

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

Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria  
tomentosa* (Willd) DC.

**GUSTAVO LUÍS BORRÉ**

PORTO ALEGRE, 2010



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

Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria  
tomentosa* (Willd) DC.

Dissertação apresentada por  
Gustavo Luís Borré para a obtenção do  
GRAU DE MESTRE em Ciências  
Farmacêuticas

**Orientador: Prof. Dr. George González Ortega**

PORTO ALEGRE, 2010

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 22.07.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino von Poser  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Letícia Scherer Koester  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares  
Universidade Federal do Pernambuco

B737o Borré, Gustavo Luís  
Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC / Gustavo Luís Borré. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xxvi, 120 p.: il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Uncaria tomentosa*. 2. Unha de gato. 3. Rubiaceae. 4. Alcalóides. 5. Saponinas. 6. Polifenóis. 7. Métodos analíticos. I. González Ortega, George. II. Título.

CDU: 615.4:582.972

Bibliotecária responsável:  
Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB 10/480

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento Galênico, empregando também equipamentos da Central Analítica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a quem expresso meus agradecimentos.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Dr. George González Ortega pelo incentivo constante à busca do crescimento intelectual, pela orientação e amizade ao longo destes anos.

Ao Professor Dr. Cabral Pavei pelo exemplo ético e profissional, pela oportunidade de aprendizado e pela amizade ao longo da minha trajetória acadêmica.

Aos farmacêuticos Janine Treter e Samuel Kaiser pela amizade e participação constante no desenvolvimento do trabalho.

À bolsista Renata Cougo de Moraes pela oportunidade de transmitir um pouco do conhecimento adquirido e pelo grande apoio na realização do trabalho.

Aos professores, colegas e bolsistas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico pelo aprendizado, motivação, amizade, e pela contribuição direta no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), pela oportunidade de crescimento profissional e pelo apoio financeiro durante boa parte do curso.

Aos docentes e funcionários da Faculdade de Farmácia da UFRGS que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e meus amigos pela compreensão e apoio incondicional nos momentos de dedicação quase que exclusiva ao curso e a carreira profissional nestes últimos meses

Em especial a minha mãe Rosane, pelo referencial de força, persistência e coragem que levo na minha vida.



## RESUMO

*Uncaria tomentosa* (Willd) DC. é uma liana tropical nativa da Amazônia brasileira e peruana. A espécie é reconhecida pelas suas propriedades antiinflamatória imunoestimulante, antiviral e antitumoral, geralmente atribuídas aos polifenóis e, principalmente, à fração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos. No âmbito tecnológico, visando o desenvolvimento de produtos derivados com maior valor agregado, são poucos os subsídios encontrados na literatura científica, afora alguns relatos atrelados a patentes e registros de produtos. Nesse contexto, o presente trabalho objetivou a obtenção e caracterização de frações enriquecidas de alcaloides, saponinas e polifenóis a partir das cascas de *U. tomentosa*, mediante o emprego de técnicas de separação em fase sólida e de métodos analíticos validados. A matéria prima foi extraída por maceração em EtOH a 40%, por quatro dias. Depois de filtrado e concentrado, o extrato bruto foi liofilizado (EBL). Para fins analíticos, o EBL foi reconstituído em EtOH a 40% e caracterizado quanto a presença de alcaloides oxindólicos, saponinas triterpênicas e polifenóis. Os quatro principais picos relativos aos alcaloides oxindólicos presentes no EBL foram quantificados por CLAE-UV e o teor total, expresso em mitrafilina, foi de 1,48 g%. Os principais picos atribuídos às saponinas foram analisados por CLAE-DAD e o teor total, expresso em  $\alpha$ -hederina, foi de 18,37 g%. O teor de polifenóis totais, determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, foi estimado em 31,93 g%. Para a separação da fração polifenólica, o emprego de PVPP mostrou ser mais eficiente do que bentonita, carvão ativado ou caseína. A fração enriquecida de alcaloides oxindólicos foi obtida por separação em resina fortemente aniônica. O teor de alcaloides totais corresponde por cerca de 90% (m/m) desta fração. A fração de saponinas triterpênicas foi obtida mediante separação em resina fortemente catiônica, com teor aproximado de 78% (m/m), considerando o somatório das áreas dos picos de interesse. A proposta de uma técnica comparativa, fazendo uso de resina hidrofóbica, resultou em uma fração saponosídica enriquecida com um rendimento superior, porém com um menor teor de saponinas totais, em torno de 75% (m/m).

**Palavras-Chaves:** *Uncaria tomentosa*, alcaloides, saponinas, polifenóis, CLAE, resinas de troca iônica, frações enriquecidas.



## ABSTRACT

*Uncaria tomentosa* is a tropical liana native from Brazilian and Peruvian rain forests. The specie is recognized by its immune stimulant, anti-viral, anti-inflammatory and anti-cancer properties often attributed to the polyphenolic fraction and mainly to the peculiar pentacyclic oxindole alkaloidal fraction. On the technological field, aiming the transformation of the raw material into standardized and high aggregate value products a few efforts can be encountered in the literature, excepting a couple of patents and product registration related information. In this context the present work aimed to the obtainment and characterization of enriched fractions of alkaloids, saponins and polyphenols from the stem barks of *U. tomentosa*, through solid phase separations techniques and validated analytical methods. The raw material extraction was extracted by a four days maceration in a 40% hydroethanolic solution. After the filtration and concentration, the crude extract was lyophilized (EBL). For analytical purposes the EBL was resuspended in a 40% hydroethanolic solution and characterized for the presence of oxindole alkaloids, triterpenic saponins and polyphenols. The four main peaks attributed to the oxindole alkaloids in EBL were quantified by UV-HPLC and the total content, expressed as mitraphiline, was about 1.48 g%. The main peaks attributed to the saponins were analysed by DAD-HPLC and the total content, expressed as  $\alpha$ -hederin, was about 18.37 g%. The total polyphenolic content, determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric assay, was estimated at 31.93 g%. For the polyphenols separation the use of PVPP showed to be more efficient than bentonite, active carbon or casein treatment. The enriched fractions of the oxindole alkaloids was obtained through a strongly anionic resin separation. The total alkaloid content of this fraction was about 90% (w/w). The saponin enriched fraction was obtained through a strongly cationic resin separation and the total saponin content was about 78% (w/w). The suggestion of a comparative technique employing a hydrophobic resin resulted on a saponosidic enriched fraction with higher yield but a lower saponin content of about 75% (w/w).

**Keywords:** *Uncaria tomentosa*, oxindole alkaloids, triterpenic saponins, polyphenols, analytical methods, enriched fractions, ion exchange resins



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Condições experimentais empregadas na análise por CLAE dos alcaloides presentes em <i>Uncaria tomentosa</i> .....	20
<b>Tabela 2.</b>	Gradiente de eluição da fase móvel em função do tempo para a análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	21
<b>Tabela 3.</b>	Gradiente de eluição da fase móvel em função do tempo para a análise por CLAE das saponinas triterpênicas de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	34
<b>Tabela 4.</b>	Parâmetros de caracterização da solução extrativa das cascas de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	54
<b>Tabela 5.</b>	Resultados da análise de regressão da curva analítica da mitrafilina.....	56
<b>Tabela 6.</b>	Resultados da análise de regressão da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.....	57
<b>Tabela 7.</b>	Concentrações dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	58
<b>Tabela 8.</b>	Resultados da análise de regressão linear da curva padrão da substância de referência $\alpha$ -hederina.....	61
<b>Tabela 9.</b>	Resultados da análise de regressão da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação das saponinas triterpênicas.....	62
<b>Tabela 10.</b>	Resultados da avaliação dos parâmetros relativos à precisão do método de análise por CLAE das saponinas triterpênicas do extrato bruto reconstituído de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	63
<b>Tabela 11.</b>	Resultados do teste de exatidão do método de análise por CLAE das saponinas triterpênicas no extrato bruto reconstituído de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	63

<b>Tabela 12.</b> Concentração de saponinas triterpênicas no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	64
<b>Tabela 13.</b> Resultados da análise de regressão linear da curva analítica da epicatequina.....	66
<b>Tabela 14.</b> Resultados da análise de regressão linear da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação dos polifenóis totais.....	67
<b>Tabela 15.</b> Resultados da avaliação dos parâmetros relativos à precisão do método de análise dos polifenóis totais no extrato bruto de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	67
<b>Tabela 16.</b> Resultados do teste de exatidão do método de determinação do teor de polifenóis totais no extrato bruto reconstituído de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	66
<b>Tabela 17.</b> Concentração de polifenóis totais no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	68
<b>Tabela 18.</b> Características físico-químicas das resinas de troca-iônica testadas na adsorção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	76
<b>Tabela 19.</b> Capacidades de adsorção específicas das resinas de troca iônica testadas para a retenção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos do extrato bruto reconstituído de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	77
<b>Tabela 20.</b> Taxas de recuperação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos das resinas de troca iônica após a etapa de extração.....	77
<b>Tabela 21.</b> Determinação de pH e de condutividade elétrica das frações ERA e FALC, obtidas mediante o fracionamento do extrato pré-purificado (EPP) com resina Dowex Marathon MSC.....	81
<b>Tabela 22.</b> Rendimento ponderal, teor de alcaloides e de saponinas nas frações ERA e FALC, obtidas mediante fracionamento em coluna com resina aniônica.....	82

<b>Tabela 23.</b> Determinação do pH e da condutividade elétrica da fração ácida de triterpenos (FAT), obtida mediante o fracionamento da do eluato da resina aniônica (ERA) com resina Amberlite IRA-958.....	87
<b>Tabela 24.</b> Rendimento ponderal e teor de saponinas nas frações obtidas no processo de fracionamento em resina catiônica (FAT) e no fracionamento em resina poliaromática (F90).....	88



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema geral das etapas experimentais desenvolvidas no processo de obtenção de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa*..... 5
- Figura 2.** Principais classes de alcaloides oxindólicos isolados de cascas de *Uncaria tomentosa*..... 14
- Figura 3.** Principais compostos polifenólicos relatados para as cascas de *Uncaria tomentosa*..... 15
- Figura 4.** Heterosídeos do ácido quinóvico isolados de cascas de *Uncaria tomentosa*..... 16
- Figura 5.** Heterosídeos do ácido piroquinóvico isolados de *Uncaria tomentosa*..... 17
- Figura 6.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos principais alcaloides oxindólicos pentacíclicos do extrato bruto das cascas de *Uncaria tomentosa* e os respectivos espectros de absorção no UV (200-400nm)..... 56
- Figura 7.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD das saponinas do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*..... 59
- Figura 8.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da  $\alpha$ -hederina, mostrando em detalhe o espectro de absorção no UV (190-400nm) da substância de referência..... 60
- Figura 9.** Estrutura química da hederagenina (A) e do ácido quinóvico (B)..... 60
- Figura 10.** Espectros de absorção da substância de referência epicatequina e do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*, após tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu..... 65
- Figura 11.** Representação gráfica de fluxo do filtrado em função do tempo de processo de ultrafiltração tangencial do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*..... 70
- Figura 12.** Efeito dos pré-tratamentos com quantidades crescentes de bentonita, carvão ativado, caseína e PVPP na variação do pH (a), condutividade elétrica (b), concentração total de alcaloides (c) e na concentração total de polifenóis (d) do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*..... 72

<b>Figura 13.</b> Análise por CLAE do extrato pré-purificado obtido após o tratamento com PVPP na quantidade relativa a dez vezes a massa de resíduo seco do extrato bruto reconstituído de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	74
<b>Figura 14.</b> Análise por CLAE da fração de primeira passagem obtida durante o processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	78
<b>Figura 15.</b> Análise por CLAE da etapa de extração do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos empregando mistura de etanol: hidróxido de amônio 10% (3:1 v/v).....	79
<b>Figura 16.</b> Análise por CLAE do eluato da etapa de neutralização do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	80
<b>Figura 17.</b> Análise por CLAE do eluato da etapa de extração do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	81
<b>Figura 18.</b> Análise por CLAE das saponinas triterpênicas na fração eluída da resina aniônica (ERA).....	83
<b>Figura 19.</b> Análise por CLAE do eluato da resina catiônica do processo de fracionamento das saponinas triterpênicas de <i>Uncaria tomentosa</i> ...	85
<b>Figura 20.</b> Análise por CLAE do eluato da etapa de acidificação com ácido fórmico 0,3M no processo de fracionamento das saponinas triterpênicas de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	86
<b>Figura 21.</b> Análise por CLAE do eluato da etapa de extração do processo de fracionamento das saponinas triterpênicas de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	86
<b>Figura 22.</b> Cromatograma da fração saponosídica enriquecida obtida pelo fracionamento na resina Diaion HP-20.....	88

## LISTA DE ANEXOS

**ANEXO I. LAUDO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA E AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO.....111**

**ANEXO II. DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE DOS ALCALOIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS.....113**

**Tabela II-A.** Áreas referentes ao pico da mitrafilina na curva analítica da substância química de referência. Detecção em 245 nm.....115

**Tabela II-B.** Áreas referentes ao pico da mitrafilina na curva analítica do extrato bruto reconstituído. Detecção em 245 nm.....115

**Tabela II-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da mitrafilina.....116

**Tabela II-D.** Dados Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído para análise dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos.....116

**ANEXO III – DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA AS SAPONINAS TRITERPÊNICAS.....117**

**Tabela III-A.** Áreas referentes ao pico da  $\alpha$ -hederina na curva analítica da substância química de referência. Detecção em 210 nm.....117

**Tabela III-B.** Áreas referentes ao pico 1 na curva analítica obtida do extrato bruto reconstituído. Detecção em 210 nm.....117

**Tabela III-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da  $\alpha$ -hederina.....118

**Tabela III-D.** Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído na análise das saponinas triterpênicas.....118

**ANEXO IV – DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS PARA A ANÁLISE DOS POLIFENÓIS TOTAIS.....119**

**Tabela IV-A.** Valores de absorvâncias obtidas com as soluções padrões de epicatequina após o tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu. Leitura em 760 nm.....119

**Tabela IV-B.** Valores de absorvâncias obtidos com as soluções das amostras de extrato bruto reconstituído após o tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu. Leitura em 760 nm.....119

**Tabela IV-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da epicatequina na análise espectrofotométrica dos polifenóis totais.....120

**Tabela IV-D.** Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído na análise espectrofotométrica dos polifenóis totais.....120

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SE – solução extrativa

EBL- extrato bruto liofilizado

EBR – extrato bruto reconstituído

EPP – extrato pré-purificado

ERA – eluato da resina aniônica

FALC – fração enriquecida de alcaloides

FAT – fração ácida de triterpenos

F90 – fração eluída com solução metanólica a 90%



## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVOS.....	7
2.1	Objetivo geral.....	9
2.2	Objetivos específicos.....	9
3.	REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1	Aspectos agronômicos e botânicos.....	13
3.2	Aspectos fitoquímicos.....	13
3.3	Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos.....	17
3.4	Aspectos analíticos.....	19
3.5	Aspectos tecnológicos.....	21
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	Materiais.....	27
4.1.1	Matéria prima vegetal.....	27
4.1.2	Reagentes, solventes e substâncias de referência.....	27
4.1.3	Agentes adsorventes e resinas poliméricas.....	27
4.1.4	Equipamentos diversos.....	28
4.2	Metodologia.....	28
4.2.1	Caracterização da matéria prima vegetal.....	28
4.2.1.1	Determinação da perda por dessecação.....	28
4.2.2	Preparação e caracterização da solução extrativa.....	29
4.2.2.1	Extração.....	29
4.2.2.2	Determinação do resíduo seco.....	29
4.2.2.3	Determinação do pH.....	29
4.2.2.4	Determinação da condutividade elétrica.....	29
4.2.2.5	Determinação da densidade.....	30
4.2.3	Obtenção do extrato bruto liofilizado.....	30
4.2.3.1	Avaliação das características macroscópicas.....	30
4.2.3.2	Determinação da perda por dessecação.....	30
4.2.4	Extrato bruto reconstituído.....	30
4.2.5	Análise dos principais constituintes do extrato bruto reconstituído.....	31

4.2.5.1	Análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.....	31
4.2.5.1.1	Condições cromatográficas.....	32
4.2.5.1.2	Linearidade da substância de referência.....	32
4.2.5.1.3	Linearidade do extrato bruto reconstituído.....	32
4.2.5.1.4	Avaliação da Linearidade.....	32
4.2.5.1.5	Limite de quantificação e limite de detecção.....	32
4.2.5.1.6	Análise quantitativa.....	33
4.2.5.2	Análise por CLAE das saponinas triterpênicas.....	33
4.2.5.2.1	Condições cromatográficas.....	33
4.2.5.2.2	Linearidade da substância de referência.....	34
4.2.5.2.3	Linearidade do extrato bruto reconstituído.....	34
4.2.5.2.4	Avaliação da Linearidade.....	35
4.2.5.2.5	Repetibilidade.....	35
4.2.5.2.6	Precisão intermediária.....	35
4.2.5.2.7	Exatidão.....	35
4.2.5.2.8	Limite de quantificação e limite de detecção.....	35
4.2.5.2.9	Análise quantitativa.....	36
4.2.5.3	Determinação espectrofotométrica dos polifenóis totais.....	36
4.2.5.3.1	Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu.....	36
4.2.5.3.2	Linearidade da substância de referência.....	36
4.2.5.3.3	Linearidade do extrato bruto reconstituído.....	37
4.2.5.3.4	Avaliação da Linearidade.....	37
4.2.5.3.5	Repetibilidade.....	37
4.2.5.3.6	Precisão intermediária.....	37
4.2.5.3.7	Exatidão.....	38
4.2.5.3.8	Limite de quantificação e limite de detecção.....	38
4.2.5.3.9	Análise quantitativa.....	38
4.2.6	Separação da fração de polifenóis do extrato bruto reconstituído.....	38
4.2.6.1	Ultrafiltração do extrato bruto reconstituído.....	39
4.2.6.1.1	Preparação da membrana de ultrafiltração.....	39
4.2.6.1.2	Preparação da amostra.....	39

4.2.6.1.3	Condições de operação.....	39
4.2.6.1.4	Avaliação dos resultados.....	40
4.2.6.2	Adsorção em fase sólida.....	40
4.2.6.2.1	Seleção do tipo e da quantidade de agente de adsorção a ser empregado.....	40
4.2.6.2.2	Avaliação dos resultados.....	40
4.2.7	Desenvolvimento de método de fracionamento aplicado aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	41
4.2.7.1	Seleção da resina de troca iônica.....	41
4.2.7.2	Técnica de fracionamento dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos empregando resina aniônica .....	42
4.2.7.2.1	Preparação da amostra para o fracionamento.....	42
4.2.7.2.2	Soluções empregadas nas etapas de fracionamento.....	42
4.2.7.2.3	Preparação da resina para fracionamento.....	43
4.2.7.2.4	Descrição da técnica.....	43
4.2.7.2.5	Avaliação do pH.....	44
4.2.7.2.6	Avaliação da condutividade.....	45
4.2.7.2.7	Liofilização.....	45
4.2.7.2.8	Avaliação das características macroscópicas.....	45
4.2.7.2.9	Determinação do rendimento.....	45
4.2.7.2.10	Análise dos constituintes das frações.....	45
4.2.8	Desenvolvimento de método de fracionamento aplicado à fração de saponinas triterpênicas de <i>Uncaria tomentosa</i> .....	46
4.2.8.2	Técnica de fracionamento das saponinas triterpênicas empregando resina catiônica.....	46
4.2.8.2.1	Preparo da amostra para o fracionamento.....	46
4.2.8.2.2	Soluções empregadas nas etapas de fracionamento.....	46
4.2.8.2.3	Preparo da resina para fracionamento.....	47
4.2.8.2.4	Descrição da técnica.....	47
4.2.8.2.5	Avaliação do pH.....	47
4.2.8.2.6	Avaliação da condutividade elétrica.....	48
4.2.8.2.7	Liofilização.....	48

4.2.8.2.8	Avaliação das características macroscópicas.....	48
4.2.8.2.9	Determinação do rendimento.....	48
4.2.8.2.10	Análise dos constituintes da fração enriquecida.....	48
4.2.8.3	Técnica de fracionamento das saponinas triterpênicas empregando resina poliaromática .....	48
4.2.8.3.1	Preparo da amostra para o fracionamento.....	48
4.2.8.3.2	Soluções empregadas nas etapas de fracionamento.....	49
4.2.8.3.3	Preparo da resina para fracionamento.....	49
4.2.8.3.4	Descrição da técnica.....	49
4.2.8.3.5	Avaliação do pH.....	50
4.2.8.3.6	Avaliação da condutividade elétrica.....	50
4.2.8.3.7	Liofilização das frações obtidas.....	50
4.2.8.3.8	Avaliação das características macroscópicas.....	50
4.2.8.3.9	Determinação do rendimento.....	50
4.2.8.3.10	Análise dos constituintes da fração enriquecida.....	50
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.1	Caracterização da matéria prima vegetal.....	53
5.2	Preparação e caracterização da solução extrativa.....	53
5.3	Análise dos principais constituintes do extrato bruto reconstituído.....	55
5.3.1	Análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.....	55
5.3.2	Análise por CLAE das saponinas triterpênicas.....	58
5.3.3	Determinação espectrofotométrica dos polifenóis totais.....	64
5.4	Separação dos polifenóis do extrato bruto reconstituído.....	69
5.5	Obtenção de fração enriquecida de alcaloides oxindólicos pentacíclicos.....	75
5.6	Obtenção de fração enriquecida de saponinas triterpênicas.....	83
6.	CONCLUSÕES.....	91
7.	PERSPECTIVAS.....	95
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	99
9.	ANEXOS.....	109

## 1. INTRODUÇÃO

---



A espécie *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (unha-de-gato) é uma videira nativa da Amazônia, sobre a qual incidem vários estudos farmacológicos relevantes (LEMAIRE e col., 1999; RIVA e col., 2001; PRADO e col., 2007; GIMENEZ e col., 2010).

Para as cascas do caule, principal farmacógeno da espécie, é relatada a presença de três grupos de compostos majoritários e quimicamente distintos: os alcaloides oxindólicos, heterosídeos triterpênicos derivados do ácido quinóico e polifenóis, representados majoritariamente pelos taninos condensados.

Dentre as atividades farmacológicas mais relatadas para *U. tomentosa* estão a imunoestimulante, neuroprotetora, antitumoral e antiinflamatória, atribuídas aos polifenóis e, principalmente, aos alcaloides (HEITZMANN e col., 2005). De modo contrário, a fração triterpênica ainda tem sido pouco explorada do ponto de vista biológico e tecnológico.

Em contraste com o aprofundamento constatado nas áreas química e farmacológica (PRADO e col., 2007; REIS e col., 2008; GIMENEZ e col., 2010), ainda são incipientes os esforços tecnológicos de desenvolvimento de produtos derivados de *U. tomentosa*. A maioria dos relatos biológicos e farmacológicos para cascas de *U. tomentosa* tem por fundamento o uso de extratos brutos ou substâncias isoladas (KEPLINGER e col., 1999; LEMAIRES e col., 1999; PRADO e col., 2007; PILARSKI e col., 2007; REIS e col., 2008; ALLEN-HALL e col., 2010).

Extratos brutos vegetais são misturas complexas, constituídas por substâncias de diversas classes químicas que podem interagir química e farmacologicamente, dificultando os estudos biológicos e tecnológicos. O isolamento de substâncias, seja para identificação ou realização de ensaios farmacológicos, é geralmente um processo desenvolvido em pequena escala, de difícil transposição, caracterizado por múltiplas etapas e baseado no emprego de diversos solventes orgânicos, muitas vezes com impacto ecológico significativo.

Nesse sentido, o desenvolvimento de processos simples e robustos, que permitam a obtenção seletiva de frações enriquecidas dos compostos bioativos, constitui uma opção válida do ponto de vista farmacológico e para o desenvolvimento tecnológico de produtos de maior valor agregado, providos de maior eficácia e segurança.

A obtenção de extratos semi-purificados e enriquecidos para ensaios farmacológicos é, atualmente, uma das etapas essenciais para o estudo de plantas medicinais. Para tanto se faz necessário o desenvolvimento de novos métodos de fracionamento e isolamento de substâncias a partir de extratos vegetais (BARRETO Jr. e col., 2005).

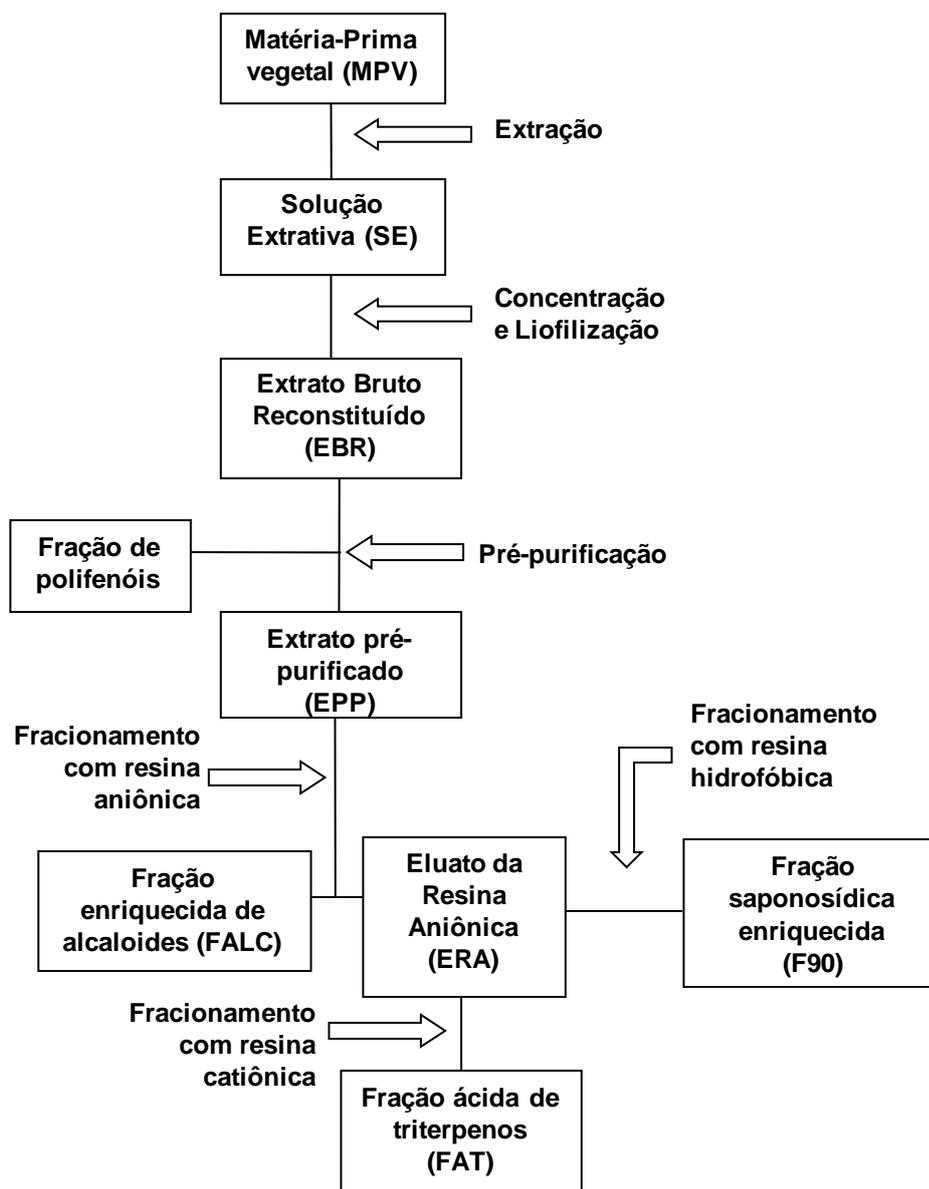
Dentre as técnicas de separação/purificação mais propagadas no âmbito tecnológico cabe destacar o fracionamento em fase sólida, por fisiossorção ou quimissorção, utilizando polímeros e resinas insolúveis na separação seletiva de diferentes grupos de compostos, com a remoção concomitante de substâncias não ativas ou interferentes analíticos.

Dentro deste PPGCF, diversas técnicas já foram empregadas com sucesso em espécies vegetais brasileiras, por exemplo, na obtenção de frações saponosídicas e polifenólicas de erva-mate mediante emprego de resina poliaromática Diaion HP-20 (PAVEI, 2004; SILVA, 2007), na complexação e quantificação de taninos de *Maytenus ilicifolia* e *Psidium guajavum* mediante povidona cruzada (SOARES, 2002; VERZA, 2006), bem como na remoção dos polifenóis totais do extrato bruto dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (CANTO, 2007).

No caso de *U. tomentosa*, o desenvolvimento de um processo sistemático de obtenção de frações enriquecidas representa um desafio, uma vez que a presença concomitante de substâncias de caráter ácido, básico e outras de natureza apolar exige a combinação de técnicas diferentes. Recentemente, frações de alcaloides e triterpenos de *U. tomentosa* foram preparadas mediante separação em fase polimérica sólida, utilizando resina Diaion HP-20 (PAVEI, 2010). O presente trabalho representa a continuação dessa abordagem tecnológica, visando o estabelecimento de um processo coerente, formado por etapas sucessivas atentando à preservação da composição química original. Para isso foram testadas diversas técnicas, empregando-se resinas de troca-iônica, fase polimérica hidrofóbica e membranas de ultrafiltração.

O trabalho resultou em um processo sistemático e seqüencial de desenvolvimento tecnológico de frações enriquecidas de compostos bastante estudados como os alcaloides oxindólicos pentacíclicos, bem como de compostos pouco explorados do campo de vista biológico e tecnológico, como as saponinas

triterpênicas. Cabe citar ainda a separação da fração polifenólica, como subproduto do processo, a qual será explorada em trabalhos subseqüentes. De modo a facilitar a compreensão, a figura 1 apresenta um esquema geral das etapas experimentais desenvolvidas ao longo do trabalho.



**Figura 1.** Esquema geral das etapas experimentais desenvolvidas no processo de obtenção de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa*.



## **2. OBJETIVOS**

---



## 2.1 Objetivo Geral

Desenvolver processo sistemático e seqüencial de fracionamento do extrato bruto das cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. visando a obtenção de frações enriquecidas de alcaloides oxindólicos, saponinas e polifenóis.

## 2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a matéria prima vegetal.
- Preparar e caracterizar a solução extrativa das cascas de *Uncaria tomentosa*.
- Obter e caracterizar o extrato seco por liofilização preparado a partir da solução extrativa concentrada.
  - Empregar o método por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos no extrato bruto e nas frações obtidas.
  - Desenvolver e validar método por cromatografia líquida de alta eficiência para a análise das saponinas triterpênicas no extrato bruto e nas frações obtidas.
  - Adequar e validar metodologia analítica por espectrofotometria UV-VIS para o doseamento do teor de polifenóis totais do extrato bruto.
  - Desenvolver técnica específica de separação da fração de polifenóis do extrato bruto e obtenção de um extrato pré-purificado.
  - Desenvolver método de fracionamento dos alcaloides oxindólicos empregando resinas de caráter aniônico, caracterizando a fração enriquecida de alcaloides oxindólicos (fração retida) e o eluato do processo (fração não retida).
  - Desenvolver método de fracionamento das saponinas triterpênicas empregando resina de caráter catiônico, caracterizando a fração ácida de saponinas triterpênicas.
  - Comparar o método de fracionamento de saponinas triterpênicas em resina de troca iônica com o método de fracionamento empregando resina poliaromática.



### **3. REFERENCIAL TEÓRICO**

---



### 3.1 Aspectos Agronômicos e Botânicos

*Uncaria tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Schultes) D.C. é uma videira de cipós espinhosos da família das rubiáceas, que é endêmica nas florestas tropicais da América do Sul e Central. A espécie é caracterizada como uma trepadeira que forma emaranhados de aproximadamente 40 m de comprimento e 20 m de altura. Os ramos possuem espinhos lenhosos, retos ou pouco curvados, responsáveis pelo nome popular amplamente difundido, unha-de-gato, garra-de-gato ou cat's claw. (POLLITO; TOMAZELLO, 2006). Embora o gênero *Uncaria* abranja cerca de 60 espécies distribuídas principalmente em África e Ásia (HEITZMAN e col., 2005), merece especial destaque a *U. guianensis* (Aubl.) Gmel., que também ocorre na floresta amazônica, juntamente com *U. tomentosa*, um fato que é responsável por equívocos e adulterações botânicas da matéria prima vegetal. (QUINTELA; DE UGAZ, 2003).

### 3.2 Aspectos Fitoquímicos

Em cascas de *U. tomentosa* ocorrem três classes diferentes de substâncias bioativas: alcaloides, compostos fenólicos e derivados triterpênicos do ácido quinóico.

Os alcaloides são provavelmente a classe de substâncias mais estudada de *U. tomentosa*, tanto pela abundância dessa fração em relação a outras espécies do gênero, quanto pelas diversas atividades biológicas atribuídas aos mesmos (SANDOVAL e col., 2002; HEITZMAN e col., 2005; JÜRGENSEN e col., 2005, PRADO e col., 2007; REIS e col., 2008; GIMENEZ e col., 2010). É possível constatar a presença de dois grandes grupos de alcaloides, os oxindólicos e os seus precursores indólicos, sendo os primeiros os mais representativos da espécie. Os alcaloides oxindólicos podem ainda ser divididos em dois grupos químicos: alcaloides oxindólicos tetracíclicos (AOT) e alcaloides oxindólicos pentacíclicos (AOP), cujas estruturas principais são apresentadas na figura 2. A caracterização da distribuição destes alcaloides isômeros nas diferentes partes do vegetal, assim como o efeito de fatores ambientais sobre o teor dos mesmos, é ainda incipiente. Contudo

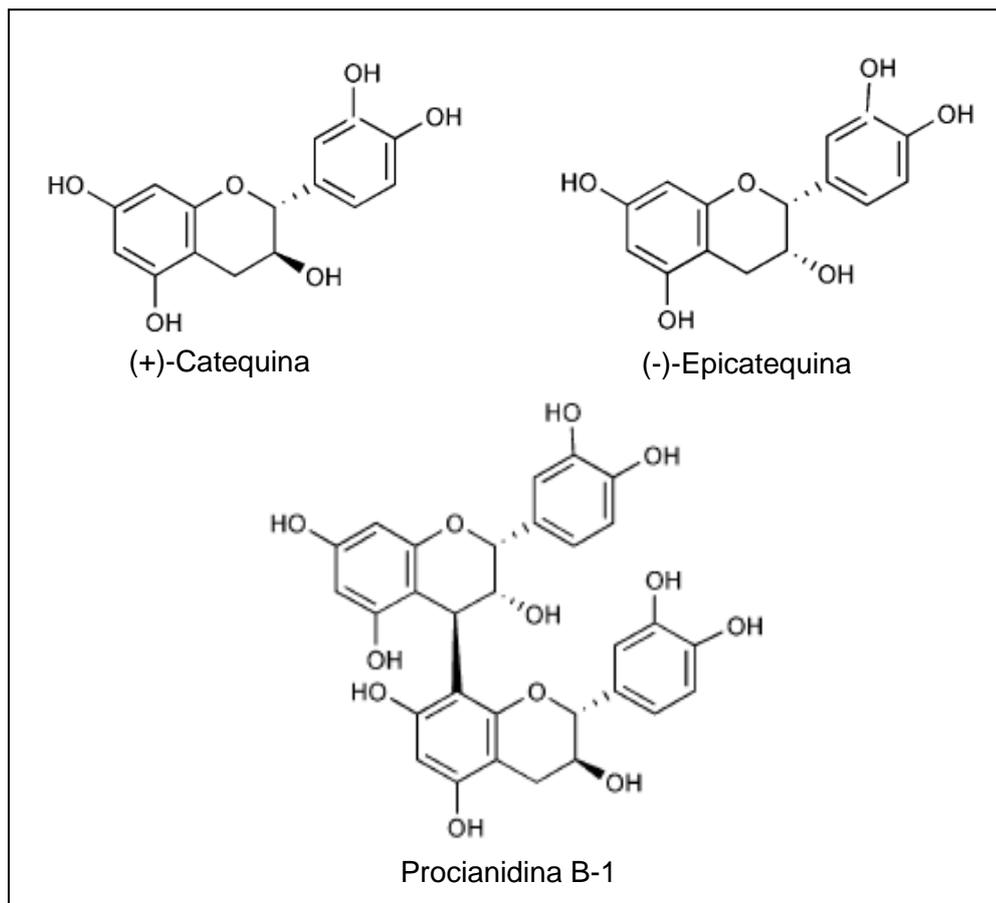
foi constatado que os tecidos mais ricos em alcaloides são as cascas do caule, seguidos das raízes. Os teores de AOP são utilizados para diferenciar a *U. tomentosa* e a *U. guianensis*, visto que a primeira possui teores cerca de 10 vezes maiores aos encontrados na segunda (STUPPNER e col., 1992; LAUS e KEPLINGER, 1994; LAUS e col., 1997).

Oxindólicos Pentacíclicos		Oxindólicos Tetracíclicos	
Alcalóide	Configuração	Alcalóide	Configuração (R')
Isomitrafilina	3S, 7S, 15S, 19S, 20R	Corinoxeina	3S, 7S, 15S, 20R (vinil)
Mitrafilina	3S, 7R, 15S, 19S, 20R	Isorrincofilina	3S, 7S, 15S, 20R (etil)
Isopteropodina (Uncarina E)	3S, 7S, 15S, 19S, 20S	Isocorinoxeina	3S, 7R, 15S, 20R (vinil)
Pteropodina (Uncarina C)	3S, 7R, 15S, 19S, 20S	Rincofilina	3S, 7R, 15S, 20R (etil)
Especiofilina (Uncarina D)	3R, 7S, 15S, 19S, 20S		
Uncarina F	3R, 7R, 15S, 19S, 20S		

**Figura 2.** Principais classes de alcaloides oxindólicos isolados de cascas de *Uncaria tomentosa* (HEMINGWAY; PHILIPSON, 1975).

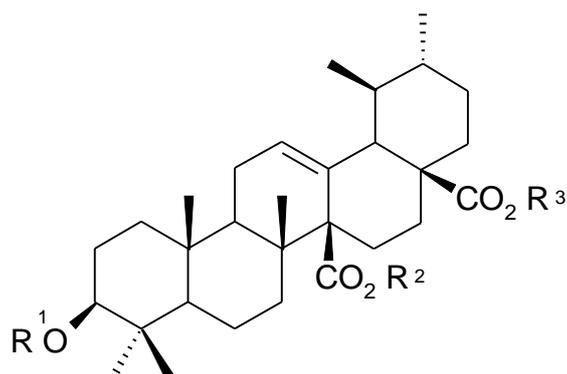
A fração polifenólica presente em *U. tomentosa* é formada basicamente por taninos condensados, proantocianidinas e suas unidades monoméricas catequina e epicatequina (Figura 3), as quais compõem em até 20 % do conteúdo das cascas e talos da espécie (SANDOVAL e col., 2002; GONÇALVES e col., 2004; HEITZMAN e col., 2005). O perfil cromatográfico por CCD da fração polifenólica foi utilizado para

diferenciar *U. tomentosa* de *U. guianensis*, visto que o flavonóide rutina só se apresentaria na segunda espécie (VAN GINKEL, 1996). Contudo, Griebeler (2005) e Pavei (2010) questionam esta diferenciação, dada a presença de rutina em quantidades significativas em amostras certificadas de *U. tomentosa*, que foi comprovada mediante análises por CCD e CLAE de extratos brutos e da fração polifenólica purificada.



**Figura 3.** Principais compostos polifenólicos relacionados para as cascas de *Uncaria tomentosa*. Adaptado de Heitzmann e colaboradores (2005).

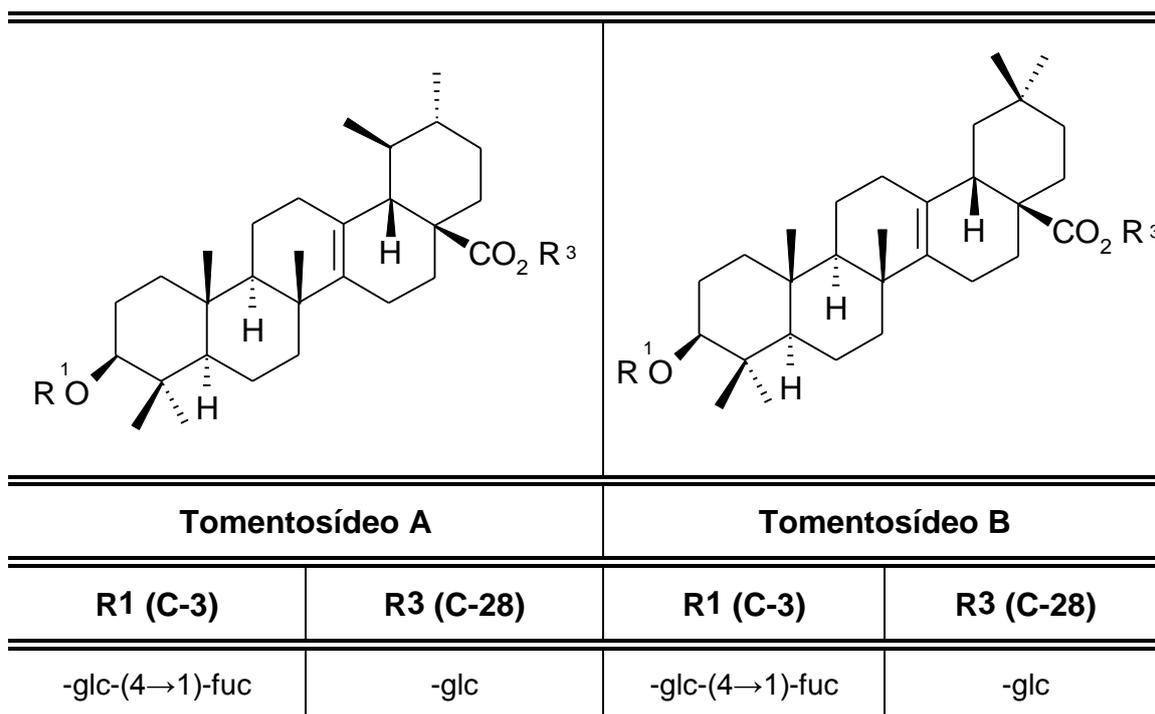
Os triterpenos presentes em *U. tomentosa* são, em sua maioria, saponinas derivadas do ácido quinóico (figura 4) com uma ou duas cadeias glicosiladas ligadas ao núcleo triterpênico (AQUINO e col., 1990; 1991; 1997; CERRI 1988).



Triterpeno	R1 (C-3)	R2 (C-27)	R3 (C-28)	Referência
A	-glc-(3→1)-fuc	-glc	-H	CERRI e col., 1988
D	-fuc	-glc	-H	AQUINO e col., 1991
E	-rha	-H	-H	AQUINO e col., 1997
F	-rha-(3→1)-glc	-H	-H	AQUINO e col., 1997
G	-qui-(3→1)-glc	-H	-H	AQUINO e col., 1997
H	-qui-(3→1)-gal	-H	-H	AQUINO e col., 1997
I	-rha-(3→1)-glc	-glc	-H	AQUINO e col., 1997
J	-glc	-glc	-H	AQUINO e col., 1997
K	-glc-(3→1)-fuc	-H	-H	CERRI e col., 1988
L	-glc-(3→1)-fuc	-H	-glc	CERRI e col., 1988
M	-qui	-H	-glc	AQUINO e col., 1989
N	-fuc	-H	-glc	AQUINO e col., 1989
O	-H	-H	-glc-glc	AQUINO e col., 1989
P	-qui	-glc	H	AQUINO e col., 1991

**Figura 4.** Heterosídeos do ácido quinóvico isolados de cascas de *U. tomentosa*. **glc**:  $\beta$ -D-glicopiranosil; **fuc**:  $\beta$ -D-fucopiranosil; **gal**:  $\beta$ -D-galactopiranosil; **qui**:  $\beta$ -D-quinovipiranosil; **rha**:  $\alpha$ -L-ramnopiranosil.

Mais recentemente, foram isolados das cascas de *U. tomentosa* glicosídeos derivados do ácido 19 $\alpha$ -hidróxi-ursólico assim como os tomentosídeos A e B (Figura 5), derivados do ácido piroquinóvico até então inéditos para outras espécies vegetais (KITAJIMA e col., 2000; 2003).



**Figura 5.** Heterosídeos do ácido piroquinóvico isolados de *Uncaria tomentosa* (KITAJIMA e col., 2003). **glc:**  $\beta$ -D-glicopiranosil; **fuc:**  $\beta$ -D-fucopiranosil

### 3.3 Aspectos Etnofarmacológicos e Farmacológicos

São incertos os períodos nos quais decoctos e macerados das cascas e raízes de *U. tomentosa* começaram a ser utilizados na medicina indígena Asháninka, na região amazônica peruana. Especialmente nessa região e na região norte do Brasil, preparados da espécie são administrados em casos de úlceras gástricas, dor reumática, artrite, infecções bacterianas e virais, alergias, asma e até mesmo em casos de câncer (HEITZMAN e col., 2005; POLLITO; TOMAZELLO, 2006).

Diversos estudos foram conduzidos a fim de se investigar as atividades relatadas para o uso desta espécie na medicina popular. A maioria deles está focada na fração alcaloídica de *U. tomentosa*. Experimentos *in vitro* relacionam a ação antiinflamatória à prevenção da produção dos fatores transcripcionais NF- $\kappa$ B e TNF- $\alpha$ , inibindo assim a transcrição de genes associados à inflamação e favorecendo a apoptose (SANDOVAL-CHACON e col., 1998; SANDOVAL e col., 2002). Efeitos anti-inflamatórios também foram constatados para extratos hidroetanólicos de *U. tomentosa*, utilizando o modelo de redução de edema em pata de rato. As ações

farmacológicas observadas foram atribuídas aos derivados do ácido quinóico e aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos presentes nos extratos, tendo-se sugerido inclusive efeitos sinérgicos entre estes grupos químicos (AQUINO e col., 1991; AGUILAR e col., 2002). Em estudos mais recentes, a atividade antiinflamatória de extratos de *U. tomentosa* foi atribuída às propriedades antioxidantes dos compostos polifenólicos, sem a participação da fração dos alcaloides oxindólicos (SANDOVAL e col., 2000; SANDOVAL e col., 2002; PILARSKI e col., 2006).

Atividades sobre o sistema nervoso central foram observadas através de ensaios realizados com receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>2</sub> e muscarínicos M<sub>1</sub> demonstrando que os alcaloides oxindólicos pteropodina e isopteropodina exercem modulação positiva sobre os mesmos (KANG e col., 2002). JÜRGENSEN e colaboradores (2005) demonstraram efeitos antinociceptivos para uma fração alcaloídica enriquecida de *U. tomentosa*, via interação com os receptores 5-HT<sub>2</sub>.

Extratos de *U. tomentosa* foram ensaiados quanto à ação antiproliferativa em linhagens de câncer de mama MCF7, demonstrando intensa atividade do extrato metanólico, onde a concentração dos alcaloides era expressiva (RIVA e col., 2001). Atividades semelhantes foram observadas em linhagens de gliomas e neuroblastomas, após a inoculação de mitrafilina, alcalóide oxindólico pentacíclico isolado de *U. tomentosa* (PRADO e col., 2007). Diferentes preparações de *U. tomentosa* demonstraram atividade antiproliferativa em linhagem humana de células leucêmicas (HL-60), estando correlacionadas com o teor de AOP dos extratos (PILARSKI e col., 2007). A atividade antiproliferativa do alcalóide mitrafilina foi também comprovada para linhagens de câncer de mama (MT-3) e de sarcoma de Ewing (MHH-ES-1), de maneira dose-dependente, em concentrações de 5 a 40 µM, (GIMENEZ e col., 2010).

Lemaire e colaboradores (1999) relataram atividade imunoestimulante, dose dependente, para extrato aquoso de casca de *U. tomentosa*, baseados no estímulo positivo da secreção de citocinas observado em macrófagos alveolares. Um efeito positivo e significativo sobre os níveis de linfócitos foi relatado para um extrato ácido de *U. tomentosa*, rico em alcaloides, quando administrado por 5 meses a pessoas infectadas pelo vírus HIV (KEPLINGER e col., 1999). Da mesma forma, extratos e frações alcaloídicas, isoladas de *U. tomentosa*, avaliadas em células mononucleares periféricas humanas, permitiram observar um aumento nos fatores de liberação de

linfócitos, ressaltando o potencial emprego dessas frações como terapia complementar em pacientes com alterações imunológicas graves (WAGNER e col. 1985, WRUM e col., 1998; WINKLER e col., 2004). Reis e colaboradores (2008), demonstraram atividade antiproliferativa para o vírus da dengue tipo 2, em monócitos humanos, utilizando o extrato hidroetanólico e uma fração enriquecida em AOP de *U. tomentosa*, demonstrando também a inibição da liberação das citocinas TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$ , responsáveis por grande parte das manifestações clínicas da dengue hemorrágica (REIS e col., 2008). Estudos mais recentes demonstraram que a modulação diferencial das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pelo extrato etanólico de *U. tomentosa*, assim como a inibição seletiva do TNF- $\alpha$ , se deve à inibição do fator de liberação NF- $\kappa$ B (ALLEN-HALL e col., 2010).

### 3.4 Aspectos Analíticos

O estudo pioneiro de caracterização química dos principais alcaloides de espécies do gênero *Uncaria* se deve a Hemingway e Philipson (1974;1975), que analisaram a composição 39 amostras, empregando diferentes técnicas cromatográficas, com o objetivo de estabelecer a quimiosistemática para o gênero.

Posteriormente, Van Ginkel (1996) e Valente e col. (2006) propuseram métodos qualitativos por CCD para a análise dos AOP e de flavonoides, tendo como finalidade o controle de qualidade da matéria prima vegetal e de produtos derivados de *U. tomentosa*.

No que tange às técnicas quantitativas por CLAE, há vários estudos publicados sobre o tema (Tabela 1).

**Tabela 1.** Condições experimentais empregadas na análise por CLAE dos alcaloides presentes em *U. tomentosa*.

Parte vegetal	Coluna (°C)	Fase Móvel (modo de eluição)	Deteção	Referência
Raízes	Lichrospher C-18 (15 °C)	CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>3</sub> CN:tampão fosfato pH 6,6 (20:20:60 v/v); (gradiente)	245 nm	Sttupner e col. (1992)
Cascas de raízes e caule	Lichrocart RP-18 (12 °C)	CH <sub>3</sub> CN:éter:tampão fosfato pH 7,7 (34:1:65 v/v); (isocrático)	245 nm	Keplinger (1994)
Cascas do caule	Luna RP-18 (23 °C)	Tampão fosfato pH 7,0:CH <sub>3</sub> CN (65:35 v/v); (gradiente)	245 nm	Ganzera e col. (2001)
Cascas e folhas	Lichrosorb RP-18	CH <sub>3</sub> OH:CH <sub>3</sub> CN:tampão acetato pH 5,0 (20:20:60); (gradiente)	MS	Montoro e col. (2004)
Cascas e extrato seco	Lichrospher RP-18 (28 °C)	Tampão fosfato pH 7,0 : CH <sub>3</sub> CN (60:40 v/v); (isocrático)	245 nm	Griebeler (2005)
Cascas de caule	Gemini RP-18 (35°C)	Tampão fosfato pH 7,0 : CH <sub>3</sub> CN (59:41 v/v); (gradiente)	245 nm	Pavei (2010)

Sttupner e colaboradores (1992) descreveram a separação por CLAE-UV dos alcaloides oxindólicos majoritários presentes em cascas de raízes de *U. tomentosa*, contudo a temperatura de análise de 15 °C mostrou-se como um inconveniente. A mesma restrição pode ser feita para o método por CLAE preconizado por Laus e Keplinger (1994), com eluição em modo isocrático, a 12 °C, que dificulta a reprodutibilidade do método. Um sistema de separação por CLAE mais viável, mais eficiente e reprodutível foi proposto posteriormente por Ganzera e colaboradores (2004), que, junto com o método descrito por Montoro e colaboradores (2004), baseados nas técnicas de CLAE preparativa e CLAE-MS/MS permitiram a identificação e caracterização dos seis principais AOP, três AOT e de quatro triterpenos derivados do ácido quinóico no extrato bruto de *U. tomentosa*.

Quanto aos compostos fenólicos, a análise por CLAE-DAD de decocto de cascas de *U. tomentosa* revelou a presença de ácidos fenólicos e, principalmente,

procianidinas (GONÇALVES e col., 2005). Os mesmos autores relatam a correlação da atividade antioxidante das preparações com a presença destas substâncias. PAVEI e colaboradores (2010), mediante comparação de dados espectrais por UV e uso de substâncias de referência, identificaram, em cascas e raízes de *U. tomentosa*, a presença de ácido clorogênico, ácido cafeico e rutina, juntamente com outros polifenóis.

Em estudo recente e mais abrangente Pavei (2010) desenvolveu e validou um método analítico por CLAE para a análise dos principais AOP no extrato bruto e em frações enriquecidas, otimizando a resolução entre os picos e reduzindo o tempo de análise. No mesmo trabalho, é descrito o desenvolvimento e validação de método analítico por CLAE-UV que permitiu, de forma inédita até então, a quantificação da fração triterpênica de *U. tomentosa*.

### 3.5 Aspectos Tecnológicos

Na literatura científica é muito escasso o número de relatos sobre aspectos tecnológicos relacionados a *U. tomentosa*. A maioria dos relatos sobre processos de transformação tecnológica está ligada a processos industriais e registro de patente. Nesse mesmo sentido, a maioria das preparações comerciais derivadas da espécie não revela qualquer tipo de processo de enriquecimento subsequente ao processo de extração. Nesta categoria destacam-se os extratos secos Krallendorn® e Saventaro® (Immodal Pharmaka; Volders, Austria), os quais são padronizados pelo teor de alcaloides oxindólicos pentacíclicos totais, que variam de 1,3 a 1,75% e acima de 1,3%, respectivamente. O fitomedicamento Imunomax®, indicado para o tratamento da *herpes simplex* e registrado junto à ANVISA pelo Herbarium, trata-se basicamente de um extrato hidroetanólico 40% incorporado em um creme-gel, com teor de alcaloides totais é expresso em mitrafilina (TRENTINI; TRENTINI, 2006).

No que tange à obtenção de frações enriquecidas e purificadas de compostos presentes em *U. tomentosa*, os primeiros esforços foram realizados por Keplinger e colaboradores (1989) os quais descrevem a obtenção de frações purificadas dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos das raízes de *U. tomentosa*, livre de

contaminantes, especialmente de taninos. Na patente gerada, estão descritos processos de extração ácido-base e por fluido supercrítico, bem como a comprovação da atividade imunoestimulante das frações obtidas (KEPLINGER e col., 1989).

Recentemente, PAVEI (2010) descreveu a obtenção de extratos secos nebulizados a partir da solução extrativa das cascas de *U. tomentosa*. Entre os parâmetros críticos avaliados destacam-se o líquido extrator, o processo de extração e o tipo de adjuvante de secagem empregado. A concentração de alcaloides totais, calculados como mitrafilina, variou entre 3,11 e 3,22 mg/g de extrato, Eventos de possível isomerização entre os picos dos marcadores foram observados e atribuídos ao emprego de calor do processo de secagem (PAVEI, 2010).

No que tange aos polifenóis presentes nas cascas de *U. tomentosa*, Castillo e colaboradores (2004) patentearam métodos de obtenção de uma fração altamente solúvel em água, denominada PTI-777, rica em compostos fenólicos. O processo de obtenção descrito inclui fracionamento por adsorção em fase sólida e CLAE em coluna preparativa. A esta fração foram atribuídas atividades no sistema nervoso central, principalmente na dissolução *in vitro* de fibrilas  $\beta$ -amiloides, envolvidas em uma série de processos degenerativos incluindo o mal de Alzheimer (CASTILLO e col., 2004).

O processo de preparação do produto C-MED 100<sup>®</sup> (CampaMed Inc.; Nova Iorque, EUA), de uso bastante citado em estudos biológicos comparativos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, envolve decocção em meio aquoso, seguido de diálise através de membranas de celulose, onde são retidas as substâncias de massa molecular acima de 10 kDa. O permeado, com baixo teor de alcaloides, flavonoides e taninos, é seco por nebulização utilizando maltodextrina como adjuvante. Diferentemente de todos os relatos tecnológicos encontrados na literatura, o produto está padronizado em 8% de ésteres alquil-carboxílicos, sendo-lhe atribuídas atividades imunoestimulantes e reparadoras do DNA (SHENG e col., 1998; 2000; AKESSON, e col., 2003).

A obtenção seqüenciada de frações enriquecidas de polifenóis, alcaloides oxindólicos e saponinas triterpênicas de *U. tomentosa* foi descrita por Pavei (2010). O processo inclui fracionamento em fase sólida utilizando resina poliaromática Diaion HP-20 e gradiente de eluição de metanol e água. As frações de polifenóis e

alcaloides obtidas demonstraram atividade tóxica *in vitro* para linhagens de gliomas C6 e U138-MG, sem alterar a viabilidade celular de células normais.



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## 4.1 Materiais

### 4.1.1 Matéria-prima vegetal

As cascas rasuradas de *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC., coletadas na província de Ucayali, foram fornecidas pelo Laboratórios Induquímica S.A, sediado na cidade de Lima, ambas no Peru. As cascas rasuradas foram identificadas botanicamente pelo biólogo peruano José Ricardo C. de La Cruz, através do laudo de certificação botânica que acompanhou a amostra.

### 4.1.2 Reagentes, solventes e substâncias químicas de referência

Todos os solventes e reagentes utilizados, a não ser quando especificado de modo contrário, apresentam grau de pureza pró-análise (PA). Acetato de amônio anidro (Tedia); acetonitrila grau HPLC (Tedia); ácido clorídrico (Nuclear); ácido fórmico (Vetec); ácido perclórico (CRQ); água ultrapura (Milli-Q); carbonato de sódio (Vetec); etanol absoluto (Nuclear); fosfato de potássio monobásico anidro (Vetec); hidróxido de sódio (Nuclear); hidróxido de amônio (Nuclear); metanol (Nuclear); metanol grau HPLC (Tedia); reagente de Folin-Ciocalteu 1N (Proton). As seguintes substâncias químicas de referência foram utilizadas:  $\alpha$ -hederina (Extrasynthèse); epicatequina (Sigma); mitrafilina (Chromadex);

### 4.1.3 Agentes adsorventes e resinas poliméricas

Bentonita (Sigma); carvão ativado (Synth), Polivinilpolipirrolidona de ligações cruzadas (Divergan RS<sup>®</sup>, BASF); resina macroporosa de caráter aniônico (Dowex Marathon MSC<sup>®</sup> MSC, Sigma-Aldrich), resina macroporosa caráter catiônico (Amberlite<sup>®</sup> IRA-958, Fluka), resina macroporosa de caráter hidrofóbico (Diaion HP-20<sup>®</sup>, Supelco).

#### 4.1.4 Equipamentos e materiais diversos

Agitador magnético (IKA, RO15); Balança analítica (Metler, AB204); Balança de Infravermelho (Gehaka, IV2000); Banho de ultrassom (Elma, Transsonic 460); centrífuga (T32a, Janetski); coluna cromatográfica Gemini-NX C18, 5 µm, 110 Å, 250 x 4,6mm, (Phenomenex); coluna de vidro 600 x 30 mm d.i; condutivímetro (Quimis); cromatógrafo de fase líquida (Shimadzu, CLASS LC 10) equipado com sistema de bombas (Shimadzu, LC-10 AD), controlador de gradiente (Shimadzu, FCV-10 AL), injetor automático (Shimadzu, SIL-10 A), degaseificador (Shimadzu, DGU-2A), detector UV-VIS (Shimadzu, SPD-10 A) e software para aquisição de dados (Shimadzu, CLASS LC-10); espectrofotômetro (Hewlett and Packard, HP8452A); estufa de ar circulante (Mettler, TV 60 UL); evaporador rotatório (Büchi, R-114) ; liofilizador (Edwards, Modulyo® 4k); módulo de ultrafiltração tangencial (Pall Corporation, Minimate®); membranas tipo cassetes de 1 kD, 5kD e 10kD de massa molecular de corte (Pall Corporation, Minimate®); membrana hidrofílica 0,45 µm de poro, 47 mm de diâmetro (Millipore, HVLPO 4700); membrana hidrofílica 0,45 µm de poro, 13 mm de diâmetro (Millipore, HVLPO 1300 ).

## 4.2 Metodologia

### 4.2.1 Caracterização da matéria-prima vegetal

#### 4.2.1.1 Determinação da perda por dessecação

Cerca de 1 g da droga vegetal foi analisada em balança de secagem por infravermelho. A temperatura foi programada para 105 °C, até a variação de peso inferior a 0,1%, e o resultado expresso em perda de massa percentual, pela média de três determinações.

## 4.2.2 Preparação e caracterização da solução extrativa

### 4.2.2.1 Extração

A solução extrativa (SE) foi obtida por maceração em solução hidroetanólica a 40% (v/v), com uma relação droga:solvente de 1:10 (m/v), durante 4 dias e agitação ocasional. O macerado foi filtrado em filtro de prensa e o volume inicial reconstituído com o mesmo líquido extrator.

### 4.2.2.2 Determinação do resíduo seco

O resíduo seco da SE foi determinado em balança de secagem por infravermelho. Três alíquotas de 10 mL da SE foram colocados em pratos de alumínio e analisados utilizando-se as mesmas condições descritas no item 4.2.1.2. O resultado foi expresso em percentual de massa residual, pela média das três determinações.

### 4.2.2.3 Determinação do pH (F. Bras. IV, 1988).

O pH da SE foi determinado a 25 °C em potenciômetro calibrado com soluções de tampões com pH 4,0 e pH 7,0. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

### 4.2.2.4 Determinação da condutividade elétrica

A condutividade da SE foi avaliada em condutímetro calibrado com solução de KCl 0,01 M. O resultado, expresso em  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , foi obtido pela média de três determinações.

#### 4.2.2.5 Determinação da densidade (F. Bras. IV, 1988).

A densidade da SE foi determinada com auxílio de picnômetro de vidro, previamente tarado e calibrado com água destilada a 25 °C. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

### 4.2.3 Obtenção do extrato bruto liofilizado

Para a preservação das características originais, a SE foi concentrada em rotaevaporador a vácuo, a 40 °C, até a metade do seu volume. O concentrado foi acondicionado em frascos específicos para a liofilização e congelado. A liofilização foi realizada de modo usual, a -60 °C e pressão de 0,1 mbar, mantendo as amostras protegidas da luz. O extrato bruto liofilizado (EBL) foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado em dessecador até o momento do uso.

#### 4.2.3.1 Avaliação das características macroscópicas

Foi realizada mediante a observação das características como cor e aspectos gerais do extrato liofilizado obtido.

#### 4.2.3.2 Determinação da perda por dessecação

Conforme descrito no item 4.2.1.1.

### 4.2.4 Extrato bruto reconstituído

Para as etapas seguintes, sempre que necessário, o EBL foi retomado em solução hidroetanólica a 40% (v/v) na proporção de 0,85 % (m/m) e denominado de *extrato bruto reconstituído* (EBR).

## 4.2.5 Análise dos principais constituintes do extrato bruto reconstituído

### 4.2.5.1 Análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos

A análise cromatográfica dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos foi realizada empregando metodologia analítica desenvolvida e validada por Pavei (2010). Para fins de quantificação, uma nova curva padrão da substância de referência mitrafilina foi construída assim como uma nova faixa de trabalho do EBR foi estabelecida.

#### 4.2.5.1.1 Condições cromatográficas

Utilizou-se coluna de fase reversa Gemini-NX RP-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) e a seguinte fase móvel:

Fase A → tampão fosfato 10 mM pH 7,0

Fase B → acetonitrila: tampão fosfato 10 mM pH 7,0 (95:5 v/v).

As análises foram realizadas mantendo-se fluxo constante de 1,1 mL/min, temperatura de 35 °C e detecção em 245 nm, empregando o gradiente de eluição descrito na tabela 2.

**Tabela 2.** Gradiente de eluição da fase móvel em função do tempo para a análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de *Uncaria tomentosa*.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	59	41
12	45	55
16	45	55
18	59	41
22	59	41

#### 4.2.5.1.2 Linearidade da substância de referência

Foram preparadas, em triplicata, soluções de mitrafilina nas concentrações de 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 e 5,0 µg/mL, utilizando solução de acetonitrila 50% (v/v) como diluente. Cada solução foi filtrada em membranas de 0,45 µm de poro e injetada três vezes. Os resultados foram expressos pelas áreas médias do pico do padrão em cada concentração.

#### 4.2.5.1.3 Linearidade do extrato bruto reconstituído

Alíquotas de 5, 10, 15, 20 e 25 mL do EBR foram diluídas até 100,0 mL com solução de acetonitrila 50% (v/v), obtendo-se amostras nas concentrações de 0,425, 0,850, 1,275, 1,700 e 2,125 mg/mL. As soluções foram filtradas em membranas de 0,45 µm de poro e injetadas três vezes. Os cálculos de linearidade foram realizados com base na área do pico da mitrafilina, detectado no EBR.

#### 4.2.5.1.4 Avaliação da linearidade

A linearidade para a mitrafilina e o EBR foi avaliada mediante análise de regressão e os resultados expressos pelos coeficientes de regressão ( $R^2$ ), limites de confiança dos interceptos, teste significância dos coeficientes de inclinação das retas e pela análise dos resíduos padronizados pelo teste de Durbin-Watson.

#### 4.2.5.1.5 Limite de quantificação e limite de detecção (ICH, 2005)

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram calculados utilizando as seguintes equações:

$$LD = \frac{di \times 3,3}{i} \qquad LQ = \frac{di \times 10}{i}$$

Onde  $di$  = desvio padrão do coeficiente linear (intercepto);  $i$  = inclinação da curva analítica.

#### 4.2.5.1.6 Análise quantitativa

A quantificação dos sinais majoritários no EBR foi realizada mediante a equação da reta gerada pela curva padrão da mitrafilina. Para o cálculo da concentração de alcaloides totais, utilizou-se o somatório das áreas dos sinais de interesse e expressou-se como mitrafilina.

#### 4.2.5.2 Análise por CLAE das saponinas triterpênicas

O perfil cromatográfico das saponinas triterpênicas foi obtido empregando-se sistema cromatográfico baseado no método desenvolvido por Pavei (2010). Mudanças na fase móvel, no comprimento de onda e no gradiente de eluição levaram à revalidação do método analítico. A validação foi realizada avaliando-se os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e determinação dos limites de detecção e quantificação (ICH, 2005).

##### 4.2.5.2.1 Condições cromatográficas

Como fase estacionária empregou-se coluna de fase reversa Gemini-NX RP-18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm) e como fase móvel o seguinte sistema:

Fase A → solução de ácido perclórico 0,1%: acetonitrila (90:10 v/v)

Fase B → acetonitrila: solução de ácido perclórico 0,1%. (90:10 v/v)

As análises foram realizadas em fluxo de 0,8 mL/min, temperatura do forno de 40 °C e comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm, empregando o sistema de eluição descrito na tabela 3.

**Tabela 3.** Gradiente de eluição da fase móvel em função do tempo para a análise por CLAE das saponinas triterpênicas de *Uncaria tomentosa*.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	75	25
5	75	25
15	70	30
30	60	40
50	45	55
55	75	25
60	75	25

#### 4.2.5.2.2 Linearidade da substância de referência

A linearidade do método foi avaliada a partir da curva padrão da substância de referência  $\alpha$ -hederina. Para a obtenção das curvas padrão foram preparadas soluções de  $\alpha$ -hederina nas concentrações de 10,0, 15,0, 20,0, 25,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  utilizando solução de acetonitrila 50% (v/v) como diluente. As soluções foram filtradas em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e injetadas em triplicata. Os resultados foram expressos pela área média do pico do padrão entre as triplicatas.

#### 4.2.5.2.3 Linearidade do extrato bruto reconstituído

Alíquotas de 2, 3, 4, 5 e 6 mL do EB foram diluídas para balões de 25 mL, obtendo-se amostras nas concentrações de 0,425, 0,850, 1,275, 1,700 e 2,125 mg/mL. As soluções foram filtradas em filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  de poro e injetadas em triplicata. Para a análise da regressão linear monitorou-se o sinal denominado Pico 1 no cromatograma do EBR.

#### 4.2.5.2.4 Avaliação da linearidade

As curvas de linearidade obtidas foram submetidas à análise de regressão e os resultados expressos pelos coeficientes de regressão ( $R^2$ ), pelos limites de confiança dos interceptos, pelo teste significância dos coeficientes de inclinação das retas e pela análise dos resíduos padronizados pelo teste de Durbin-Watson.

#### 4.2.5.2.5 Repetibilidade

Foi realizada mediante análise de seis diluições de mesma concentração, correspondentes ao ponto central da curva de linearidade do EBR, no mesmo dia. O resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo entre as respostas (áreas) obtidas.

#### 4.2.5.2.6 Precisão intermediária

Foi verificada através da análise de amostra referente ao ponto central da curva de linearidade do EBR, em três dias diferentes. O resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo entre as respostas (áreas) obtidas nos três dias de análise.

#### 4.2.5.2.7 Exatidão

Foi avaliada mediante a contaminação de amostras do EBR com três concentrações de  $\alpha$ -hederina equivalentes a 10,0, 20,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  avaliando-se a porcentagem de recuperação da substância em cada nível de concentração.

#### 4.2.5.2.8 Limite de quantificação e limite de detecção

Conforme descrito no item 4.2.5.1.5.

#### 4.2.5.2.9 Análise quantitativa

A quantificação das saponinas triterpênicas presentes no EBR foi realizada mediante a equação da reta gerada pela curva padrão da  $\alpha$ -hederina. Para o cálculo da concentração de saponinas totais, utilizou-se o somatório das áreas dos sinais de interesse e expressou-se como mitrafilina.

#### 4.2.5.3 Determinação espectrofotométrica dos polifenóis totais

A determinação de polifenóis totais do EBR foi realizada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, conforme descrito por Verza (2006) na quantificação da fração tanante de *Psidium guajavum*, ajustando-se os parâmetros para a análise do EBR de *U. tomentosa*. O método analítico foi validado, avaliando-se os parâmetros de linearidade, precisão, exatidão e determinação dos limites de detecção e quantificação (ICH, 2005).

##### 4.2.5.3.1 Método colorimétrico de Folin-Ciocalteu

Alíquotas de 2,0 mL de amostra, 2,0 mL de reagente de Folin-Ciocalteu, 10,0 mL de água purificada foram pipetadas em balão volumétrico de 25,0 mL e o volume ajustado com solução de carbonato de sódio 20% (m/v). A absorvância foi lida em 760 nm após 20 min da adição da solução de carbonato de sódio, de modo a obterem-se leituras dentro da faixa de 0,2 a 0,8 U.A. Soluções de compensação (branco) foram obtidas substituindo o volume de amostra por água purificada.

##### 4.2.5.3.2 Linearidade da substância de referência

A linearidade do método foi avaliada a partir da curva padrão da substância de referência epicatequina. Para a obtenção das curvas analíticas foram preparadas soluções padrão de epicatequina nas concentrações de 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Em seguida procedeu-se conforme descrito no item 4.2.5.3.1, em triplicata, para

cada solução padrão obtida. Os resultados foram expressos pela média da absorvância de cada triplicata.

#### 4.2.5.3.3 Linearidade do extrato bruto reconstituído

Uma alíquota de 20,0 mL do EBR foi pipetada para balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com água purificada. Desta solução, alíquotas de 1, 2, 3, 4 e 5 mL foram pipetadas para balões volumétricos de 50 mL, completando-se o volume com água purificada. Em seguida procedeu-se conforme descrito no item 4.2.5.3.1, em triplicata para cada solução amostra obtida. Os resultados foram expressos pela média da absorvância de cada triplicata.

#### 4.2.5.3.4 Avaliação da linearidade

As curvas de linearidade obtidas foram submetidas à análise de regressão e os resultados expressos pelos coeficientes de regressão ( $R^2$ ), pelos limites de confiança dos interceptos, pelo teste significância dos coeficientes de inclinação das retas e pela análise dos resíduos padronizados pelo teste de Durbin-Watson.

#### 4.2.5.3.5 Repetibilidade

Seis alíquotas de 3 mL do EBR, relativas ao ponto central da curva de linearidade, foram diluídas a 50 mL com água purificada. Em seguida, as amostras foram tratadas conforme descrito no item 4.2.5.3.1. O resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo dos valores de absorvância.

#### 4.2.5.3.6 Precisão Intermediária

Alíquotas de 1, 3 e 5 mL do EBR foram pipetadas para balões volumétricos de 50 mL completando-se o volume com água purificada. As amostras obtidas foram tratadas conforme descrito no item 4.2.5.3.1. O procedimento foi realizado em três

dias consecutivos e o resultado foi expresso pelo desvio padrão relativo entre as absorvâncias obtidas nos três dias de análise.

#### 4.2.5.3.7 Exatidão

Uma alíquota de 20 mL do EBR foi pipetada para balão volumétrico de 50 mL e o volume completado com água purificada. Desta solução, alíquotas de 2 mL foram pipetadas para balões volumétricos de 50,0 mL, contaminando-se com concentrações de epicatequina equivalentes a 20, 40, e 60 µg/mL completando-se o volume com água purificada. Após o tratamento das amostras conforme descrito no item 4.2.5.3.1, a exatidão foi avaliada verificando-se a porcentagem de recuperação pela seguinte equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

#### 4.2.5.3.8 Limite de quantificação e limite de detecção

Conforme descrito no item 4.2.5.1.5.

#### 4.2.5.3.9 Análise quantitativa

O teor de polifenóis totais do EBR foi determinado pela equação da reta gerada pela curva padrão da epicatequina, aplicando-se os fatores de diluição necessários.

### 4.2.6 Separação da fração de polifenóis do extrato bruto reconstituído

Visando a separação da fração polifenólica, principalmente dos taninos e procianidinas, o EBR foi submetido a dois processos distintos: a separação por membranas e a adsorção em fase sólida.

#### 4.2.6.1 Ultrafiltração do extrato bruto reconstituído

##### 4.2.6.1.1 Preparação da membrana de ultrafiltração

O cassete de ultrafiltração contendo membrana de corte de 10 kD, foi devidamente acoplado nas tubulações de entrada da alimentação, saída do filtrado e saída do retentato.

Para a remoção dos conservantes das membranas, 500 mL de água purificada foram submetidas ao processo, utilizando fluxo de alimentação ( $J_a$ ) de 50 mL/min, fechando-se a válvula da saída do retentato, forçando todo líquido a perfundir a membrana para o filtrado.

##### 4.2.6.1.2 Preparação da amostra

Uma alíquota de 50 mL de EBR foi filtrada previamente em membrana de poro de 0,45  $\mu\text{m}$  a fim de se remover qualquer material em suspensão. Depois de filtrada, a amostra foi colocada no recipiente do equipamento, mantido sob agitação magnética constante.

##### 4.2.6.1.3 Condições de operação

O processo de ultrafiltração foi operado em módulo de diafiltração, onde o volume de líquido perdido para o filtrado é constantemente repostado por solução hidroetanólica 40% (v/v), pela pressão negativa gerada do reservatório da amostra. O fluxo de alimentação ( $J_a$ ) estabelecido em 15 mL/min e a pressão transmembrânica em torno de 20 psi. O fim do processo foi estabelecido até o volume de filtrado atingir 150 mL, equivalente a três vezes o volume inicial de EBR submetido ao processo.

#### 4.2.6.1.4 Avaliação dos resultados

A hidrodinâmica do processo foi avaliada pelo monitoramento do fluxo do filtrado ( $J_f$ ) ao longo do tempo de duração do processo. Em adição a este resultado, o filtrado e o retentado foram coletados e avaliados conforme os parâmetros de pH (item 4.2.2.3), condutividade (item 4.2.2.4), teor de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (item 4.2.5.1), bem como pelo teor de polifenóis totais (item 4.2.5.3).

#### 4.2.6.2 Adsorção em fase sólida

4.2.6.2.1 Seleção do tipo e da quantidade de agente de adsorção a ser empregado

Avaliou-se o emprego de materiais adsorventes de naturezas diversas como a bentonita, o carvão ativo, a caseína e a PVPP na remoção dos polifenóis do EBR. Para tanto, alíquotas de 10 mL do EBR, foram misturados com quantidades de 85,0, 212,5, 425,0, 637,5 e 850 mg de cada um dos agentes de adsorção, equivalentes às proporções resíduo seco:agente de adsorção de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:7,5, 1:10 (m/m). Após um período de agitação magnética de 1 hora, as amostras foram transferidas para tubos de ensaios, e centrifugadas por 30 minutos em velocidade de 3000 RPM e os sobrenadantes coletados e reservados.

#### 4.2.6.2.2 Avaliação dos resultados

Os sobrenadantes foram avaliados conforme os parâmetros de pH (item 4.2.2.3), condutividade (item 4.2.2.4), teor de alcaloides oxindólicos pentacíclicos (item 4.2.5.1), bem como pelo teor de polifenóis totais (item 4.2.5.3).

## 4.2.7 Desenvolvimento de método de fracionamento aplicado aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de *Uncaria tomentosa*

### 4.2.7.1 Seleção da resina de troca iônica

A seleção da resina a ser empregada no fracionamento dos alcaloides oxindólicos foi realizada mediante determinação da capacidade específica de adsorção e pela taxa de recuperação dos alcaloides oxindólicos após tratamento com as resinas Dowex Marathon MSC e Lewatit CNP-105 (PI e col., 2008).

Alíquotas de 100 mL de EBR foram adicionadas de 500 mg de cada resina, sob agitação magnética durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e as concentrações de alcaloides totais foram determinadas conforme método analítico descrito no item 4.2.5.1.

As resinas foram extraídas com 10 mL de solução de EtOH:NH<sub>4</sub>OH (99,9:0,1 v/v), sob agitação magnética, durante 30 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e os teores de alcaloides totais foram determinados conforme o método analítico descrito no item 4.2.5.1.

A capacidade de adsorção específica ( $Q$ ) de cada resina foi determinada pela seguinte equação:

$$Q = \frac{(C_o - C_f) \times V_{am}}{(M_{res} - p)}$$

Onde  $Q$  é a capacidade de adsorção específica ( $\mu\text{g/g}$ ),  $C_o$  e  $C_f$  são as concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) das alíquotas antes e após o tratamento com as resinas,  $V_{am}$  é o volume (mL) das alíquotas de amostra,  $M_{res}$  é a massa de resina adicionada (g) e  $p$  é o teor de umidade (g) da resina.

A taxa de recuperação ( $r$ ) dos alcaloides após a extração das resinas foi determinada pela seguinte equação:

$$r = \frac{(C_e \times V_e)}{(C_o - C_f) \times V_{am}} \times 100$$

Onde  $r$  é a taxa de recuperação (%),  $C_e$  é a concentração total de alcaloides ( $\mu\text{g/mL}$ ) no líquido de extração,  $V_e$  é o volume das alíquotas de extração.  $C_o$ ,  $C_f$  e  $V_{am}$  são os mesmos descritos na equação anterior.

#### 4.2.7.2 Técnica de fracionamento dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos empregando resina aniônica

##### 4.2.7.2.1 Preparação da amostra para o fracionamento

Em um volume de 200 mL de EBR foram adicionados cerca de 17 g de PVPP submetendo-se a agitação magnética durante 1 hora. Em seguida, filtrou-se em funil de Büchner com papel filtro, lavando-se o resíduo do filtro com mais 100 mL de solução hidroetanólica 40%. O filtrado foi acidificado a pH 3,0 com auxílio de solução de ácido fórmico 10% (v/v).

##### 4.2.7.2.2 Soluções empregadas nas etapas de fracionamento

- *Solução de Lavagem (SL)*: solução hidroetanólica 40 % (v/v).
- *Solução de Neutralização (SN)*: solução tampão de acetato de amônio 0,3 M pH 7,0.
- *Soluções de Extração (SE)*:
  - $SE_1$ : solução EtOH: sol.  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% (3:1 v/v)
  - $SE_2$ : solução EtOH: sol.  $\text{NH}_4\text{OH}$  1% (3:1 v/v)
  - $SE_3$ : solução hidroetanólica 80 % (v/v)
- *Solução de Regeneração (SR)*: solução de HCl 5% (v/v).

#### 4.2.7.2.3 Preparação da resina para fracionamento

Cerca de 10 g da resina de caráter fortemente aniônico Dowex Marathon MSC<sup>®</sup> MSC foram acondicionados em coluna de vidro (600 mm x 30 mm d.i.), com auxílio de 500 mL de água purificada sob fluxo de 5,0 mL/min. Em seguida adicionou-se 200 mL de solução hidroetanólica a 40%, sob fluxo de drenagem de aproximadamente 5,0 mL/min (0,5 VL/min), deixando uma altura de líquido cerca de 1 cm acima do leito de resina.

#### 4.2.7.2.4 Descrição da técnica

Diferentes sistemas de fracionamento foram testados durante o desenvolvimento da técnica de fracionamento. Para fins de melhor compreensão foram divididos em dois grupos, denominados *Sistema I* e *Sistema II*.

##### Sistema I:

- Adição da amostra: A amostra de extrato, preparada conforme o item 4.2.7.2.1, foi vertida na coluna e eluída sob fluxo de constante de 5 mL/min, até restar uma altura de líquido cerca de 1 cm acima do leito de resina. O eluato desta etapa foi denominado de *fração de primeira passagem*.
- Lavagem da resina: A etapa de lavagem foi efetuada adicionando-se 200 mL da *SL*, sob fluxo de 5 mL/min, até eliminar todo líquido da coluna. O eluato desta etapa foi denominado de *fração de lavagem*.
- Extração: Cerca de 500 mL da  $SE_1$  ou da  $SE_2$  (item 4.2.7.2.2) foram adicionados lentamente na coluna, mantendo-se o fluxo de eluição de 3 mL/min, até não restar mais líquido na coluna.
- Regeneração da resina: Foi realizada adicionando-se 300 mL da *SR* sob fluxo de 3,0 mL/min. A resina foi armazenada na mesma solução até o próximo uso.

### Sistema II:

- Adição da amostra: A amostra preparada conforme o item 4.2.7.2.1 foi vertida na coluna e eluída sob fluxo de constante de 5,0 mL/min, até restar uma altura de líquido cerca de 1 cm acima do leito de resina. O eluato desta etapa foi denominado de fração de primeira passagem.
- Lavagem da resina: A etapa de lavagem foi efetuada adicionando-se 100 mL de *SL*, sob fluxo de 5 mL/min, até eliminar todo líquido da coluna. O eluato desta etapa foi denominado de fração de lavagem.
- Neutralização: Cerca de 300 mL de *SN* foram adicionados cuidadosamente na coluna e eluídos sob fluxo de 5 mL/min até eliminar todo líquido da coluna.
- Extração: Cerca de 300 mL de *SE<sub>3</sub>* foram adicionados aos poucos na coluna, mantendo-se o fluxo de eluição de 5,0 mL/min, até não restar líquido na coluna.
- Regeneração da resina: Foi realizada adicionando-se 300 mL da *SR* sob fluxo de 3,0 mL/min. A resina foi armazenada na mesma solução até o próximo uso.

As frações de primeira passagem e as frações de lavagem, constituídas pelos compostos sem afinidade pela resina aniônica, foram reunidas e denominadas *eluato da resina aniônica* (ERA). O eluato das etapas de extração, constituídos pelos compostos inicialmente retidos pela resina aniônica, foram denominados *frações enriquecidas de alcaloides* (FALC).

#### 4.2.7.2.5 Avaliação do pH

A avaliação do pH do ERA e da FALC foi realizado conforme descrito no item 4.2.2.3.

#### 4.2.7.2.6 Avaliação da condutividade

A condutividade do ERA e da FALC foi avaliada conforme descrito no item 4.2.2.4.

#### 4.2.7.2.7 Liofilização das frações obtidas

O ERA foi concentrado em rotaevaporador e liofilizado conforme descrito no item 4.2.3. A FALC foi acidificada a pH 4,0, concentrada em rotaevaporador e liofilizada, conforme item 4.2.3.

#### 4.2.7.2.8 Avaliação das características macroscópicas

A avaliação das características macroscópicas foi realizada mediante observação da cor e dos aspectos gerais das frações liofilizadas.

#### 4.2.7.2.9 Determinação do rendimento

Foi avaliado mediante comparação relativa da massa residual de cada fração com a massa inicial de EBL submetida ao processo.

#### 4.2.7.2.10 Análise dos constituintes das frações

As frações ERA e FALC foram submetidas às técnicas analíticas descritas no item 4.2.5.

#### **4.2.8 Desenvolvimento de técnica de fracionamento aplicado à fração de saponinas triterpênicas de *Uncaria tomentosa***

Para a obtenção de fração enriquecida de heterosídeos triterpênicos foram testadas duas técnicas diferentes, tendo como ponto de partida a fração ERA, resultante do processo anterior de fracionamento dos alcaloides oxindólicos. Na primeira técnica foi utilizada resina catiônica e seu desenvolvimento é descrito no presente trabalho. A segunda técnica refere-se àquela descrita por Pavei (2010), que emprega resina poliaromática, de caráter hidrofóbico.

##### **4.2.8.2 Técnica de fracionamento das saponinas triterpênicas empregando resina catiônica**

###### **4.2.8.2.1 Preparação da amostra do extrato para fracionamento**

Exatamente cerca de 1,00 g do ERA liofilizado foi transferido para balão volumétrico de 500 mL com auxílio de solução hidroetanólica 40% (v/v), completando-se o volume com a mesma solução. O extrato foi dissolvido sob banho de ultrassom por 5 minutos. Em seguida, ajustou-se o pH a 8,0 com auxílio de solução de hidróxido de amônio 10% (v/v), sob agitação magnética.

###### **4.2.8.2.2 Soluções empregadas nas etapas de fracionamento**

- *Solução de Lavagem (SL)*: solução hidroetanólica 40 % (v/v).
- *Solução de Acidificação (SA)*: solução de ácido fórmico 0,3 M.
- *Solução de Extração (SE)*: solução hidroetanólica 80 % (v/v).
- *Solução de Regeneração (SR)*: solução de hidróxido de sódio 5% (m/v).

#### 4.2.8.2.3 Preparo da resina para o fracionamento

Cerca de 10 g da resina de caráter fortemente catiônico (Amberlite IRA-958) foram acondicionados na coluna de fracionamento (600 mm x 30 mm d.i.), com o auxílio de 500 mL de água purificada sob fluxo de 5,0 mL/min. Em seguida adicionou-se 200 mL de solução hidroetanólica a 40%, sob fluxo de 5,0 mL/min, deixando uma altura de líquido cerca de 1 cm acima do leito de resina.

#### 4.2.8.2.4 Descrição da técnica

- Adição da amostra: A amostra preparada conforme o item 4.2.8.2.1 foi vertida na coluna e eluída sob fluxo de constante de 3 mL/min até restar líquido a cerca de 1 cm acima do leito de resina.
- Lavagem da resina: A etapa de lavagem foi efetuada adicionando-se 100 mL de SL, eluindo-se sob fluxo de 5,0 mL/min, até eliminar todo líquido da coluna.
- Acidificação do leito: Cerca de 300 mL de SA foram adicionados na coluna e eluídos sob fluxo de 5,0 mL/min até eliminar todo líquido da coluna.
- Extração: Cerca de 300 mL de SE foram adicionados, mantendo-se o fluxo de 5,0 mL/min.
- Regeneração da resina: Foi realizada adicionando-se 300 mL da SR sob fluxo de 3,0 mL/min. A resina foi armazenada na mesma solução até o próximo uso.

O eluato da etapa de extração foi denominado *fração ácida de triterpenos* (FAT).

#### 4.2.8.2.5 Avaliação do pH

A avaliação do pH da FAT foi realizado conforme descrito no item 4.2.2.3.

#### 4.2.8.2.6 Avaliação da condutividade elétrica

A condutividade da FAT foi avaliada conforme descrito no item 4.2.2.4.

#### 4.2.8.2.7 Liofilização

A FAT foi concentrada em rotaevaporador e liofilizada conforme item 4.2.3.

#### 4.2.8.2.8 Avaliação das características macroscópicas do liofilizado

A avaliação das características macroscópicas foi realizada mediante observação da cor e dos aspectos gerais da fração enriquecida liofilizada.

#### 4.2.8.2.9 Avaliação do rendimento

Foi avaliado mediante comparação relativa da massa residual da fração obtida com a massa inicial de ERA submetida ao processo.

#### 4.2.8.2.10 Análise dos constituintes da fração enriquecida

A FAT, depois de liofilizada, foi submetida às técnicas analíticas descritas no item 4.2.5.

4.2.8.3 Técnica de fracionamento das saponinas triterpênicas empregando resina poliaromática (PAVEI, 2010).

#### 4.2.8.3.1 Preparo da amostra para o fracionamento

Exatamente cerca de 300 mg do ERA liofilizado foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de água purificada, completando-se o volume

com a mesma solução. O extrato foi dissolvido com auxílio de banho de ultrassom por 5 minutos.

#### 4.2.8.3.2 Soluções empregadas na etapa de fracionamento

- água
- solução de metanol:água (30:70 v/v)
- solução de metanol:água (50:50 v/v)
- solução de metanol:água (70:30 v/v)
- solução de metanol:água (90:10 v/v)
- metanol

#### 4.2.8.3.3 Preparo da resina

Com auxílio de uma proveta, cerca de 60 mL da resina poliaromática Diaion HP-20 foram transferidos para um erlenmeyer de 500 mL e imersos em quantidade suficiente de metanol, mantendo-se a agitação em agitador orbital. A mistura foi acondicionada na coluna de vidro (600 mm x 30 mm d.i.), com o auxílio de mais 100 mL de metanol. Em seguida, adicionou-se 200 mL de solução metanólica a 50%, sob fluxo de 3,0 mL/min, e, por fim, mais 200 mL de água purificada sob o mesmo fluxo, deixando uma altura de líquido cerca de 1 cm acima do leito de resina, o qual foi mantido durante todo fracionamento.

#### 4.2.8.3.4 Descrição da técnica

A amostra preparada conforme o item 4.2.8.3.1 foi vertida na coluna e eluída sob fluxo de constante de 2 mL/min. Em seguida, procedeu-se ao regime de eluição em gradiente decrescente de polaridade, empregando 200 mL de cada solução

descrita no item 4.2.8.3.3. O eluato da solução metanol:água (90:10 v/v) foi recolhido e denominado de F90.

#### 4.2.8.3.5 Avaliação do pH

A avaliação do pH da F90 foi realizado conforme descrito no item 4.2.2.3.

#### 4.2.8.3.6 Avaliação da condutividade elétrica

A condutividade da F90 foi avaliada conforme descrito no item 4.2.2.4.

#### 4.2.8.3.7 Liofilização

A F90 foi concentrada em rotaevaporador e liofilizada conforme item 4.2.3.

#### 4.2.8.3.8 Avaliação das características macroscópicas dos liofilizados

A avaliação das características macroscópicas foi realizada mediante observação da cor e dos aspectos gerais da fração enriquecida liofilizada.

#### 4.2.3.8.9 Avaliação do rendimento

Foi avaliado mediante comparação relativa da massa residual da fração obtida com a massa inicial de ERA submetida ao processo.

#### 4.2.3.8.10 Análise dos constituintes da fração enriquecida

A F90, depois de liofilizada, foi submetida às técnicas analíticas descritas no item 4.2.5.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---



## 5.1 Caracterização da matéria prima vegetal

A produção de todo medicamento começa pelo estabelecimento de critérios de qualidade para as matérias primas utilizadas na sua fabricação. Em se tratando de produtos de origem vegetal, este processo é realizado via procedimentos específicos de colheita, identificação botânica, amostragem, estabilização e caracterização. Em relação à última etapa, o êxito é alcançado fazendo-se uso de procedimentos bem estabelecidos e aceitos por compêndios oficiais, órgãos harmonizadores e reguladores. Esta avaliação deve contemplar não somente a etapa inicial, porém todas as etapas de transformação tecnológica da matéria prima vegetal (FARIAS, 2003).

A amostra de cascas rasuradas de *U. tomentosa* utilizada neste trabalho foi, conforme dados do fornecedor, previamente secas ao ar e sua identidade foi certificada mediante laudo botânico emitido pelo mesmo (ANEXO I). Esta certificação é indispensável devido ao crescente número de espécies do gênero *Uncaria* que vem ganhando relevância etnofarmacológica e farmacológica, o que propicia a ocorrência de equívocos e adulterações (QUINTELA; DE UGAZ, 2003; HEITZMANN e col., 2005).

Considerando que uma umidade residual elevada nas matérias primas vegetais pode favorecer reações químicas de degradação e proliferação microbiológica, o teor de umidade residual foi determinado obtendo-se o valor de  $7,6 \pm 0,2$  % (m/m), valor que está dentro do preconizado para as matérias primas vegetais em diferentes farmacopéias, que varia de 8% a 14%, de acordo com o farmacógeno (FARIAS, 2003).

## 5.2 Preparação e caracterização da solução extrativa

O método de extração, o sistema solvente, e a proporção droga:solvente utilizados foram os mesmos estabelecidos por Pavei (2010), que otimizou as condições de extração mediante um desenho fatorial, considerando como variáveis de saída teor de extrativos o teor total de alcaloides. Afora o mencionado, a maceração com agitação ocasional, em solução hidroetanólica 40% (v/v), se

apresenta como um método simples e sem o emprego de calor, o que minimiza possíveis eventos de isomerização e degradação dos alcaloides estudados (PAVEI, 2010)

Na tabela 4 encontram-se os parâmetros de caracterização da solução extrativa (SE).

**Tabela 4.** Parâmetros de caracterização da solução extrativa das cascas de *Uncaria tomentosa*.

<b>pH; X ± S</b>	<b>Resíduo seco (% m/m) X ± S</b>	<b>Densidade (g/mL) X ± S</b>	<b>Condutividade (µS/cm) X ± S</b>
4,89 ± 0,01	0,85 ± 0,03	0,98 ± 0,01	233 ± 2

X: média de três determinações; S: desvio padrão

Os valores de resíduo seco e pH obtidos para a SE foram próximos aos obtidos por Pavei (2010) de  $0,89 \pm 0,01$  % e  $4,75 \pm 0,01$ , respectivamente. A determinação da condutividade elétrica, mesmo não sendo um parâmetro usual na caracterização de extratos vegetais, tem como objetivo estabelecer um valor de referência quando da aplicação de técnicas de purificação em fase sólida e separação por membranas, além de permitir a avaliação da carga iônica inerente à solução extrativa obtida. Os valores, no entanto, devem ser vistos com reserva visto as quantidades significativas de etanol nas amostras.

A obtenção do extrato bruto liofilizado (EBL) teve como objetivos principais estabelecer e preservar a composição original da SE, possibilitando detectar alterações induzidas pelo processamento tecnológico adotado ao longo do desenvolvimento do trabalho, e, ao mesmo tempo, servir como material de partida na obtenção do extrato bruto reconstituído (EBR) por retomada em solução hidroetanólica a 40% (v/v), na concentração de 0,85% (m/m), referente ao teor de resíduo seco calculado para a SE.

O EBL apresentou-se como um pó fino, de cor avermelhada e bastante higroscópico. A umidade residual determinada foi de  $7,31 \pm 0,22$ %, que é um valor compatível com o relatado previamente por Pavei (2010), que foi de  $7,66 \pm 0,91$ %.

### 5.3 Análise dos principais constituintes do extrato bruto reconstituído

Adicionalmente ao relatado no presente trabalho foram testados o emprego de técnicas qualitativas por CCD para os alcaloides oxindólicos pentacíclicos e flavonoides de *Uncaria tomentosa* (VAN GINKEL, e col., 1997; VALENTE e col., 2006), bem como o emprego de sistemas cromatográficos relatados para heterosídeos triterpênicos de outras espécies (KRAEMER, 1997; AYHAYDE, 2000). No entanto, a capacidade discriminatória em termos de especificidade e resolução cromatográfica, não se mostrou apropriada no monitoramento dos processos tecnológicos desenvolvidos aplicados a estes grupos de substâncias.

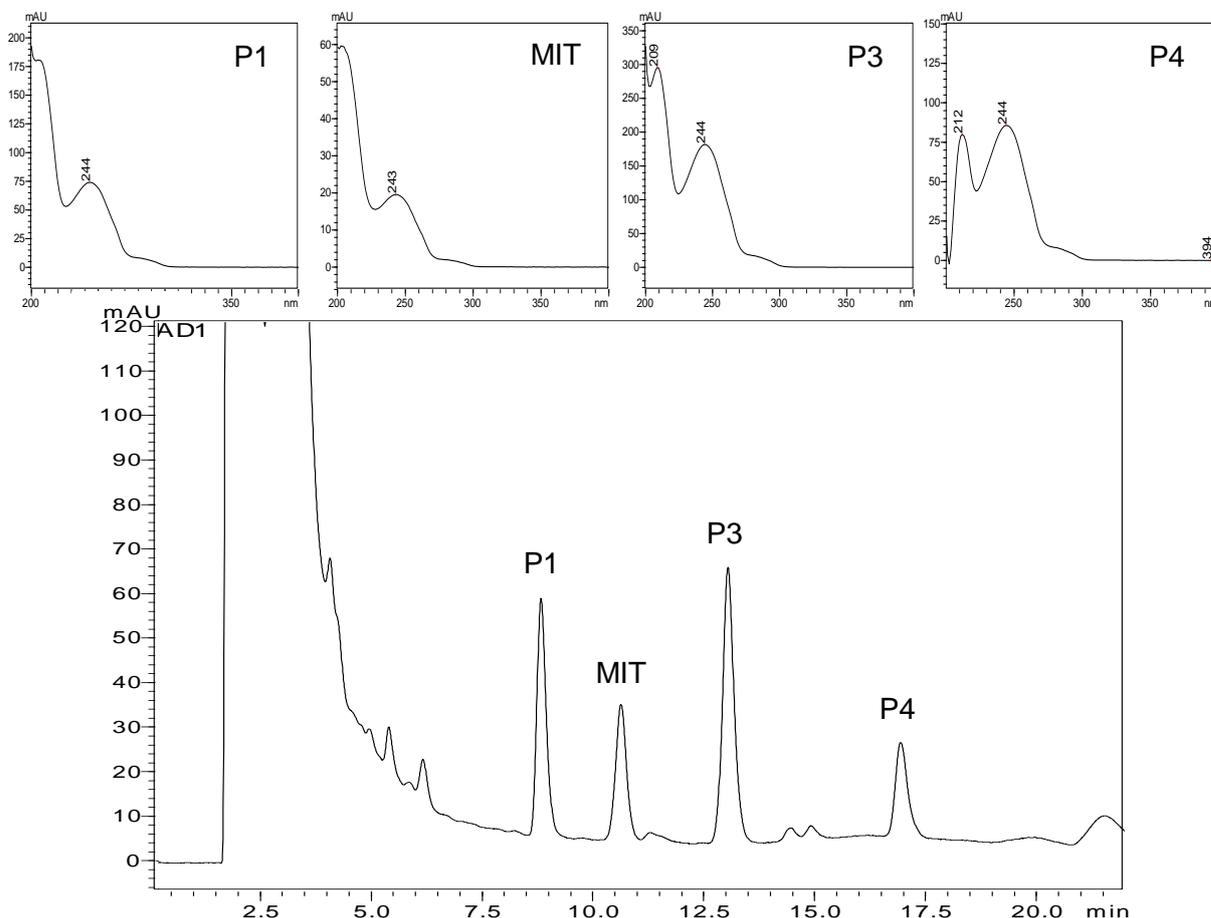
Este fato encoraja um estudo mais aprofundado no desenvolvimento e otimização de métodos por CCD para uma avaliação fidedigna dos constituintes da espécie em questão. Neste sentido, o monitoramento utilizando técnicas por CLAE e espectrofotometria UV/VIS mostraram ser estritamente necessárias.

#### 5.3.1 Análise por CLAE dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos

No cromatograma por CLAE-DAD obtido para a EBR observou-se a presença de 4 picos majoritários (Figura 6). O pico relativo à mitrafilina (MIT) foi identificado com auxílio da substância de referência. Os picos 1, 3 e 4 foram atribuídos, de acordo com a ordem de eluição em sistemas cromatográficos semelhantes (GANZERA e col., 2004; PILARSKI e col., 2006). O primeiro deles corresponde à especiofilina, o terceiro resulta da coeluição da isomitrafilina e pteropodina, e o quarto à isopteropodina. A mesma ordem de eluição também pode ser observada em trabalhos anteriores, onde a separação das substâncias isomitrafilina e pteropodina só é alcançada em condições cromatográficas específicas, porém tidas como pouco reprodutíveis (STUPPNER e col., 1992; LAUS;KEPLINGER, 1994).

Os espectros de absorção no UV obtidos de cada um dos 4 picos, com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD), demonstram comportamentos espectrais muito semelhantes, com máximos de absorção em torno de 245 nm. Desta forma, para fins de quantificação, os teores dos picos P1, P3 e P4 também foram expressos como mitrafilina.

Os resultados da avaliação da linearidade para as curvas analíticas da mitrafilina e do extrato EBR estão apresentados nas tabelas 5 e 6. Dados adicionais referentes ao teste de linearidade do encontram-se no ANEXO II.



**Figura 6.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD dos principais alcaloides oxindólicos pentacíclicos do extrato bruto das cascas de *Uncaria tomentosa* e os respectivos espectros de absorção no UV (200-400 nm).

**Tabela 5.** Resultados da análise de regressão da curva analítica da mitrafilina.

	Coefficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Interseção (a)	-1746,0095	347,8290	-2474,0239	1017,9951	$7,60 \times 10^{-5}$
Inclinação (b)	34106,7333	107,7093	33881,2951	34332,1716	$7,82 \times 10^{-37}$

$$R^2 = 0,9998$$

$$dw_{\text{calc}} = 1,16$$

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

**Tabela 6.** Resultados da análise de regressão da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos.

	Coeficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Interseção (a)	235,3857	565,3769	-947,9618	1418,7332	0,6818
Inclinação (b)	77238,3529	411,9426	76376,1471	78100,5588	$1,64 \times 10^{-32}$
$R^2 = 0,9994$		$dw_{\text{calc}} = 2,18$			

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

A análise de regressão linear das curvas obtidas tanto para mitrafilina quanto para o EBR evidenciaram a ausência de desvios de linearidade, com valores de  $R^2$  acima de 0,999. Os limites de confiança superior e inferior para os interceptos (a) compreendem o valor zero nas equações lineares, indicando ausência de erro sistemático constante. A análise dos resíduos padronizados indica ausência de *outliers* visto que todos os valores encontram-se entre os limites de 2 e -2. O teste de Durbin-Watson (dw) evidenciou a ausência de autocorrelação entre os resíduos das regressões visto que os valores de  $dw_{\text{calc}}$  são ambos maiores que  $dw_{\text{inferior}}$  e  $dw_{\text{superior}}$  de 0,81 e 1,07, respectivamente, para  $n=15$  e  $\alpha=0,01$ .

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados para a curva analítica da mitrafilina foram de 0,03  $\mu\text{g/mL}$  e 0,09  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os valores são muito próximos aos obtidos nos trabalhos de Pavei (2010), de 0,02  $\mu\text{g/mL}$  (LD) e 0,06  $\mu\text{g/mL}$  (LQ).

Na tabela 7 estão apresentados as concentrações de mitrafilina e os picos P1, P3 e P4 no EBR determinados por CLAE-PDA.

**Tabela 7.** Concentrações dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de *Uncaria tomentosa*.

Pico	Concentração no EBR ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentração no EBL ( $\text{g}\%$ ) <sup>1</sup>	DPR (%)
P1	25,00	0,30	1,19
MIT	23,94	0,28	1,28
P3	52,73	0,63	0,99
P4	23,22	0,27	0,91
Total	123,72	1,48	0,80

MIT: mitrafilina; EBR: extrato bruto reconstituído; EBL: extrato bruto liofilizado; (1) expresso em gramas de mitrafilina em 100 g de extrato bruto liofilizado; DPR: desvio padrão relativo.

### 5.3.2 Análise por CLAE das saponinas triterpênicas

A análise quali e quantitativa de triterpenos por CLAE-UV é um verdadeiro desafio ao desenvolvimento de métodos analíticos devido à ausência de cromóforos com absorção acima de 205-215 nm, à alta complexidade das misturas como a que esses compostos costumam ocorrer em vegetais, ao caráter anfifílico dos mesmos e à carência de substâncias químicas de referência disponíveis comercialmente. A detecção em UV destas substâncias freqüentemente é realizada em comprimentos de onda situados entre 200 a 210 nm, implicando em forte interferência devida aos demais constituintes da amostra e da própria fase móvel (OLESZEK, 2002).

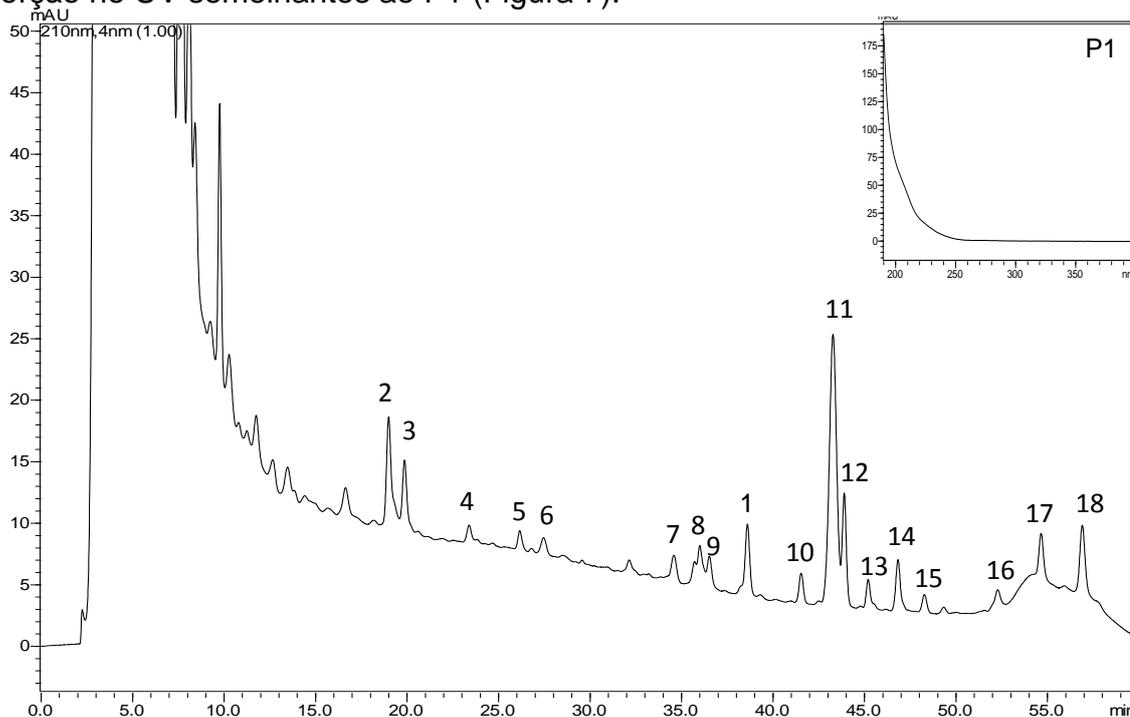
No que tange à análise das saponinas de *Uncaria tomentosa*, a única tentativa de estabelecer um perfil cromatográfico fidedigno destes compostos na espécie é devida aos trabalhos de Pavei (2010), que preconiza a eluição em gradiente de ácido fórmico 0,01% e acetonitrila, temperatura de 35 °C, fluxo de 1,0 mL/min e detecção em 205 nm.

Neste trabalho, a análise da fração triterpênica do EBR mediante as condições cromatográficas propostas pelo trabalho citado mostrou restrições para a

reprodutibilidade do método analítico, originadas pelo baixo comprimento de onda utilizado, e em consequência, às interferências associadas ao ácido fórmico e aos demais constituintes presentes no EBR.

Dentre as estratégias adotadas para superar os problemas citados, a troca do ácido fórmico pelo ácido perclórico e o aumento do comprimento de onda de análise, de 205 para 210 nm, trouxeram vantagens para a obtenção de um sistema cromatográfico reprodutível para a separação das saponinas do EBR (Figura 6).

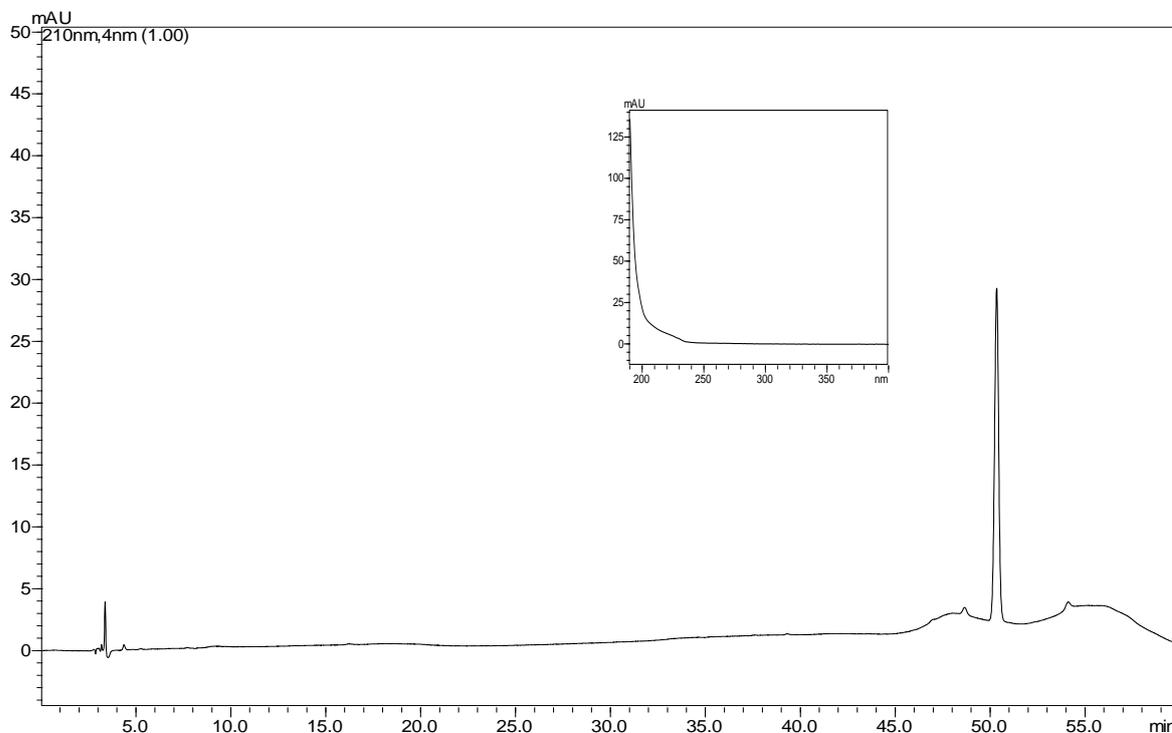
Para a validação do método analítico baseou-se no pico número 1 (P1), que além de uma resolução satisfatória mostrou espectro absorção no UV típico de saponinas. A fração triterpênica total foi expressa considerando o somatório das áreas dos picos numerados de 1 a 18, os quais apresentaram espectros de absorção no UV semelhantes ao P1 (Figura 7).



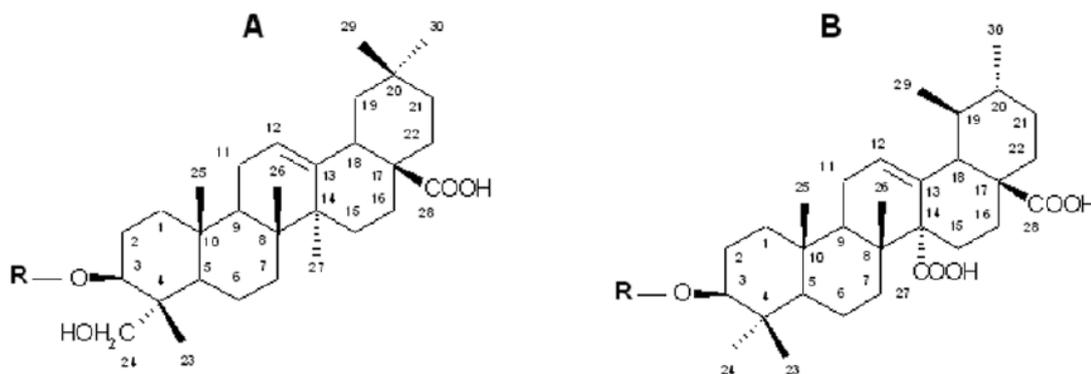
**Figura 7.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD das saponinas do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*. Em detalhe o espectro de absorção no UV (190-400nm) do pico 1 (P1).

Considerando a inexistência de substâncias de referência disponíveis comercialmente, a saponina  $\alpha$ -hederina foi utilizada como padrão externo (Figura 8). A  $\alpha$ -hederina, assim como grande parte dos heterosídeos do ácido quinóico

relatados para *Uncaria tomentosa*, é uma saponina monodesmósica de caráter ácido (Figura 9).



**Figura 8.** Perfil cromatográfico por CLAE-DAD da  $\alpha$ -hederina, mostrando em detalhe o espectro de absorção no UV (190-400nm) da substância de referência.



**Figura 9.** Estrutura química geral da  $\alpha$ -hederina (A) e dos derivados do ácido quinóico (B). Adaptado de Pavei (2010).

Os resultados da avaliação da linearidade da curva analítica da  $\alpha$ -hederina estão detalhados na tabela 8. Dados adicionais referentes ao teste de linearidade do encontram-se no Anexo III.

**Tabela 8.** Resultados da análise de regressão linear da curva padrão da substância de referência  $\alpha$ -hederina.

	Coeficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Interseção (a)	2278,33	1072,53	-38,73	4595,40	0,05
Inclinação (b)	6376,81	50,56	6267,59	6486,04	$1,84 \times 10^{-21}$

$$R^2 = 0,9991 \quad dw_{\text{calc}} = 1,49$$

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

A partir da análise do coeficiente de regressão linear (0,9991) constata-se que, nas condições cromatográficas empregadas, a curva analítica da  $\alpha$ -hederina apresenta linearidade bastante satisfatória. Os limites de confiança da intersecção da curva (a) incluem o zero, evidenciando ausência de erro sistemático constante. A análise dos resíduos padronizados da regressão não aponta para a presença de *outliers*, estando todos os pontos situados entre os valores de 2 e -2. O teste de Durbin-Watson (dw) evidenciou a ausência de autocorrelação entre os resíduos da regressão visto que  $dw_{\text{calc}}$  é maior que  $dw_{\text{inferior}}$  e  $dw_{\text{superior}}$  de 0,81 e 1,07, respectivamente, para  $n=15$  e  $\alpha=0,01$ .

Calculados conforme as equações preconizadas pelo ICH (2005), os limites de detecção e quantificação para a substância de referência apresentaram valores de 0,55  $\mu\text{g/mL}$  e 1,68  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Os valores foram significativamente maiores do que aqueles obtidos por Pavei (2010) de 0,16  $\mu\text{g/mL}$  e 0,47  $\mu\text{g/mL}$ . Esta diferença pode estar relacionada ao menor comprimento de onda empregado no trabalho mencionado, o que torna o método de análise destes compostos mais sensível. Esta maior sensibilidade do método é refletida na inclinação (b) da curva

analítica obtida no trabalho anterior de 7227,59, valor superior ao obtido na curva analítica obtida no presente trabalho (tabela 8).

A avaliação da linearidade foi igualmente realizada para o EBR, considerando os mesmos parâmetros descritos na análise de regressão da  $\alpha$ -hederina, monitorando-se a área do Pico 1. Os resultados encontram-se descritos na tabela 9.

**Tabela 9.** Resultados da análise de regressão da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação das saponinas triterpênicas

	Coeficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Intersecção (a)	1441,57	365,11	677,37	2205,76	$8,62 \times 10^{-4}$
Inclinação (b)	31184,42	209,23	30746,50	31622,34	$1,28 \times 10^{-30}$

$$R^2 = 0,9989 \quad dw_{\text{calc}} = 1,31$$

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

Os resultados da avaliação da linearidade do EBR, considerando o coeficiente de regressão obtido (0,9989), evidenciam a ausência de desvios de linearidade na faixa de concentrações estabelecida. A partir da observação dos limites de confiança para a intersecção (a) denota-se que estes não incluem o valor zero, indicando a existência de um pequeno erro sistemático constante, que pode estar atrelado à complexidade da matriz. O teste de Durbin-Watson (dw) evidenciou a ausência de correlação entre os resíduos da regressão visto que  $dw_{\text{calc}}$  é maior que  $dw_{\text{inferior}}$  e  $dw_{\text{superior}}$  de 0,81 e 1,07, respectivamente, para  $n=15$  e  $\alpha=0,01$ .

A precisão do método cromatográfico para o EBR foi avaliada mediante a determinação dos parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária (tabela 10). Na repetibilidade são expressas as variações obtidas após várias replicatas do método analítico em um curto período de tempo, enquanto que na precisão intermediária o são as variações obtidas na aplicação do método analítico sob a influência de fatores diferentes, como dias ou analistas (ICH, 2005).

**Tabela 10.** Resultados da avaliação dos parâmetros relativos à precisão do método de análise por CLAE das saponinas triterpênicas do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

Amostra	Precisão intermediária X ± S (DPR%)		Repetibilidade X ± S (DPR%)	
	Pico 1	Somatório	Pico 1	Somatório
EBR	53921,66 (2,69)	1189361,26 (3,64)	53978,26 (1,07)	1140970,05 (1,41)

EBR: extrato bruto reconstituído; X: média das áreas; S: desvio padrão; DPR%: desvio padrão relativo;

Em ambos os parâmetros foram considerados tanto as áreas do Pico 1 isoladamente, quanto o somatório das áreas dos picos de numerados. Os resultados demonstraram valores de DPR abaixo de 5%, considerados bastante satisfatórios tendo em vista o limite máximo aceitável de 15% para matrizes complexas (FDA, 2001).

No teste de exatidão as recuperações ficaram todas próximas ao valor de 100% (Tabela 11).

**Tabela 11.** Resultados do teste de exatidão do método de análise por CLAE das saponinas triterpênicas no extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

Concentração teórica (mg/mL)	Concentração experimental (mg/mL)	DPR (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%) (DPR %)
9,96	10,13	1,23	101,71	101,72 (1,11)
19,92	20,49	1,22	102,86	
29,88	30,06	0,97	100,60	

DPR: desvio padrão relativo;

Na tabela 12 estão descritas as concentrações do Pico 1 e os teores totais de saponinas triterpênicas no EBR e no EBL, expressas como  $\alpha$ -hederina.

**Tabela 12.** Concentração de saponinas triterpênicas no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de *Uncaria tomentosa*.

	Concentração no EBR (mg/mL)	Concentração no EBL <sup>1</sup> (g%)	DPR (%)
Pico 1	0,06	0,80	0,59
Total	1,55	18,37	3,25

EBR: extrato bruto reconstituído; EBL: extrato bruto liofilizado; (1) expresso em gramas de  $\alpha$ -hederina por 100 g de extrato bruto liofilizado; DPR: desvio padrão relativo

### 5.3.3 Determinação espectrofotométrica dos polifenóis totais

Os relatos de quantificação da fração de compostos fenólicos presentes nas cascas de *U. tomentosa* são escassos. No que se refere a análises por CLAE, os trabalhos disponíveis relatam a detecção e quantificação de ácidos fenólicos, flavonoides e até proantocianidinas diméricas (GONÇALVES e col., 2005; PAVEI e col., 2010). Em ambos os casos, a totalização dos teores de compostos fenólicos esbarra nas dificuldades da análise cromatográfica dos taninos condensados de maior grau de polimerização, presentes nos extratos hidroalcoólicos das cascas da planta (SCHOFIELD e col., 2001; HEITZMANN e col., 2005).

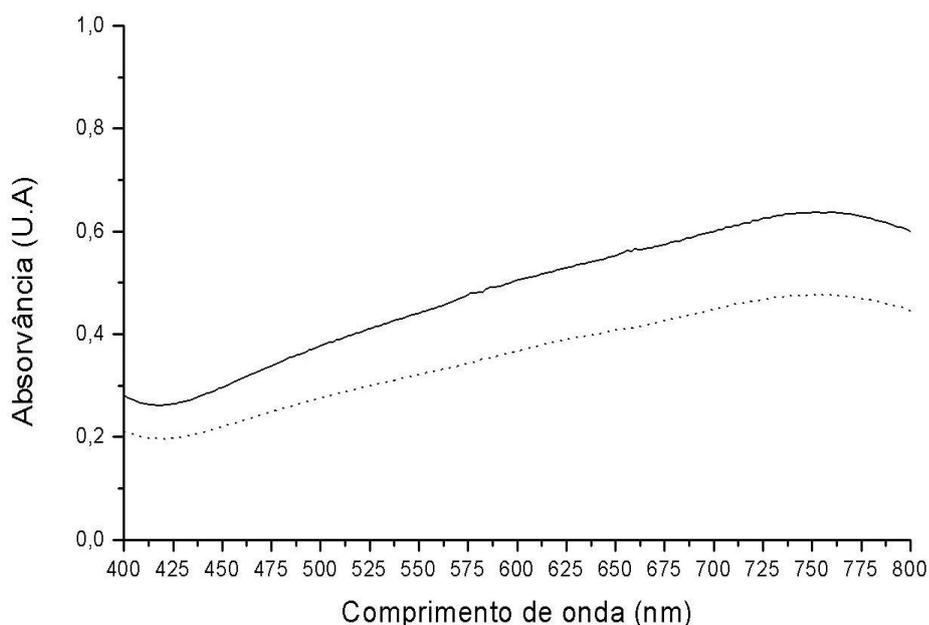
A busca por um método simples e eficaz de determinação do teor de polifenóis totais conduziu ao emprego do ensaio colorimétrico utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu. O método de doseamento envolve a formação de um complexo de ácido fosfotúngstico/ácido fosfomolibdico, de cor azul, resultado da redução do reagente pelas hidroxilas fenólicas dos componentes em solução (SCALBERT e col., 1992).

Pilarski e col., (2006) relatam a determinação e comparação do teor de polifenóis totais de diferentes extratos de *U. tomentosa* aplicando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, contudo, utilizando procedimento de preparação de amostra específico sujeitas a contestação. Conforme demonstrado por Verza (2006), o método de doseamento do teor de polifenóis totais utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, incluindo o método de determinação de taninos totais da *European Pharmacopoeia* (2005), merece uma adequação das condições analíticas,

avaliando-se, caso a caso, a natureza dos polifenóis da amostra sob análise e a substância de referência utilizada.

Para a validação do método analítico, a epicatequina foi escolhida como substância de referência com base na composição química da fração de compostos fenólicos relatados para *U. tomentosa*, onde essa substância se faz presente, tanto na forma isolada como na composição dos taninos condensados (GONÇALVES e col., 2005; PILARSKI e col., 2006).

A seleção do comprimento de onda de leitura das amostras foi realizada mediante comparação dos espectros de varredura obtidos com a solução de epicatequina e com amostra do EBR de *U. tomentosa*, após o tratamento descrito no item 4.2.5.3.1 (Figura 10).



**Figura 10.** Espectros de absorção da substância de referência epicatequina (—) e do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa* (.....), após tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu.

A análise comparativa dos comportamentos espectrais apresentados pela epicatequina e pela amostra de EBR demonstrou máximos de absorção próximos a 760 nm, característico do produto de reação formado neste ensaio colorimétrico (SCALBERT e col., 1992). Para fins quantitativos, utilizaram-se os valores de absorvância em 760 nm.

O tempo ótimo decorrido entre a adição da solução de carbonato de sódio e a leitura no espectrofotômetro foi estabelecido mediante o acompanhamento da cinética de reação, durante uma hora. Um máximo de absorvância pode ser observado próximo aos 20 minutos de reação. À diferença dos 30 minutos observados em trabalhos anteriores e preconizado em compêndios oficiais (DAB, 1986; F. BRAS., 1988; EUR. PH., 2002; SOARES, 2003; VERZA, 2006), o fato observado reforça a necessidade da adequação das condições analíticas a diferentes amostras analisadas.

A linearidade do método para epicatequina foi avaliada na faixa de concentração de 1,64 µg/mL a 8,23 µg/mL. A partir da análise da regressão (Tabela 13) obteve-se um comportamento linear satisfatório para o tipo de método analítico. Dados adicionais da linearidade do método analítico encontram-se no Anexo IV.

**Tabela 13.** Resultados da análise de regressão linear da curva analítica da epicatequina.

	Coeficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Interseção (a)	0,023567	0,004267	0,014349	0,032784	9,82x10 <sup>-5</sup>
Inclinação (b)	0,089602	0,000781	0,087914	0,091291	6,35x10 <sup>-21</sup>

$$R^2 = 0,9990 \quad dw_{\text{calc}} = 2,40$$

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

A análise dos limites de confiança para o intercepto (a) demonstra que os mesmos não compreendem o valor 0, indicando a presença de algum erro sistemático constante. O teste de Durbin-Watson (dw) evidenciou a ausência de autocorrelação entre os resíduos da regressão visto que  $dw_{\text{calc}}$  é maior que  $dw_{\text{inferior}}$  e  $dw_{\text{superior}}$  de 0,81 e 1,07, respectivamente, para  $n=15$  e  $\alpha=0,01$ .

A linearidade satisfatória obtida para a substância de referência pode ser observada igualmente na análise do EBR, na faixa de concentração de 5,6 a 28,0 µg/mL (Tabela 14).

**Tabela 14.** Resultados da análise de regressão linear da curva analítica do extrato bruto reconstituído na quantificação dos polifenóis totais.

	Coeficientes	Erro padrão	LC inferior	LC superior	valor-P
Interseção (a)	0,013867	0,004083	0,005045	0,022689	0,004781
Inclinação (b)	21,41645	0,21998	20,94121	21,89169	5,31x10 <sup>-20</sup>

$R^2 = 0,9986$   $dw_{calc} = 1,04$

LC: limite de confiança;  $R^2$ : coeficiente de regressão linear;  $\alpha=0,05$ ; dw: teste de Durbin-Watson

A análise dos limites de confiança para o intercepto (a) demonstrou que os mesmos não compreendem o valor 0, indicando novamente a presença de algum erro sistemático constante. O teste de Durbin-Watson (dw) foi inconclusivo quanto à presença de autocorrelação entre os resíduos da regressão visto que  $dw_{calc}$  é maior que  $dw_{inferior}$  de 0,81 e menor que  $dw_{superior}$  de 1,07 para  $n=15$  e  $\alpha=0,01$ .

Os resultados de precisão intermediária e repetibilidade do método estão descritos na tabela 15, encontrando-se ambos os valores de DPR% abaixo de 5%.

**Tabela 15.** Resultados da avaliação dos parâmetros relativos à precisão do método de análise dos polifenóis totais no extrato bruto de *Uncaria tomentosa*.

Precisão intermediária <sup>1</sup> X (DPR %)	Repetibilidade <sup>2</sup> X (DPR %)
0,398 (4,03)	0,401 (1,57)

X: média das absorvâncias; DPR: desvio padrão relativo; 1: referente a três análises realizadas em três dias diferentes; 2: referente a seis análises consecutivas em um mesmo dia;

No teste de exatidão, após serem adicionadas concentrações conhecidas de epicatequina (20 µg/mL, 40 µg/mL e 60 µg/mL) em diluições do EBR contendo concentração de polifenóis previamente determinadas de 31,27 µg/mL obtendo-se taxas de recuperações dentro do intervalo de 95% a 105% (tabela 16).

**Tabela 16.** Resultados do teste de exatidão do método de determinação do teor de polifenóis totais no extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	DPR (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%) (DPR%)
61,39	64,49	1,13	104,87	
81,39	84,02	1,51	103,22	103,31 (1,48)
101,39	103,25	1,64	101,83	

DPR%: desvio padrão relativo

**Tabela 17.** Concentração de polifenóis totais no extrato bruto reconstituído e no extrato bruto liofilizado de *Uncaria tomentosa*.

	Concentração no EBR (mg/mL)	Concentração no EBL <sup>1</sup> (g%)	DPR (%)
Polifenóis Totais	2,65	31,93	1,51

EBR: extrato bruto reconstituído; EBL: extrato bruto liofilizado; (1) expresso em gramas de epicatequina por 100 g de extrato bruto liofilizado; DPR: desvio padrão relativo

Para a quantificação do teor de polifenóis totais no EBR foi utilizada a equação da reta obtida com a curva padrão da epicatequina (Tabela 17), obtendo-se um valor cerca de trinta vezes maior do que o valor determinado por CLAE para o mesmo extrato liofilizado, de 1,12 g% (PAVEI, 2010). Esta considerável diferença pode ser atribuída ao fato de o método cromatográfico abranger apenas alguns ácidos fenólicos e flavonoides com absorção em 325 nm, enquanto que o método espectrofotométrico é de caráter geral, determinando a concentração total de polifenóis, incluído taninos, flavonoides e os demais polifenóis de baixa massa molecular.

#### 5.4 Separação dos polifenóis do extrato bruto reconstituído

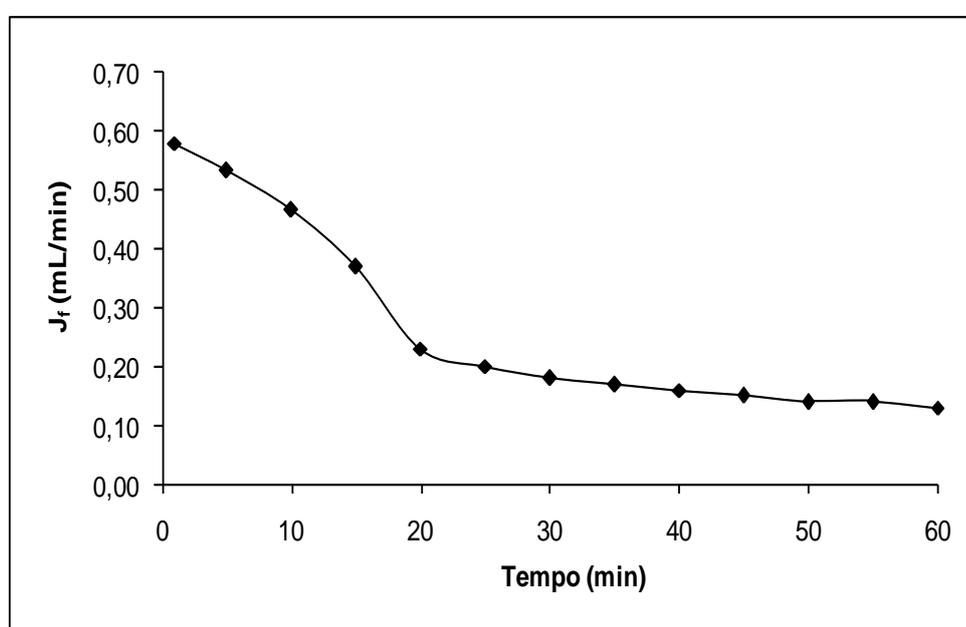
Provavelmente a maior dificuldade encontrada no processo de transformação tecnológica residuiu na elevada concentração de polifenóis presentes no EBR das cascas *U. tomentosa*. Dentre os problemas observados em testes preliminares destaca-se a grande tendência de co-precipitação destes compostos juntamente com os alcaloides na etapa de concentração, bem como a incrustação irreversível das resinas de troca iônica utilizadas na obtenção de frações purificadas de derivados do ácido quinóico e dos alcaloides. A ocorrência destes fenômenos é justificada pelo elevado teor de polifenóis totais verificados para o EBR, perfazendo de cerca de 30% da massa do EBL.

Na literatura há estudos visando à retirada dos polifenóis do extrato bruto de *U. tomentosa* com o objetivo restrito ao pré-tratamento das amostras para fins analíticos. Utilizando a resina de poliamida 6 foi possível melhorar os perfis cromatográficos por CLAE e CCD dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos, (GANZERRA e col., 2004; VALENTE e col., 2006).

Nesta etapa do trabalho vislumbrou-se não somente a remoção, mas ao mesmo tempo, a obtenção de uma fração enriquecida dos polifenóis do EBR, cujos estudos químicos, tecnológicos e biológicos serão discutidos em trabalho paralelo desenvolvido dentro do grupo de trabalho.

Inicialmente avaliou-se a aplicação do processo de ultrafiltração tangencial, bastante empregado na concentração e purificação de macromoléculas como proteínas, polissacarídeos e oligonucleotídeos, bem como no beneficiamento/clarificação de sucos de frutas para a remoção de enzimas, taninos, polissacarídeos e pectinas (CARVALHO e col., 1998; YOUN e col., 2003; RAI e col., 2005; YAZDANSHENAS e col., 2005; CASSANO e col., 2006; TASSELLI e col., 2007). O processo, baseado na separação de compostos por exclusão molecular exercida por membranas de poros inferiores a 0,1  $\mu\text{m}$ , ainda é pouco explorado na obtenção de frações enriquecidas de compostos vegetais, fato este que instigou a sua aplicação na obtenção de uma fração de polifenóis de alta massa molecular do EBR de *U. tomentosa*.

Na figura 11 está demonstrado o comportamento hidrodinâmico do EBR durante o processo de ultrafiltração. Com o fluxo de alimentação e a pressão transmembrânica mantidos em 15 mL/min e 20 psi, respectivamente, o fluxo inicial de filtrado foi de apenas 0,58 mL/min. O valor foi considerado baixo, visto que, nas mesmas condições, utilizando-se água purificada, o fluxo de filtrado é de 11,7 mL/min. O baixo valor de fluxo inicial de filtrado pode ser atribuído a presença de etanol na amostra e a mais alta interação do solvente com as membranas de polietersulfona, de caráter apolar. Além disto, denota-se um rápido decaimento deste fluxo ao longo dos primeiros vinte minutos e uma aparente estabilização do mesmo em valores próximos a 0,1 mL/min.



**Figura 11.** Representação gráfica de fluxo do filtrado em função do tempo de processo de ultrafiltração tangencial do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

O comportamento observado é típico de processos com fenômeno de deposição de solutos na membrana, mais conhecido como *fouling*, o qual é responsável pelo aumento da resistência hidráulica das membranas e pela diminuição do fluxo do filtrado ao longo do processo (CARVALHO e col., 1998; DOSMAR; PINTO, 2007). A redução irreversível da permeabilidade hidráulica da membrana foi observada, após a lavagem com NaOH 0,1 M a 40 °C, quando o fluxo de filtrado, utilizando-se água purificada nas mesmas condições de operação, foi de

somente 5,7 mL/min. O processo, para fins práticos, foi considerado inviável para a remoção dos polifenóis macromoleculares do EBR.

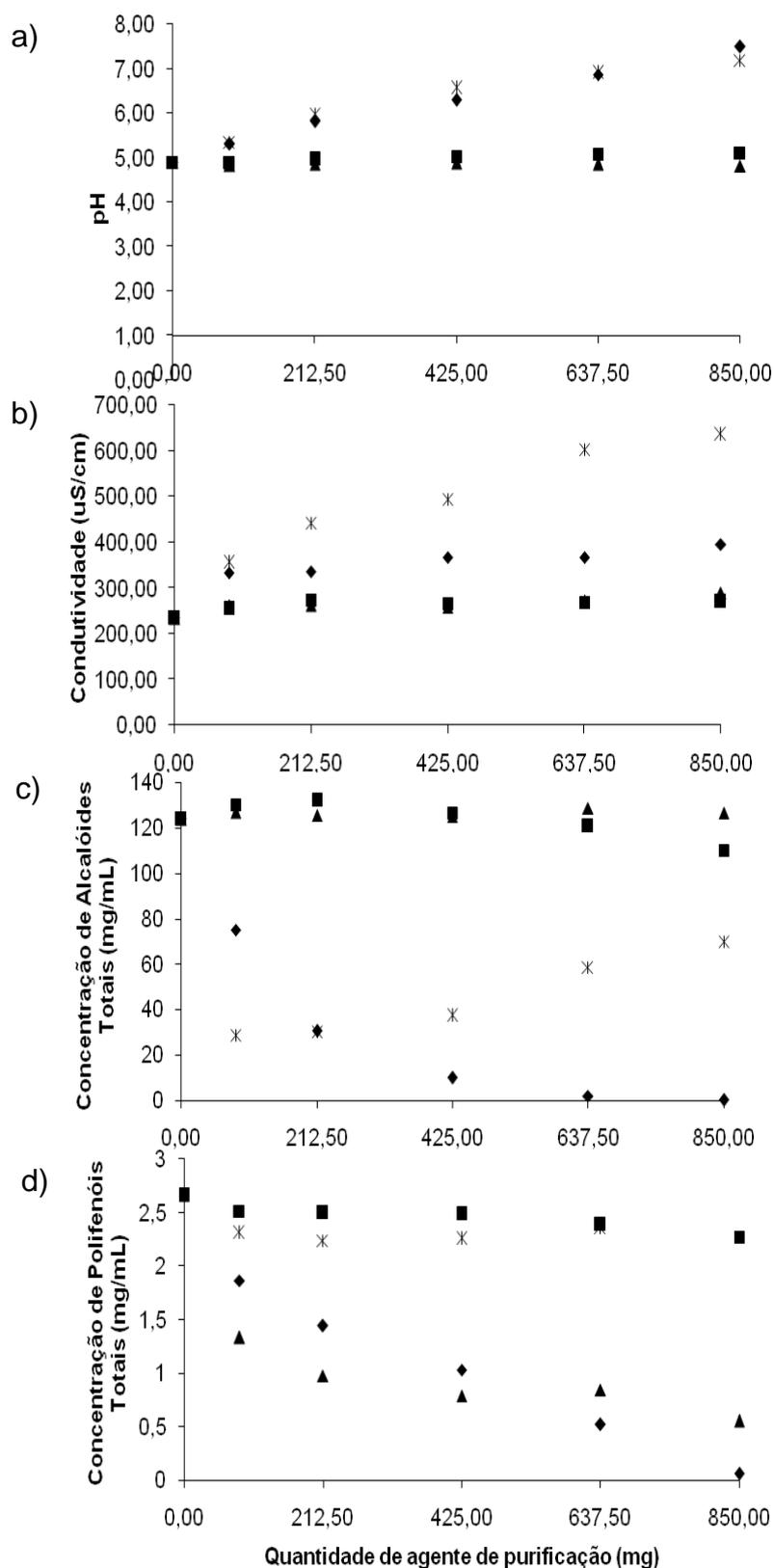
A impossibilidade de se empregar os processos de ultrafiltração fez com que se buscassem outros métodos clássicos de separação dos polifenóis como o emprego de agentes de clarificação, tradicionalmente utilizados no beneficiamento de bebidas como vinhos, cervejas e sucos de frutas para eliminação da turbidez, diminuição da adstringência e melhoramento do sabor (SARNI-MANCHADO e col., 1999; BASF, 2003; YOUN e col., 2004; RAI e col., 2005; GOKMEN; ÇETINKAYA, 2007).

Com exceção do carvão ativado, que age por adsorção inespecífica, a maioria dos agentes de clarificação atua por meio de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, removendo diversas macromoléculas em solução, como pectinas, proteínas e taninos.

A seleção do melhor agente de pré-purificação, assim denominado neste trabalho, levou em consideração não só a capacidade de remover os compostos polifenólicos, mas também a avaliação de parâmetros críticos para a qualidade do extrato resultante, como o pH, condutividade e teor total de alcaloides oxindólicos.

Na figura 12 estão demonstrados os gráficos de monitoramento dos parâmetros mencionados após o tratamento do EBR com as quantidades pré-estabelecidas dos agentes de pré-purificação, baseadas no resíduo seco do EBR.

O tratamento do EBR com o carvão ativado provocou um aumento significativo do pH e da condutividade do extrato, dando indícios de alterações na composição química da amostra e aumento da carga de íons em solução. O aumento do pH é característica intrínseca da ação do carvão ativado, observada principalmente no tratamento da água (KIBBE, 2000). Embora tenha se observado uma elevada capacidade de remoção dos polifenóis totais, essa é também acompanhada pela remoção simultânea dos alcaloides oxindólicos, reforçando suas características como adsorvente inespecífico.



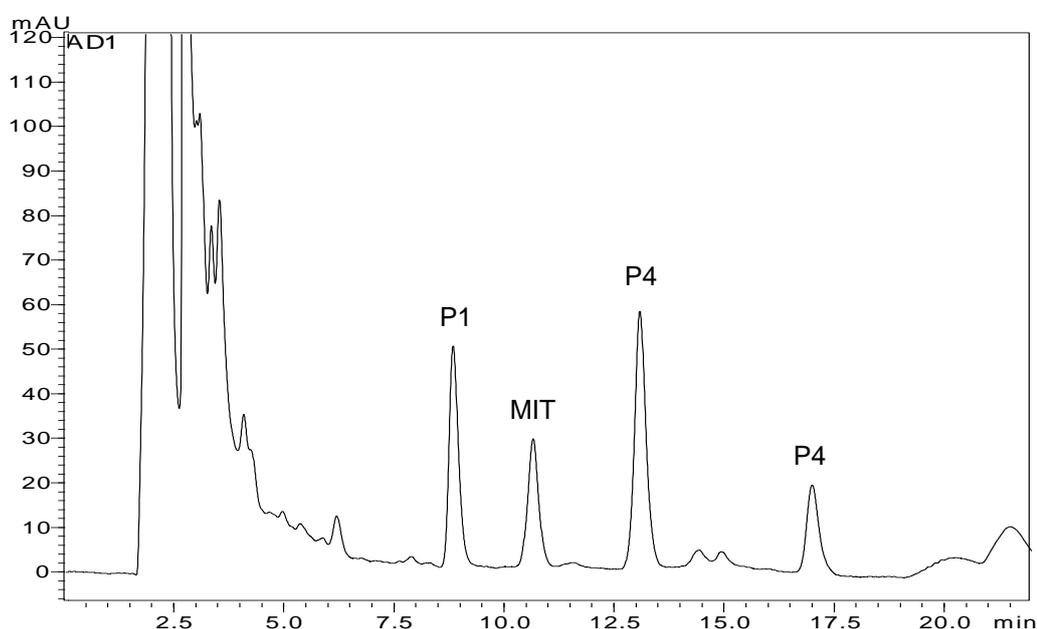
**Figura 12.** Efeito dos pré-tratamentos com quantidades crescentes de bentonita (\*), carvão ativado (◆), caseína (■) e PVPP (▲) na variação do pH (a), condutividade elétrica (b), concentração total de alcalóides (c) e na concentração total de polifenóis (d) do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

As amostras tratadas com bentonita também apresentaram um aumento significativo no pH, o que confere com a característica alcalina de dispersões de argilas de uso farmacêutico, normalmente na faixa de 9,5 a 10,5 (KIBBE, 2000). Também se observou um aumento expressivo na condutividade elétrica, cujos valores triplicaram em relação ao valor obtido para o EBR não tratado. O incremento na condutividade pode ser explicado pelo fato de as partículas de bentonita, fundamentalmente alumino-silicatos de sódio, adquirirem carga negativa, quando dispersas em água (LUCKHAM; ROSSI, 1999). Quanto à capacidade de remoção dos polifenóis, a bentonita demonstrou ser pouco efetiva. A complexação dos alcaloides do EBR foi observada principalmente em baixas concentrações, o que pode ser explicado pela carga negativa das partículas solvatadas da argila. O aumento do pH e da força iônica provocados pelo aumento da quantidade de bentonita podem ter favorecido a diminuição da associação dos alcaloides à argila.

A caseína, proteína freqüentemente empregada em estudos de complexação e quantificação de taninos (LUCK e col., 1994; VERZA, 2006) demonstrou não ser eficiente na remoção dos compostos fenólicos presentes no EBR. A caseína é formada por  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas, que formam micelas globulares protéicas em meio aquoso. A estabilidade destas micelas é essencial para interação com os polifenóis, sobretudo os taninos (LUCK e col., 1994). Considerando o teor alcoólico de 40% (v/v) do EBR, é possível postular a desidratação dessas micelas globulares e a desnaturação das subunidades protéicas, prejudicando assim a interação com os polifenóis em solução. Os demais parâmetros como pH, condutividade e teor de alcaloides, permaneceram praticamente inalterados após o tratamento com a caseína, resultado da ausência de interação da proteína com os demais constituintes do EBR.

Entre os agentes de pré-purificação testados, os melhores resultados, em termos de remoção dos polifenóis do EBR foram obtidos com PVPP. A alta capacidade de complexação dos polifenóis relatada para vários derivados da povidona (HORN; DITTER, 1982; MAKKAR, e col., 1995; SOARES, 2002, VERZA, 2006) pode ser relacionada aos grupamentos pirrolidona, os quais interagem através de ligações de hidrogênio com os polifenóis em solução, de forma análoga à observada para proteínas ricas em prolina (SIEBERT, 1999). Essa característica

favorável foi acompanhada pela manutenção dos valores originais de pH e condutividade elétrica da solução, fato explicado pelo caráter não iônico desse polímero. Mais ainda, PVPP não mostrou afinidade pelos alcaloides oxindólicos, haja vista a manutenção da concentração dos marcadores químicos, mesmo nas maiores quantidades empregadas desse polímero. O cromatograma por CLAE-PDA dos alcaloides do extrato, após o tratamento com a maior quantidade testada de PVPP, não apresentou alterações significativas, excetuando a diminuição dos sinais do início do cromatograma, provavelmente relativos aos compostos retidos pelo polímero (Figura 13).



**Figura 13.** Análise por CLAE do extrato pré-purificado obtido após o tratamento com PVPP na quantidade relativa a dez vezes a massa de resíduo seco do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

Com o emprego de água purificada como solvente único desta etapa de pré-purificação foi possível observar a co-remoção dos alcalóides juntamente com os polifenóis, reforçando a alta interação destas duas classes de substâncias em meio aquoso.

O tratamento do EBR com a PVPP, na proporção de 10:1 (PVPP:resíduo seco), mantendo um tempo de contato de 60 minutos, sob agitação magnética, levou ao produto doravante denominado extrato pré-purificado (EPP). Após ter sido liofilizado, o EPP apresentou-se como um pó aglomerado, higroscópico, de cor amarela intensa, com umidade residual de 8,42% (m/m). O pó apresentou uma

grande instabilidade demonstrada pelo rápido escurecimento, quando as condições de luminosidade, temperatura e umidade não fossem rigorosamente controladas. Devido a este fato, a pré-purificação do EB foi realizada sempre que necessário, imediatamente antes do uso do EPP.

Para a obtenção da fração purificada de polifenóis de *Uncaria tomentosa* surge a necessidade de extração destes compostos da PVPP. A etapa de extração dos, conforme o fabricante da resina, requer condições drásticas como o emprego de soluções de NaOH 1 a 2% em temperaturas de 65 a 85 °C. Nestas condições, contudo, a integridade dos constituintes da fração polifenólica fica seriamente comprometida. Devido à abundância e complexidade da fração polifenólica de *U. tomentosa* e as conseqüentes dificuldades analíticas impostas, um estudo mais aprofundado, visando à otimização do método de extração dos polifenóis da PVPP avaliando-se o real impacto na constituição química desta fração, farão parte de um trabalho à parte.

### **5.5 Obtenção de fração enriquecida de alcaloides oxindólicos pentacíclicos**

Dentre os métodos de separação de alcaloides encontrados na literatura tecnocientífica, além da tradicional partição líquido-líquido, encontra-se o emprego da cromatografia de troca-iônica, tanto nas etapas de preparação das amostras, como na análise cromatográfica propriamente dita (CARVALHAES e col., 2002; MOLYNEUX e col., 2002; BEALES e col., 2004; MROCZEK e col., 2006; PI e col., 2008).

Ao contrário dos trabalhos acima citados, o emprego de resinas macroporosas de troca-iônica no presente trabalho teve como finalidade a obtenção de fração enriquecida dos alcaloides de *U. tomentosa* com alto rendimento e teor. As resinas macroporosas, em relação às resinas usuais em forma de gel, possuem uma maior estabilidade frente ao uso de solventes orgânicos, melhor recuperação dos compostos de interesse e maior facilidade de regeneração (BARRETO JR e col., 2005).

Pi e colaboradores (2008), na obtenção de frações purificadas dos alcaloides sanguinarina e queleritrina a partir do extrato bruto de *Macleaya cordata*, empregam a capacidade de adsorção específica e a taxa de desorção ou recuperação como parâmetros para a avaliação e comparação preliminar entre diversas resinas poliméricas. Da maneira semelhante, no presente trabalho, avaliou-se preliminarmente as resinas macroporosas Dowex Marathon MSC (caráter fortemente aniônico) e Lewatit CNP-105 (caráter fracamente aniônico).

Na tabela 18 estão descritas as características físico-químicas das resinas testadas, evidenciando as diferenças notáveis entre elas tanto em relação à estrutura polimérica quanto nas características de diâmetro médio e área superficial.

**Tabela 18.** Características físico-químicas das resinas de troca-iônica testadas na adsorção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos de *Uncaria tomentosa*.

Resina	Diâmetro médio de partícula (mm)	Área superficial (m <sup>2</sup> /g)	Estrutura polimérica – Grupos funcionais	Capacidade específica (Eq/L)
Dowex Marathon MSC	0,55	35	Copolímero estireno divinilbenzeno – sulfonatos	1,7
Lewatit CNP-105	0,25	200	Polímero metacrílico – ácidos carboxílicos	1,4

Em relação à capacidade de adsorção dos alcaloides, a resina Dowex Marathon MSC foi superior como demonstrado na tabela 19. Apesar de sua menor área superficial em relação à resina Lewatit CNP-105, o caráter fortemente aniônico pode ter sido vantajoso na adsorção dos alcaloides do EBR. O maior desvio padrão relativo observado nos experimentos com a resina fracamente aniônica pode indicar uma heterogeneidade na dissociação dos grupamentos ionizáveis, quando em contato com o EBR.

**Tabela 19.** Capacidade de adsorção específica das resinas de troca iônica testadas para a retenção dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos do extrato bruto reconstituído de *Uncaria tomentosa*.

Resina	Adsorção Específica ( $\mu\text{g/g}$ ) <sup>1</sup> ; X (DPR %)				
	Pico 1	Mitrafilina	Pico 3	Pico 4	Total
Dowex Marathon MSC	5536,62 (0,25)	5230,53 (0,30)	10613,96 (0,15)	5525,73 (0,45)	26906,85 (0,32)
Lewatit CNP-105	1864,86 (1,20)	2602,55 (0,90)	5108,93 (0,85)	5732,72 (1,35)	15309,06 (1,05)

(1): expresso em  $\mu\text{g}$  de mitrafilina por grama de resina; X: média de três determinações; DPR: desvio padrão relativo.

A avaliação da taxa de recuperação é essencial para se avaliar a capacidade de desorção dos compostos da resina e visualizar possíveis eventos de degradação e formação de artefatos durante a extração. Em ambos os casos as taxas de recuperação foram bastante satisfatórias (tabela 20). Novamente, os desvios padrões relativos foram maiores nos experimentos com a resina Lewatit CNP-105. Durante as extrações de ambas as resinas, as proporções das intensidades dos sinais no perfil cromatográfico dos alcaloides permaneceram inalteradas, indicando a ausência de eventos de isomerização entre os alcaloides oxindólicos, observados principalmente em meios aquosos e faixas de pH alcalinas (LAUS e col., 1996).

**Tabela 20.** Taxas de recuperação dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos das resinas de troca iônica após a etapa de extração.

Resina	Taxa de Recuperação (%); X (DPR %)				
	Pico 1	Mitrafilina	Pico 3	Pico 4	Total
Dowex Marathon MSC	91,18 (1,13)	92,59 (1,24)	98,27 (1,17)	98,25 (1,07)	95,07 (1,15)
Lewatit CNP-105	91,65 (1,67)	97,53 (3,37)	93,33 (2,73)	95,67 (3,51)	94,55 (2,82)

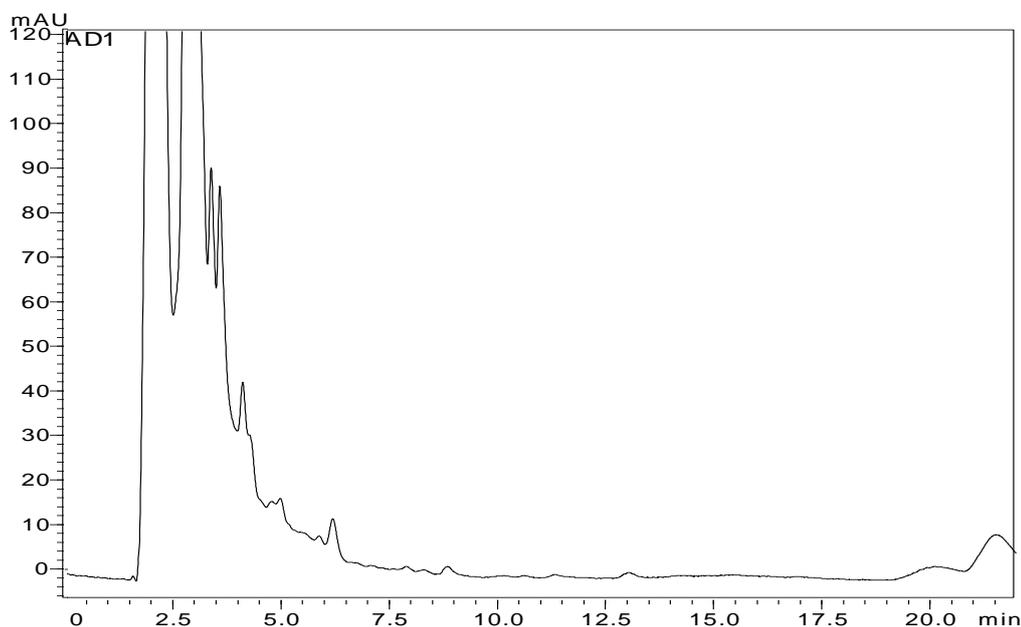
X: média das determinações; DPR: desvio padrão relativo.

Com base nesses resultados preliminares, optou-se pela resina Dowex Marathon para dar continuidade ao desenvolvimento do processo de fracionamento dos alcaloides. Levou-se em consideração também o fato de o caráter fortemente

aniônico permitir trabalhar em uma ampla faixa de pH sem danos a resina e ao processo.

Para os testes preliminares foi estabelecido um volume de leito (VL) de aproximadamente 10 cm<sup>3</sup> e um fluxo equivalente a 0,5 VL/min, empregando diretamente o EBR. A adsorção dos alcaloides na resina foi satisfatória, contudo, a impregnação irreversível da resina por componentes polifenólicos comprometeu a etapa de regeneração da resina.

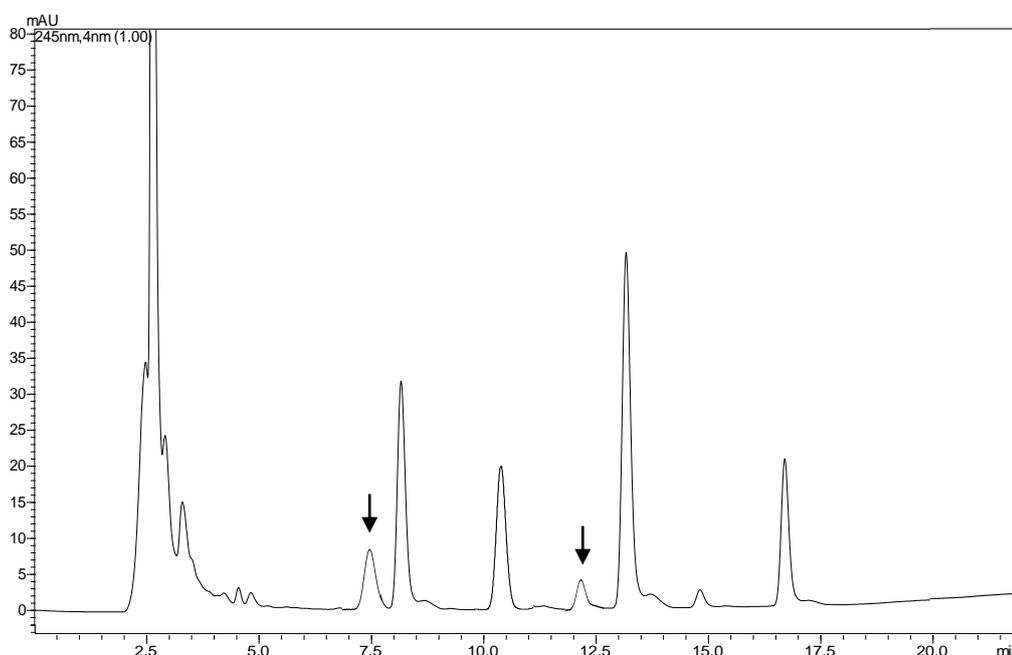
Esse problema foi contornado aplicando o processo de pré-purificação mediante PVPP, anteriormente descrito, que levou à obtenção do extrato pré-purificado (EPP). Inicialmente, o EPP obtido foi acidificado a pH 3,0 com ácido fórmico a 10% (v/v), a fim de favorecer a ionização dos alcaloides em solução e aumentar a afinidade destes pela resina. A análise para alcaloides por CLAE-UV da *fração de primeira passagem* do EPP demonstrou ausência dos picos referentes aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (figura 14), demonstrando uma elevada eficiência na retenção dos mesmos.



**Figura 14.** Análise por CLAE da fração de primeira passagem obtida durante o processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado (EPP) de *Uncaria tomentosa*.

Na etapa subsequente de lavagem do leito de resina com solução hidroetanólica a 40% (v/v) visou evitar qualquer mudança brusca na polaridade do sistema, que pudesse afetar os passos seguintes da extração ou provocar a precipitação dos componentes adsorvidos na resina (AMERSHAM BIOSCIENCES, 2010). Igualmente não foram observados traços de alcaloides nessa fração de lavagem. As frações de primeira passagem e de lavagem foram reunidas e denominadas eluato da resina aniônica (ERA).

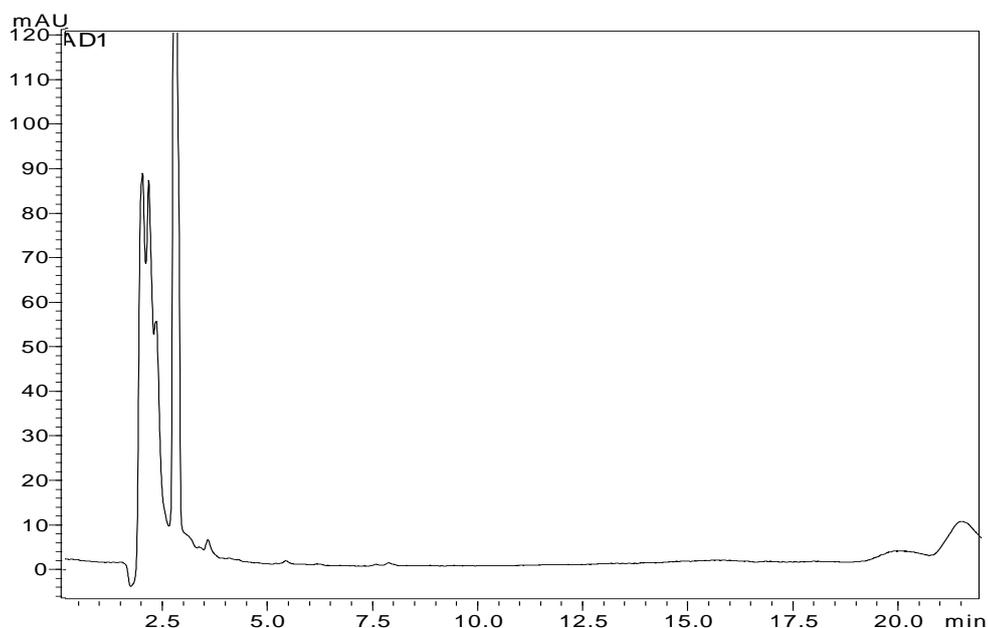
A etapa de remoção dos alcaloides (e de bases fracas em geral) de resinas aniônicas é feita normalmente com misturas alcalinas de hidróxido de amônio e solventes orgânicos (CARVALHAES e col., 2002; MROCZEK e col., 2006). Ao longo do desenvolvimento da técnica foram testadas misturas de hidróxido de amônio concentrado e etanol em diferentes proporções (*Sistema I*). O emprego destas soluções fortemente alcalinas resultou numa alteração do perfil cromatográfico dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos (figura 15), onde pode ser observado o surgimento de picos adicionais, bem como a coeluição de outras substâncias interferentes no início do cromatograma. Nesse contexto não se descartou a possibilidade da ocorrência de fenômenos de degradação.



**Figura 15.** Análise por CLAE da etapa de extração do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos, empregando mistura de etanol: hidróxido de amônio 10% (3:1 v/v) e evidenciando o aparecimento de sinais adicionais sinalizados.

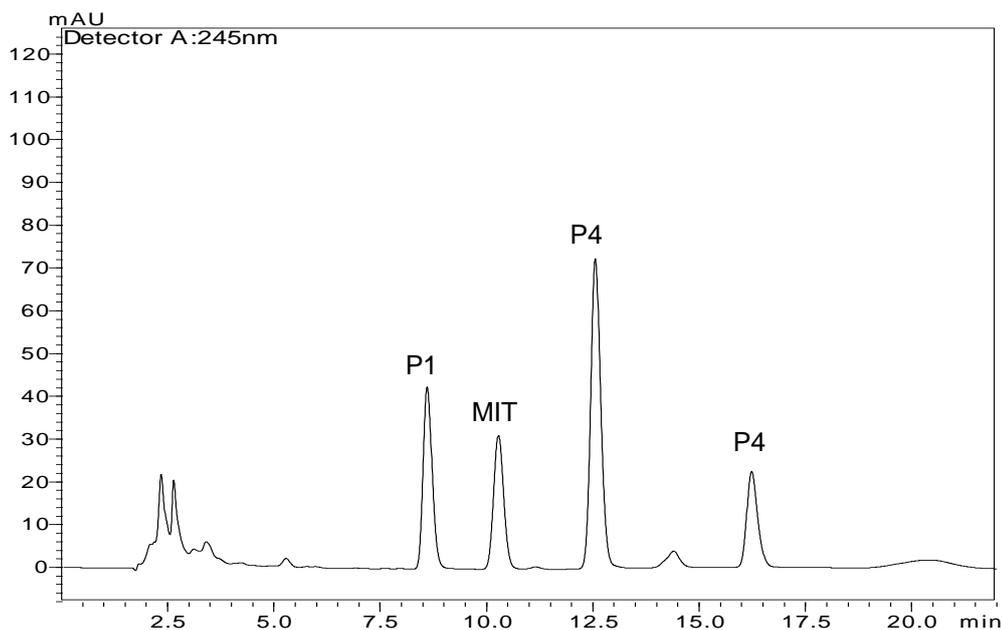
Para contornar este problema, foi adotada uma estratégia de extração realizada em duas etapas denominadas de *neutralização* e *extração* propriamente dita (*Sistema II*).

Na *etapa de neutralização*, o pH do leite foi levado à neutralidade com solução tampão de acetato de amônio pH 7,0. Com isso se promoveu a perda de afinidade dos alcaloides pela carga negativa e, ao mesmo tempo, um aumento da interação dos mesmos com a porção hidrofóbica da resina. Este fato pode ser comprovado pela análise por CLAE do eluato resultante (Figura 16), onde não foram detectados os picos relativos aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Esta etapa permitiu ainda a eluição de outras substâncias de caráter básico e de polaridade maior.



**Figura 16.** Análise por CLAE do eluato da etapa de neutralização do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado (EPP) de *Uncaria tomentosa*.

A etapa de extração foi realizada utilizando solução hidroetanólica a 80% (v/v). Com isso a polaridade do sistema foi diminuída e a afinidade dos alcaloides pela resina deslocada em favor do líquido eluente. A fração assim obtida foi denominada da fração de alcaloides oxindólicos (FALC) (Figura 17).



**Figura 17.** Análise por CLAE do eluato da etapa de extração do processo de fracionamento dos alcaloides oxindólicos a partir do extrato pré-purificado (EPP) de *Uncaria tomentosa*.

As frações denominadas ERA e a FALC foram também caracterizadas enquanto pH e condutividade (Tabela 21), a fim de estabelecer parâmetros físico-químicos para cada uma delas.

**Tabela 21.** Determinação de pH e de condutividade elétrica das frações ERA e FALC, obtidas mediante o fracionamento do extrato pré-purificado (EPP) com resina Dowex Marathon MSC

Fração	pH; $X \pm S$	Condutividade ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ); $X \pm S$
ERA	$4,40 \pm 0,01$	$590 \pm 3$
FALC	$7,44 \pm 0,02$	$622 \pm 2$

X: média; S: desvio padrão

A fração ERA apresentou pH acima daquele estabelecido para o EPP, de 3,0, o que atribuído à ação da resina aniônica de reter cargas positivas, incluindo íons  $\text{H}^+$  livres. O mesmo pode ser observado para a FALC, a qual apresentou um pH ligeiramente acima daquele ajustado pelo tampão acetato de amônio de 7,0,

utilizado na neutralização do leite. A condutividade de ambas as frações foi notavelmente superior se comparado ao valor determinado para o EPP de 295  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , antes do processo de fracionamento.

Após sua obtenção, a fração FALC foi prontamente acidificada a pH 4,0, a fim de minimizar possíveis eventos de isomerização durante a etapa de concentração e liofilização.

O liofilizado da fração ERA resultou em um pó aglomerado, de cor amarelo escuro, higroscópico e com uma umidade residual de  $8,23 \pm 0,03 \%$  (m/m). A fração denominada FALC apresentou-se como um pó aglomerado, higroscópico, de cor amarelo claro, apresentando uma umidade residual de  $7,89 \pm 0,04 \%$  (m/m).

O rendimento ponderal, a concentração de alcaloides totais e a concentração de saponinas totais para as frações ERA e FALC estão descritos na tabela 22.

**Tabela 22.** Rendimento ponderal, teor de alcaloides e de saponinas nas frações ERA e FALC, obtidas mediante fracionamento em coluna com resina aniônica.

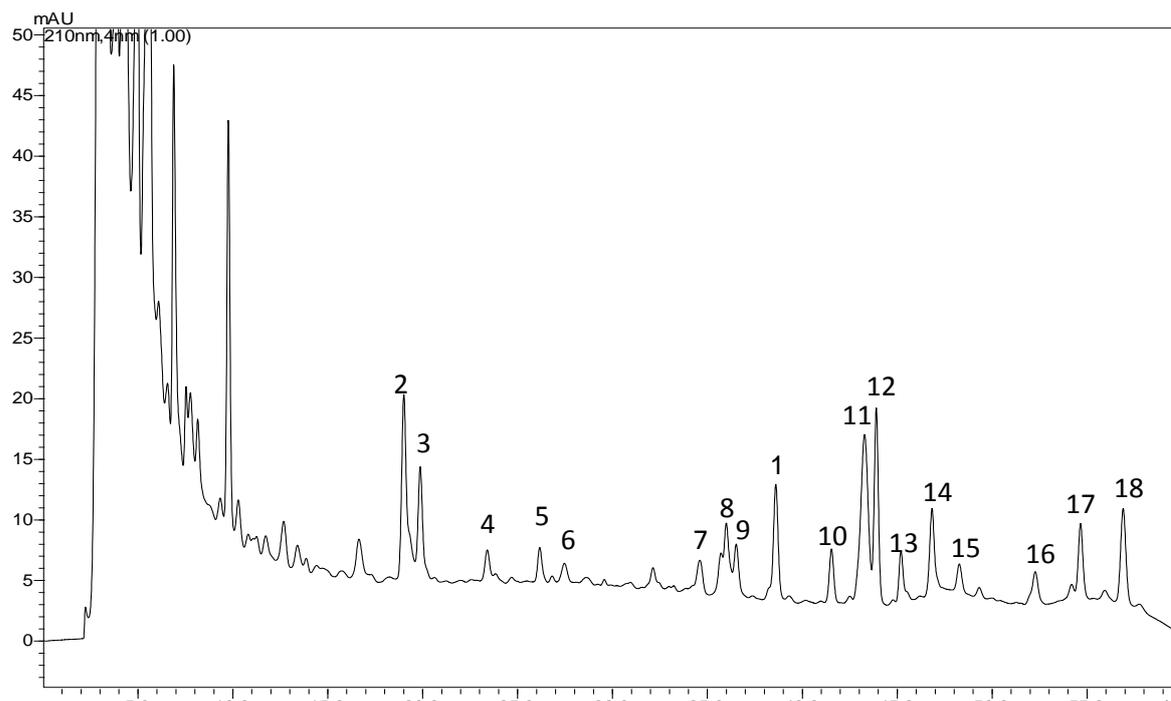
Fração	Rendimento <sup>1</sup> (%)	Teor de Alcaloides <sup>2</sup> (g%)	Teor de Saponinas <sup>3</sup> (g%)
ERA	50,87	ND	28,88
FALC	16,12	88,19	ND

(1) Rendimento percentual relativo à massa inicial de extrato bruto liofilizado submetido ao processo; (2) Expresso em gramas de mitrafalina por 100g de amostra liofilizada; (3) Expresso em gramas de  $\alpha$ -hederina por 100g de amostra liofilizada; ND: Não detectado

As frações ERA e FALC correspondem em conjunto a aproximadamente 67 % (m/m) da massa inicial do EBL submetido ao processo. Considerando o teor de polifenóis totais no EBL de cerca de 30% (m/m), conforme determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, as perdas residuais de processo foram estimadas em torno de 3% (m/m).

A FALC apresentou um teor de alcaloides oxindólicos totais de 90%, enquanto que na ERA esses não foram detectados.

A análise das frações FALC pelo método de determinação das saponinas por CLAE não evidenciou os sinais referentes a estes compostos. Na fração ERA puderam ser observados os dezoito picos atribuídos a saponinas no EBL (Figura 18), observando-se acúmulo destes compostos, acompanhado de uma diminuição clara de compostos interferentes, removidos ao longo do processo de purificação.



**Figura 18.** Análise por CLAE das saponinas triterpênicas na fração eluída da resina aniônica (ERA).

## 5.6 Obtenção de fração enriquecida de saponinas triterpênicas

A obtenção de uma fração enriquecida de saponinas traz vantagens do ponto de vista analítico, tecnológico e biológico. Dentre estas vantagens podem ser citadas o aumento da concentração destes compostos, facilidade de monitoramento analítico e a maior constância nas propriedades físico-químicas e biológicas (PEIXOTO, 2009).

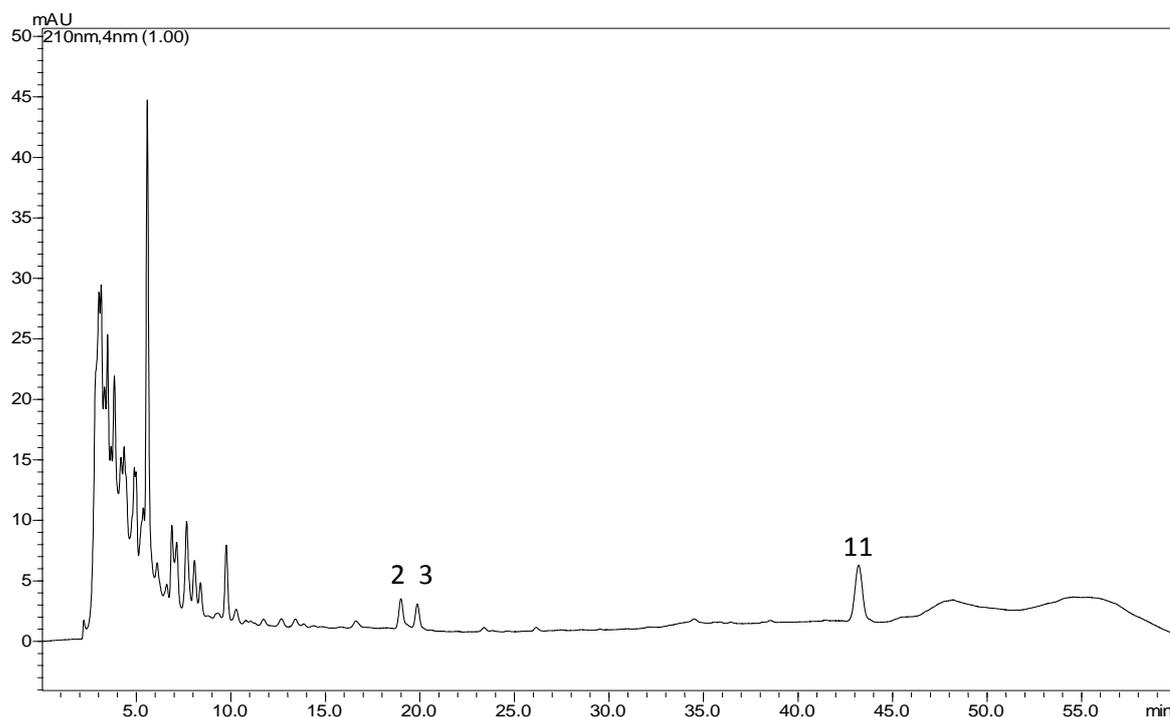
Dentre as técnicas mais empregadas na obtenção de frações saponosídicas destaca-se o fracionamento líquido-líquido, constituído de partições sucessivas com solventes apolares, seguidas de partições com misturas de *n*-butanol e água

(GÜÇLÜ-USTUNDAG; MAZZA, 2007). O processo além de envolver múltiplas etapas, apresenta como desvantagens o emprego de grandes quantidades de solventes orgânicos, a potencial perda de compostos mais polares e a dificuldade de aumento de escala (PEIXOTO, 2009).

A exemplo de trabalhos anteriores nos quais a técnica de separação em fase sólida foi aplicada com sucesso na obtenção de fração purificada de saponinas (PAVEI, 2004; CANTO, 2007; PEIXOTO, 2009; PAVEI, 2010), avaliou-se o emprego e comparação de diferentes suportes sólidos para a separação das saponinas triterpênicas de *U. tomentosa*. Para tanto foram desenvolvidos duas técnicas diferentes, tendo como ponto de partida a fração ERA, resultante do processo de obtenção da fração enriquecida de alcaloides de *U. tomentosa*, acima descrito. O primeiro desses processos teve por princípio o uso de resina de troca iônica, e o segundo o uso de resina poliaromática.

Para o primeiro processo, a resina selecionada foi a Amberlite IRA-958, de caráter fortemente catiônico, tomando como exemplo o fracionamento em fase sólida dos alcaloides, onde a resina fortemente aniônica apresentou vantagens em relação à fracamente aniônica. A resina Amberlite IRA-958 consiste em partículas de estrutura macroporosa, com diâmetro aproximado de 0,75 mm, compostas por polímero metacrílico, de ligações cruzadas e grupamentos de amônio quaternário, os quais conferem um caráter fortemente catiônico (ROHM & HAAS, 2008).

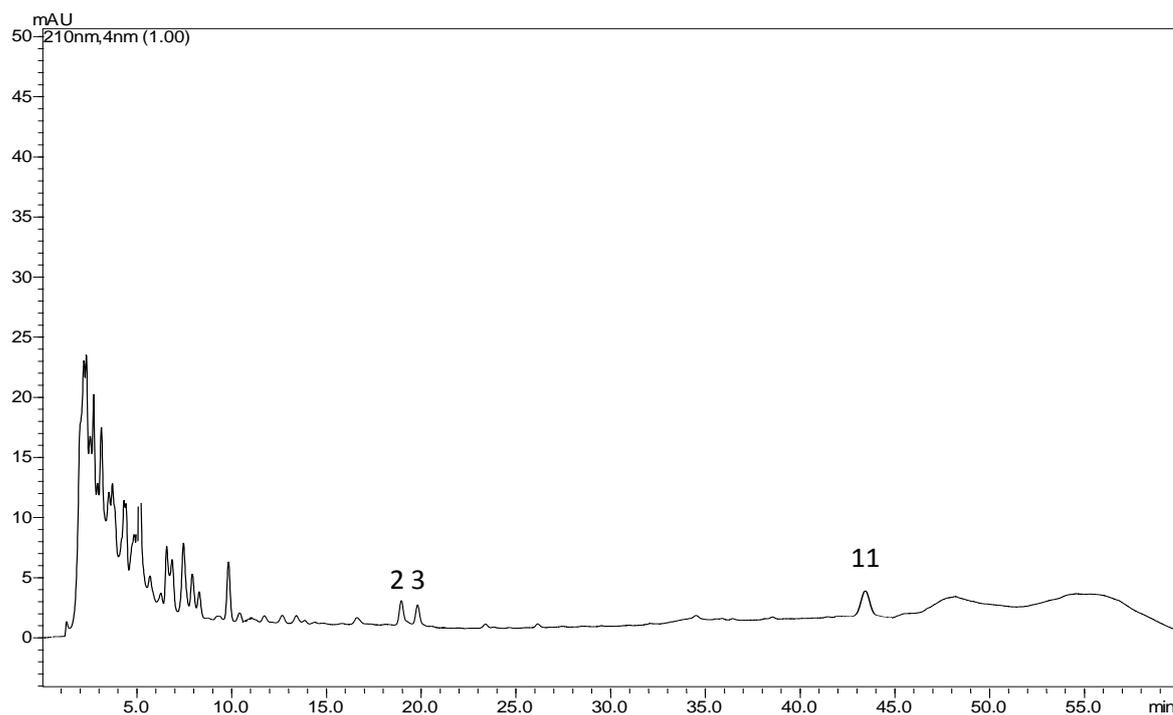
A fração ERA, previamente liofilizada, foi dissolvida em solução hidroetanólica 40% (v/v) e o pH ajustado para 8,0, a fim de promover a ionização dos compostos de caráter ácido. A *fração de primeira passagem* e a *fração de lavagem*, reunidas e denominadas eluato da resina catiônica (ERC), quando analisadas pelo método por CLAE para as saponinas, revelou, entre outros, a presença dos picos 2, 3 e 11, que mostraram escassa afinidade pela resina (Figura 19). O fato pode estar relacionado com a ausência da carboxila livre ligado ao carbono 14, característica dos heterosídeos derivados do ácido hidroxiursólico e dos tomentosídeos A e B, relatados por KITAJIMA e colaboradores (2000;2003).



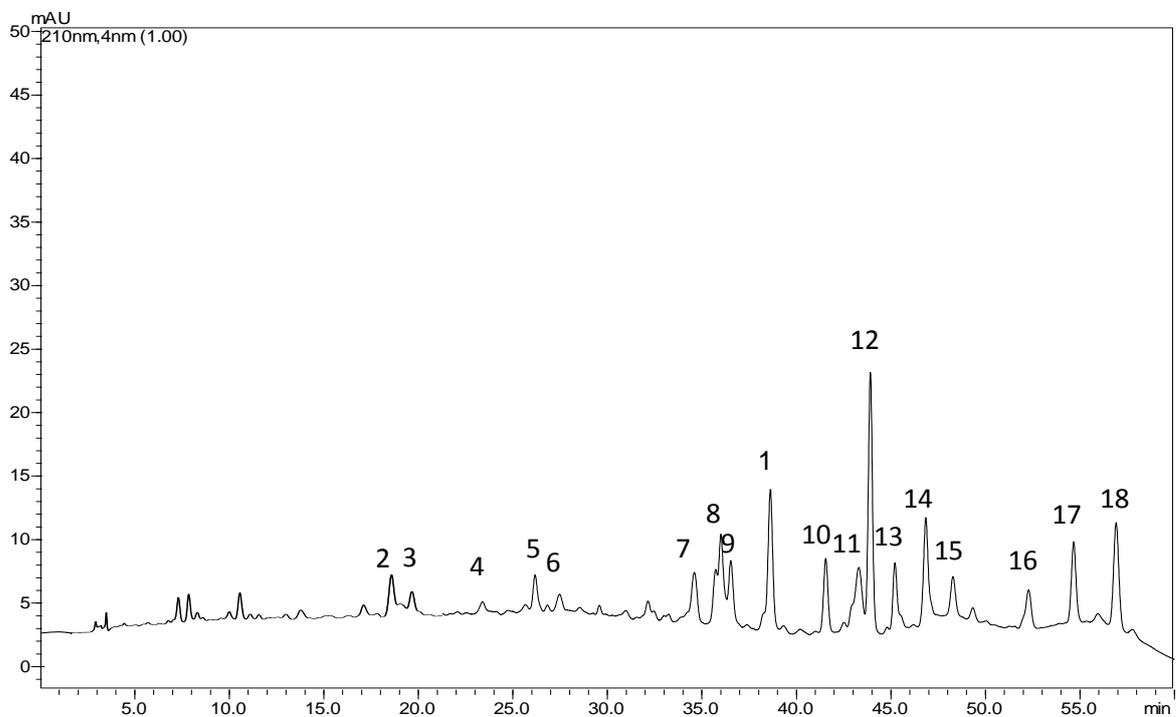
**Figura 19.** Análise por CLAE do eluato da resina catiônica do processo de fracionamento das saponinas triterpênicas *Uncaria tomentosa*.

Após a drenagem, o leito de resina foi tratado com solução de ácido fórmico 0,3 M. O ácido fórmico foi escolhido pela maior facilidade de eliminação da amostra nas etapas de concentração e secagem, assim como pela menor reatividade química, se comparado com outros ácidos fortes. A fração recolhida, contendo substâncias ácidas e bastante solúveis em água, bem como a presença 2, 3 e 11, foi desconsiderada nas etapas posteriores (Figura 20).

A etapa de remoção dos triterpenos da resina, devido à sua baixa polaridade, foi realizada utilizando solução hidroetanólica 80% (v/v). A análise por CLAE desta fração, denominada fração ácida de triterpenos (FAT), demonstrou uma predominância das substâncias de interesse, bem como uma diminuição significativa dos interferentes no início do cromatograma (Figura 21).



**Figura 20.** Análise por CLAE do eluato da etapa de acidificação com ácido fórmico 0,3M do processo de fracionamento das saponinas triterpênicas de *Uncaria tomentosa*.



**Figura 21.** Análise por CLAE do eluato da etapa de extração do processo de fracionamento das saponinas triterpênicas de *Uncaria tomentosa*.

A FAT foi caracterizada quanto pH e condutividade elétrica (tabela 23). Após ser liofilizada, a fração apresentou-se como um pó fino, pouco denso, de cor branca levemente amarelada e com teor de umidade de  $6,85 \pm 0,02$  % (m/m).

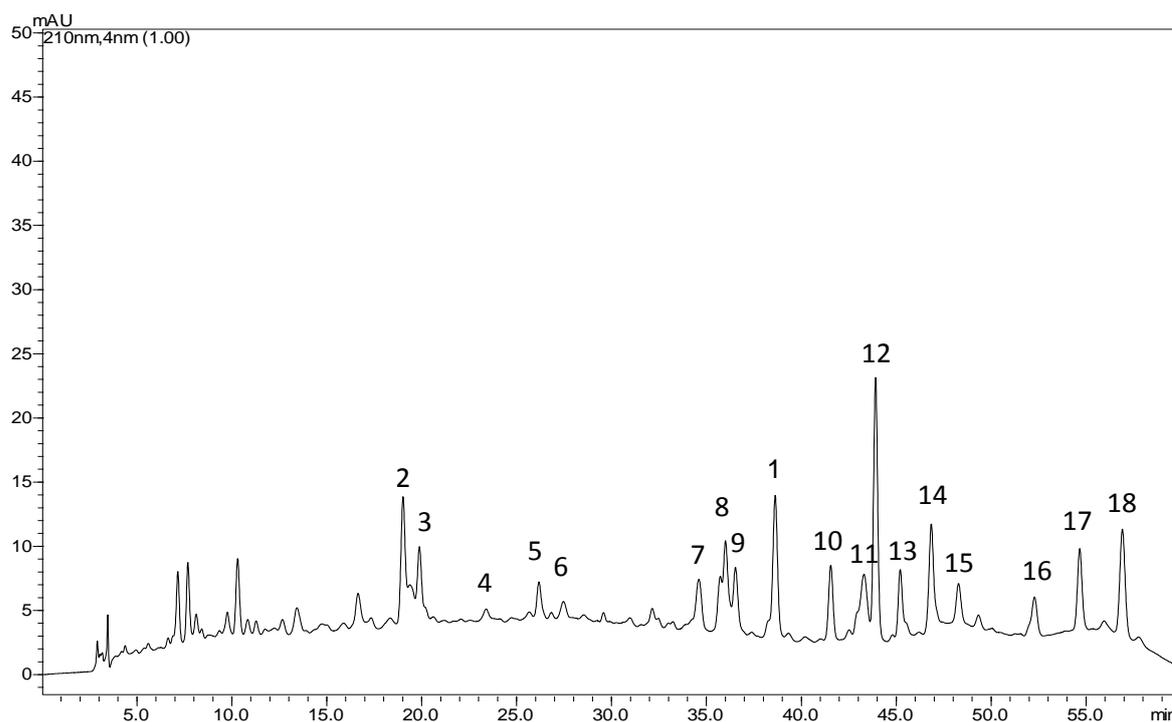
**Tabela 23.** Determinação do pH e da condutividade elétrica da fração ácida de triterpenos (FAT), obtida mediante o fracionamento da do eluato da resina aniônica (ERA) com resina catiônica Amberlite IRA-958

Fração	pH; $X \pm S$	Condutividade ( $\mu\text{S/cm}$ ); $X \pm S$
FAQ	$2,94 \pm 0,01$	$326 \pm 3$

Paralelamente, utilizando a resina poliaromática e de caráter hidrofóbico Diaion HP-20, o ERA foi submetido ao fracionamento em gradiente decrescente de polaridade, utilizando misturas de metanol e água como eluentes, seguindo a mesma metodologia descrita por Pavei (2010) e aplicada na obtenção da fração saponosídica enriquecida a partir do extrato bruto de *U. tomentosa*. Com isso tornou-se possível estabelecer um parâmetro de comparação com o processo desenvolvido neste trabalho.

A fração eluída com a mistura de metanol:água (90:10), denominada de F90, apresentou perfil cromatográfico semelhante aquele obtido para a FAT (Figura 22).

Após concentrada e liofilizada a F90 apresentou-se como um pó fino, pouco denso, de cor branca levemente amarelada e com teor de umidade de 7,03%, muito semelhante à FAT.



**Figura 22.** Análise por CLAE da fração saponosídica enriquecida obtida pelo fracionamento na resina Diaion HP-20.

O rendimento ponderal e o teor de saponinas determinado para as duas frações enriquecidas obtidas estão descritos na tabela 24.

**Tabela 24.** Rendimento ponderal e teor de saponinas nas frações obtidas no processo de fracionamento em resina catiônica (FAT) e no fracionamento em resina poliaromática (F90).

Fração	Rendimento <sup>1</sup> (%)	Teor de Saponinas <sup>2</sup> (g%)
FAT	9,05	77,56
F90	25,63	74,61

(1) Rendimento percentual relativo à massa inicial de ERA liofilizado submetido ao processo; (2) Expresso em gramas de  $\alpha$ -hederina por 100g da amostra;

A F90 apresentou um rendimento bastante superior a FAT, o que pode ser relacionado à perda de triterpenos, de caráter não ácido, pelo processo de troca iônica, bem como pela possível coeluição de outros compostos de caráter hidrofóbico pelo fracionamento de com resina poliaromática.

O teor de saponinas na FAT, calculado como  $\alpha$ -hederina, foi maior do que aquele calculado para F90, indicando que o processo de fracionamento por troca iônica apresenta maior seletividade aos compostos de interesse, principalmente àqueles de caráter ácido.



## **6. CONCLUSÕES**

---



- A disponibilidade de marcadores químicos e de métodos analíticos validados mostrou ser estritamente necessária no desenvolvimento de uma sistemática de separação e purificação dos compostos bioativos de *U. tomentosa*.
- Para a caracterização e análise quantitativa dos alcaloides oxindólicos pentacíclicos presentes no extrato bruto de *U. tomentosa*, foi confirmada a viabilidade de aplicação, sem maiores alterações, do método por CLAE-UV preconizado por Pavei (2010).
- O método por CLAE-DAD desenvolvido e validado para a análise qualitativa e quantitativa das saponinas triterpênicas do extrato bruto liofilizado, viabilizou a obtenção de um perfil cromatográfico fidedigno de substâncias com características espectrais típicas para a classe de compostos, permitindo o monitoramento amplo e consistente dos diferentes processos de separação/purificação.
- A determinação espectrofotométrica do teor de polifenóis totais, realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, permitiu estimar teores próximos a 32% (m/m) no extrato bruto liofilizado, confirmando dados na literatura que destacam o elevado teor deste grupo de substâncias em cascas de *U. tomentosa*. Ao mesmo tempo o método espectrofotométrico revelou diferenças significativas em relação ao teor de polifenóis determinado CLAE-UV em trabalho anterior. Essa diferença pode ser atribuída pelo fato do método espectrofotométrico incluir polifenóis de mais alta massa molecular como taninos e proantocianidinas.
- A sistemática de separação e de purificação, desenvolvida no presente trabalho para as três frações bioativas relatadas para *U. tomentosa*, mostrou ser viável, preservando-se os perfis cromatográficos de alcaloides e saponinas em relação àquele observado no extrato bruto.
- A separação da fração de polifenóis, especificamente de taninos, mostrou ser inviável utilizando-se a técnica de ultrafiltração tangencial, dado o elevado teor deste grupo de substâncias no extrato bruto liofilizado. Considerando a fração de alcaloides e a de saponinas como prioritários no presente trabalho, a remoção eficaz dos polifenóis representou *per se* um desafio tecnológico, mais do que um objetivo propriamente dito.

- A eficiência da polivinilpirrolidona de ligações cruzadas (PVPP) como agente complexante de polifenóis mostrou ser superior àquela constatada para carvão ativado, caseína e bentonita, três substâncias usualmente utilizadas com o mesmo propósito e com emprego relatado para processos analíticos e industriais. Adicionalmente, o uso de PVPP manteve inalterados os perfis de alcaloides e saponinas.
- De forma inédita até então, o trabalho descreveu o desenvolvimento de métodos de separação seqüencial de frações de alcaloides e saponinas de *U. tomentosa* utilizando resinas de troca-iônica.
- O emprego de resina fortemente aniônica demonstrou ser uma forma eficiente, simples e reproduzível de separação da fração de alcaloides oxindólicos dos demais constituintes do extrato pré-purificado, não sendo constatadas alterações na composição química dos demais constituintes.
- Eventos de isomerização e degradação dos alcaloides oxindólicos, já antes relatados em processos de secagem por nebulização e observados no presente trabalho com o emprego de soluções fortemente alcalinas, foram minimizados com eluição de solução tampão de acetato de amônio pH 7,0 seguida de solução hidroetanólica 80% (v/v).
- A caracterização da fração enriquecida de saponinas obtida pelo emprego de resina de caráter fortemente catiônico denotou a eficiência de separação das saponinas de caráter ácido dos outros compostos interferentes de forma simples, rápida e reproduzível.
- Quando comparada ao fracionamento empregando resina poliaromática, o método de obtenção de saponinas de caráter ácido descrito neste trabalho apresentou menor rendimento em massa, contudo apresentou um maior teor dos compostos de interesse.
- O emprego de resinas macroporosas de troca-iônica revelou ser um método eficiente de separação de compostos naturais ionizáveis como alcaloides e triterpenos de caráter ácido, sem o emprego de solventes orgânicos de maior impacto ambiental e toxicológico.

## **7. PERSPECTIVAS**

---



- No presente trabalho, o desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas aplicadas às cascas de *Uncaria tomentosa* vem a somar com estudos precedentes e oportunizar novos estudos tecnológicos e biológicos com os constituintes das frações alcalóidica, triterpênica e polifenólica.
- No que tange ao campo analítico, uma das futuras ações a serem empreendidas refere-se à identificação dos compostos da fração triterpênica e a confirmação da identidade dos picos dos alcaloides oxindólicos, através de espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear.
- No âmbito dos estudos biológicos, propõe-se a dar continuidade aos estudos bioquímicos da ação citotóxica e antiproliferativa em células tumorais da fração de alcaloides oxindólicos pentacíclicos e de saponinas triterpênicas de *U. tomentosa*.



## **8. REFERÊNCIAS**

---



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.

AKESSON, C.; PERO, R. W.; IVARS, F. C-MED 100®, a hot water extract of *Uncaria tomentosa* lymphocyte survival *in vivo*. **Phytomedicine**, v.10, p.23-33, 2003.

ALLEN-HALL, L.; ARNASON, J.T.; CANO, P.; LAFRENIE, R.M. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF-alpha inhibitor through NF-kappa B. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, p.685-693, 2010.

AMERSHAM BIOSCIENCES. Ion Exchange Chromatography: Principles and Methods, p.80-96, 2006.

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.

ATHAYDE, M. L. **Metilxantinas e Saponinas em quatro populações de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.; Triterpenos e Saponinas em outras espécies do gênero *Ilex***. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2000. Tese de Doutorado.

BASF. Products for Food and Pharmaceutical Industry. **Technical Information**, p. 191-197, 2003.

BARRETO JÚNIOR, A.G.; BISCAIA JUNIOR, E. C. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de copaíba (*Copaifera multijuga*) e da sacaca (*Croton cajucara*). **Química Nova**, v.28, p.719-722, 2005.

BEALES, K. A.; BETTERIDGE, K.; COLEGATE, S. M.; EDGAR, J. A. Solid-Phase Extraction and LC-MS Analysis of Pyrrolizidine Alkaloids in Honeys. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6664-6672, 2002.

CANTO, G. S. **Avaliação físico-química e tecnológica da fração saponosídica dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.: potencialidade como adjuvante espumógeno**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2007. Tese de Doutorado.

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.

CARVALHO, L.M.J.; SILVA, C.A.B.; PIERUCCI, A.P.T.R. Clarification of pineapple juice (*Ananas comosus* L. Merryl) by ultrafiltration and microfiltration: Physicochemical evaluation of clarified juices, softdrink formulation, and sensorial evaluation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2185-2189, 1998.

CASSANO, A.; MARCHIO, M.; DRIOLI, E. Clarification of blood orange juice by ultrafiltration: analyses of operating parameters, membrane fouling and juice quality. **Desalinization**, v.212, p.15–27, 2007.

CASTILLO, G.; CHOI, P.; NGUYEN, B.; SNOW, A. Methods of isolating amyloid-inhibiting compounds and use of compounds isolated from *Uncaria tomentosa* and related plants. **US patent 20040137092**, 20p., 2004

DEUTSCHES Arzneibuch. 9. Ausgabe. Frankfurt: Govi-Deutscher, 1986.

DOSMAR, M.; PINTO, S. Crossflow Filtration. In: JORNITZ, M. W.; MELTZER, T.H. (org). **Filtration and Purification in the Biopharmaceutical Industry**. 2ed. Nova lorque: Informa Healthcare, 2007, cap. 19, p.495-540.

EUROPEAN Pharmacopeia. 4ed. France: EDQM, p.187, 2002.

FARIAS, M. Avaliação da qualidade de matérias primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. (org). **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 12, p.263-288.

FARMACOPEIA Brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Pt.1.

FOOD and Drug Administration – **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, Rockville: FDA, 2001.

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, 2004.

GIMENEZ, D.G.; PRADO, E.G.; RODRIGUEZ, T.S.; ARCHE, A.F.; DE LA PUERTA,R. Cytotoxic effect of the pentacyclic oxindole alkaloid mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark on human ewing's sarcoma and breast cancer cell lines. **Planta Medica**, v.76 p.133-136, 2010.

GÜÇLÜ-USTUNDAG, O.; MAZZA, G. Saponins: properties, applications and processing. **Critical Reviews of Food Science Nutrition**, v.47, p.231-258, 2007.

GOKMEN, V; CETINKAYA, O. Effect of pretreatment with gelatin and bentonite on permeate flux and fouling layer resistance during apple juice ultrafiltration. **Journal of Food Engineering**, v.80, p.300-305, 2007.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. **Phytochemistry** v.66, p.89-98, 2005.

GRIEBELER, S. A. **Validação de metodologia analítica para matéria-prima vegetal, extrato seco e cápsulas de gelatina dura contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2005. Dissertação de Mestrado

HEITZMAN, M. E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v.66, p.5-29, 2005.

HEMINGWAY, S. R.; PHILLIPSON, J. D. Alkaloids from south american *Uncaria* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.26, p.113-116, 1974.

HEMINGWAY, S. R.; PHILLIPSON, J. D. 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.

HÖRN, D.; DITTER, W. Chromatographic studies of interactions between polyvinylpyrrolidone and drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.71, p.1021-1026, 1982.

INTERNATIONAL Conference on Harmonization of Technical Requirements for registration of pharmaceuticals for human use, validation of analytical procedures: text and methodology, **Q2 (R1)**, 2005.

JÜRGENSEN, S.; DALBÓ, S.; ANGERS P.; SANTOS, A. R. S.; DO VALLE, R. M. R. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** v.81, p.466–477, 2005.

KANG, T.H.; MURAKAMI, Y.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA M.; AIMI, N.; WATANABE H.; MATSUMOTO, K. Pteropodine and isopteropodine positively modulate the function of rat muscarinic M<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors expressed in *Xenopus oocyte*. **European Journal of Pharmacology** v.444, p. 39–45, 2002.

KANG, T. H.; MURAKAMI, Y.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA M.; AIMI, N.; WATANABE H.; MATSUMOTO, K. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on in vitro ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. **Life Sciences**, v.76, p.331–343, 2004.

KEPLINGER, H. Oxyindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system and preparation containing same. **US Patent n° 4884901**, 20 p., 1989.

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.

KIBBE, A. H. **Hand Book of Pharmaceutical Excipients**. 3. ed. Londres: Pharmaceutical Press, 2000.

KITAJIMA, M.; HASHIMOTO, K.I.; YOKOYA, M.; TAKAYAMA, H.; SANDOVAL, M.; AIMI, N. Two new nor-triterpenes glycosides from Peruvian Una de gato (*Uncaria tomentosa*). **Journal of Natural Products**, v. 66, p.320-323, 2003.

KRAEMER, K. H. ***Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (erva-mate): Distribuição de saponinas e estudos iniciais em culturas de células em suspensão.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 1997. Tese de Doutorado.

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

LAUS, G.; BRÖSSNER, D.; SENN, G.; WURST, K. Analysis of the kinetics of isomerization of spiro oxindole alkaloids. **Journal Chemistry Society Perkin Transformation**, v.2, p. 1931-1936, 1996.

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.

LUCKHAM, P. F.; ROSSI, S. The colloidal and rheological properties of bentonite suspensions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 82, p. 43-92, 1999.

MAKKAR, H. P. S.; BLUMMEL, M; BECKER, K. Formation of complexes of polyvinylpyrrolidones or polyethyleneglycols and tannis, and their implications in gas-production and true digestibility in *in vitro* techniques. **British Journal of Nutrition**, v.73, p.897-913, 1995.

MONTORO, P.; CARBONE, V.; QUIROZ, J. D. Z.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. **Phytochemical Analysis**, v.15, p.55-64, 2004.

MROCZEK, T.; GLOWNIAK, K.; WLASZCZYK, A. Simultaneous determination of *N*-oxides and free bases of pyrrolizidine alkaloids by cation-exchange solid-phase extraction and ion-pair high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.949, p.249-262, 2002.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography A**, v. 967, p.147-162, 2002.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2004.Dissertação de Mestrado

PAVEI, C. **Obtenção de frações bioativas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (Unha-de-gato): Avaliação tecnológica e biológica.** Porto Alegre: Programa de

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2004. Tese de Doutorado.

PI, G.; REN, P.; YU, J.; SHI, R.; YUAN, Z.; WANG, C. Separation of sanguinarine and chelerythrine in *Macleaya cordata* (Willd) R. Br. based on methyl acrylate-co-divinylbenzene macroporous adsorbents. **Journal of Chromatography A**, v.1192, p.17–24, 2008.

PILARSKI, R.; ZIELINSKI H.; CIESIOLKA, D.; SZYFTER K.; GULEWICZ, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.)DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v.104, p.18–23, 2006.

PILARSKI, R.; POCZEKAJ-KOSTRZEWSKA, M.; CIESIOLKA, D.; SZYFTER K.; GULEWICZ, K. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. **Pharmacological Reports**, v.59, p.565-572, 2007.

POLLITO, P. A. Z.; TOMAZELLO, M. Anatomia do lenho de *Uncaria guianensis* e *U. tomentosa* (Rubiaceae) do estado do Acre, Brasil. **Acta Amazônica**, v.36, n.2, p. 1-21, 2006.

PRADO, E.G; GIMENEZ, D.G.; VAZQUEZ, R.D.P.; SANCHEZ, J.L.E.; RODRIGUEZ, T.S. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v.14 p.280-284, 2007.

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

RAI, P.; MAJUMDAR, G. C.; DAS GUPTA, S.; DE, S. Effect of various pretreatment methods on permeate flux and quality during ultrafiltration of mosambi juice. **Journal of Food Engineering**, v.78, p.561-568, 2007.

REIS, S.R.I.N.; VALENTE, L.M.M.; SAMPAIO, A.L.; SIANI, A.C.; GANDINI M.; AZEREDO E.L.; MAZZEI, J.L.; D'AVILA, L.A.; KUBELKA, C.F.; HENRIQUES M.G.M. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. **International Immunopharmacology**, v.8, p.468-476, 2008.

RHOM AND HAAS. Amberlite IRA-958 Strong Anion Exchanger. **Product Data Sheet**, 1999.

RIVA, L.; CORADINI, D.; DI FRONZO, G.; DE FEO, V.; DE TOMAASI, N.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. **Anticancer Research**, v.21, p.2457-2462, 2001.

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 Biology Medical**, v.29, p.71-78, 2000.

SANDOVAL, M.; OKUHAMA, N. N.; ZHANG, X. J.; CONDEZO, L. A.; LAO, J.; ANGELES, F. M.; MUSAH, R. A.; BOBROWSKI, P.; MILLER, M. J. S. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. **Phytomedicine**, v.9, p.325-337, 2002.

SARNI-MANCHADO, P.; DELERIS, A.; AVALLONE, S.; CHEYNIER, V.; MOUTOUNET, M. Analysis and characterization of wine condensed tannins precipitated by proteins used as fining agent in enology. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.50, p.81-86, 1999.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D.M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v.91, p.21-40, 2001.

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 Therapy**, v.12, p.1279-1289, 1998.

SHENG, Y.; PERO, R. W.; AMIRI, A.; BRYNGELSSON, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v.18, p.3363-3368, 1998.

SHENG, Y.; PERO, R. W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v.7, n. 2, p.137-143, 2000.

SIEBERT, K. J. Effects of protein-polyphenol interaction on beverage haze, stabilization and analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.353-362, 1999.

SILVA, F. A. **Avaliação tecnológica e biológica de extrato seco por Spray-drying de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2007. Tese de Doutorado.

STUPPNER, H.; STURM, S.; KONWALINKA, G. HPLC analysis of main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Chromatographia**, v.34, n.11/12, p.597-600, 1992.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos com alto teor de extrato seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Reissek. - Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2002. Tese de Doutorado.

STUPPNER, H.; STURM, S.; KONWALINKA, G. HPLC analysis of main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Chromatographia**, v.34, n.12, p.597-600, 1992.

TASSELLI, F.; CASSANO, A.; DRIOLI, E. Ultrafiltration of kiwi fruit juice using modified poly(etheretherketone) hollow fibre membranes. **Separation and Purification Technology**, v.57, p.94-102, 2007.

TRENTINI, A.M.M; TRENTINI, M.A.M Phytotherapeutic compound for treatment of herpes comprises herbal extract from *Uncaria tomentosa*, vehicle and excipients. **Patent WO2006024120**, 24p., 2006.

VALENTE, L. M. M.; ALVES, F. F.; BEZERRA, G. M.; ALMEIDA, M. B. S.; ROSARIO, S. L.; MAZZEI, J. L.; D'AVILA, L. A.; SIANI, A. C. Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul americanas do gênero *Uncaria*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.216-223, 2006.

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.

VERZA, S.G. **Avaliação das variáveis analíticas dos métodos de determinação de taninos totais baseados na formação de complexos com substâncias protéicas e derivados da polivinilpirrolidona**. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2006. Dissertação de Mestrado.

WAGNER, H.; PROKSCH, A.; VOLLMAR, A.; KREUTZKAMP, B.; BAUER, J. In-vitro-Phagozytose-Stimulierung durch isolierte Pflanzenstoffe gemessen im Phagozytose-Chemolumineszenz-(CL)-Modell. **Planta Medica**, v. 51, p. 139–144, 1985.

WINKLER, C.; WIRLEITNER, B.; SCHROECKSNADEL, K.; MUR, E.; FUCHS, D. *In vitro* effects of two extracts and two pure alkaloids preparations of *Uncaria tomentosa* on peripheral blood mononuclear cells, **Planta Medica**, v. 70, p. 205-210, 2004.

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.

YAZDANSHENAS, M.; TABATABAEENEZHAD, A. R.; ROOSTAAZAD, R.; KHOSHFETRAT, A. B. Full scale analysis of apple juice ultrafiltration and optimization of diafiltration. **Separation and Purification Technology**, v.47, p.52-57, 2005.

YOUN, K. S.; HONG, J. H.; BAE, D. H.; KIM, S. J.; Kim, S. D. Effective clarifying process of reconstituted apple juice using membrane filtration with filter-aid pretreatment. **Journal of Membrane Science**, v.228, p.179–186, 2004.



## **9. ANEXOS**

---



**ANEXO I – LAUDO DE CERTIFICAÇÃO BOTÂNICA E AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO**

**CERTIFICACIÓN BOTÁNICA**

**José Ricardo Campos de la Cruz. Biólogo Colegiado. C. B. P. # 2796**

**Certifica:**

Que, la muestra vegetal conocida como “uña de gato”, proporcionada por **LABORATORIOS INDUQUIMICA S. A.** con RUC # 20101364152., ha sido estudiada y determinada científicamente como: **Uncaria tomentosa** (Willdenow ex. Roemer & Schultes.) DC. Y en base al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist et. al. 1981 se ubica en las siguientes categorías taxonómicas.

**DIVISIÓN : MAGNOLIOPHYTA**  
**CLASE : MAGNOLIOPSIDA**  
**SUBCLASE : ASTERIDAE**  
**ORDEN : RUBIALES**  
**FAMILIA : RUBIACEAE**  
**GENERO : Uncaria Schreb.**  
**ESPECIE : Uncaria tomentosa (Willd. ex. Roem. & Schult.) DC.**

Nombre vulgar: “Uña de gato”

Se expide la presente certificación a solicitud de la empresa para los fines que estime conveniente.

Lima, 08 junio del 2006

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urbanización Santa Luzmila







MINISTERIO DE AGRICULTURA  
INSTITUTO NACIONAL DE RECURSOS NATURALES  
INRENA

Nº 007892 -AG-INRENA

## PERMISO PARA FAUNA Y FLORA SILVESTRE

Este permiso debe adjuntarse con los especímenes y/o productos a exportar, importar o re-exportar.

EXPORTACION     IMPORTACION     RE-EXPORTACION

Válido por 60 días calendarios

Nombre : LABORATORIOS INDUQUIMICA S.A.  
Domicilio : Calle Santa Lucila Nº 152-154 Urb. Villa Marina, Chorrillos. Lima - Perú  
Documento de Identidad : RUC Nº 20101364152  
Producto (s) :

UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*)

Cantidad: 5 kg de corteza molida de uña de gato.

PRODUCTO CON FINES COMERCIALES\*\*\*\*\*

Los derechos otorgados sobre los recursos biológicos no otorgan derechos sobre los recursos genéticos contenidos en ellos (Art. 1, inciso f del Decreto Supremo 014-2001-AG).

Lugar de Procedencia : Ucayali.  
Destinatario : George Gonzáles Ortega  
Dirección : Avenida Ipiranga 2752, 90610.000 Porto Alegre - RS BRASIL

Lima, 03 de 07 del 2006

Sello y firma del Controlador INRENA  
FECHA: 13/07/06  
HORA: 11:35

Sello y firma del representante de la Autoridad  
CITES - PERÚ  
INRENA

Acta n° 340-06  
O.A n° 6559971154

El titular del presente permiso conoce las disposiciones legales vigentes en la materia y es responsable de su cumplimiento y sujeto a las sanciones correspondientes en caso del incumplimiento total o parcial.



**ANEXO II – DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE DOS ALCALOIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS.**

**Tabela II-A.** Áreas referentes ao pico da mitrafilina na curva analítica da substância química de referência. Detecção em 245 nm.

<b>Linearidade Mitrafilina</b>	
<b>Concentração (ug/mL)</b>	<b>Área (mV.s)</b>
1,00	33058
1,00	33560
1,00	32355
2,00	65861
2,00	66651
2,00	66755
3,00	99965
3,00	100057
3,00	99886
4,00	135098
4,00	134851
4,00	134720
5,00	168701
5,00	169481
5,00	169691

**Tabela II-B.** Áreas referentes ao pico da mitrafilina na curva analítica do extrato bruto reconstituído. Detecção em 245 nm.

<b>Linearidade Extrato Bruto</b>	
<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Área (mV.s)</b>
0,43	32952
0,43	32451
0,43	32617
0,85	64649
0,85	66067
0,85	65521
1,28	97969
1,28	99067
1,28	98238
1,70	130341
1,70	131029
1,70	131730
2,13	163341
2,13	162933
2,13	165709

**Tabela II-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da mitrafilina.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	32499,20	558,80	0,96
2	32499,20	1060,80	1,82
3	32499,20	-144,20	-0,25
4	66605,93	-744,93	-1,28
5	66605,93	45,07	0,08
6	66605,93	149,07	0,26
7	100712,67	-747,67	-1,28
8	100712,67	-655,67	-1,13
9	100712,67	-826,67	-1,42
10	134819,40	278,60	0,48
11	134819,40	31,60	0,05
12	134819,40	-99,40	-0,17
13	168926,13	-225,13	-0,39
14	168926,13	554,87	0,95
15	168926,13	764,87	1,31

**Tabela II-D.** Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído para análise dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	32655,00	297,00	0,41
2	32655,00	-204,00	-0,28
3	32655,00	-38,00	-0,05
4	65481,30	-832,30	-1,15
5	65481,30	585,70	0,81
6	65481,30	39,70	0,05
7	98307,60	-338,60	-0,47
8	98307,60	759,40	1,05
9	98307,60	-69,60	-0,10
10	131133,90	-792,90	-1,09
11	131133,90	-104,90	-0,14
12	131133,90	596,10	0,82
13	163960,20	-619,20	-0,85
14	163960,20	-1027,20	-1,42
15	163960,20	1748,80	2,41

**ANEXO III – DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR CLAE PARA AS SAPONINAS TRITERPÊNICAS.**

**Tabela III-A.** Áreas referentes ao pico da  $\alpha$ -hederina na curva analítica da substância química de referência. Detecção em 210 nm.

<b>Linearidade <math>\alpha</math>-hederina</b>	
<b>Concentração (ug/mL)</b>	<b>Área (mV.s)</b>
10,00	65609
10,00	66830
10,00	66923
15,00	96821
15,00	96229
15,00	97351
20,00	130442
20,00	130622
20,00	131093
25,00	163769
25,00	159716
25,00	160466
30,00	193129
30,00	192860
30,00	194359

**Tabela III-B.** Áreas referentes ao pico 1 na curva analítica obtida do extrato bruto reconstituído. Detecção em 210 nm.

<b>Linearidade Extrato Bruto</b>	
<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Área (mV.s)</b>
0,84	80936
0,84	80528
0,84	81045
1,25	120809
1,25	121454
1,25	122395
1,67	159774
1,67	159234
1,67	160598
2,09	199457
2,09	199322
2,09	200549
2,51	237251
2,51	237251
2,51	237251

**Tabela III-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da  $\alpha$ -hederina.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	66046,47	-437,47	-0,37
2	66046,47	783,53	0,66
3	66046,47	876,53	0,74
4	97897,20	-1076,20	-0,91
5	97897,20	-1668,20	-1,41
6	97897,20	-546,20	-0,46
7	129747,93	694,07	0,59
8	129747,93	874,07	0,74
9	129747,93	1345,07	1,13
10	161598,67	2170,33	1,83
11	161598,67	-1882,67	-1,59
12	161598,67	-1132,67	-0,96
13	193449,40	-320,40	-0,27
14	193449,40	-589,40	-0,50
15	193449,40	909,60	0,77

**Tabela III-D.** Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído na análise das saponinas triterpênicas.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	81646,40	-710,40	-0,80
2	81646,40	-1118,40	-1,25
3	81646,40	-601,40	-0,67
4	120751,67	57,33	0,06
5	120751,67	702,33	0,79
6	120751,67	1643,33	1,84
7	159856,93	-82,93	-0,09
8	159856,93	-622,93	-0,70
9	159856,93	741,07	0,83
10	198962,20	494,80	0,55
11	198962,20	359,80	0,40
12	198962,20	1586,80	1,78
13	238067,47	-816,47	-0,91
14	238067,47	-816,47	-0,91
15	238067,47	-816,47	-0,91

**ANEXO IV – DADOS DE LINEARIDADE DO MÉTODO ANALÍTICO POR ESPECTROFOTOMETRIA UV/VIS PARA A ANÁLISE DOS POLIFENÓIS TOTAIS.**

**Tabela IV-A.** Valores de absorvâncias obtidas com as soluções padrões de epicatequina após o tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu. Leitura em 760 nm.

<b>Linearidade Epicatequina</b>	
<b>Concentração (ug/mL)</b>	<b>Absorvância (U.A.)</b>
1,65	0,165
1,65	0,170
1,65	0,173
3,29	0,318
3,29	0,326
3,29	0,317
4,94	0,471
4,94	0,461
4,94	0,457
6,58	0,620
6,58	0,619
6,58	0,625
8,23	0,750
8,23	0,766
8,23	0,753

**Tabela IV-B.** Valores de absorvâncias obtidos com as soluções das amostras de extrato bruto reconstituído após o tratamento com o reagente de Folin-Ciocalteu. Leitura em 760 nm.

<b>Linearidade Extrato Bruto</b>	
<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>Absorvância (U.A.)</b>
0,0056	0,129
0,0056	0,127
0,0056	0,122
0,0112	0,259
0,0112	0,259
0,0112	0,260
0,0168	0,376
0,0168	0,380
0,0168	0,379
0,0224	0,498
0,0224	0,495
0,0224	0,499
0,0280	0,604
0,0280	0,608
0,0280	0,607

**Tabela IV-C.** Tabela dos resíduos da curva analítica da epicatequina na análise espectrofotométrica dos polifenóis totais.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	0,1711	-0,0061	-0,8935
2	0,1711	-0,0011	-0,1571
3	0,1711	0,0019	0,2847
4	0,3186	-0,0006	-0,0835
5	0,3186	0,0074	1,0948
6	0,3186	-0,0016	-0,2307
7	0,4661	0,0049	0,7266
8	0,4661	-0,0051	-0,7462
9	0,4661	-0,0091	-1,3353
10	0,6136	0,0064	0,9475
11	0,6136	0,0054	0,8002
12	0,6136	0,0114	1,6839
13	0,7611	-0,0111	-1,6299
14	0,7611	0,0049	0,7266
15	0,7611	-0,0081	-1,1880

**Tabela IV-D.** Tabela dos resíduos da curva analítica do extrato bruto reconstituído na análise espectrofotométrica dos polifenóis totais.

<b>Observação</b>	<b>Y previsto</b>	<b>Resíduos</b>	<b>Resíduos padrão</b>
1	0,1337	-0,0047	-0,7284
2	0,1337	-0,0067	-1,0362
3	0,1337	-0,0117	-1,8056
4	0,2536	0,0054	0,8310
5	0,2536	0,0054	0,8310
6	0,2536	0,0064	0,9849
7	0,3735	0,0025	0,3898
8	0,3735	0,0065	1,0054
9	0,3735	0,0055	0,8515
10	0,4933	0,0047	0,7181
11	0,4933	0,0017	0,2565
12	0,4933	0,0057	0,8720
13	0,6132	-0,0092	-1,4157
14	0,6132	-0,0052	-0,8002
15	0,6132	-0,0062	-0,9541