca; A: absorvância lida (U.A.); FD: fator de diluição igual a 625; m: massa da droga vegetal (g); pd: perda por dessecação (g) e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorção específica do complexo rutina- AlCl_3 (171,65).

b) método espectrofotométrico sem hidrólise ácida (DE SOUZA, 1996)

Uma amostra de 0,4 g de DVSM, exatamente pesada, foi transferida para balão de fundo redondo de 100,0 mL e submetida à extração sob refluxo, por 15 minutos, com 30,0 mL de água. A extração foi repetida por mais duas vezes com 30,0 mL de água. As soluções resultantes foram filtradas, reunidas em balão volumétrico de 100,0 mL e seu volume completado com água (solução-mãe, **SM**). Uma alíquota de 10,0 ml de SM foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com água. Separadamente, duas alíquotas de 10,0 mL desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 25,0 mL. Ao primeiro balão foram adicionados 2,0 mL de solução de cloreto de alumínio a 1,5% (m/v), completando-se o volume com água (solução-amostra, **SA**). No outro balão, o volume foi completado com água para 25,0 mL (solução de compensação, **SC**). Após 15 minutos da adição da solução reagente de cloreto de alumínio, foi realizada a leitura da SA a 315 nm, utilizando SC como branco.

A concentração percentual do teor de flavonóides totais foi expressa como sakuranetina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \text{ FD}}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - \text{pd})} 100$$

onde,

C: concentração percentual m/m de flavonóides totais, expressos em gramas de sakuranetina por 100 g de amostra seca; A: absorvância lida (U.A.); *FD*: fator de diluição igual a 2500; *m*: massa da droga vegetal (g); *pd*: perda por dessecação (g) e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorção específica do complexo sakuranetina -AlCl₃ (526,25).

Determinação do teor de alcalóides totais

a) Método da extração ácido-base (COSTA, 1994)

Uma amostra de 1,0 g de DVSM, exatamente pesada, foi transferida para erlenmeyer. Sobre a droga foi acrescentado 10,0 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio a 10% (v/v) e 20,0 mL de clorofórmio. A mistura foi aquecida durante 5 minutos em água fervente. Após o aquecimento procedeu-se à separação das fases aquosa e orgânica, utilizando funil de separação. A fase aquosa foi então desprezada e sobre a fase orgânica acrescentou-se 10,0 mL de solução aquosa de HCl (1:1) (v/v) e 20,0 mL de éter. As fases foram novamente extraídas em funil de separação. A fase orgânica foi desprezada e sobre a fase aquosa acrescentou-se 10,0 mL de solução de hidróxido de amônio a 10% (v/v) e 20,0 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi separada e rejeitada. Uma alíquota de 1,0 mL da fase orgânica foi transferida para balão volumétrico de 50,0 mL e seu volume foi completado com metanol. Realizou-se a leitura da absorvância, no comprimento de onda de 285 nm, usando isomitrafalina como substância de referência.

A concentração percentual do teor de alcalóides totais foi expressa como isomitrafalina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C_a = \frac{A_a C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafalina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafalina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

b) Método da extração metanólica

Cerca de 1,0 g de DVSM, exatamente pesada, foi extraída com 25,0 mL de metanol, sob refluxo durante 30 minutos. Depois de resfriada a mistura foi filtrada com papel de filtro e o volume completado a 50,0 mL. Uma alíquota de 1,0 mL da solução foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e o volume completado com metanol. A absorção da solução foi medida a 285 nm, comparando-a com isomitrafalina. A concentração percentual do teor de alcalóides totais foi expressa como isomitrafalina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C_a = \frac{A_a C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafalina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafalina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

4.2.3. Obtenção e caracterização da solução extrativa e do extrato seco liofilizado

4.2.3.1. Preparação da solução extrativa

A solução extrativa foi obtida pelo método de percolação simples (PRISTA e col., 1981). A relação droga:solvente utilizada foi de 1:10 (m/V). Uma amostra de 100,0 g de DVSM foi adicionada de 600,0 mL de etanol 40% (V/V) e misturada manualmente, até a obtenção de um produto homogeneamente umedecido. Após 24 horas, a droga intumescida foi colocada em percolador cilíndrico, sendo cuidadosamente empacotada, sobre uma dupla camada de algodão e de papel de filtro. A parte superior da coluna de droga empacotada foi protegida com papel de filtro, deixando a mistura em maceração durante 24 horas. Após esse período, procedeu-se à percolação propriamente dita, com velocidade de gotejamento de aproximadamente 20 gotas por minuto. A percolação foi realizada em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a extração, o marco foi prensado em prensa

hidráulica manual e o volume final completado de modo a restaurar a proporção inicial de extração de 1:10 (m/v), com um volume de percolado igual a 1000,0 mL. A solução extrativa foi acondicionada em frascos próprios para a liofilização.

4.2.3.1.1. Caracterização da solução extrativa

Determinação do pH

Foram utilizados volumes de 10,0 mL de solução extrativa. O potenciômetro foi calibrado, a 25 °C, a pH 7,0 e 4,0 com soluções tampão de fosfato e acetato, respectivamente. O resultado expresso corresponde à média de cinco determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

Determinação da densidade relativa

Foi empregado picnômetro de 25,0 mL, previamente calibrado, aferindo-se as suas massas estando vazio e contendo água, a 25 °C. Em seguida, foi determinada a massa do mesmo contendo solução extrativa, a 25 °C. A densidade foi calculada através do quociente entre a massa da solução extrativa e massa de água contida no picnômetro, sendo o resultado expresso pela média de três determinações, com correção de temperatura (FARMACOPÉIA, 1998).

$$d_{25^{\circ}\text{C}}^{25^{\circ}\text{C}} = \frac{m_{\text{SE}}}{m_{\text{água}}}$$

onde,

$d_{25^{\circ}\text{C}}^{25^{\circ}\text{C}}$: densidade relativa, m_{SE} : a massa da solução extrativa; $m_{\text{água}}$: massa da alíquota de água, ambas a 25 °C.

Determinação do resíduo seco

Para a avaliação do teor de resíduo seco foram pesados, exatamente, cerca de 20,0 g da solução extrativa em pesa-filtros previamente tarados. As soluções foram evaporadas em banho de água fervente, sob agitação ocasional. Após evaporação, os pesa-filtros foram colocados em estufa a 105 °C, por duas horas, resfriados em dessecador e pesados na seqüência. O resultado foi calculado em

relação a 100,0 g de solução extrativa (% *m/m*) e expressa a média de três determinações (HARTKE e MUTSCHLER, 1986).

4.2.3.2. Obtenção do extrato seco liofilizado

A solução extrativa, obtida conforme o item 4.2.3.1, foi concentrada em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, até o equivalente a 40% do volume original. O concentrado obtido foi congelado e, na seqüência, submetido à secagem por liofilização, nas condições expressas na tabela 7. Após a liofilização, o produto foi acondicionado em frascos âmbar, hermeticamente fechados, mantidos em dessecador provido de sílica, até o momento de uso.

Tabela 7. Condições experimentais de obtenção do produto seco liofilizado.

Condições de liofilização	Especificações
Tempo de liofilização	72 horas
Pressão	10 mbar
Temperatura	- 60 °C

4.2.3.2.1. Caracterização do extrato seco liofilizado

Determinação da perda por dessecação

Em pesa-filtro, previamente tarado, cerca de 1,0 g do extrato seco liofilizado foi pesado exatamente e, a seguir, colocado em estufa à temperatura de 105 ° C por 2 horas. Após resfriamento durante 30 minutos em dessecador provido de sílica, o pesa-filtro contendo o extrato seco liofilizado foi novamente pesado e recolocado em estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até peso constante. Os resultados foram expressos como perda da massa percentual, através da média de quatro determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

Determinação do teor de flavonóides totais

a) método espectrofotométrico com hidrólise ácida

Uma amostra de 0,4 g do liofilizado, exatamente pesada, foi transferida para balão de fundo redondo de 100,0 mL, acrescentando-se 1,0 mL de solução aquosa de hexametilenotetramina a 0,5% (m/V), 20,0 mL de acetona R e 2,0 mL de ácido clorídrico R. Em banho de água a 100 °C, a mistura foi aquecida sob refluxo, durante 30 minutos e, posteriormente, filtrada por algodão para balão volumétrico de 100,0 mL. O resíduo do liofilizado e o algodão foram tratados, sucessivamente, com duas porções de 20,0 mL de acetona R, com aquecimento até ebulição, sob refluxo, por mais 10 minutos. Após resfriamento à temperatura ambiente, as soluções foram filtradas para o balão volumétrico de 100,0 mL, completando-se o volume com acetona R. Esta solução foi denominada solução-mãe (**SM**). Em funil de separação, 20,0 mL de SM foram adicionados de 20,0 mL de água e extraídos com 15,0 mL de acetato de etila R, procedendo-se em seguida conforme descrito pela Farmacopéia Alemã para a *Determinação do teor de flavonóides totais* (DEUSTCHES, 1992).

A concentração percentual do teor de flavonóides totais foi expressa como rutina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \cdot FD}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - pd)} \cdot 100$$

onde,

C: concentração percentual m/m de flavonóides totais, expressos em gramas de rutina por 100 g de amostra seca; A: absorvância lida (U.A.); FD: fator de diluição igual a 625; m: massa da droga vegetal (g); pd: perda por dessecação (g) e $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorção específica do complexo rutina- AlCl_3 (171,65).

b) método espectrofotométrico sem hidrólise ácida

Uma amostra de 0,4 g do liofilizado, exatamente pesada, foi transferida para balão de fundo redondo de 100,0 mL e submetida a extração sob refluxo, por 15 minutos, com 30,0 mL de água. A extração foi repetida por mais duas vezes com 30,0 mL do mesmo líquido extrator. As soluções resultantes foram filtradas, reunidas em balão volumétrico de 100,0 mL e seu volume completado com água (solução-mãe – **SM**). Uma alíquota de 10,0 ml de **SM** foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e seu volume foi completado com água. Procedeu-se em seguida

conforme descrito por De Souza (1996) para a *Determinação do teor de flavonóides totais, método sem hidrólise ácida*.

A concentração percentual do teor de flavonóides totais foi expressa como sakuranetina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \cdot FD}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - pd)} \cdot 100$$

onde,

C: concentração percentual m/m de flavonóides totais, expressos em gramas de sakuranetina por 100 g de amostra seca; A: absorvância lida (U.A.); FD: fator de diluição igual a 2500; m: massa da droga vegetal (g); pd: perda por dessecação (g) e

$A_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorção específica do complexo sakuranetina -AlCl₃ (526,25).

Determinação do teor de alcalóides totais

a) Método da extração ácido-base

Uma amostra de 1,0 g de extrato liofilizado, exatamente pesada, foi transferida para erlemmeyer. Sobre o liofilizado foram acrescentados 10,0 mL de solução aquosa de hidróxido de amônio a 10% (v/v) e 20,0 mL de clorofórmio. A mistura foi aquecida durante 5 minutos a uma temperatura de 100 °C. Após o aquecimento, a fase aquosa foi separada da fase orgânica com auxílio de um funil de separação e desprezada na seqüência. À fase orgânica acrescentou-se 10,0 mL de solução aquosa de HCl (1:1) (v/v) e 20,0 mL de éter. A fase orgânica foi separada em funil de separação e desprezada. À fase aquosa foram acrescentados 10,0 mL de solução de hidróxido de amônio a 10% (v/v) e 20,0 mL de clorofórmio. A fase aquosa foi separada por funil de separação e desprezada. Uma alíquota de 1,0 mL da fase orgânica foi transferida para balão volumétrico de 50,0 mL e seu volume foi completado com metanol. Realizou-se a leitura da absorvância, no comprimento de onda de 285 nm, usando isomitrafalina como substância de referência.

A concentração percentual do teor de alcalóides totais foi expressa como isomitrafalina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C_a = \frac{A_a \cdot C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} \cdot 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafalina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafalina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

b) Método por extração metanólica

Cerca de 1,0 g do liofilizado foi exatamente pesado e transferido para balão volumétrico de 50,0 mL, sendo seu volume completado com metanol. Esta solução foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos e foi filtrada em papel de filtro. Do filtrado foi medida uma alíquota de 5,0 mL que foi transferida para balão volumétrico de 100,0 mL e seu volume foi completado com metanol. A absorvância desta solução e da solução de isomitrafalina foi lida em 285 nm e a concentração de alcalóides calculada pela equação:

$$C_a = \frac{A_a C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafalina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafalina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

Análise por cromatografia em camada delgada

Para a análise por CCD, a solução de leitura do liofilizado foi preparada conforme descrito anteriormente em *Determinação do teor de alcalóides totais, método por extração metanólica*.

a) Alcalóides

Para o desenvolvimento dos sistemas cromatográficos utilizou-se a mesma metodologia descrita para a DVSM em *Análise por cromatografia em camada delgada – alcalóides*.

b) Flavonóides

Para o desenvolvimento dos sistemas cromatográficos utilizou-se a mesma metodologia descrita para a DVSM em *Análise por cromatografia em camada delgada – flavonóides*.

4.2.4. Caracterização do extrato seco comercial (ESC)

4.2.4.1. Análise granulométrica

Uma amostra de aproximadamente 10,0 mg de ESC foi dispersa em óleo mineral sobre lâmina de vidro. O critério de medição adotado foi o diâmetro de Feret, medindo 1000 partículas em microscópio óptico, provido de nonio graduado, com escala de 1 mm e com 100 divisões (LANTZ, 1990).

4.2.4.2. Determinação da perda por dessecação

Em pesa-filtro, previamente tarado, cerca de 1,0 g do ESC foi pesado exatamente e, a seguir, colocado em estufa à temperatura de 105 °C por 2 horas. Após resfriamento durante 30 minutos em dessecador provido de sílica, o pesa-filtro contendo ESC foi pesado novamente e recolocado em estufa por mais 1 hora, repetindo-se o procedimento até peso constante. Os resultados foram expressos como perda da massa percentual, através da média de quatro determinações (FARMACOPÉIA, 1988).

4.2.4.3. Análise por cromatografia em camada delgada

a) Alcalóides

A amostra e o procedimento adotado para o ESC foram os mesmos descritos para a DVSM relatados no item *Análise por cromatografia em camada delgada - alcalóides*. Os sistemas cromatográficos usados foram os mesmos descritos para a DVSM (tabela 5).

b) Flavonóides

A amostra e o procedimento adotado para o ESC foram os mesmos descritos para a DVSM relatados no item na *Análise por cromatografia em camada delgada - flavonóides*. Os sistemas cromatográficos usados foram os mesmos descritos para a DVSM (tabela 6).

Determinação do teor de flavonóides totais

a) Método espectrofotométrico com hidrólise ácida

Cerca de 1,50 g do ESC foram exatamente pesados e transferidos para balão de fundo redondo de 100,0 mL e o teor de flavonóides determinado conforme descrito para a DVSM em *Determinação do teor de flavonóides totais, método com hidrólise ácida* (DEUTSCHES, 1992). A absorvância foi lida 15 minutos após a adição de AlCl_3 a 1,5% (m/v), no comprimento de onda de 420 nm. A concentração percentual de flavonóides totais calculada corresponde à média de três determinações e foi expressa como rutina, mediante a fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \cdot FD}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - pd)} \cdot 100$$

onde,

C: concentração de flavonóides totais expressos em (g) de rutina por 100,0 g de droga vegetal seca (g%); A: absorvância lida (U.A.); FD: fator de diluição igual a 625; m: massa da solução extrativa (g), pd: perda por dessecação; $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: absorção específica do complexo rutina- AlCl_3 (171,65).

b) Método espectrofotométrico sem hidrólise ácida

Uma amostra de 0,5 g do ESC foi dissolvida e diluída com água a 500,0 mL. Separadamente, duas alíquotas de 10,0 mL desta solução foram transferidas para balões volumétricos de 25,0 mL. Ao primeiro balão volumétrico foram adicionados 2,0 mL de solução de cloreto de alumínio a 1,5% (m/v), completando-se o volume com água (solução-amostra – **SA**). No segundo balão o volume foi completado com água (solução de compensação – **SC**). Após 15 minutos foi realizada a leitura de **SA** a 315 nm, utilizando **SC** como branco.

Os resultados forma expressos em concentração percentual de flavonóides totais como sakuranetina, pela média de três determinações, calculada pela fórmula abaixo:

$$C = \frac{A \text{ FD}}{A_{1\text{cm}}^{1\%} (m - pd)} 100$$

onde,

C: concentração de flavonóides totais expressos em (g) de sakuranetina por 100 g de droga vegetal seca (g%); A: absorvância da amostra (U.A.); FD: fator de diluição igual a 12 50; m: massa da solução extrativa (g); pd: perda por dessecação (g); $A_{1\text{cm}}^{1\%}$: coeficiente de absorção do complexo sakuranetina- AlCl_3 (526,25).

Determinação do teor de alcalóides totais

a) Método por extração ácido-base

Uma amostra de 1,0 g de E SC, exatamente pesada, foi transferida para erlemmeyer e o teor de alcalóides calculado mediante a mesma metodologia descrita para a DVSM em *Determinação do teor de alcalóides, método por extração ácido-base*. A concentração percentual do teor de alcalóides totais foi expressa como isomitrafalina, pela média de três determinações, utilizando a fórmula abaixo:

$$C_a = \frac{A_a C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafalina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafalina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

b) Método por extração metanólica

Cerca de 1,0 g do ESC foi exatamente pesado e transferido para balão volumétrico e o teor de alcalóides calculado mediante a mesma metodologia descrita para a DVSM em *Determinação do teor de alcalóides totais, método por extração metanólica*. Os resultados foram calculados em massa percentual e expressos como isomitrafalina, pela média de três determinações.

$$C_a = \frac{A_a C_{\text{padrão}}}{A_{\text{padrão}}} 100$$

onde,

C_a = concentração percentual da amostra ($\mu\text{g/mL}$); C_p : concentração da solução padrão de isomitrafilina ($\mu\text{g/mL}$); A_a : absorvância da amostra; A_p : absorvância da solução padrão de isomitrafilina. Os resultados finais consideraram a perda por dessecação da amostra.

Controle microbiológico de ESC

a) Contagem de microorganismos viáveis (bactérias e fungos)

O ESC foi ensaiado quanto à presença de microorganismos viáveis, nas condições específicas de bactérias e fungos, segundo o método de contagem em placas da Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

b) Pesquisa de patógenos

A presença dos patógenos *E. coli*, *Salmonella* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* no ESC foi testada segundo a Farmacopéia Brasileira 4ª edição.

Determinação do teor de alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Preparação do padrão

Uma amostra de 10,0 mg de isomitrafilina foi dissolvida em metanol e o volume completado a 10,0 mL com o mesmo solvente. Uma alíquota de 2,5 mL dessa solução foi diluída em metanol a 10,0 mL. A partir dessa solução, alíquotas de 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 0,6 mL foram retiradas, transferidas, separadamente, para balões volumétricos de 10,0 mL e o volume completado com metanol. As soluções resultantes foram codificadas como **P1**, **P2**, **P3**, **P4** e **P5**, sendo suas concentrações 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Cada solução foi filtrada por membrana hidrofílica HVHP e injetada em triplicata no cromatógrafo seguindo as condições cromatográficas descritas na tabela 8.

Preparação da amostra:

Cerca de 1,0 g do ESC, exatamente pesado, foi transferido para balão volumétrico de 10,0 mL, dissolvido em metanol e o volume completado com o mesmo solvente. Na seqüência, foi retirada uma alíquota de 1,0 mL, transferindo-a para um balão volumétrico de 100,0 mL e completando-se o volume com metanol. Esta solução foi submetida a banho de ultra-som por 15 minutos, filtrada por membrana hidrofílica HVHP e injetada em triplicata no cromatógrafo. As condições cromatográficas utilizadas na análise estão descritas na tabela 8.

Tabela 8. Condições experimentais do método isocrático por CLAE.

Característica	Descrição
Fase móvel	Tampão fosfato pH 7,0:acetonitrila (60:40, V/V)
Coluna	Lichrospher® 100 RP-18 (250 mm X 4,0 mm, 3 µm)
Fluxo da fase móvel	0,75 mL/min.
Comprimento de onda	245 nm
Volume de injeção	10,0 µl
Temperatura de análise	28 °C

Observação: Para remoção de resíduos, a coluna foi lavada com solução metanólica de ácido acético a 1%, durante 5 minutos, quando assim foi requerido.

Teste preliminar para a estabilidade do ESC

Amostras de ESC foram colocadas em camadas de 1,5 cm sobre placas de Petri e expostas à luz ultravioleta (lâmpada germicida de marca Phillips, modelo G30T8 UV-C *long life*), distante 20 cm. Após a exposição à luz UVC em tempos pré-determinados de 24 horas, 7, 14, 21, 30, 45, 60 e 90 dias, o perfil de alcalóides do ESC foi avaliado pelo método por CLAE acima descrito, enquanto redução de teor de alcalóides e presença de produtos de degradação.

4.2.5. Preparação e caracterização das cápsulas contendo ESC

Aproximadamente 1000 cápsulas foram preparadas utilizando máquina de encapsular (Erli, mod. EG 9000, Brasil), de modo a obter cápsulas n° 0 com 400 mg de ESC.

Determinação da perda por dessecação

A determinação da perda por dessecação foi efetuada conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição. Os resultados foram expressos como perda de massa percentual, através da média de quatro determinações (FARMACOPEIA, 1988).

Determinação do peso médio das cápsulas

A determinação do peso médio das cápsulas foi efetuada conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPEIA, 1988).

Tempo de desintegração das cápsulas

O tempo de desintegração das cápsulas foi estabelecido conforme a Farmacopéia Brasileira 4ª edição (FARMACOPEIA, 1988).

Teste preliminar de estabilidade térmica para cápsulas contendo ESC

Cinquenta cápsulas contendo ESC foram colocadas em estufa a 50 ± 2 °C e uma umidade relativa de $90 \pm 5\%$, por um período de 90 dias. O teor e o perfil dos alcalóides foram avaliados no tempo zero e após 30, 60 e 90 dias de exposição, conforme estipulado pela ANVISA (ANVISA, RE nº 560/2002), exceto pelo uso das embalagens primária, secundária e terciária. O perfil de alcalóides do ESC foi avaliado pelo método por CLAE (Vide *Determinação do teor de alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*), enquanto redução de teor de alcalóides e presença de produtos de degradação.

4.2.6. Validação de métodos analíticos

Validação do método analítico por espectrofotometria no UV

Para essa finalidade foram avaliados os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e robustez.

Linearidade: a curva-padrão para isomitrafalina foi obtida utilizando as mesmas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 µg/mL, utilizadas na análise por CLAE (*Determinação do teor de alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*). Cada ponto da curva foi lido em triplicata. A linearidade foi avaliada pelos critérios de

coeficiente de regressão, análise de ANOVA, limites de confiança para os coeficientes angular e linear, erro sistemático constante e análise de resíduos por Durbin-Watson (FUNCK e col., 1992)

Precisão: A precisão do método foi verificada mediante seis determinações do teor de alcalóides do ESC, todas realizadas no mesmo aparelho, pela mesma analista, porém, em dois dias diferentes, considerando a concentração média correspondente a 100% do esperado. Os resultados foram expressos em desvio padrão e coeficiente de variação.

Exatidão: A exatidão do método foi verificada através do teste de recuperação, pela adição de quantidades conhecidas de ESC, de forma a obter amostras equivalentes a 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 e 120% da concentração nominal esperada. Cada amostra foi lida em triplicata.

Robustez: A robustez do método testado levou em consideração os fatores: pH da solução de leitura, comprimento de onda, temperatura da solução de leitura, solvente.

Para a avaliação do pH da solução de leitura foram usadas solução diluída de NH_4OH e solução 1 N de HCl. A solução de leitura foi alcalinizada a pH 10,0 e a absorvância lida em 285 nm ($\lambda_{\text{máx.}}$ da isomitrafalina). Para a avaliação em pH ácido, a solução de leitura foi acidificada a pH 5,0. A leitura também foi realizada em 285 nm. Para a avaliação da mudança de comprimento de onda, a absorvância da solução de leitura, sem alteração de pH, foi lida em 280 e 300 nm. Para avaliação do fator temperatura, foi determinada absorvância em 285 nm de soluções de leitura, estando estas a 40 e 6 °C. Para a avaliação do fator solvente, foi utilizado metanol de duas procedências diferentes, seguindo uma mesma sistemática de obtenção da solução de leitura. A absorvância foi lida em 285 nm.

Validação do método analítico por CLAE

Para a validação da metodologia analítica por CLAE foram avaliados os parâmetros de linearidade, exatidão, precisão e robustez.

Linearidade: a curva-padrão para isomitrafalina foi obtida utilizando as mesmas concentrações de 5,0; 7,5; 10,0; 12,5 e 15,0 $\mu\text{g/mL}$, utilizadas na análise por CLAE (*Determinação do teor de alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência*).

Cada ponto da curva foi injetado em triplicata. A linearidade foi avaliada pelos critérios de coeficiente de regressão, análise de ANOVA, limites de confiança para os coeficientes angular e linear, erro sistemático constante e análise de resíduos por Durbin-Watson (FUNCK e col., 1992). Neste caso, o volume de injeção foi programado para 10,0 μ L, de modo a obter parâmetros de comparação com dados relatados (GANZERA e col., 2001).

Precisão: A precisão do método foi verificada por seis determinações do ESC, através de ensaios completos, realizados no mesmo laboratório, pela mesma analista, com experimentos realizados em dois dias diferentes, considerando a concentração média correspondente a 100% do valor esperado. Os resultados foram expressos em desvio padrão e coeficiente de variação.

Exatidão: A exatidão do método foi verificada através do teste de recuperação, pela adição de quantidades conhecidas do ESC, de forma a obter soluções de leitura com as seguintes concentrações equivalentes a 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115 e 120% do valor esperado. O resultado levou em consideração a média de três injeções de cada amostra.

Robustez: A robustez do método testado levou em consideração os fatores: pH da fase móvel, comprimento de onda, temperatura, composição da fase móvel, volume de injeção e lote da coluna.

Para a avaliação do pH da fase móvel foram usadas soluções-tampão de fosfatos com pH 5,0 e 8,0. Para a avaliação do fator comprimento de onda, a absorvância foi lida em 243 e 247 nm. A avaliação do fator temperatura foi realizada em 25 e 35 °C. Para avaliar o efeito da variação da fase móvel, foram utilizadas proporções de 65:35 e 70:30 (v/v) de tampão fosfato pH 7,0:acetonitrila. O fluxo da fase móvel variou entre 0,5 e 1,0 μ L. As colunas cromatográficas usadas tiveram a mesma procedência, porém, de lotes diferentes.

4.3. Elaboração de fluxograma de desenvolvimento de fitoterápico monodroga

As etapas executadas no presente trabalho foram reproduzidas na forma de um fluxograma, a ser utilizado pelo laboratório patrocinador da pesquisa, em outras ocasiões em que se fizer necessário o desenvolvimento de metodologia analítica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação e caracterização das matérias-primas vegetais utilizadas neste trabalho foram realizadas para atender as demandas de qualidade que atualmente incidem sobre um produto fitoterápico à base de casca de *U. tomentosa* e, ao mesmo tempo, estabelecer critérios que permitam identificar e caracterizar um extrato seco obtido no comércio pelo Laboratório Tiaraju Ltda.

A utilização de extratos secos como produto intermediário, como foi o caso implícito no presente trabalho, apresenta um grande número de vantagens em relação aos extratos moles, líquidos e à droga na forma de pó, o que explica seu uso preferencial no âmbito de indústria de fitoterápicos.

Entre estas vantagens se destacam: a mais fácil manipulação, maior estabilidade química e microbiológica, bem como maior homogeneidade de distribuição dos constituintes ativos ou de interesse (LIST e SCHMIDT, 1989; TAYLOR, 2002).

Nesse contexto, a legislação moderna remete a indústria farmacêutica de fitoterápicos ao desenvolvimento de métodos que assegurem e confirmem a eficiência da formulação, em condições susceptíveis de validação.

Para essa finalidade são requeridos, porém, métodos analíticos validados e parâmetros de qualidade fidedignos (WORLD, 1993), que possibilitem a identificação e caracterização das matérias-primas e, também, a padronização e otimização de qualquer transformação tecnológica.

Visto desse ponto de vista amplo, as monografias de Farmacopéias modernas constituem um instrumento que viabiliza o controle de qualidade, principalmente, da matéria-prima (MIGUEL e col., 2004), o qual, contudo, não pode ser transposto para o controle de processos tecnológicos ou para o controle de qualidade do produto acabado de modo irrestrito.

5.1. Caracterização do Extrato Seco Comercial (ESC)

5.1.1. Características macroscópicas

A matéria-prima, utilizada pelo Laboratório Tiaraju na elaboração de fitoterápicos a base de *Uncaria tomentosa*, foi adquirida do comércio, apresentando-se na forma de pó finamente dividido, de fluxo fácil e de coloração marrom-escuro. A análise preliminar do ESC em microscópio ótico revelou tratar-se de partículas de forma esférica, com características próprias de um extrato seco por aspersão.

5.1.2. Análise granulométrica do ESC

O laudo de qualidade que acompanhou o ESC utilizado neste trabalho, embora declare tratar-se de um extrato seco obtido por nebulização, não faz nenhuma menção às características granulométricas do mesmo. Em face disso e considerando que o tamanho das partículas em formas farmacêuticas pulveréas tem fundamental importância na garantia da uniformidade de dose, além de influir no perfil de dissolução, uma das primeiras ações tomadas foi a de caracterizar a granulometria do produto.

Entre os métodos de análise da distribuição granulométrica de pós, a microscopia ótica é aceita e usualmente empregada (WELLS, 1988). Os resultados da análise da distribuição granulométrica do ESC, realizada por microscopia ótica, adotando como critério de medida o diâmetro de Feret (LANTZ, 1990), encontram-se na tabela 9 e na figura 3.

Os resultados indicam um tamanho médio de partícula próximo de 3,5 μm , com distribuição não-normal, unimodal, com assimetria negativa, o que é frequentemente observado em distribuições granulométricas de pós, incluindo extratos secos obtidos por aspersão (WELLS, 1988; DE SOUZA, 1996).

Tabela 9. Análise granulométrica do extrato seco comercial (ESC), por microscopia óptica.

Intervalo de faixa granulométrica (μm)	Valor médio (μm)	Frequência relativa (%)
0 – 3,4	1,7	3,4
3,4 – 6,8	5,1	6,6
6,8 – 10,2	8,5	29,8
10,2 – 13,6	11,9	20,8
13,6 – 17,0	15,3	10,2
17,0 – 20,4	18,7	12,0
20,4 – 23,8	22,1	8,4
23,8 - 27,2	25,5	4,8
27,2 – 30,6	28,9	4,0
Total	-	100

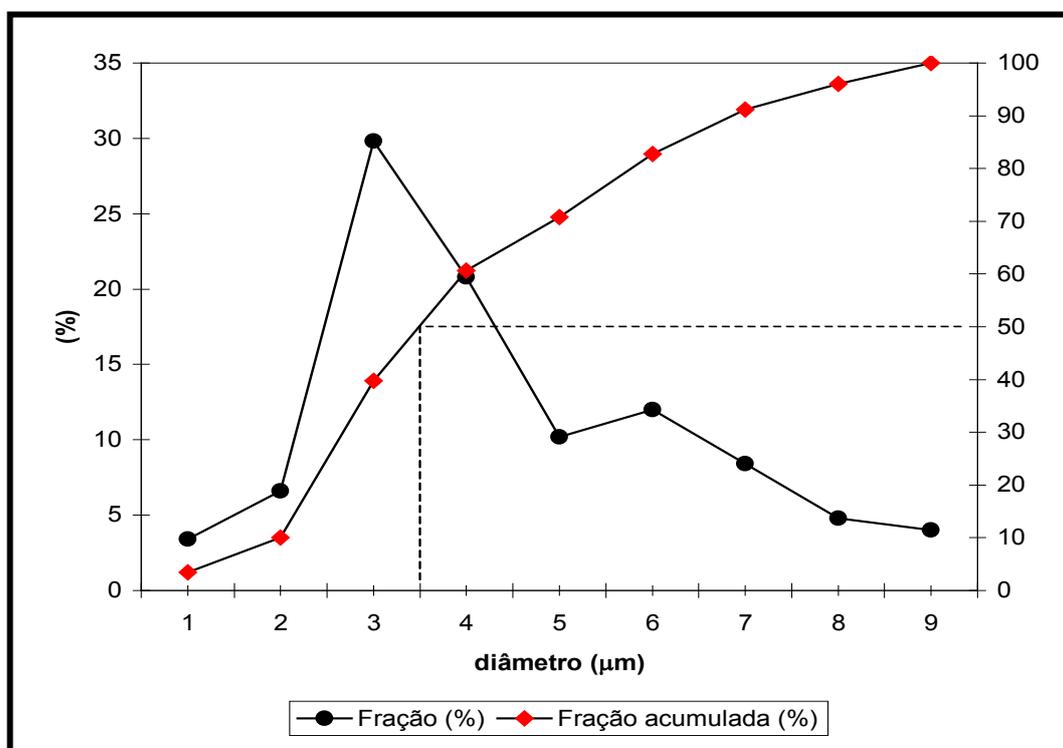


Figura 3. Distribuição granulométrica do extrato seco comercial (ESC), expressa em termos percentual e percentual acumulado.

5.2. Identificação e Controle de Qualidade para o Extrato Seco Comercial (ESC)

Uma das maiores dificuldades encontradas no estabelecimento de critérios de identificação da origem botânica e de qualidade para a DVSM e o ESC foi a obtenção de uma amostra autêntica da droga vegetal oficial, isto é, casca de *Uncaria tomentosa*, ou de uma amostra exsiccata da planta, já que se trata de vegetal inexistente na região sul. Diversas tentativas de obter uma amostra autêntica junto a vários herbários nacionais (UFRGS, UFMG e UFRJ) foram infrutíferas. Mais tardiamente, obteve-se uma amostra autêntica de partes aéreas junto à Estação Experimental da EMBRAPA, em LAVRAS-MG¹, que permitiu a identificação da amostra de DVSM como sendo da espécie *Uncaria tomentosa* DC.

Outro obstáculo enfrentado foi a semelhança da espécie *Uncaria tomentosa* com a *Uncaria guianensis* Willd. DC. A principal característica morfológica de diferenciação baseia-se na análise comparativa dos espinhos e folhas (TAYLOR, 2002). Sendo a droga vegetal oficial desprovida destes elementos de diferenciação, explica-se que a substituição de uma espécie pela outra seja um fato relatado na literatura. Na revisão apresentada por Taylor (2002), referente à abordagem etnobotânica e etnofarmacológica do gênero *Uncaria*, a autora discute este e outros problemas, ressaltando que as dificuldades para identificar corretamente as espécies do Gênero podem ter constituído um importante fator de erro na investigação e comprovação das suas indicações tradicionais. Pode-se acrescentar o fato da casca de *Uncaria tomentosa* ser comercializada no Brasil na forma de rasurado ou de pó, o que potencializa a oportunidade de substituição com *U. guianensis* ou de adulteração com caules e cerne do tronco. Esta possibilidade de substituição foi descartada na ocasião da identificação botânica da amostra de droga vegetal, porém, não contempla a possibilidade de adulteração do ESC devido à falta de estruturas celulares organizadas.

Perante a falta de características morfológicas de identificação procurou-se estabelecer critérios cromatográficos de identificação mediante análise comparativa utilizando amostras da droga vegetal comercializada no Brasil como casca de

¹ Pela identificação e auxílio, nosso agradecimento ao Curador do herbário Dr. Bot. Evandro José Linhares Ferreira.

Uncaria tomentosa e de uma pequena amostra autêntica de casca², procurando para isso utilizar sistemas cromatográficos já relatados na literatura.

5.2.1. Estabelecimento de critérios de identificação baseados na droga vegetal seca moída (DVSM)

A amostra recebida de matéria-prima vegetal rasurada consistiu em estruturas fibrosas alongadas, de aproximadamente 1 a 2 mm de diâmetro e 2 a 10 centímetros de comprimento, de cor amarelo-escuro. O seu aspecto foi não homogêneo, sendo possível discriminar a presença de fibras marrom-escuro misturadas a outras de tonalidade mais clara (figura 4).

Para fins analíticos, a amostra de matéria-prima vegetal rasurada foi moída em moinho de facas e o produto resultante identificado como droga vegetal seca moída (DVSM).

5.2.1.1. Análise por cromatografia em camada delgada da DVSM e do ESC

A caracterização por cromatografia em camada delgada é referida como requisito indispensável na identificação e caracterização de drogas vegetais (WAGNER e BLADT, 1996; WORLD, 1993). No presente trabalho, os sistemas cromatográficos testados basearam-se naqueles descritos no trabalho de VAN GINKEL (1997), quem os preconizou para a identificação de flavonóides e alcalóides. Estes sistemas foram codificados como SI, SII, SIII, SIV, SV, SVI, SVII, SVIII, SIX, SX (tabela 5 e 6).

Como substâncias de referência foram usados o alcalóide isomitrafalina, cuja ocorrência em *U. tomentosa* já fora anteriormente relatada (KEPLINGER e col., 1999; LAUS e col., 1994; GANZERA e col., 2001) e o flavonóide rutina, cuja ausência em *U. tomentosa* fora relatada como sendo um parâmetro de diferenciação

² Nossos agradecimentos à Profa. Dra. A.T. Henriques e à Profa. Dra. L.A. Mentz, ambas da UFRGS, pelo fornecimento e identificação da amostra autêntica.

entre as espécies *U. tomentosa* e *U. guianensis* por Van Ginkel (1997). Para a revelação dos flavonóides e dos alcalóides deu-se preferência a dois reagentes de uso relatado para *U. tomentosa*, especificamente, o reagente Natural-A a 0,5% (m/v) com solução metanólica de macrogol 400 a 5% , no caso dos flavonóides, e o reagente de Dragendorff, para alcalóides (VAN GINKEL, 1997).

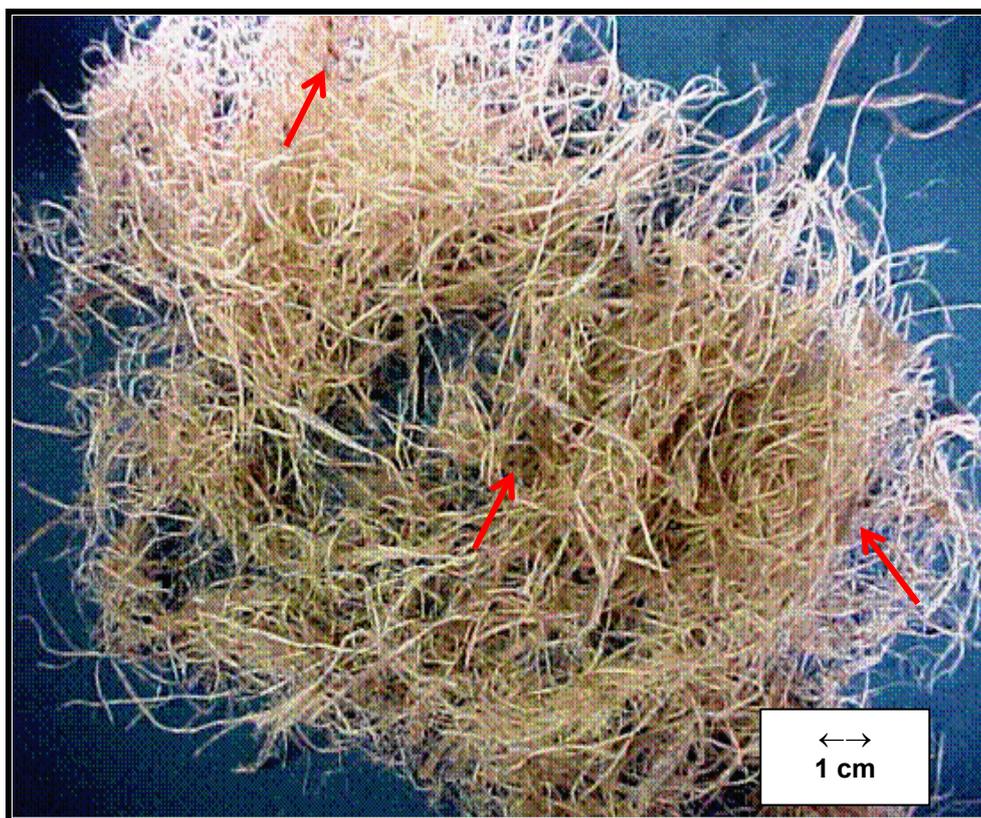


Figura 4. Aspecto macroscópico da DVSM adquirida no comércio como “casca de *Uncaria tomentosa*”. As setas indicam estruturas fibrosas de coloração mais escura.

Considerando a resolução e os valores de Rf das manchas dos padrões e das amostras utilizadas, o sistema **SV** foi o que apresentou os resultados mais satisfatórios na detecção dos alcalóides (figura 5), e o sistema **SX** na detecção dos flavonóides (figura 6), confirmando a preferência na escolha destes dois sistemas por Van Ginkel (1997).

No cromatograma da DVSM, obtido com o sistema **SV** e revelado com o reagente de Dragendorff, observam-se cinco manchas principais, das quais, quatro amarelo-alaranjadas (Rf 0,24; 0,53; 0,61 e 0,88) e uma mancha de cor azul, com valor de Rf de 0,49 (tabela 10). A mancha amarelo-alaranjada com valor de Rf 0,61

mostrou comportamento cromatográfico semelhante ao observado para o padrão de isomitrafalina.

De modo geral, o cromatograma obtido após revelação com reagente de Dragendorff coincide com a descrição feita por Van Ginkel (1997) para casca de *U. tomentosa*, exceto pela presença da mancha em Rf 0,88, que segundo a autora é de se esperar em amostras de outras espécies de *Uncaria*, mas não em *U. tomentosa*. Por sua vez, o cromatograma do extrato obtido por extração metanólica não mostrou diferenças significativas em relação ao obtido por extração ácido-base, quando esse mesmo sistema cromatográfico foi utilizado.

Contudo, cabe salientar que a autora acima referida fez uso de uma alcalinização prévia à extração da droga com metanol, o que, em parte, poderia explicar as discrepâncias parciais assinaladas neste trabalho.

Quanto ao cromatograma obtido com o ESC (figura 5), pôde-se perceber a presença de cinco manchas amarelo-alaranjadas (Rf 0,18; 0,24, 0,61; 0,70 e 0,89). As manchas de cor azul (Rf 0,49) e amarela (Rf 0,53) presentes na cromatografia da DVSM não foram observadas no ESC, porém, a mancha com Rf 0,61, correspondente à isomitrafalina, pôde ser facilmente identificada. Por sua vez, a amostra autêntica de casca de *U. tomentosa*, além das mesmas características cromatográficas assinaladas no ESC, apresentou uma mancha de cor verde (Rf 0,91) e duas manchas amarelas (Rf 0,53 e 0,05), revelando um maior número de coincidências em relação à descrição de Van Ginkel (1997), se comparada com a DVSM e ESC.

De modo geral, é possível afirmar que os três cromatogramas obtidos para a DVSM, ESC e amostra autêntica, embora apresentem diversas manchas em comum, guardam diferenças substanciais, destacando-se a mancha azul (Rf 0,49), observada apenas para a DVSM, e as duas manchas, uma esverdeada (0,91) e outra amarela (0,05), observadas apenas na amostra autêntica de casca de *U. tomentosa*.

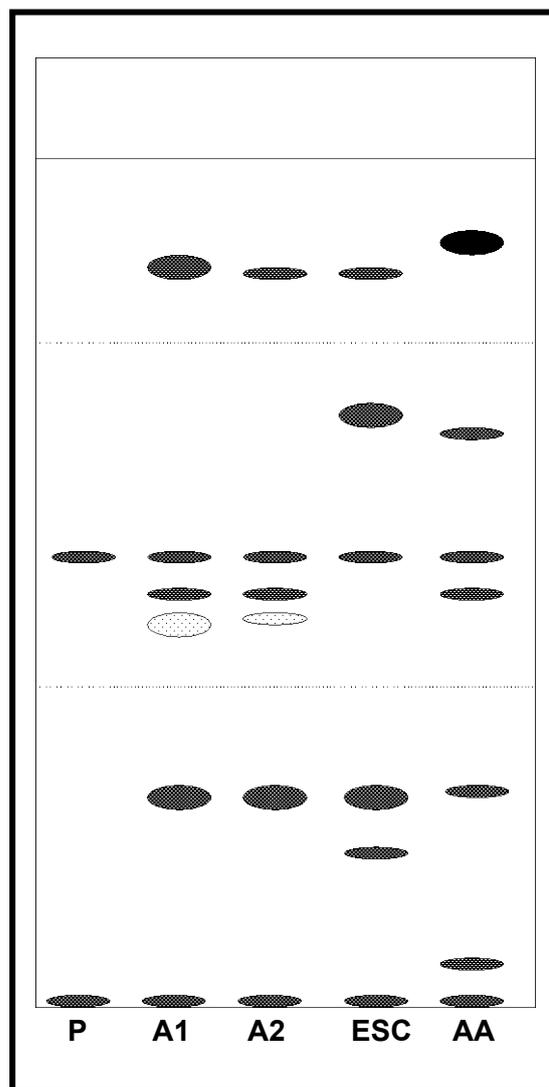


Figura 5. Cromatograma de *Uncaria tomentosa* para alcalóides. Sistema: SV: clorofórmio:etanol (60:40 v/v). **P**: padrão isomitrafalina; **A1**: DVSM obtida por extração ácido-base; **A2**: DVSM obtida com extração metanólica; **ESC**: extrato seco diluído com metanol; **AA**: amostra autêntica de casca de *U. tomentosa*. Distância de migração: 15 cm, revelador: reagente de Dragendorff, com leitura em 366 nm.

No cromatograma relativo à análise dos flavonóides da DVSM pelo sistema **SX**, utilizando reagente Natural-A (figura 6), observaram-se duas manchas de coloração azul (Rf 0,94 e 0,42) e seis manchas de coloração laranja (Rf 0,51; 0,49; 0,46; 0,36; 0,24 e 0,18) (tabela 11). Para esse mesmo sistema cromatográfico, o cromatograma do ESC mostrou duas manchas de cor azul (Rf 0,94 e 0,45) e cinco manchas de coloração laranja (Rf 0,66; 0,63; 0,51; 0,39 e 0,18).

A amostra autêntica apresentou duas manchas de cor azul (Rf 0,94 e 0,45) e três manchas de cor laranja (Rf 0,77; 0,51 e 0,18). Assim, partindo do princípio que os métodos de extração utilizados neste trabalho e por Van Ginkel (1997) foram os mesmos, as diferenças observadas podem ser atribuídas a matérias primas diferentes (casca com e sem cerne) ou a uma degradação química relacionadas às operações de moagem e extração-secagem, implícitas na obtenção da DVSM e do ESC.

Em todos os materiais investigados identificou-se uma mancha com Rf 0,51, com comportamento idêntico ao padrão rotina. Isto representa um forte ponto de discrepância, uma vez que a aut ora supracitada relata a ausência de rutina em *U. tomentosa* e preconiza, ao mesmo tempo, que esse flavonóide ocorre em um Rf de 0,18 em *U. guianensis*.

Tabela 10. Valores de Rf e cores das manchas observadas por CCD para os alcalóides, usando sistema SV e revelador de Dragendorff

Material pesquisado	Valor de Rf	Cor
Padrão isomitrafalina	0,61	Amarelo
DVSM	0,88; 0,61; 0,53; 0,24 0,49	Amarelo Azul
ESC	0,89; 0,70; 0,61; 0,24; 0,18	Amarelo
Amostra autêntica	0,91 0,89; 0,67; 0,61; 0,53; 0,24; 0,05	Verde Amarelo

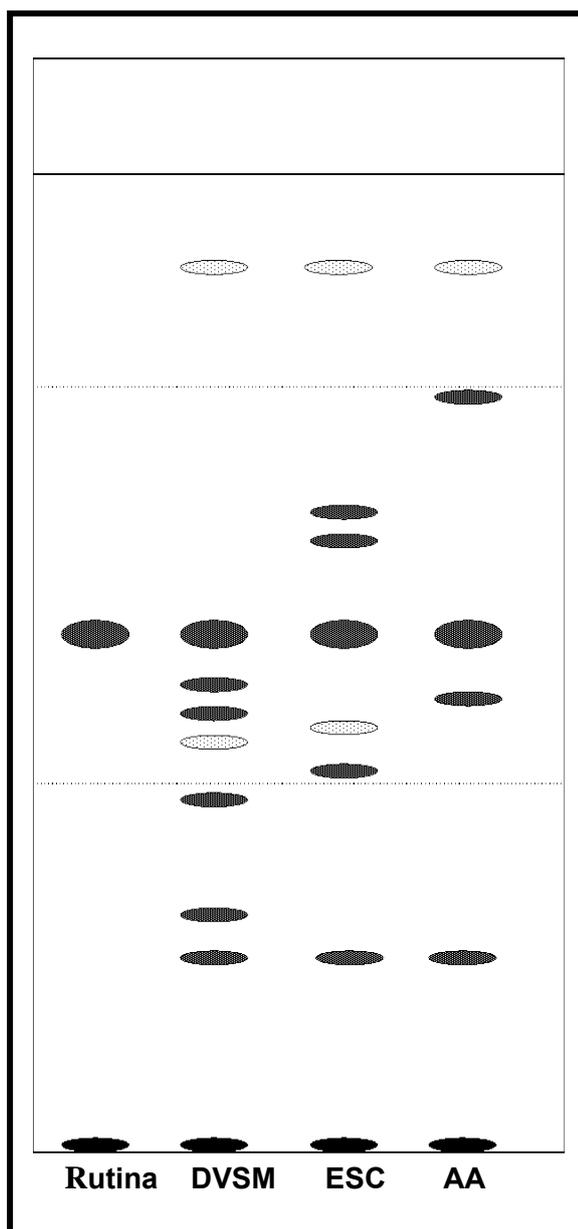


Figura 6. Cromatograma de *Uncaria tomentosa* para flavonóides obtido com o sistema **SX**: *n*-butanol:ácido acético:água (100:10:30) (v/v). **DVSM**: droga vegetal seca moída; **ESC**: extrato seco comercial; **AA**: amostra autêntica de casca de *U. tomentosa*. Cromatofolhas de gel de sílica 60 UV 254, tempo de saturação da cuba: 30 minutos, distância de migração: 14 cm, revelador solução metanólica de Reagente Natural A 0,5% (m/v) e solução etanólica de polietilenoglicol 400 a 5% (v/v) (366 nm).

Tabela 11. Valores de Rf e cores das manchas observadas por CCD para flavonóides usando Sistema X.

Material pesquisado	Valor de Rf	Cor
Padrão Rutina	0,51	Laranja
DVSM	0,94; 0,42 0,51; 0,49; 0,46; 0,36; 0,24; 0,18	Azul Laranja
ESC	0,94; 0,45 0,66; 0,63; 0,51; 0,39; 0,18	Azul Laranja
Amostra autêntica	0,94; 0,45 0,77; 0,51; 0,18	Azul Laranja

Comparando os cromatogramas das três amostras analisadas (DVSM, ESC e amostra autêntica) com o perfil relatado para *U. tomentosa* por Van Ginkel (1997), foi possível estabelecer a ocorrência em comum de três manchas principais, identificadas como alcalóides. Contudo, observa-se que a diferença entre a composição da fração de alcalóides da amostra autêntica e da DVSM não pode ser atribuída completamente à presença de cerne na amostra, uma vez que as composições dessa e da casca não puderam ser diferenciadas em estudos anteriores (REINHARD, 1999). Uma segunda alternativa a ser considerada diz respeito ao efeito térmico associado à moagem, o qual poderia, em última instância, desencadear um processo de degradação da fração dos alcalóides.

5.2.1.2. Análise granulométrica da DVSM

Embora não constitua um critério de qualidade farmacopéico, a análise da distribuição do tamanho de partícula da DVSM serve como parâmetro auxiliar na garantia da reprodutibilidade dos métodos analíticos, que compreendem a extração como parte integral do método. Sabidamente, a distribuição, o tamanho médio de

partícula e a superfície específica de drogas vegetais em pó têm uma relação direta com a homogeneidade e reprodutibilidade do processo extrativo (VOIGT, 1993).

Os resultados da análise granulométrica da DVSM (tabela 12) indicam uma faixa granulométrica predominante compreendida entre 0,420 e 0,106 mm, com diâmetro médio aproximado de 0,27 mm, que corresponde a 76,6 % do total da amostra (figura 7).

Tabela 12. Análise granulométrica da DVSM, mediante uso de tamises.

NA (mm)	CG (mm)	DM (mm)	IA (mm)	Fr (%)	FrR (%)	FrP (%)
0,42	> 0,42	-	-	6,9	6,9	93,1
0,3	0,42-0,3	0,36	0,12	28,5	35,4	64,6
0,25	0,3-0,25	0,275	0,05	3,2	38,6	61,4
0,106	0,25-0,106	0,178	0,144	44,9	83,5	16,5
0,082	0,106-0,082	0,094	0,024	13,4	96,9	3,1
Coletor	0,082-0	0,041	0,082	3,1	100	0

Nota: **AN**: abertura nominal de malha; **CG**: classe granulométrica; **DM**: diâmetro médio; **IA**: intervalo de abertura; **Fr**: fração tamisada; **FrR**: fração retida acumulada; **FrP**: fração de passagem acumulada.

5.2.1.3. Determinação do teor de umidade residual

A quantidade de água presente na droga vegetal seca está relacionada não somente à estabilidade dos constituintes químicos, mas também ao cálculo do teor de substâncias ativas. Assim, o teor de umidade residual é um parâmetro indicativo das condições de conservação das drogas vegetais.

Para o farmacógeno casca, os limites farmacopéicos de umidade residual são de 8 a 14% (FARMACOPÉIA, 1988). O teor de umidade residual determinado para a DVSM foi de $8,44 \pm 0,07$ % (CV%= 0,83), indicando que o mesmo obedece a esse critério farmacopéico estabelecido. Este valor foi levado em consideração no cálculo do teor de flavonóides e de alcalóides da DVSM.

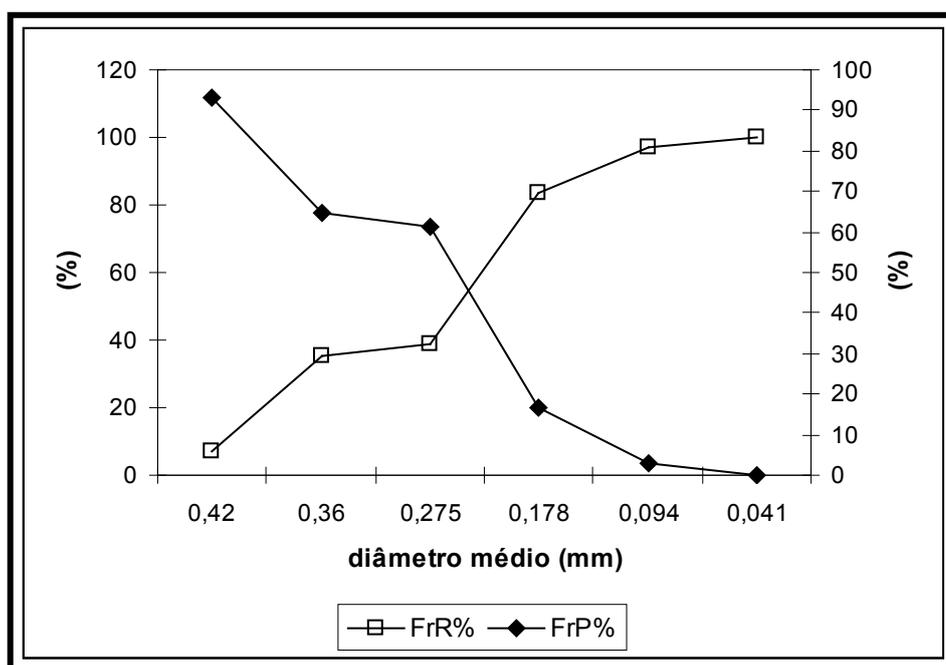


Figura 7. Análise granulométrica da DVSM em termos de fração retida percentual (FrR%) e fração de passagem percentual (FrP%).

5.2.1.4. Determinação do teor de extrativos

O teor de extrativos constitui um critério empírico de qualidade, que avalia o rendimento de extração de substâncias em um determinado solvente, podendo auxiliar na escolha de um líquido extrator adequado, ou, simplesmente, servir como parâmetro de avaliação das características das matérias-primas vegetais. O teor de extrativos calculado para DVSM, utilizando água como solvente, foi de $4,48 \text{ g}\% \pm 0,88$ ($\text{CV}\% = 4,23$).

5.2.1.5. Determinação do teor de flavonóides

A avaliação da qualidade da droga vegetal seca e das soluções pressupõe o doseamento do teor de substâncias ativas ou, no caso do seu desconhecimento, de substâncias cuja composição seja majoritária na espécie vegetal. No caso de *Uncaria tomentosa*, a literatura atribui a vários grupos de substâncias as atividades

terapêuticas relatadas, entre elas, os alcalóides, flavonóides e triterpenos (SANDOVAL-CHACON e col., 1998).

Entre os métodos de determinação do teor de flavonóides totais, os espectrofotométricos contam entre os mais difundidos. Esses métodos, geralmente, têm por fundamento a formação de complexos metálicos entre polifenóis e, principalmente, com cloreto de alumínio (MABRY e col., 1970). No presente trabalho, o teor de flavonóides foi determinado segundo métodos espectrofotométricos preconizados na literatura (ORTEGA, 1993; DEUTSCHES, 1992), com e sem hidrólise ácida dos heterosídeos flavonoídicos.

Os métodos espectrofotométricos propostos diferenciam-se basicamente na fase de extração, a qual pode, ou não, incluir uma etapa de hidrólise ácida simultaneamente à extração. No método preconizado por alguns códigos oficiais, como a Farmacopéia Alemã (DEUTSCHES, 1992), os heterosídeos flavonoídicos são hidrolisados com ácido clorídrico, enquanto se processa a extração sob refluxo dos mesmos. As agliconas resultantes são extraídas com solvente orgânico, normalmente acetato de etila, e posteriormente complexadas utilizando solução etanólica de cloreto de alumínio. O resultado disso é o deslocamento batocrômico da absorção máxima dos flavonóides para comprimentos de onda próximos à região de 400-450 nm. O teor de flavonóides totais é normalmente expresso em termos de rutina ou quercetina.

Diferentemente, no método sem hidrólise ácida (ORTEGA, 1993; DE SOUZA, 1996 e PETRY, 1999) a complexação e a leitura espectrofotométrica são feitas após extração e diluição direta da droga vegetal previamente extraída com solvente hidroalcoólico. Após adição de cloreto de alumínio e uso como *branco* da solução de leitura não-tratada com cloreto de alumínio, o teor de flavonóides totais é expresso em termos de um flavonóide (heterosídeo ou aglicona) como, por exemplo, quercetina, apigenina, sakuranetina, vitexina, entre outros (ORTEGA, 1993; PETRY, 1999).

Os resultados da determinação do teor de flavonóides por ambos os métodos espectrofotométricos estão apresentados na tabela 13.

Tabela 13. Teor de flavonóides totais (TFT) da DVSM, determinado pelos métodos espectrofotométricos com hidrólise e sem hidrólise.

Método	TFT (g%)	± dp	CV%
Com hidrólise (420 nm)	0,73	0,006	0,82
Sem hidrólise (315 nm)	0,53	0,002	0,37
Sem hidrólise (420 nm)	0,64	0,002	0,37

Embora os dois métodos tenham se mostrado precisos nos três comprimentos de onda de leitura utilizados, os teores de flavonóides totais calculados mostraram ser diferentes, uma vez que os comprimentos de onda de leitura, os valores de absorção específica e o efeito de interferentes foram diferentes. Uma situação análoga foi descrita por De Souza (1996) e Petry (1999) para a determinação do teor de flavonóides totais de folhas de *Passiflora edulis* Sims.

O espectro de varredura obtido para a solução de leitura da DVSM hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como *branco* a mesma solução sem cloreto de alumínio (figura 8), permite evidenciar um máximo de absorção em 420 nm, o qual é acompanhado de uma absorção secundária próxima a 480 nm. Com base no primeiro comprimento de onda, o teor de flavonóides totais foi de 0,73 g%, calculado como rotina.

Por sua vez, o espectro de varredura da solução de leitura da DVSM não hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como *branco* a mesma solução sem cloreto de alumínio (figura 9), mostrou máximos de absorção em 420 nm e 315 nm. Os teores calculados em ambos os comprimentos de onda foram de 0,53 g%, expresso como sakuranetina, e 0,64 g%, expresso como rutina, respectivamente. Cabe aqui esclarecer que a presença de sakuranetina não foi relatada para *U. tomentosa*. Porém, nas condições acima especificadas para a DVSM, esse flavonóide mostrou um comportamento análogo, adequando-se bastante bem para fins analíticos.

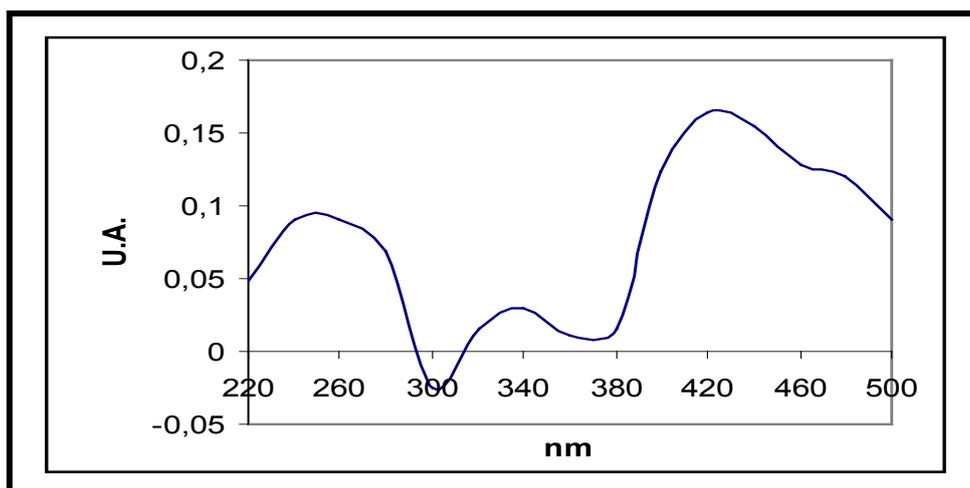


Figura 8. Espectro de varredura UV-VIS para a solução de leitura da DVSM hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como branco a mesma solução sem cloreto de alumínio.

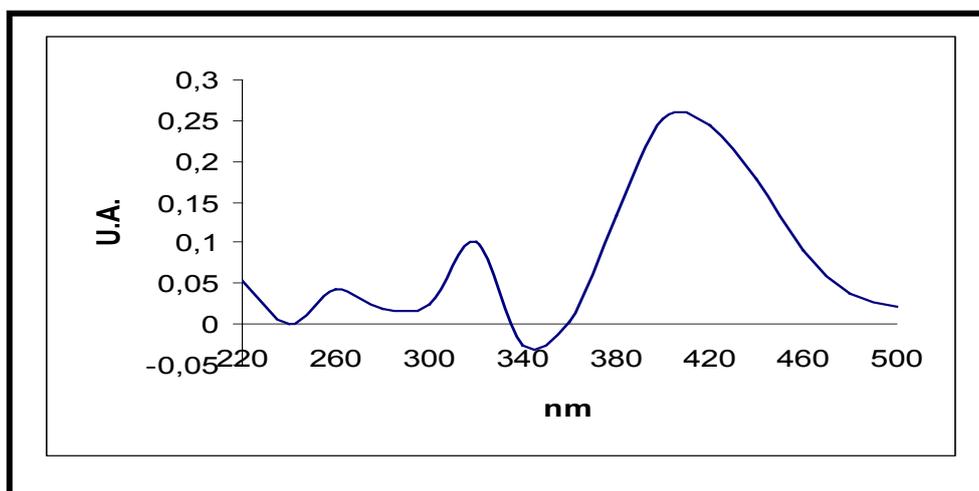


Figura 9. Espectro de varredura UV-VIS para a solução de leitura da DVSM não hidrolisada e adicionada de cloreto de alumínio, utilizando como branco a mesma solução sem cloreto de alumínio.

Os valores da absorção específica da sakuranetina e da rutina tinham sido calculados anteriormente por Silva (1999) e constam nas respectivas equações de cálculo. Observa-se que os teores de flavonóides calculados a partir desses valores foram diferentes e inferiores ao teor calculado pelo método de hidrólise ácida (0,73 g%).

Não foi possível estabelecer comparações entre os teores calculados e teores relatados na literatura para *Uncaria tomentosa*, dada a falta desses nos diversos trabalhos consultados.

5.2.1.6. Determinação do teor de alcalóides para a DVSM

No caso específico de *Uncaria tomentosa*, embora vários alcalóides tenham sido identificados na casca (KEPLINGER e col. 1999; GANZERA e col., 2001), aqueles disponíveis no mercado e que poderiam ser utilizados como substâncias de referência têm preço quase proibitivo. Por essa razão, na execução deste trabalho optou-se por utilizar apenas o alcalóide oxindólico pentacíclico isomitrafalina como substância de referência, que além de ser relativamente mais barato, constitui um dos alcalóides majoritários isolados de cascas de *U. tomentosa*.

Os resultados da determinação do teor de alcalóides totais para a DVSM pelos métodos espectrofotométricos estão apresentados na tabela 14.

Tabela 14. Teor de alcalóides totais da DVSM, determinado por espectrofotometria, com o método por extração ácido-base e com o método por extração metanólica.

Método	Teor (g%)	(\pm sd)	CV%
Extração ácido-base	0,25	0,004	2,56
Extração metanólica	0,55	0,006	1,05

O teor de alcalóides totais determinado para a DVSM mediante o método por extração ácido-base foi menor, se comparado com o obtido pela extração com metanol, ficando em evidência a diferença entre ambos os métodos. Um fator de diferenciação adicional pode estar relacionado à isomerização dos alcalóides em meio ácido e alcalino, fato já antes relatado na literatura para alcalóides de *U. tomentosa* (LAUS e col., 1994). Adicionalmente, a isomerização dos alcalóides de *U.*

tomentosa não foi observada em processos de extração metanólica anteriormente relatados (GANZERA e col., 2001).

Por essa razão, a extração diretamente com metanol surge como o método de extração de escolha e, ao mesmo tempo, torna obrigatória, para fins oficiais e de controle de qualidade, a declaração exata do método utilizado na extração da matéria-prima, assim como na produção de extratos secos e nas análises quantitativas deste vegetal.

O método espectrofotométrico de determinação do teor de alcalóides, embora seja um método rápido e simples, tem, contudo, como principal desvantagem a falta de especificidade, que torne o método capaz de identificar possíveis adulterações da DVSM com outras partes da planta, que não casca.

5.3. Doseamento do teor de flavonóides e alcalóides para o ESC

5.3.1. Determinação da perda por dessecação do ESC

A determinação da perda por dessecação do ESC indicou um teor de umidade residual de aproximadamente 7,6% (dp = 0,08; CV% = 1,11), que se mostra apropriado para a preparação de cápsulas, principal uso para o qual esse produto se destina. A perda por dessecação calculada também constitui um valor a ser inserido na fórmula de cálculo do doseamento do teor de flavonóides e de alcalóides no ESC.

5.3.2. Determinação do teor de flavonóides do ESC

Os resultados da determinação do teor de flavonóides para o ESC de *U. tomentosa*, pelos métodos espectrofotométricos com hidrólise e sem hidrólise, estão apresentados na tabela 15. Os valores calculados foram inferiores àqueles vistos para a DVSM, porém, conservam a mesma seqüência constatada nesse, isto é, o maior teor correspondeu ao método por hidrólise, seguido do teor calculado como

rotina pelo método sem hidrólise. Outros comentários que poderiam ser levantados coincidem com os feitos antes no item destinado à *Determinação do teor de flavonóides* da DVSM.

Tabela 15. Determinação do teor de flavonóides totais (TFT) do ESC, determinado espectrofotometricamente pelos métodos com e sem hidrólise.

Método	TFT (g%)	Desvio padrão (± dp)	CV%
Com hidrólise (420 nm)	0,32	0,004	1,37
Sem hidrólise (315 nm)	0,24	0,006	2,59
Sem hidrólise (420 nm)	0,29	0,006	2,59

5.3.3. Determinação do teor de alcalóides do ESC

Os resultados da determinação espectrofotométrica do teor de alcalóides totais para o ESC de *U. tomentosa* estão apresentados na tabela 16.

Em comparação com a DVSM, o teor de alcalóides determinado para o ESC foi comparativamente menor, independente do método utilizado, o que coincide com os resultados antes observados para o teor de flavonóides.

Tabela 16. Determinação espectrofotométrica do teor de alcalóides totais para o ESC

Método	Teor de alcalóides totais (g%)	Desvio padrão (± dp)	CV%
Extração ácido-base	0,23	0,08	0,71
Extração metanólica	0,47	0,04	0,66

5.3.4. Resultados de outros testes realizados sobre o ESC

Além dos testes anteriormente abordados, durante a realização deste trabalho foram conduzidos testes adicionais, de modo a avaliar mais detidamente a qualidade, assim como possíveis efeitos devidos a uma carga microbiana excessiva no extrato seco comercializado (ESC). Os resultados desses testes estão descritos na tabela 17.

Tabela 17. Comparação dos testes declarados pelo fornecedor para o ESC, com os resultados relatados no presente trabalho.

Teste	Especificação	Resultado declarado pelo fornecedor	Resultado encontrado
Descrição	Pó marrom avermelhado com leve odor característico e sabor amargo	De acordo	De acordo
pH	4,0 – 6,0	4,88	4,64
Perda por dessecação	No máximo 6,0%	1,65%	7,6%
<i>Controle microbiológico</i>			
Contagem total para bactérias	No máximo 1.000 ufc/g	Menor que 1.000 ufc/g	550 ufc/g
Contagem total para fungos	No máximo 100 ufc/g	Menor que 100 ufc/g	34 ufc/g
Patógenos			
<i>E. coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>S. aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>P. aeruginosa</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella sp.</i>	Ausente	Ausente	Ausente

Nota: ufc/g = unidades formadoras de colônias por grama

5.4. Validação do método de determinação do teor de alcalóides por espectrofotometria UV

Com base em testes preliminares e no teor de alcalóides totais determinados para a DVSM e ESC, o líquido extrator de escolha foi o metanol. O processo de extração dos alcalóides empregando metanol tem a vantagem de extrair os

alcalóides tanto na forma livre quanto na forma de sais, devido à polaridade elevada do metanol (SHARAPIN, 2000).

5.4.1. Determinação do comprimento de onda de leitura

O máximo de absorção determinado para a DVSM, ESC e extrato liofilizado deu-se no comprimento de onda de 340 nm. O padrão isomitrafalina apresentou perfil diferenciado, tendo máximo de absorção em 285 nm.

Testes de linearidade

A linearidade do método de determinação do teor de alcalóides totais foi testada mediante a análise dos coeficientes de determinação, linear (interseção) e angular (inclinação), ANOVA da regressão e análise de resíduos pelo teste de Durbin-Watson.

Os resultados para a análise de regressão linear da curva padrão encontram-se nas tabelas 18 e 19.

Tabela 18. Valores referentes à curva padrão da isomitrafalina, em 285 nm.

Concentração (µg/mL)	Média ± dp (U.A.)	CV (%)
5	0,359 ± 0,002	1,08
7,5	0,486 ± 0,002	0,84
10	0,650 ± 0,003	0,64
12,5	0,861 ± 0,007	0,51
15	1,013 ± 0,004	0,48

*Cada valor de absorvância é média de três determinações.

Pela análise de regressão linear, a equação da reta obtida foi:

$$y = 0,0006 + 0,06732 x,$$

com um valor de $R^2 = 0,9937$. Não há indícios de tendência à correlação nem de erro sistemático constante, a julgar pelos valores do teste de Durbin-Watson e pela análise dos limites de confiança do coeficiente linear (intercepto).

Teste de repetibilidade

Os resultados do teste de repetibilidade mostraram, para um valor médio de 0,568 U.A., um desvio padrão de 0,006 U.A., o que corresponde a um CV% de 1,06 e, conseqüentemente, dentro das exigências usuais para este tipo de método.

Tabela 19. Valores da análise de regressão linear para isomitrafilina, em 285nm.

Coefficiente	Valor	E.P.	teste t (coeficientes)	P(0,05)	LC inf.	LC sup.
Linear	0,0006	0,0327	0,01833	0,9863	-0,1036	0,1048
Angular	0,06732	0,0031	21,8130	0,0002	0,0575	0,0771

G.L.: = 4, $R^2 = 0,9937$; Erro padrão (regressão) = 0,02440; F(regressão) = 475,81;
 $P_{\text{regressão}, 0,05} = 0,00021$. Durbin-Watson = DW 1,6431 > DW_{crit, 0,05} 1,40

Observação: LC sup. = limite de confiança superior; LC inf. = limite de confiança inferior

Os resultados do teste de precisão intermediária do método de espectrofotométrico por UV, aplicado ao ESC, considerando valores analíticos para dois dias consecutivos, com o mesmo analista, mesmo instrumento e uma mesma solução, estão apresentados na tabela 20. Para as condições experimentais selecionadas, os resultados permitem afirmar que o método é preciso em termos de validação.

Tabela 20. Resultados do teste de precisão intermediária interdias para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm

Amostra	Absorvância 1º dia e 2º dia
Amostra 1	0,558 / 0,576
Amostra 2	0,571 / 0,557
Amostra 3	0,575 / 0,560
Amostra 4	0,563 / 0,556
Amostra 5	0,574 / 0,567
Amostra 6	0,568 / 0,564
Média	0,568 / 0,563
Desvio padrão	0,006 / 0,007
CV%	1,06% / 1,24%

Teste de exatidão

O teste de recuperação, medida da exatidão do método espectrofotométrico por UV, foi aplicado utilizando ESC, considerando valores analíticos obtidos pelo

mesmo analista, mesmo instrumento e aplicado a uma mesma solução. Os resultados respectivos estão apresentados na tabela 21.

Tabela 21. Resultados do teste de recuperação para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm.

Nº da amostra	Conc. teórica	Absorvância	Conc. exper.	% recuper.
1	80%	0,44	79%	101,27
2	85%	0,47	83,33%	102
3	90%	0,51	90,5%	99,45
4	95%	0,54	96,15%	98,80
5	100%	0,56	98,71%	101,31
6	105%	0,59	105,12%	99,89
7	110%	0,61	108,97%	100,95
8	115%	0,64	114,10%	100,79
9	120%	0,67	120,51%	99,58
Soma				904,04
Média				100,45%
Desvio padrão				1,054
CV%				1,059

Nota: Conc.: concentração; exper.: experimental; %recuper.: percentual de recuperação

Teste de robustez

Os resultados do teste de robustez do método analítico para o ESC de *Uncaria tomentosa* estão apresentados na tabela 22.

Entre os fatores de variação escolhidos, isto é, pH e temperatura da solução de leitura, solventes de procedência diferentes e comprimento de onda, merecem destaque os dois primeiros por causa da variação que esses provocam. Considerando que as substâncias de interesse são bases fracas, o feito do pH é possível de ser explicado de modo plausível em termos de dissociação da base livre. A variação observada nos resultados em função da variação da temperatura é, porém, mais difícil de explicar.

5.5. Determinação do Teor de Alcalóides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para o doseamento dos alcalóides totais por CLAE foi tomado como ponto de partida o método preconizado por GANZERA e col. (2001), expressando os teores de alcalóides individuais e totais como isomitrafalina. Com isto, pretendeu-se estabelecer um método de referências, tido como mais sensível e mais específico do que os métodos espectrofotométricos (Figura 10).

Tabela 22. Resultados do teste de robustez para o método espectrofotométrico do ESC, em 285 nm.

pH da solução de leitura	Absorvância
5,0	0,334
10,0	0,201
6,0	0,558
Média	0,364
Desvio padrão	0,180
CV%	49,45%
Temperatura da solução de leitura	Absorvância
40 °C	0,116
6 °C	0,407
28 °C	0,553
Média	0,358
Desvio padrão	0,222
CV%	62,01%
Solvente (metanol)	Absorvância
Fabricante 1	0,554
Fabricante 2	0,543
Fabricante 3	0,559
Média	0,550
Desvio padrão	0,008
CV%	1,45%
Comprimento de onda	Absorvância
285 nm	0,550
280 nm	0,528
300 nm	0,510
Média	0,529
Desvio padrão	0,020
CV%	3,78%

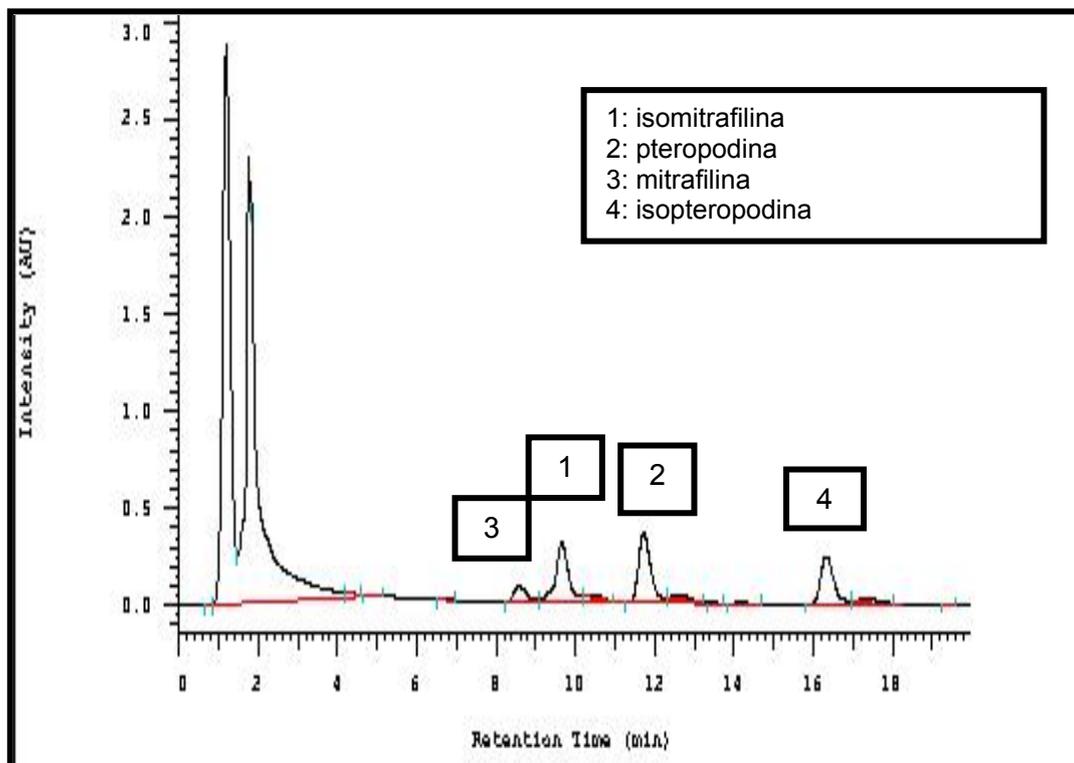


Figura 10. Cromatograma da separação dos alcalóides de ESC de *Uncaria tomentosa* por CLAE.

O teor calculado para o pico da isomitrafalina foi de 5,14 mg/g, enquanto que a análise efetuada utilizando o somatório dos picos, como equivalente a teor de alcalóides totais expressos em isomitrafalina, foi de 14,58 mg/g.

5.5.1. Validação do método por CLAE

5.5.1.1. Curva de calibração para substância de referência

Os dados relativos à curva de calibração encontram-se na tabela 23 e na figura 11, a partir dos quais foi realizada a análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados e a validação da linearidade.

Tabela 23. Curva de calibração por CLAE para a isomitrafilina

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	Área dos picos
5,0	132379
7,5	251312
10,0	287996
12,5	354290
15,0	413846

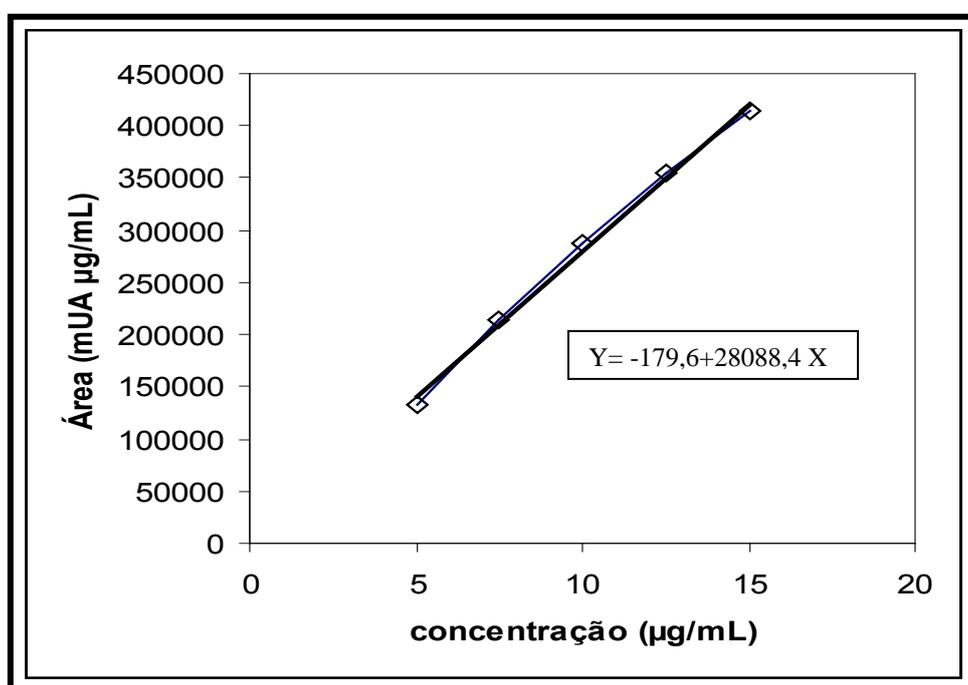


Figura 11. Curva de calibração para a substância de referência isomitrafilina, com a respectiva equação da reta obtida por regressão linear.

Os dados relativos aos parâmetros coeficiente de determinação, desvio padrão da regressão, F da regressão, assim como dos coeficientes linear e angular com os respectivos limites de confiança encontram-se na tabela 24. Pela análise dos mesmos, não foi observada nenhuma anomalia que indicasse erro sistemático constante ou tendência à autocorrelação, de modo que a linearidade da curva-padrão foi tida como validada.

Tabela 24. Parâmetros utilizados na validação da linearidade do método por CLAE.

Parâmetro	Valores
R-Quadrado	0,99595
Erro padrão	8174,13
$F_{(3; 0,05)}$	738,0
Interseção	-179,6
Limites da interseção	-35080,7 a 34721,47
Inclinação	28088,44
Limites da inclinação	24797,94 a 31378,94
Durbin-Watson ($DW_{crit., 0,05} = 1,4$)	2,426

5.5.1.2. Teste de repetibilidade para o método de CLAE aplicado ao ESC.

Os resultados do teste de repetibilidade, considerando a área do pico da isomitrafalina e a somatória das áreas relativas aos picos da isomitrafalina, mitrafalina, pteropodina e isopteropodina, para dias diferentes de análise, estão apresentados na tabela 25.

O valor médio para a precisão intermediária foi de 0,79%, referenciado ao pico de isomitrafalina, e de 0,31% para o somatório dos picos.

Os resultados obtidos demonstram que o método apresenta repetibilidade, para as condições experimentais adotadas em dois dias consecutivos de análise.

Tabela 25. Resultados da precisão intermediária do ESC pelo método de CLAE, no 1º e 2º dia de análise.

1º dia				
Amostras	Valores para isomitrafalina		Valores para a soma dos picos	
	Área	Conc.	Área	Conc.
Amostra 1	148029	5,14	419898	14,58
Amostra 2	146589	5,09	419898	14,58
Amostra 3	148317	5,15	421626	14,64
Amostra 4	144573	5,02	419034	14,55
Amostra 5	145725	5,06	419322	14,56
Amostra 6	146589	5,09	421338	14,63
Média mg% (± dp) CV %	5,09 mg/g ± 0,04 0,94%		14,59 mg/g ± 0,03 0,24%	

2º dia				
Amostras	Valores para isomitrafalina		Valores para a soma dos picos	
	Área	Conc.	Área	Conc.
Amostra 1	148029	5,14	419322	14,56
Amostra 2	148605	5,16	418170	14,52
Amostra 3	148605	5,16	419034	14,55
Amostra 4	147165	5,11	420186	14,59
Amostra 5	146877	5,10	421914	14,65
Amostra 6	146301	5,08	422202	14,66
Média mg% (± dp) CV %	5,12 mg/g ± 0,03 0,64%		14,58 mg/g ± 0,05 0,38%	

5.5.1.3. Teste de exatidão para o método de CLAE aplicado ao ESC.

Os resultados do teste de exatidão, considerando a área do pico da isomitrafalina e a somatória das áreas relativas aos picos da isomitrafalina, mitrafalina, pteropodina e isopteropodina, estão apresentados na tabela 26.

A média dos valores de exatidão para o doseamento de isomitrafalina foi de 99,95% e para o doseamento de alcalóides totais expressos como isomitrafalina foi

de 100,44%, não tendo nenhum valor excedido a margem de 2% (98 a 102%) na recuperação. Novamente, os resultados não indicam nada em contrário à validação do método neste quesito.

Tabela 26. Resultados do teste de exatidão do ESC pelo método de CLAE

Nº da amostra	Conc. teórica	Valores para isomitrafilina		Valores para alcalóides totais	
		Conc. Exper.	% Recup.	Conc. Exper.	% Recup.
1	80%	80,80%	98,77	79,23%	100,97
2	85%	86,21%	98,6	83,85%	101,37
3	90%	91,25%	98,63	88,66%	101,51
4	95%	93,65%	101,44	93,24%	101,89
5	100%	101,14%	98,87	98,79%	101,22
6	105%	103,56%	101,39	106,70%	98,41
7	110%	109,32%	100,62	110,93%	99,16
8	115%	114,65%	100,31	114,81%	100,17
9	120%	118,95%	100,88	120,88%	99,27
Média			99,95		100,44

Observação: conc. = concentração; conc. exper. = concentração experimental; % Recup. = recuperação percentual.

5.5.1.4. Teste de robustez para o método de CLAE aplicado ao ESC.

Os resultados do teste de robustez do método analítico por CLAE para o ESC estão apresentados na tabela 27.

Entre os fatores de variação selecionados, quais sejam: comprimento de onda, fluxo do sistema, pH da solução, lote de coluna, temperatura e composição do eluente, os maiores efeitos foram assinalados para o pH e temperatura. Uma vez que os alcalóides são bases fracas, a variação entre os resultados é facilmente explicada mediante o efeito do pH no grau de dissociação molecular. Os valores apresentados com a variação da temperatura não foram representativos já que a temperatura utilizada variou 3 °C acima e abaixo da temperatura executada na análise. No caso do teste de robustez para o método espectrofotométrico a variação foi significativa, porém a temperatura utilizada foi extrema. Além de um improvável

decréscimo na solubilidade dos alcalóides nos diferentes meios (fato não testado no presente trabalho) não foi possível estabelecer nenhuma conclusão plausível que explique esse fenômeno.

Tabela 27. Resultados do teste de robustez do ESC pelo método de CLAE

Comprimento de onda	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
245 nm	146877	5,10	419898	14,58
243 nm	143422	4,98	411834	14,30
247 nm	139102	4,83	410394	14,25
Média (mg%) ± dp	4,97 mg/g ± 0,13		14,37 mg/g ± 0,17	
CV%	2,61%		1,18%	
Fluxo (mL/min)	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
0,75	146877	5,10	419898	14,58
0,5	144573	5,02	419610	14,57
1,0	145725	5,06	415866	14,44
Média (mg%) ± dp	5,06 mg/g ± 0,04		14,53 mg/g ± 0,07	
CV%	0,79%		0,53%	
pH da amostra	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
6	146877	5,10	419898	14,58
5	58463	2,03	129310	4,49
8	40607	1,41	109150	3,79
Média (mg%) ± dp	2,84 mg/g ± 1,97		7,62 mg/g ± 6,03	
CV%	69,57%		79,22%	
Lote da coluna	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
1°	146877	5,10	419898	14,58
2°	148029	5,14	412698	14,33
3°	147453	5,12	417018	14,48
Média (mg%) ± dp	5,12 mg/g ± 0,02		14,46 mg/g ± 0,12	
CV%	0,39%		0,86%	
Temperatura	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
25 °C	146877	5,10	419898	14,58
28 °C	144861	5,03	416730	14,47
35 °C	126142	4,38	415002	14,41
Média (mg%) ± dp	4,83 mg/g ± 0,39		14,48 mg/g ± 0,08	
CV%	8,21%		0,59%	
Composição da fase móvel	Valor para isomitrafilina		Valor para alcalóides totais	
	Área	Conc.	Área	Conc.
65/35	146877	5,10	419898	14,58
60/40	143134	4,97	419322	14,56
70/30	144285	5,01	415578	14,43
Média (mg%) ± dp	5,02 mg/g ± 0,06		14,52 mg/g ± 0,08	
CV%	1,31%		0,55%	

Observação: conc = concentração

5.6 Validação do sistema cromatográfico

Os parâmetros avaliados para esta finalidade encontram-se resumidos na tabela 28, os quais foram referenciados ao pico da isomitrafalina.

Tabela 28. Parâmetros de validação do sistema de separação por CLAE, tendo como referência o pico assinalado para a isomitrafalina.

Pico	TR (min)	RS	N	K'	α
1	9,74	7 ² e 4,8 ³	16.179	26,71	1,21

Observação: TR: tempo de retenção; RS: resolução (²: considera o pico 2 – pteropodina; ³: considera o pico 3 – mitrafalina); N: número pratos teóricos; K': fator de capacidade e α : fator de separação.

5.7. Padronização do Extrato Liofilizado

No presente trabalho, foi incluída uma etapa adicional de obtenção de um extrato liofilizado que pudesse servir como extrato padronizado, dada a escassez e elevado preço dos alcalóides isolados. Para isso, deu-se atenção àquelas etapas julgadas como as mais críticas na padronização do liofilizado.

5.7.1. Caracterização da solução extrativa

Para a realização dos ensaios de caracterização da solução extrativa, foram verificadas algumas propriedades relevantes para a sua caracterização tecnológica, entre as quais a determinação do resíduo seco, do pH e densidade.

A determinação do resíduo seco expressa a concentração de sólidos solúveis na solução extrativa, servindo de referência para a obtenção do rendimento ponderal do processo extrativo, como também para o cálculo do rendimento após o procedimento de secagem (DE SOUZA, 1996). O resíduo calculado foi igual a $1,88 \pm 0,03$ (CV% = 1,59).

Os resultados da determinação do pH e da densidade da solução extrativa de *U. tomentosa* são apresentados na tabela 29.

Tabela 29. Densidade e pH da solução extrativa, obtida com uma proporção droga: solvente de 1:10 (m/v).

Densidade relativa \pm dp	CV%	pH \pm dp	CV%
1,001 \pm 0,001	0,08	5,26 \pm 0,09	1,70

5.7.2. Caracterização do extrato liofilizado

Liofilização é um método que permite a secagem de um corpo após prévia congelação, removendo-se a água congelada, por sublimação, sem que o gel formado passe ao estado líquido (PRISTA e col., 1981). O teor de água residual determinado (Tabela 30) está dentro do valor-limite de 4% , estabelecido para extratos secos pela Farmacopéia Brasileira (FARMACOPÉIA, 1988).

Tabela 30. Resultado da perda por dessecação do liofilizado

Média	3,49%
Desvio Padrão	0,128582
CV%	3,68

A caracterização qualitativa do perfil de alcalóides do liofilizado foi efetuada por CCD, com o intuito de verificar possíveis alterações devidas ao processo de liofilização. Para isso, foram utilizadas as mesmas condições experimentais descritas para a DVSM. O padrão de manchas e os valores de Rf observados na DVSM e no extrato liofilizado mostraram ser comparáveis.

Para uma avaliação mais acurada da influência do processo de liofilização do extrato, foi quantificado o teor de flavonóides e de alcalóides totais por métodos espectrofotométricos. No caso do primeiro utilizaram-se os métodos com e sem hidrólise, já descritos para a DVSM. Os resultados do teor de flavonóides encontram-se descritos na tabela 31.

Tabela 31. Resultado da determinação do teor de flavonóides totais com e sem hidrólise, pelo método espectrofotométrico, para o extrato liofilizado.

Método	Teor de Flavonóides totais (g%)	Desvio padrão (\pm dp)	CV%
Com hidrólise	2,62	0,02	0,73
Sem hidrólise	1,40	0,04	1,73

Para a determinação do teor de alcalóides totais pelo método espectrofotométrico foi utilizado o metanol como solvente e o alcalóide oxindólico pentacíclico isomitrafalina como padrão de referência (GANZERA e col., 2001). Os resultados encontram-se expressos na Tabela 32.

Tabela 32. Resultado da determinação do teor de alcalóides totais do extrato liofilizado utilizando método espectrofotométrico.

Método	Teor de Alcalóides totais (g%)	Desvio padrão (\pm dp)	CV%
Extração ácido-base	0,77	0,03	1,12
Extração metanólica	1,80	0,07	0,85

O método baseado na extração metanólica do liofilizado apresentou maiores teores de alcalóides do que o baseado na extração ácido-base, repetindo os resultados anteriormente descritos neste trabalho para a DVSM e o ESC.

O perfil dos alcalóides presentes no extrato liofilizado foi avaliado por CLAE (Figura 12).

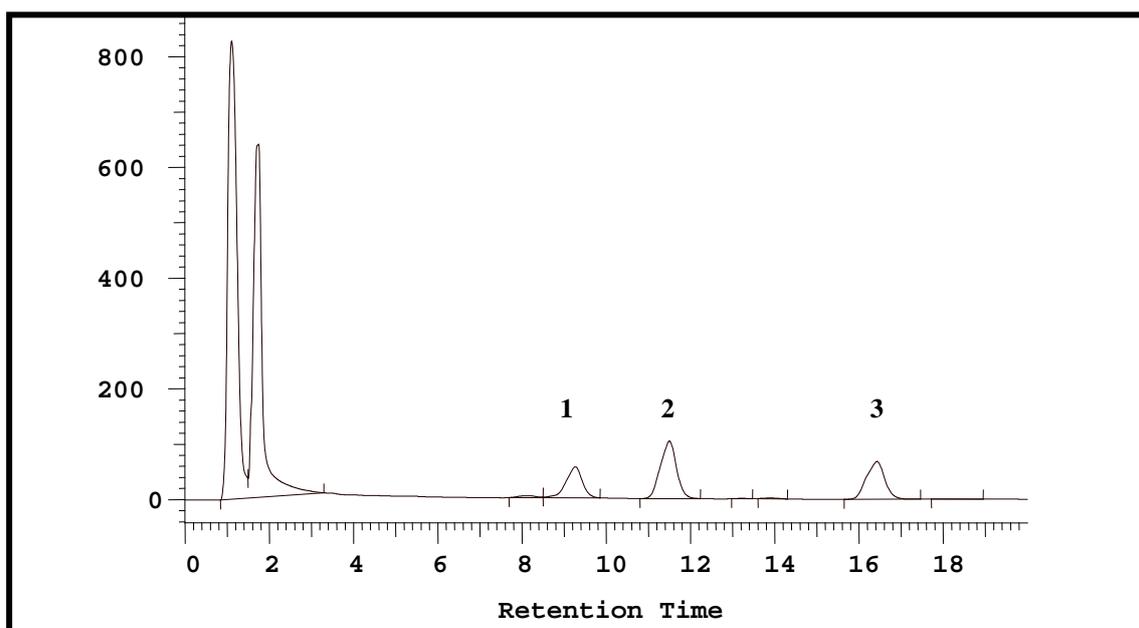


Figura 12. Doseamento dos alcalóides totais do liofilizado por CLAE

No cromatograma são observados somente três picos, identificados como isomitrafalina (pico 1), pteropodina (pico 2) e isopteropodina (pico 3), o que se diferencia do cromatograma antes descrito para o ESC.

Com a finalidade de resumir os resultados encontrados nas análises anteriormente relatadas utilizando métodos espectrofotométricos, os teores de alcalóides e de flavonóides para a DVSM, liofilizado e ESC estão relacionados nas tabelas 33 e 34.

Tabela 33. Resultado da determinação do teor de alcalóides totais da DVSM, liofilizado e ESC utilizando método espectrofotométrico.

Método	Teor de alcalóides totais (g%) DVSM	Teor de alcalóides totais (g%) Liofilizado	Teor de alcalóides totais (g%) ESC
Extração ácido-base	0,25	0,77	0,23
Extração metanólica	0,55	1,80	0,55

Tabela 34. Resultado da determinação dos teores de flavonóides totais da DVSM, liofilizado e ESC, determinados espectrofotometricamente.

Método	Teor de flavonóides totais (g%) DVSM	Teor de flavonóides totais (g%) Liofilizado	Teor de flavonóides totais (g%) ESC
Com hidrólise (420 nm)	0,73	2,62	0,32
Sem hidrólise (315 nm)	0,53	1,40	0,24
Sem hidrólise (420 nm)	0,64	-	0,29

5.8. Estudo preliminar de estabilidade do ESC

A estabilidade do ESC foi avaliada preliminarmente mediante análise comparativa do perfil da fração alcaloídica, por CLAE, quando exposto à luz UVC. Com isso objetivou-se estabelecer critérios que permitam diferenciar os produtos de degradação dos alcalóides originalmente presentes. As análises foram realizadas considerando períodos de exposição de 24 horas, 7, 14, 21, 30, 45, 60 e 90 dias. A figura 13 descreve o perfil dos alcalóides no final dos 90 dias de teste de estabilidade à luz UVC.

O ESC, no final dos 90 dias, apresentou teores de 4,95 mg/g de isomitrafalina e de 14,76 mg/g de alcalóides totais, expressos como isomitrafalina, que não se diferenciam daqueles determinados no ESC original.

Quando comparado com o cromatograma original do ESC, não foram observadas alterações significativas, o que, contudo, não pode ser afirmado quando o perfil após 90 dias é comparado, por exemplo, com o do extrato liofilizado (figura 12). Neste caso fica evidente o surgimento de, pelo menos, três picos adicionais.

Tendo essa observação por fundamento, parece provável que uma maior multiplicidade de picos, como o observado na figura 13, seja um indicativo de degradação desencadeada pela exposição à luz ultravioleta.

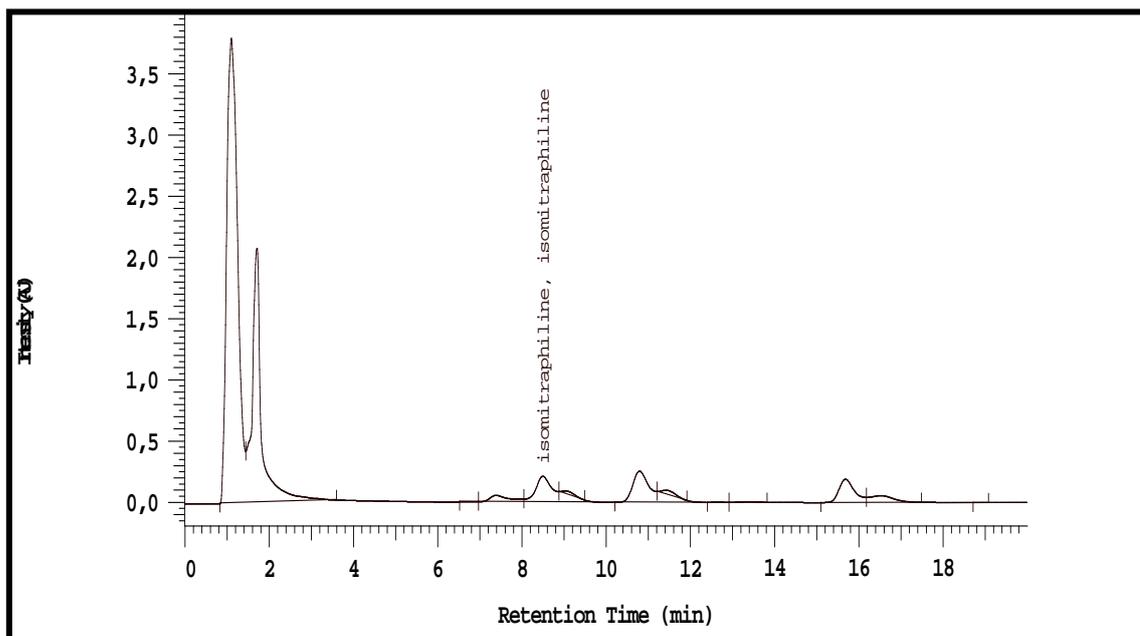


Figura 13. Perfil dos alcalóides do ESC após exposição à luz UVC por 90 dias.

5.9. Cápsulas contendo ESC de *Uncaria tomentosa*

A forma farmacêutica escolhida para o ESC de *Uncaria tomentosa* foi cápsulas de gelatina dura, por se tratar de forma farmacêutica usada na empresa e cujo processo de produção já se encontra validado.

A determinação do peso médio das cápsulas está descrita na tabela 35.

Tabela 35. Determinação do peso médio das cápsulas

Peso médio	445,75 mg
Limite	480,3 mg
Limite	410,6 mg
Desvio padrão	± 8,52 mg
CV%	1,90

O tempo médio de desintegração das cápsulas foi de 15,2 minutos.

O teste de estabilidade térmica realizado com as cápsulas contendo extrato seco foi efetuado em condições forçadas de armazenamento, com o propósito de

monitorar as reações de degradação. O tempo do estudo foi de 90 dias e as análises foram efetuadas no tempo zero, no final de 30, 60 e 90 dias. O resultado final do experimento é ilustrado na figura 14.

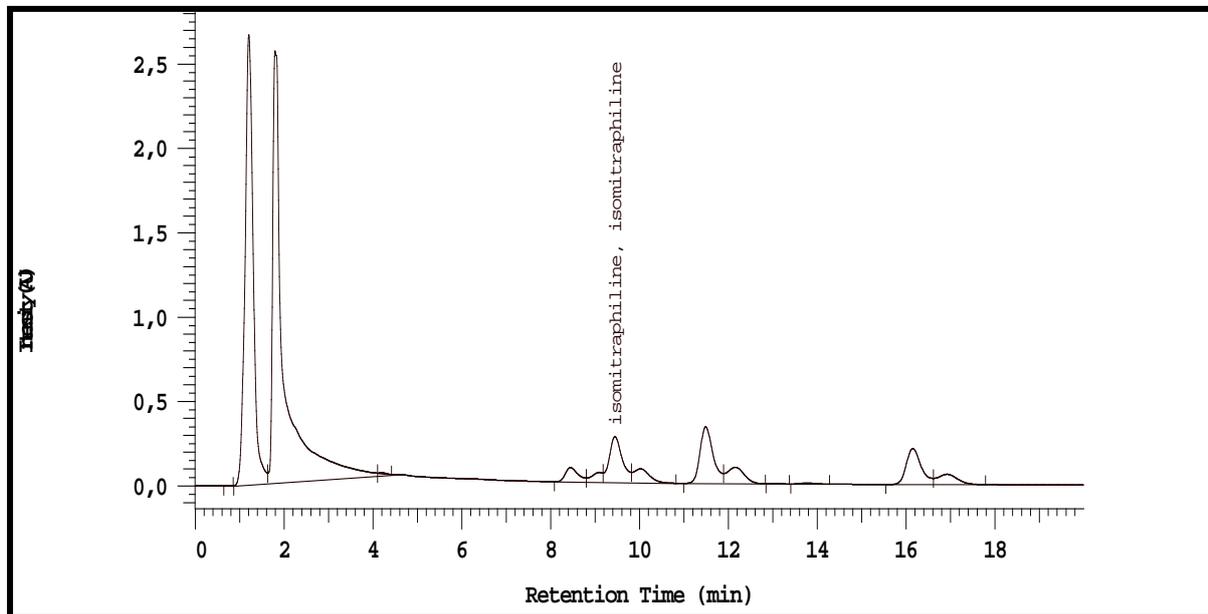


Figura 14. Cromatograma de E SC, após a exposição de 90 dias, das cápsulas à estabilidade térmica.

O doseamento do alcalóide isomitrafina foi de 4,98 mg/g e do teor de alcalóides totais expressos como isomitrafina foi de 14,85 mg/g, o que revela apenas um pequeno desvio em relação aos teores previamente calculados para o ESC sem tratamento.

De forma semelhante, a comparação deste cromatograma com o descrito na figura 12 permite destacar um padrão de desdobramento dos picos originalmente observado no cromatograma do extrato liofilizado, o que pode ser interpretado como evidência de degradação térmica.

5.10. Fluxograma de Desenvolvimento de Metodologia de Análise

O processo de desenvolvimento do processo analítico (Figura 15) tem início com a chegada da matéria-prima vegetal (MPV) ao laboratório. Inicialmente, faz-se uma amostragem da mesma e são verificadas as características organolépticas (cor,

odor e aparência). Satisfazendo-se as especificações, são realizadas as reações de caracterização. Caso contrário, a MPV é devolvida ao fornecedor.

As reações químicas de caracterização buscam evidenciar a presença do grupo de substância(s) responsável(is) pela ação farmacológica e/ou ausência de substâncias tóxicas. Caso o resultado obtido não estiver de acordo com a especificação da MPV, o fornecedor deverá ser contatado para que se possa efetuar a devolução do material. Se o resultado satisfizer as especificações, o teste de cromatografia em camada delgada (CCD) deve ser realizado. Nesta análise a MPV é testada frente a um padrão, com o intuito de evidenciar a presença de substâncias pesquisadas.

A realização do teste de CCD também é útil na pesquisa de substâncias de referência que são constituintes da planta. Isto permite a detecção de falsificação do material vegetal. Caso sejam confirmadas adulterações do material vegetal ou que este não apresente a(s) substância(s) identificada(s) como marcadora(s), a MPV será devolvida ao fabricante.

Na seqüência, avalia-se o teor de umidade. Este é um índice importante porque indica a quantidade de água que permanece na droga após a secagem da planta, permitindo a proliferação de microrganismos e/ou a hidrólise de constituintes. Se o teor de umidade for elevado, o material deve ser reprovado e devolvido ao fabricante. Caso contrário, o teor de cinzas deverá ser avaliado.

A determinação do teor de cinzas compreende a determinação de cinzas totais, cinzas sulfatadas e cinzas insolúveis em ácido clorídrico. Esta análise constitui um índice individual e simultâneo de identificação e pureza. Este ensaio permite verificar impurezas inorgânicas não voláteis que podem estar presentes como contaminantes. As cinzas totais incluem derivados do tecido vegetal, cinzas fisiológicas e de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderentes à superfície da droga. Caso o teor for acima da especificação, a matéria-prima deverá ser reprovada. Não ocorrendo a reprovação, o analista deverá partir para a pesquisa de agrotóxicos e metais pesados na MPV.

Posteriormente, faz-se a determinação dos níveis de metais pesados e dos valores de cloretos e sulfatos presentes na MPV. O ensaio do limite de cloretos e sulfatos fornece um indicativo do teor de agrotóxicos, enquanto que o ensaio do limite de chumbo fornece um indicativo da contaminação por metais pesados. Estes ensaios são importantes tendo em vista que a contaminação por pesticidas e metais pesados tem ocorrido devido ao aumento da poluição ambiental por metais tóxicos e através do uso abusivo de agrotóxicos, inclusive no cultivo de plantas medicinais.

Novamente, satisfazendo-se os resultados, passa-se à etapa seguinte que é o controle microbiológico. Caso contrário, a MPV é reprovada e devolvida ao fornecedor. O controle microbiológico da MPV garante a determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC) para fungos e bactérias. Esta etapa é de suma importância considerando-se que fatores como a falta de cuidado com o manejo, secagem e armazenamento favorecem o desenvolvimento de microrganismos viáveis, intensificando a sua contaminação.

Somente após realizarem-se todas as etapas descritas anteriormente é que ocorre a aplicação da metodologia analítica propriamente dita. O objetivo destes estudos é estabelecer as condições necessárias para o doseamento do teor de princípios ativos do material vegetal por um método de escolha e, em caso necessário, de um segundo método. Caso todos os parâmetros estiverem de acordo, o analista deve realizar o doseamento do teor de princípio(s) ativo(s), que deve(m) estar de acordo com o valor declarado pelo fornecedor ou estabelecido em códigos oficiais. Caso não se cumpra a especificação, novamente, a MPV é reprovada e devolvida ao fornecedor.

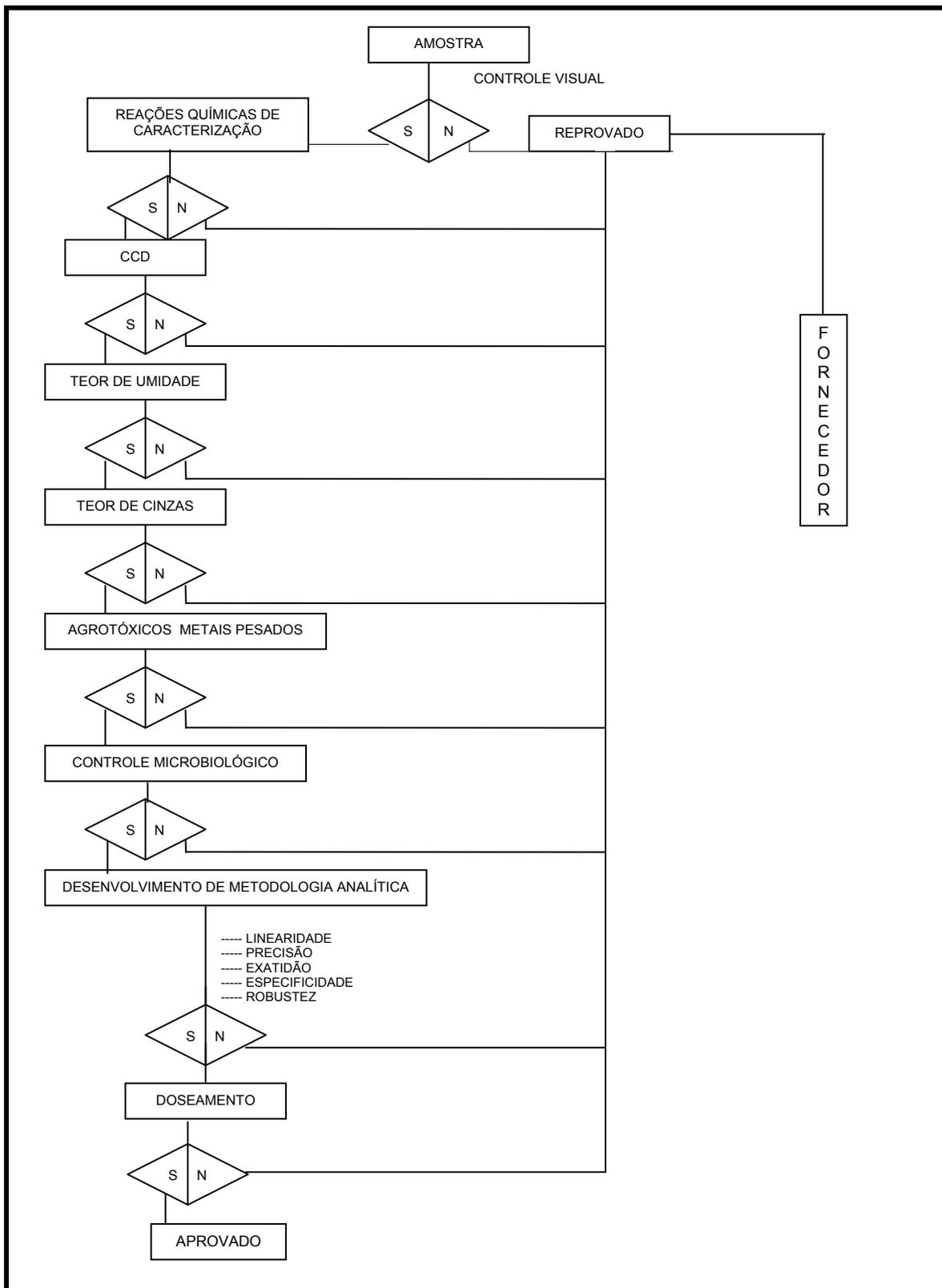


Figura 15. Fluxograma de Desenvolvimento.

6. CONCLUSÕES

- As amostras de DVSM, extrato liofilizado e ESC de *U. tomentosa*, analisados por CCD apresentaram perfil cromatográfico diferente do descrito por Van Ginkel (1997), principalmente em relação a critérios de diferenciação da procedência vegetal baseada no perfil de flavonóides e de alcalóides. As discrepâncias observadas reforçam a necessidade de estabelecer métodos oficiais de extração e de separação padronizados, utilizando matéria primas certificadas.

- Os métodos espectrofotométricos de determinação do teor de flavonóides, com e sem hidrólise, mostraram-se simples e de fácil execução, contudo, conduzem a valores diferentes em função dos fatores de cálculo, absorção específica e comprimento de onda de leitura. Para fins de padronização de métodos, salienta-se a necessidade de explicitar detalhadamente os critérios de extração e de cálculo adotados.

- A proposta de expressar o teor de flavonóides em termos de rutina, no método espectrofotométrico por hidrólise ácida, baseia-se no fato da DVSM, extrato liofilizado e ESC apresentarem um máximo de absorção em 420 nm, que coincide com o da rutina. Contudo, a presença de uma absorção secundária em comprimento de onda levemente superior levanta restrições enquanto especificidade e efeitos de interferentes.

- Para o cálculo do teor de flavonóides por espectrofotometria sem hidrólise ácida, o uso da sakuranetina como flavonóide de referência surge como uma opção mais sólida que a anterior (método com hidrólise), uma vez que seu espectro de absorção UV-Vis apresenta máximos de absorção que coincidem com os observados no espectro da DVSM, liofilizado e ESC. A escolha do comprimento de onda de leitura em 315 nm, mesmo que não seja o de absorção mais forte, evita as interferências relatadas para o pico de 420 nm.

- O método espectrofotométrico de determinação do teor de alcalóides mostrou ser de fácil implantação no laboratório, porém, está sujeito a restrições. A principal delas refere-se à falta de especificidade, que impede diferenciar teores de alcalóides de amostras contendo produtos de degradação.

- O método analítico por CLAE proposto para o ESC apresentou repetibilidade, precisão intermediária e exatidão satisfatórias. No entanto, o teste de robustez evidenciou a necessidade de um maior controle sobre os fatores de variação temperatura, comprimento de onda e pH da solução de leitura.
- O estudo de estabilidade térmica, tomando como referência o extrato liofilizado, mostrou que a multiplicidade de picos observada no cromatograma do ESC é muito provavelmente resultado de produtos de degradação. Sendo o ESC um extrato seco obtido por aspersão, isso reforça a ideia de monitorar os processos de transformação tecnológica que impliquem no uso ou no surgimento de calor.
- O estudo de estabilidade preliminar, avaliou a influência da luz UVC sobre o ESC e apontou a formação de novos picos no cromatograma avaliado por CLAE. Isso torna evidente a necessidade de controle das condições de embalagem e armazenamento do ESC, bem como de produto acabado, elaborado a partir de extrato de *Uncaria tomentosa*.
- No seu conjunto, os resultados obtidos das análises por CLAE sugerem a necessidade da realização de estudos adicionais de otimização das metodologias de doseamento, acompanhados de testes biológicos específicos para a atividade pretendida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, J.L.; ROJAS, P.; ADOLFO, M.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C.; MERFORD, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.271-276, 2002.

ALONSO, J.R. – **Tratado de Fitomedicina**. – LIMA: Isis – Arg., 1998. Monografia Instituto Peruano de Seguridad Social.

AQUINO, R.; VICENZO, F.; FRANCESCO, S. Plant Metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.52, p.679-685; 1990.

AQUINO, R.; VICENZO, F.; FRANCESCO, S. Plant Metabolites. New compounds and anti inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.453-459, 1991.

AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45, p.1035-1040, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RDC nº 17, 2000. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 de fevereiro de 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. RE nº 560/2002. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 20 de fevereiro de 2003.

CERRI, R.; AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, v.51, p. 257-261, 1988.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**. 5.ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1994.

DE SOUZA, K.C.B. **Desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas na obtenção de extratos secos nebulizados de *Passiflora edulis* forma *flavicarpa***. Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

DESMARCHELIER, C.; REPETTO, M.; COUSSIO, J.; LLESUY, S.; CÍCIA, G. Total reactive antioxidant potential and total antioxidant reactivity of medicinal plants used in Southwest Amazonas (Bolivia and Peru). **Journal of Pharmacognosy**, v.35, p.288-296, 1997.

DEUTSCHES Arzneibuch 10 Ausgabe Frankfurt: Deutscher Apotheke, 1992.

DUKE, J.; VASQUEZ, R. **Amazonian Ethnobotanical Dictionary**. Boca Raton: CRC 1994.

ELISABETSKY, E. Pesquisa em plantas medicinais. **Ciência e cultura**, v.39, n.8, p.697-702, 1987.

FARMACOPEIA Brasileira, 4.ed, São Paulo: Atheneu, 1988.

FUNCK, W.; DAMMANN, V.; DONNEVERT, G. **Qualitätssicherung in der analytischen Chemie**. Weinheim: VHC, 1992.

GANZERA, M.; MUHAMMAD, I.; KHAN, R.A.; KHAN, I. A. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Planta Medica**, v.67, p.447-450, 2001.

HARTKE, K.; MUTSCHLER, E. **Deutsches Arzneibuch-9. Ausgabe 1986 Kommentar**. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1987. p.305-306.

HEMINGWAY, S.R.; PHILLIPSON, J.D. Alkaloids from south american *Uncaria* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, p.113-116, 1974.

HERRERA, H.; JORGE, E.; Procesamiento de la *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. Uña de Gato. **Biodiversidad Salud**, v.11, p.32-37, 1998.

ICH – **International Conference on Harmonization**. Validation of analytical procedures: methodology. Step 4. **Closing Report**. Brussels, 1996.

JONES, K. **Cat's Claw: Healing Vine of Peru**. Seattle: Sylvan. 1995.

KEPLINGER, K.; KEPLINGER, D. Pharmaceutical compositions containing oxindole alkaloids for stimulating the immunological system. Patent-US-5, 302, 611: 14 P P, 1994.

KEPLINGER, K.; LAUS, G.; WURM, M.; DIERICH, M.P.; TEPPNER, H. *Uncaria tomentosa* (Wild). Ethnomedicinal Uses and new pharmacological, toxicological and botanical results. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.23-34, 1999.

LANTZ, R.J.Jr. Size Reduction. In: LIEBERMAN, H.A., LACHMAN, I., SCWARTZ, J.B. (Eds.). **Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets**. 2. ed. New York. Marcel Dekker, 1990, v.2, n.3, p.162-186, 1990.

LAUS, G.; KEPLINGER, D. Separation of stereoisomer oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.A, n.662, p.243-249, 1994.

LEMAIRE, I.; ASSINEWE, V.; CANO, P.; AWANG, D.V.; ARNASON, J.T. Stimulation of interleukin-1 and-6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (uña de gato). **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.109-115, 1999.

LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical Technology**. London: Heyden, 1989.

MABRY, T.J., MARKHAM, K.R., THOMAS, M.B. Reagents and procedures for the ultraviolet spectral analysis of flavonoids. In: **The Systematic Identification of Flavonoids**. Berlin: Springer, 1970. p.35-40.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. **Desenvolvimento de Fitoterápicos**. 1. Ed. São Paulo: Tecmed, 2004.

MINISTERIO DE EDUCACION, INSTITUTO LINGUISTICO DE VERA NO-PUCALPA (PERU). **Catálogo de Plantas Útiles de la Amazonia Peruana**, 1995.

MONTENEGRO DE MATTA, S.; DELLE MONACHE, F.; FERRARI, F. Alkaloids and procyanidins of the *Uncaria* sp. from Peru. **Farmaco**, v.31, p.527-535, 1976.

MUR, E.; HARTIG, F.; EIBL, G.; SCHIRMER, M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. **The journal of Rheumatology**, v.29, p.678-681, 2002.

ORTEGA, G.G. **Trockenextrakte aus Passionsblumenkraut. Herstellung, Standardisierung, Wirkungsnachweis**. Tübingen: Fakultät für Chemie und Pharmazie, Eberhard-Karls Universität, 1993. Tese (Doutorado em Ciências Naturais).

QUINTERA, J.C.; UGAZ, O. L. Uña de gato – *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. **Revista de Fitoterapia**, v.3, p.5-16, 2003.

PEÑA, R.C.; TIMMERMANN, B.T.; ITURRIAGA, L.; GONZÁLEZ, L. & G. Posibilidades de un control botánico analítico de la uña de gato. *Uncaria tomentosa* (Willd) D.C. **Rev. Acad. Comb. Ciencia**, v.22(85), p.595-600, 1998.

PETRY, R.D. **Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas aplicadas à *Passiflora edulis* Sims. -maracujá.** Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS. 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

PHILLIPSON, J.D. HEMINGWAY, S.R. Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus *Uncaria*. **Journal of Chromatography**, v.105, p.163-178, 1975.

PISCOYA, J.; RODRIGUES, Z.; BUSTAMANTE S.A.; OKUHAMA, N.N.; MILLER, M.J.; SANDOVAL, M. Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis knee: mechanism of actions of the species *Uncaria guianensis*. **Inflamm. Res.**, v.50, p.442-448, 2001.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, RM.R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galénica.** 3.ed., Lisboa: Calouste Gulbekian, v.1, 1981.

REINHARD, K. H., *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's Claw, *Uña de Gato*, or Saventaro. **The Journal of Altern.Complem. Medicine**, v.5, p.143-151, 1999.

RIZZI, R.; RE, F.; BIANCHI, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BIANCHI, L.; STIVALA, L.A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.38, p.63-77, 1993.

SANDOVAL, M. CHARBONNET, R.M.; OKUHAMA, N.N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, M.; MILLER, M.J. Cat's Claw (unha de gato) inhibits TNF alpha production in scavenges free radicals: role cytoprotection. **Free radical Biol. Med.**, v.29, p.71-78, 2000.

SANDOVAL-CHACON, M.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X.J.; LIU, X.; MANNICK, E.E.; SANDOWSKA-KROWICKA, H.; CHARBONNET, R.M.; CLARK, D.A.; MILLER, M.S.J. Anti-inflammatory actions of Cat's Claw : The role of NF-KB. **Aliment pharmacology Ther.**, v.12, p.279-289, 1998.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAS, M.M.; ALBAN, J.; GALAN DE MERA, VICENTE, J.; POZUCLO, J.M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.183-187, 1997.

SENATORE A.; CATALDO A.; LACCARINO, L.P.; ELBERTI, M.G. Ricerche fitochimiche e biologiche sull'*Uncaria tomentosa*. **Boll. Soc. It. Biol. Sper.**, v.65, p.517-520, 1989.

SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de produtos fitoterápicos**. Bogotá; Cytel, 2000.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.115-126, 2000.

SILVA, W. **Desenvolvimento e validação de Metodologia analítica para a matéria-prima e solução extrativa aquosa de partes aéreas de *Phyllanthus niruri* L.** Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, 1999, 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

SILVA, S.R.; ROSÁRIO, S.L.; MAZZEI, J.L.; D'ÁVILA, L.A.; SIANI, A.C.; VALENTE, L.M.M. Estudo comparativo da extração e caracterização do perfil em CLAE dos alcalóides de espécies do gênero *Uncaria*. In: 25a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas. Livro de Resumos da 25a. RASBQ, 2002. v. 1.

SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLA, J.C.P.; MENTZ, L.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre, Florianópolis: UFRGS, UFSC. 2003.

TAYLOR, L. **Herbal Secrets of the Rainforest**. 2 ed. Carson: Sage, 2002.

USP 25. **The United States Pharmacopoeia** 25th ed. Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, 2002.

VAN GINKEL, A. Identification of the alkaloids and flavonoids from *Uncaria tomentosa* bark by TLC in quality control. **Phytotherapy Research**, v.10, p.9-18, 1997.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7. überarb. Aufl., Berlin: Ullstein Mosby, 1993.

WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B.; JURCIC, K. Alkaloids from *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis enhancement effect. **Planta medica**, v.5, p.419-423, 1985.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug analysis**. Berlin: Springer, 1996.

WELLS, J.I. **Pharmaceutical Preformulation: The Physicochemical Properties of drug Substances**. London: Ellis Horwood Limited, 1988.

WORLD Health Organization. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**, Geneva:WHO, 1993.

WURM, M.; KACANI, I.; LAUS, G.; KEPLINGER, K.; DIERICH, M. P. Pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce human endothelial cells to release a lymphocyte – proliferation – regulation factor. **Planta Medica**, v.64, p.701-704, 1998.

ANEXOS

Anexo 1

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE



PARQUE ZOBOTÂNICO

HERBÁRIO

Rio Branco-Acre, 10 de janeiro de 2004.

Em resposta a v . solicitação relativa a i dentificação de amostra botânica encaminhada ao Herbário da U niversidade Federal do Acre no passado mês de dezembro, informamos que as amostras correspondem à seguinte espécie:

Nome Vulgar

Nome Científico

“Unha de Gato”

Uncaria tomentosa (Willd.) DC

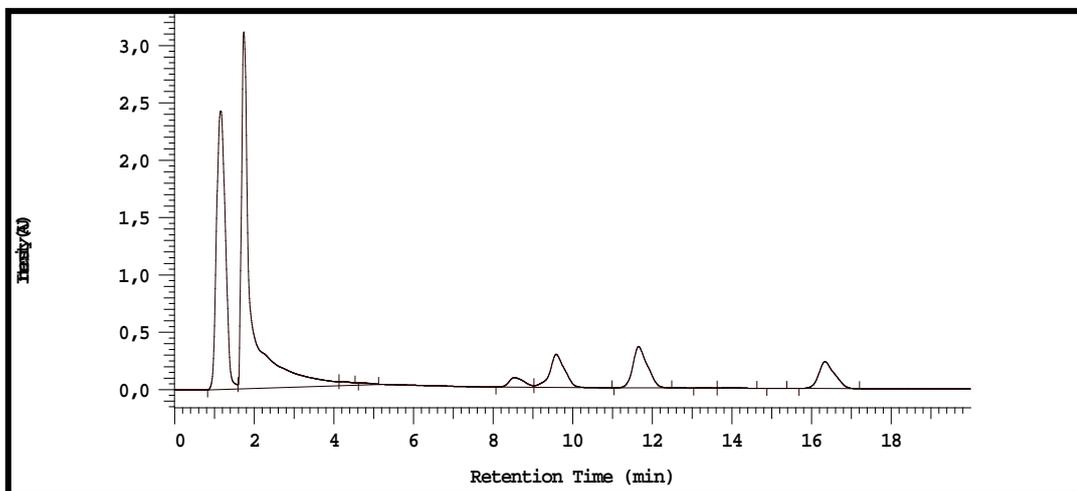
Atenciosamente,

Evandro José Linhares Ferreira

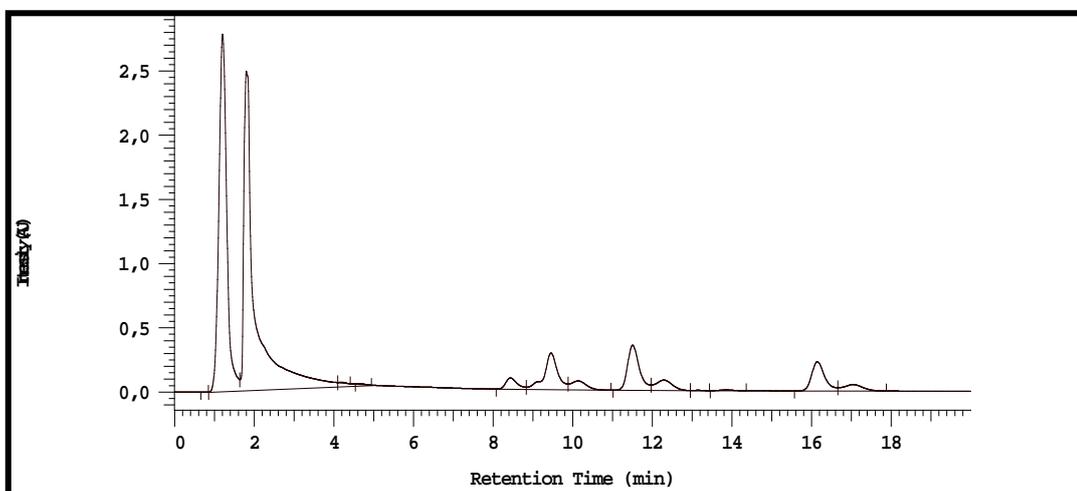
Ph.D. em Botânica Sistemática (City University of New York)

Curador do Herbário da Universidade Federal do Acre

Anexo 2

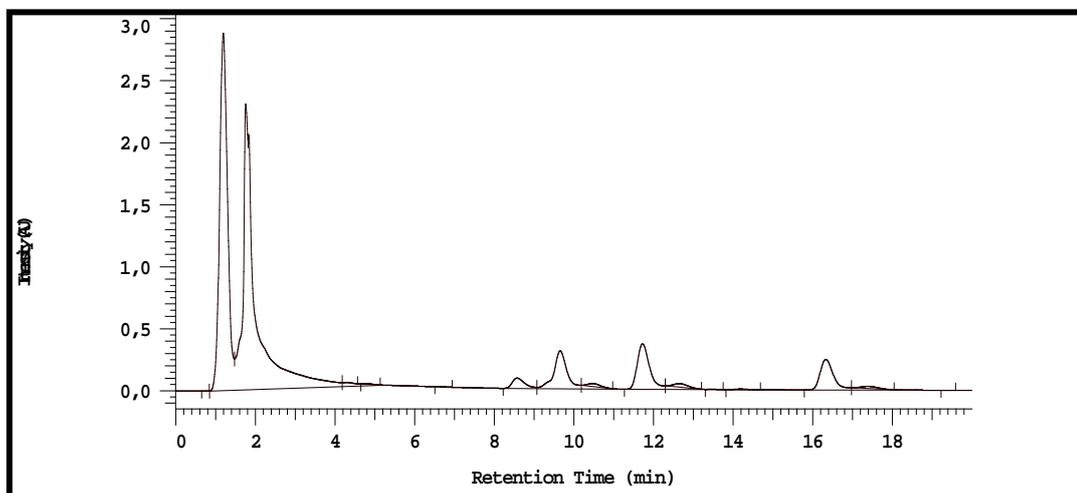


Perfil dos alcalóides do ESC, após exposição à luz UVC por 30 dias.

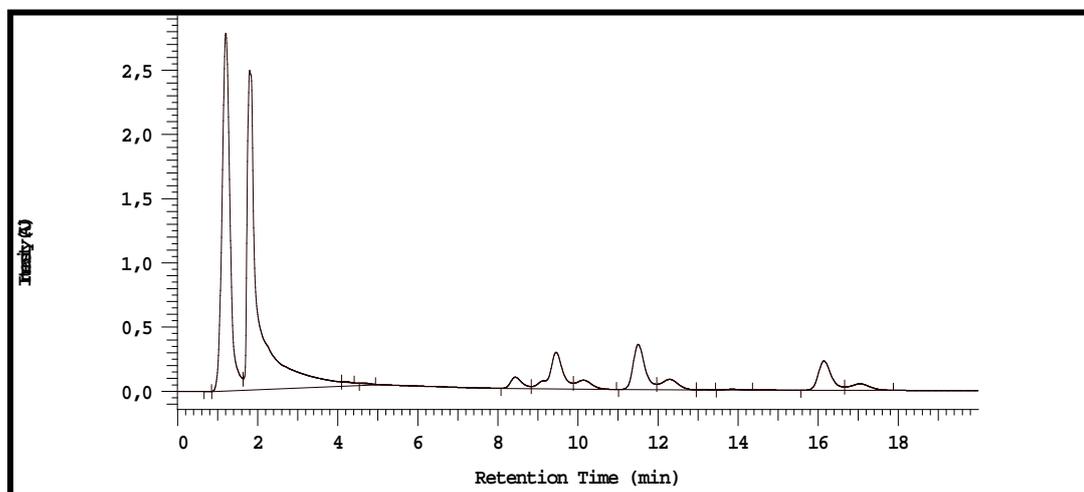


Perfil dos alcalóides do ESC, após exposição à luz UVC por 60 dias.

Anexo 3



Cromatograma de E SC, após a exposição de 30 dias, das cápsulas à estabilidade térmica.



Cromatograma de E SC, após a exposição de 60 dias, das cápsulas à estabilidade térmica.

