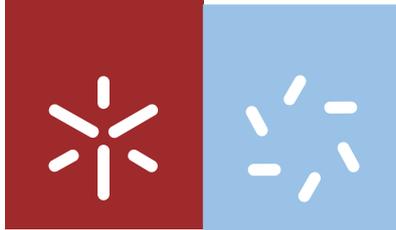


Universidade do Minho
Escola de Ciências

Daniel Santos Pereira

Análise do perfil químico e determinação quantitativa de mitrafilina e ácido clorogênico por HPLC em folhas da espécie medicinal *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae).



Universidade do Minho

Escola de Ciências



**Instituto de Pesquisa e
Desenvolvimento**

Setor de Produtos Naturais

Daniel Santos Pereira

**Análise do perfil químico e determinação
quantitativa de mitrafilina e ácido clorogênico
por HPLC em folhas da espécie medicinal
Uncaria tomentosa (Rubiaceae).**

Dissertação de Mestrado
Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química

Trabalho efetuado sob orientação de:
Doutor Antônio Carlos Siani
Doutora Maria Dulce Geraldo

Julho de 2013

DECLARAÇÃO

Nome: Daniel Santos Pereira

Título da Tese de Mestrado:

Análise do perfil químico e determinação quantitativa de mitrafilina e ácido clorogênico por HPLC em folhas da espécie medicinal *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae)

Orientador(es):

Antônio Carlos Siani e Maria Dulce Geraldo

Ano de Conclusão: 2013

Designação do Mestrado: Mestrado em Técnicas de Caracterização e Análise Química.

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE;

Universidade do Minho, ___/___/_____

Assinatura: _____

Agradecimentos

Ao Doutor Antônio Carlos Siani, meu orientador, por todo apoio prestado ao longo do trabalho experimental e durante a elaboração da dissertação, com suas preciosas orientações, disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

À Doutora Maria Dulce Geraldo, minha orientadora, por todo apoio na organização e formatação deste trabalho, ajuda nos tratamentos dos cálculos matemáticos, disponibilidade e valiosas orientações.

À Doutora Lígia Valente da UFRJ pelo “pontapé” inicial no trabalho, recepção, ajuda e apoio desde o início.

Aos companheiros do laboratório de pesquisa da UFRJ (“os 627”).

Ao Doutor João Tostes da Fiocruz pelo seu apoio na parte experimental, acompanhamento e amizade durante todo o trabalho.

Ao Doutor José Luís Mazzei da Fiocruz pela transmissão de conhecimentos e auxílio em todas as dúvidas surgidas ao longo do percurso.

Aos demais funcionários da plataforma analítica da Fiocruz, em especial ao Thiago, Jun e Vinícius.

À todos os professores ao longo do ano curricular do Mestrado pelo compartilhamento de conhecimentos e experiências profissionais.

Aos colegas do Mestrado, em especial ao “Marcellão” e “Zé”, pelo seu apoio, companheirismo e amizade. Podem sempre contar comigo!

Aos meus pais, Paulo e Rosângela, pela educação, carinho, preocupação, incentivo e amor, que fizeram com que tudo isso se tornasse realidade.

As minhas irmãs, Paula e Isabela, pelo seu amor e carinho, que sem elas eu não seria a pessoa que sou hoje, e ao meu “irmão” Buck, pela amizade e amor durante todos os anos. R.I.P.

A minha amada Liana, pelo seu amor, carinho, alegria, paciência, ajuda, compreensão e por ter me tornado uma pessoa muito melhor. Te amo!

Uncaria tomentosa (Willd) DC., conhecida como unha de gato, é uma liana tropical nativa da Amazônia brasileira e peruana. A espécie é reconhecida pelas suas propriedades anti-inflamatória, imunoestimulante, antioxidante e antiviral, geralmente atribuídas aos polifenóis e, principalmente aos alcaloides oxindólicos pentacíclicos. Essa espécie enfrenta ultimamente uma diminuição alarmante no seu habitat nativo, devido principalmente à sua colheita indiscriminada, dado o alto grau de comercialização das cascas para uso medicinal. Nesse âmbito, o possível aproveitamento das folhas para fins terapêuticos ganha relevância para a sobrevivência da espécie e a sustentabilidade do mercado. Contudo, as folhas ainda não são suficientemente conhecidas do ponto de vista do conteúdo alcaloídico, e até o momento, não existem estudos sobre seu conteúdo fenólico.

Este trabalho teve como objetivo analisar o perfil químico e determinar o teor de alcaloides (quantificados pelo marcador mitrafilina) e polifenóis (quantificados pelo ácido clorogênico) por HPLC em fase reversa, complementado com informações obtidas por TLC, em cinco amostras de folhas de *Uncaria tomentosa* colhidas em diferentes localidades do Brasil. Foram comparados os produtos da extração das folhas secas com metanol puro e com etanol/água 1:1; obtendo-se para cada um deles, frações enriquecidas em alcaloides e fenóis, mediante procedimentos de partição. A quantificação da mitrafilina e do ácido clorogênico nas amostras foi realizada através do método HPLC-DAD, utilizando retas de calibração externa com seus respectivos padrões. Em ambos os casos, foram avaliados os parâmetros de linearidade, limite de detecção e quantificação e foram efetuados ensaios de recuperação. Três amostras da fração sob partição básica apresentaram conteúdos de mitrafilina entre 0,88-2,15 mg/g de folhas secas. As cinco amostras indicaram, na partição ácida, um conteúdo de ácido clorogênico de 0,14-1,71 mg/g de folhas secas. Uma das amostras apresentou o flavonoide campferitrina como um sinal proeminente no cromatograma, sugerindo que provavelmente esta amostra não provém da *U. tomentosa*, ainda que as folhas sejam morfológicamente similares. Estes resultados destacam a adequabilidade da técnica HPLC aplicada ao controle de qualidade de matéria-prima vegetal com fins medicinais. A análise por UPLC-DAD-MS corroborou a presença dos marcadores químicos (mitrafilina, ácido clorogênico e campferitrina) nos extratos de *U. tomentosa* analisados.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*; HPLC; mitrafilina; ácido clorogênico; campferitrina; alcaloides; polifenóis.

Uncaria tomentosa (Willd) DC., known as cat's claw is a vine native to tropical Brazilian and Peruvian Amazon. The species is known for its anti-inflammatory, immunostimulant, antioxidant and antiviral properties, generally attributed to polyphenols, and especially to the pentacyclic oxindole alkaloids. This species is lately facing alarming decrease in its native habitat, mainly due to the indiscriminate harvesting, given the high degree of commercialization of the bark for medicinal use. In this context, the possible use of the leaves for therapeutic use gains relevance for the survival of the species and the sustainability of the market. However, the leaves are not yet sufficiently known from the point of view of alkaloid content, and so far, there are no studies on its phenolic content.

This study aimed to analyze the chemical profile and determine the content of alkaloids (quantified by mitraphylline marker) and polyphenols (quantified by chlorogenic acid) by reversed phase HPLC, supplemented with information obtained by TLC in five samples of leaves of *Uncaria tomentosa* harvested in different Brazilian locations. The products of the extraction of dried leaves with pure methanol and with ethanol / water 1:1 were compared, for each one of them, fractions enriched in alkaloids and phenols by partition procedures were obtained. The quantification of mitraphylline and chlorogenic acid in the samples was performed through the HPLC-DAD method using external calibration curves with their respective standards. In both cases the parameters evaluated were: linearity, limit of detection and quantification and recovery experiments were also performed. Three samples of the fraction under basic partition showed mitraphylline content between 0.88 and 2.15 mg / g of dried leaves. The five samples indicated in the acidic partition a chlorogenic acid content from 0.14 to 1.71 mg / g of dried leaves. One of the samples showed the kaempferitrin flavonoid as a prominent sign on the chromatogram, suggesting that this sample is probably not from *U. tomentosa*, even if the thorns are morphologically similar. These results highlight the suitability of the HPLC technique applied to quality control of plant material for medicinal purposes. The analysis by UPLC-DAD-MS confirmed the presence of chemical markers (mitraphylline, chlorogenic acid and kaempferitrin) in the extracts of *U. tomentosa* analyzed.

Keywords: *Uncaria tomentosa*; HPLC; mitraphylline; chlorogenic acid; kaempferitrin; alkaloids, polyphenols.

Agradecimentos.....	iii
Resumo.....	iv
Abstract.....	v
Índice Geral.....	vi
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tabelas.....	xiii
Abreviaturas e Siglas.....	xv
Cap. 1 – Introdução.....	1
1.1 Importância da Fitoterapia.....	1
1.2 A família botânica Rubiaceae e o género <i>Uncaria</i>	2
1.3 A espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	3
1.4 Caracterização química e propriedades farmacológicas da <i>Uncaria tomentosa</i>	5
1.4.1 Alcaloides.....	5
1.4.2 Terpenóides.....	8
1.4.3 Polifenóis.....	10
1.5 Influência de diferentes fatores na produção de metabólitos secundários.....	14
1.6 Controle de qualidade do fármaco vegetal.....	15
Cap. 2 – Objetivos.....	19
2.1 Objetivo geral.....	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
Cap. 3 – Materiais e Métodos.....	20
3.1 Solventes, reagentes, substâncias de referência e materiais laboratoriais.....	20
3.2 Equipamentos.....	20
3.3 Material vegetal.....	21
3.4 Determinação do perfil das amostras por TLC.....	22

3.5 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i>	23
3.5.1 Partição dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i>	23
3.6 Obtenção dos extratos metanólicos das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i>	23
3.6.1 Partição ácido-base dos extratos metanólicos das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i>	24
3.7 Doseamento do alcaloide mitrafilina em folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> por HPLC-DAD.....	24
3.8 Doseamento do ácido clorogênico em folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> por HPLC-DAD.....	26
3.9 Análises de UPLC-DAD-MS.....	27
Cap. 4 – Apresentação e discussão dos resultados	30
4.1 Extração e caracterização preliminar de alcaloides e polifenóis.....	30
4.2 Quantificação dos alcaloides das amostras de <i>Uncaria tomentosa</i> por HPLC.....	36
4.3 Quantificação dos polifenóis das amostras de <i>Uncaria tomentosa</i> por HPLC.....	46
4.4 Caracterização por UPLC-DAD-MS dos marcadores químicos nos extratos enriquecidos em alcaloides e polifenóis de <i>Uncaria tomentosa</i>	59
4.4.1 Análise dos alcaloides nas amostras UT-2 FB-MeOH e UT-4 FB-MeOH.....	60
4.4.2 Análise dos polifenóis nas amostras UT-2 FA-MeOH e UT-4 FA-MeOH.....	64
Cap. 5 – Conclusões	74
Cap. 6 – Referências Bibliográficas	77

Figura 1 - Fotografia da espécie <i>Uncaria tomentosa</i>	3
Figura 2 - Fotografia das folhas da <i>Uncaria tomentosa</i> , destacando os espinhos.....	4
Figura 3 - Alcaloides oxindólicos pentacíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	6
Figura 4 - Alcaloides oxindólicos tetracíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	6
Figura 5 - Alcaloides indólicos tetracíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	7
Figura 6 - Alcaloides indólicos pentacíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	7
Figura 7 - Estrutura molecular do isopreno.....	8
Figura 8 - Ácidos triterpênicos isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	9
Figura 9 - Outros triterpenoides isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	10
Figura 10 - Núcleo fundamental de flavonoides.....	11
Figura 11 - Esqueletos básicos de flavonoides.....	12
Figura 12 - Substâncias fenólicas identificadas em <i>Uncaria tomentosa</i>	13
Figura 13 - Principal flavonoide isolado de <i>Uncaria guianensis</i>	13
Figura 14 - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD indicando a presença dos seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos: (1) especiofilina; (2) mitrafilina; (3) uncarina F; (4) pteropodina; (5) isomitrafilina; (6) isopteropodina. (A) Amostra de referência UTFA ₂ (c = 0,60 mg/ml): condições experimentais: fase móvel MeCN/NH ₄ OAc 30 mM (45:55), pH 6,8-7,0, modo isocrático, fluxo: 1,0 ml/min, detecção: 245 nm, forno: 60° C. (B) Amostra de referência UTFA (c = 1,0 mg/ml).....	31
Figura 15 - Cromatografia em camada fina do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> . (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspensão com reagente NP/PEG. Concentração dos extratos: 50 mg/ml.....	32
Figura 16 - Cromatografia em camada fina do extrato bruto metanólico (EBM) das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i> . (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H ₂ O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspensão com reagente NP/PEG. Concentração dos extratos: 50 mg/ml.....	32

Figura 17 - Cromatografia em camada fina das frações provenientes da partição do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B e C) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. (a) FH-EtOH/H₂O; (b) FC-EtOH/H₂O; (c) FHM-EtOH/H₂O. Concentração das frações: 10 mg/ml e concentração das amostras de referência: UTFA₁: 5,0 mg/ml, ácido clorogênico: 1,0 mg/ml, ácido cafeico: 1,0 mg/ml e campferitrina: 0,60 mg/ml.....34

Figura 18 - Cromatografia em camada fina das frações provenientes da partição do extrato bruto metanólico (EBM) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A e B) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (C) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob luz visível após aspersão com reagente Dragendorff/Nitrito de sódio; (D) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. (d) FB-MeOH; (e) FA-MeOH. Concentração das frações: 10 mg/ml para as FA-MeOH e 1,0 mg/ml para as FB-MeOH; e concentração das amostras de referência: UTFA₂: 1,0 mg/ml e 6,0 mg/ml (A e B, respetivamente), ácido clorogênico: 1,0 mg/ml, ácido cafeico: 1,0 mg/ml, campferitrina: 0,60 mg/ml, mitrafilina: 1,0 mg/ml e isopteropodina: 1,0 mg/ml.....35

Figura 19 - Cromatograma e espectro de ultravioleta correspondente à solução padrão de: (A) mitrafilina (c = 0,20 mg/ml) e (B) isopteropodina (c = 0,20 mg/ml) com detecção à 245 nm. Condições de análise: ver item 3.7..... 37

Figura 20 - Representação gráfica da curva de calibração da área do pico referente à mitrafilina em função da concentração.....38

Figura 21 - Cromatograma da amostra UT-1 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7.....41

Figura 22 - Cromatograma da amostra UT-2 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7.....41

Figura 23 - Cromatograma da amostra UT-3 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7.....42

Figura 24 - Cromatograma da amostra UT-4 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7.....42

Figura 25 - Cromatograma da amostra UT-5 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7.....43

Figura 26 - Cromatograma e espectro de ultravioleta correspondente à solução padrão de: ácido clorogênico (c = 0,50 mg/ml) a 280 nm (A) e a 320 nm (B), campferitrina (c = 0,6 mg/ml) a 280 nm (C) e a 320 nm (D). Condições de análise: ver item 3.8.....47

Figura 27 - Representação gráfica das retas de calibração da área do pico referente ao ácido clorogênico em função da concentração avaliadas a 280 nm e 320 nm).....48

Figura 28 - Cromatograma da amostra UT-1 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	51
Figura 29 - Cromatograma da amostra UT-2 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	52
Figura 30 - Cromatograma da amostra UT-3 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	52
Figura 31 - Cromatograma da amostra UT-4 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico (1) e campferitrina (2) com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Condições de análise: ver item 3.8.....	53
Figura 32 - Cromatograma da amostra UT-5 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	53
Figura 33 - Cromatograma da amostra UT-1/EA FHM-EtOH/H ₂ O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	54
Figura 34 - Cromatograma da amostra UT-1 FHM-EtOH/H ₂ O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	54
Figura 35 - Cromatograma da amostra UT-2 FHM-EtOH/H ₂ O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	55
Figura 36 - Cromatograma da amostra UT-3 FHM-EtOH/H ₂ O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8.....	55
Figura 37 - Cromatograma da amostra UT-4/EA FHM-EtOH/H ₂ O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico (1) e campferitrina (2) com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Condições de análise: ver item 3.8.....	56

Figura 38 - (A) Perfil cromatográfico da mitrafalina ($c = 0,20$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS. (B) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5. (C) Espectros de massas obtidos para os dois sinais no modo positivo. C.1: $t_R \sim 7,05$ min; C.2: $t_R \sim 5,27$ min. Condições de análise: ver item 3.9.....61

Figura 39 - (A.1) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml). (A.2) e (A.3) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5 e m/z 385,5, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 7,94 min; B.2: 2,56 min; B.3: 2,40 min ($[M + H]^+$) = 386 (u.m.a.); B.4: 6,53 min; B.5: 4,86 min ($[M + H]^+$) = 370 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....62

Figura 40 - (A.1) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml). (A.2) e (A.3) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5 e m/z 385,5, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 7,92 min; B.2: 6,56 min; B.3: 2,42 min ($[M + H]^+$) = 386 (u.m.a.); B.4: 11,39 min; B.5: 9,42 min; B.6: 6,15 min; B.7: 4,85 min; B.8: 4,11 min ($[M + H]^+$) = 370 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....63

Figura 41 - Perfil cromatográfico do ácido clorogênico ($c = 0,50$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS monitorizado a 280 nm (A.1) e 320 nm (A.2). (B) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 353,5. (C) Espectro de massa obtido para sinal com $t_R \sim 4,52$ min no modo negativo. Condições de análise: ver item 3.9.....66

Figura 42 - Perfil cromatográfico da campferitrina ($c = 0,60$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS monitorizado a 280 nm (A.1) e 320 nm (A.2). (B) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 577. (C) Espectro de massa obtido para sinal com $t_R \sim 9,98$ min no modo negativo. Condições de análise: ver item 3.9.....67

Figura 43 - (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FA-MeOH ($c = 10,0$ mg/ml) com calibração prévia com campferitrina avaliado a 280 e a 320 nm, respetivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 10,41 min ($[M - H]^-$) = 577 (u.m.a.); B.2: 4,41 min ($[M - H]^-$) = 355,5 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....68

Figura 44 - (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FA-MeOH ($c = 10,0$ mg/ml) com calibração prévia com ácido clorogênico avaliado a 280 e a 320 nm, respetivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respetivamente. (B) = Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,82 min ($[M - H]^-$) = 577 (u.m.a.); B.2: 4,44 min ($[M - H]^-$) = 355,5 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....69

Figura 45 - (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FA-MeOH ($c = 1,0$ mg/ml), com calibração prévia com campferitrina, avaliado a 280 e a 320 nm, respetivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,91 min ($[M - H]^-$) = 577 (u.m.a.); B.2: 4,51 min ($[M - H]^-$) = 355,5 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....71

Figura 46 (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FA-MeOH ($c = 1,0$ mg/ml), com calibração prévia com ácido clorogênico, avaliado a 280 e a 320 nm, respectivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respectivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,89 min ($[M - H]^- = 577$ (u.m.a.); B.2: 4,51 min ($[M - H]^- = 355,5$ (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9.....72

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Cronologia da descoberta de fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas.....	1
Tabela 2 - Nome, descrição e laboratório de alguns extratos patenteados à base de <i>Uncaria tomentosa</i>	5
Tabela 3 - Natureza química e distribuição dos alcaloides presentes na <i>Uncaria tomentosa</i>	7
Tabela 4 - Condensação de unidades isoprenicas na formação de terpenoides.....	9
Tabela 5 - Classificação das substâncias fenólicas de acordo com o esqueleto carbônico básico.....	11
Tabela 6 - Determinação de substâncias e/ou marcadores químicos da <i>Uncaria tomentosa</i> por HPLC.....	17-18
Tabela 7 - Dados sobre as amostras de folhas secas de <i>Uncaria tomentosa</i> utilizadas no trabalho.....	22
Tabela 8 - Procedimento de preparação das soluções padrão de mitrafilina para a reta de calibração.....	25
Tabela 9 - Procedimento de preparação das soluções padrão de ácido clorogênico para a reta de calibração.....	27
Tabela 10 - Condições de ionização para mitrafilina, ácido clorogênico e campferitrina por UPLC-MS.....	29
Tabela 11 - Rendimento dos extratos EBH e EBM das folhas de <i>Uncaria tomentosa</i>	30
Tabela 12 - Rendimento das frações obtidas por partição dos extratos brutos.....	30
Tabela 13 - Média e desvio padrão relativo das áreas obtidas por HPLC-DAD da mitrafilina em função da concentração (avaliada a 245 nm).....	36
Tabela 14 - Parâmetros estatísticos da reta de calibração apresentada na figura 20.....	38
Tabela 15 - Concentração estimada de mitrafilina por HPLC-DAD a partir da reta de calibração apresentada na figura 20.....	40
Tabela 16 - Ensaios de recuperação de amostras e soluções-padrão (245 nm).....	44
Tabela 17 - Concentrações, rendimentos e teor (mg/g) de mitrafilina nas amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	45
Tabela 18 - Teor de mitrafilina em amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	45

Tabela 19 - Média e desvio padrão relativo das áreas obtidas por HPLC-DAD do ácido clorogênico em função da concentração (avaliada a 280 e 320 nm).....	46
Tabela 20 - Parâmetros estatísticos das retas de calibração apresentada na figura 27.....	48
Tabela 21 - Concentração estimada de ácido clorogênico por HPLC-DAD nas amostras a partir da reta de calibração apresentada na figura 27.....	50
Tabela 22 - Ensaio de recuperação de amostras e soluções-padrão com detecção efetuada a 280 nm.....	57
Tabela 23 - Ensaio de recuperação de amostras e soluções-padrão com detecção efetuada a 320 nm.....	57
Tabela 24 - Comparação dos valores de concentração, rendimento e teor de ácido clorogênico nas amostras de <i>Uncaria tomentosa</i> avaliados a dois comprimentos de onda.....	58

Abreviaturas e Siglas

ABIFISA - Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde

Cols - Colaboradores

CV - Coeficiente de variação

DAD - Detetor de arranjo de díodos

EA - Extração adicional

EBH - Extrato bruto hidroalcoólico

EBM - Extrato bruto metanólico

EMBRAPA – Empresa brasileira de pesquisa agropecuária

ESI - Ionização por eletronebulização - *Electrospray ionization*

FA-MeOH - Fração ácida obtida do extrato metanólico

FB-MeOH - Fração básica obtida do extrato metanólico

FC-EtOH/H₂O - Fração clorofórmica obtida do extrato hidroalcoólico

FH-EtOH/H₂O - Fração hexânica obtida do extrato hidroalcoólico

FHM-EtOH/H₂O - Fração hidrometanólica obtida do extrato hidroalcoólico

GC - Cromatografia gasosa - *Gas chromatography*

HPLC - Cromatografia líquida de alta performance - *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-DAD - Cromatografia líquida de alta performance acoplada à detetor de arranjo de díodos - *High Performance Liquid Chromatography coupled with diode array detector*

HPLC-MS - Cromatografia líquida de alta performance acoplada à espectrometria de massa - *High Performance Liquid Chromatography coupled with Mass spectrometer*

ISO - Organização Internacional para Padronização - *International Organization for Standardization*

IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LDD - Limite de detecção

LDQ - Limite de quantificação

Min - minutos

MS - Espectrometria de massa - *Mass spectrometry*

mAU - mili unidades de absorbância - *milli-absorbance unit*

m/z - razão massa-carga

NP - 2-aminoetil-difenilborinato

OMS - Organização Mundial de Saúde

PEG - Polietilenoglicol

PM - Peso molecular

POA - Alcaloides oxindólicos pentacíclicos - *Pentacyclic oxindole alkaloid*

R_F - Fator de retenção

RSD - Desvio padrão relativo - *Relative standard deviation*

TLC - Cromatografia em camada fina - *Thin layer chromatography*

TOA - Alcaloides oxindólicos tetracíclicos - *Tetracyclic oxindole alkaloid*

t_R - Tempo de retenção

u.m.a. - unidade de massa atômica

U. Tomentosa - Uncaria tomentosa

UPLC - Cromatografia líquida de ultra performance - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

UPLC-DAD-MS - Cromatografia líquida de ultra performance com detetor de arranjo de díodos acoplada à espectrometria de massa - *Ultra Performance Liquid Chromatography coupled with Diode Array Detector coupled with Mass Spectrometry*

UTFA - Fração Alcaloídica da *Uncaria tomentosa*

UV - Ultravioleta

UV-Vis - Ultravioleta-visível

λ_{max} - Comprimento de onda com máximo de absorção

1. Introdução

1.1 Importância da Fitoterapia

A utilização de plantas medicinais pelo homem é hábito remoto, sendo difundido em todos os continentes desde a origem das civilizações. O uso de plantas para tratar doenças levou a um crescimento de conhecimento terapêutico popular, que vem ajudando constantemente a descoberta de uma grande variedade de medicamentos de uso corrente e atual [1]. A importância histórica das substâncias ativas obtidas de plantas como protótipo para o desenvolvimento de fármacos pode ser demonstrada pela cronologia apresentada, de maneira resumida, na tabela 1 [2].

Tabela 1 – Cronologia da descoberta de fármacos protótipos de categorias terapêuticas, a partir de plantas [2]

Gênero	Fármaco	Data do isolamento	Categoria terapêutica
<i>Digitalis</i>	digitoxina	1785 - 1875	Cardiotônico
<i>Papaver</i>	morfina	1805	Hipnoanalgésico
<i>Atropa</i>	atropina	1833	Anticolinérgico
<i>Pilocarpus</i>	pilocarpina	1875	Colinérgico
<i>Ephedra</i>	efedrina	1887	Adrenérgico
<i>Erythroxylon</i>	cocaína	1895	Anestésico local
<i>Rauwolfia</i>	reserpina	1952	Neuroléptico

Com a crescente utilização da fitoterapia por profissionais de saúde, impulsionada pelo aumento do conhecimento e pela grande produção científica, principalmente nas duas últimas décadas, a cada dia mais fármacos e extratos vegetais são introduzidos na terapêutica e comercializados [3].

No mercado internacional de medicamentos, muitos produtos derivam de espécies vegetais. Atualmente, as estatísticas relativas ao mercado de fitoterápicos mostram que o consumo destes produtos no mundo tem aumentado consideravelmente nos últimos anos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população mundial faz uso de alguma planta medicinal ou aromática, dos quais 30% são por indicação médica [4]. Estimativas avaliam que o mercado mundial de fármacos de origem vegetal atingiu US\$ 12,4 bilhões recentemente, sendo o consumo da Europa responsável por aproximadamente 50% deste mercado [5]. Além disso, os fitoterápicos

são responsáveis por 25% das receitas médicas nos países desenvolvidos e cerca de 80% nos países em desenvolvimento [3].

No Brasil, a utilização de plantas medicinais tem origem na cultura indígena e na posterior agregação do conhecimento trazido pelos europeus e africanos que ali chegaram [6]. A medicina popular brasileira poderia ser considerada privilegiada, uma vez que o país é detentor de 23% das espécies vegetais existentes no planeta, sendo esta considerada a mais rica diversidade genética do mundo. Acredita-se que pelo menos metade tenha alguma propriedade terapêutica ou aromática, útil à população [7].

Segundo a Associação Brasileira das Empresas do Setor Fitoterápico, Suplemento Alimentar e de Promoção da Saúde (ABIFISA), o mercado brasileiro de fitoterápicos movimentou aproximadamente US\$ 1 bilhão em 2011 prevendo-se um aumento entre 10% e 15% para 2012 [8].

1.2 A família botânica Rubiaceae e o gênero *Uncaria*

A família Rubiaceae representa a quarta maior família do grupo das Angiospermas [9] com cerca de 650 gêneros e 13.000 espécies, distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com alguns representantes nas regiões temperadas e frias da Europa [10]. No Brasil ocorrem cerca de 120 gêneros e 2000 espécies, correspondendo a uma das principais famílias da nossa flora e constituindo-se como um importante elemento em quase todas as formações naturais [11]. Em alguns estudos químicos a essa família identificou-se a presença de alcaloides, flavonoides, cumarinas, terpenoides e antraquinonas [10, 12].

Pertencente à família Rubiaceae, o gênero *Uncaria* tem sido reconhecido como constituído de trepadeiras lenhosas. É representado por 34 espécies amplamente distribuídas em regiões tropicais, incluindo o Sudeste da Ásia, África e América do Sul, sendo as mais conhecidas a *Uncaria tomentosa*, *Uncaria rynchophylla*, *Uncaria attenuata* e *Uncaria guianensis* [13].

Os usos medicinais tradicionais de espécies *Uncaria* incluem tratamentos para feridas e úlceras, febres, dores de cabeça, doenças gastrointestinais, cardiovasculares e do sistema nervoso central, infecções bacterianas/fúngicas e hipertensão [14, 15].

A caracterização química do gênero *Uncaria* tem sido extensivamente abordada desde o início de 1900. O primeiro artigo foi publicado em 1928 e revelou o isolamento da substância rincofilina da *Uncaria rynchophylla*. Atualmente, mais de 150

substâncias foram isoladas e identificadas em espécies do género *Uncaria*. Os compostos predominantes são os alcaloides, terpenoides, flavonoides e cumarinas [12].

1.3 A espécie *Uncaria tomentosa*

A espécie *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Figura 1) pode ser encontrada na América Central e do Sul: Peru, Bolívia [16] e Brasil [17]. No Brasil, pode ser encontrada nos estados do Acre, Amazonas, Amapá e Pará, sendo popularmente conhecida por unha-de-gato [13], ou por variações populares, de acordo com o local onde ocorre. Os nomes mais comuns são no Brasil: espera-aí, jupinda e jupindá; na Bolívia: bereoquida e no Peru: garabato, garabato amarillo, samento, misho mentis e uña de gato [18, 19]. De forma mais abrangente é conhecida como *uña de gato* nos países de língua espanhola e *cat's claw* nos de língua inglesa.



Figura 1. Fotografia da espécie *Uncaria tomentosa*. Adaptado de [20].

É uma liana lenhosa gigante, geralmente encontrada em florestas primárias, ou ainda em florestas secundárias antigas. Pode atingir entre 10 a 30 m de comprimento e 5 a 40 cm de diâmetro de base [21]. As folhas são perenes e as flores pequenas amarelo-esbranquiçadas. Possui espinhos semicurvados, pontiagudos e de consistência lenhosa que facilitam a aderência da planta à casca de ramos das árvores (Figura 2), sendo frequentemente encontrada em copas de árvores com 20 a 30 m de altura. As flores surgem nos meses de outubro e novembro e as sementes amadurecem em dezembro [22]. O seu nome mais comum, unha-de-gato, está relacionado com a morfologia da planta, que apresenta acúleos na base foliar que servem como garras de sustentação e que lembram unhas [23].



Figura 2. Fotografia das folhas da *Uncaria tomentosa*, destacando os espinhos. Adaptado de [24].

As espécies de *Uncaria* têm sido utilizadas há pelo menos 2000 anos pelos índios sul-americanos para tratar tumores, inflamações, reumatismos, úlceras gástricas e outras disfunções, além de contraceptivo [25, 26]. Dentre suas principais propriedades farmacológicas, destaca-se a ação anti-inflamatória, antioxidante e atividade imunestimulante, sendo que os estudos realizados comprovaram as propriedades consagradas no uso popular [12]. Os principais usos tradicionais e aplicações de *Uncaria tomentosa* são: abscesso, alergias, artrite, asma, bursites, cancro, contraceção, fadiga crônica, febres, feridas, fraqueza, hemorragias, inflamações, irregularidades menstruais, limpeza dos rins, prevenção de doenças, reumatismo, úlcera gástrica [21, 25]. Tradicionalmente, tem sido utilizada a casca, por vezes as raízes e as folhas da planta [27]. Dado que a forma de preparação e a dosagem têm variado muito é importante aprofundar a investigação científica sobre esta espécie [26].

As propriedades medicinais de *Uncaria tomentosa* vêm surpreendendo o meio científico diariamente e os estudos realizados já levaram à produção e comercialização de diversos fármacos (Tabela 2).

Tabela 2 – Nome, descrição e laboratório de alguns extratos patenteados à base de *Uncaria tomentosa* [21]

Nome	Descrição	Laboratório
Krallendorm®	Extrato de alcaloides oxindólicos pentacíclicos, obtido por tratamento das cascas com HCl seguido de extração (contém 1,3-1,75% de alcaloides totais sendo ~97% de pentacíclicos)	Immodal Pharmaka G.m.b.H. (Volders, Austria)
Saventaro®	Extrato etanólico das cascas contendo >1,3% de alcaloides oxindólicos pentacíclicos	Immodal Pharmaka G.m.b.H. (Volders, Austria)
C-MED-100®	Extrato aquoso liofilizado obtido por aquecimento das cascas a 90-100°C/24h e livre de substâncias de alto peso molecular (PM>10000) (contém 0,05% de alcaloides e >8% de ésteres carboxialquílicos)	CampaMed Inc. (New York, USA)
Vilcacora™	Extrato aquoso das cascas	Lab. Induquímica SA (Lima, Peru)

1.4 Caracterização química e propriedades farmacológicas da *Uncaria tomentosa*

De acordo com Laus e cols. [28], é pouco provável que uma única substância ou um grupo de substâncias seja responsável por todas as atividades descritas para a *Uncaria tomentosa*. Os estudos fitoquímicos com esta espécie têm demonstrado a presença de uma variada gama de metabólitos bioativos: alcaloides, terpenos, glicosídeos e flavonoides [12, 28-30].

1.4.1 Alcaloides

Os alcaloides formam um grupo heterogêneo de substâncias orgânicas que incluem na sua fórmula molecular carbono, oxigênio, hidrogênio e nitrogênio, geralmente sob a forma de amina [31]. Na *Uncaria tomentosa* os alcaloides são na sua maioria do tipo indólico e oxindólico. As diversas tentativas para avaliar o potencial terapêutico dessa espécie levaram à descoberta de dois tipos de alcaloides com um padrão diferente: os alcaloides oxindólicos tetracíclicos (TOA = *Tetracyclic Oxindole Alkaloid*) e os pentacíclicos (POA = *Pentacyclic Oxindole Alkaloid*) [17]. Testes farmacológicos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os POA presentes na *Uncaria tomentosa* são os principais responsáveis pela sua propriedade imunoestimulante [12] e atualmente são

considerados como marcadores químicos da planta [32]: especiofilina, mitrafilina, uncarina F, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina (Figura 3). Esses alcaloides não são característicos da espécie *Uncaria tomentosa*, uma vez que são encontrados em espécies do gênero *Mitragyna* (exemplo: *Mitragyna hirsuta*), além de outras espécies do gênero *Uncaria* como *U. Canescens*, *U. Glabatra*, *U. Attenuata*, *U. Guianensis* entre outras [13, 33]. A mitrafilina, cujo nome IUPAC é methyl (1S,4aS,5aS,6R,10aR)-1-methyl-2'-oxospiro[1,4a,5,5a,7,8,10,10a-octahydropyrano[3,4-f]indolizine-6,3'-1H-indole]-4-carboxylate, já demonstrou atividade antitumoral [34] e anti-inflamatória [35].

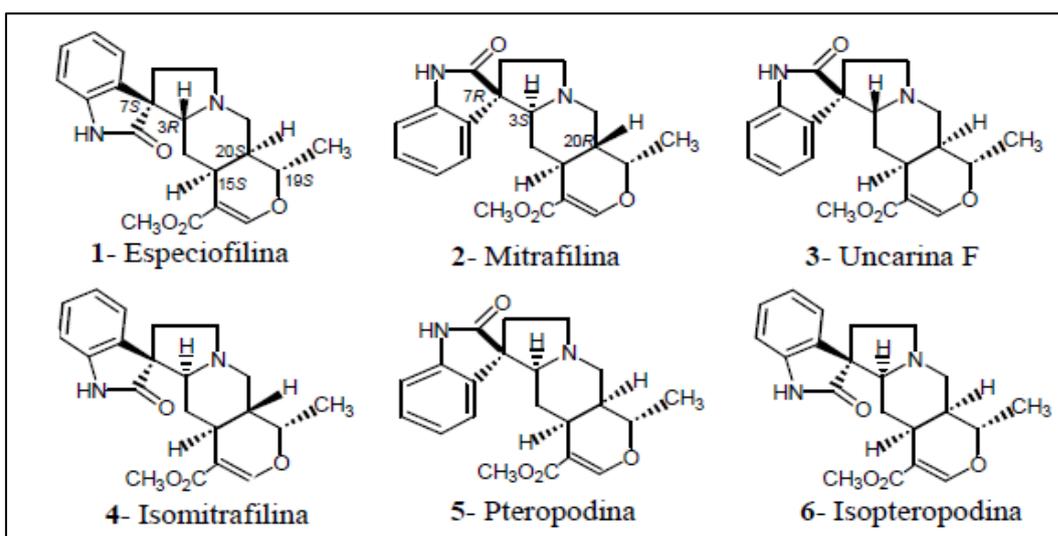


Figura 3. Alcaloides oxindólicos pentacíclicos identificados na *Uncaria tomentosa*

Os TOA, os quais não possuem atividade imunoestimulante, podem coexistir eventualmente com os POA [28]. Entre eles, citam-se a rincofilina, isorincofilina, corinoxeína e isocorinoxeína (Figura 4). Nas folhas e raízes das plantas destes também foram encontradas pequenas quantidades de alcaloides indólicos tetracíclicos [36], tais como a dihidrocorinanteína, hirsuteína, hirsutina e corinanteína (Figura 5).

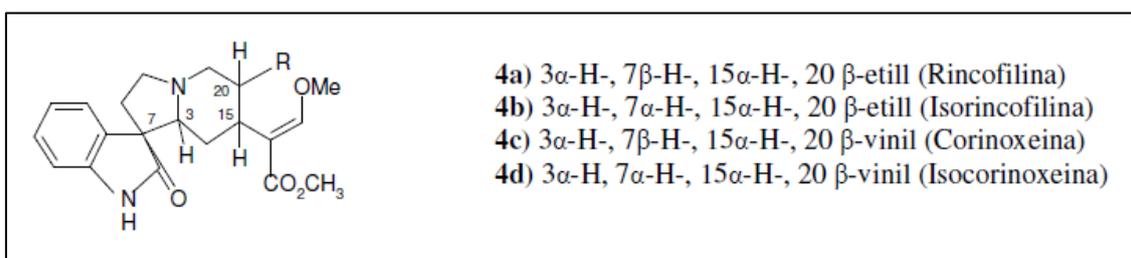


Figura 4. Alcaloides oxindólicos tetracíclicos identificados na *Uncaria tomentosa*

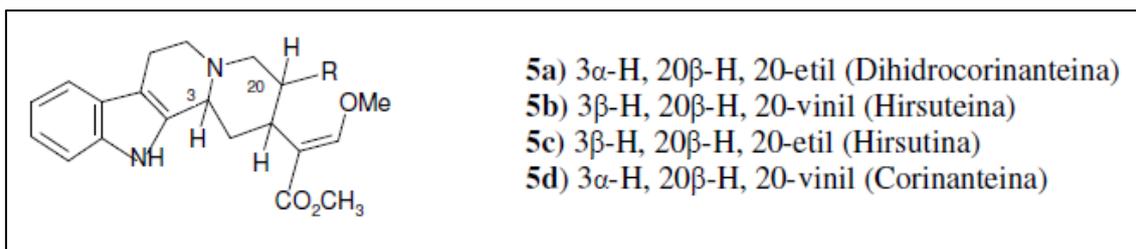


Figura 5. Alcaloides indólicos tetracíclicos identificados na *Uncaria tomentosa*

A *Uncaria tomentosa* também possui pequenas quantidades de outros alcaloides indólicos pentacíclicos, com estruturas rearranjadas [28]. São eles: tetrahydroalstonina e isoajmalicina (Figura 6).

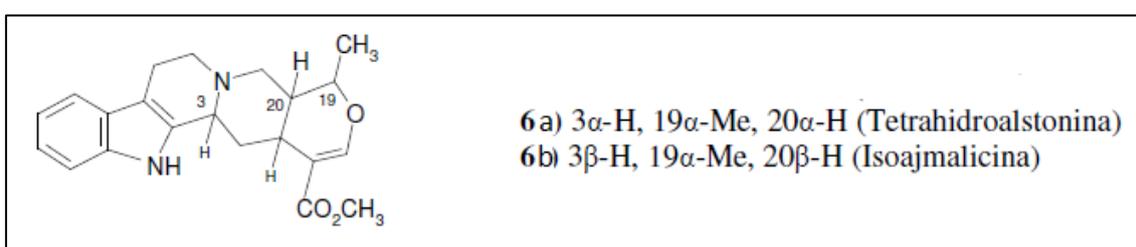


Figura 6. Alcaloides indólicos pentacíclicos identificados na *Uncaria tomentosa*

A distribuição desses diversos tipos de alcaloides nas diferentes partes da planta foi relatada por diversos pesquisadores, conforme resumido na Tabela 3.

Tabela 3 – Natureza química e distribuição dos alcaloides presentes na *Uncaria tomentosa* [12, 36, 37]

	Alcaloides Pentacíclicos			Alcaloides Tetracíclicos		
	Nome	Fig.	Origem	Nome	Fig.	Origem
Alcaloides Oxindólicos	Especiofilina	3.1	C, R, F	Rincofilina	4a	R, F, Fl
	Mitrafilina	3.2	C, R, F	Isorincofilina	4b	R, F
	Uncarina F	3.3	C, R, F	Corinoxeína	4c	R, F
	Isomitrafalina	3.4	C, R, F	Isocorinoxeína	4d	R, F
	Pteropodina	3.5	C, R, F			
	Isopteropodina	3.6	C, R, F			
Alcaloides Indólicos	Tetrahydroalstonina	6a	F	Dihidrocorinanteína	5a	R, F
	Isoajmalicina	6b	F	Hirsuteína	5b	R, F
				Hirsutina	5c	R, F
				Corinanteína	5d	R, F

C - Casca do caule; R - Casca da raiz; F – Folhas; Fl - Flores

Os alcaloides oxindólicos e os indólicos, que são minoritários na espécie, também têm sido relatados como possuindo atividades farmacológicas específicas, como hipotensiva e vasodilatadora, inibidor da agregação plaquetária e trombose cerebral, atividade imunoestimulante e citotóxica [12, 25, 38].

1.4.2 Terpenoides

Os terpenoides, também conhecidos como terpenos, constituem uma grande variedade de substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (Figura 7).

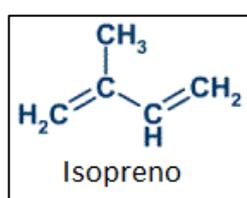


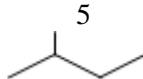
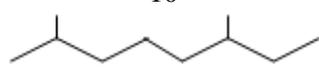
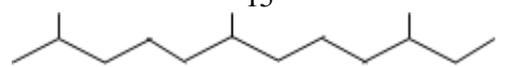
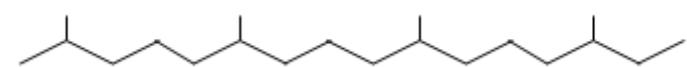
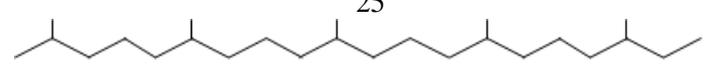
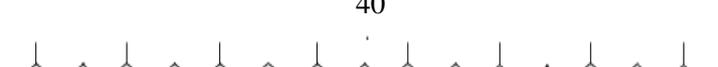
Figura 7. Estrutura molecular do isopreno

Esta classe de substâncias é formada pela condensação de um número variável de unidades isoprénicas, conforme apresentado na tabela 4. Normalmente, estas moléculas apresentam policiclos de carbonos e funcionalizam-se com a incorporação de oxigénio, resultando em álcoois, ésteres, cetonas e lactonas.

Os terpenos apresentam uma vasta gama de propriedades farmacológicas, como atividades quimioprotetoras, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antihiperlicémicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias [39].

A espécie *Uncaria tomentosa* contém principalmente triterpenos derivados do ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido quinóvico. Os três derivados de ácidos são representantes dos triterpenos (30 carbonos), e o último normalmente ocorre na forma glicosilada (Figura 8) [12]. Estes encontram-se presentes principalmente nas cascas do caule e na raiz. Isolados de *U. tomentosa*, o glicosídeo 8i apresentou atividade anti-inflamatória [40] e o glicosídeo 8l apresentou atividade antiviral [41]. Além disso, também foram isolados da *U. tomentosa* para além do ácido ursólico, o ácido oleanólico, o ácido florídrico e três outros triterpenos poli-oxigenados derivados das estruturas do ácido ursólico ou quinóvico (Figura 9) [40, 42].

Tabela 4 – Condensação de unidades isoprênicas na formação de terpenoides [43]

Unidades isoprênicas	Nº de átomos de carbono	Nome
1	5 	hemiterpenos
2	10 	monoterpenos
3	15 	sesquiterpenos
4	20 	diterpenos
5	25 	sesterpenos
6	30 	triterpenos
8	40 	tetraterpenos
n	n	polisoprenos

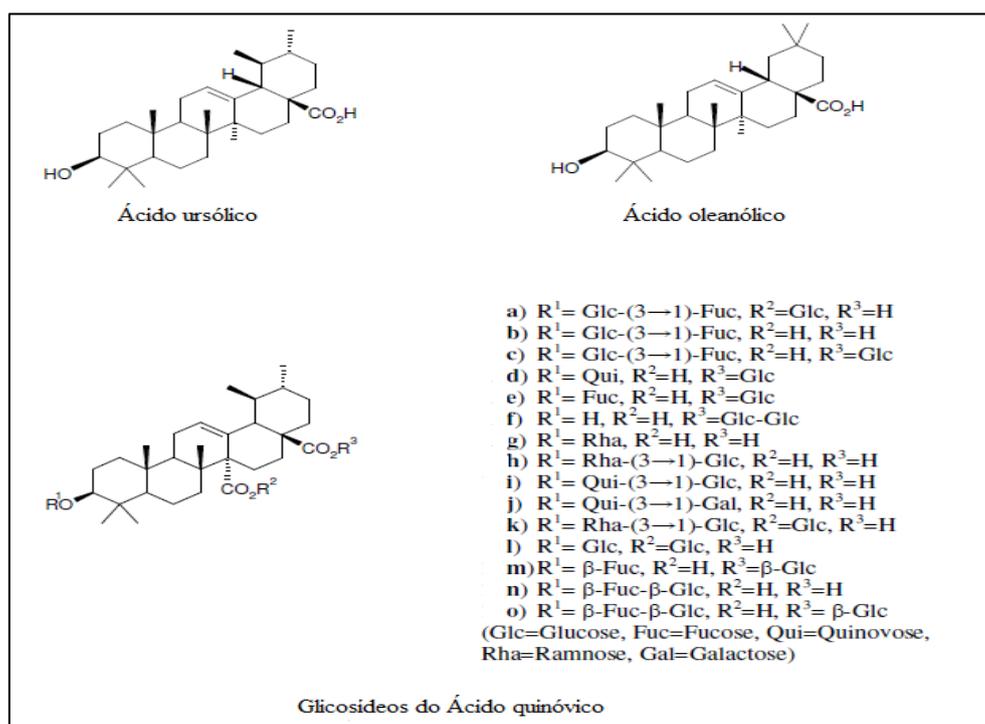


Figura 8. Ácidos triterpênicos isolados de *Uncaria tomentosa*

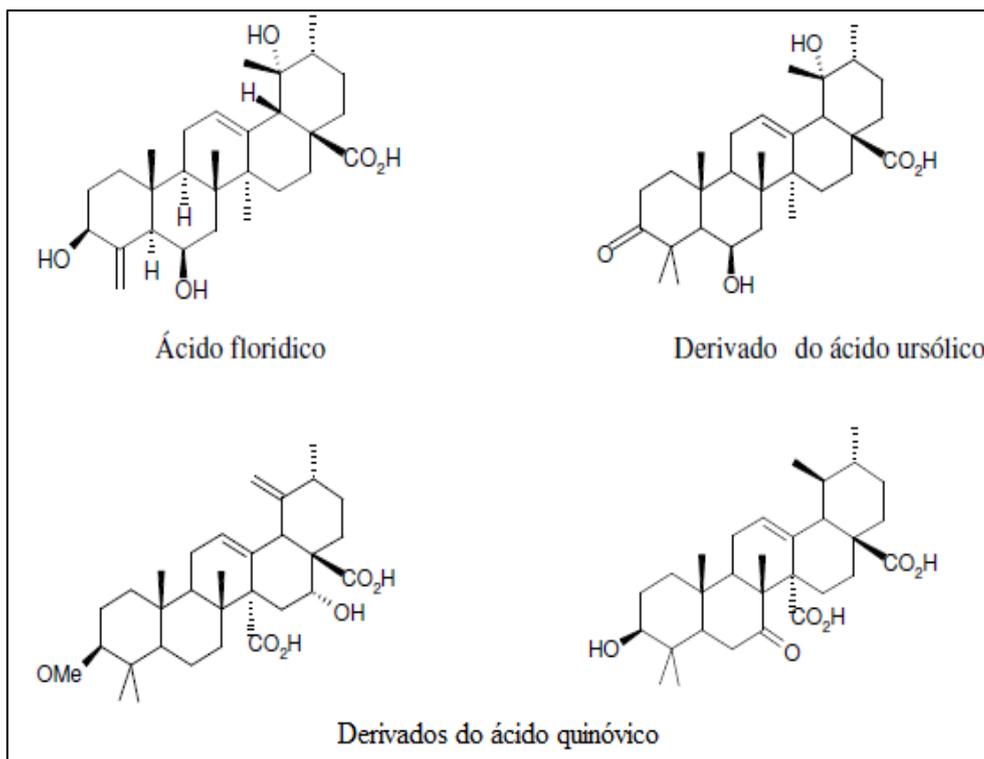


Figura 9. Outros triterpenoides isolados de *Uncaria tomentosa*

1.4.3 Polifenóis

Os compostos polifenólicos pertencem a uma classe de substâncias que inclui uma grande diversidade de estruturas, com graus variáveis de complexidade, possuindo pelo menos um anel aromático com pelo menos um hidrogénio substituído por um grupo hidroxilo [44]. Esses compostos podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal, conforme representado na tabela 5, onde C6 corresponde ao anel benzénico e CX à cadeia substituinte com X átomos de carbono. Das substâncias polifenólicas, os flavonoides representam um dos grupos mais importantes e diversificados encontrados nos produtos naturais. São compostos amplamente distribuídos no reino vegetal e estão presentes na maioria das plantas, concentrados em folhas, frutos, sementes, cascas, raízes e flores [45].

Tabela 5 – Classificação das substâncias polifenólicas de acordo com o esqueleto carbônico básico [44]

Esqueleto básico	Classe de compostos polifenólicos
C6	fenóis simples, benzoquinonas
C6-C1	ácidos fenólicos
C6-C2	acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6-C3	fenilpropanóides: ácidos cinâmicos, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6-C4	naftoquinonas
C6-C1-C6	xantonas
C6-C2-C6	estilbenos, antraquinonas
C6-C3-C6	flavonoides e isoflavonoides
(C6-C3) ₂	lignanas
(C6-C3-C6) ₂	diflavonoides
(C6) _n	melaninas vegetais
(C6-C3) _n	ligninas
(C6-C1) _n	taninos hidrolisáveis
(C6-C1-C6) _n	taninos condensados

Os flavonoides são encontrados em diversas formas estruturais, onde o esqueleto básico consiste em um núcleo fundamental, constituído de 15 átomos de carbono arranjados em três anéis (C6-C3-C6), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um pirano (ciclo oxicarbonônico de 6 membros) acoplado ao anel A (Figura 10).

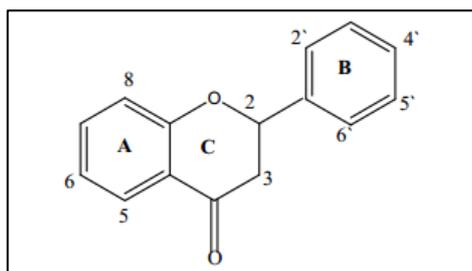


Figura 10. Núcleo fundamental de flavonoides

Mais de 8.000 flavonoides já foram identificados. Aqueles de origem natural apresentam-se frequentemente oxigenados e, na maioria dos casos, suas moléculas encontram-se conjugadas com açúcares [46]. A unidade do flavonoide considerada sem o glicosídeo conjugado é conhecida como aglicona. Essas substâncias são subdivididas

nas principais classes: flavonas, chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonóis, isoflavonas, antocianidinas e flavan-3-ols (Figura 11). A diversidade estrutural dos flavonoides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações no esqueleto carbônico básico, promovidas por reações de alquilação, glicosilação ou oligomerização [45].

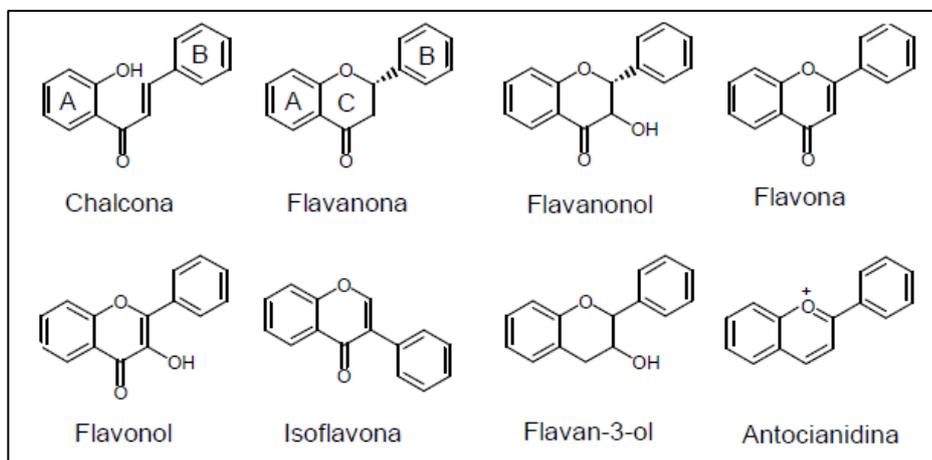


Figura 11. Esqueletos básicos de flavonoides

Inúmeras propriedades farmacológicas têm sido comprovadas para essa classe de polifenóis, tais como atividade antioxidante, anti-inflamatória, estrogênica, entre outras, o que lhes confere uma significativa importância terapêutica [29, 47, 48]. Foram identificadas na casca de *Uncaria tomentosa*, catequina, epicatequina, derivados de proantocianidinas (cinchonaina Ia e Ib), rutina, ácido cafeico, ácido clorogênico (Figura 12), entre outros, que apresentam atividade anti-inflamatória e antioxidante [29, 41, 49, 50]. O ácido clorogênico, cujo nome IUPAC é (1S,3R,4R,5R)-3-[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy-1,4,5-trihydroxycyclohexane-1-carboxylic acid, foi identificado em diversas espécies de plantas medicinais, mas pode-se destacar sua presença nas espécies *Coffea arabica* e *Pyrus malus*, vulgarmente conhecidas como café e maçã, respectivamente [51, 52].

Além disso, da *Uncaria guianensis*, outra espécie do gênero *Uncaria* encontrada na Amazônia brasileira, foi isolada a campferitina (Figura 13), cujo nome IUPAC é 5-hydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-3,7-bis[[2-(2S,3R,4R,5R,6S)-3,4,5-trihydroxy-6-methoxy-2-yl]oxy]chromen-4-one. Esse flavonóide pertencente à classe dos flavonóis, é formado pela aglicona campferol diglicosilado nas posições 3 e 7 do sistema pela rhamnose, e apresenta atividade hipoglicemiante, antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana [53-55]. A campferitina é um dos componentes

maioritários do gênero *Bauhinia* e é considerada marcador químico da espécie *Bauhinia forficata* [56].

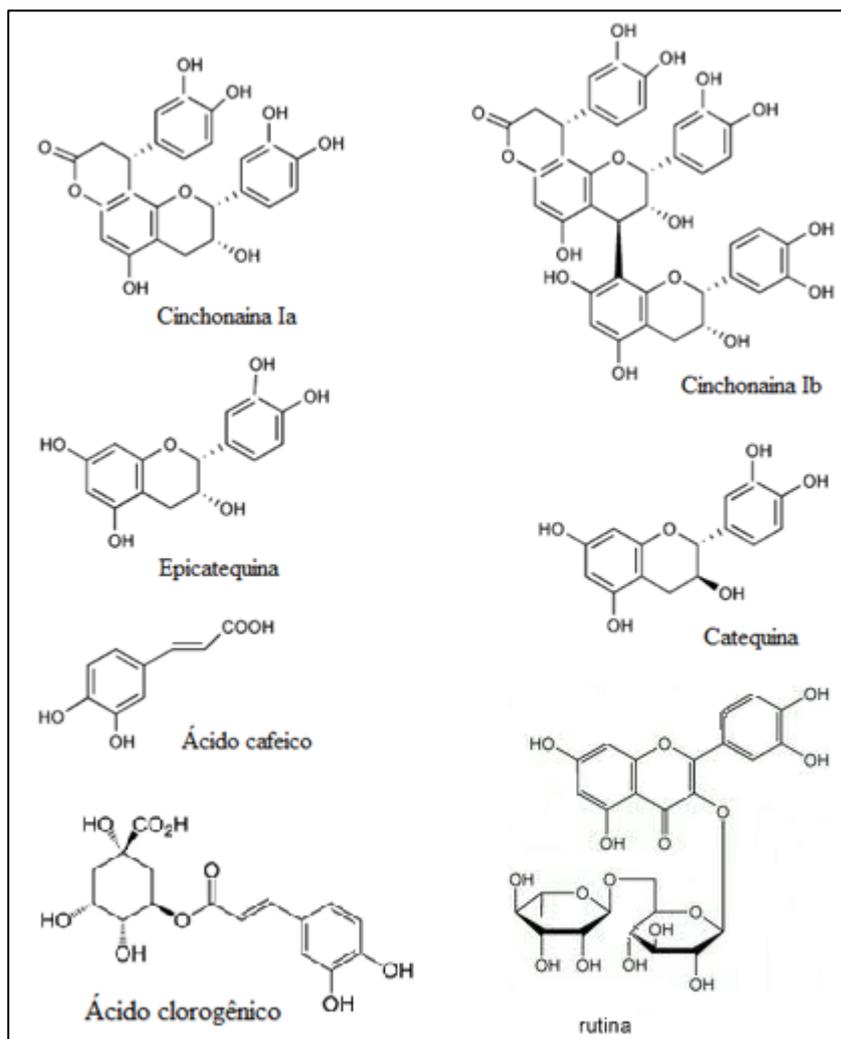


Figura 12. Substâncias fenólicas identificadas em *Uncaria tomentosa*

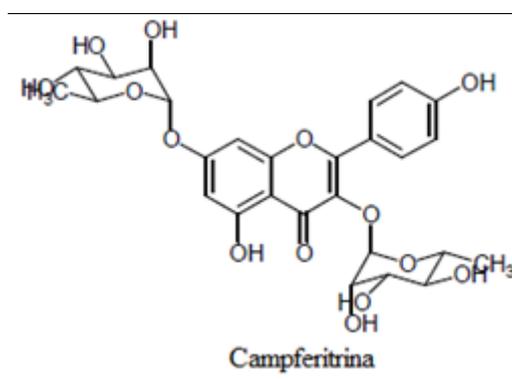


Figura 13. Principal flavonoide isolado de *Uncaria guianensis*

1.5 Influência de diferentes fatores na produção de metabólitos secundários

Devido a variações temporais e espaciais, ocorrem alterações em diferentes níveis no conteúdo total, bem como nas proporções relativas de metabólitos secundários em plantas. Apesar do controle genético natural, a expressão de metabólitos pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos [57, 58].

Dos fatores que exercem influência sobre a produção e variação dos metabólitos secundários nas espécies vegetais, pode-se citar: a sazonalidade, radiação ultravioleta, composição atmosférica, altitude, temperatura, idade e disponibilidade de nutrientes. Além disso, alguns desses fatores apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influenciar em conjunto o metabolismo vegetal das plantas [59]. Entre estes, a sazonalidade é um dos mais relevantes. A época em que uma planta medicinal é colhida pode afetar o conteúdo e mesmo a composição dos seus princípios ativos, que não devem manter-se constante durante todas as estações do ano. A literatura relata variações no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, entre eles, os alcaloides e flavonoides [60, 61]. Numerosos estudos mostram que a concentração de metabólitos nas plantas pode variar consideravelmente durante o ciclo dia/noite [62]. A idade e o desenvolvimento da espécie também são fatores importantes na quantidade total de metabólitos produzidos e também nas proporções relativas entre eles [63].

A influência da temperatura e da radiação ultravioleta na produção de metabólitos secundários foi reportada no estudo de Grace e cols. [64] que demonstra o aumento nas concentrações de ácido clorogênico e de antocianinas em folhas de *Mahonia repens*, quando expostas a baixas temperaturas [64]. Em contrapartida, foi demonstrada a existência de uma relação bem estabelecida entre o aumento na intensidade de radiação solar e o aumento na produção de compostos fenólicos, como flavonoides e antocianinas. Isso ocorre devido à proteção contra radiação ultravioleta proporcionada por esses metabólitos ao absorvê-la e/ou dissipá-la [65].

Por estas razões, são necessários elevados padrões de produção e controle de qualidade dos medicamentos originados a partir de plantas medicinais, com uma especificação clara da composição química [66].

1.6 Controle de qualidade do fármaco vegetal

Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte dos fármacos continua a ser obtida a partir de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade em obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, seja pela inviabilidade econômica. A eficácia de um medicamento à base de plantas depende, entre outras coisas, da qualidade do material vegetal e do conhecimento dos princípios ativos responsáveis pelas suas propriedades terapêuticas [67].

Os ensaios de qualidade de matérias-primas vegetais aconselhados nas farmacopeias e em diferentes literaturas da área objetivam a verificação da identidade botânica e pureza do material, da normalização dos procedimentos de preparação dos extratos e a caracterização dos constituintes químicos da espécie, especialmente daqueles envolvidos na atividade farmacológica, bem como o doseamento destes.

Os desenvolvimentos alcançados nas técnicas de caracterização, particularmente nas técnicas cromatográficas e nas técnicas de elucidação estrutural permitem obter rapidamente informações preliminares sobre os constituintes químicos presentes nos extratos vegetais complexos, como o reconhecimento de moléculas já conhecidas, que de outro modo requereria investimentos em tempo e recursos materiais para os processos de isolamento e identificação [68].

A cromatografia em camada fina (TLC) é amplamente utilizada em análises de rotina laboratorial, por ser uma técnica rápida, eficiente e de baixo custo [69]. Esse método é largamente utilizado em análises qualitativas aplicadas ao controle de qualidade de plantas medicinais, já que avalia o resultado de um processo de separação e fornece informações sobre a composição química da planta com uma boa precisão. Este método também possibilita realizar análises quantitativas.

Para além da TLC usada como técnica de rotina no laboratório, outras técnicas mais sofisticadas são correntemente utilizadas para quantificar os metabólitos de origem vegetal, como a cromatografia em fase gasosa (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Em alguns casos, estas são acopladas a métodos de detecção adequados (técnicas hífenizadas), como a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectroscopia de massas (HPLC-MS). Para separar metabólitos não voláteis e mais polares a partir de misturas complexas, a técnica HPLC tem sido a mais amplamente utilizada, já que permite obter graus adequados de pureza e rendimento.

Nas duas últimas décadas, esta técnica tem apresentado um enorme impulso no isolamento e purificação de moléculas oriundas de vegetais, aplicadas ao desenvolvimento de novos fármacos e também na aplicação para caracterizar, validar e controlar a matéria-prima vegetal [70]. Neste contexto, as análises de HPLC e HPLC-MS (assim como outras técnicas cromatográficas) têm como objetivo identificar o conteúdo químico dos extratos, por intermédio de medidas relativas aos ‘marcadores’ químicos ali presentes. Daí, além de fornecer suporte à identificação botânica correta, também contribui para assegurar níveis quantitativos dos metabólitos que darão suporte à eficácia terapêutica da espécie. Como ferramenta de qualidade, além da matéria-prima vegetal, estes critérios aplicam-se em produtos intermediários (como os extratos secos comerciais) e aos farmacêuticos finais [71].

No caso da espécie *Uncaria tomentosa*, existe uma grande variedade de estudos publicados envolvendo as etapas de fracionamento, isolamento e/ou purificação utilizando o HPLC. Aqui pode-se destacar os temas que incidem na otimização das condições de separação de substâncias e/ou marcadores químicos que estão relacionados à eficácia da planta medicinal.

A tabela 6 apresenta um resumo das condições de separação de substâncias e/ou marcadores químicos da *Uncaria tomentosa* por HPLC. Neste caso, os estudos têm se concentrado nas análises das cascas desta espécie, que são a matéria-prima utilizada mais frequentemente na medicina popular. Este fato deve-se, basicamente, à presença dos alcaloides [33, 72]. Complementarmente, outros estudos debruçam-se sobre as substâncias fenólicas contidas neste substrato. Todavia, a utilização das cascas e o alto grau de comercialização juntamente com a colheita indiscriminada da espécie têm causado uma diminuição alarmante no seu habitat nativo [73]. Este fato tem conduzido os estudos atuais ao possível aproveitamento das folhas cujo conteúdo químico ainda não se encontra devidamente caracterizado. Segundo Montoro e cols. [74] as folhas contêm os mesmos alcaloides oxindólicos pentacíclicos das cascas, porém em quantidades mais baixas (com excessão da mitrafilina e isomitrafilina). Por outro lado, o conteúdo fenólico das folhas ainda não foi apropriadamente investigado até o momento.

Tabela 6 – Determinação de substâncias e/ou marcadores químicos da *Uncaria tomentosa* por HPLC

Equipamento / Coluna	Condições	Substâncias (parte da planta)	*Ref.
HPLC: Classe 10 Shimadzu (Tóquio, Japão) composto por interface (FCV-10 AL), sistema de bomba (LC-10AD), amostrador automático com <i>loop</i> de 20 µl (SIL-10A), detetor por arranjo de díodo (DAD) (SPD-10A) e controle pelo software CLASS-VP. Coluna: Gemini (250 x 4,0 mm i.d., 5 µm) com fase RP-18 acoplada a uma pré-coluna Lichrosorb C-18.	Fase móvel composta de A (ácido trifluoroacético 0,1%, v/v) e B (metanol:ácido:trifluoroacético (99,9:0,1, v/v) seguindo um gradiente de: 30-40% de B em 10 minutos, 40-60% de B em 8 minutos, 60% de B por 4 minutos e 60-30% de B em 6 minutos. Fluxo: 0,9 ml/min; detecção: 325 nm; forno: 23±1 °C	Ácido clorogênico; ácido cafeico; rutina (cascas e raízes)	[50]
HPLC: Gilson equipado com detetor por arranjo de díodo (DAD). Coluna: Waters ODS-2 (250 x 4,6 mm i.d., 5 µm).	Fase móvel composta de A (metanol) e B (ácido fórmico 5%, v/v) seguindo um gradiente de: 5-15% de A em 10 minutos, 15-35% de A em 25 minutos, 35-50% de A em 15 minutos e 50-100% de A em 10 minutos. Fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 280 e 320 nm	Ácido cafeico; proantocianidinas; catequina; epicatequina; ácido vanílico; ácido siríngico; ácido elágico; campferol (cascas)	[29]
HPLC: Merck-Hitachi composto por sistema de bomba (L-6200), detetor por arranjo de díodo (DAD) (L-4500), interface (D-6000) e injetor com <i>loop</i> de 200 µl Rheodyne (9125). Coluna: LiChroCart (125 x 4,0 mm i.d., 5 µm) com fase LiChrospher 100 RP-18.	Sistema 1: Fase móvel composta de acetonitrilo-éter <i>tert.</i> butil metílico-tampão fosfato 10 mM (34:1:65), pH 6,7, modo isocrático. Fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 245 nm; forno: 12 °C. Sistema 2: Fase móvel composta de acetonitrilo-tampão fosfato 10 mM (45:55), pH 7,0. Fluxo: 1,3 ml/min; detecção: 245 nm; forno: 80 °C.	Rincofilina; isorincofilina; especiofilina; mitrafilina; uncarina f; isomitrafilina; pteropodina; isopteropodina (cascas)	[75] *[76] *[77]

*Mesmas condições de análise, com pequenas variações no equipamento e/ou coluna.

Tabela 6 (continuação) – Determinação de substâncias e/ou marcadores químicos da *Uncaria tomentosa* por HPLC

Equipamento / Coluna	Condições	Substâncias (parte da planta)	*Ref.
<p>HPLC: Merck-Hitachi composto por sistema de bomba (L-7100), injetor automático (L-7200), detetor por arranjo de díodo (DAD) (L-7450) e interface (D-7000).</p> <p>Coluna: LiChroCart (250 x 4,0 mm i.d., 5 µm) com fase LiChrospher 100 RP-18 acoplada a uma pré-coluna LiChroCart (4,0 x 4,0 mm i.d., 5 µm) com fase LiChrospher 100 RP-18.</p>	<p>Fase móvel composta de A (tampão fosfato 10 mM pH 6,6) e B (metanol:acetonitrilo (1:1; v/v) seguindo um gradiente de: 60-30% de A em 30 minutos.</p> <p>Fluxo: 1,0 ml/min; detecção: 245 nm; forno: 21 °C</p>	<p>Especiofilina; mitrafilina; uncarina f; isopteropodina (cascas)</p>	<p>[78]</p>
<p>HPLC: 500E Waters com injetor automático e detetor por arranjo de díodo (DAD) HP series 1100.</p> <p>Coluna: LiChroCart (125 x 4,6 mm i.d., 5 µm) com fase LiChrospher 100 RP-18.</p>	<p>Fase móvel composta de acetonitrilo-solução aquosa de acetato de amônio 30 mM (45:55), pH 6,8-7,0, modo isocrático.</p> <p>Fluxo: 1,0 ml/min; volume: 10 µl; detecção: 245 nm; forno: 60 °C</p>	<p>Especiofilina; mitrafilina; uncarina f; isomitrafilina; pteropodina; isopteropodina (cascas)</p>	<p>*[79] [80]</p>

*Mesmas condições de análise, com pequenas variações no equipamento e/ou coluna.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

Face ao exposto anteriormente e considerando que estudos de investigação científica aplicados à análise de substâncias fenólicas em amostras de folhas de *Uncaria tomentosa* não estão descritos até o momento, o principal propósito desse trabalho foi analisar o perfil e determinar o teor de polifenóis e alcaloides por HPLC em amostras de folhas de *Uncaria tomentosa* recolhidas em diferentes localidades do Brasil, como auxílio para o controle de qualidade desta matéria-prima vegetal.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar a influência de dois métodos de extração distintos na composição de alcaloides e de fenóis a partir das folhas de *U. tomentosa* provenientes de distintas origens do país;
- ✓ Determinar o conteúdo de alcaloides em folhas de *U. tomentosa* provenientes de distintas origens do país e comparar com o referenciado na literatura;
- ✓ Determinar o conteúdo de fenóis em folhas de *U. tomentosa* provenientes de distintas origens do país;
- ✓ Verificar a presença do flavonol campferitrina nas folhas de *U. tomentosa* provenientes de distintas origens do país;
- ✓ Caracterizar as estruturas das substâncias quantificadas em frações representativas dos extratos, por técnicas cromatográficas (HPLC-MS), utilizando substâncias de referência.

3. Materiais e Métodos

3.1 Solventes, reagentes, substâncias de referência e materiais laboratoriais

Foram utilizados os seguintes solventes e reagentes: sulfato de sódio PA (> 99%), acetona PA (> 99,5%), clorofórmio PA (> 99,8%), etanol PA (> 99,5%), hexano PA (> 95%), hidróxido de amônio PA (> 28%), ácido acético glacial PA (> 99,7%), ácido fórmico PA (> 98%), metanol grau HPLC (> 99,9%), acetato de amônio grau HPLC (> 97%), acetato de etilo grau HPLC (> 99,8%), acetonitrilo grau HPLC (> 99,9%), (todos Tedia, Brasil); ácido clorídrico PA (> 37%) (Merck, Alemanha), reagente cromatográfico NP-PEG (1% em MeOH de NP (2-aminoetil-difenilborinato) - (Sigma-Aldrich, Alemanha) + 5% em EtOH de PEG (polietilenoglicol) - (Tedia, Brasil) e reagente cromatográfico Dragendorff-Nitrito de sódio, grau PA (Tedia, Brasil).

Para a análise foram utilizados os seguintes padrões de referência: ácido clorogênico (> 95%), lote: SLBB6914V (Sigma-Aldrich, Alemanha), mitrafilina, isopteropodina, UTFa (Fração Alcaloídica da *Uncaria tomentosa*) e campferitrina. Os alcalóides mitrafilina e isopteropodina, assim como o extrato certificado de alcalóides (UTFa, contendo seis POA) foram obtidos em estudos prévios do laboratório [79, 81], a partir da partição ácido-base [32] do extrato etanol/água da casca do caule de *U. tomentosa* coletada em Cruzeiro do Sul, AC, Brasil [19]. Da mesma maneira, o flavonoide campferitrina foi obtido a partir do extrato etanólico das folhas de *Uncaria guianensis* [55].

Foram utilizados os seguintes materiais: folha de alumínio (fase estacionária para TLC) com sílica gel 60 F₂₅₄ (espessura 0,2 mm), ref. 1.05554.0001 (Merck, Alemanha), membranas de éster de celulose com poro 0,22 µm e diâmetro 47 mm, ref. GSWP04700 (Millipore, EUA), filtros para seringas MINISART® com membrana de celulose regenerada com poro 0,20 µm e diâmetro 15 mm, ref. 512-3276 (Sartorius, Alemanha), microseringa de 25 µl ref. 80465 (Hamilton, EUA), pipetas automáticas de alta precisão: de 100-1000 µl, 10-100 µl e 0,5-10 µl (Boeco, Alemanha).

3.2 Equipamentos

Foram utilizados os seguintes equipamentos: balança analítica BP2215 (máx.: 220 g; d = 0,0001 g) – (Sartorius, Alemanha); centrífuga Excelsa Baby II 206-R (velocidade 3000 rpm) – (Fanem, Brasil), HPLC-DAD Classe 10 (Shimadzu, Japão) composto por

bomba binária (LC-10AD), amostrador automático com *loop* de 20 µl (SIL-10AD), degaseificador a vácuo (DGU-12A), detetor por arranjo de díodo (DAD) com múltiplos comprimentos de onda (SPD-M10A), forno para coluna (CTO-10A), interface (SCL-10A) e aquisição e controle pelo *software* CLASS-VP; exsicador a vácuo H420561003 – (Sanplatec, Japão); destilador Pilsen MB1004 - (Marte, Brasil); espectrofotômetro de UV/Vis CX-20 (utilização a comprimento de onda de 254 nm e 365 nm) – (Spectroline, EUA); cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado à espectrometria de massas (UPLC-DAD-MS) Prominence-Nexera (Shimadzu, Japão) composto por bomba binária de alta pressão (LC-30AD), amostrador automático com *loop* de 20 µl (SIL-30AC), degaseificador a vácuo (DGU-20As), detetor por arranjo de díodo (DAD) com múltiplos comprimentos de onda (SPD-M20A), detetor espectrométrico com quadrupolo de massas MS ZQ (Micromass-Waters) com ionização por “electrospray”, forno para coluna (CTO-30A), interface (CBM-20A) e aquisição e controle pelo *software* CLASS-VP; evaporador rotatório R-114 e B-480 – (Büchi, Suíça); liofilizador L101 – (Liobras, Brasil); medidor de pH pH300M – (Analyser, Brasil); purificador Milli-Q Simplicity – (Millipore, EUA); gerador de ultrassom UCC-1860A (potência de 154W) – (Unique, Brasil).

3.3 Material vegetal

As cinco amostras de folhas de *Uncaria tomentosa* utilizadas nesse trabalho foram colhidas ou adquiridas em três diferentes localidades do Brasil: município de Cruzeiro do Sul, Acre (AC) (7°40' S, 72°38' W; 192 m elevação); Rio Branco, Acre (AC) e Belém, Pará (PA). Os três espécimes de Cruzeiro do Sul foram recolhidas entre agosto e outubro de 2000. O botânico Dr. J. Revilla Cardenas participou numa das recolhas tendo confirmado a identificação das amostras. As exsicatas (amostra do vegetal seca acompanhada de rótulo contendo informações sobre a espécie e local de coleta) foram depositadas no herbário da Universidade Federal do Acre e catalogadas sob os números 15.635, 15.636 e 15.637 [19]. A amostra do Pará foi adquirida no Mercado Municipal de Belém em 2012 pelo Dr. A.C. Siani e a de Rio Branco foi recolhida no Campo Experimental da Embrapa, em 2004. Todas as amostras recebidas foram previamente secas e foram moídas em liquidificador industrial com copo de aço inox previamente lavado e seco. O material foi peneirado em peneiros analíticos com um diâmetro de

partículas de 0,5-1,0 mm. Na tabela 7 estão apresentados os principais dados das amostras utilizadas.

Tabela 7 – Dados sobre as amostras de folhas secas de *Uncaria tomentosa* utilizadas no trabalho

Amostra	Código	Origem (GPS)	Recolha	Depósito (exsicata)	Coloração das folhas secas
UT1 - Cruzeiro do Sul	UT-1	Cruzeiro do Sul, AC (7°40' S, 72°38' W; 192 m elevação)	Agosto e outubro de 2000	15.635	Castanho claro
UT2 - Cruzeiro do Sul	UT-2	Cruzeiro do Sul, AC (7°40' S, 72°38' W; 192 m elevação)	Agosto e outubro de 2000	15.636	Castanho claro
UT3 - Cruzeiro do Sul	UT-3	Cruzeiro do Sul, Acre (7°40' S, 72°38' W; 192 m elevação)	Agosto e outubro de 2000	15.637	Castanho claro
UT - Belém	UT-4	Mercado municipal “Ver-o-Peso”, Belém, PA	2012	-----	Verde claro
UT - Rio Branco	UT-5	Rio Branco, AC	2004	-----	Castanho claro

3.4 Determinação do perfil das amostras por TLC

As análises efetuadas por cromatografia em camada fina (TLC) foram realizadas em folha de alumínio de sílica gel, onde foram aplicadas manualmente alíquotas de 10 µl de cada fração e das substâncias de referência, utilizando-se microsseringa. Foram aplicadas bandas de 1,0 cm cada, com um espaçamento de 0,5 cm entre elas, e reservando-se 1,0 cm de base e com um percurso de 8,0 cm.

Para a monitorização dos fenóis, o eluente utilizado como fase móvel foi preparado pela seguinte mistura: acetato de etilo / ácido fórmico / ácido acético glacial / água destilada, na proporção de 100:11:11:26 [82]. A visualização das bandas foi efetuada por exposição à luz UV a 365 nm com revelação, através de aspensão de uma solução 1% em metanol do reagente NP, seguido de aspensão de uma solução 5% em etanol do reagente PEG [82].

Para a monitorização dos alcaloides, o eluente utilizado como fase móvel foi preparado pela seguinte mistura: acetato de etilo / hexano, na proporção de 95:5 [33]. A visualização das bandas foi efetuada por exposição à luz UV a 254 nm ou por exposição à luz visível com revelação química, pela aspensão sequencial com o reagente Dragendorff e uma solução aquosa 10% de nitrito de sódio [82].

3.5 Obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Uncaria tomentosa*

Para as amostras UT-1, UT-2, UT-3 e UT-4, os extratos foram preparados segundo metodologia otimizada por Paixão [83], onde 250 mg do material vegetal seco e moído foi extraído com 8 ml de etanol/água 1:1, sujeito a ultrassons durante 16 minutos à temperatura ambiente, seguido do processo centrifugação durante 3 minutos. O processo foi repetido 5 vezes para cada amostra. Os sobrenadantes reunidos foram filtrados, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida a 37 °C, e os resíduos resultantes foram levados ao exsiccador por 48 horas, e pesados para a determinação do rendimento. Para determinação do perfil cromatográfico por TLC, foram preparadas soluções de concentração 50 mg/ml em MeOH desses resíduos. No caso da amostra UT-5, apenas foi efetuado o procedimento descrito em 3.6.

3.5.1 Partição dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *U. tomentosa*

Uma porção de 50 mg de cada extrato bruto hidroalcoólico (EBH) obtido na extração das amostras UT-1, UT-2 e UT-3, foi solubilizada em 5 ml de MeOH/H₂O 9:1 e extraída sequencialmente com (5 x 5 ml) de n-hexano e (5 x 5 ml) de clorofórmio. As fases orgânicas geradas foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas, evaporadas à pressão reduzida e os materiais resultantes foram pesados, após 48 h em repouso no exsiccador, gerando a ‘fração hexânica’ (FH-EtOH/H₂O) e a ‘fração clorofórmica’ (FC-EtOH/H₂O). A fase hidrometanólica foi filtrada, o solvente evaporado à pressão reduzida, e o resíduo foi mantido no exsiccador por 48 h, gerando a ‘fração hidrometanólica’ (FHM-EtOH/H₂O). Para determinação do perfil cromatográfico por TLC foram preparadas soluções de concentração 10 mg/ml dessas frações em MeOH. O mesmo procedimento foi aplicado às amostras UT-1 e UT-4; contudo, nestes casos, as frações hexânica e clorofórmica geradas foram submetidas a uma extração adicional (EA) com 10 ml de MeOH/H₂O 9:1. Essas amostras foram denominadas de UT-1/EA e UT-4/EA.

3.6 Obtenção dos extratos metanólicos das folhas de *Uncaria tomentosa*

Para as amostras UT-1, UT-2, UT-3, UT-4 e UT-5, os extratos foram preparados segundo metodologia otimizada por Ganzera e cols. [17], onde 7 g do material vegetal seco e moído foram extraídos com 23 ml de metanol com ultrassons durante 10 minutos

à temperatura ambiente seguido de centrifugação por 5 minutos. O processo foi repetido 4 vezes. Os sobrenadantes agrupados foram filtrados, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida a 37 °C, e os resíduos resultantes foram levados ao exsiccador por 48 horas, e pesados para determinação do rendimento. Para determinação do perfil cromatográfico por TLC, foram preparadas soluções de concentração 50 mg/ml em MeOH desses resíduos.

3.6.1 Partição ácido-base dos extratos metanólicos das folhas de *U. tomentosa*

Para as amostras UT-1, UT-2, UT-3, UT-4 e UT-5, foi aplicada a metodologia otimizada por Valente e cols. [32]. Cada extrato bruto metanólico (EBM) foi tratado com uma solução de ácido clorídrico 0,1 M em uma relação de 0,15 ml/mg. A mistura foi sujeita a ultrassons durante 5 minutos e em seguida extraída 3 vezes com volumes equivalentes (ao volume de HCl) de acetato de etilo, gerando a ‘fração ácida’ (FA-MeOH). Após separação das fases, a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e, em seguida, extraída 4 vezes com o mesmo volume de acetato de etilo usado anteriormente, gerando a ‘fração básica’ (FB-MeOH). Ambas FA-MeOH e FB-MeOH foram secas com sulfato de sódio anidro, filtradas, evaporadas à pressão reduzida, e o resíduo foi mantido no exsiccador por 48 h. A monitorização dos fenóis foi realizado por TLC, a partir de soluções de 10 mg/ml em MeOH enquanto a dos alcaloides foi realizada a partir de soluções de 1 mg/ml em MeOH.

3.7 Doseamento do alcaloide mitrafilina em folhas de *Uncaria tomentosa* por HPLC-DAD

As amostras UT-1, UT-2, UT-3, UT-4 e UT-5 foram analisadas por HPLC-DAD, utilizando-se uma coluna LiChrocart (125 x 4,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm) acoplada a uma pré-coluna LiChrocart (4,0 x 4,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm). A fase móvel foi composta por 45% de acetonitrilo grau HPLC e 55% de solução aquosa de acetato de amônio 30 mM, preparada com H₂O grau Milli-Q, após filtração com uma membrana de éster de celulose. A solução final (pH ajustado em 6,8-7,0 com ácido acético glacial 20% v/v) foi posteriormente levada ao banho de ultrassons durante 30 minutos. O método cromatográfico utilizado ao longo do trabalho para análise foi otimizado por Mazzei [79] com sistema isocrático, 20 minutos

de condicionamento da coluna, fluxo de 1,0 ml/minuto, volume de injeção de 10 µl e temperatura do forno de 60 °C. O detetor de arranjo de díodo foi programado para aquisição de dados na gama de comprimentos de onda de 190 a 600 nm e 88 varrimentos/s. A deteção foi efetuada ao comprimento de onda de 245 nm.

Para a quantificação dos alcaloides, a solução mãe do padrão mitrafilina obtido no item 3.1 foi preparada pesando com rigor 1,0 mg do padrão e transferindo-o para um balão volumétrico de 5,00 ml, onde foram adicionados 4 ml de metanol grau HPLC, pré-filtrado em membrana de éster de celulose. Este foi levado ao banho de ultrassom até a completa dissolução; completando-se o volume com o metanol. A solução mãe foi sujeita a ultrassons durante 10 minutos e filtrada em filtros para seringas MINISART®. Por diluição da solução mãe, foram preparadas as soluções padrão de calibração apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 – Procedimento de preparação das soluções padrão de mitrafilina para a reta de calibração

Solução original (mg/ml)	Vol. inicial (ml)	Vol. Final (ml)	Concentração (mg/ml)
0,20	5,00	-	0,20
0,20	1,00	2,00	0,10
0,20	0,50	2,00	0,050
0,20	0,25	2,00	0,025
0,20	0,25	4,00	0,012 ₅
0,012 ₅	1,00	2,00	0,0062 ₅
0,012 ₅	0,50	2,00	0,0031 ₂
0,012 ₅	0,25	2,00	0,0015 ₆
0,012 ₅	0,125	2,00	0,00078 ₁

Todas as soluções padrão foram preparadas com metanol grau HPLC filtrado, foram sujeitas a ultrassons durante 10 minutos e filtradas em filtros para seringas MINISART®, antes de serem injetadas no equipamento. As análises foram feitas em triplicado.

As amostras foram apropriadamente diluídas com metanol grau HPLC filtrado, com o objetivo de obter concentrações finais de 1,0 mg/ml para as FC-EtOH/H₂O e 0,2 mg/ml para as FB-MeOH. Todas as amostras foram levadas ao banho de ultrassons

durante 10 minutos e filtradas em filtros para seringas MINISART[®], antes de serem injetadas no equipamento. As injeções foram feitas em triplicado. A mitrafilina foi identificada por comparação do seu tempo de retenção e do seu espectro de ultravioleta correspondente, com o obtido para a substância de referência. Os resultados foram expressos pela média das áreas dos picos das três injeções. Todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o software *Microsoft Office Excel*.

3.8 Doseamento do ácido clorogênico em folhas de *Uncaria tomentosa* por HPLC-DAD

As amostras UT-1, UT-2, UT-3, UT-4 e UT-5 foram analisadas por HPLC-DAD, utilizando-se uma coluna LiChrocart (250 x 4,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm) acoplada a uma pré-coluna LiChrocart (4,0 x 4,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm). A fase móvel foi preparada a partir de metanol de grau HPLC e água de grau Milli-Q acidificada com ácido fórmico até pH 3, após filtração em membrana de éster de celulose e colocada num banho de ultrassons durante 30 minutos. O método cromatográfico foi baseado na otimização apresentada por Gonçalves e cols. [29] que considera o prévio acondicionamento da coluna com MeOH 5% durante 20 minutos e a eluição das amostras com MeOH/H₂O (H₂O em pH 3; HCOOH) em modo gradiente (5-15% de MeOH durante 10 minutos, 15-35% de MeOH durante 25 minutos, 35-50% de MeOH durante 15 minutos, 50-100% de MeOH durante 10 minutos e 100-5% de MeOH durante 5 minutos num total de 65 minutos). Entre as análises foi utilizado um período de equilíbrio de 15 minutos com MeOH 5%. O fluxo foi de 1,0 ml/minuto, o volume de injeção de 10 µl e a temperatura do forno de 30 °C. O detetor de arranjo de díodo foi programado para aquisição de dados na gama de comprimentos de onda de 190 a 600 nm e 88 varrimentos/s. A monitorização foi realizada à 280 nm (canal A) e 320 nm (canal B).

Para a quantificação dos fenóis, a solução mãe do padrão ácido clorogênico foi preparada pesando com rigor 2,5 mg do padrão e transferindo-o para um balão volumétrico de 5,00 ml, onde foram adicionados 4 ml de metanol grau HPLC, pré-filtrado em membrana de éster de celulose. Este foi levado ao banho de ultrassom até a completa dissolução e completou-se o volume com o metanol. A solução mãe foi deixada num banho de ultrassons durante 10 minutos e filtrada em filtros para seringas

MINISART[®]. Por diluição da solução mãe, foram preparadas as soluções padrão de calibração apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9 – Procedimento de preparação das soluções padrão de ácido clorogênico para a reta de calibração

Solução original (mg/ml)	Vol. inicial (ml)	Vol. final (ml)	Concentração (mg/ml)
0,50	5,00	-----	0,50
0,50	1,00	2,00	0,25
0,50	0,50	2,00	0,12 ₅
0,50	0,50	4,00	0,062 ₅
0,062 ₅	1,00	2,00	0,031 ₂
0,062 ₅	0,50	2,00	0,015 ₆
0,062 ₅	0,25	2,00	0,0078 ₁
0,062 ₅	0,25	4,00	0,0039 ₁

Após completar o volume das soluções-padrão com metanol (grau HPLC filtrado), as soluções foram levadas ao banho de ultrassons durante 10 minutos e filtradas em filtros para seringas MINISART[®], antes de serem injetadas. As injeções foram feitas em triplicado.

As amostras foram apropriadamente diluídas com metanol (grau HPLC filtrado), com o objetivo de obter concentrações finais de 10,0 mg/ml para as FHM-EtOH/H₂O e 10,0 mg/ml para as FA-MeOH, exceto para a amostra coletada em Belém, cuja concentração final foi de 1,0 mg/ml. Todas as amostras foram levadas ao banho de ultrassons durante 10 minutos e filtradas em filtros para seringas MINISART[®], antes de serem injetadas. As injeções foram feitas em triplicado. O ácido clorogênico foi identificado por comparação do tempo de retenção e do espectro de UV correspondente, com o obtido da substância de referência. Os resultados foram expressos pela média das áreas dos picos das três injeções. Todos os dados estatísticos foram calculados utilizando o software *Microsoft Office Excel*.

3.9 Análises de UPLC-DAD-MS

O espectrômetro de massa utilizado é constituído por uma fonte de ionização do tipo “electrospray” e de um analisador do tipo quadrupólo. O método de ionização por

“electrospray” (ESI) é realizado à pressão atmosférica, e consiste basicamente na introdução da amostra na fonte de ionização, através de um capilar mantido sob alta voltagem. Na saída do capilar são formadas gotas altamente carregadas (“spray”) que são dessolvatadas, ocasionando redução do seu tamanho até a formação de iões do analito a partir destas gotas [84]. Esse método gera ionização do analito pelo modo positivo ou negativo. A escolha do modo de ionização depende, dentre outros parâmetros, da estrutura da substância. Substâncias que apresentam grupos básicos normalmente são analisadas no modo positivo, quando o ião observado corresponde à forma positiva da molécula ($[M + H]^+$), após agregação de um átomo de hidrogénio dada a relativa facilidade com que as mesmas são protonadas. Por outro lado, substâncias contendo grupos ácidos são mais facilmente desprotonadas e, conseqüentemente, são analisadas no modo negativo, quando o ião observado corresponde à forma negativa da molécula ($[M - H]^-$), após a perda de um átomo de hidrogénio [85]. Já o analisador do tipo quadrupólo consiste em quatro cilindros (cilindros opostos têm polaridade igual enquanto cilindros adjacentes têm polaridade oposta) distribuídos de forma simétrica. Sob o efeito de um campo elétrico, e a uma determinada ráiofrequência, os iões de uma determinada razão m/z que adotam um estado de oscilação estável, atravessam o quadrupólo em direção ao detetor. Todos os outros iões que não permitam uma oscilação estável são eliminados [84].

O perfil de alcaloides das amostras UT-2 e UT-4 FB-MeOH foi obtido por UPLC-DAD-MS, utilizando-se uma coluna LiChrocart (125 x 2,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 μ m). Foram utilizadas as mesmas condições de eluição descritas no item 3.7, a exceção do fluxo (0,2 ml/minuto) e do volume de injeção (2 μ l). O DAD foi programado para aquisição de dados na gama de comprimentos de onda de 200 a 800 nm com resolução de 4 nm. O equipamento foi previamente calibrado com mitrafilina e a monitorização de iões identificadores foi realizado para m/z 369,5 (POA) e m/z 385,5 (TOA). As condições para o modo de ionização da mitrafilina estão representadas na tabela 10. A aquisição foi obtida no intervalo de m/z 100-600 com resolução de m/z 0,4.

O perfil de fenóis das amostras UT-2 e UT-4 FA-MeOH foi obtido por UPLC-DAD-MS, utilizando-se uma coluna Phenomenex (100 x 3,0 mm) com fase RP18 (2,6 μ m). As condições de eluição das amostras com MeOH/H₂O (H₂O em pH 3; HCOOH) em modo gradiente foram: 5-15% de MeOH (2,10 minutos), 15-35% de MeOH (5,20 minutos), 35-50% de MeOH (3,10 minutos), 50-100% de MeOH (2,10 minutos) e 100-

5% de MeOH (1 minuto) num total de 13,50 minutos. Um período de equilíbrio de 3,50 minutos com MeOH 5% foi utilizado entre as análises. O fluxo foi de 0,8 ml/minuto, volume de injeção de 5 µl e temperatura do forno de 30 °C. O DAD foi programado para aquisição de dados na gama de comprimentos de onda de 200 a 800 nm com resolução de 4 nm. O equipamento foi previamente calibrado com ácido clorogênico e campferitrina, e a monitorização de iões identificadores foi realizada para m/z 353,5 e m/z 577,0 respetivamente. As condições para o modo de ionização do ácido clorogênico e da campferitrina estão representadas na tabela 10. A aquisição foi obtida no intervalo de m/z 100-700 com resolução de m/z 0,4.

Tabela 10 – Condições de ionização para mitrafilina, ácido clorogênico e campferitrina por UPLC-MS

Padrão	Modo de ionização	Capilar metálico (kV)	Cone de amostragem (V)	Extrator (V)	RF do quadrupolo (V)	Tfonte °C	Tdessorvatação °C
Mitrafilina	Positivo	3,00	30,00	1,00	1,0	150	350
Ácido clorogênico	Negativo	3,00	20,00	1,00	1,0	150	350
Campferitrina	Negativo	3,00	40,00	1,00	1,0	150	350

4. Apresentação e discussão dos resultados

4.1 Extração e caracterização preliminar de alcaloides e polifenóis

O rendimento de cada extrato bruto hidroalcoólico (EBH) e metanólico (EBM) obtido a partir das folhas de *Uncaria tomentosa* está apresentado na tabela 11. Na tabela 12 estão apresentados os rendimentos das frações FH-EtOH/H₂O, FC-EtOH/H₂O, FHM-EtOH/H₂O, FA-MeOH e FB-MeOH de cada amostra, obtidas por partição desses extratos.

Tabela 11 – Rendimento dos extratos EBH e EBM das folhas de *Uncaria tomentosa*

Amostra	Rendimento (% m/m)	
	EBH	EBM
UT-1	47,4	19,9
UT-2	46,4	26,8
UT-3	36,1	27,9
UT-4	48,0	14,2
UT-5	*	8,20

*Procedimento não realizado. EBH: extrato bruto hidroalcoólico, EBM: extrato bruto metanólico.

Tabela 12 – Rendimento das frações obtidas por partição dos extratos brutos

Amostra	Rendimento (m/m) (%)				
	FH-EtOH/H ₂ O	FC-EtOH/H ₂ O	FHM-EtOH/H ₂ O	FA-MeOH	FB-MeOH
UT-1	0,8	6,2	58,4	17,9	1,6
UT-1/EA	1,6	6,4	58,8	*	*
UT-2	1,6	4,4	45,2	12,9	1,1
UT-3	3,2	5,6	54,8	10,9	2,7
UT-4	*	*	*	12,4	4,1
UT-4/EA	5,4	7,2	40,2	*	*
UT-5	*	*	*	16,0	2,3

*Procedimento não realizado. FH-EtOH/H₂O: fração hexânica, FC-EtOH/H₂O: fração clorofórmica, FHM-EtOH/H₂O: fração hidrometanólica, FA-MeOH: fração ácida, FB-MeOH: fração básica. EA = etapa adicional (ver item 3.5.1).

Os resultados apresentados nas tabelas 11 e 12 revelam que o extrato EBH possui um maior rendimento demonstrando que a mistura hidroalcoólica extrai uma maior quantidade de metabólitos. Normalmente, os extratos vegetais comerciais são obtidos com misturas variáveis de etanol/água. A extração com etanol/água 1:1 já tinha sido utilizada na otimização do processo de extração de extratos enriquecidos em camferitrina, a partir de *Uncaria guianensis* [83].

No estabelecimento da metodologia desenvolvida por HPLC, foi utilizada inicialmente uma amostra de referência (UTFA₁) constituída de uma fração enriquecida de POA, obtida de acordo com o descrito no item 3.1. Contudo, ao ser submetida à análise HPLC-DAD nas condições descritas no item 3.7, a caracterização dos alcaloides não correspondeu ao perfil previsto, de acordo com a literatura [76, 79, 80, 86] (dados não apresentados). Foi então analisada uma outra amostra de referência (UTFA₂) obtida da mesma forma, mas sob um acondicionamento diferente. Esta, quando submetida ao teste de controlo prévio de sua composição por HPLC-DAD, revelou um perfil cromatográfico compatível conforme esperado, ao indicar a presença dos seis POA (figura 14A-B). Os seis sinais foram atribuídos aos POA, de acordo com a ordem de eluição observada em trabalhos anteriores [76, 79, 80, 86]. A variação no perfil cromatográfico dessas amostras de referência deve-se possivelmente ao fato desses alcaloides serem suscetíveis à luz, pH e temperatura [31, 75]. Portanto, as condições de armazenamento para os extratos contendo alcaloides são essenciais para a manutenção destes, quando se objetiva utilizá-los como substância de referência.

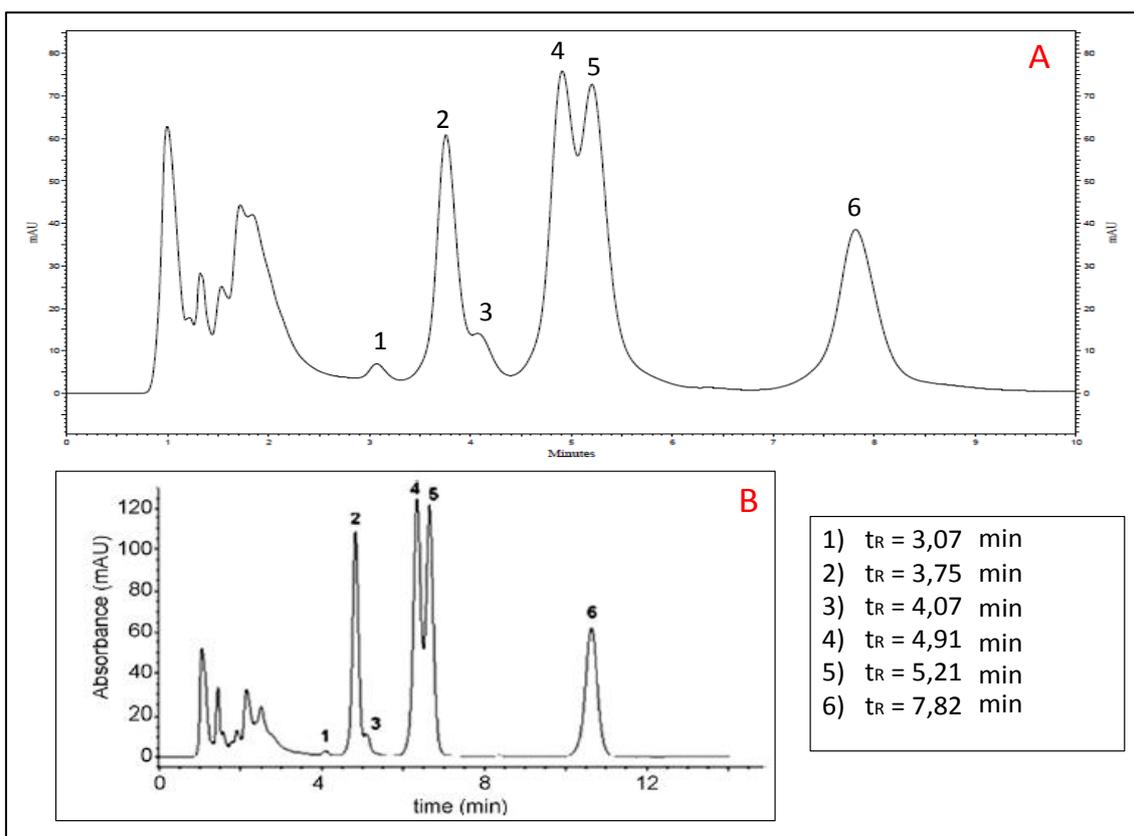


Figura 14. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD indicando a presença dos seis alcaloides oxindólicos pentacíclicos: (1) especiofilina; (2) mitrafilina; (3) uncarina F; (4) pteropodina; (5) isomitrafilina; (6) isopteropodina. (A) Amostra de referência UTFA₂ ($c = 0,60$ mg/ml): condições experimentais: fase móvel MeCN/NH₄OAc 30 mM (45:55), pH 6,8-7,0, modo isocrático, fluxo: 1,0 ml/min, detecção: 245 nm, forno: 60° C. (B) Amostra de referência UTFA ($c = 1,0$ mg/ml): condições descritas em [86].

Os perfis obtidos por TLC do extrato bruto EBH e das frações provenientes da partição com solventes, FH-EtOH/H₂O, FC-EtOH/H₂O e FHM-EtOH/H₂O estão apresentados nas figuras 15 e 17, respetivamente.

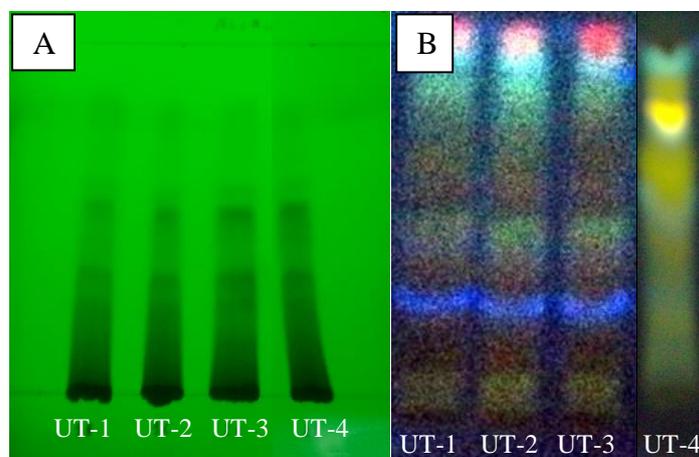


Figura 15. Cromatografia em camada fina do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. Concentração dos extratos: 50 mg/ml.

Os perfis obtidos por TLC do extrato bruto EBM e das frações oriundas de sua partição com solventes, FA-MeOH e FB-MeOH estão apresentados nas figuras 16 e 18, respetivamente.

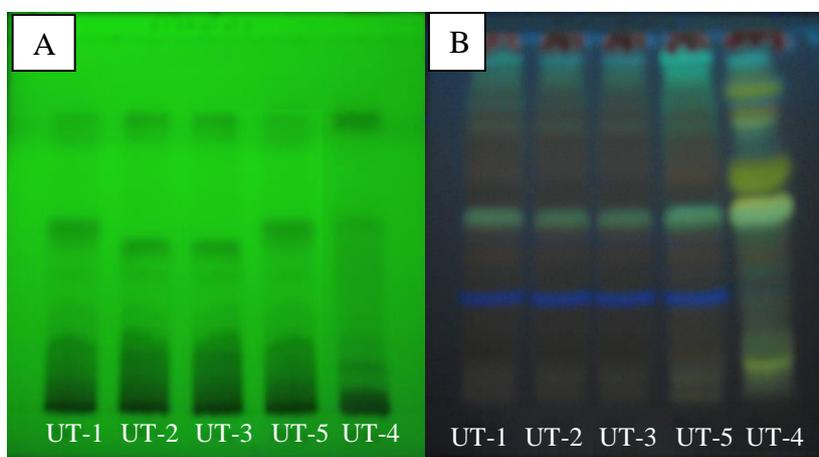


Figura 16. Cromatografia em camada fina do extrato bruto metanólico (EBM) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. Concentração dos extratos: 50 mg/ml.

Comparando as análises obtidas por TLC do extrato bruto EBH e EBM mostrados na figura 15B e 16B, observa-se uma diferença no perfil fenólico da amostra UT-4 em relação às outras. As substâncias fenólicas são reveladas no reagente NP/PEG com coloração amarela, laranja, verde e azul [82]. Analisando as placas cromatográficas

observou-se a presença de substâncias fenólicas de coloração amarela, que são típicas de flavonol [82], que só aparecem nessa amostra, gerando uma dúvida quanto à sua identidade botânica. Além disso, conforme apresentado na figura 17, nota-se que a etapa de extração adicional da fração FH-EtOH/H₂O (a) e FC-EtOH/H₂O (b) da amostra UT-1/EA com 10 ml de MeOH/H₂O (9:1) foi eficaz, já que promoveu uma separação seletiva dos componentes alcaloídicos na FC-EtOH/H₂O (b) e dos componentes fenólicos na FHM-EtOH/H₂O (c).

Uma melhor visualização dos alcaloides UTFA₂ foi obtida na placa (B) da Fig. 18, onde a concentração dessa amostra de referência foi de 6 mg/ml. Esta foi a menor concentração que permitiu a visualização de todos os alcaloides presentes, levando-se em conta a variação das concentrações dos mesmos. A mitrafilina e a isopteropodina foram identificadas nesta placa pela comparação dos fatores de retenção (R_F) com seus padrões aplicados em paralelo, e pela ordem de eluição descrita por Pereira e cols. [86] (Figura 14B). A atribuição da identidade dos outros quatro POA baseou-se na comparação com a ordem de eluição apresentada pelos alcaloides com aquela descrita na literatura [76, 79, 80, 86].

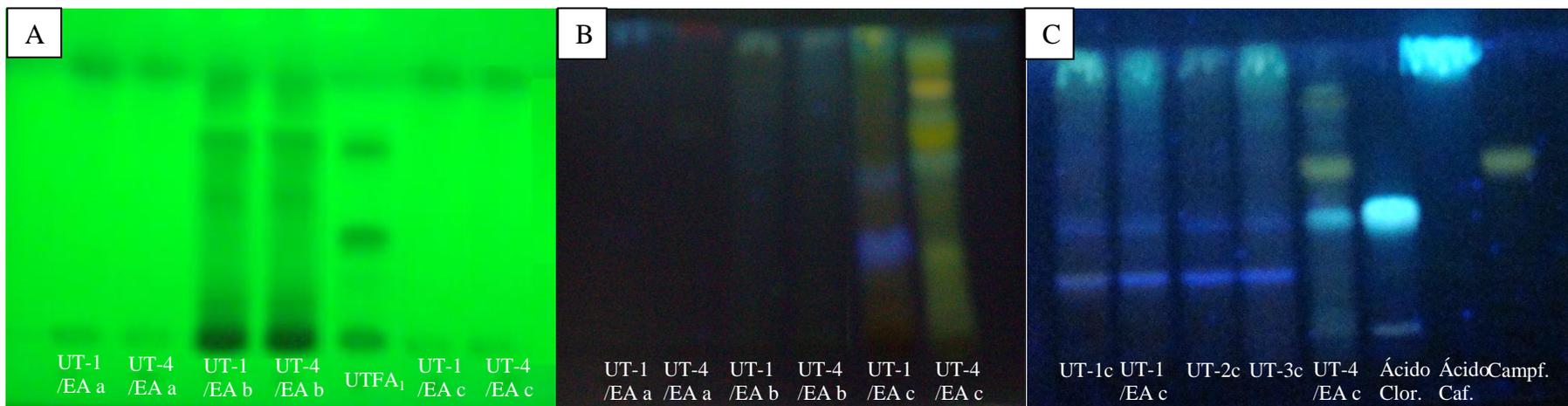
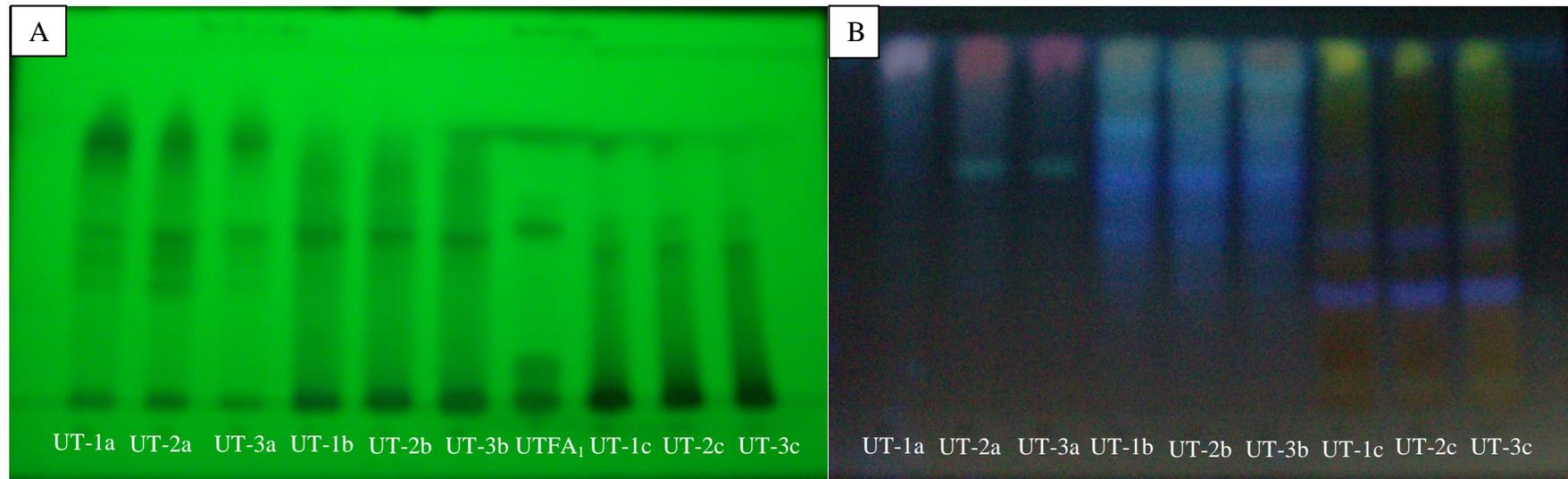


Figura 17. Cromatografia em camada fina das frações provenientes da partição do extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (B e C) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. (a) FH-EtOH/H₂O; (b) FC-EtOH/H₂O; (c) FHM-EtOH/H₂O. Concentração das frações: 10 mg/ml e concentração das amostras de referência: UTFA₁: 5,0 mg/ml, ácido clorogênico: 1,0 mg/ml, ácido cafeico: 1,0 mg/ml e campferitrina: 0,60 mg/ml

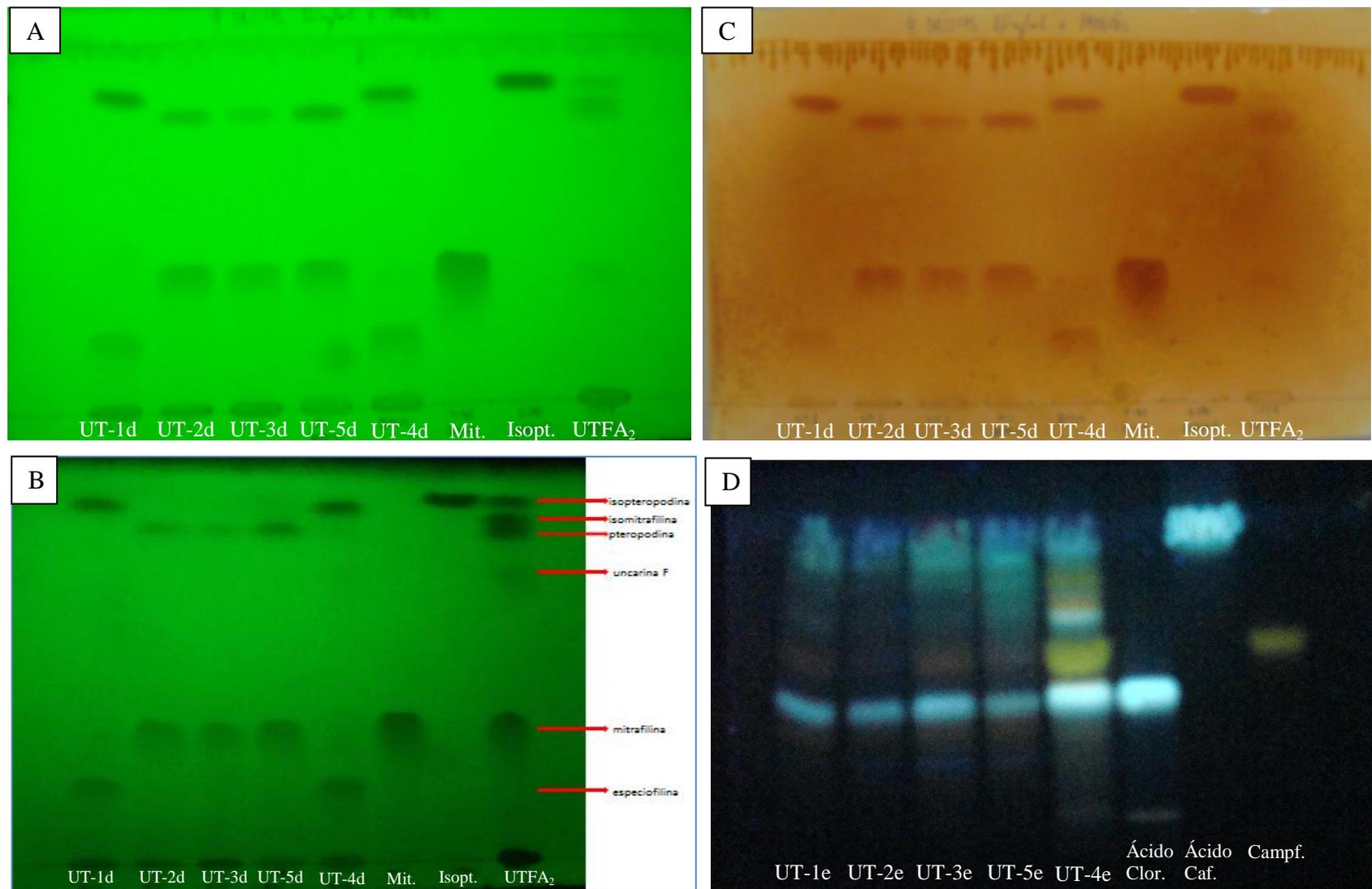


Figura 18. Cromatografia em camada fina das frações provenientes da partição do extrato bruto metanólico (EBM) das folhas de *Uncaria tomentosa*. (A e B) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob lâmpada de UV a 254 nm; (C) Fase móvel: AcOEt/n-hexano (95:5) e revelação sob luz visível após aspersão com reagente Dragendorff/Nitrito de sódio; (D) Fase móvel: AcOEt/HCOOH/AcOH/H₂O (100:11:11:26) e revelação sob lâmpada de UV a 365 nm após aspersão com reagente NP/PEG. (d) FB-MeOH; (e) FA-MeOH. Concentração das frações: 10 mg/ml para as FA-MeOH e 1,0 mg/ml para as FB-MeOH; e concentração das amostras de referência: UTFA₂: 1,0 mg/ml e 6,0 mg/ml (A e B, respectivamente), ácido clorogênico: 1,0 mg/ml, ácido cafeico: 1,0 mg/ml, campferitrina: 0,60 mg/ml, mitrafilina: 1,0 mg/ml e isopteropodina: 1,0 mg/ml.

4.2 Quantificação dos alcaloides das amostras de *Uncaria tomentosa* por HPLC

As amostras de *U. tomentosa* foram caracterizadas através do teor do alcaloide mitrafilina, usado como referência. Para a quantificação da mitrafilina por HPLC foi elaborada uma curva de calibração a partir da média das áreas dos sinais obtidos das soluções-padrão dentro de um intervalo de concentrações entre 0 e 0,20 mg/ml. Os resultados expressos pela média e desvio padrão relativo (RSD) das áreas referentes ao sinal da mitrafilina encontram-se na tabela 13. A resposta do detetor (área referente ao sinal) é medida em mAU (mili unidades de absorvância).

Tabela 13 – Média e desvio padrão relativo das áreas obtidas por HPLC-DAD da mitrafilina em função da concentração (avaliada a 245 nm)

Concentração (mg/ml)	Média das áreas* (mAU)	Desvio padrão relativo das áreas (%)
0,20	$4,33 \times 10^6$	0,22
0,10	$2,07 \times 10^6$	0,12
0,050	$1,07 \times 10^6$	0,45
0,025	$4,96 \times 10^5$	1,4
0,012 ₅	$2,50 \times 10^5$	0,61
0,0062 ₅	$1,27 \times 10^5$	1,7
0,0031 ₂	$6,01 \times 10^4$	1,3
0,0015 ₆	$3,17 \times 10^4$	2,0
0,00078 ₁	$1,77 \times 10^4$	3,1
0	0	0

*Média de triplicados.

Na figura 19 está apresentado um cromatograma de uma solução padrão de mitrafilina e também de isopteropodina (ambas com concentração de 0,20 mg/ml) e respectivos espectros de ultravioleta. Os valores de tempo de retenção (t_R) obtidos são iguais aos encontrados na amostra de referência UTF_A₂ (figura 14A), confirmando a atribuição realizada anteriormente. Em ambos os casos, tanto o espectro quanto o comprimento de onda no qual ocorre o máximo de absorção (λ_{max}) estão de acordo com os referidos na literatura [79, 87]. A isopteropodina é um estereoisômero da mitrafilina, que normalmente acompanha o perfil cromatográfico de extratos contendo este alcaloide, já que ambas possuem estruturas químicas interconvertíveis em solução com diferentes valores de pH e temperatura [75]. A isopteropodina foi submetida à análise por HPLC-DAD com o propósito de identificar os sinais nos cromatogramas

mediante comparação com os resultados obtidos por TLC apresentados nas figuras 18A-B-C.

Na figura 20 está representada a reta de calibração obtida e na tabela 14 estão os parâmetros estatísticos da reta, nomeadamente os valores de declive e incerteza, ordenada na origem e incerteza, coeficiente de correlação, limite de detecção e de quantificação. Os valores das incertezas estão apresentados considerando o parâmetro de t-Student para uma probabilidade de 95% e para n-2 graus de liberdade em que n representa o número de soluções padrão na reta de calibração.

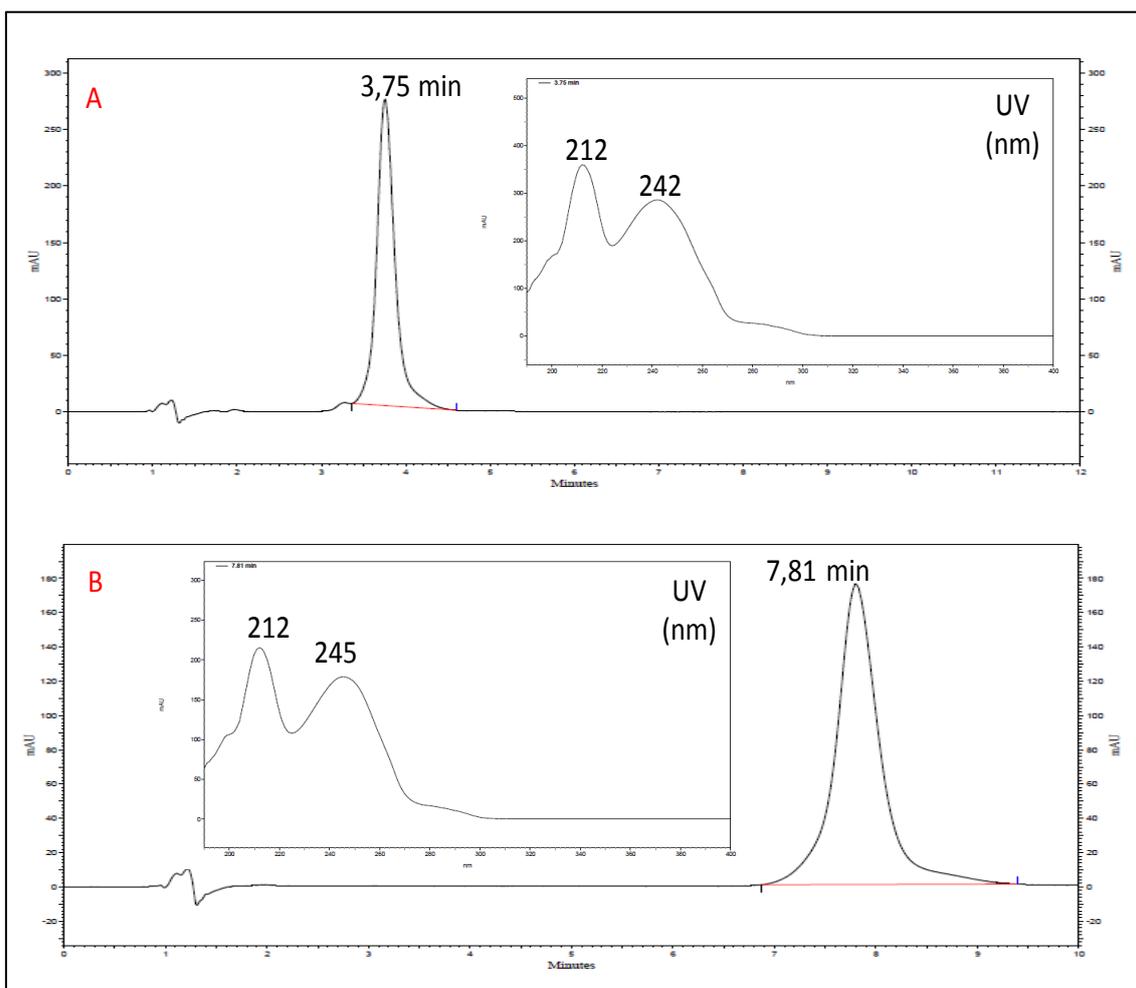


Figura 19. Cromatograma e espectro de ultravioleta correspondente à solução padrão de: (A) mitrafilina ($c = 0,20$ mg/ml) e (B) isopteropodina ($c = 0,20$ mg/ml) com detecção a 245 nm. Condições de análise: ver item 3.7

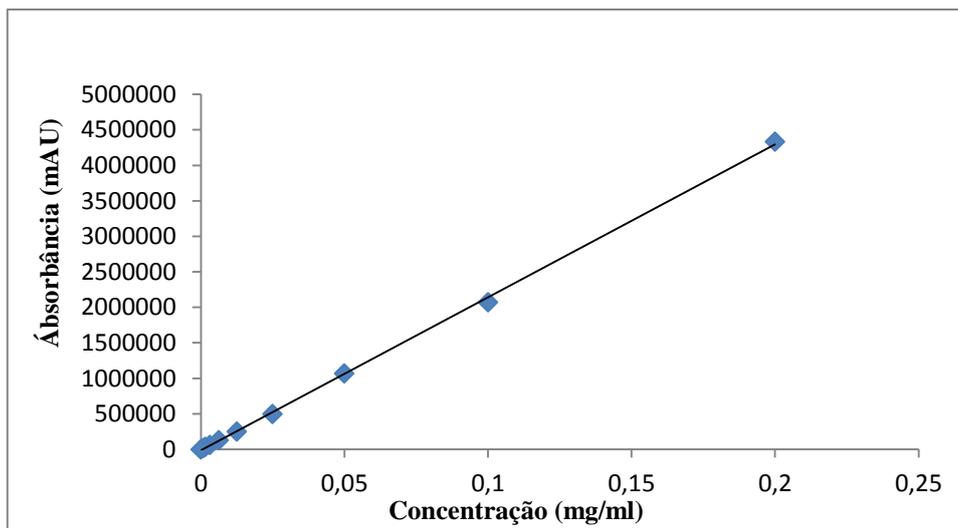


Figura 20. Representação gráfica da curva de calibração da área do pico referente à mitrafilina em função da concentração

Tabela 14 – Parâmetros estatísticos da reta de calibração apresentada na figura 20

Declive (mAU l/g)	Ordenada na origem (mAU)	Coefficiente de correlação, r	Limite de deteção, LDD (mg/ml)	Limite de quantificação, LDQ (mg/ml)
$(2,155 \pm 0,037) \times 10^7$	$(-1,5 \pm 2,7) \times 10^4$	0,9995	$4,4 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^{-2}$

De acordo com a equação obtida para a reta de calibração, o método de quantificação da mitrafilina apresentou resposta linear dentro da gama avaliada, pois o coeficiente de correlação r foi maior que 0,99, atendendo ao critério mínimo aceitável estabelecido pela ISO 17025 para métodos de quantificação [88]. A partir dos dados da reta de calibração foi possível estimar o limite de detecção (LDD) de $4,4 \times 10^{-3}$ mg/ml e o limite de quantificação (LDQ) de $1,5 \times 10^{-2}$ mg/ml. Os limiares analíticos foram determinados recorrendo as expressões 1 e 2:

$$LDD = \frac{3,3s_{y/x}}{b} \quad (1)$$

$$LDQ = \frac{10s_{y/x}}{b} \quad (2)$$

em que b representa o declive e $s_{y/x}$ representa o desvio padrão dos pontos à reta de calibração, dado pela expressão 3:

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}} \quad (3)$$

em que \hat{y} representa o valor de y interpolado na reta de calibração e n representa o número de soluções padrão.

Para valores abaixo do LDD não é possível detetar a mitrafilina na amostra sob as condições experimentais estabelecidas e, para valores abaixo do LDQ, sabe-se que a amostra contém mitrafilina, mas não é possível quantificá-la, ou seja, não é possível determinar a sua concentração com precisão e exatidão aceitáveis. O método não apresentou muitos desvios entre os pontos experimentais e a reta definida na gama de trabalho, e o valor de desvio padrão ($1,5 \times 10^{-3}$) e de coeficiente de variação (3,6%) foram baixos. Portanto, pode-se concluir que a ocorrência de erros aleatórios durante a análise é muito baixa.

A identificação da mitrafilina por HPLC-DAD nas frações FB-MeOH pode ser demonstrada pela presença de um pico com mesmo t_R e espectro de ultravioleta, em comparação com o padrão mostrado na figura 19A. Essa caracterização é corroborada pelos resultados obtidos na análise por TLC apresentados na figura 18A-B-C, das amostras UT-2, UT-3, UT-4 e UT-5, com confiança, enquanto o sinal correspondente está ausente na amostra UT-1. Portanto, a partir da reta de calibração e da média das áreas relativas ao sinal da mitrafilina nas diversas amostras, foi possível estimar a concentração desse alcaloide em cada uma delas. O valor da incerteza da concentração foi determinado a partir da expressão 4:

$$S_x = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (4)$$

em que m representa o número de réplicas da amostra, y_0 representa o valor médio da resposta da amostra, \bar{x} representa o valor médio de x e \bar{y} representa o valor médio de y . Esse valor foi depois corrigido considerando o valor de t com $n-2$ graus de liberdade e probabilidade de 95%, sendo apresentado como $t s_x$.

Os resultados expressos pela média e RSD das áreas referentes ao sinal da mitrafilina estão apresentados na tabela 15. Apenas as frações FB-MeOH foram quantificadas por HPLC, já que as análises das frações FC-EtOH/H₂O de todas as amostras resultaram em cromatogramas com péssima resolução (resultados não apresentados).

Tabela 15 – Concentração estimada de mitrafilina por HPLC-DAD a partir da reta de calibração apresentada na figura 20

Amostras	Média das áreas* (mAU)	Desvio padrão relativo das áreas (%)	c ± t sx (mg/ml)
UT-1 FB-MeOH	1,21 x 10 ⁴	3,08	(0,13 ± 0,23) x 10 ⁻²
UT-2 FB-MeOH	2,03 x 10 ⁶	0,31	(9,47 ± 0,24) x 10 ⁻²
UT-3 FB-MeOH	1,21 x 10 ⁶	0,56	(5,70 ± 0,22) x 10 ⁻²
UT-4 FB-MeOH	1,74 x 10 ⁵	0,24	(0,88 ± 0,23) x 10 ⁻²
UT-5 FB-MeOH	2,00 x 10 ⁶	0,91	(9,34 ± 0,24) x 10 ⁻²

*Média de triplicados.

Os cromatogramas obtidos por TLC apresentados na figura 18A-B-C estão de acordo com estes resultados, já que se observam diferenças de intensidade nas bandas correspondentes à mitrafilina após revelação. Considerando os valores de LDD e LDQ obtidos (Tabela 14), e através da análise da tabela 15, verifica-se que a amostra UT-1 FB-MeOH está abaixo do LDD e a UT-4 FB-MeOH está abaixo do LDQ. Deste modo pode-se explicar a elevada incerteza associada à concentração dessas amostras (181% e 26%, respetivamente). As restantes amostras possuem valores de concentração que se situam acima do LDQ.

Na amostra UT-1 FB-MeOH a quantidade de mitrafilina encontra-se abaixo do LDD do método, mas a presença de outros alcaloides foi revelada por TLC (figura 18A-B-C) e por HPLC (figura 21).

O perfil cromatográfico, o espectro de ultravioleta da mitrafilina ($t_R \sim 3,8$ min) e os sinais das frações FB-MeOH das amostras de *Uncaria tomentosa* avaliados a 245 nm estão apresentados nas Figuras 21 a 25.

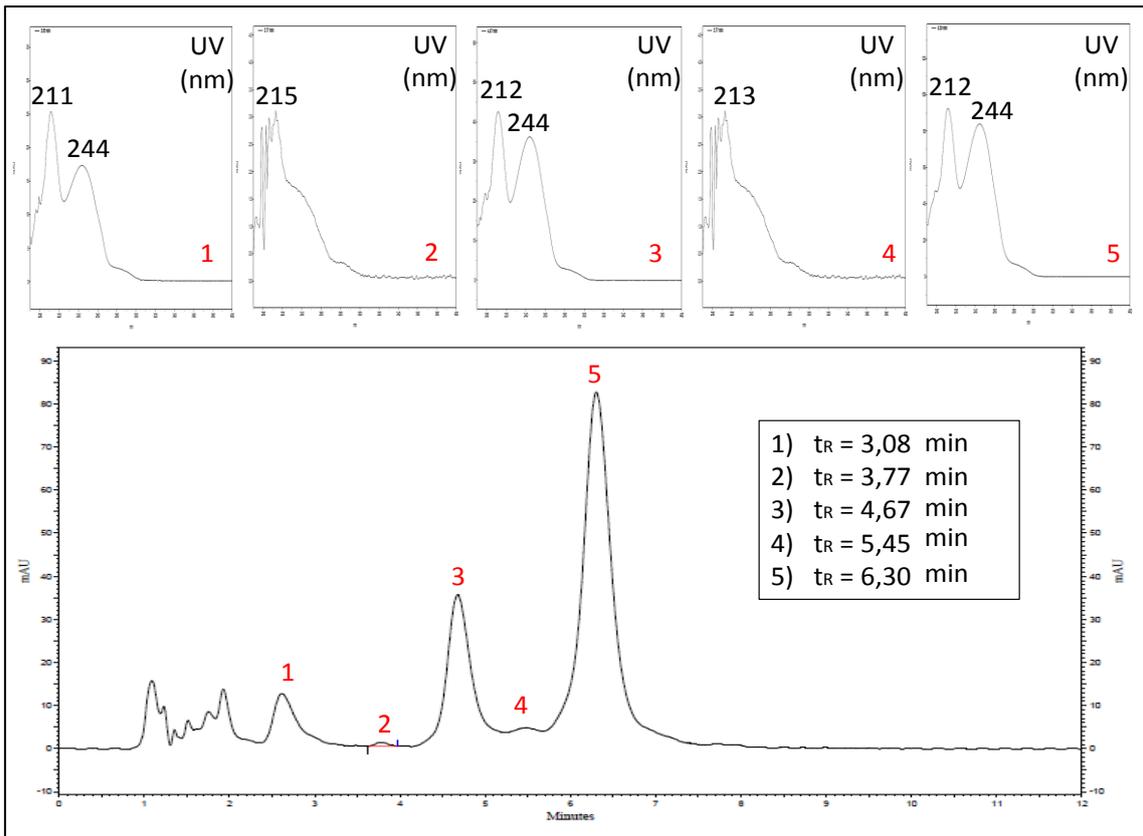


Figura 21. Cromatograma da amostra UT-1 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7

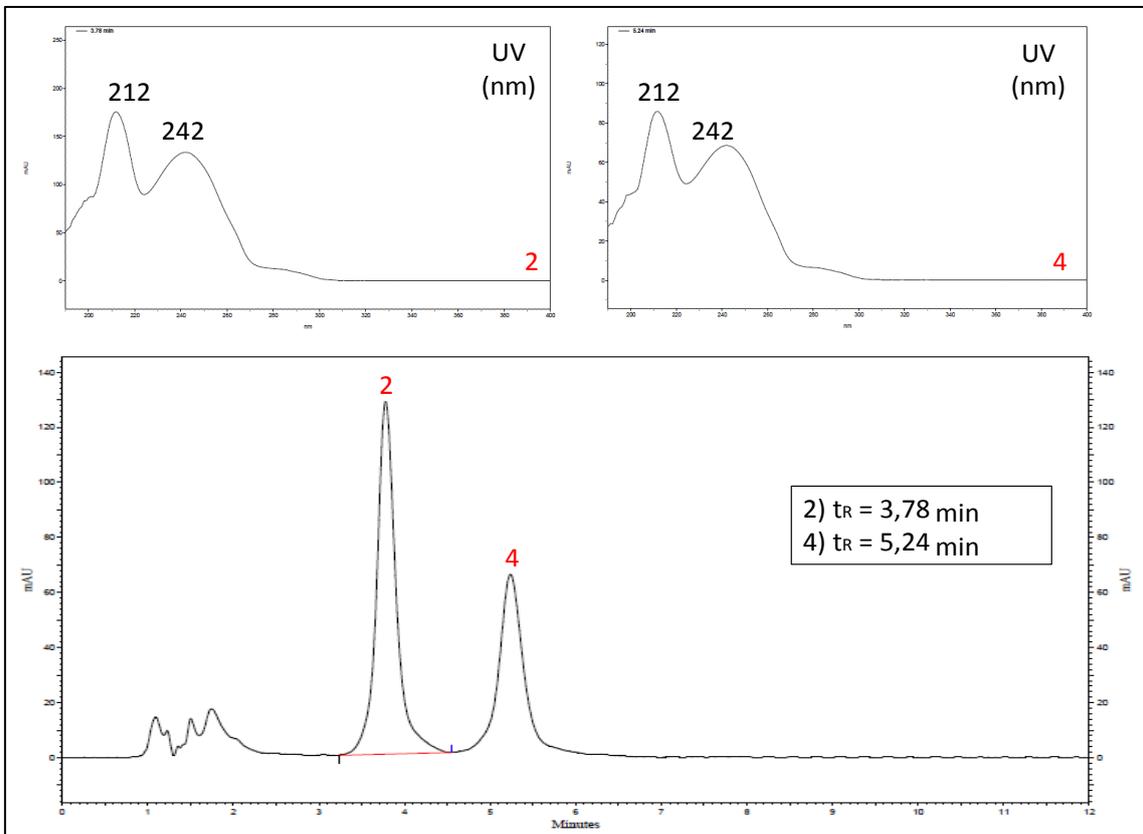


Figura 22. Cromatograma da amostra UT-2 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7

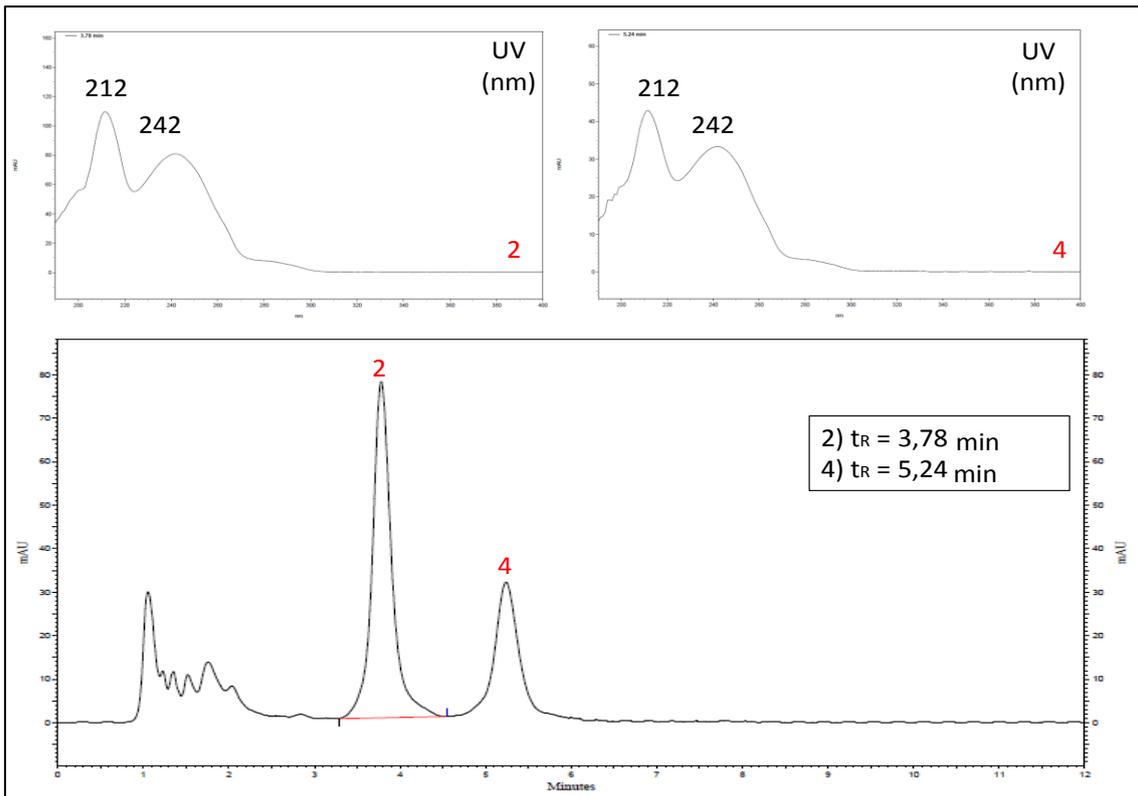


Figura 23. Cromatograma da amostra UT-3 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7

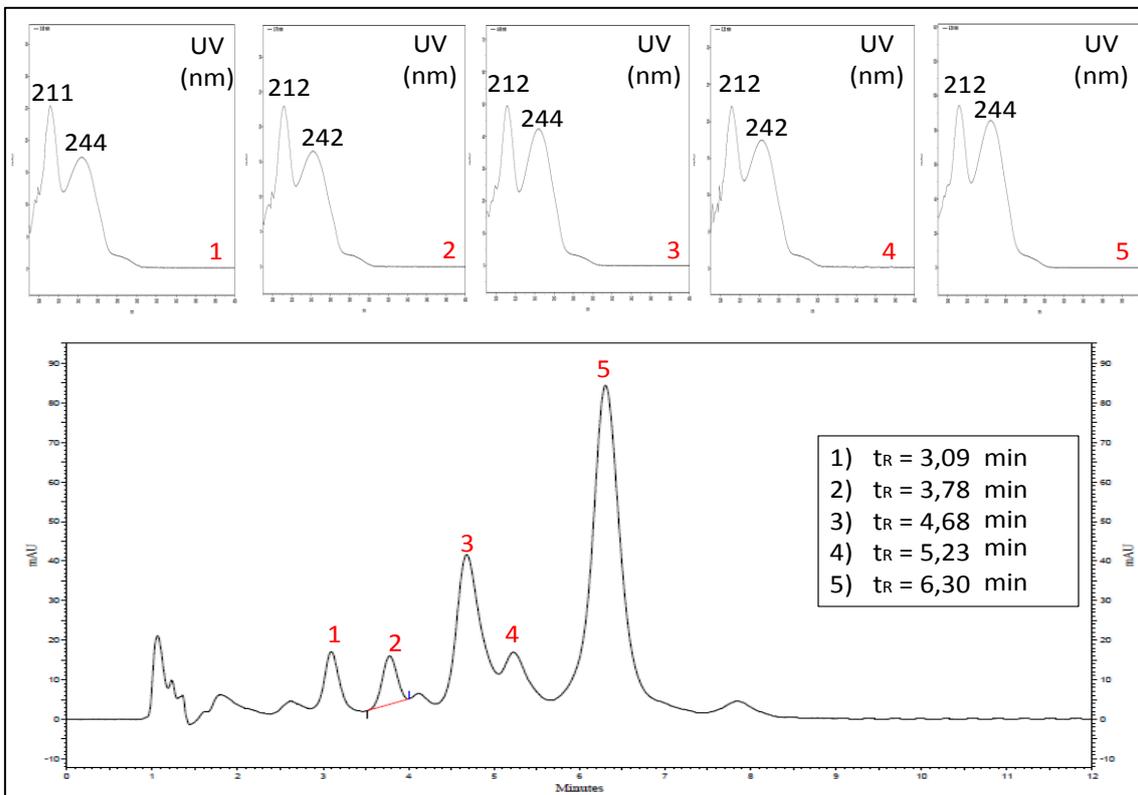


Figura 24. Cromatograma da amostra UT-4 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7

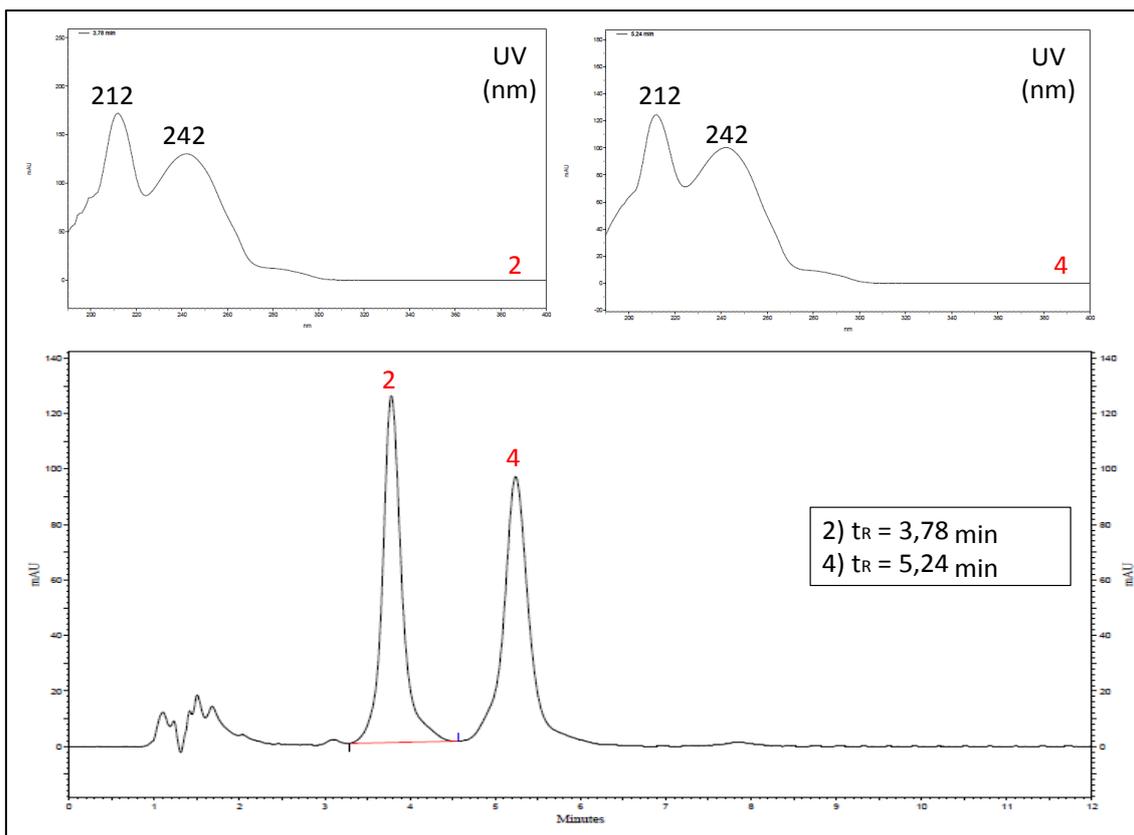


Figura 25. Cromatograma da amostra UT-5 FB-MeOH e espectros dos sinais maioritários (mitrafilina corresponde ao pico 2). Condições de análise: ver item 3.7

Os espectros de ultravioleta dos sinais presentes nas amostras são semelhantes em relação aos espectros dos padrões mitrafilina e isopteropodina (Figura 19), sugerindo possuírem cromóforos similares e, portanto, compartilharem a mesma classe química. A partir dessa semelhança espectral e dos valores de t_R dos sinais dos cromatogramas e das figuras 14A e 19; além da análise da placa de TLC (Figura 18B), observa-se que o sinal 1 das amostras UT-1 FB-MeOH e UT-4 FB-MeOH, e o sinal 4 das amostras UT-2 FB-MeOH, UT-3 FB-MeOH e UT-5 FB-MeOH possuem características químicas similares aos alcaloides especiofilina e isomitrafilina, respectivamente. As pequenas variações que ocorreram no R_F desses alcaloides em TLC são possivelmente devido às oscilações na saturação da câmara cromatográfica. Contudo, Laus & Keplinger [75] e Mazzei [79] reportaram que o par de alcaloides (pteropodina e isomitrafilina), quando analisado por HPLC, apresenta por vezes a ordem de eluição invertida devido a pequenas diferenças nas condições cromatográficas. Além da possível presença de especiofilina nas amostras UT-1 FB-MeOH e UT-4 FB-MeOH, nota-se a presença de bandas (Figura 18B) com mesmo R_F correspondente ao alcaloide isopteropodina nessas amostras. Porém, esse alcaloide que apresenta $t_R \sim 7,8$ min (figuras 14A e 19), após injeção do padrão por

HPLC apresentou $t_R \sim 6,3$ min nas amostras (figuras 21 e 24). Portanto, para a corroboração da presença de especiofilina, isomitrafalina e isopteropodina exigiria a aplicação de técnicas adicionais de caracterização química. Neste caso, a técnica de HPLC-MS foi aplicada (ver adiante), sugerindo que o $t_R \sim 6,3$ min da amostra UT-4 FB-MeOH não corresponde à isopteropodina, mas sim possivelmente a um alcaloide tetracíclico (TOA).

Ensaio de recuperação do padrão foram elaborados em dois níveis de concentração (0,05 mg/ml e 0,025 mg/ml) com três réplicas cada, para quatro amostras e duas soluções-padrão. Os resultados desses ensaios estão apresentados na tabela 16 e permitiram validar os resultados obtidos a partir da reta, uma vez que as quantificações das amostras e das soluções-padrão foram efetuadas em ocasiões diferentes. Além disso, eles sugerem que o método apresenta uma boa exatidão, pois o erro relativo calculado foi inferior a 1%, com exceção da amostra UT-4 FB-MeOH que apresentou valor acima de 10%. Isso se deve possivelmente à concentração estar abaixo do LDQ.

Tabela 16 – Ensaio de recuperação de amostras e soluções padrão (245 nm)

Amostras	Concentração antes da fortificação (mg/ml)	Concentração média após fortificação (mg/ml)		Taxa de recuperação (%)		Erro relativo (%)	
		0,05	0,025	0,05	0,025	0,05	0,025
Nível de concentração							
UT-2 FB-MeOH	$9,47 \times 10^{-2}$	$1,4_4 \times 10^{-1}$	$1,2_0 \times 10^{-1}$	99,5	101	0,18	0,25
UT-3 FB-MeOH	$5,70 \times 10^{-2}$	$1,0_6 \times 10^{-1}$	$8,1_8 \times 10^{-2}$	98,6	99,0	0,65	0,29
UT-4 FB-MeOH	$0,88 \times 10^{-2}$	$5,2_4 \times 10^{-2}$	$3,0_1 \times 10^{-2}$	87,2	85,0	11	11
UT-5 FB-MeOH	$9,34 \times 10^{-2}$	$1,4_3 \times 10^{-1}$	$1,1_8 \times 10^{-1}$	99,4	99,6	0,22	0,079
Mitrafalina (0,10 mg/ml)	0,10	$1,5_1 \times 10^{-1}$	$1,2_5 \times 10^{-1}$	102	101	0,62	0,11
Mitrafalina (0,012 ₅ mg/ml)	0,012 ₅	$6,3_0 \times 10^{-2}$	$3,7_5 \times 10^{-2}$	101	99,9	0,78	0,049

Na tabela 17 está apresentada a concentração de mitrafalina determinada nas frações FB-MeOH e respectivos rendimentos, e teor de mitrafalina, de cada fração, em mg por 1 g de amostra de folhas secas de *Uncaria tomentosa*.

Tabela 17 – Concentrações, rendimentos e teor (mg/g) de mitrafilina nas amostras de *Uncaria tomentosa*

Amostras	C ± t sx (mg/ml)	Rendimento (% m/m)	Teor ± s teor (mg/g)
UT-1 FB-MeOH	Abaixo do LDD	1,6	**
UT-2 FB-MeOH	$(9,47 \pm 0,24) \times 10^{-2}$	1,1	$1,39 \pm 0,03$
UT-3 FB-MeOH	$(5,70 \pm 0,22) \times 10^{-2}$	2,7	$2,15 \pm 0,08$
UT-4 FB-MeOH	Abaixo do LDQ	4,1	*
UT-5 FB-MeOH	$(9,34 \pm 0,24) \times 10^{-2}$	2,3	$0,88 \pm 0,02$

*Não calculado

Esses resultados estão de acordo com Laus e cols. [75] que observaram que o teor de mitrafilina variava com a localidade. Além disso, pode-se notar que as amostras UT-1, UT-2 e UT-3 que foram recolhidas no mesmo local apresentaram teores diferentes desse alcaloide, mostrando que a sazonalidade exerce influência na produção de metabólitos secundários. Resultados semelhantes foram obtidos por Laus e cols. [28].

A tabela 18 apresenta o resumo de um levantamento realizado sobre o teor de mitrafilina encontrado em espécies de *Uncaria tomentosa*.

Tabela 18 – Teor de mitrafilina em amostras de *Uncaria tomentosa*

Teor de mitrafilina (mg/g)	Parte da planta	Referência
0,67	Cascas	[78]
0,90	Cascas	[74]
3,37	Folhas	[74]
3,03	Cascas	[75]
0,96	Cascas	[89]
1,20	Cascas	[28]
2,06	Folhas	[28]

Segundo Montoro e cols. [74], as folhas de *U. tomentosa* contém maior quantidade de mitrafilina do que as cascas. Além disso, Laus e cols. [28] investigaram e constataram que as folhas maduras possuem maior concentração desse alcaloide que as folhas jovens. Considerando os valores das tabelas 17 e 18, pode-se verificar que os

teores de mitrafilina das frações UT-2 FB-MeOH e UT-3 FB-MeOH foram maiores que os teores desse alcaloide presente nas cascas dos estudos já realizados, com exceção do publicado por Laus e cols. [75].

Portanto, o perfil e o teor de mitrafilina na *Uncaria tomentosa* está estreitamente conectado às variações fisiológicas e ambientais. Desse modo, pode haver variações significativas no alcaloide em função do local onde as espécies grassam, a época em que são colhidas, a parte da planta utilizada, e a idade do vegetal utilizado. É portanto evidente a importância da análise realizada para a caracterização química e o controle de qualidade desta matéria-prima vegetal.

4.3 Quantificação dos polifenóis das amostras de *Uncaria tomentosa* por HPLC

As amostras de *U. tomentosa* foram caracterizadas através do teor do polifenol ácido clorogênico, usado como referência. Para a quantificação do ácido clorogênico por HPLC foram elaboradas duas curvas de calibração a partir da média das áreas dos sinais obtidos das soluções-padrão dentro de um intervalo de concentrações entre 0 e 0,50 mg/ml. Os resultados expressos pela média e desvio padrão relativo (RSD) das áreas referentes ao sinal do ácido clorogênico encontram-se na tabela 19.

Tabela 19 – Média e desvio padrão relativo das áreas obtidas por HPLC-DAD do ácido clorogênico em função da concentração (avaliada a 280 e 320 nm)

Concentração (mg/ml)	Média das áreas (mAu)		Desvio padrão relativo das áreas (%)	
	280 nm	320 nm	280 nm	320 nm
0,50	$7,80 \times 10^6$	$1,45 \times 10^7$	1,6	1,5
0,25	$3,85 \times 10^6$	$7,14 \times 10^6$	1,5	1,6
0,12 ₅	$1,89 \times 10^6$	$3,50 \times 10^6$	0,61	1,1
0,062 ₅	$9,45 \times 10^5$	$1,75 \times 10^6$	1,7	1,9
0,031 ₂	$4,16 \times 10^5$	$7,84 \times 10^5$	2,8	2,1
0,015 ₆	$2,09 \times 10^5$	$4,01 \times 10^5$	2,1	2,7
0,0078 ₁	$1,38 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	1,4	1,5
0,0039 ₁	$6,62 \times 10^4$	$1,26 \times 10^5$	2,0	2,4
0	0	0	0	0

*Média de triplicados.

Na figura 26 está representado um cromatograma com detecção efetuado aos comprimentos de ondas de 280 e 320 nm do padrão ácido clorogênico e também de

campferitrina (com concentração de 0,50 mg/ml e 0,60 mg/ml, respectivamente) e espectros de ultravioleta correspondentes. Em ambos os casos, tanto o espectro quanto o comprimento de onda ao qual ocorre o máximo de absorção (λ_{max}) estão de acordo com os referidos na literatura [50, 90]. A campferitrina foi submetida à análise de HPLC-DAD com o propósito analítico de corroborar a sua identificação realizada por TLC nas amostras UT-4/EA FHM-EtOH/H₂O e UT-4 FA-MeOH mostradas nas figuras 17C e 18D, respectivamente. Segundo Valente e cols. [55] que realizaram estudos com o objetivo de identificar essa substância nas espécies *U. tomentosa* e *U. guianensis*, este flavonol somente foi identificado e isolado na espécie *Uncaria guianensis*, gerando uma dúvida quanto à identidade botânica correta da amostra UT-4.

Na figura 27 estão representadas as retas de calibração do ácido clorogênico avaliadas aos dois comprimentos de onda e na tabela 20 estão os parâmetros estatísticos das retas.

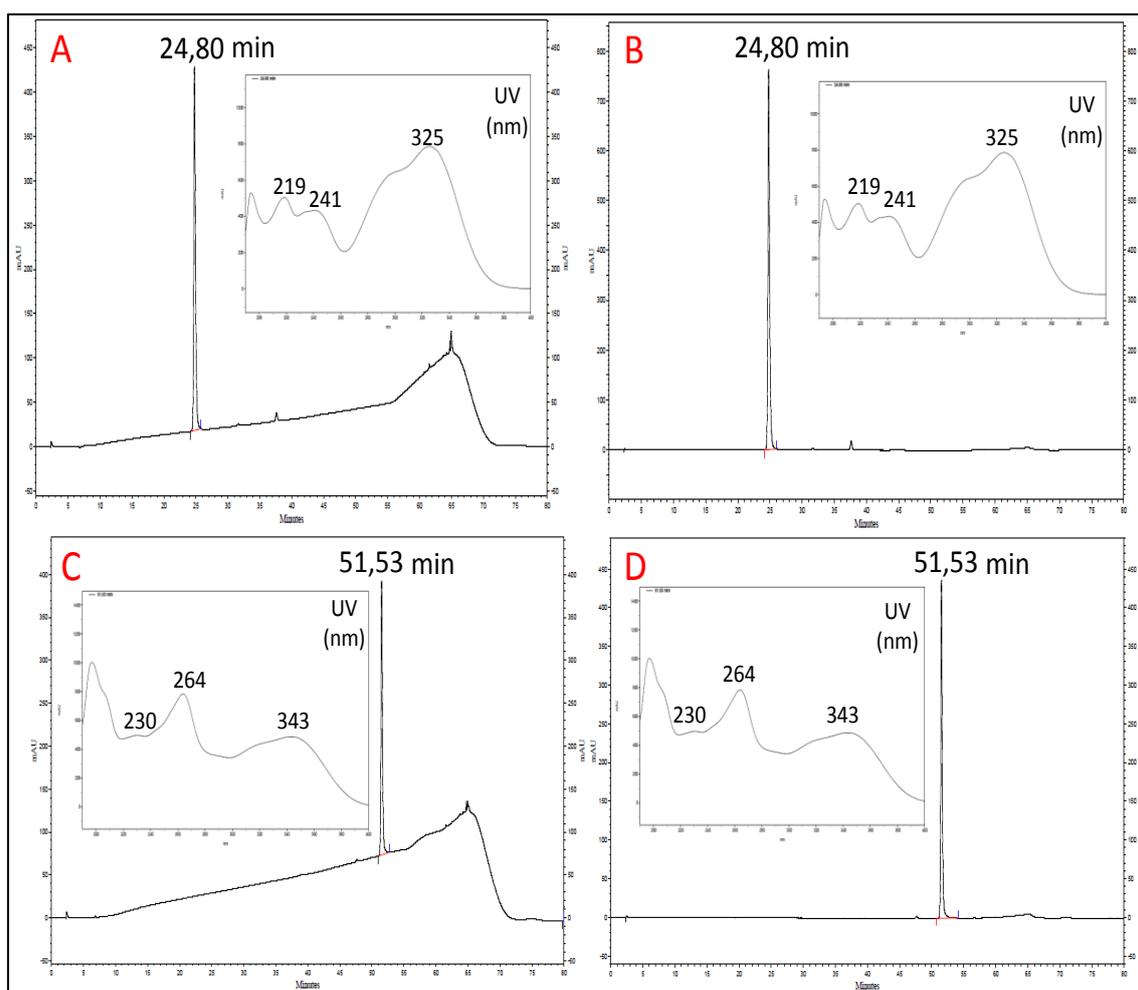


Figura 26. Cromatograma e espectro de ultravioleta correspondente à solução padrão de: ácido clorogênico (c = 0,50 mg/ml) a 280 nm (A) e a 320 nm (B); campferitrina (c = 0,60 mg/ml) a 280 nm (C) e a 320 nm (D). Condições de análise: ver item 3.8

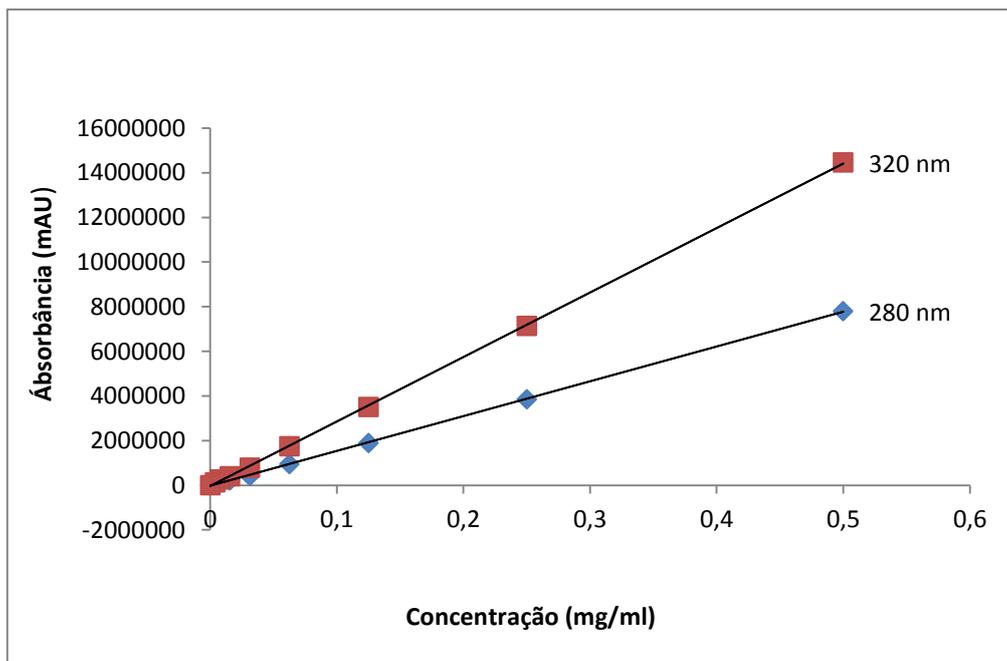


Figura 27. Representação gráfica das retas de calibração da área do pico referente ao ácido clorogênico em função da concentração avaliadas a 280 nm e 320 nm

Tabela 20 – Parâmetros estatísticos das retas de calibração apresentada na figura 27

λ (nm)	Declive (mAU l/g)	Ordenada na origem (mAU)	Coefficiente de correlação, r	Limite de detecção, LDD (mg/ml)	Limite de quantificação, LDQ (mg/ml)
280	$(1,561 \pm 0,017) \times 10^7$	$(-2,5 \pm 3,3) \times 10^4$	0,9999	$6,5 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-2}$
320	$(2,891 \pm 0,030) \times 10^7$	$(-4,1 \pm 5,8) \times 10^4$	0,9999	$6,3 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-2}$

De acordo com as equações obtidas para as retas de calibração, o método de quantificação do ácido clorogênico apresentou resposta linear dentro da gama avaliada, pois o coeficiente de correlação r foi maior que 0,99, atendendo ao critério mínimo aceitável estabelecido pela ISO 17025 para métodos de quantificação [88]. A partir dos dados das curvas de calibração foi possível estimar, para a monitorização a 280 nm, um LDD de $6,5 \times 10^{-3}$ mg/ml e um LDQ de $2,1 \times 10^{-2}$ mg/ml; e para a monitorização a 320 nm um LDD de $6,3 \times 10^{-3}$ mg/ml e um LDQ de $2,1 \times 10^{-2}$ mg/ml.

A reta de calibração obtida com a detecção a 280 nm não apresentou muitos desvios entre os pontos experimentais dentro da gama de trabalho analisada, e o valor de desvio padrão ($2,2 \times 10^{-3}$) assim como o coeficiente de variação (2,0%) foram muito baixos. A incerteza associada ao declive também é muito baixa (1,1%), no entanto verifica-se que o ponto zero, zero não fica incluído na incerteza associada à ordenada na origem.

Relativamente à reta obtida a 320 nm, esta também não apresentou muitos desvios entre os pontos experimentais dentro da gama de trabalho analisada, e teve um valor baixo de desvio padrão ($2,1 \times 10^{-3}$) assim como de coeficiente de variação (1,9%). A incerteza associada ao declive é também muito baixa (1,0%), e verifica-se que o intervalo de confinça da ordenada na origem contém o ponto zero, zero.

A identificação do ácido clorogênico por HPLC-DAD nas frações FHM-EtOH/H₂O e FA-MeOH pode ser demonstrada pela presença de um pico com semelhante t_R e espectro de ultravioleta, em comparação com o padrão mostrado na figura 26A-B. Essa caracterização é corroborada pela análise por TLC apresentada nas figuras 17C e 18D, pelo menos para as amostras incluídas como FA-MeOH, a UT-1/EA FHM-EtOH/H₂O e a UT-4/EA FHM-EtOH/H₂O, com confiança. A identificação da campferitrina nas amostras UT-4/EA FHM-EtOH/H₂O e UT-4 FA-MeOH foi feita por comparação do t_R e espectro de ultravioleta com o padrão mostrado na figura 26C-D, confirmando o resultado obtido em TLC nas figuras 17C e 18D, respetivamente.

Portanto, a partir das retas de calibração e da média das áreas relativas ao sinal do ácido clorogênico a 280 e 320 nm nas diversas amostras, foi possível estimar a concentração dessa substância em cada amostra. Esses dados e o RSD das áreas relativas ao sinal do ácido clorogênico estão representados na tabela 21. A amostra UT-2 FHM-EtOH/H₂O não foi quantificada por HPLC, já que não foi possível obter um valor de área para o sinal correspondente ao ácido clorogênico.

Os cromatogramas obtidos por TLC apresentados nas figuras 17C e 18D confirmam esses resultados, já que se observam diferenças de intensidade nas bandas correspondentes ao ácido clorogênico após revelação. Além disso, no procedimento definido para EBH, a etapa de extração adicional realizada na amostra UT-1/EA ('lavagens' da fração hexânica e clorofórmica com MeOH/H₂O 9:1), aparentemente pouco elevou o conteúdo de fenólicos extraído (58,4% para 58,8%) (tabela 12); contudo favoreceu a extração do ácido clorogênico, que aumentou aproximadamente 135% (tabela 21).

Tabela 21 – Concentração estimada de ácido clorogênico por HPLC-DAD nas amostras a partir da reta de calibração apresentada na figura 27

Amostras	Média das áreas * (mAU)		Desvio padrão relativo das áreas (%)		C ±t sx (mg/ml)	
	280	320	280	320	280	320
λ (nm)						
UT-1 FA-MeOH	1,57 x 10 ⁶	2,75 x 10 ⁶	2,79	0,34	(10,21 ± 0,34) x 10 ⁻²	(9,66 ± 0,32) x 10 ⁻²
UT-2 FA-MeOH	1,47 x 10 ⁶	1,77 x 10 ⁶	3,55	0,85	(9,57 ± 0,34) x 10 ⁻²	(6,27 ± 0,33) x 10 ⁻²
UT-3 FA-MeOH	2,99 x 10 ⁶	5,11 x 10 ⁶	1,25	0,51	(19,34 ± 0,35) x 10 ⁻²	(17,81 ± 0,34) x 10 ⁻²
UT-4 FA-MeOH	1,51 x 10 ⁶	2,75 x 10 ⁶	2,51	0,78	(98,45 ± 0,34) x 10 ⁻²	(96,65 ± 0,33) x 10 ⁻²
UT-5 FA-MeOH	1,81 x 10 ⁶	3,07 x 10 ⁶	3,86	1,41	(11,75 ± 0,34) x 10 ⁻²	(10,75 ± 0,33) x 10 ⁻²
UT-1/EA FHM- EtOH/H ₂ O	1,54 x 10 ⁵	2,39 x 10 ⁵	5,68	1,84	(1,15 ± 0,36) x 10 ⁻²	(0,98 ± 0,34) x 10 ⁻²
UT-1 FHM- EtOH/H ₂ O	4,42 x 10 ⁴	9,34 x 10 ⁴	2,00	2,35	(0,48 ± 0,36) x 10 ⁻²	(0,42 ± 0,35) x 10 ⁻²
UT-3 FHM- EtOH/H ₂ O	7,24 x 10 ⁴	1,45 x 10 ⁵	1,87	2,97	(0,63 ± 0,36) x 10 ⁻²	(0,62 ± 0,35) x 10 ⁻²
UT-4/EA FHM- EtOH/H ₂ O	1,41 x 10 ⁶	2,59 x 10 ⁶	2,13	2,05	(9,16 ± 0,34) x 10 ⁻²	(9,11 ± 0,33) x 10 ⁻²

*Média de triplicados.

Considerando os valores de LDD e LDQ e pela análise da tabela 20 é possível afirmar que as amostras UT-1 FHM-EtOH/H₂O e UT-3 FHM-EtOH/H₂O estão abaixo do LDD e a amostra UT-1/EA FHM-EtOH/H₂O está abaixo do LDQ. Isso explica a elevada incerteza dessas amostras (81,0%, 57,8% e 24,1%, respectivamente) em 280 nm e (74,5%, 53,6% e 35,3%, respectivamente) avaliada a 320 nm. Todas as outras amostras quantificadas possuem valores de concentração que se situam acima do LDQ. Pode-se verificar que o método de extração com metanol seguido de partição ácido-base é mais seletivo que a extração hidroalcoólica na obtenção de ácido clorogênico das folhas de *Uncaria tomentosa*.

Apesar das amostras UT-1 FHM-EtOH/H₂O e UT-3 FHM-EtOH/H₂O não possuírem quantidades de ácido clorogênico detetável e na amostra UT-2 FHM-EtOH/H₂O não ser possível estimar a sua concentração; estas revelam outros compostos fenólicos, como demonstraram os sinais obtidos por TLC (figura 17C) e os cromatogramas correspondentes (figuras 34 a 36). As bandas de coloração azul

correspondem a fenóis pertencentes à classe de ácidos fenólicos e cumarinas [82]. Além disso, alguns sinais do cromatograma dessas amostras não aparecem nas placas de TLC revelados com NP-PEG. Contudo, sabe-se que há substâncias fenólicas que não respondem colorimetricamente à ação desse reagente cromatográfico [82].

Os cromatogramas e espectros de ultravioleta do ácido clorogênico (t_R 24,5-25,2 min) e da campferitrina ($t_R \sim 51,5$ min) das frações FA-MeOH e FHM-EtOH/H₂O realizadas para todas as amostras com detecção a 280 e 320 nm são apresentados nas figuras 28-37. As pequenas variações que ocorreram no t_R do ácido clorogênico devem-se possivelmente às oscilações de pressão do equipamento utilizado.

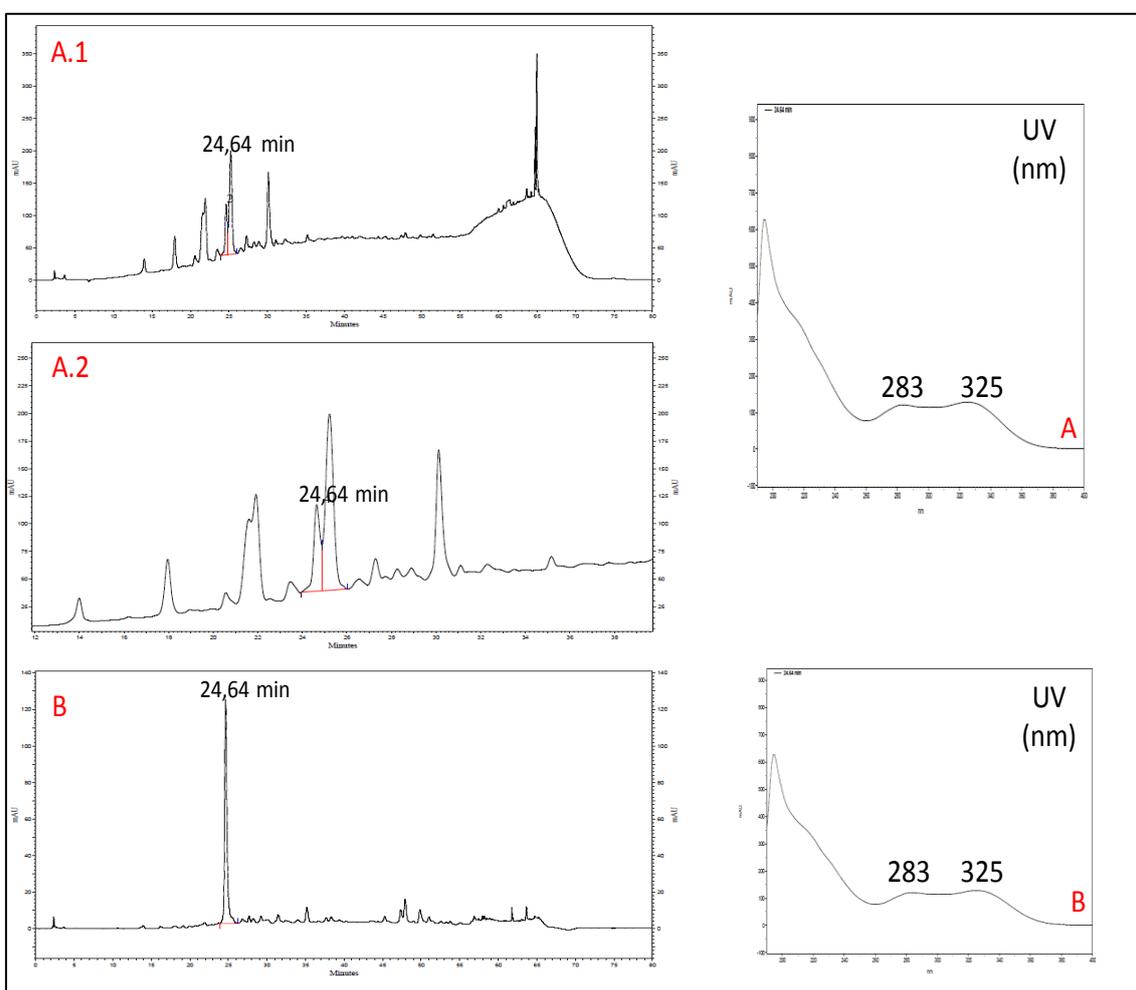


Figura 28. Cromatograma da amostra UT-1 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

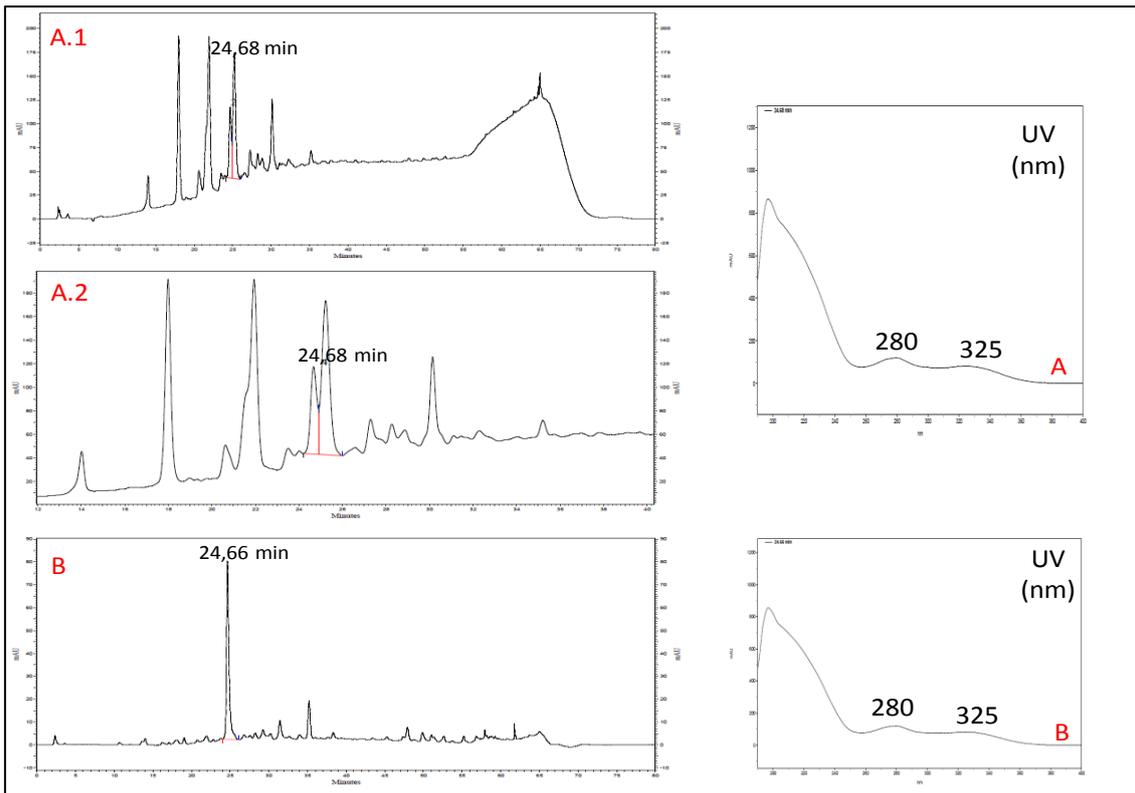


Figura 29. Cromatograma da amostra UT-2 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

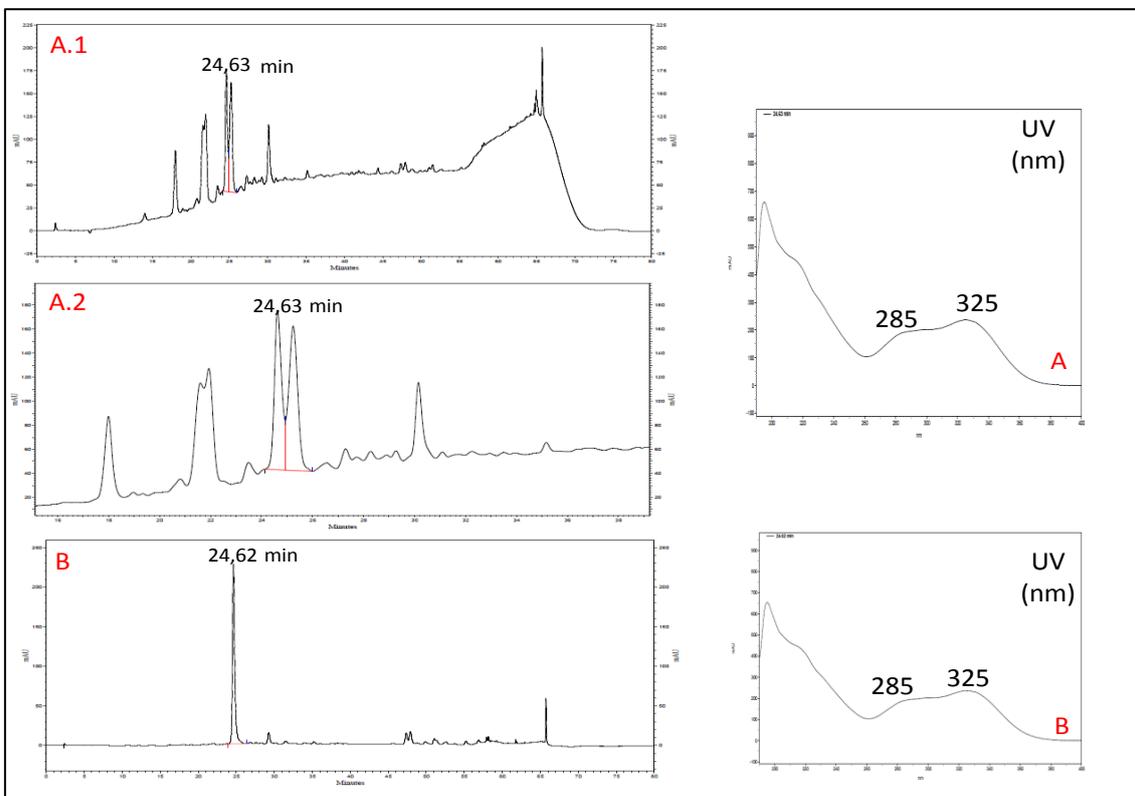


Figura 30. Cromatograma da amostra UT-3 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

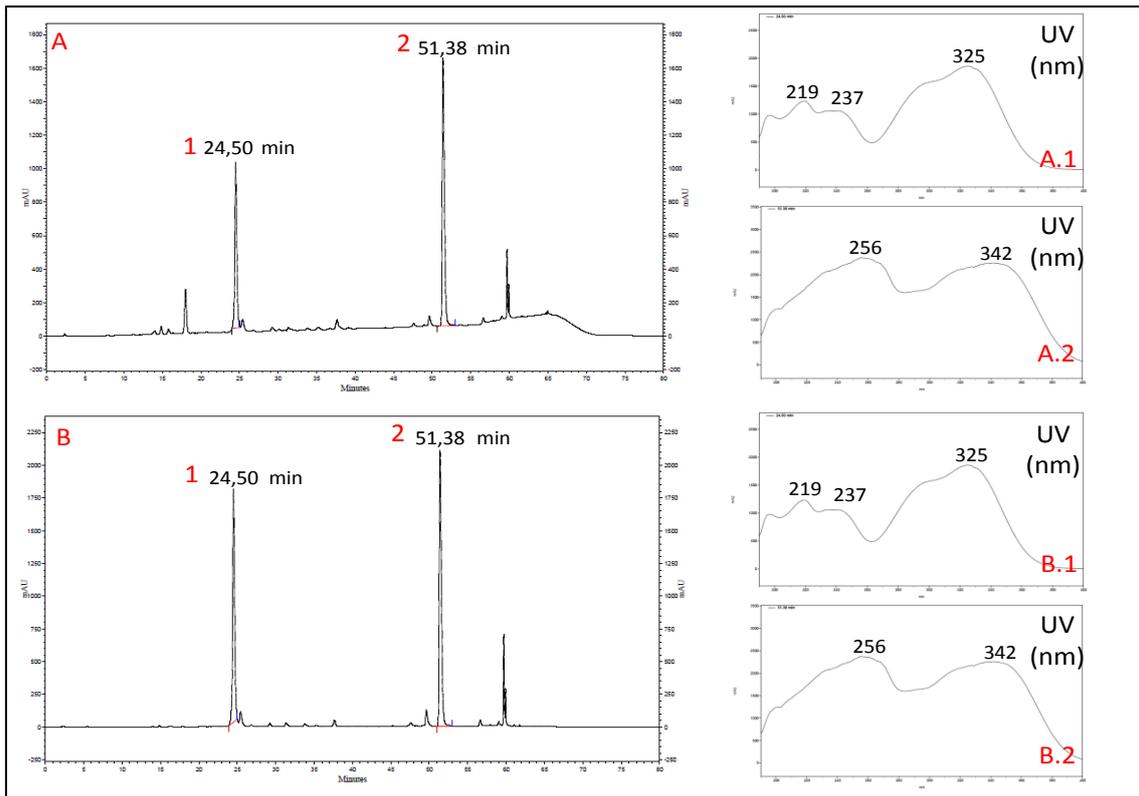


Figura 31. Cromatograma da amostra UT-4 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico (1) e campferitrina (2) com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Condições de análise: ver item 3.8

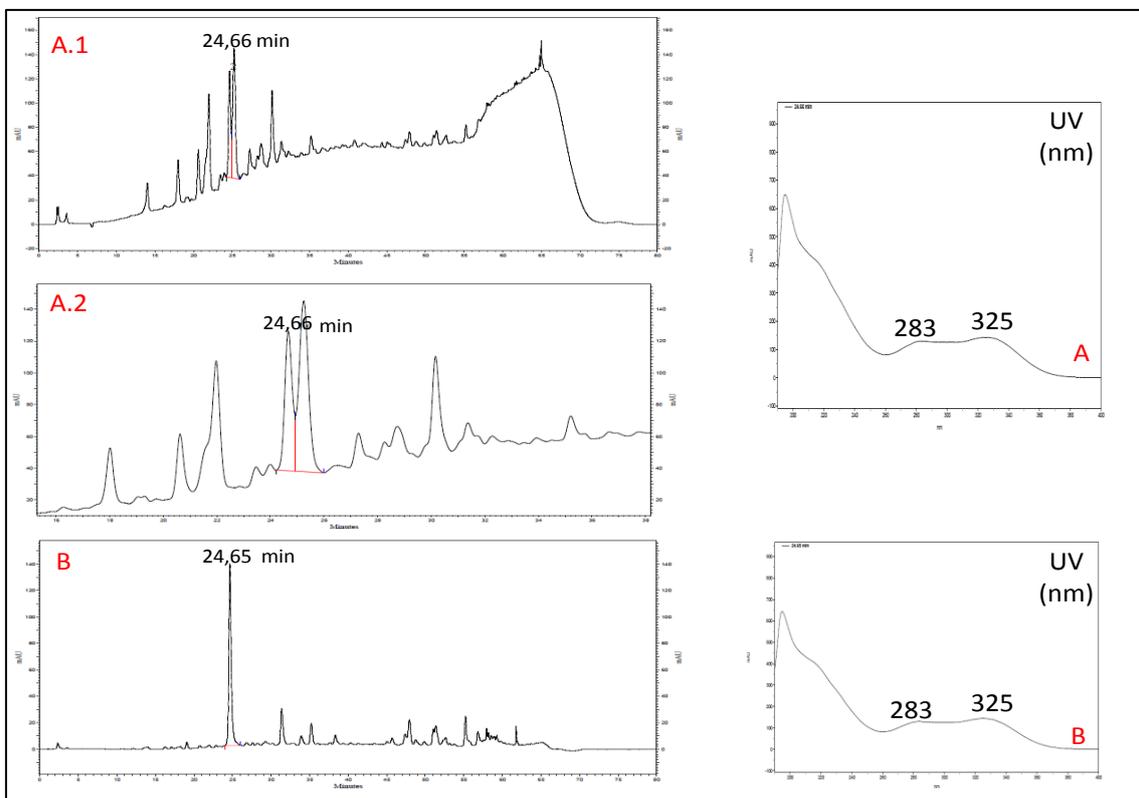


Figura 32. Cromatograma da amostra UT-5 FA-MeOH e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

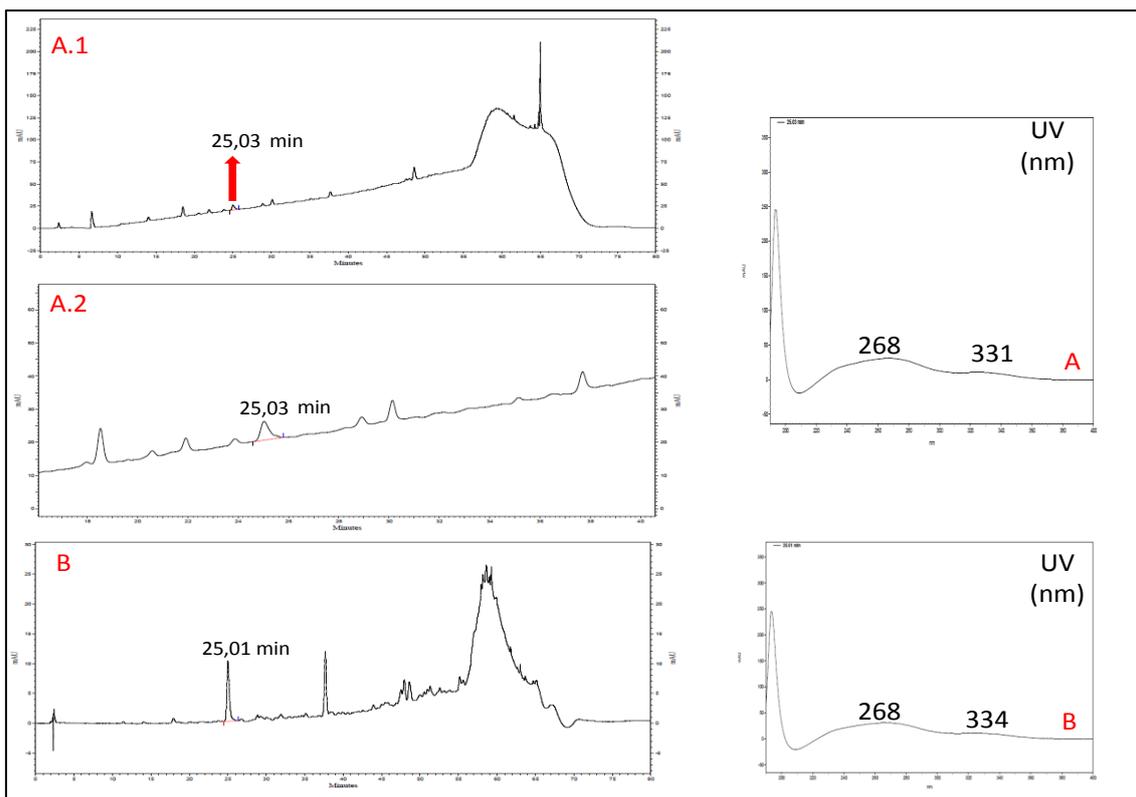


Figura 33. Cromatograma da amostra UT-1/EA FHM-EtOH/H₂O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

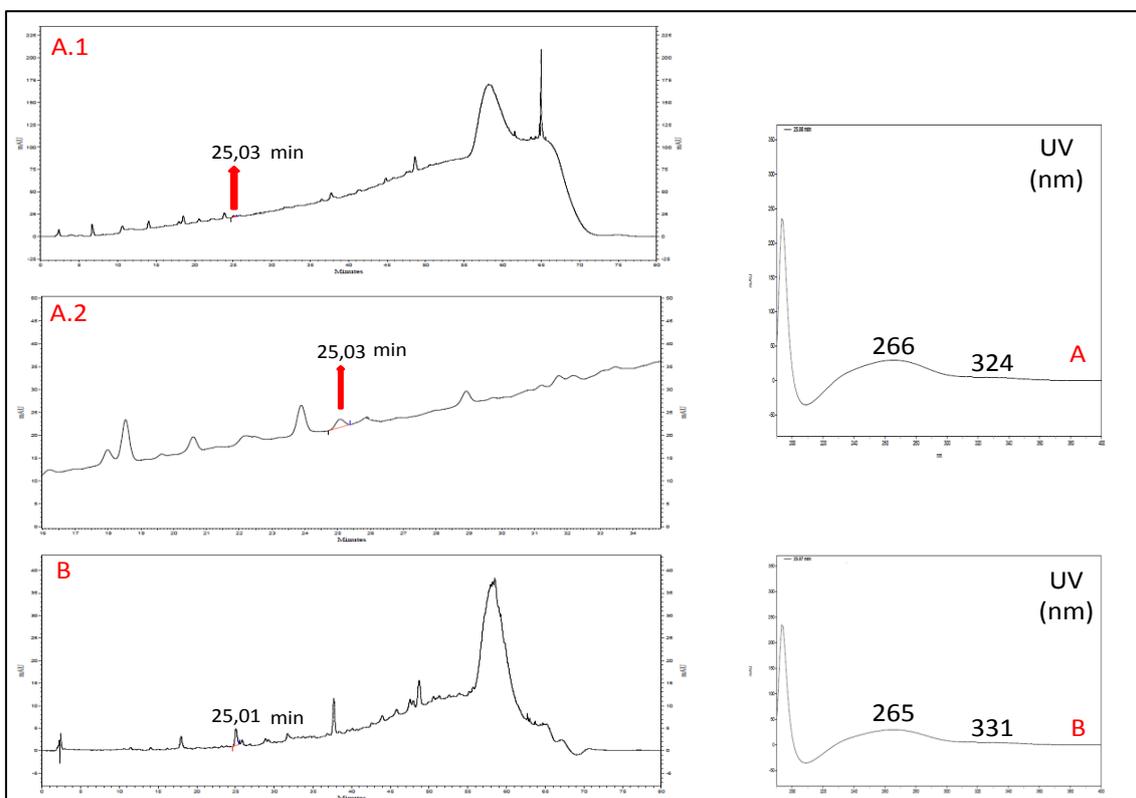


Figura 34. Cromatograma da amostra UT-1 FHM-EtOH/H₂O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

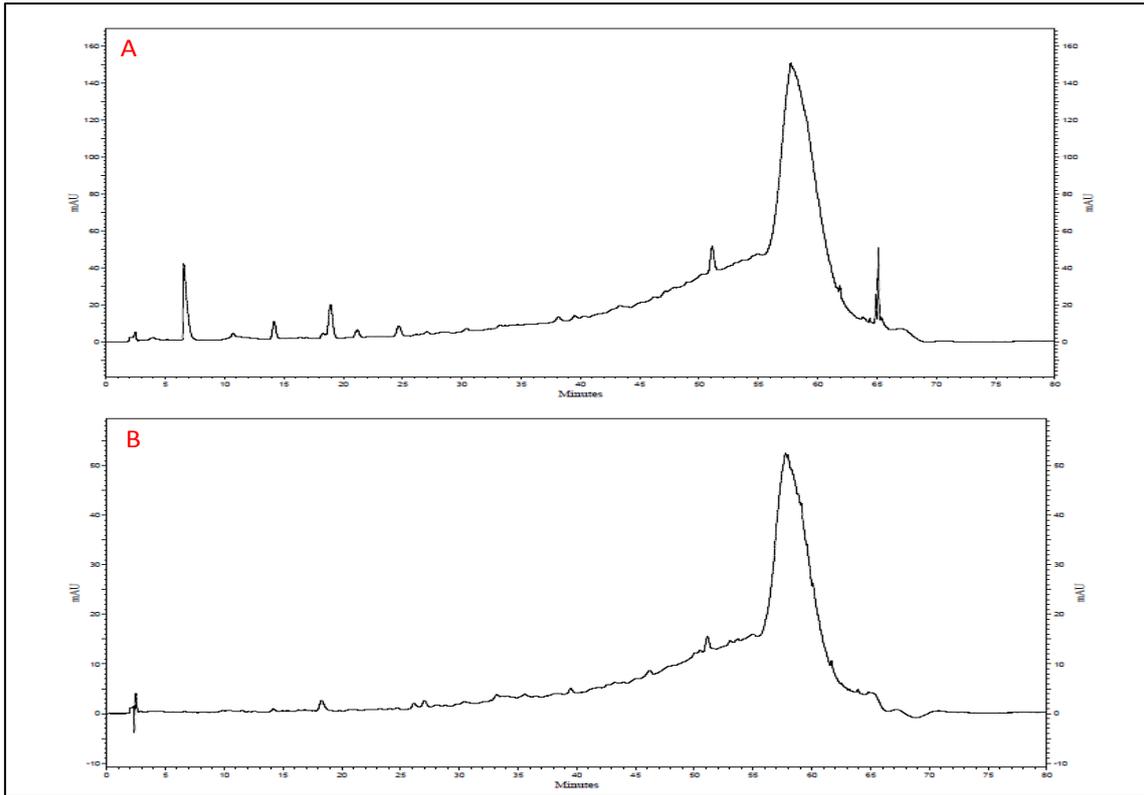


Figura 35. Cromatograma da amostra UT-2 FHM-EtOH/H₂O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

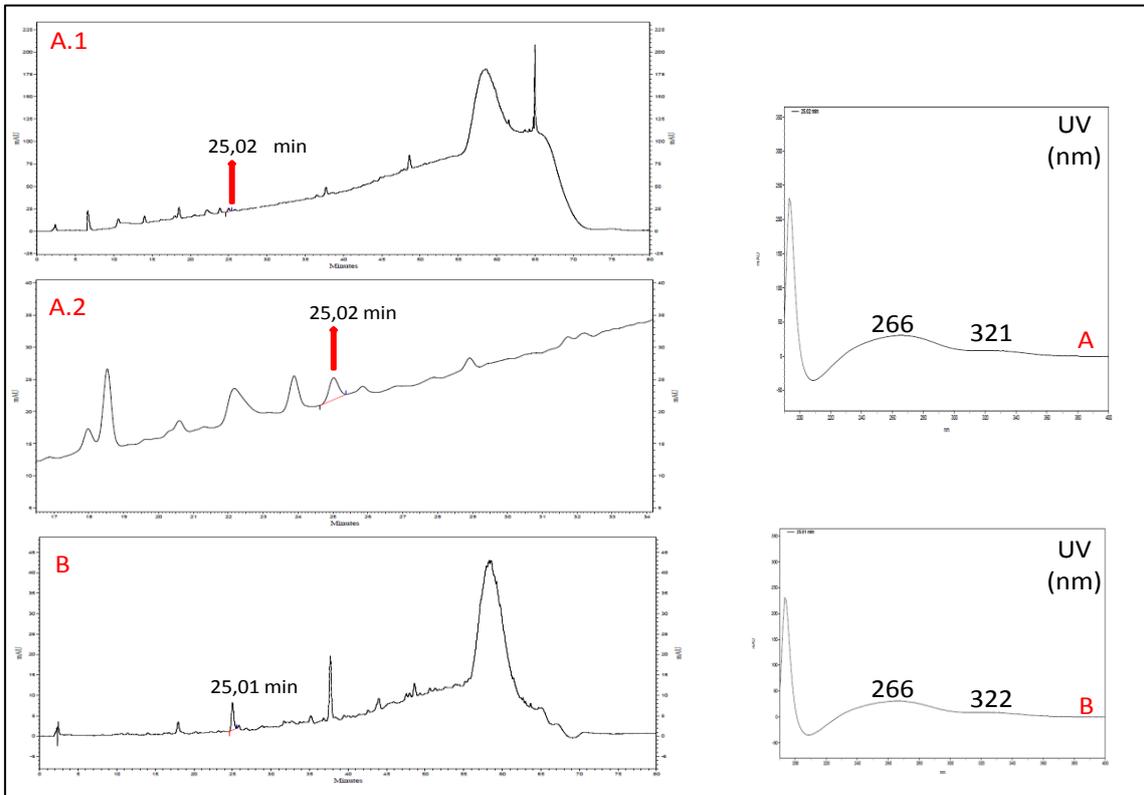


Figura 36. Cromatograma da amostra UT-3 FHM-EtOH/H₂O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). (A.1) = Cromatograma completo da análise; (A.2) = Zona ampliada junto ao pico do ácido clorogênico. Condições de análise: ver item 3.8

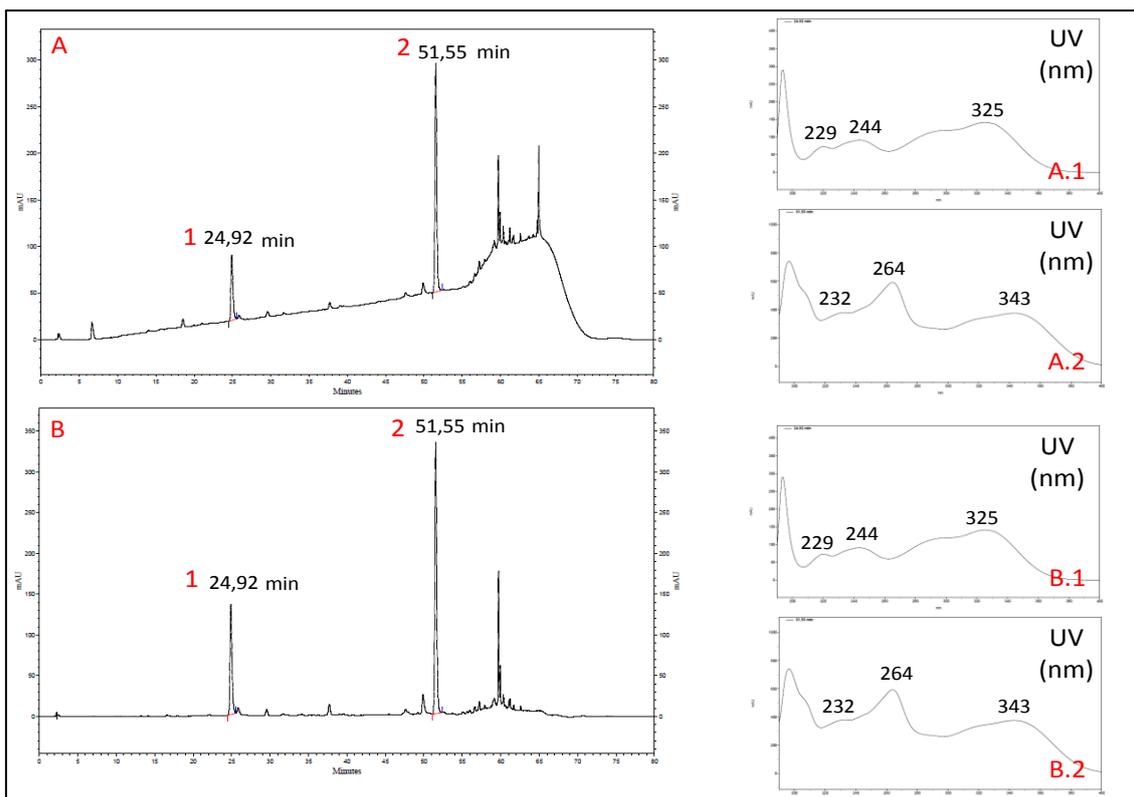


Figura 37. Cromatograma da amostra UT-4/EA FHM-EtOH/H₂O e espectro de ultravioleta do ácido clorogênico (1) e campferitina (2) com detecção a 280 nm (A) e 320 nm (B). Condições de análise: ver item 3.8

Analisando os cromatogramas das figuras 28-30 e 32-36 para as amostras UT-1, UT-2, UT-3 e UT-5, observa-se que o sinal do ácido clorogênico a 280 nm está sobreposto com outro sinal não identificado. Uma das causas de diferença nos valores de concentração do ácido clorogênico dessas amostras a 280 nm, em comparação com os valores obtidos em 320 nm, deve-se possivelmente a essa sobreposição. Além disso, verifica-se que as frações FA-MeOH e FHM-EtOH/H₂O contêm, em grande parte, misturas de compostos fenólicos, e que os cromatogramas com detecção a 280 nm para as frações FA-MeOH são muito mais complexos que os cromatogramas a 320 nm. Um perfil cromatográfico similar foi obtido por Gonçalves e cols. [29] que analisaram extratos obtidos da casca da *Uncaria tomentosa* e atribuíram a presença de proantocianidinas (taninos condensados) como a causa dessa complexidade. Contudo, os cromatogramas das frações FA-MeOH e FHM-EtOH/H₂O (da amostra UT-4) apresentam perfis diferentes das restantes amostras. Além disso, esta é a única amostra na qual foi identificada o flavonoide campferitina.

Ensaio de recuperação do padrão foram realizados em dois níveis de concentração (0,12₅ e 0,031₂ mg/ml) com três réplicas cada, para duas amostras e duas soluções padrão. Os resultados desses ensaios estão apresentados nas tabelas 22 e 23. Esses

resultados permitiram validar os resultados, uma vez que as quantificações das amostras e das soluções padrão foram efetuadas em ocasiões diferentes. Além disso, estes dados sugerem que o método apresenta uma boa exatidão, pois o erro relativo calculado foi inferior a 1% [88]. Contudo, observa-se que os valores de erro relativo são maiores nas amostras monitorizadas a 280 nm, mostrando novamente que a sobreposição do ácido clorogênico com outro sinal aumenta a ocorrência de erros sistemáticos na análise.

Tabela 22 – Ensaios de recuperação de amostras e soluções padrão com detecção efetuada a 280 nm

Amostras	Concentração antes da fortificação (mg/ml)	Concentração média após fortificação (mg/ml)		Taxa de recuperação (%)		Erro relativo (%)	
		0,12 ₅	0,031 ₂	0,12 ₅	0,031 ₂	0,12 ₅	0,031 ₂
UT-3 FA-MeOH	19,34 x 10 ⁻²	3,1 ₅ x 10 ⁻¹	2,2 ₅ x 10 ⁻¹	97,5	103	0,98	0,38
UT-5 FA-MeOH	11,75 x 10 ⁻²	2,4 ₁ x 10 ⁻¹	1,4 ₉ x 10 ⁻¹	98,5	102	0,79	0,52
Ácido clorogênico (0,25 mg/ml)	0,25	3,7 ₅ x 10 ⁻¹	2,8 ₂ x 10 ⁻¹	100	101	0,13	0,15
Ácido clorogênico (0,062 ₅ mg/ml)	0,062 ₅	1,8 ₆ x 10 ⁻¹	9,3 ₈ x 10 ⁻²	98,9	100	0,71	0,11

Tabela 23 – Ensaios de recuperação de amostras e soluções padrão com detecção efetuada a 320 nm

Amostras	Concentração antes da fortificação (mg/ml)	Concentração média após fortificação (mg/ml)		Taxa de recuperação (%)		Erro relativo (%)	
		0,12 ₅	0,031 ₂	0,12 ₅	0,031 ₂	0,12 ₅	0,031 ₂
UT-3 FA-MeOH	17,81 x 10 ⁻²	3,0 ₅ x 10 ⁻¹	2,1 ₀ x 10 ⁻¹	101	101	0,62	0,20
UT-5 FA-MeOH	10,75 x 10 ⁻²	2,3 ₁ x 10 ⁻¹	1,3 ₉ x 10 ⁻¹	99,1	101	0,47	0,34
Ácido clorogênico (0,25 mg/ml)	0,25	3,7 ₄ x 10 ⁻¹	2,8 ₁ x 10 ⁻¹	99,1	101	0,31	0,11
Ácido clorogênico (0,062 ₅ mg/ml)	0,062 ₅	1,8 ₈ x 10 ⁻¹	9,3 ₇ x 10 ⁻²	101	100	0,48	0,10

Na tabela 24 está apresentada a concentração de ácido clorogênico nas frações FA-MeOH e FHM-EtOH/H₂O e os respectivos rendimentos, e o teor de ácido clorogênico de cada fração em mg por 1 g de amostra de folhas secas de *Uncaria tomentosa*.

Tabela 24 – Comparação dos valores de concentração, rendimento e teor de ácido clorogênico nas amostras de *Uncaria tomentosa* avaliados a dois comprimentos de onda

Amostras	C ± t sx (mg/ml)		Rendimento (m/m) (%)	Teor ± s teor (mg/g)	
	280 nm	320 nm		280 nm	320 nm
UT-1 FA-MeOH	$(10,21 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$(9,66 \pm 0,32) \times 10^{-2}$	17,9	0,36 ± 0,01	0,34 ± 0,02
UT-2 FA-MeOH	$(9,57 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$(6,27 \pm 0,33) \times 10^{-2}$	12,9	0,33 ± 0,01	0,22 ± 0,01
UT-3 FA-MeOH	$(19,34 \pm 0,35) \times 10^{-2}$	$(17,81 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	10,9	0,58 ± 0,02	0,54 ± 0,01
UT-4 FA-MeOH	$(98,45 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$(96,65 \pm 0,33) \times 10^{-2}$	12,4	1,73 ± 0,05	1,71 ± 0,05
UT-5 FA-MeOH	$(11,75 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$(10,75 \pm 0,33) \times 10^{-2}$	16,0	0,15 ± 0,01	0,14 ± 0,01
UT-1/EA FHM-EtOH/H ₂ O	Abaixo do LDQ	Abaixo do LDQ	58,8	**	**
UT-1 FHM-EtOH/H ₂ O	Abaixo do LDD	Abaixo do LDD	58,4	**	**
UT-3 FHM-EtOH/H ₂ O	Abaixo do LDD	Abaixo do LDD	54,8	**	**
UT-4/EA FHM-EtOH/H ₂ O	$(9,16 \pm 0,34) \times 10^{-2}$	$(9,11 \pm 0,33) \times 10^{-2}$	40,2	1,77 ± 0,06	1,75 ± 0,06

*Não calculado

Pavei e cols. [50] identificaram o ácido clorogênico em amostras de cascas e raízes de *Uncaria tomentosa*, porém o teor em relação à planta seca não foi apresentado. Não há relatos na literatura sobre identificação e quantificação de compostos fenólicos presentes em folhas dessa espécie e da presença do ácido clorogênico na *Uncaria guianensis*.

Através da obtenção de um perfil cromatográfico obtido por TLC e HPLC-DAD diferente das restantes amostras e da presença do flavonol campferitrina, constata-se que a amostra UT-4, adquirida num mercado popular, possui características químicas similares à espécie *U. guianensis*, principalmente devido à presença marcante de campferitrina, e também pelo seu conteúdo em ácido clorogênico atingir cerca de 3 vezes o presente nas outras amostras. No entanto, os aspetos macroscópicos da planta adquirida são mais compatíveis com a espécie *U. tomentosa*, principalmente pela

morfologia das folhas e espinhos. Portanto, é possível que esta planta represente a uma terceira espécie de *Uncaria* diferente das duas citadas.

4.4 Caracterização por UPLC-DAD-MS dos marcadores químicos nos extratos enriquecidos em alcaloides e polifenóis de *Uncaria tomentosa*

Com o objetivo de caracterizar os extratos preparados em relação aos perfis químicos enriquecidos em alcaloides e polifenóis, as quatro amostras selecionadas foram submetidas à análise por UPLC-MS, pesquisando no primeiro caso, a presença de mitrafilina e no segundo, a presença de ácido clorogênico. Este estudo foi complementado com a pesquisa da presença do flavonoide campferitrina, cuja presença em quantidade elevada foi indicada na amostra UT-4. Assim, foram escolhidas as amostras UT-2 FB-MeOH e UT-4 FB-MeOH para determinação de mitrafilina; e as amostras UT-2 FA-MeOH e UT-4 FA-MeOH para determinação do ácido clorogênico e da campferitrina. As três substâncias de referência utilizadas foram obtidas em estudos prévios pelo grupo de pesquisa da Fiocruz (Rio de Janeiro, Brasil), ou adquiridas comercialmente (ver item 3.1).

O procedimento experimental e as condições cromatográficas utilizadas para as análises por UPLC-DAD-MS estão descritos detalhadamente na seção 3.9. A escolha das condições de análise obedeceu a parâmetros de transposição dos experimentos de quantificação das amostras em função da mitrafilina e do ácido clorogênico. Para a mitrafilina, foram ajustadas as condições descritas por Mazzei [79] (item 3.7). Para o ácido clorogênico e campferitrina, foram ajustadas as condições descritas por Gonçalves e cols. [29] (item 3.8). Em princípio, as análises dos perfis alcaloídicos e fenólicos poderiam ser realizadas com uma coluna única LiChrocart (125 x 2,0 mm) com fase LiChrospher RP18 (5 µm). No entanto, a análise dos fenóis nas amostras UT-2 FA-MeOH e UT-4 FA-MeOH, com base nos padrões do ácido clorogênico e campferitrina, não foi adequada, apesar das variações ensaiadas nas condições utilizadas; já que não foi possível reproduzir o perfil cromatográfico obtido para esses padrões nas análises por HPLC-DAD. Este obstáculo foi resolvido pela transposição das condições utilizadas por Gonçalves e cols. [29] recorrendo a uma coluna Phenomenex (100 x 3,0 mm) com fase RP18 (2,6 µm).

Os cromatogramas e os espectros de massas correspondentes obtidos para as amostras selecionadas estão apresentados nas subseções seguintes.

4.4.1 Análise dos alcaloides nas amostras UT-2 FB-MeOH e UT-4 FB-MeOH

A mitrafilina apresenta massa molecular de aproximadamente 368,5 u.m.a. (unidade de massa atômica). Por apresentar grupos básicos, o modo de ionização escolhido foi o positivo ($[M + H]^+$), e o sinal no espectro de massa com maior m/z (ião molecular M^+) corresponde à massa molecular de aproximadamente 369,5. Esse valor esperado pode ser estendido aos restantes POA, considerando que são isômeros conformacionais. No caso dos TOA, que possuem massa molecular de aproximadamente 384,5 u.m.a., a relação m/z esperada para o ião molecular em modo positivo de ionização é de 385,5.

Na figura 38A, B e C está representado, o perfil cromatográfico do padrão mitrafilina (A); o cromatograma com monitorização de iões identificadores do padrão mitrafilina realizado para m/z 369,5 (B); e os espectros de massas no modo de ionização positivo para os dois sinais que aparecem no cromatograma do padrão (C), respetivamente. Os cromatogramas foram monitorizados a 245 nm.

A análise da mitrafilina ($c = 0,20$ mg/ml) em UPLC apresentou dois sinais, ambos com mesmo espectro de ultravioleta (dados não mostrados), mostrando-se idêntico ao padrão na figura 19. O sinal com t_R 5,28 min é referente à substância em análise, correspondendo ao sinal majoritário do cromatograma (87,2% da área total). O sinal com t_R 7,06 min (12,8% da área total), não teve sua identificação confirmada. Segundo Bertol [87], que obteve um cromatograma similar, esse sinal seria referente ao alcaloide pteropodina, já que este e a mitrafilina apresentam interconversão quando em solução.

Na figura 39 está apresentado, o perfil cromatográfico (A.1), o cromatograma com monitorização de iões identificadores realizados para m/z 369,5 (A.2) e m/z 385,5 (A.3), e os espectros de massa no modo positivo (B), para a amostra UT-2 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml), respetivamente; e na figura 40, apresenta-se os resultados obtidos para a amostra UT-4 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml). Os cromatogramas foram monitorizados a 245 nm.

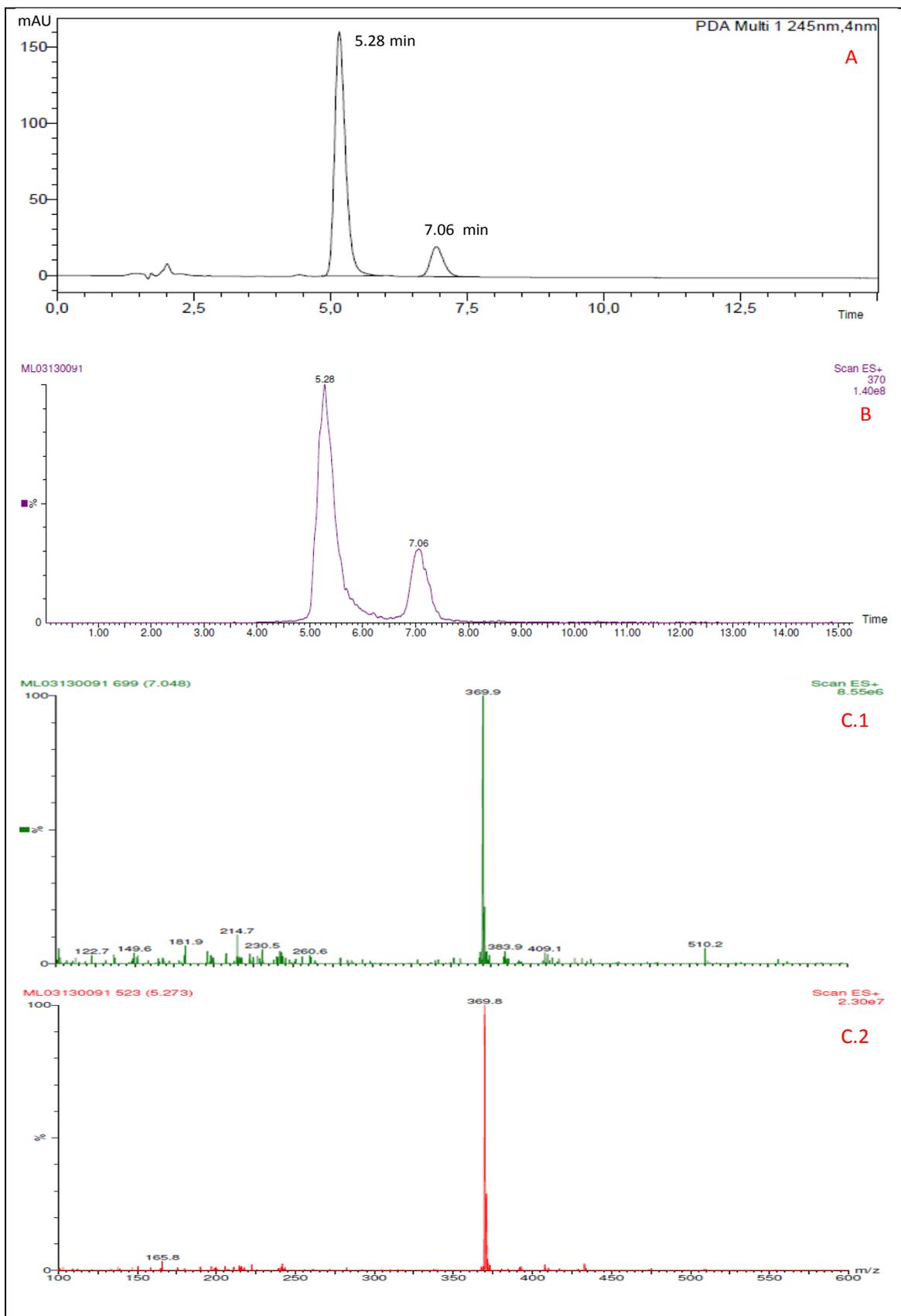


Figura 38. (A) Perfil cromatográfico da mitrafilina ($c = 0,20$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS. (B) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5. (C) Espectros de massas obtidos para os dois sinais no modo positivo. C.1: $t_R \sim 7,05$ min; C.2: $t_R \sim 5,27$ min. Condições de análise: ver item 3.9.

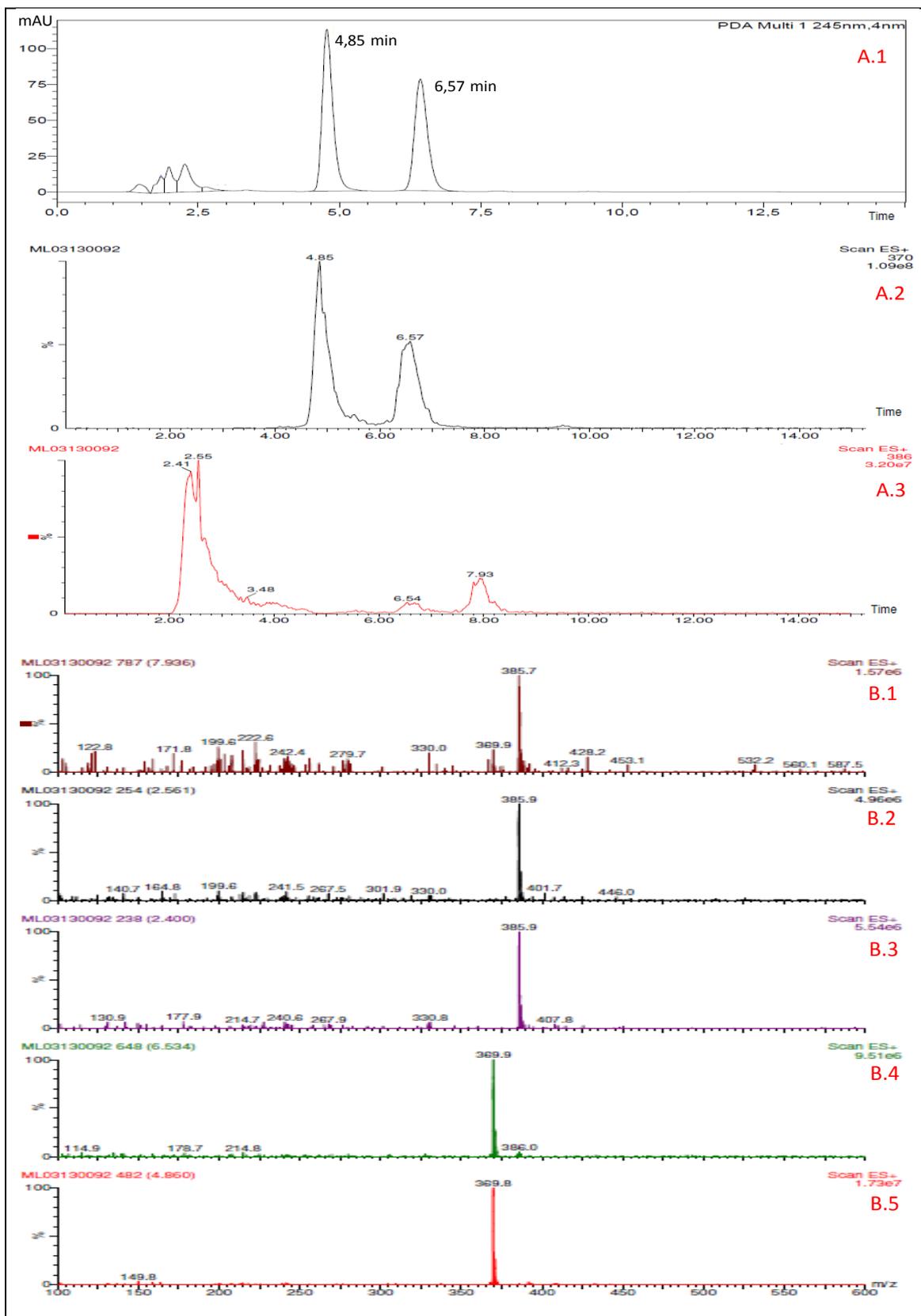


Figura 39. (A.1) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml). (A.2) e (A.3) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5 e m/z 385,5, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de. B.1: 7,94 min; B.2: 2,56 min; B.3: 2,40 min ($[M + H]^+$) = 386 (u.m.a.); B.4: 6,53 min; B.5: 4,86 min ($[M + H]^+$) = 370 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9

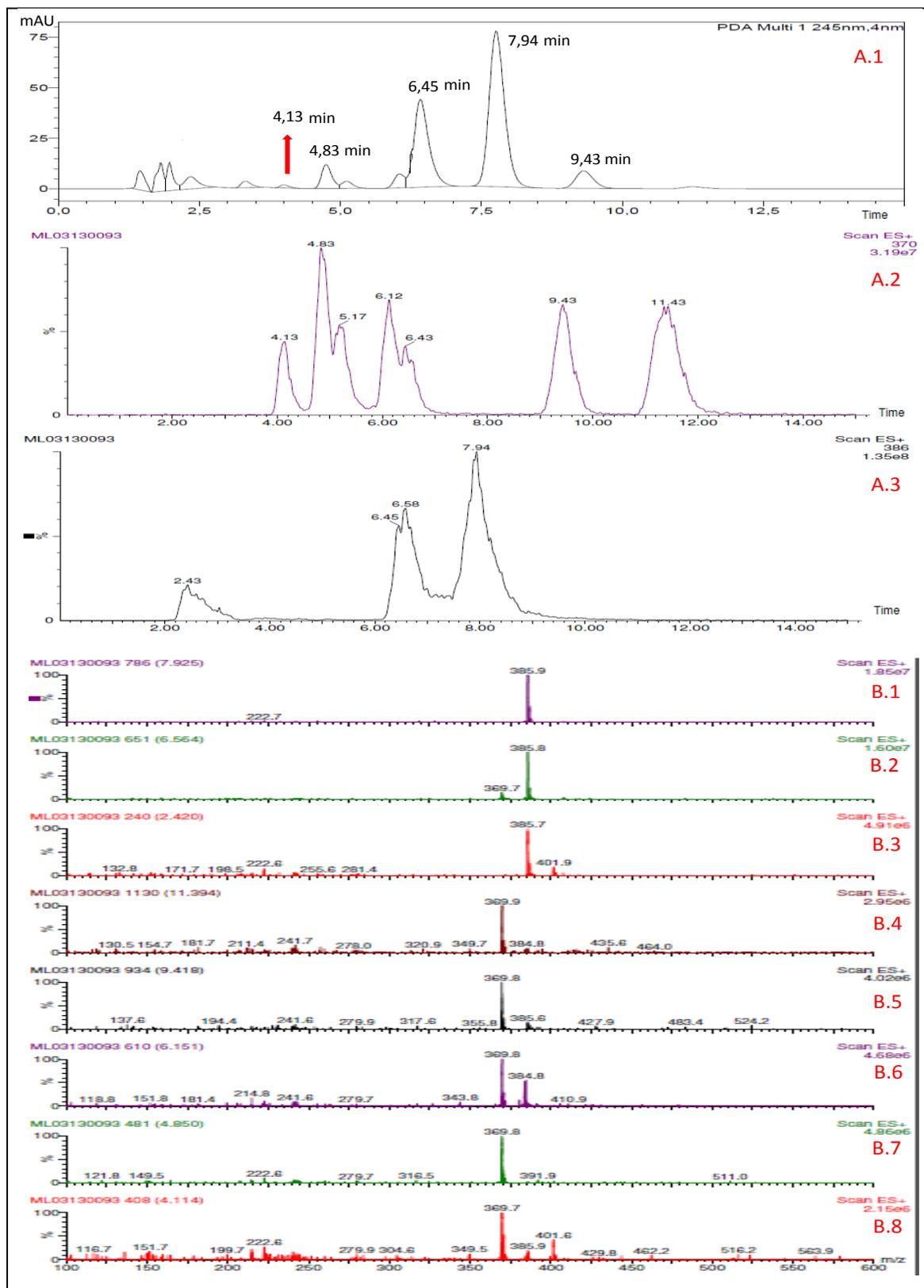


Figura 40. (A.1) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FB-MeOH ($c = 0,20$ mg/ml). (A.2) e (A.3) Cromatograma com monitorização de iões identificadores realizado para m/z 369,5 e m/z 385,5, respetivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 7,92 min; B.2: 6,56 min; B.3: 2,42 min ($[M + H]^+$) = 386 (u.m.a.); B.4: 11,39 min; B.5: 9,42 min; B.6: 6,15 min; B.7: 4,85 min; B.8: 4,11 min ($[M + H]^+$) = 370 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9

Da análise dos resultados das amostras caracterizadas por UPLC, pode-se verificar que o sinal referente à mitrafilina apresentou $t_R \sim 4,85$ min. Houve uma pequena diferença em relação ao t_R da substância de referência apresentada na figura 38, contudo esta foi identificada nas amostras UT-2 e UT-4 FA-MeOH por comparação do seu perfil cromatográfico e espectro de ultravioleta obtido por UPLC (dados não mostrados), com seu perfil cromatográfico e espectro obtido por HPLC (Figuras 22 e 24, respetivamente).

O alcaloide com $t_R \sim 6,57$ min na amostra UT-2 FA-MeOH apresentou o mesmo valor de m/z para o pico base em comparação com o espectro de massas da mitrafilina, sugerindo que pertence à classe dos POA. Esse resultado está de acordo com a sugestão feita anteriormente, quando a mesma amostra foi analisada por HPLC, ocasião em que se indicou esse alcaloide como possivelmente a isomitrafilina ou pteropodina. O mesmo ocorre para o alcaloide (sugerido como especiofilina) com $t_R \sim 4,13$ min na amostra UT-4 FA-MeOH. Este apresentou valor de m/z para o pico base idêntico ao da mitrafilina. Todavia, o alcaloide com $t_R \sim 7,92$ min da amostra UT-4 FA-MeOH, que apresentou mesmo R_F correspondente à isopteropodina por TLC (Figura 18B), forneceu m/z 385,9 para o pico base, sugerindo que pertence à classe dos TOA.

Pelos espectros de massa apresentados nas figuras 39 (B.1, B.2 e B.3) e figuras 40 (B.1, B.2 e B.3), evidencia-se a presença de TOAs nas amostras analisadas. Esse resultado está de acordo com Keplinger e cols. [16], que demonstraram que uma mesma espécie pode produzir e armazenar POA em um determinado momento, e em outros, movimentar sua rota metabólica em direção aos TOA. Isso corrobora a possibilidade, já reportada por alguns autores [74, 75, 87], da coexistência dos dois grupos de alcaloides nas espécies de *U. tomentosa*.

4.4.2 Análise dos polifenóis nas amostras UT-2 FA-MeOH e UT-4 FA-MeOH

O ácido clorogênico, de massa molecular de aproximadamente 354,5 u.m.a, por apresentar grupos ácidos, foi ionizado negativamente, logo o sinal esperado no espectro de massa com maior m/z corresponde à massa molecular aproximadamente de 353,5 ($[M - H]^-$). Já para a campferitrina, que também possui grupos ácidos e cuja massa molecular é de aproximadamente 578 u.m.a., o valor esperado para o ião molecular no modo negativo de ionização é de m/z 577.

Na figura 41A, B e C está representado, o perfil cromatográfico do padrão ácido clorogênico a 280 nm (A.1) e a 320 nm (A.2); o cromatograma com monitorização de íões identificadores do ácido clorogênico realizado para m/z 353,5 (B); assim como o espectro de massas obtido no modo de ionização negativo para o sinal relativo ao padrão (C), respetivamente.

O cromatograma de uma solução padrão de ácido clorogênico ($c = 0,50$ mg/ml) obtido por UPLC apresentou um sinal majoritário com t_R 4,52 min, cujo espectro de ultravioleta (dados não mostrados) está de acordo com o espectro obtido por HPLC (Figura 26A-B). Os sinais minoritários (t_R 3,81, 6,34 e 6,65 min) devem ser resultantes de impurezas no produto comercial, já que a pureza era apenas $> 95\%$. O cromatograma apresentado na figura 41B (íões identificadores para m/z 353,5) indica a presença do ácido clorogênico ao t_R 4,52 min. Contudo, a presença de sinais sobrepostos indica a dificuldade de ionização que usualmente é causada por supressão iónica na presença de substâncias com características polares, que competem com o ácido clorogênico na ionização. Esta ocorrência é considerada como frequente quando se utiliza gradiente de mistura de solventes na fase móvel [91]. Adicionalmente, as condições de ionização não foram suficientemente otimizadas.

Na figura 42A, B e C está representado, o perfil cromatográfico do padrão campferitrina a 280 nm (A.1) e a 320 nm (A.2); o cromatograma com monitorização de íões identificadores da campferitrina realizado para m/z 577 (B); assim como o espectro de massas no modo de ionização negativo para o sinal relativo ao padrão (C), respetivamente.

O cromatograma do padrão campferitrina ($c = 0,60$ mg/ml) caracterizado por UPLC (figuras 42A.1 e 42A.2) apresentou um único sinal, que revelou um espectro de ultravioleta similar ao da figura 26C-D. A monitorização de íões identificadores para m/z 577 (figura 42B) gera também um perfil bastante complexo, provavelmente pelas mesmas razões expostas para o caso do ácido clorogênico. Todavia, é possível verificar claramente na figura 42B, o t_R 9,98 min, correspondente ao marcador campferitrina. O espectro de massas (figura 42C) corrobora este fato, ao detetar a massa do íon molecular m/z 577 no modo negativo.

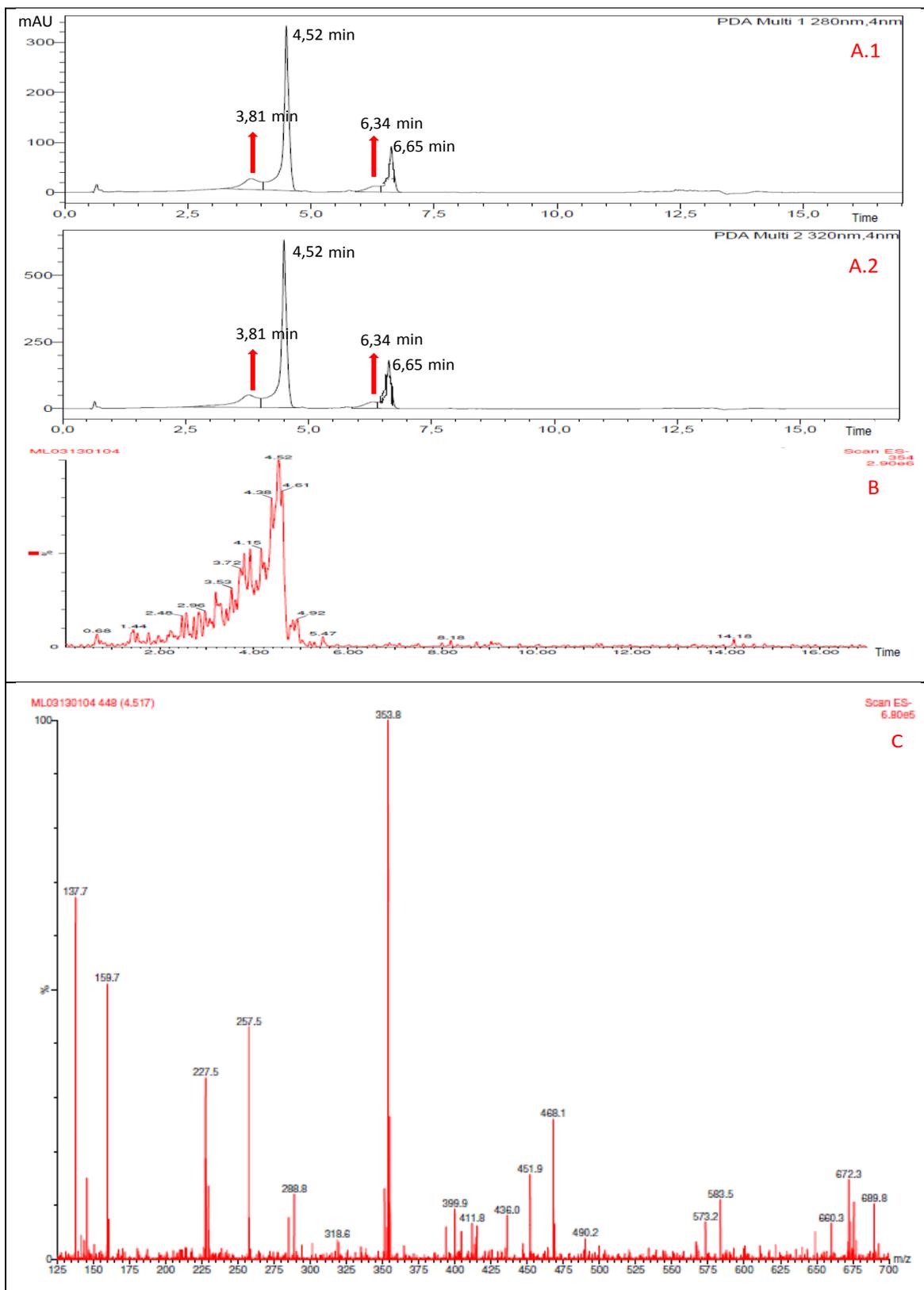


Figura 41. Perfil cromatográfico do ácido clorogênico ($c = 0,50$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS monitorizado a 280 nm (A.1) e a 320 nm (A.2). (B) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 353,5. (C) Espectro de massa obtido para sinal com $t_R \sim 4,52$ min no modo negativo. Condições de análise: ver item 3.9

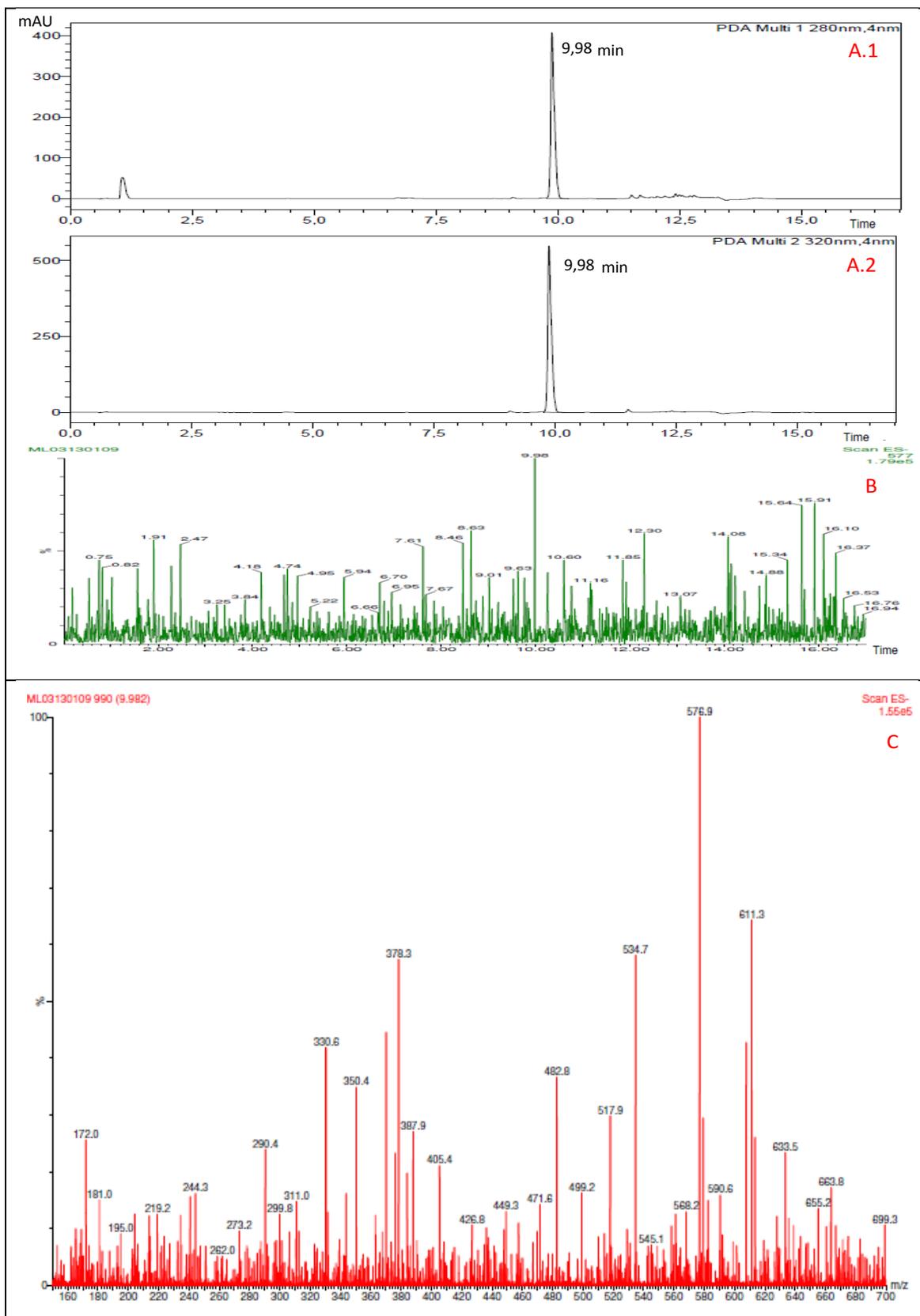


Figura 42. Perfil cromatográfico da campheritrina ($c = 0,60$ mg/ml) obtido por UPLC-DAD-MS monitorizado a 280 nm (A.1) e a 320 nm (A.2). (B) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 577. (C) Espectro de massa obtido para sinal com $t_R \sim 9,98$ min no modo negativo. Condições de análise: ver item 3.9

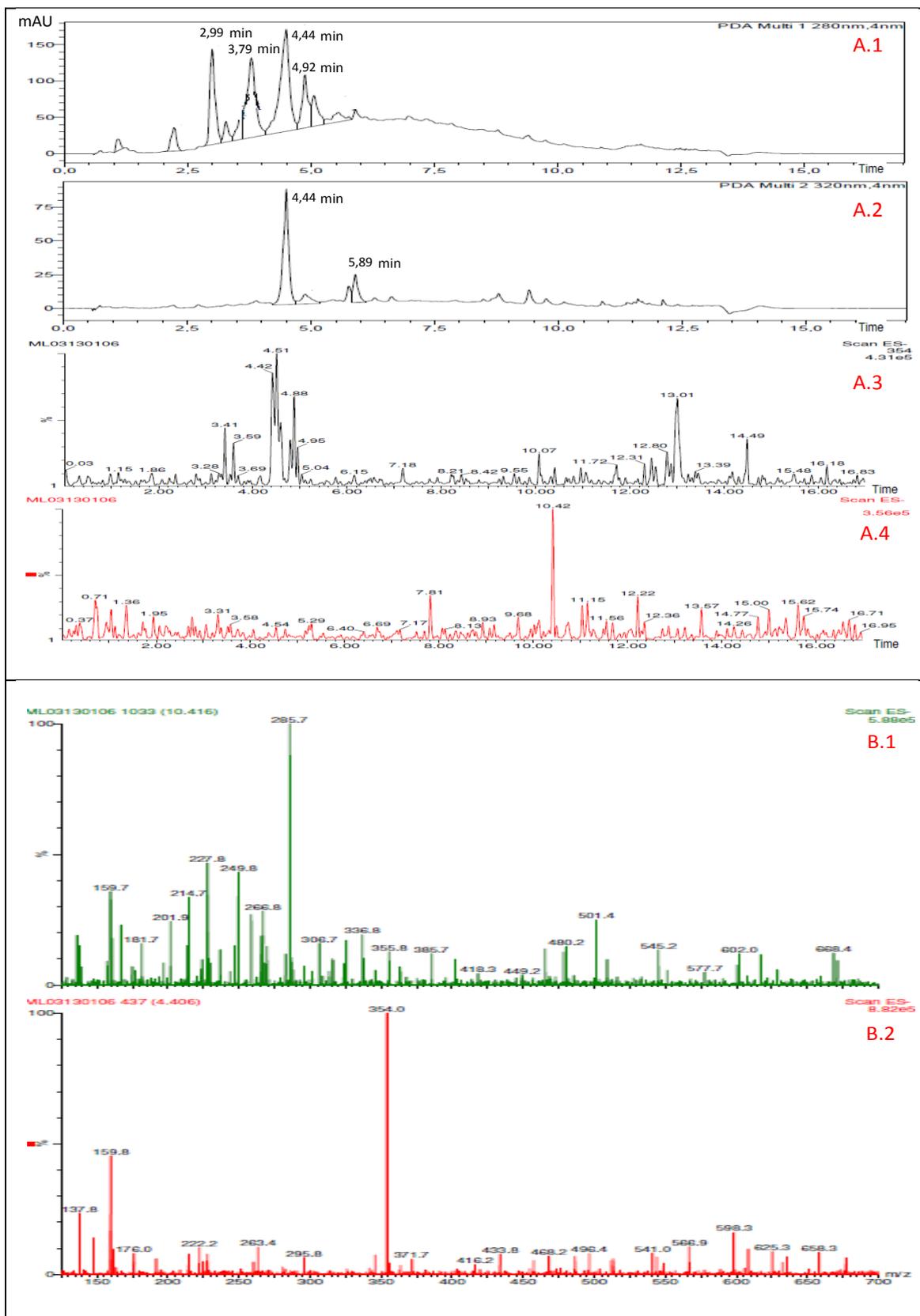


Figura 43. (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FA-MeOH ($c = 10,0$ mg/ml) com calibração prévia com campferitrina avaliado a 280 e a 320 nm, respectivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respectivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 10,41 min ($[M - H]^- = 577$ (u.m.a.); B.2: 4,41 min ($[M - H]^- = 355,5$ (u.m.a.)). Condições de análise: ver item 3.9

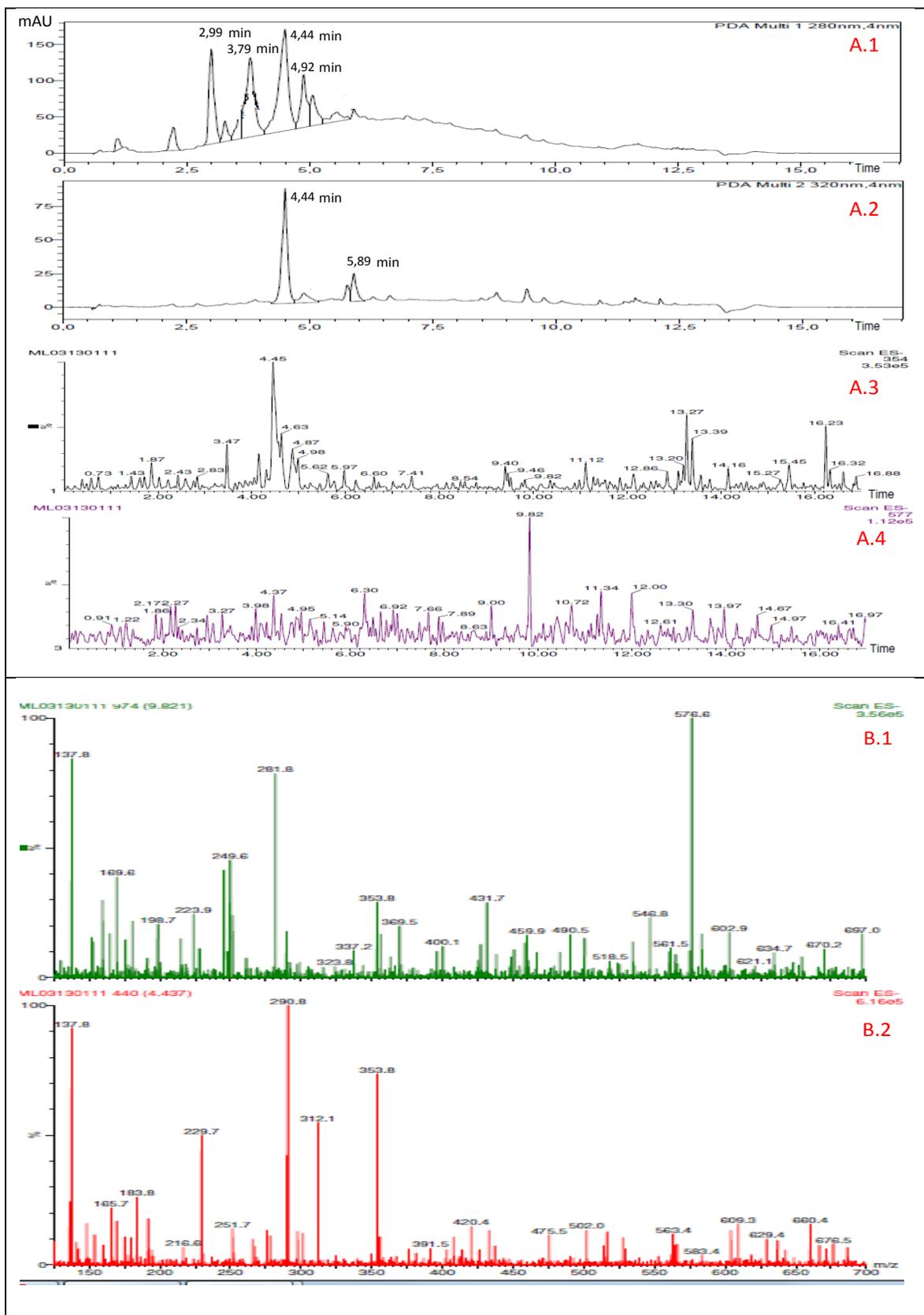


Figura 44. (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-2 FA-MeOH (c = 10,0 mg/ml) com calibração prévia com ácido clorogênico avaliado a 280 e a 320 nm, respectivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respectivamente. (B) = Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,82 min ($[M - H]^-$) = 577 (u.m.a.); B.2: 4,44 min ($[M - H]^-$) = 355,5 (u.m.a.). Condições de análise: ver item 3.9

Na figura 43 está representado o perfil cromatográfico nos comprimentos de onda de 280 nm (A.1) e de 320 nm (A.2), o cromatograma com monitorização de iões identificadores realizados para m/z 353,5 (A.3) e m/z 577 (A.4), e os espectros de massa (B) para a amostra UT-2 FA-MeOH ($c = 10,0$ mg/ml), respetivamente, tendo realizado a calibração prévia com a campferitrina. Na figura 44, apresentam-se os mesmos resultados, com a calibração prévia com o ácido clorogênico.

Da análise dos resultados obtidos para a amostra UT-2 FA-MeOH por UPLC-DAD, pode-se verificar a presença do ácido clorogênico ($t_R \sim 4,44$ min) por comparação do seu espectro de ultravioleta obtido (dados não mostrados) com aquele obtido por HPLC-DAD (Figura 26A-B). Além disso, foi detetado o fragmento m/z 353,5 referente ao seu ião molecular no espectro de massas (figura 44B.2), após previa calibração com o padrão. Estes dados indicam a presença de ácido clorogênico na amostra UT-2 FA-MeOH, corroborando com sua caracterização anterior por HPLC. Por outro lado, o fragmento m/z 353,5 também aparece no espectro de massas obtido após calibração com a campferitrina. Isto ocorreu quando se utilizou o potencial de ionização igual a 40,0 V, evidenciando a relevância deste parâmetro (energia de ionização no cone de amostragem) na deteção do fragmento com m/z 353,5. Para apoiar esta dedução, a deteção deste fragmento durante a análise do padrão do ácido clorogênico deveria ser investigada nas condições de ionização a 40,0 V. Outra possibilidade seria a geração, nesta energia determinada, do ácido clorogênico a partir de moléculas de polifenóis maiores. Em contrapartida, a campferitrina não foi identificada na amostra UT-2 FB-MeOH quando analisada nas condições de ionização adequadas para este flavonoide.

Nas figuras 45 e 46 estão apresentados, o perfil cromatográfico avaliado aos comprimentos de onda de 280 nm (A.1) e de 320 nm (A.2), o cromatograma com monitorização de iões identificadores realizados para m/z 353,5 (A.3) e m/z 577 (A.4); e os espectros de massa (B), para a amostra UT-4 FA-MeOH ($c = 1,0$ mg/ml), após calibração prévia com os padrões campferitrina e ácido clorogênico, respetivamente.

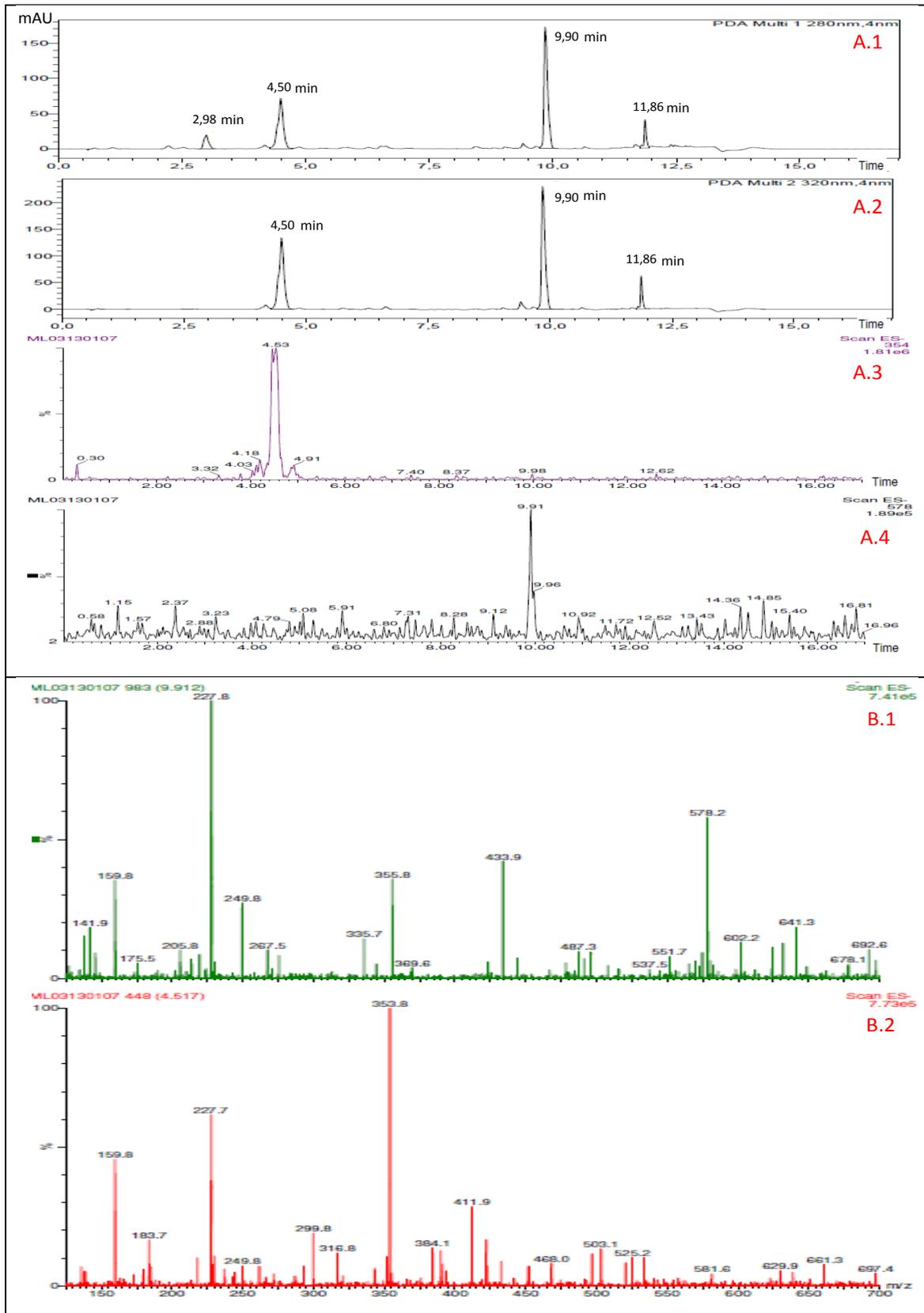


Figura 45. (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FA-MeOH ($c = 1,0$ mg/ml), com calibração prévia com campferitrina, avaliado a 280 e a 320 nm, respectivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respectivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,91 min ($[M - H]^- = 577$ (u.m.a.)); B.2: 4,51 min ($[M - H]^- = 353,5$ (u.m.a.)). Condições de análise: ver item 3.9

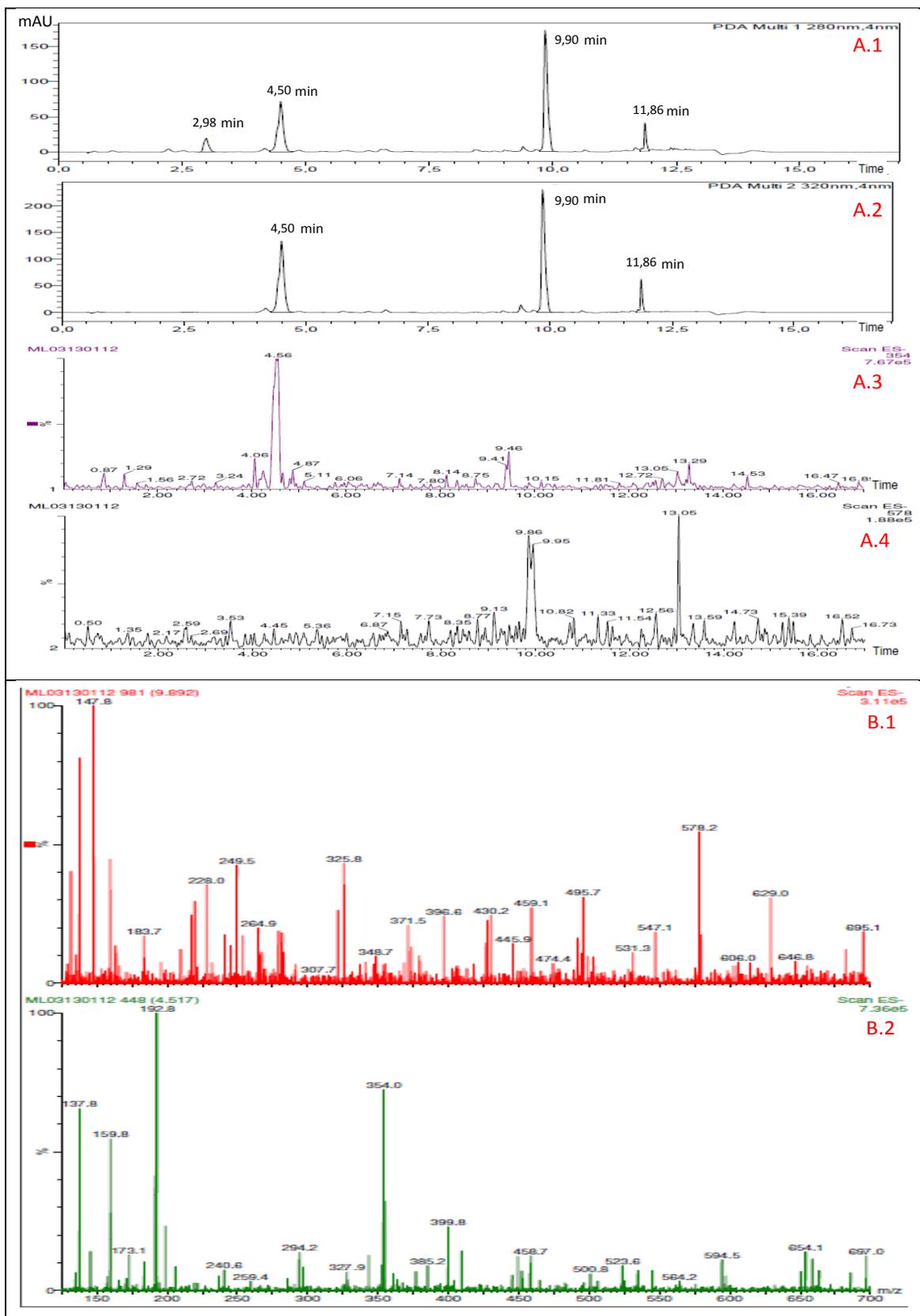


Figura 46. (A.1) e (A.2) Perfil cromatográfico da amostra UT-4 FA-MeOH ($c = 1,0$ mg/ml), com calibração prévia com ácido clorogênico, avaliado a 280 e a 320 nm, respectivamente. (A.3) e (A.4) Cromatograma com monitorização de íons identificadores realizado para m/z 353,5 e m/z 577, respectivamente. (B) Espectros de massas dos picos obtidos ao t_R de: B.1: 9,89 min ($[M - H]^- = 577$ (u.m.a.); B.2: 4,51 min ($[M - H]^- = 355,5$ (u.m.a.)). Condições de análise: ver item 3.9

No caso da amostra UT-4 FA-MeOH, a presença de campferitrina indicada por TLC e HPLC-DAD foi corroborada pela análise em UPLC-MS, com base na detecção do fragmento m/z 577 segundo as condições de calibração com o padrão do flavonoide. Além disso, a presença de ácido clorogênico (m/z 353,5) nesta amostra também é evidenciada segundo calibração efetuada tanto pelo seu padrão de referência quanto pela campferitrina. Da mesma maneira, a confirmação deste resultado exigiria investigações adicionais, no sentido de otimizar as condições de análise, com base em calibrações pelas substâncias individuais e também simultaneamente com a mistura das duas.

5. Conclusões

No contexto dos objetivos traçados (analisar o perfil químico e determinar o teor de polifenóis e alcaloides por HPLC) e do estudo desenvolvido com as folhas de cinco amostras de *U. tomentosa* de diferentes origens, as seguintes conclusões podem ser inferidas:

- ✓ A extração direcionada para uma classe definida de substâncias permitiu obter extratos de composições distintas, enriquecidos em alcaloides ou fenóis. Em ambos os casos, a extração com metanol puro foi superior à mistura de etanol/água 1:1;
- ✓ A introdução de uma etapa adicional de extração (*clean up* das fases menos polares), no caso da extração com etanol/água 1:1, forneceu uma maior seletividade nas partições de ambos os processos orientados para obter alcaloides ou fenóis; além de aumentar (mais que o dobro) a quantidade de ácido clorogênico extraída no segundo caso;
- ✓ A utilização de TLC na rotina de análise fitoquímica dos extratos foi bastante eficaz quanto ao indicativo de seus conteúdos. Especificamente, o caso da *U. tomentosa* corrobora a utilização desta técnica como simples, rápida e eficiente para aplicar em extratos vegetais;
- ✓ Em conformidade com diversos estudos reportados na literatura, para a *U. tomentosa*, a técnica de HPLC mostrou-se muito adequada, quando aplicada à avaliação quantitativa dos conteúdos químicos dos extratos, mediante o uso de substâncias de referência comerciais ou certificadas;
- ✓ A técnica de UPLC-MS permitiu validar a identidade dos marcadores químicos (mitrafilina, ácido clorogênico, campferitrina) como constituintes dos extratos de *U. tomentosa* estudados. Pode-se citar entre suas vantagens, o pequeno volume de amostra injetada e reduzida quantidade de fase móvel usada durante a análise. Especificamente para o caso dos fenóis, a utilização desta técnica permitiu reduzir em cerca de 3-4 vezes o tempo de análise;
- ✓ Todas as cinco amostras de *U. tomentosa* apresentaram alcaloides na composição química das folhas, ainda que numa delas (UT-1) a quantidade de mitrafilina tenha ficado abaixo do limite de detecção do método utilizado;

- ✓ Quanto à prospeção de fenóis, os extratos obtidos com metanol, após partição ácida, evidenciaram a presença de ácido clorogênico em todas as amostras analisadas. Quanto aos extratos obtidos com etanol/água 1:1, apenas duas amostras (UT-1 e UT-4) revelaram a presença de ácido clorogênico, após a etapa adicional de *clean up*;
- ✓ A leitura dos cromatogramas ao comprimento de onda de 320 nm mostrou-se mais vantajosa para a quantificação do ácido clorogênico nas amostras, do que a leitura a 280 nm, pois resultou numa maior sensibilidade, menores valores de LDD, LDQ, desvio padrão e coeficiente de variação; além de separação ótima do sinal referente ao ácido clorogênico;
- ✓ Três amostras da fração sob partição básica apresentaram conteúdos de mitrafilina entre 0,88-2,15 mg/g de folhas secas, e cinco amostras da fração sob partição ácida e uma amostra da fração sob partição hidrometanólica apresentaram conteúdos de ácido clorogênico entre 0,14-1,75 mg/g de folhas secas. Para quantificação do conteúdo fenólico e alcaloídico total das folhas deveriam ser utilizadas outras técnicas quantitativas complementares;
- ✓ Uma das amostras (UT-4) apresentou um alto teor do flavonoide campferitrina, sugerindo que provavelmente não se trata de *U. tomentosa*, mas sim de alguma espécie correlata. Esta amostra foi adquirida comercialmente em uma feira popular no norte do Brasil (onde a ‘unha-de-gato’ é nativa) sem, portanto, ter a determinação botânica assegurada. Este resultado revela a importância do estudo realizado no contexto do controle de qualidade da matéria-prima vegetal com fins medicinais;
- ✓ O local de origem da planta e a época em que ela foi colhida são os fatores que exercem uma grande influência na produção de alcaloides e fenóis nas amostras estudadas;
- ✓ O estudo realizado contribui com uma primeira abordagem para o controle químico de qualidade das folhas de *U. tomentosa*, prevendo-se que este substrato, ao exemplo das cascas, também venha a ser utilizado para fins medicinais. É pertinente mencionar que, dado o grande interesse comercial, esta espécie tem enfrentado uma exploração extrativa exaustiva, ameaçando a sua própria subsistência como planta nativa. A caracterização química das folhas (substrato renovável) de *U. tomentosa* em termos do conteúdo de POA e de

fenóis, também poderá acarretar benefícios para as populações locais que procuram gradualmente substituir a utilização das cascas com fim medicinal;

- ✓ O estabelecimento de um perfil químico para as folhas, as tornaria atraentes do ponto de vista comercial, devido ao grande interesse nessa espécie. Assim, é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos que possam monitorizar a qualidade do material vegetal e dos fitoterápicos derivados;
- ✓ Por último, mas não menos importante, salienta-se que este foi o primeiro estudo sobre compostos fenólicos das folhas de *U. tomentosa*, e como uma perspectiva futura, novas investigações devem avançar tanto na questão de quantificar os fenóis totais, como no isolamento e identificação dos constituintes dessa classe química nas folhas de *U. tomentosa*.

6. Referências Bibliográficas

1. Borris, R.P. Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *Journal of Ethnopharmacology*, **1996**. 51 (1-3): p. 29-38.
2. Rocha, A. and Silva, M. *Fundamentos da farmacologia e suas aplicações à terapêutica*. 3. ed. Vol. 1. 1973: São Paulo: Edart; Brasília: INL.
3. Boorhem, R.L. and Lage, E.B. Drogas e extratos vegetais utilizados em Fitoterapia. *Revista Fitos*, **2009**. 4 (1): p. 37-55.
4. Silva, F. and Casali, V.W.D. Plantas medicinais e aromáticas: pós colheita e óleos essenciais. *Departamento de Fitotecnia, Universidade de Viçosa*, **2000**: p. 153.
5. Guerra, M.P. and Nodari, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, **2003**: p. 15.
6. Lorenzi, H. and Mattos, F.J.A. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas. *Nova Odessa, São Paulo*, **2008**: p. 1-544.
7. Alves, L.F. Plantas Medicinais e Fitoquímica no Brasil: uma visão histórica. *São Paulo: Pharmabooks*, **2010**: p. 389.
8. ABIFISA. Interesse por fitoterápicos: mercado já movimentado US\$1 bilhão no país. Disponível em: <http://www.abifisa.org.br>. Acessado em: 28 janeiro 2013.
9. Consolaro, H.N. A distilia em espécies de Rubiaceae do bioma cerrado. *Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília - DF*, **2008**.
10. Conserva, L.M. and Jesu, J.C.F. Borreria and Spermacece species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. *Pharmacognosy Reviews*, **2012**. 6 (11): p. 46.
11. Margalho, L.F., Rocha, A.E.S. and Secco, R.S. Rubiaceae Juss. da restinga da APA de Algodão/Maiandeuá, Pará, Brasil. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi de Ciências Naturais*, **2009**. 4 (3): p. 303-339.
12. Heitzman, M.E., Neto, C.C., Winiarz, E., Vaisberg, A.J. and Hammond, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry*, **2005**. 66 (1): p. 5-29.
13. Ridsdale, C.E. A revision of Mytragyna and *Uncaria* (Rubiaceae). *Blumea*, **1978**. 24 (1): p. 43-100.
14. Sandoval, M., Okuhama, N.N., Zhang, X.J., Condezo, L.A., Lao, J., Angeles, F.M., Musah, R.A., Bobrowski, P. and 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*, **2002**. 9 (4): p. 325-337.
15. Zhou, J.Y. and Zhou, S.W. Isorhynchophylline: A plant alkaloid with therapeutic potential for cardiovascular and central nervous system diseases. *Fitoterapia*, **2012**. 83: p. 617-626.

16. Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P. and Teppner, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.—Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology*, **1998**. 64 (1): p. 23-34.
17. Ganzera, M., Muhammad, I., Khan, R.A. and Khan, I.A. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Planta medica*, **2001**. 67 (05): p. 447-450.
18. Falkiewicz, B. and Łukasiak, J. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmel.]—a review of published scientific literature. *Case Report and Clinical Practice Review*, **2001**. 2: p. 305-316.
19. Miranda, E.M., Sousa, J.A. and Pereira, R.C.A. Caracterização e avaliação de populações nativas de unha de gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.] no vale do rio Juruá-AC. *Rev Bras Pl Med*, **2003**. 5: p. 41-46.
20. Reinhard, K.H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's Claw, Uña de Gato, or Savéntaro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, **1999**. 5 (2): p. 143-151.
21. Valente, L.M.M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. *Revista Fitos*, **2006**. 2 (1): p. 48-58.
22. Miranda, E.M., Sousa, J.A. and Pereira, R. Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha-de-gato (*Uncaria* spp.) no vale do Rio Juruá, AC. *Rio Branco: Embrapa*, **2001**.
23. Cheng, A.C., Jian, C.B., Huang, Y.T., Lai, C.S., Hsu, P.C. and Pan, M.H. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food and Chemical Toxicology*, **2007**. 45 (11): p. 2206-2218.
24. Ferreira, M.S., *Unha de gato. Uncaria tomentosa (Willd) DC.*, in *Escola Paulista de Medicina*. 2009, Universidade Federal de São Paulo: São Paulo.
25. Jones, K. Cat's claw, healing vine of Peru. *Seattle: Sylvan Press*, **1995**.
26. Obregón Vilches, L. Uña de Gato. Género *Uncaria*. Estudios botánicos, químicos y farmacológicos de *Uncaria tomentosa* y *Uncaria guianensis*. *Lima: Instituto de Fitoterapia Americano*, **1997**.
27. Cunha, A.P., Roque, O.R. and da Silva, A.P. *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. 2003: Fundação Calouste Gulbenkian.
28. Laus, G., Brössner, D. and Keplinger, K. Alkaloids of peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*, **1996**. 45 (4): p. 855-860.
29. Goncalves, C., Dinis, T. and Batista, M.T. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry*, **2005**. 66 (1): p. 89-98.
30. Aquino, R., Tommasi, N.D., Simone, F.D. and Pizza, C. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry*, **1998**. 48 (6): p. 1075-1077.

31. Henriques, A.T., Limberger, R.P., Kerber, V.A. and Moreno, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 2003*: p. 765-766, 782-783.
32. Valente, L.M.M., Alves, F.F., Bezerra, G.M., Almeida, M.B.S., Rosario, S.L., Mazzei, J.L., d Avila, L.A. and 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 género *Uncaria*. *Rev Bras Farmacognosia, 2006*. 16: p. 216-223.
33. Phillipson, J.D. and Hemingway, S.R. Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus *Uncaria*. *Journal of Chromatography A, 1975*. 105 (1): p. 163-178.
34. Garcia-Prado, E., Gimenez, G., De la Puerta Vázquez, R., Espartero Sánchez, J.L. and Sáenz Rodríguez, M.T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine, 2007*. 14 (4): p. 280-284.
35. Rojas-Duran, R., González-Aspajo, G., Ruiz-Martel, C., Bourdy, G., Doroteo-Ortega, V.H., Alban-Castillo, J., Robert, G., Auberger, P. and Deharo, E. Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark. *Journal of Ethnopharmacology, 2012*. 143 (3): p. 801-804.
36. Marques, O.C.P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante. *Dissertação de Mestrado - Departamento de Farmácia, Universidade de Coimbra, 2008*: p. 10.
37. Keplinger, K., Laus, G., Wurm, M., Dierich, M.P. and Teppner, H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.-Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology, 1999*. 64 (1): p. 23-34.
38. Taylor, L. *Herbal secrets of the rainforest: the healing power of over 50 medicinal plants you should know about*. 2002: 2.ed. Austin: Sage Press, Inc.
39. Paduch, R., Kandefler-Szerszeń, M., Trytek, M. and Fiedurek, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis, 2007*. 55 (5): p. 315-327.
40. Aquino, R., De Feo, V., De Simone, F., Pizza, C. and Cirino, G. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural products, 1991*. 54 (2): p. 453-459.
41. Aquino, R., De Simone, F., Pizza, C., Conti, C. and Stein, M.L. Plant Metabolites. Structure and In Vitro Antiviral Activity of Quinovic Acid Glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platytipoda*. *Journal of Natural products, 1989*. 52 (4): p. 679-685.
42. Aquino, R., De Tommasi, N., De Simone, F. and Pizza, C. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry, 1997*. 45 (5): p. 1035-1040.
43. Simões, C.M.O. and Spitzer, V. Óleos voláteis. *Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, 2003*: p. 469-470.

44. Carvalho, J.C.T., Gosmann, G. and Schenkel, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, **2003**: p. 519-520.
45. Harborne, J.B. and Williams, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **2000**. 55 (6): p. 481-504.
46. Pietta, P.G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural products*, **2000**. 63 (7): p. 1035-1042.
47. Heim, K.E., Tagliaferro, A.R. and Bobilya, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *The Journal of nutritional biochemistry*, **2002**. 13 (10): p. 572-584.
48. Kurzer, M.S. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. *The Journal of Nutrition*, **2000**. 130 (3): p. 660S-661S.
49. Desmarchelier, C., Mongelli, E., Coussio, J. and Ciccía, G. Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research*, **1997**. 11 (3): p. 254-256.
50. Pavei, C., Kaiser, S., Borré, G.L. and Ortega, G.G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2010**. 33: p. 1-11.
51. Alves, S.T., Dias, R.C.E., Benassi, M.T. and Scholz, M.B.S. Metodologia para análise simultânea de ácido nicotínico, trigonelina, ácido clorogênico e cafeína em café torrado por cromatografia líquida de alta eficiência. *Quim Nova*, **2006**. 29 (6): p. 1164-8.
52. Veberic, R., Trobec, M., Herbinger, K., Hofer, M., Grill, D. and Stampar, F. Phenolic compounds in some apple (*Malus domestica* Borkh) cultivars of organic and integrated production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2005**. 85 (10): p. 1687-1694.
53. Sousa, E., Zanatta, L., Seifriz, I., Creczynski-Pasa, T.B., Pizzolatti, M.G., Szpoganicz, B. and Silva, F.R.M.B. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3, 7-O-(α)-dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal of Natural products*, **2004**. 67 (5): p. 829-832.
54. Fang, S.H., Rao, Y.K. and Tzeng, Y.M. Inhibitory effects of flavonol glycosides from *Cinnamomum osmophloeum* on inflammatory mediators in LPS/IFN- γ -activated murine macrophages. *Bioorganic & medicinal chemistry*, **2005**. 13 (7): p. 2381-2388.
55. Valente, L.M.M., Bizarri, C.H.B., Liechocki, S., Barboza, R.S., da Paixão, D., Almeida, M.B.S., Benevides, P.J.C., Magalhães, A. and Sianib, A.C. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its Potential as a Chemical Marker for the Species. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2009**. 20 (6): p. 1041-1045.
56. Silva, K.L. and Filho, V.C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. *Química Nova*, **2002**. 25 (3): p. 449-454.
57. Lindroth, R.L., Hsia, M.T. and Scriber, J.M. Seasonal patterns in the phytochemistry of three *Populus* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, **1987**. 15 (6): p. 681-686.

58. Darrow, K. and Deane, M.B. Phenological and population variation in iridoid glycosides of *Plantago lanceolata* (Plantaginaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, **1997**. 25 (1): p. 1-11.
59. Gobbo-Neto, L. and Lopes, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, **2007**. 30 (2): p. 374-381.
60. Brooks, J.S. and Feeny, P. Seasonal variation in *Daucus carota* leaf-surface and leaf-tissue chemical profiles. *Biochemical Systematics and Ecology*, **2004**. 32 (9): p. 769-782.
61. Roca-Pérez, L., Boluda, R., Gavidia, I. and Pérez-Bermúdez, P. Seasonal cardenolide production and gene expression in natural populations of *Digitalis obscura*. *Phytochemistry*, **2004**. 65 (13): p. 1869-1878.
62. Itenov, K., Mølgaard, P. and Nyman, U. Diurnal fluctuations of the alkaloid concentration in latex of poppy *Papaver somniferum* is due to day–night fluctuations of the latex water content. *Phytochemistry*, **1999**. 52 (7): p. 1229-1234.
63. Höft, M., Verpoorte, R. and Beck, E. Leaf alkaloid contents of *Tabernaemontana pachysiphon* as influenced by endogenous and environmental factors in the natural habitat. *Planta medica*, **2007**. 64 (02): p. 148-152.
64. Grace, S.C., Logan, B.A. and Adams, W.W. Seasonal differences in foliar content of chlorogenic acid, a phenylpropanoid antioxidant, in *Mahonia repens*. *Plant, Cell & Environment*, **1998**. 21 (5): p. 513-521.
65. Grace, S.C. and Logan, B.A. Energy dissipation and radical scavenging by the plant phenylpropanoid pathway. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, **2000**. 355 (1402): p. 1499-1510.
66. Mur, E., Hartig, F., Eibl, G. and Schirmer, M. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *The journal of Rheumatology*, **2002**. 29 (4): p. 678-681.
67. Schenkel, E.P., Gosmann, G. and Petrovick, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. 2005: Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC.
68. Reif, K., Sievers, H. and Steffen, J.P. The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical material - a European perspective. *HerbalGram*, **2004**. 63: p. 38-43.
69. Falkenberg, M.B., Santos, R.I. and Simões, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/UFSC, **2003**: p. 241-242.
70. Hostettmann, K., Queiroz, E.F. and Vieira, P.C. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*. 2003: 1 ed. São Carlos: EdUFRSCar, 152 p.
71. Siani, A.C. Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos: plataforma metodológica. *Scriptorio: Rio de Janeiro*, **2003**: p. 97.

72. Winkler, C., Wirleitner, B., Schroecksnadel, K., Schennach, H., Mur, E. and Fuchs, D. In vitro effects of two extracts and two pure alkaloid preparations of *Uncaria tomentosa* on peripheral blood mononuclear cells. *Planta medica*, **2004**. 70 (03): p. 205-210.
73. Jones, K. *Cat's Claw, Healing Vine of Peru*. 1995: Sylvan Press: Seattle.
74. Montoro, P., Carbone, V., Dioz Zuniga Quiroz, J., De Simone, F. and Pizza, C. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochemical analysis*, **2004**. 15 (1): p. 55-64.
75. Laus, G. and Keplinger, D. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1994**. 662 (2): p. 243-249.
76. Reis, S.R.I.N., Valente, L.M.M., Sampaio, A.L., Siani, A.C., Gandini, M., Azeredo, E.L., D'Avila, L.A., Mazzei, J.L., Henriques, M.M. and Kubelka, C.F. Immunomodulating and antiviral activities of *Uncaria tomentosa* on human monocytes infected with Dengue Virus-2. *International Immunopharmacology*, **2008**. 8 (3): p. 468-476.
77. Domingues, A., Sartori, A., Golim, M., Valente, L.M.M., da Rosa, L.C., Ishikawa, L.L.W., Siani, A.C. and Viero, R.M. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? *Journal of Ethnopharmacology*, **2011**. 137 (1): p. 635-642.
78. Pilarski, R., Zieliński, H., Ciesiołka, D. and Gulewicz, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology*, **2006**. 104 (1-2): p. 18-23.
79. Mazzei, J.L. Transposição em escala por modelos na produção de substâncias naturais por cromatografia líquida de alta eficiência. *Tese de Doutorado - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, **2004**.
80. Domingues, A., Sartori, A., Valente, L.M.M., Golim, M.A., Siani, A.C. and Viero, R.M. *Uncaria tomentosa* Aqueous-ethanol Extract Triggers an Immunomodulation toward a Th2 Cytokine Profile. *Phytotherapy Research*, **2011**. 25 (8): p. 1229-1235.
81. Mazzei, J.L., Rosario, S.L., Silva, R.S., Siani, A.C., Valente, L.M.M. and d'Avila, L.A. Scale-up of isolation of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by HPLC using chromatographic model. *Rev Fitoterapia*, **2002**. 2: p. 289.
82. Wagner, H. and Bladt, S. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Second ed. 2009: Springer: Berlin, Germany.
83. Paixão, D. Desenvolvimento por planejamento fatorial e validação de metodologia analítica utilizando extração em fase sólida e cromatografia líquida de alta eficiência na quantificação do flavonóide campferitrina em *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). *Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, **2010**.
84. Chiaradia, M.C., Collins, C.H. and Jardim, I.C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim Nova*, **2008**. 31 (3): p. 623-36.

85. Crotti, A.E.M., Vessechi, R., Lopes, J.L.C. and Lopes, N.P. Electrospray ionization mass spectrometry: chemical processes involved in the ion formation from low molecular weight organic compounds. *Química Nova*, **2006**. 29 (2): p. 287-292.
86. Pereira, R.C.C., Valente, L.M.M., Pinto, J.E.B.P., Bertolucci, S.K.V., Bezerra, G.M., Alves, F.F., Santos, P.F.P., Benevides, P.J.C., Siani, A.C., Rosario, S.L., Mazzei, J.L., Avila, L.A., Gomes, L.N.F., Aquino-Neto, F.R., Emmerick, I.C.M. and Carvalhaes, S.F. In vitro cultivated *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* with determination of the pentacyclic oxindole alkaloid contents and profiles. *J. Braz. Chem. Society*, **2008**. 19 (6): p. 1193-1200.
87. Bertol, G. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. - Rubiaceae. *Dissertação de Mestrado - Escola de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná*, **2010**.
88. NP EN ISO/IEC 17025. *Requisitos gerais de competência para laboratórios de ensaio e calibração*, **2005**.
89. Lemaire, I., Assinewe, V., Cano, P., Awang, D.V.C. and 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*, **1999**. 64 (2): p. 109-115.
90. Barboza, R.S. Isolamento de substâncias polares presentes no extrato etanólico bioativo das folhas de *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) por CLAE aplicando a transposição de modelos. *Dissertação de Mestrado - Departamento de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro*, **2012**.
91. Ardrey, R.E. *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*. Wiley: *Huddersfield*, **2003**: p. 105, 141-143.