



Desenvolvimento e aplicação de metodologia por cromatografia em camada delgada para determinação do perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies sul-americanas do gênero *Uncaria*

Ligia M.M. Valente^{1*}, Flaviane F. Alves¹, Giselle M. Bezerra¹, Maria Beatriz S. Almeida², Sandra L. Rosario², José L. Mazzei³, Luiz A. d'Avila³, Antonio C. Siani²

¹Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco A, 21910-240, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

²Instituto de Tecnologia em Fármacos, Fundação Oswaldo Cruz, R. Sizenando Nabuco 100, 21041-250, Rio de Janeiro, RJ, Brasil,

³Departamento de Processos Orgânicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Tecnologia, Bloco E, 21910-240, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO: O gênero *Uncaria* (Rubiaceae) é representado na América do Sul e Central por duas espécies: *U. tomentosa* (Willd.) DC. e *U. guianensis* (Aubl.) Gmel., conhecidas popularmente como unha-de-gato. Ambas são trepadeiras perenes, sendo empregadas na prevenção e cura de várias doenças. Nessas plantas são encontrados alcalóides oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonóides. Seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos, considerados seus marcadores: especiofilina, mitrafilina, uncarina F, isomitrafilina, pteropodina e isopteropodina, são usados na padronização do material vegetal e fitoterápicos derivados. O presente trabalho descreve o desenvolvimento de metodologia analítica qualitativa utilizando cromatografia em camada delgada (CCD) para determinação do perfil dos seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos marcadores das espécies. O desenvolvimento do método incluiu a comparação entre o uso do extrato metanólico bruto, e de frações enriquecidas obtidas por partição ácido-base clássica ou pelo uso de resina básica Poliamida 6. Utilizou-se gel de sílica como fase estacionária, e variaram-se alguns parâmetros como: eluentes, concentração da amostra, espaço de eluição e tipos de reveladores. O método desenvolvido em CCD mostrou-se confiável, reproduzível e seletivo para os alcalóides alvos, sendo aplicado na análise de amostras de folhas e caule das duas espécies e também de fitoterápicos comerciais à base de *U. tomentosa*.

Unitermos: *Uncaria tomentosa*, *Uncaria guianensis*, Rubiaceae, alcalóides oxindólicos, cromatografia em camada delgada.

ABSTRACT: "Development and application of a thin layer chromatographic method for the determination of the pentacyclic oxindole alkaloid profile in South-American species of the genus *Uncaria*". The species *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *U. guianensis* Gmel. (Rubiaceae), known as cat's claw, are large woody vines occurring in the Amazon rain forest and other tropical areas of South and Central America. It has been used medicinally by indigenous peoples for at least 2,000 years for several diseases. Tetra- and pentacyclic oxindole alkaloids, triterpenoid glycosides, sterols and flavonoids are found in these plants. Among these metabolites, six pentacyclic oxindole alkaloids, speciophylline, mitraphylline, pteropodine, uncarine F, isopteropodine and isomitraphylline, are considered to be the biochemical markers and are used to standardize commercial herbal medicines. The present study describes the development of an analytical methodology to determine the profile of these alkaloid markers through thin layer chromatography (TLC). This development has also included a comparison among the use of the crude methanol extract and fractions obtained through the classical acid-base partition or by using the basic resin Polyamide 6. Silica gel was used as stationary phase with the variation of some parameters such as solvent systems, sample concentration, distance of development and detection method. The TLC method developed was shown to be reliable, reproducible and selective for the target alkaloids. It has been applied to the analysis of leaves and stems from both species as well as phytopharmaceutical derivatives based on *U. tomentosa*.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, *Uncaria guianensis*, Rubiaceae, oxindole alkaloids, thin layer chromatography.

INTRODUÇÃO

O gênero *Uncaria* (Rubiaceae), típico de regiões tropicais, é representado na América do Sul e Central por duas espécies (Ridscale, 1978): *U. tomentosa* (Willd.) DC. e *U. guianensis* (Aubl.) Gmel., conhecidas popularmente como unha-de-gato. Ambas são trepadeiras perenes, raramente cultivadas, possuindo diferenças anatômicas que facilmente as distinguem entre si (Vilches, 1997; Revilla, 2002). Possuem uma longa história de usos similares na medicina popular, principalmente no tratamento do câncer, na cura de feridas, alergias e artrites (Vilches, 1997; Revilla, 2002). A espécie *U. guianensis* tem se sobressaído por sua comprovada atividade antiinflamatória e antioxidante. Já a espécie *U. tomentosa*, mais estudada, destaca-se por sua atividade imunestimulante, sendo também citotóxica, antiinflamatória e antioxidante (Heitzman et al., 2005). Em função de sua propriedade imunestimulante, *U. tomentosa* é atualmente uma planta de alto valor comercial no Brasil e no mundo. As cascas do caule e as folhas da espécie são comercializadas *in natura* ou como fitoterápicos na forma de cápsula ou comprimido: partes da planta secas e moídas ou extrato etanólico seco. Ambas as espécies contêm, embora em proporções diferentes, alcalóides oxindólicos, *N*-oxi-oxindólicos e indólicos, triterpenos glicosilados, taninos e flavonóides. Testes farmacológicos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que os alcalóides oxindólicos pentacíclicos presentes em *U. tomentosa* (Figura 1) eram os principais responsáveis por sua propriedade imunestimulante (Heitzman et al., 2005) e atualmente, eles são usados para aferir a qualidade da espécie. A concentração desses alcalóides pode variar nas diferentes partes da planta e sazonalmente (Laus et al., 1997). É possível encontrar também um quimiotipo que contém preferencialmente alcalóides oxindólicos tetracíclicos (que não possuem

atividade imunestimulante). Esses alcalóides podem eventualmente co-ocorrer com os pentacíclicos (Laus et al., 1997). Em *U. guianensis*, de um modo geral, a concentração de alcalóides oxindólicos é bem menor do que em *U. tomentosa* (Laus; Keplinger, 2003).

Devido ao grande interesse comercial dessas plantas, é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos que possam monitorar a qualidade do material vegetal e dos fitoterápicos derivados. O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a aplicação de metodologia de análise dos seis principais alcalóides oxindólicos pentacíclicos das espécies *Uncaria tomentosa* e *U. guianensis* por cromatografia em camada delgada.

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um método rápido, eficiente, de baixo custo e largamente empregado em controle de qualidade de plantas medicinais, tanto em matéria-prima vegetal quanto em fitoterápicos derivados (Julião et al., 2003). Embora sejam encontrados na literatura alguns métodos para análise por CCD de alcalóides oxindólicos em espécies do gênero *Uncaria* (Philipson; Hemingway, 1975; Ginkel, 1996; Wagner; Bladt, 1996; Keplinger et al., 2002; Glensk et al., 2004) estes ou não são descritos com detalhes e/ou os alcalóides oxindólicos pentacíclicos não são identificados. Em função da complexidade da composição dos extratos alcoólicos brutos de ambas as espécies, que incluem grande quantidade de taninos (complexantes dos alcalóides), especialmente em amostras provenientes de caule ou casca de caule, a maioria das análises dos alcalóides presentes tem sido feita ou pelo pré-tratamento com base (hidróxido de amônio) do material vegetal seguido de extração com solvente (Ginkel, 1996) e/ou pela submissão, após extração, à metodologias que conduzem à frações enriquecidas desses alcalóides (Ganzera et al., 2001; Philipson; Hemingway, 1975; Wagner; Bladt, 1996). No entanto não há até o momento a descrição detalhada de uma metodologia para a determinação por CCD do perfil

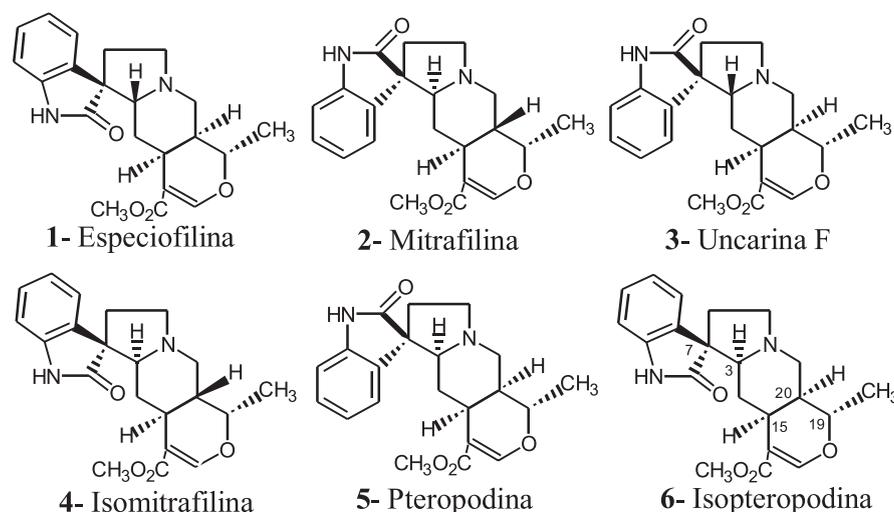


Figura 1. Estrutura dos seis alcalóides oxindólicos pentacíclicos considerados como marcadores das espécies sul-americanas de *Uncaria*

dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas espécies *U. tomentosa* e *U. guianensis*. No presente trabalho foram analisadas algumas condições cromatográficas descritas na literatura, otimizando-se vários parâmetros e introduzindo procedimentos, com o objetivo de desenvolver um método simples e reprodutível que pudesse detectar com precisão os alcalóides marcadores presentes na(s) amostra(s) avaliada(s). Como parte do desenvolvimento desta metodologia, foram comparados os perfis cromatográficos em CCD dos alcalóides alvos tanto pelo uso de extrato metanólico bruto quanto de frações enriquecidas desses alcalóides obtidas pela submissão do extrato bruto à partição ácido-base clássica e a tratamento com resina básica Poliamida 6.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenvolvimento do método em CCD

No estabelecimento da metodologia por CCD foi utilizada uma amostra de referência, não comercial, constituída de uma fração enriquecida nos alcalóides oxindólicos marcadores das espécies, obtida por partição ácido-base clássica a partir do extrato etanólico das cascas do caule de *U. tomentosa* previamente secas e moídas, coletadas em Cruzeiro do Sul, Acre (dados sobre identificação e exsicata em Miranda et al., 2003) e fornecidas pela empresa Biosapiens. Essa fração foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta (UV) a 245 nm, com caracterização dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos marcadores por seus tempos de retenção em condições descritas na literatura (Laus; Keplinger, 1994) e por CLAE acoplada a detector por *photodiode array* e espectrometria de massas (CLAE-DAD-EM) com monitoramento do íon $[M+1]^+$ em m/z 369 e análise dos espectros de UV (Mazzei, 2004; Lopez-Avila et al., 1997). Para obtenção das substâncias padrão, a fração foi refluxada com éter metil *t*-butílico levando à precipitação, após resfriamento, de mitrafilina (2) que foi posteriormente purificada por cristalização nesse mesmo solvente. O sobrenadante foi seco a pressão reduzida e submetido seqüencialmente à cromatografia em coluna (CC) em gel de sílica com gradiente de solvente hexano-acetato de etila-metanol e à CLAE em fase reversa para isolamento de pteropodina (5) e isopteropodina (6) (Laus; Keplinger, 1994; Mazzei et al., 2002). As substâncias puras foram identificadas estruturalmente por espectrometria na região do infravermelho (IV), técnicas de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono-13 (RMN 1H e ^{13}C) (300MHz e 75MHz respectivamente, $CDCl_3$, TMS como padrão interno) em uma e duas dimensões e análise dos espectros de UV e EM em CLAE-DAD-EM e seus dados comparados àqueles disponíveis na literatura (Seki et al., 1993; Lopez-Avila et al., 1997). A determinação da pureza foi feita por integração dos cromatogramas de íons totais em CLAE-EM.

Mitrafilina (1): sólido branco cristalino; CLAE-DAD-EM: λ_{max} 244 nm, m/z 369 $[M+1]^+$, t_R 3,86 min (pureza > 95%); RMN 1H : 1,11 (3H, d, J 6,6 Hz, H-18), 2,11 (2H, m, H-15 e 20), 2,42 (1H, dd, J 2,6, 10,1 Hz, H-3), 3,60 (3H, s, CH_3O), 4,37 (1H, qd, J 3,0, 6,6 Hz, H-19), 7,43 (1H, s, H-17), 7,91 (1H, s, NH); RMN ^{13}C : 15,1 (C-18), 50,9 (CH_3O), 55,7 (C-7), 74,0 (C-19), 74,8 (C-3), 107,1 (C-16), 114,9 (C-12), 122,8 (C-10), 123,2 (C-9), 154,3 (C-17), 167,3 (C-22), 181,2 (C-2); IV (KBr) ν_{max} 1622, 1705, 1725; 3269, 3412 cm^{-1} .

Pteropodina (5): sólido branco cristalino; CLAE-DAD-EM: λ_{max} 247 nm, m/z 369 $[M+1]^+$, t_R 4,82 min (pureza 99%); RMN 1H : 1,41 (3H, d, J 6,2 Hz, H-18), 1,58 (1H, m, H-20), 2,44 (1H, ddd, J 4,4, 4,7, 11,5 Hz, H-15), 3,60 (3H, s, CH_3O), 4,56 (1H, qd, J 6,2, 10,6 Hz, H-19), 7,49 (1H, s, H-17), 7,93 (1H, sl, NH); IV (KBr) ν_{max} 1624, 1701, 3257 cm^{-1} .

Isopteropodina (6): sólido branco cristalino; CLAE-DAD-EM: 247 nm, m/z 369 $[M+1]^+$, t_R 7,49 min (pureza 100%); RMN 1H : 1,41 (3H, d, J 6,2 Hz, H-18), 1,59 (1H, m, H-20), 2,57 (1H, dd, J 2,8, 11,7 Hz, H-3), 3,60 (3H, s, CH_3O), 4,35 (1H, qd, J 6,2, 10,8 Hz, H-19), 7,41 (1H, s, H-17), 8,80 (1H, s, NH); RMN ^{13}C : 18,8 (C-18), 51,2 (OCH_3), 71,4 (C-3), 124,7 (C-9), 127,8, 140,5 (C-13), 167,8 (C-22), 181,6 (C-2); IV (KBr) ν_{max} 1633, 1679, 1700, 1719, 3247 cm^{-1} .

As análises em CCD foram desenvolvidas em placas pré-elaboradas de gel de sílica (cromatofolha Merck, gel de sílica 60 F₂₅₄, 0,2 mm). As amostras foram aplicadas manualmente, utilizando-se microseringa de 25 μ L (Hamilton ref. 80465).

Vários parâmetros foram ensaiados: largura da aplicação da amostra, espaço de eluição, tipos de reveladores, concentração da amostra e sistemas de fase móvel. Como primeira etapa do processo, foram testados quatro sistemas de solvente como fase móvel, dentre aqueles descritos na literatura (Keplinger et al., 2002; Philipson; Hemingway, 1975) que aliavam o maior potencial de separação dos alcalóides pentacíclicos em questão com a facilidade de manuseio: acetato de etila/hexano (95:5), clorofórmio/acetona (5:4), clorofórmio/metanol (95:5), acetato de etila/isopropanol/hidróxido de amônio (16:3:1). Depois de escolhido o sistema de eluente, testou-se a distância ótima de desenvolvimento. Para tal, foram utilizadas placas cromatográficas com 11,5, 15 e 20 cm de comprimento, com espaço de corrida de 10, 13,5 e 18,5 cm respectivamente. Para o teste da concentração mínima de detecção, e conseqüentemente da concentração ideal de análise, preparou-se uma solução de 5 mg/mL da amostra de referência em metanol. Dessa solução, foram aplicadas alíquotas de 6, 10, 16, 20, 26, 30 e 36 μ L. Em seguida, a largura das bandas de aplicação da amostra foi ensaiada com 0,5 e 1 cm. A visualização das manchas foi efetuada por exposição à luz UV a 254 nm e a revelação, através de borrifamento com reagente de Dragendorff/nitrito de sódio 10% (Wagner; Bladt, 1996). As placas foram documentadas por fotografia digital.

Identificação dos alcalóides na placa cromatográfica

Os seis alcalóides marcadores foram identificados na placa cromatográfica pela comparação dos R_f das manchas na amostra de referência com os R_f de padrões isolados e identificados estruturalmente [mitrafilina (2), pteropodina (5) e isopteropodina (6)], conforme descrito anteriormente, e por intermédio da comparação com a ordem de eluição descrita por Keplinger et al. (2002). Para os padrões, foram aplicados 10 μ L de uma solução de 1 mg/mL.

Métodos de extração de alcalóides

Para comparar os diferentes métodos de extração de alcalóides utilizou-se a mesma partida de cascas de caule de *U. tomentosa*, coletada em Cruzeiro do Sul, Acre, utilizada na obtenção da amostra de referência e no isolamento das substâncias padrão. Os extratos foram preparados segundo metodologia otimizada por Ganzera et al. (2001), onde 750 mg do material vegetal seco e moído foram extraídos com 2,5 mL de metanol com sonicação por 10 min seguido de centrifugação por 5 min. O processo foi repetido 4 vezes e os sobrenadantes reunidos. No tratamento com resina básica (Ganzera et al., 2001) os sobrenadantes foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL e o volume completado com metanol. Em seguida foi retirada uma alíquota de 3 mL e adicionado a esta 300 mg de resina Nylon 6 Radilon S natural (Radici Plastics Ltda.) (Poliamida 6) de granulometria 53-125 μ m e a mistura mantida sob agitação magnética por 15 min. O sobrenadante foi então seco a pressão reduzida e pesado. Na partição ácido-base, os sobrenadantes resultantes da extração depois de reunidos foram secos a pressão reduzida e pesados. O extrato seco foi tratado com solução de ácido clorídrico 0,1N em uma relação 0,15 mL/mg. A mistura foi colocada

no banho de ultra-som por 5 min e em seguida extraída com acetato de etila, sendo o volume de acetato de etila utilizado igual ao do ácido clorídrico (3 vezes). A fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de acetato de etila (4 vezes), gerando uma fração orgânica enriquecida em alcalóides. A fração foi seca com sulfato de sódio anidro, filtrada, evaporada à pressão reduzida e pesada. As amostras foram aplicadas nas placas em duplicata.

Aplicação da metodologia desenvolvida

O método desenvolvido foi aplicado na análise de amostras de folhas e cascas de caule de *U. guianensis*, coletadas em Juruema, Mato Grosso e doadas pela O.N.G. Pró-Natura (a planta foi identificada pelo botânico Pierro Delprete do *New York Botanic Garden* e uma exsiccata está depositada no Herbário Central da Universidade Federal de Mato Grosso, com o nº 24.715), e em amostras de folhas e cascas de caule de *U. tomentosa*, coletadas no Acre e doadas pela Embrapa-Acre (dados sobre identificação e exsiccata em Miranda et al., 2003). O método foi aplicado também na análise de quatro fitoterápicos à base de *U. tomentosa* de diferentes fornecedores, aleatoriamente adquiridos no comércio local. A descrição dos fitoterápicos analisados e de seus respectivos procedimentos de extração encontra-se no Quadro 1. As amostras foram aplicadas nas placas em duplicata.

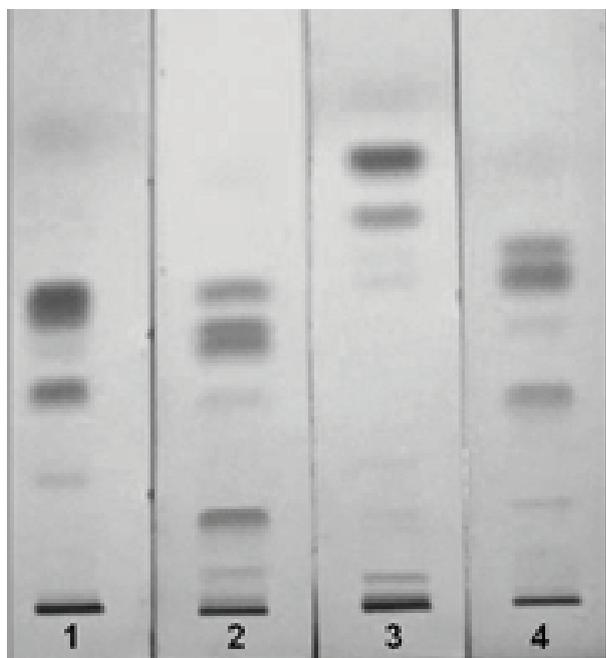
RESULTADOS

A largura de aplicação de 1 cm proporcionou uma melhor resolução das bandas dos alcalóides em relação à de 0,5 cm. A distância de desenvolvimento de 10 cm foi a escolhida por proporcionar uma separação satisfatória dos alcalóides, conjugado à praticidade e menor custo. Os perfis obtidos para os seis alcalóides

Quadro 1. Descrição dos fitoterápicos à base de *Uncaria tomentosa* analisados e de seus respectivos procedimentos de extração

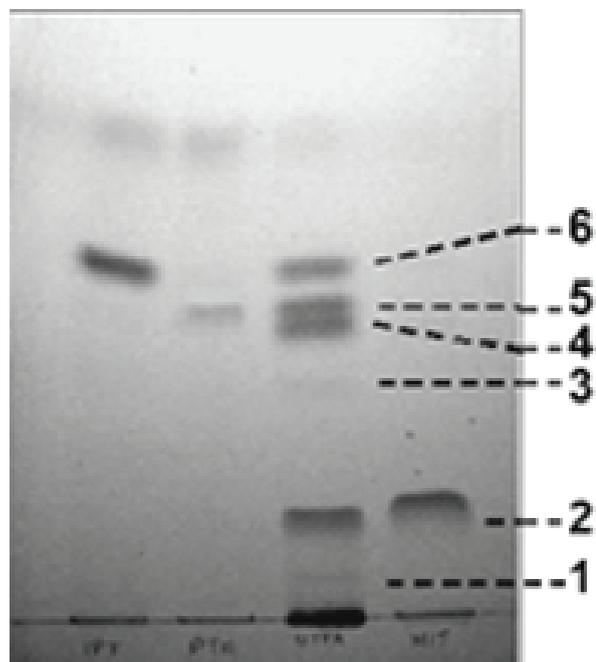
Fitoterápico	Forma farmacêutica	Composição e parte da planta utilizada*	Procedimento de extração**
A	cápsula gelatinosa dura	casca em pó (410 mg/cápsula)	abertura manual da cápsula e extração de seu conteúdo (747 mg/10 mL)
B	comprimido	Parte da planta não informada e excipientes (190 mg de planta/comprimido)	trituração do comprimido seguida de extração (1621 mg/10 mL)
C	comprimido	extrato seco do córtex da raiz e excipientes (100 mg de extrato/comprimido)	trituração do comprimido seguida de extração (638 mg/10 mL)
D	cápsula gelatinosa dura	folha em pó (330 mg/cápsula)	abertura manual da cápsula e extração de seu conteúdo (754 mg/10 mL)

*conforme informado pelo fabricante; **todas as extrações foram feitas com MeOH.



1:CHCl₃/MeOH 95:5; 2:Hexano/AcOEt 5:95; 3:AcOEt/iPrOH/NH₄OH (16:3:1); 4:CHCl₃/Acetona 5:4. Fase estacionária: gel de sílica; visualização: UV, 254 nm; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência: 5 mg/mL; vol. aplicado: 10 µL.

Figura 2. Perfil dos alcalóides oxindólicos da amostra de referência nos quatro sistemas de fase móvel testados.



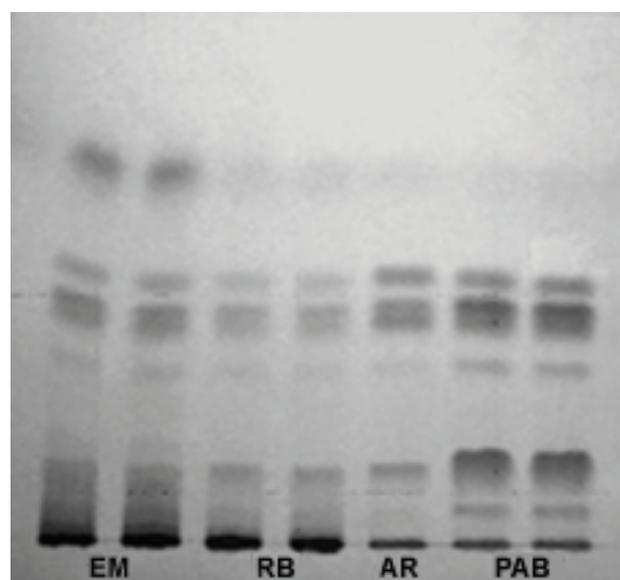
1-Especiofilina, 2-Mitrafilina, 3-Uncarina F, 4-Isomitrafilina, 5-Pteropodina, 6-Isopteropodina. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; visualização: UV, 254 nm; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência: 5 mg/mL; conc. padrões: 1 mg/mL; vol. aplicado: 10 µL.

Figura 3. Identificação dos alcalóides oxindólicos presentes na amostra de referência.



MP: Mistura de Padrões; AR: Amostra de Referência. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência: 5 mg/mL; conc. padrões: 1 mg/mL; vol. aplicado: 10 µL.

Figura 4. Revelação da amostra de referência por borrifamento com reagente de Dragendorff/nitrito de sódio 10%.



EM: Extrato MeOH bruto; RB: Extrato MeOH tratado com resina básica Poliamida 6; AR: Amostra de Referência; PAB: Extrato MeOH submetido à partição ácido-base. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; visualização: UV, 254 nm; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência e de PAB: 5 mg/mL; conc. extratos: 50 mg/mL; vol. aplicado: 10 µL.

Figura 5. Comparação entre os perfis de alcalóides de uma amostra de *U. tomentosa* em relação a diferentes métodos de extração.

Tabela 1. Faixa de valores de R_f dos alcalóides oxindólicos marcadores

Alcalóide	Faixa de valores de R_f *
Especiofilina (1)	0,05-0,06
Mitrafilina (2)	0,15-0,16
Uncarina F (3)	0,34-0,40
Isomitrafalina (4)	0,44-0,49
Pteropodina (5)	0,47-0,53
Isopteropodina (6)	0,53-0,60

*valores determinados a partir do cromatograma da amostra de referência (AR) nas diversas placas cromatográficas apresentadas. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; dist. desenvolvimento: 10 cm.

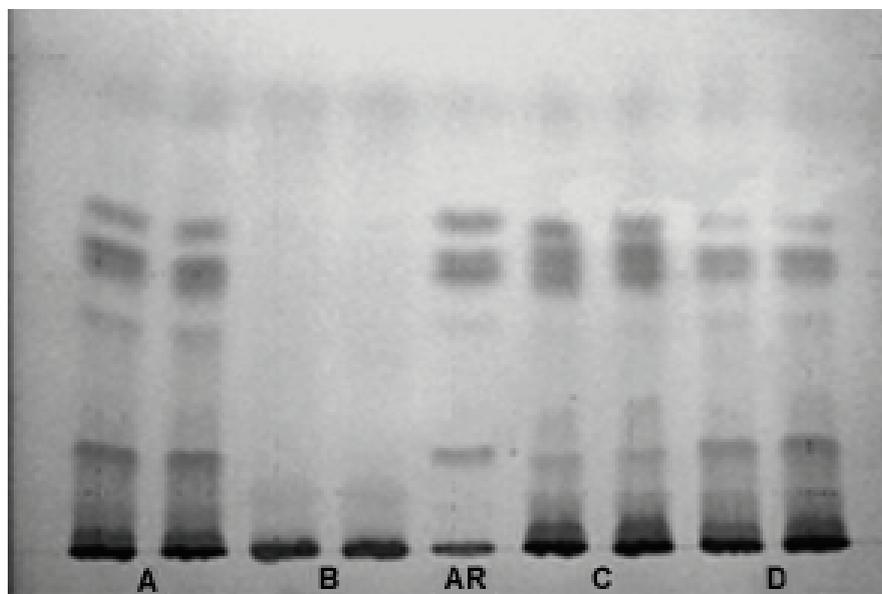
nos quatro sistemas de eluentes testados, utilizando-se uma largura de aplicação de amostra e distância de desenvolvimento respectivamente de 1 e 10 cm (placa cromatográfica de 11,5 cm), são mostrados na Figura 2. O sistema de fase móvel escolhido foi o que utiliza acetato de etila/hexano 95:5 por apresentar melhor separação dos alcalóides alvos. A concentração ótima de análise para essa fração enriquecida foi a que utilizou uma alíquota de 10 μ L da solução estoque de 5 mg/mL. Esta foi a menor concentração que permitiu a visualização de todos os alcalóides presentes, levando-se em conta a variação das concentrações dos mesmos, com substâncias amplamente majoritárias e outras ausentes, ou em concentração muito baixa.

A identificação dos seis alcalóides marcadores na placa cromatográfica é mostrada na Figura 3. A

visualização sob lâmpada de UV a 254 nm (Figuras 2 e 3) mostrou-se mais prática que a revelação por borrifamento com reagente de Dragendorff/nitrito de sódio 10%, que apresentou manchas amarelo-amarronzadas instáveis (Figura 3) (em todas as figuras a seguir as placas cromatográficas mostram a visualização por irradiação em UV a 254 nm).

A comparação entre os perfis de alcalóides obtidos pelo uso do extrato metanólico bruto e frações enriquecidas de alcalóides, oriundas do tratamento do extrato com resina Poliamida 6 e da partição ácido-base, é mostrada na Figura 5.

As Figuras 6 e 7 mostram a aplicação da metodologia desenvolvida na análise de quatro fitoterápicos comerciais à base de *U. tomentosa* de diferentes fabricantes assim como na análise de amostras



A,B,C,D: ver Quadro 1; AR: Amostra de Referência. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; visualização: UV, 254 nm; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência: 5 mg/mL; conc. amostras de fitoterápicos: 50 mg/mL; vol. aplicado: 10 μ L.

Figura 6. Perfil dos alcalóides em amostras de fitoterápicos comerciais à base de *U. tomentosa*.



UGC e UGF: respectivamente caule e folha de *U. guianensis*; UTC e UTF: respectivamente caule e folha de *U. tomentosa*; AR: Amostra de Referência. Fase móvel: Hexano/AcOEt 5:95; fase estacionária: gel de sílica; visualização: UV, 254 nm; dist. desenvolvimento: 10 cm; conc. amostra de referência: 5 mg/mL; conc. amostras: 50 mg/mL; vol. aplicado: 10 μ L.

Figura 7. Perfis dos alcalóides em amostras de *U. tomentosa* e *U. guianensis*

de folhas e cascas de caule das duas espécies.

A faixa dos valores de R_f para os alcalóides alvos está descrita na Tabela 1.

DISCUSSÃO

As pequenas variações que ocorreram nos R_f de algumas substâncias (Tabela 1) devem-se possivelmente às oscilações na saturação da câmara cromatográfica.

A comparação dos cromatogramas obtidos com os dois métodos de extração testados frente ao cromatograma do extrato bruto (Figura 5), revela que a melhor visualização dos alcalóides foi alcançada quando se utilizou a fração enriquecida pela partição ácido-base (PAB). Já o cromatograma do extrato bruto revelou muitas impurezas na base, dificultando, ou mesmo impedindo a visualização dos alcalóides de menor R_f [especiofilina (1) e mitrafilina (2)]. Por outro lado, o tratamento do extrato bruto com a resina básica Poliamida 6 (RB), cuja função é a de reter os taninos, proporcionou uma visualização

muito satisfatória dos alcalóides. Para se obter esses resultados, foram utilizados, tanto para o extrato bruto quanto para o semi-purificado por resina básica, 10 μ L de uma solução 50 mg/mL (500 μ g aplicados) e para a fração obtida por partição ácido-base as mesmas condições da amostra de referência (50 μ g aplicados). A concentração dez vezes maior para o extrato bruto e para o semi-purificado baseou-se no rendimento aproximado de 10% da fração enriquecida em alcalóides, obtida por partição ácido-base, em relação ao extrato bruto. Pode-se concluir que todos os métodos de extração apresentam vantagens e desvantagens, quer pelo custo, quer pelo grande número de etapas ou pela menor eficiência de visualização das manchas dos alcalóides alvo, e que a escolha pode ser feita em termos de número de amostras, recursos disponíveis e objetivos da análise. O método de extração com resina foi o escolhido na análise dos fitoterápicos (Figura 6). Nesse caso, aliam-se a praticidade da extração em fase sólida e o objetivo de se efetuar uma análise comparativa mais detalhada entre os diversos fabricantes. Dessa forma pode-se constatar que o fitoterápico B, ao contrário dos outros, não contém os alcalóides alvos. Para as amostras vegetais, a opção por aplicar o extrato bruto direto na placa cromatográfica (Figura 7), permitiu efetuar uma triagem preliminar rápida da presença e do perfil de alcalóides nesse material, observando-se a ausência e a aparente menor quantidade dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos nas amostras de *U. guianensis* em relação às de *U. tomentosa*. Como constatado pelas diversas placas cromatográficas apresentadas, o método cromatográfico desenvolvido, independente da forma de extração dos alcalóides, mostrou-se confiável, reprodutivo e seletivo para os alcalóides oxindólicos pentacíclicos marcadores alvos, possibilitando uma análise qualitativa do perfil desses alcalóides nas amostras analisadas. Os resultados apresentados preenchem uma lacuna na literatura, e ao mesmo tempo disponibilizam um instrumento alternativo preciso e acessível para o controle de qualidade de produtos e drogas vegetais a partir de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, ao validar a utilização de uma amostra de referência como sucedânea dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos – marcadores químicos de custo elevado (Reif et al., 2004).

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FUJB-UFRJ pelo auxílio financeiro ao projeto. A.C.S. e F.F.A. agradecem ao CNPq e G.M.B. e S.L.R. à FAPERJ pelas bolsas concedidas. Os autores agradecem também à Profa. Bluma G. Soares do IMA-UFRJ pela doação da resina Nylon 6, ao Prof. Marcos V. A. Fonseca e à Dra. Ma. Cristina L. F. P. Pinto do IQ-UFRJ pela moagem da mesma e ao Prof. Luiz Nelson L. F. Gomes do IQ-UFRJ pela fotografia das placas. Agradecem ainda ao Dr. Peter May, à O.N.G. Pro-Natura, à empresa Biosapiens, e ao Dr. João A. de Sousa da Embrapa-Acre pela doação do

material vegetal utilizado no trabalho. E, finalmente, à Dra. Héliida B. N. Borges do Herbário Central da UFMT pelos dados da exsicata de *U. guianensis*.

REFERÊNCIAS

- Ganzera M, Muhammad I, Khan RA, Khan IA 2001. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Planta Med* 6: 447-450.
- Ginkel A 1996. Identification of the alkaloids and flavonoids from *Uncaria tomentosa* bark by TLC in quality control. *Phytother Res* 10: S18-S19.
- Glensk M, Żbikowska B, Cisowski W 2004. TLC separation of *Uncaria tomentosa* alkaloids on chemically modified stationary phases. *J Planar Chromatogr* 17: 14-17.
- Heitzmam ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). *Phytochemistry* 66: 5-29.
- Julião LS, Tavares ES, Lage CLS, Leitão SG 2003. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) N.E.Br. (erva-cidreira). *Rev Bras Farmacogn* 13(Supl. 1): 36-38.
- Keplinger K, Wurn M, Laus G 2002. Process and substances for the release of a growth-regulating factor from endothelial cells. *USP 0039790 A1*.
- Laus G, Keplinger D 1994. Separation of stereoisomeric oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 662: 243-249.
- Laus G, Brössner D, Keplinger K 1997. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 45: 853-860.
- Laus G, Keplinger K 2003. Alkaloids of Peruvian *Uncaria guianensis* (Rubiaceae). *Phyton* 43: 1-8.
- Lopez-Avila V, Benedicto J, Robaugh D 1997. Supercritical fluid extraction of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *J High Resol Chromatogr* 20: 231-236.
- Mazzei JL, Rosario SL, Silva RS, Siani AC, Valente LMM, D'Avila LA 2002. Scale-up of isolation of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by HPLC using chromatographic model. *Rev Fitoterapia* 2: 289.
- Mazzei JL 2004. *Transposição em escala por modelos na produção de substâncias naturais por cromatografia líquida de alta eficiência*. Rio de Janeiro, 227p. Tese de Doutorado - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Miranda EM, Sousa JA, Pereira RCA 2003. Caracterização e avaliação de populações nativas de unha de gato [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. e *U. guianensis* (Aubl.) Gmel.] no vale do rio Juruá-AC. *Rev Bras Pl Med* 5: 41-46.
- Philipson JD, Hemingway SR 1975. Chromatographic and spectroscopic methods for the identification of alkaloids from herbarium samples of the genus *Uncaria*. *J Chromatogr* 105: 163-178.
- Reif K, Sievers H, Steffen J-P 2004. The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials - a European perspective. *HerbalGram* 63: 38-43.
- Revilla J 2002. *Plantas Úteis da Bacia Amazônica*. v.II, Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/SEBRAE-AM.
- Ridsdale CE 1978. A revision of *Mitragyna* and *Uncaria* (Rubiaceae). *Blumea* 24: 43-100.
- Seki H, Takayama H, Aimi N, Sakai SI, Ponglux D 1993. A nuclear magnetic resonance study on the eleven stereoisomers of heteroyohimbine-type oxindole alkaloids. *Chem Pharm Bull* 41: 2077-2086.
- Vilches LEO 1997. *Unha de Gato. Género Uncaria. Estudos Botânicos, Químicos y Farmacológicos de Uncaria tomentosa y Uncaria guianensis*. 3ª. ed. Lima: Instituto de Fitoterapia Americano.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas*. Berlin: Springer.