

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

Obtenção de frações bioativas de
Uncaria tomentosa (Willd) DC. (Unha-de-gato):
Avaliação tecnológica e biológica

CABRAL PAVEI

PORTO ALEGRE, 2010

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

Obtenção de frações bioativas de
Uncaria tomentosa (Willd) DC. (Unha-de-gato):
Avaliação tecnológica e biológica

Tese apresentada por **CABRAL PAVEI**
para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR
em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega
Co-Orientador: Profa. Dr. Christianne Gazzana Salbego

PORTO ALEGRE, 2010

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 27.01.2010, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Ana Maria Oliveira Battastini
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Tatiane Pereira de Souza
Universidade Federal do Amazonas

Profa. Dr. Valquiria Linck Bassani
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

P337o Pavei, Cabral

Obtenção de frações bioativas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (Unha de gato): avaliação tecnológica e biológica / Cabral Pavei. – Porto Alegre: UFRGS, 2010. – xxiv, 203 p. : il.

Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. *Uncaria tomentosa*. 2. Unha-de gato. 3. Rubiaceae. 4. Validação: métodos analíticos. 5. Controle de qualidade: Matéria-prima vegetal. 6. Efeito antiproliferativo. 7. Atividade imunoadjuvante. I. Ortega, George Gonzalez. II. Salbego, Christianne Gazzana. III. Título.

CDU: 615.4

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

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e no Centro de Desenvolvimento Tecnológico e Farmacêutico (CDTF/UFRGS). Algumas análises foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; no laboratório de Neurociência do Instituto de Ciências Básicas da Saúde; no Laboratório de Materiais Cerâmicos da Escola de Engenharia; no Centro de Microscopia Eletrônica da UFRGS e no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da UFG.

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade, onipotente;

Ao Professor George Ortega, exemplo profissional e ético, pela confiança e liberdade na execução de todos os experimentos;

A Professora Christiane Salbego, pela co-orientação do trabalho;

Aos farmacêuticos Gustavo Luis Borré e Samuel Kaiser, pela oportunidade de aprender e ensinar um pouco a cada dia;

À família Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG), onde todos os companheiros de bancada e professores integrantes contribuíram de forma direta na construção de meu caráter pessoal e profissional;

Ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), na pessoa do Professor Paulo Mayorga, por oportunizar esta vivência com o setor produtivo farmacêutico, fundamental para meu crescimento profissional;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), pela busca incansável de aperfeiçoamento de seus docentes e discentes;

A todos os docentes e funcionários da Faculdade de Farmácia (FACFAR), bem como dos demais cursos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho;

A todos os meus fiéis amigos de Santa Catarina;

A minha irmã Katiuci, cunhado Ranier e querida Aninha, pelo carinho e incentivo incondicionais;

Às minhas famílias Rocha e Réus, outros grandes presentes que recebi com meu casamento;

À minha esposa Deise, a flor que embeleza e torna mais agradável os dias;

À minha mãe Adelina, pelo amor, carinho, confiança... e por ser agora a luz que iluminará todos os meus caminhos.

"In the field of observation
chance favors only the prepared mind"

Louis Pasteur

RESUMO

Uncaria tomentosa (Willd) DC. é uma árvore nativa das Américas Central e do Sul, onde é popularmente conhecida como "unha-de-gato". Sua casca é largamente utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças, como gastrite, asma e artrite. Quanto à sua composição química é descrita a presença de alcalóides indólicos e oxindólicos, compostos polifenólicos e derivados do ácido quinóico. Este trabalho teve como objetivo obter em separado frações enriquecidas dos referidos grupos químicos de *Uncaria tomentosa*, empregando o procedimento de extração em fase sólida, bem como a validação dos métodos analíticos aplicados a cada fração bioativa. Adicionalmente, as frações enriquecidas foram avaliadas quanto ao potencial efeito antiproliferativo contra linhagens de células de glioma e atividade imunoadjuvante empregando como modelo vacinas virais contendo BoHV-5, respectivamente em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Todos os métodos de análise necessários para o acompanhamento e controle de qualidade da matéria-prima e produtos de transformação foram validados de forma satisfatória. O procedimento de separação/purificação empregando resina de poliestireno demonstrou resultados robustos e reprodutíveis e permitiu a separação de frações ricas em compostos fenólicos, alcalóides e triterpenos. Em outro plano, foi possível constatar a isomerização dos alcalóides pentacíclicos em meio aquoso por efeito do processo de secagem empregando elevadas temperaturas. O método de análise para a quantificação de polifenóis foi discriminatório quando aplicado aos extratos obtidos de diferentes órgãos de *U. tomentosa*. As frações fenólica e alcaloídica foram capazes de diminuir a porcentagem de células viáveis das linhagens de glioma C6 e U138-MG após período de tratamento de 48 e 72 h, respectivamente. Complementarmente, estas frações não afetaram as células não-tumorais na mesma extensão em que afetam as células cancerosas. No tocante à avaliação da atividade imunoadjuvante, um pequeno efeito foi observado apenas na resposta imune dos animais imunizados com a fração triterpênica.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*, controle de qualidade, frações enriquecidas, antiproliferativo, imunoadjuvante.

ABSTRACT

Preparation of purified bioactive fractions of *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (cat's claw): technological and biological evaluation

Uncaria tomentosa (Willd) DC. is a climbing tree native from Central and South America, where is commonly known as “uña-de-gato” or “cat's claw”. Its bark is widely used in traditional medicine for the treatment of gastritis, asthma and arthritis. Concerning its chemical composition is worth mentioning the presence of indole and oxindole alkaloids, phenolic compounds and quinovic acid derivatives. This work aims to obtain enriched fractions of the three main chemical groups of *Uncaria tomentosa* above described using solid phase extraction procedure, as well as the validation of specific assay methods. In parallel, potential antiproliferative effect against glioma cell lines and immunoadjuvant activity using BoHV-5 viral vaccine are evaluated by *in-vitro* and *in-vivo* models, in that order. All analytical methods required for monitoring and end-process quality control were validated satisfactorily. The separation/purification procedure using a polystyrene resin gave promising results and allowed the separation of phenolics, alkaloids and triterpenes fractions. Fractions yield were in all satisfactory and the processes were robust and reproducible. It could confirm the alkaloid isomerization in aqueous milieu by effect of the temperature process. The LC method for assay of polyphenols was discriminatory when applied to extracts from different organs of *U. tomentosa*. The fractions of phenolic and alkaloids compounds were able to decrease the percentage of cells in C6 and U138-MG glioma lineages after a 48h and 72h-treatment, respectively. Moreover, these fractions did not affect non-tumoral cells to the extent that they affect tumor cells. With regard to the immunoadjuvant activity evaluation a moderate effect was detected on immune responses of immunized animals with triterpenes fraction.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, quality control, enriched fractions, antiproliferative, immunoadjuvant.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a. Características botânicas de diferenciação entre <i>Uncaria tomentosa</i> e <i>Uncaria guianensis</i>	16
Tabela 1b. Condições cromatográficas empregadas na análise de metabólitos secundários presentes em <i>Uncaria tomentosa</i>	28
Tabela 1c. Registros de patentes que contemplam produtos transformados de <i>Uncaria tomentosa</i>	30
Tabela 1.1. Percent composition of the <i>Uncaria tomentosa</i> spray-dried extracts	53
Tabela 1.2. Results of hydroethanolic solutions of <i>Uncaria tomentosa</i>	54
Tabela 1.3. Alkaloid content in dried extracts from <i>Uncaria tomentosa</i>	55
Tabela 2.1. HPLC parameters for the standard alpha-hederin and for Peak 1 in the <i>Uncaria tomentosa</i> extract	79
Tabela 2.2. Repeatability and intermediate precision for the standard alpha-hederin and Peak 1 in the <i>Uncaria tomentosa</i> extract	80
Tabela 2.3. Quantification of quinovic acid glycosides in dried extracts from <i>Uncaria tomentosa</i> bark	81
Tabela 3.1. System suitability parameters for standards peaks (left) and the five major peaks (right, italic) detected in the HB chromatogram.	105
Tabela 3.2. Linearity, LOD and LOQ parameters for the standards compounds	106
Tabela 3.3. Repeatability and intermediary precision for the main five peaks detected in the HB chromatogram	107
Tabela 3.4. Recovery test for chlorogenic acid, caffeic acid and rutin in HB	108
Tabela 3.5. Polyphenol contents in different freeze-dried extracts (HB, HR, AB, AR) and commercial extract (CE)	109

Tabela 4a. Gradientes de eluição testados a obtenção de frações de 125
Uncaria tomentosa empregando a resina Diaion® HP-20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1a. Aspecto da parte superior de um arbusto de <i>Uncaria tomentosa</i>	14
Figura 1b. Desenhos botânicos das espécies (A) <i>Uncaria tomentosa</i> (Will) D.C. e (B) <i>Uncaria guianensis</i> (Aubl.) J. F. Gmel.	15
Figura 1c. Glicosídeos do ácido quinóvico isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	19
Figura 1d. Glicosídeos do ácido piroquinóvico isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	20
Figura 1e. Principais classes de alcalóides indólicos isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	21
Figura 1f. Principais classes de alcalóides oxindólicos isolados de <i>Uncaria tomentosa</i>	22
Figura 1.1. LC-chromatograms: (a) <i>U. tomentosa</i> extract obtained according selected process conditions, (b) mitraphylline reference standard, and (c) physical mixture of spray drying excipients	56
Figura 1.2. Scanning electron photomicrographs of UTS1 (with colloidal silicon dioxide), UTS2 (colloidal silicon dioxide and maltodextrin; 1:1), and UTS3: (maltodextrin)	57
Figura 2.1. Structure of (A) alpha-hederin and (B) general substitution patterns in quinovic derivatives	82
Figura 2.2. Alpha-hederin LC chromatogram and the corresponding UV spectrum	83
Figura 2.3. LC chromatograms of the <i>Uncaria tomentosa</i> extract (upper image) and quinovic derivatives fraction (lower image) showing exclusion of the major phenolic fraction after cleanup step. Detection at 205 nm	84
Figura 3.1. Chromatographic profiles of the standards compounds and their respective UV-spectra (200 - 500 nm)	111
Figura 3.2. LC-Chromatograms and UV-spectra (200 - 500 nm) showing	112

the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, and two still unidentified flavonoids in HB samples. Detection at 325 nm

Figura 3.3. LC-chromatograms recorded at 325 nm for the *U. tomentosa* 113
hydroethanolic extract from root (HR); aqueous extract from bark (AB);
aqueous extract from root (AR); and commercial extract (CE) along with
UV-spectra (200 – 500 nm) of the peak 3 and peak 4

Figura 4a. Aspectos macroscópicos das cascas do tronco de *Uncaria* 127
tomentosa

Figura 4b. Perfil cromatográfico por CLAE de polifenóis de *Uncaria* 131
tomentosa no extrato seco liofilizado (ELUT) e nas frações 30 (Fr 30) e
50 (Fr 50)

Figura 4c. Perfil cromatográfico por CLAE de alcalóides de *Uncaria* 132
tomentosa na fração 70 (acima) e no extrato seco liofilizado (abaixo)

Figura 4d. Perfil cromatográfico por CLAE de derivados quinóvicos de 133
Uncaria tomentosa no extrato seco liofilizado e na fração 90

Figura 5.1. Coloração com sulforrodamina B em linhagem de gliomas C6 149
após tratamento com a fração polifenólica por 24 h (a) e 48 h (b)

Figura 5.2. Morfologia celular e marcação com Iodeto de propídeo em 150
linhagem de células C6 após tratamento com fração polifenólica por 24 h
(a) e por 48 h (b)

Figura 5.3. Coloração com sulforrodamina B em linhagem de glioma 151
U137-MG após tratamento com a fração polifenólica por 48 h (a) e 72 h
(b)

Figura 5.4. Morfologia celular e marcação com Iodeto de propídeo em 152
linhagem de células U137-MG após tratamento com fração polifenólica
por 72 h

Figura 5.5. Coloração com sulforrodamina B após tratamento com a 153
fração alcaloídica por 24 h (a) e 48 h (b)

Figura 5.6. Morfologia celular e marcação com Iodeto de propídeo após 154

tratamento com fração alcaloídica por 24 h (a) e por 48 h (b)	
Figura 5.7. Coloração com sulforrodamina B em linhagem de glioma U137-MG após tratamento com a fração alcaloídica por 48 h (a) e 72 h (b)	155
Figura 5.8. Morfologia celular e marcação com Iodeto de propídeo em linhagem de células U137-MG após tratamento com fração alcaloídica por 72 h	156
Figura 5.9. Marcação com iodeto de propídeo em culturas organotípicas de hipocampo após tratamento por 48 h com as frações polifenólica (FP) e alcaloídica (FA)	157
Figura 6.1. Reverse phase LC-UV chromatograms of Ilexoside II at 0.5 mg/mL (A) and MSF at 1mg/mL (B). UV detection at 205 nm	174
Figura 6.2. LC-UV chromatograms of alpha-hederin (A) and quinovic derivatives fraction (B). UV detection at 205 nm	175
Figura 6.3. Total IgG antibody, represented as optical density at 492 nm using indirect ELISA. Mice were immunized on days 0 and 14 and sera were collected on days 0, 14, 28 and 42 (T0, T1, T2 and T3 respectively)	176

LISTA DE ABREVIATURAS

ELUT – Extrato liofilizado de *Uncaria tomentosa*

ESUT_a – Extrato seco por *spray-drying* de *Uncaria tomentosa* empregando dióxido de silício coloidal e maltodextrina como adjuvantes

ESUT_b – Extrato seco por *spray-drying* de *Uncaria tomentosa* empregando dióxido de silício coloidal como adjuvante

ESUT_c – Extrato seco por *spray-drying* de *Uncaria tomentosa* empregando maltodextrina como adjuvante

FA – Fração alcaloídica de *Uncaria tomentosa*

FP – Fração polifenólica de *Uncaria tomentosa*

FT – Fração triterpênica de *Uncaria tomentosa*

SG – Sistema gradiente de eluição no processo de purificação

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xix
APRESENTAÇÃO	1
INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	3
OBJETIVOS	7
REFERENCIAL TEÓRICO	11
CAPÍTULO 1. Obtenção de Soluções Extrativas e Extratos Secos de <i>Uncaria tomentosa</i>	33
Introdução	35
<i>Artigo 1. Alkaloid isomerization induced by spray drying of Uncaria tomentosa bark extracts</i>	37
CAPÍTULO 2. Desenvolvimento de método analítico aplicado aos derivados quinóvicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	59
Introdução	61
<i>Artigo 2. LC method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (<i>Uncaria tomentosa</i>)</i>	63
CAPÍTULO 3. Desenvolvimento de método analítico aplicado aos derivados fenólicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	85
Introdução	87
<i>Artigo 3. Validation of a LC Method for Polyphenols assay in Cat's Claw (<i>Uncaria tomentosa</i>)</i>	89

CAPÍTULO 4. Obtenção de frações enriquecidas de alcalóides, polifenóis e derivados quinóicos de <i>Uncaria tomentosa</i>	115
Introdução	117
Materiais e Métodos	118
Resultados e Discussão	127
CAPÍTULO 5. Avaliação da atividade antiproliferativa sobre linhagens de glioma	137
Introdução	139
<i>Artigo 4. Investigação do efeito de frações enriquecidas de Uncaria tomentosa sobre a proliferação de linhagens de glioma</i>	141
CAPÍTULO 6. Avaliação da atividade imunoadjuvante da fração enriquecida em triterpenos de <i>Uncaria tomentosa</i>	161
Introdução	163
<i>Artigo 5. Investigation of immunoadjuvant activity of triterpenic saponins from Ilex paraguariensis and Uncaria tomentosa using a BoHV-5 viral vaccine</i>	165
DISCUSSÃO GERAL	181
CONCLUSÕES	189
REFERÊNCIAS	193
APÊNDICES	201

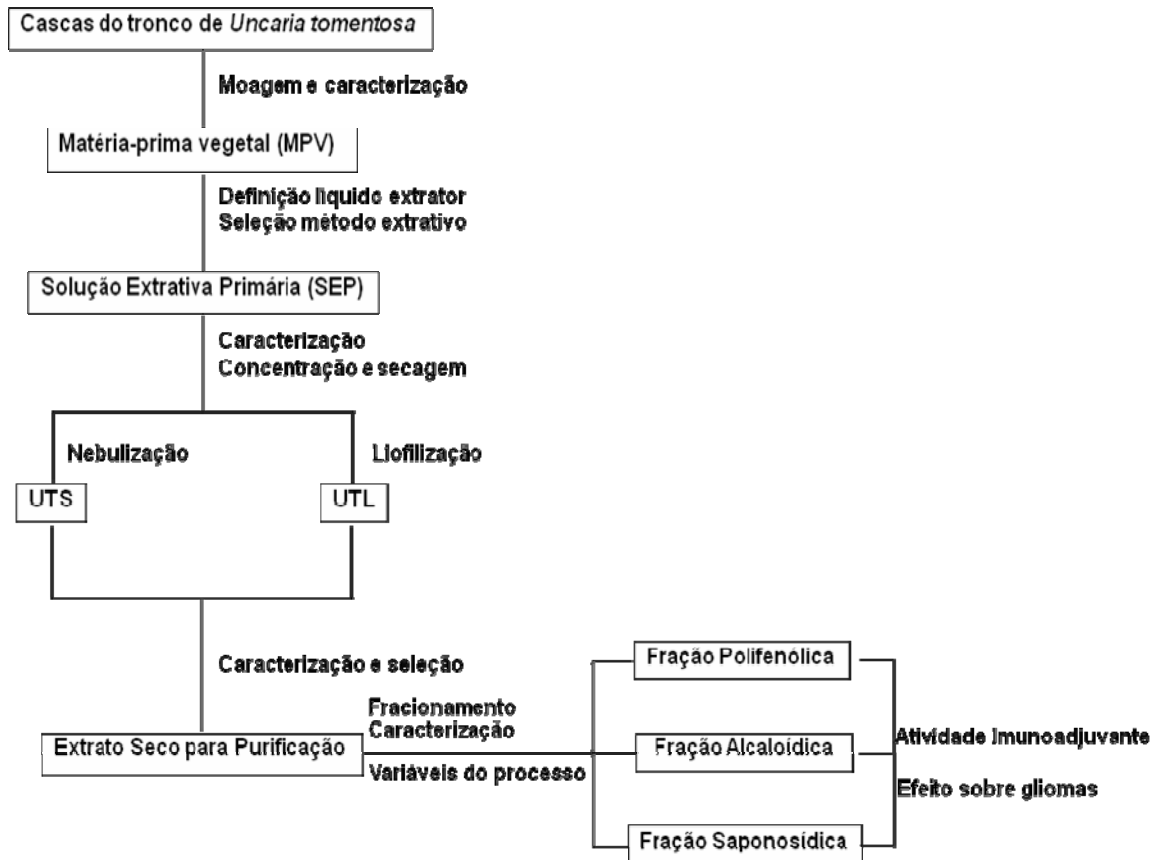
APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de capítulos.

Desta forma, o presente exemplar encontra-se organizado da seguinte forma:

- Objetivo geral;
- Fundamentos teóricos;
- Capítulos 1 a 6: introdução e artigos submetidos ou por serem submetidos à publicação, a exceção do capítulo 4.
- Discussão geral;
- Conclusões;
- Referências bibliográficas;
- Anexos

O esquema apresentado a seguir permite a compreensão das etapas experimentais descritas nos capítulos da presente tese.



INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

No desenvolvimento e transformação de derivados vegetais, em nível de pesquisa acadêmica ou escala industrial, freqüentemente verifica-se uma maximização das abordagens e decisões, motivada em sua maioria pela gama de processos e aplicações factíveis a estes produtos, fato que estimula a realização de novos e frutíferos projetos.

Sob esta ótica, a partir da realização de um estudo inicial envolvendo a obtenção de frações padronizadas a partir de derivados vegetais, foi possível estabelecer um processo de purificação de saponinas diferenciado, o qual possibilitou a solicitação de registro intelectual (PI 0501510-3, 22/04/2005; PAVEI, 2004). Neste escopo, surgiu a perspectiva de consolidação desta estratégia e o domínio tecnológico do processo, visando produtos com valor agregado mediante a definição da espécie vegetal e do delineamento na obtenção e purificação de frações bioativas.

A *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. (unha-de-gato) é uma espécie nativa da floresta amazônica e de outras regiões tropicais da América do Sul, tendo grande relevância sócio-econômica nas regiões de cultivo (SPIEGELFELD, 2005). No Brasil, a espécie ocorre nos estados do Acre, Amapá, Amazonas e Pará.

Suas propriedades antiinflamatória, cicatrizante e antiulcerativa são reconhecidas por povos em diversos países, estando algumas alicerçadas em estudos científicos (KEPLINGER e col., 1999).

Tendo como referencial os relatos da presença na espécie de grupos ativos representados pelos polifenóis, triterpenos e alcalóides, a proposta em obter produtos purificados tecnologicamente constitui para a espécie uma abordagem inédita, garantindo uma padronização química e segurança farmacológica. De forma complementar, a realização de avaliações *in vitro* e *in vivo* de atividades biológicas relatadas à espécie almeja ratificar a relação entre as frações purificadas obtidas e as atividades farmacológicas propostas a espécie.

Objetivou-se ainda como escopo do presente projeto, expandir as atividades interdisciplinares e interinstitucionais, oportunizando experiências acumuladas nos diferentes centros de pesquisa envolvidos e valorizando ações ainda pouco exploradas no desenvolvimento de fitoterápicos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Desenvolver e aperfeiçoar processo de purificação de frações bioativas presentes em *Uncaria tomentosa*, com concomitante desenvolvimento de produtos intermediários, métodos analíticos e avaliação biológica das frações obtidas.

Objetivos específicos

- Efetuar avaliação analítica e tecnológica da matéria-prima vegetal.
 - Desenvolver e validar sistemas cromatográficos de caracterização e quantificação por CLAE para análise das frações triterpênica, alcaloídica e de derivados fenólicos.
 - Obter e caracterizar tecnológica e analiticamente soluções extrativas primárias.
 - Produzir e caracterizar mediante ensaios tecnológicos e analíticos extratos secos obtidos por liofilização e aspensão.
 - Desenvolver e padronizar técnica de fracionamento em fase sólida aplicada às frações enriquecidas em polifenóis, alcalóides e triterpenos.
 - Efetuar a caracterização tecnológica e analítica das frações obtidas.
 - Avaliar o potencial imunoadjuvante das frações enriquecidas, em ensaios *in vivo*.
 - Avaliar *in vitro* o efeito antiproliferativo das frações enriquecidas sobre linhagens de células de glioma de ratos e humanos.
-

REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos agronômicos e botânicos

O Gênero *Uncaria* da família Rubiaceae é composto por aproximadamente 60 espécies distribuídas, em sua maioria, na África e Ásia (KEPLINGER e col., 1999). Especificamente, *Uncaria tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Shultes) D.C. é uma videira de cipó espinhoso de ocorrência natural nas florestas tropicais do Peru, Colômbia, Equador, Guiana, Venezuela, Trinidad, Suriname, Guatemala, Costa Rica, Panamá, Republica Dominicana, englobando áreas desde o nível do mar até mais de 750 metros de altura. Caracteriza-se pela formação de emaranhados que alcançam 40 metros de comprimento e 20 metros de altura, aproximadamente. Os ramos são obtuso-quadrangulares e os talos possuem um espinho lenhoso, dirigido para baixo, reto ou pouco curvado, que pode medir cerca de 2 cm, o qual auxilia na escalada para as outras árvores e é responsável pelos nomes populares unha-de-gato ou garra-de-gato (POLLITO; TOMAZELLO, 2006).

As folhas são pecioladas, opostas, de forma oblonga, de coloração verde claro na face superior e verde pálido na parte inferior, na qual são encontrados finos pêlos, denominados tomentos. Quanto às dimensões, apresentam de 1 a 5 cm de comprimento e de 3 a 5 cm de largura. As inflorescências possuem até cinco pseudo-cabeças esféricas, pedúnculo pubescente com 1,5 a 4,0 cm de comprimento, solitário ou por vezes racemoso, com cálice e corola tubulares (figura 1a).



Figura 1a. Aspecto da parte superior de um arbusto de *Uncaria tomentosa* (retirada de www.herbalgram.com).

Segundo relatos históricos, *U. tomentosa* é cultivada há mais de 2000 anos por indígenas na floresta amazônica, sendo a casca a parte utilizada, tanto na medicina tradicional quanto institucional (POLLITO; TOMAZELLO, 2006). Tem-se descrito três tipos diferentes de cascas de *U. tomentosa*, diferenciadas apenas na coloração após o corte, podendo variar em tonalidades de vermelho, cinza e marrom (QUINTELA; DE UGAZ, 2003).

Uncaria tomentosa ocorre na Amazônia Brasileira e Peruana ocupando de modo amplo e concomitante o mesmo habitat que a espécie sul-americana *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., a qual é a principal responsável por equívocos e adulterações botânicas envolvendo a matéria-prima vegetal (QUINTELA; DE UGAZ, 2003). Contudo, é possível estabelecer uma diferenciação botânica consistente entre ambas às espécies a partir da comparação morfo-anatômica dos órgãos vegetativos e reprodutivos (GATTUSO e col., 2004; POLLITO; TOMAZELLO, 2006). As principais

características de diferenciação entre *U. tomentosa* e *U. guianensis* são apresentadas relacionadas na figura 1b e na tabela 1a.

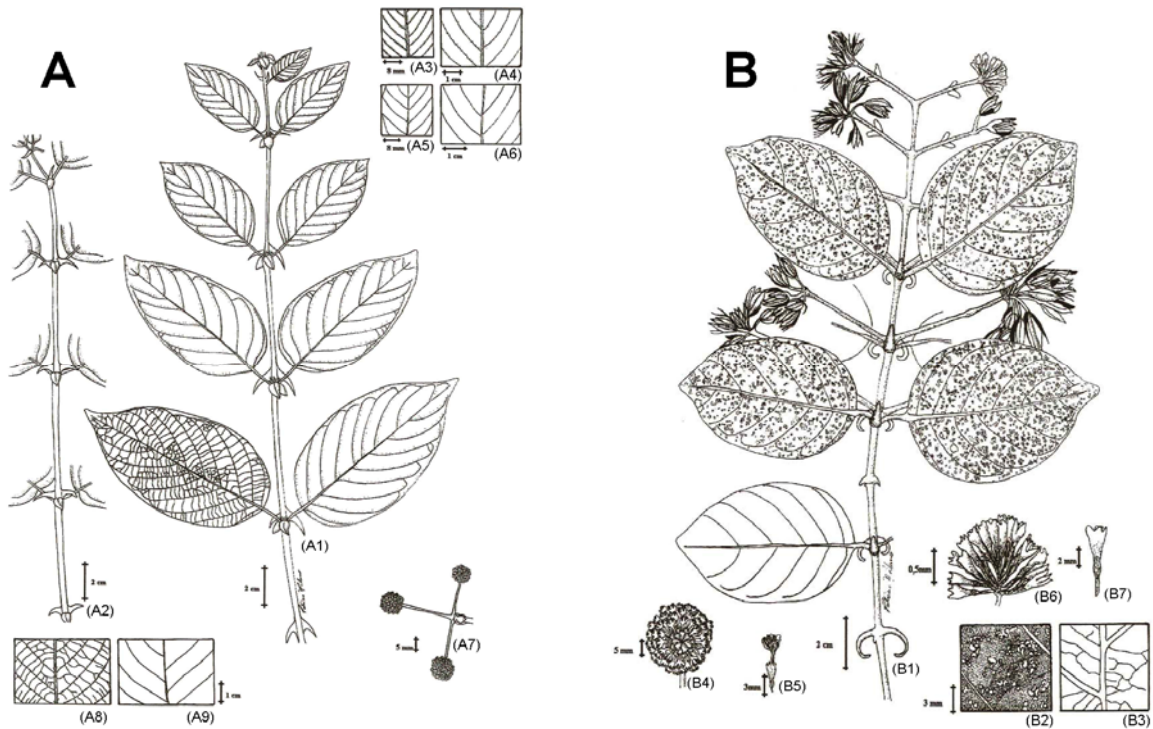


Figura 1b. Desenhos botânicos das espécies (A) *Uncaria tomentosa* (Will) D.C. e (B) *Uncaria guianensis* (Aubl.) J. F. Gmel. Nota: A1: ramo terminal; A2: detalhe espinhos no caule; A3 e A4: pubescência face abaxial folha nova e velha; A5 e A6: pubescência na face adaxial folha nova e velha; A7: inflorescência imatura; A8 e A9: detalhe da nervura da folha com pubescência face abaxial e adaxial; B1: Ramo terminal com inflorescência e frutos; B2 e B3: pubescência face abaxial folha nova e velha; B4: inflorescência capítulo; B5: flor; B6: inflorescência com flores fecundadas; B7: cálice da flor (adaptado de POLLITO; TOMAZELLO, 2006).

Tabela 1a. Características botânicas de diferenciação entre *Uncaria tomentosa* e *Uncaria guianensis*.

parte \ espécie	<i>Uncaria tomentosa</i>	<i>Uncaria guianensis</i>
Espinhos	Opostos, pouco curvados	Alternados, recurvados
Folhas	Menos alongadas, apresentam pêlos	Globosas e ausência de pêlos
Cascas	Micro-cristais de oxalato de cálcio, fibras maiores	Grandes cristais, fibras menores
Inflorescências	Amarelas com branco, cinco lobos	Laranjas com vermelho, esféricas, com três lobos
Sementes	Pequenas	Grandes
Dimensões da espécie	10 – 30 m comprimento x 5 – 40 cm diâmetro	4 – 10 m comprimento x 4 – 15 cm diâmetro

Aspectos Fitoquímicos

A análise dos constituintes químicos das cascas de *U. tomentosa*, revela a presença de compostos **fenólicos**, como flavonóides, derivados fenilpropânicos e taninos; derivados **triterpênicos**, representados pelas agliconas e heterosídeos dos ácidos quinóico, ursólico e oleanólico; e, com significativa deferência científica, de **alcalóides**, sendo majoritários os oxindólicos e, em menor proporção, os indólicos. Há referência ainda ao isolamento dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol e campesterol (KEPLINGER e col., 1999).

Polifenóis

Quando comparado a outras espécies do gênero, *U. tomentosa* possui uma pequena distribuição qualitativa e quantitativa de derivados fenólicos. Os relatos indicam uma presença mais acentuada destes metabólitos em exemplares novos, possivelmente envolvidos nos eventos de proteção do vegetal (HEITZMAN e col., 2005).

Entre as classes fenólicas isoladas, os flavonóides apresentam derivados do canferol e quercetina. Segundo van Ginkel (1996), a ausência de rutina em *U. tomentosa* serviria como uma forma de diferenciação, mediante análise por CCD, entre essa espécie e *U. guianensis*. Contudo, contrariando este relato, Griebeler (2006) relatou mediante análise por CCD a presença de rutina também em amostras de cascas, denotando a necessidade de estudos complementares.

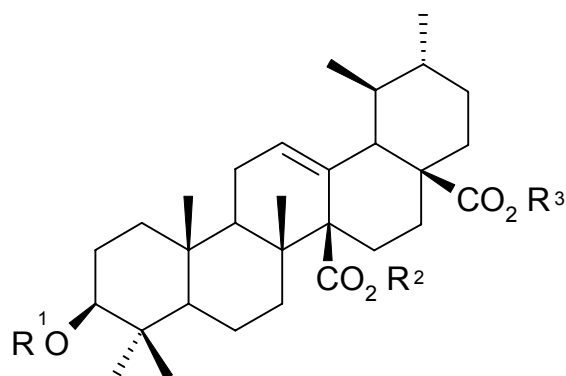
Entre os taninos, apenas os condensados e suas unidades monoméricas catequina e epicatequina estão presentes em *U. tomentosa*, perfazendo até 20 % em peso do conteúdo das cascas. Outras cinco procianidinas foram relatadas para a espécie (HEITZMAN e col., 2005).

Triterpenos

Em sua maioria, os triterpenos presentes em espécies de *U. tomentosa* derivam dos ácidos oleanólico, ursólico, 19 α -hidroxi-ursólico, quinóvico e piroquinóvico (AQUINO e col., 1997). Os triterpenos isolados de

órgãos de *U. tomentosa* são, em sua maioria, heterosídeos do ácido quinóico (figura 1c) com padrões de glicosilação monodesmosídica em C-3, C-27 ou C-28, ou bidesmosídica, com cadeias em C-3 e C-27 ou em C-3 e C-28. Os principais açúcares que constituem a cadeias osídicas são: galactose, glicose e ramnose.

O estudo precursor visando ao isolamento de triterpenos em *U. tomentosa* oportunizou os indícios de pronunciadas atividades biológicas da espécie que contrapunham aos teores de alcalóides nos extratos utilizados nos experimentos (CERRI e col., 1988). A partir deste trabalho, o isolamento e elucidação estrutural destes compostos aportaram um significativo conhecimento químico da sua distribuição entre as espécies que compõem o gênero, permitindo o isolamento de diversas agliconas e heterosídeos, além de ensejarem à seleção destes compostos como marcadores quimiotaxonômicos (AQUINO e col., 1990; AQUINO e col., 1991; AQUINO e col., 1997).



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

Figura 1c. Glicosídeos do ácido quinóvico isolados de *Uncaria tomentosa*. **glc**: β -D-glicopiranosil; **fuc**: β -D-fucopiranosil; **gal**: β -D-galactopiranosil; **qui**: β -D-quinovipiranosil; **rha**: α -L-ramnopiranosil.

Novos glicosídeos foram isolados das cascas de *U. tomentosa* permitindo uma melhor diferenciação química em relação a *U. guianensis*. Kitajama e colaboradores (2003) isolaram dois compostos derivados do ácido 19 α -hidroxi-ursólico, assim como os tomentosídeos A e B (figura 1d), que

apresentam como núcleo o ácido piroquinóvico, relatados pela primeira vez para espécies vegetais (KITAJAMA e col., 2003).

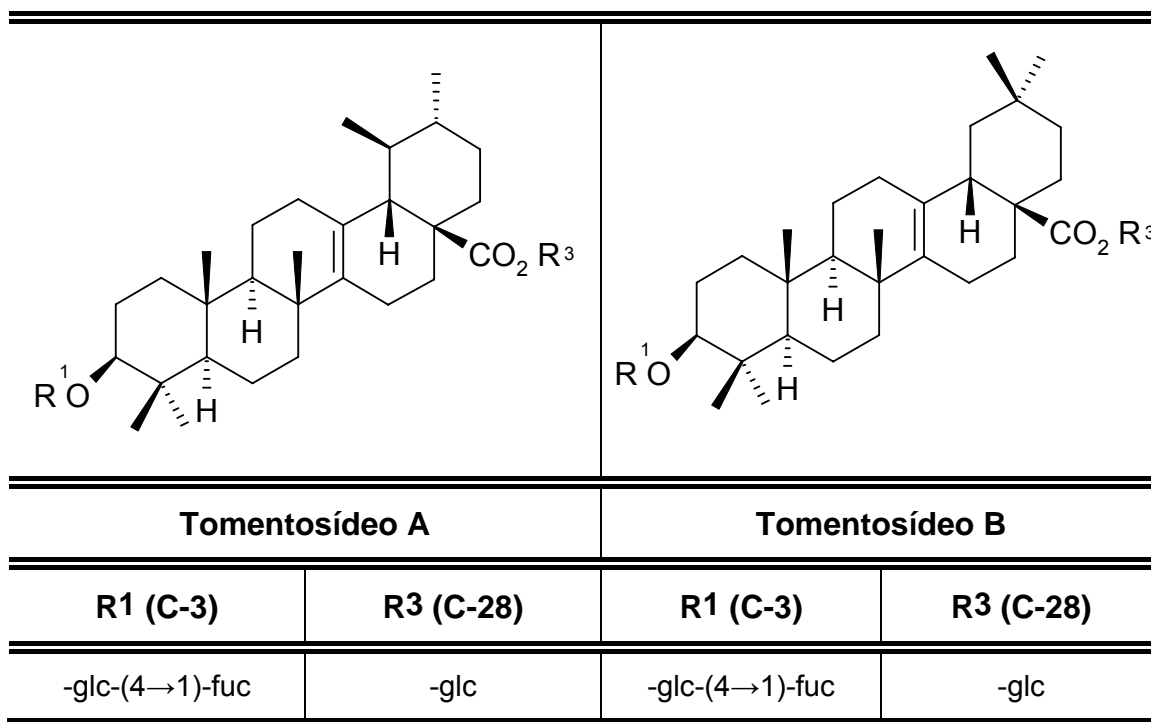


Figura 1d. Glicosídeos do ácido piroquinóvico isolados de *Uncaria tomentosa*.
 glc: β -D-glicopiranosil; fuc: β -D-fucopiranosil (KITAJIMA e col., 2003).

O enriquecimento das concentrações de triterpenos com núcleos oleanólico e ursólico de *U. tomentosa* vem sendo o principal foco de estudos de cultivo com suspensões de células *in-vitro* deste vegetal, permitindo entender à regulação da biossíntese destes compostos (FLORES-SÁNCHEZ e col., 2002; FERIA-ROMERO e col., 2005).

Alcalóides

Segundo a literatura, a classe mais importante de substâncias biologicamente ativas contidas em *U. tomentosa* são os alcalóides. Os primeiros relatos da presença de alcalóides em *U. tomentosa* datam da década de 70, sendo relatada a presença de quantidades significativas dos alcalóides rincofilina e isorrincofilina (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974). Estudos fitoquímicos e analíticos posteriores questionaram esses resultados, gerando indícios de uma representativa variabilidade na composição total de alcalóides (STUPPNER e col., 1992).

Em *U. tomentosa* são encontrados dois grupos de alcalóides, os indólicos (figura 1e) e os oxindólicos (figura 1f).

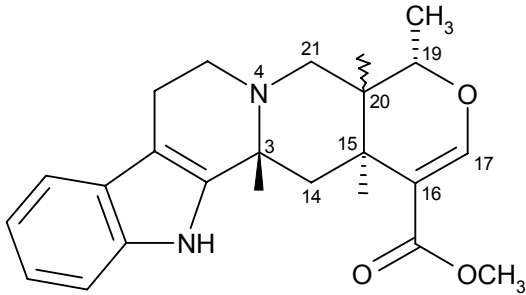
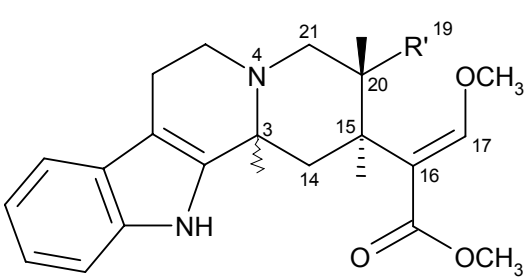
Indólicos Pentacíclicos	Indólicos Tetracíclicos
	
<p>Acuamigina</p> <p>Angustina</p> <p>Angustolina</p> <p>Isoajmalicina</p> <p>Tetraidroalstonina</p>	<p>Corinanteína</p> <p>Diidrocorinateína e seus N-óxidos</p> <p>Hirsuteína</p> <p>Hirsuteína e seus N-óxidos</p>

Figura 1e. Principais classes de alcalóides indólicos isolados de *Uncaria tomentosa* (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974; MONTENEGRO DE MATTA e col., 1976; WAGNER e col., 1985)

Ambos os grupos apresentam subdivisões, sendo que os alcalóides oxindólicos permitem distinguir dois quimiotipos de *U. tomentosa*, indistinguíveis botanicamente, que são representados, majoritariamente, por estruturas tetracíclicas, designadas tipo oxindólico tetracíclico (**TOT**), ou pentacíclicas, do tipo oxindólico pentacíclico (**TOP**) (KEPLINGER e col., 1999).

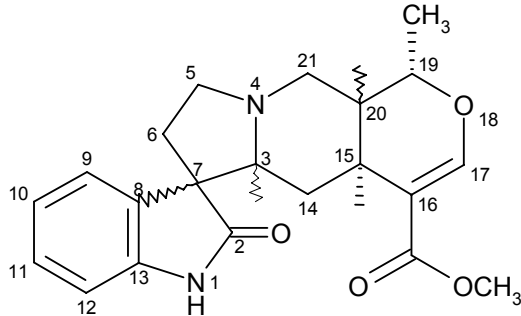
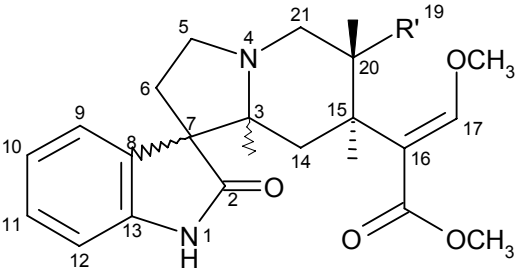
Oxindólicos Pentacíclicos		Oxindólicos Tetracíclicos	
			
Alcalóide	Configuração	Alcalóide	Configuração (R')
Isomitrafilina	3S, 7S, 15S, 19S, 20R	Corinoxeina	3S, 7S, 15S, 20R (vinil)
Isopteropodina (Uncarina E)	3S, 7S, 15S, 19S, 20S	Isocorinoxeina	3S, 7R, 15S, 20R (vinil)
Mitrafilina	3S, 7R, 15S, 19S,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

Figura 1f. Principais classes de alcalóides oxindólicos isolados de *Uncaria tomentosa* (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974; MONTENEGRO DE MATTA *et al.*, 1976; WAGNER *et al.*, 1985)

Segundo STTUPNER e colaboradores (1992), o conteúdo total de alcalóides nos extratos de *U. tomentosa* é significativamente alterado por fatores intrínsecos e ambientais, entre os quais a parte da planta estudada, a sazonalidade da coleta e o local do crescimento da planta, podendo-se encontrar diferenças de até setenta vezes nos exemplares. Os tecidos mais ricos em alcalóides são as cascas, talos e raízes, nos quais o teor médio encontrado oscilou entre 0,5 a 3,0 % no material seco (STTUPNER e col., 1992; LAUS; KEPLINGER, 1994).

Os teores de alcalóides podem igualmente ser utilizados na diferenciação entre *U. tomentosa* e sua principal espécie adulterante, *U. guianensis*. Os alcalóides oxindólicos tetracíclicos predominam em *U. guianensis*, apresentando teores cerca de 10 vezes maiores aos encontrados em *U. tomentosa*, podendo variar de acordo com a parte da planta analisada (LAUS; KEPLINGER, 1994).

Aspectos Etnofarmacológicos e Farmacológicos

São incertos os períodos nos quais macerados e decoctos das cascas e raízes de *U. tomentosa* começaram a ser empregados na medicina indígena Asháninka, na Amazônia Peruana. Nos dias atuais, seu emprego tradicional está baseado no tratamento de distúrbios associados principalmente aos sistemas muscular e digestivo. Especialmente na região norte do Brasil e no Peru, *U. tomentosa* é administrada em casos de úlceras gástricas, dores reumáticas, doenças epidêmicas, como gripes e febre amarela, entre outras (SYRIMIS, 1999).

Quanto aos estudos realizados, no tocante a atividade gástrica, tem-se demonstrado um efeito benéfico do extrato aquoso das cascas contra enteropatias desenvolvidas por antiinflamatórios não-esteróides em concentrações de 5,0 mg/ml. Experimentos *in-vitro* relacionam a ação antiinflamatória à prevenção da ativação do fator transcricional NF-kB, inibindo a expressão dos genes associados ao processo inflamatório, como o fator de necrose tumoral (SANDOVAL-CHACON e col., 1998).

Foi demonstrado um forte efeito inibitório sobre as ciclooxigenases, COX-1 e COX-2 para extratos aquosos e etanólicos de *U. tomentosa*, respectivamente (AGUILAR e col., 2002). A atividade antiinflamatória de *U. tomentosa* foi atribuída à presença de β -sitosterol (SENATORE e col., 1989), derivados do ácido quinóico (AQUINO e col., 1991) e aos alcalóides oxindólicos pentacíclicos, tendo sido sugerido, inclusive, um efeito sinérgico entre grupos químicos.

A investigação com espécies reativas de oxigênio (ERO), envolvidas em diversos processos patológicos, tem demonstrado que extratos e frações de *U. tomentosa* apresentam significativa atividade antioxidante em ensaios *in-vitro*. Sugere-se que o efeito *scavenger* esteja atrelado ao conteúdo de ácidos fenólicos e taninos condensados nos extratos (RIZZI e col., 1993).

Igualmente, foi observada atividade citoprotetora contra o estresse induzido por oxidante contra macrófagos *in-vitro*, com redução da apoptose celular induzida por irradiação UV (SANDOVAL-CHACON e col., 1998; SANDOVAL e col., 2000). Modelos empregando a prevenção na produção de

TBARS foram desenvolvidos complementando o estudo da propriedade biológica proposta (DESMARCHELIER e col., 1997).

Um extrato ácido de *U. tomentosa*, rico em alcalóides, foi administrado por cinco meses em pessoas infectadas pelo vírus HIV, causando um acréscimo representativo nos níveis de linfócitos (KEPLINGER e col., 1999). A atividade imunoestimulante, baseada no estímulo à secreção de citocinas em humanos, pôde ser constatada em macrófagos alveolares de forma dose dependente para extratos em concentrações entre 0,025 a 0,1 mg/ml de alcalóides, com intensa produção das interleucinas 1 e 6 (LEMAIRE e col., 1999).

Diversos estudos da atividade de extratos e frações alcaloídicas sobre células mononucleares periféricas e em fatores de regulação da liberação de linfócitos parecem confirmar o largo emprego de preparados de *Uncaria* como terapia complementar em pacientes com alterações imunológicas graves (WAGNER e col., 1985; WURM e col., 1998; WINKLER e col., 2004).

Um extrato aquoso padronizado de *U. tomentosa* acelerou a recuperação de pacientes com leucopenia, ao aumentar os níveis de linfócitos *in-vivo* (AKESSON e col., 2003), mesmo após a administração de doxorubicina (SHENG e col., 2000). Este mesmo extrato demonstrou inibição *in vitro* e *in vivo* da atividade beta-amilóide, tanto na formação como na deposição de proteínas causadoras de processos neurodegenerativos (SNOW e col., 2003).

O efeito benéfico observado no teste de comprometimento da memória de ratos, induzido pela disfunção no sistema colinérgico no cérebro, foi atribuído aos alcalóides oxindólicos, tanto quando avaliados em termos de teor total como de forma isolada (MOHAMED e col., 2000).

Riva e colaboradores (2001) avaliaram o efeito antiproliferativo de extratos brutos e frações de grupos ativos de *Uncaria tomentosa* contra células cancerosas da linhagem MCF7 de tecidos mamários, demonstrando uma intensa atividade, mormente para o extrato metanólico.

Adicionalmente, verifica-se que os dois quimiotipos (TOT e TOP) apresentam ocasionalmente antagonismo nos efeitos imunológicos, ainda que a extensão desta regulação não esteja totalmente estabelecida (REINHARD, 1999).

GARCIA PRADO e colaboradores (2007) avaliaram o efeito do alcalóide mitrafilina sobre linhagens de células de neuroblastomas SKN-BE (2) e gliomas GAMG, nas concentrações de 10 a 40 μM . Os resultados indicaram significativo efeito antiproliferativo em ambas às linhagens de células, de forma dose-dependente, com valores de IC_{50} de 20 μM e 12 μM para os tratamentos em gliomas GAMG e SKN-BE (2), respectivamente.

Aspectos Analíticos

O relato do perfil dos constituintes químicos presentes em *U. tomentosa* foi realizado concomitantemente aos estudos de isolamento de substâncias, especialmente por CCD (AQUINO e col., 1991). Dados

complementares em relação ao comportamento cromatográfico das substâncias aparecem na literatura posteriormente (van GINKEL, 1996; VALENTE e col., 2006).

O perfil por CCD é relatado apenas para os alcalóides e flavonóides presentes nas cascas de *U. tomentosa* e avaliado comparativamente a *U. guianensis*. A diferença é clara entre as espécies, observando-se acúmulo de alcalóides em *U. tomentosa* e a presença intensa de rutina em *U. guianensis* (van GINKEL, 1996).

O estudo pioneiro na caracterização analítica de metabólitos oriundos de espécies de *Uncaria* foi desenvolvido por Phillipson e Hemingway (1975), que analisaram a composição de alcalóides em 39 amostras, empregando diferentes técnicas, visando ao estabelecimento de uma sistematização química para o Gênero. Este *screening* fitoquímico permitiu a caracterização de substâncias pertencentes a seis grupos de alcalóides.

A partir deste trabalho, vários outros estudos foram desenvolvidos com diferentes abordagens com o intuito pormenorizar os perfis dos compostos que compõem os grupos químicos da espécie *U. tomentosa*. No que tange às técnicas quantitativas, as principais condições cromatográficas relatadas estão sumarizadas na tabela 1b.

A primeira possibilidade satisfatória de visualização dos alcalóides oxindólicos majoritários das cascas e das raízes por CLAE-UV foi relatada por Stuppner e colaboradores (1992). Variáveis como pH da fase móvel e temperatura do forno da coluna foram avaliados, residindo neste último à

principal dificuldade, pois as análises foram realizadas a 15 °C. Entre seis amostras analisadas, pteropodina e isopteropodina foram os principais constituintes (STUPPNER e col., 1992).

Tabela 1b. Condições cromatográficas empregadas na análise de metabólitos secundários presentes em *Uncaria tomentosa*.

Parte vegetal (grupo químico)	Coluna (Temp.)	Fase Móvel	Deteccção	Referência
Raízes (alcalóides oxindólicos)	Lichrospher CH-18 (15 °C)	CH ₃ OH:CH ₃ CN: tampão fosfato pH 6,6 (20:20:60 v/v); gradiente	245 nm	Sttupner e colaboradores (1992)
Cascas de raízes e tronco (alcalóides)	LichroCART RP-18 (12 °C)	CH ₃ CN:éter: tampão fosfato pH 7,7 (34:1:65 v/v); isocrático	254 nm	Laus; Keplinger (1994)
Cascas do tronco (alcalóides)	Luna RP-18 (23 °C)	Tampão fosfato (pH 7,0):CH ₃ CN (65:35 v/v); gradiente	245 nm	Ganzera e colaboradores (2001)
Cascas e folhas (alcalóides e glicosídeos quinóvicos)	Lichrsorb RP-18 e Symmetry RP-18	CH ₃ OH:CH ₃ CN: tampão acetato pH 5,0; gradientes	Espectrom. de massas	Montoro e colaboradores (2004)
Cascas e extrato seco	Lichrospher RP-18 (28 °C)	Tampão fosfato pH 7,0:CH ₃ CN (60:40 v/v); isocrático	245 nm	Griebeler (2006)

Os efeitos sazonalidade e tecido vegetal demonstraram significativa variação sobre o conteúdo de alcalóides em 13 amostras de *U. tomentosa*. Em folhas jovens, uncarina E foi o alcalóide oxindólico predominante, enquanto nos exemplares adultos especiofilina foi o mais abundante. As raízes apresentaram

elevadas concentrações de mitrafilina e nas cascas do tronco a pteropodina foi majoritária (LAUS; KEPLINGER, 1994).

Estudos propuseram métodos aplicados ao aperfeiçoamento da metodologia para totalização da fração alcaloídica por CLAE-UV, além da sua correta identificação e caracterização empregando CLAE associado à espectrometria de massas. Merece destaque nestes estudos a diferença nos teores de alcalóides totais entre amostras, variando de 0,156 a 0,962 % (GANZERA e col., 2001; MONTORO e col., 2004).

Griebeler (2006) desenvolveu e validou técnica analítica por CLAE-UV, em regime isocrático de eluição, aplicada à matéria-prima, produtos intermediários e final obtido de *U. tomentosa*, empregando como substância de referência o alcalóide isomitrafilina. A autora constatou a necessidade de um rígido controle sobre temperatura e pH na avaliação da precisão do método. O teor de alcalóides no extrato seco foi 14,58 mg/g, expresso pelo somatório dos sinais do cromatograma, e o teor de isomitrafilina foi 5,14 mg/g, quando expresso apenas pelo sinal correspondente (GRIEBELER, 2006).

Aspectos Tecnológicos e Registros de Patentes

Analisando os referenciais envolvendo *U. tomentosa* sob a ótica tecnológica é possível constatar uma escassez de estudos no meio científico, estando às transformações da matéria-prima majoritariamente atreladas a processos industriais e registros de patente (tabela 1c). Dessa forma, alguns produtos são empregados e comercializados na forma de extratos líquidos e

secos, os quais se diferenciam principalmente pelos solventes e técnicas de extração utilizados.

Os produtos à base de *U. tomentosa* estão em grande soma presentes no mercado europeu e possuem sua utilização regulamentada pelo FDA nos Estados Unidos como suplemento alimentar.

Tabela 1c. Registros de patentes que contemplam produtos transformados de *Uncaria tomentosa*.

Produto	Fração/ Extrato	Número / ano (ref.)
Imunomax [®]	Extrato total	WO2006024120 / 2006 (TRENTINI; TRENTINI, 2006).
-	Fração polifenólica	WO2003074062 / 2003 (SNOW e col., 2003)
C-Med 100 [®]	Extrato aquoso	US2003017998 / 2002 (PERO, 2002)
C-Med 100 [®]	Extrato aquoso	WO200002571 / 2000

Em detrimento a relevância dos alcalóides na espécie, o extrato de *U. tomentosa* mais empregado atualmente em modelos experimentais farmacológicos *in-vitro* (SHENG e col., 1998) e *in-vivo* (SHENG e col., 2000) é comercializado sob o registro C-MED 100[®] (CampaMed Inc.; New York, USA). Esse produto é obtido em meio aquoso a quente, seguido de posterior eliminação mediante ultra-filtração de substâncias com massa molecular acima de 10 kDa, originando um produto com baixos teores de alcalóides, taninos e

flavonóides, padronizado em 8% de ésteres alqui-carboxílicos (AKESSON e col., 2005).

Em outros produtos comerciais não se verifica o emprego de técnicas de enriquecimento dos extratos subseqüentes ao processo de extração, o qual é crítico na padronização dos derivados obtidos (REINHARD, 1999). Verifica-se que produtos contendo extratos não-aquosos de cascas de *U. tomentosa* são padronizados pelos teores de alcalóides, por exemplo, Krallendorn[®] e Saventano[®] (Immodal Pharmaka; Volders, Austria).

No Brasil, o Laboratório Herbarium registrou junto a ANVISA medicamento fitoterápico à base de *U. tomentosa*, sob o nome comercial Imunomax[®], indicado no tratamento do *herpes simplex*. Este fitoterápico apresenta-se na forma semi-sólida, com incorporação direta do extrato total. Como marcador é empregado o teor total de alcalóides, calculado como mitrafilina. Segundo os inventores, o produto exerce ações imunomodulatória e antiinflamatória pelo aumento da resistência orgânica, sem interferência na replicação viral (TRENTINI; TRENTINI, 2006).

É relatada a ação sobre o sistema nervoso central de substâncias obtidas de *U. tomentosa*, sendo encontrada uma patente que descreve a inibição da formação de fibrilas beta-amilóides mediante utilização de derivados da espécie. Cabe salientar, contudo, que essa patente tem como aspecto inventivo o grupo de derivados fenólicos, altamente solúveis em água, fracionados em cromatografia líquida preparativa, sobretudo, procianidinas (SNOW e col., 2003).

O produto C-Med 100[®] e a fração deste, rica em ácido quínico, possuem solicitação de patente vinculada à promoção da atividade do sistema imune e reparação da estrutura do DNA. A fração é obtida por ultrafiltração e imediatamente submetida à secagem por aspersão, usando maltodextrina como adjuvante de secagem. O ácido quínico é utilizado industrialmente como adstringente, podendo ser obtido de cascas de quina ou pela hidrólise do ácido clorogênico. Afora isso, devido ao seu centro quiral, integra a rota de síntese de medicamentos antivirais (PERO, 2002; SHENG e col., 2005).

Num outro plano, incipientes estudos indicam diferenças entre os produtos tecnologicamente obtidos, sobretudo no tocante às variações nos teores do alcalóide mitrafilina. Segundo Lahoud e colaboradores (2000), quando comparados os processos de secagem por liofilização e nebulização, neste último o teor de alcalóides é aproximadamente 10 vezes menor, oscilando entre 0,3 e 0,5 %, enquanto no processo por liofilização os percentuais encontrados situam-se entre 4 a 6% (LAHOUD e col., 2000).

Capítulo 1. Obtenção de Soluções Extrativas e Extratos Secos de
Uncaria tomentosa

INTRODUÇÃO

Segundo a medicina tradicional peruana, o método usual de extração de preparados de *Uncaria tomentosa* é a decocção, utilizando-se proporções variáveis de planta e água, mas mantendo-se o aquecimento por um período entre 45 a 60 minutos (REINHARD, 1999). O estudo científico de variáveis de processo sobre o rendimento na extração de alcalóides a partir de cascas de *U. tomentosa* é, contudo, bastante incipiente. Além disso, diversos estudos demonstraram que os alcalóides pentacíclicos, compostos químicos marcadores da espécie, sofrem intensa isomerização em meio aquoso, catalisada pela temperatura (LAUS, 1998).

Face ao exposto, após a caracterização da matéria-prima vegetal, foi realizado estudo comparativo de processos extrativos, assim como, após seleção deste, foi efetuada a secagem da solução extrativa visando à obtenção de extrato seco a ser utilizado nos experimentos subseqüentes de purificação.

Este capítulo apresenta-se na forma de artigo submetido para publicação no periódico Drug Development and Industrial Pharmacy.

Artigo 1.

Submetido ao Periódico Drug Development and Industrial Pharmacy

**Alkaloid isomerization induced by spray drying of *Uncaria tomentosa* bark
extracts**

Cabral Pavei,¹ Gustavo Luis Borre,¹ Samuel Kaiser,¹ George Gonzalez-Ortega^{1,2}

ABSTRACT

Cat's claw is an alkaloid rich-liana from the Peruvian Amazonian rainforest. Regarding several oxindole alkaloids from cat's claw bark, the isomerization induced by pH, temperature and solvent polarity is reported in the literature. Some industrial drying processes, as spray drying, can afforded therefore favorable conditions of heating and moisture for isomerization, and it is to expect effects on the alkaloid composition during technological processing. In this work we focused the effect of spray drying on the alkaloids isomerization of three dried extracts obtained from *Uncaria tomentosa* bark. All dried extracts were characterized technologically considering moisture content, particle size distribution and scanning electron microscopy features. The concentration of the main alkaloids was assayed by a validated reverse phase LC method. High isomerization levels were observed in all dried extracts. A loss in mitraphylline (15%) and pteropodine (12%) content is related to an equivalent content increasing of isomitraphylline and isopteropodine, respectively. Since different biological and pharmacological activities had been ascribed to these alkaloids,

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² To whom correspondence should be addressed. (e-mail: ortega@farmacia.ufrgs.br)

the influence of the thermal effect inherent to the spray drying technique and excipient type should be worth of special attention.

KEY WORDS: *Uncaria tomentosa*, alkaloids, isomerization, spray dried extracts, column liquid chromatography

INTRODUCTION

Uncaria tomentosa (Willd) DC. is a native liana of the Peruvian Amazonian rainforest, commonly known as “uña-de-gato” or “cat’s claw”. Its phytochemical composition is given mainly by antocians, quinovic acid derivatives triterpenes, and indolics and oxindolics alkaloids. Several relevant biological activities recognized to this species, including anti-inflammatory, immune stimulating and anti-tumoral, were formerly ascribed to the pentacyclic oxindole alkaloids (1,2). Despite several oxindole alkaloids related for *U. tomentosa* undergo isomerization by effect of heat, pH and/or solvent polarity (3-5), the probable effect of spray drying on them remain still unclear.

Spray-drying processing is probably the most widely technique applied for the development of powdered products (6), and many spray dried derivates from *U. tomentosa* bark are commercially available around the world. The water removing takes place indeed very quickly in this process, however the thermal effect due to the dwelling time of the dry powder into the drying chamber and conducting pipeline should not be overlooked. Moreover, spray drying excipients are usually added to guarantee higher process outcome and better technological characteristics. Among these stand out colloidal silicon dioxide

and maltodextrins, two excipients widely used in the pharmaceutical and food industry, alone or mixed (7).

Therefore, this work aims to evaluate three dried extracts of *U. tomentosa* from a technological and chemical point of view, using different ratios of colloidal silicon dioxide and maltodextrin as drying excipients. Comparisons with lyophilized extracts and two commercial *U. tomentosa* dried extracts were also done. A monitoring of oxindole alkaloids as chemical markers was proceeded by LC, in order to assure the feasibility of this drying process as well as the quality of commercial products.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Acetonitrile HPLC grade (Merck/Germany), potassium phosphate monobasic (Nuclear/Brazil) and ultra-pure water obtained from a Milli-Q® system (Millipore/USA) were used for the HPLC analysis. Mitraphylline (batch 2946) was purchase by Phytolab GmbH (Germany). Colloidal silicon dioxide (Aerosil 200®, Degussa/Germany) and maltodextrin (Glucidex® 12 D, Roquette/France) were used as drying excipients. An authentic sample of *Uncaria tomentosa* bark (batch 0107/06) was kindly provided by Laboratorios Induquímica S.A., Lima, Peru. For comparison purposes, two manufactured spray dried extracts were purchase from the Brazilian market, used as received and coded as UTCa and UCTb.

Extraction procedure

A comparative study was used to evaluate the effects of the extraction parameters on solids and alkaloids contents. The parameters studied were extraction solvent (water or hydroethanolic solution 40%; v/v); drug:solvent ratio (0.5:10 or 1.0:10; w/w) and extraction process (turbo extraction or maceration). All extracts were pressed, filtered and concentrated under vacuum to half of their original weight.

Preparation of the spray dried extracts

For the spray dried extracts (UTS), the excipients were dispersed at room temperature according to the excipient:dry residue of extractive solution mixture ratios (Table I). Spray drying experiments were performed in a spray dryer – Production Minor NIRO/GEA (Soeborg, Denmark), with co-current flow, fitted with a rotatory disk atomizer at 11000 rpm. The feed flow rate was controlled automatically to keep inlet and outlet temperatures at 177 and 99 °C, respectively.

Here Table I

A lyophilized extract (UTL) was prepared separately from the extractive solution as a control of the thermal impact on the chemical profile after spray drying processing. For all dried process the yield was calculated as the relation between total solids content in final spray dried product and total solids content in feed material, considering the moisture content in each case.

Characterization of the spray dried extracts

Loss on drying

The moisture content of each dried powder was gravimetrically determined by the loss on drying assay, using 1.0 g-samples. The results express the mean value of three determinations each.

Particle shape and surface features

The photomicrographs were taken with a scanning electron microscope Jeol (mod. JSM 5800), 10 kW radiation intensity, at magnifications of 3.500 times.

Particle size determinations

The particle size analysis was determined using a laser diffractometer CILAS 1180 (Madison, USA). Samples weighting 200 mg were dispersed in silicon oil prior to analysis

LC method validation

The reversed-phase gradient method was performed employing a Shimadzu LC 10 Class (Tokyo/Japan) provided with a column Gemini RP-18 250 x 3.9 mm i.d., 5 μ m (Phenomenex, USA). The mobile phase consisted of phosphate buffer 0,01M pH 7.0 (solvent A) and acetonitrile:phosphate buffer 0.01M pH 7.0 (95:5; v/v) (solvent B) in a linear gradient elution program: 0–1 min 41.0% B; 1–12 min 55.0% B; 12–16 min 55.0% B and 16-20 min 41.0% B. The flow rate was kept constant at 1.1 mL/min and the analyses were performed at $35 \pm 1^\circ\text{C}$. The detection was at 245 nm and the major alkaloids were monitored with a Shimadzu Prominence SPD-M20A (Tokyo/Japan), which detection at 190-800 nm, controlled by LC-Solution Multi-PDA software.

The alkaloid content was expressed as milligram of mitraphylline in 1.0 g of dry sample.

The validation comprised tests of specificity, linearity, accuracy, intermediate precision (IP), repeatability (RE), and limits of detection (LOD) and of quantification (LOQ).

Specificity: The specificity was evaluated by comparing the spectra obtained from the peak of mitraphylline standard and the peak of interest in the dried extracts with a photodiode array detector. Blank sample with the same excipients in their respective concentration were prepared to determine the absence of interfering peaks in the retention time of the mitraphylline.

Linearity: Appropriate dilutions of mitraphylline stock solution were prepared to yield concentrations of 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 and 1.0 µg/mL. The samples were filtered through 0.45 µm membrane (Millipore/USA) prior to injection. Each analysis was repeated three times, over a 3 days period.

Accuracy: The accuracy was evaluated through recovery studies by adding known amounts of the mitraphylline solution to the dried extracts with a concentration of 400 µg/mL. Controls from all samples were prepared and analyzed. The recovery experiment was performed at three concentration levels (80, 100, and 120%).

Intermediate precision and repeatability: For evaluation of the repeatability, the R.S.D. of nine injections of the mitraphylline and the dried extracts was considered. The intermediate precision was evaluated in triplicate for 3 days period.

Limits of detection and of quantification: The detection limit (DL) and quantitation limit (QL) were calculated based on the regression S.D. and the slope (S) of mitraphylline calibration curves.

Dried extracts: The three manufactured dried extracts, the two commercial powders and the lyophilized extracts were prepared at 2.0 mg/mL final concentration using acetonitrile:water (50:50 v/v) taking account the amount of adjuvant in each case. The solutions were filtered and aliquots of 5.0 mL were diluted up to a 20.0 mL final volume with acetonitrile:phosphate buffer (50:50; v:v).

RESULTS AND DISCUSSION

The extraction conditions were chosen keeping in mind efficiency and stability of the alkaloids. The better performance for alkaloid extraction was observed when maceration rather than turbo extraction at room temperature was applied (Table II). The advantage of a mild extraction procedure avoiding heat was earlier recognized as important to retain the alkaloids pattern of cat's claw extracts. Furthermore, degradation and/or isomerization of *Uncaria* alkaloids by heating, pH and solvent polarity was also related (8). Thus, it seems feasible such difference was due to the heat evolved during turbo-extraction owing the laminar and remarkably fibrous characteristics of cat's claw bark (9). By that reason maceration was selected, as extraction procedure in the present work. The polarity of the solvent played a remarkable role on the extraction effectiveness. The worse alkaloids yield was observed when water was employed alone instead of the hydroethanolic solution.

Here Table II

Conversely, the drug:solvent ratio did not exert any significant effect on the solids content ($P < 0.05$), but a drug:solvent ratio high level (1,0:10; w/w) enhanced mitraphylline extraction significantly. Therefore, the selected extraction conditions were: a 4 days-maceration, hydroethanolic solution (40%; v/v) and a drug:solvent ratio of 1.0:10 (w/w).

The spray drying could be straightforward performed and the yield process was above 75% for all extractive solutions. Nonetheless, better results were achieved with colloidal silicon dioxide (UTS1 = 80.7%; UTS2 = 78.3%) when compared to those preparations without it (UTS3 = 75.4%). The residual moisture presented by all spray dried extracts ranged from 5 to 7% and consequently it fulfills the recommended limits.

The linearity was tested from 0.1 to 1.0 $\mu\text{g/mL}$ of mitraphylline, corresponding to 20 - 200% of its nominal content in commercial dried extracts. The experimental data could be fitted satisfactorily by the method of the linear least square ($R^2 = 0.9997$). The slope and the intercept were 267.11 and 59070.44, respectively, and no evidence of auto-correlation after the Durbin-Watson test could be evidenced. The limit of detection (LOD) and the limit of quantification (LOQ) for mitraphylline calibration curve were, respectively, 0.021 $\mu\text{g/mL}$ and 0.065 $\mu\text{g/mL}$. The R.S.D. values for the intra-day (repeatability) and inter-day (intermediary precision) tests were, respectively 1.13% and 1.82%. The method accuracy evaluated by spiking of mitraphylline to the dried extracts indicates a recovery range from 103.3 to 105.2%. The results obtained for three concentration levels analyzed with R.S.D. lower than 0.72% in all cases in the

recovery test. No evidence of interfering due to excipients could be observed after LC comparison of mitraphylline alone and its mixture with the spray drying excipients (Fig. 1).

Here Fig 1.

In summary, the analytical method fulfill all the current ICH guideline requirements (10) and can be regarded therefore as validated.

The presence of mitraphylline in the dried extracts could be assessed straightforward after comparing to the respective mitraphylline standard UV-spectrum and retention time (9.6 min). PDA analysis revealed that the mitraphylline peak purity was 99.83%. Furthermore, the identity of three additional peaks occurring at 8.3, 12.1 and 15.3 min. could be ascertain as isomitraphylline (IM), pteropodine (PT) and isopteropodine (IP), respectively.

However, the alkaloid fingerprints and total alkaloid content of spray dried extracts UTS1, UTS2, and UTS3 were clearly dissimilar to those determined for the control freeze dried extract (t test; $P < 0.05$). Even though the four main alkaloids mentioned above are unmistakable present in all extracts, including the later one (Table III), changes concerning mitraphylline, pteropodine and their respective isomers isomitraphylline and isopteropodine contents became evident. There are indeed an inverse relationship between mitraphylline/isomitraphylline and pteropodine/isopteropodine contents decreasing and a significant increasing of 14.9% and 12.2% for isomitraphylline and isopteropodine, respectively. The heat-induced isomerization was related

earlier for the mitraphylline and isomitraphylline, and the sensibility of both alkaloids toward unfavorable thermal conditions in aqueous media (8).

Here Table III

It can also appraised a strong correlation ($r = 0,996$) between mitraphylline and total alkaloid contents decrease. The morphologic features of silicon dioxide-containing particles and that without it can better appraise in Fig. 2. Additionally, the particle size analysis by laser diffraction revealed mean diameter greater for UTS1 (30 μm), UTS2 (19 μm) than UTS3 (8 μm), as expected for spray dried powder formulated with colloidal silicon dioxide and maltodextrin (11).

Here Fig. 2

Different to the spray dried powders formulated with colloidal silicon dioxide, UTS1 and UTS2, UTS3 particles showed higher agglomeration tendency and a more rugged surface, which implies higher specific surface area.

With regard to the alkaloids LC-profile of the commercial dried extracts, no additional peaks were detected, but the mitraphylline and isomitraphylline contents were quite different. Whereas the content ratio of these alkaloids was about 0.65 in dried extracts UTS1, UTS2 and UTS3, it was near to 4.4 in the commercial products. Actually, a variation in the alkaloids composition of cat's claw raw material was previously described (12,13). However, the alkaloids content in the commercial extracts were substantially lower than the UTS1, UTS2 and UTS3 dried extracts manufactured ($P < 0.05$), despite all they were prepared by a similar same drying technique. It seems possible therefore that the thermal influence, as well as excipient type and weight proportion of them in

commercial dried extracts could exert a deleterious effect on the mitraphylline content.

CONCLUSION

The high performance of the spray drying could be assessed for the preparation of *Uncaria tomentosa* dried powders in pilot scale. Despite of a process yield around 75-81% and a very transient thermal effect during process, cat's claw alkaloids underwent substantial isomerization. Since several biological and pharmacological activities were ascribed to these isomerized alkaloids, further studies for improving stability against moisture and the thermal influence are still required.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF/UFRGS) for the financial and technical support, Laboratório Induquímica for cat's claw bark donation and Dr. José Ricardo de la Cruz for identification of plant material. G.L.B and S.K. received CNPq grant.

REFERENCE

1. Lemaire I, Assinewe V, Cano P, Awang DV, Arnason JT. Stimulation of interleukin-1 and-6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *J. Ethnopharmacol.* 1999;64:109-115.

2. Sandoval M, Charbonnet RM, Okuhama NN, Roberts J, Krenova Z, Trentacosti M, Miller MJ. Cat's Claw (unha de gato) inhibits TNF alpha production in scavenges free radicals: role cytoprotection. *Free Radical Bio. Med.* 2000;29:71-8.
3. Aimi N, Yamanaka E, Endo J, Sakai S, Haginiwa J. Conversion of oxindole alkaloids into indole alkaloids. *Tetrahedron Lett.* 1972;13:1081-84.
4. Laus G, Keplinger D. Separation of stereoisomer oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr.* 1994;662:243-49.
5. Paradowska K, Wolniak M, Pisklak M, Glinski JA, Davey MH, Wawer I. ¹³C, ¹⁵N CPMAS NMR and GIAO DFT calculations of stereoisomeric oxindole alkaloids from Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*). *Solid State Nucl. Magn. Reson.* 2008;34:202-09.
6. Hlinak AJ, Clark BA. Drying and Dryers. In: Swarbrick J, editors. *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*. New York: Informa Helthcare; 2006. P.1435-49.
7. Gonnissen Y, Gonçalves SIV, De Geestb BG, Remona JP, Vervaet C. Process design applied to optimise a directly compressible powder produced via a continuous manufacturing process. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2008;68:760-70.
8. Laus G. Kinetics of isomerization of tetracyclic spiro oxindole alkaloids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* 1998;2:315-17.

9. Gattuso M, Di Sapio O, Gattuso S, LI Pereyra E. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. *Phytomedicine* 2004;11:213-23.
10. International Conference on Harmonization (ICH) 2005. Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva.
11. Cai YZ, Corke H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus* betacyanin pigments. *J. Food Sci.* 2000;65:1248-52.
12. Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. HPLC analysis of main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Chromatographia* 1992;34:597-600.
13. Reinhard KH. *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC-Cat's Claw, Uña de gato oder Katzenkralle. *Zeitschrift für Phytotherapie* 1997;18:112-21.

Figure captions

Fig. 1. LC-chromatograms: (a) *U. tomentosa* extract obtained according selected process conditions, (b) mitraphylline reference standard, and (c) physical mixture of spray drying excipients. *Top*: Corresponding UV spectrum (IM: isomitraphylline; MT: mitraphylline; PT: pteropodine; IP: isopteropodine).

Fig. 2. Scanning electron photomicrographs of UTS1 (with colloidal silicon dioxide), UTS2 (colloidal silicon dioxide and maltodextrin; 1:1), and UTS3: (maltodextrin)

List of Tables

Table I. Percent composition of the *Uncaria tomentosa* spray-dried extracts

Product	Drying excipients (w/w; %)		Solid content (%)
	Colloidal silicon dioxide	Maltodextrin	
UTS1	30	0	70
UTS2	15	15	70
UTS3	0	30	70

Table II. Results of hydroethanolic solutions of *Uncaria tomentosa*

Extractive process	Solid content; % (R.S.D)	Mitraphylline content; $\mu\text{g/mL}$ (R.S.D)
Maceration	0.89 (0.84)	3.41 (1.38)
Turbo extraction	0.51 (2.28)	1.62 (0.96)

Table III. Alkaloid content in dried extracts from *Uncaria tomentosa*

Dried Extract	Concentration; mg/g (R.S.D)					
	mitraphylline (MT)	isomitraphylline (IM)	pteropodine (PT)	isopteropodine (IP)	MT/IM ratio	PT/IP ratio
UTL*	0.81 (0.61)	0.91 (1.28)	1.36 (0.46)	0.55 (1.45)	0.890	2.473
UTS1	0.62 (0.81)	0.84 (1.02)	1.27 (0.80)	0.47 (2.04)	0.738	2.702
UTS2	0.59 (2.56)	0.81 (0.71)	1.25 (0.62)	0.46 (1.74)	0.728	2.717
UTS3	0.62 (1.02)	0.85 (0.14)	1.28 (0.81)	0.47 (1.55)	0.729	2.723
UTCa	0.07 (1.95)	0.40 (0.31)	0.25 (0.66)	0.12 (1.43)	0.175	2.083
UTCb	0.03 (0.84)	0.09 (1.08)	0.15 (0.92)	0.07 (2.05)	0.333	2.143

Note: *lyophilized extract; UTS1: spray dried extract with colloidal silicon dioxide; UTS2: spray dried extract with colloidal silicon dioxide:maltodextrin (1:1); UTS3: spray dried extract with maltodextrin; UTCa and UTCb: manufactured spray dried extracts.

Fig. 1

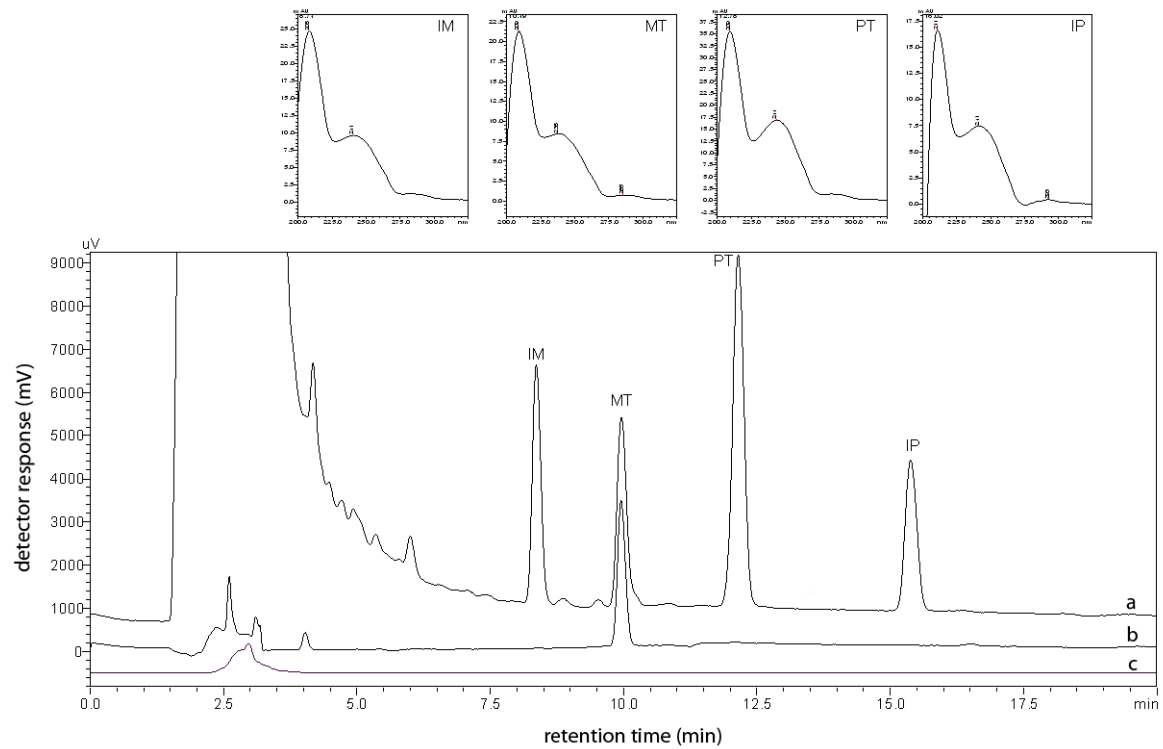
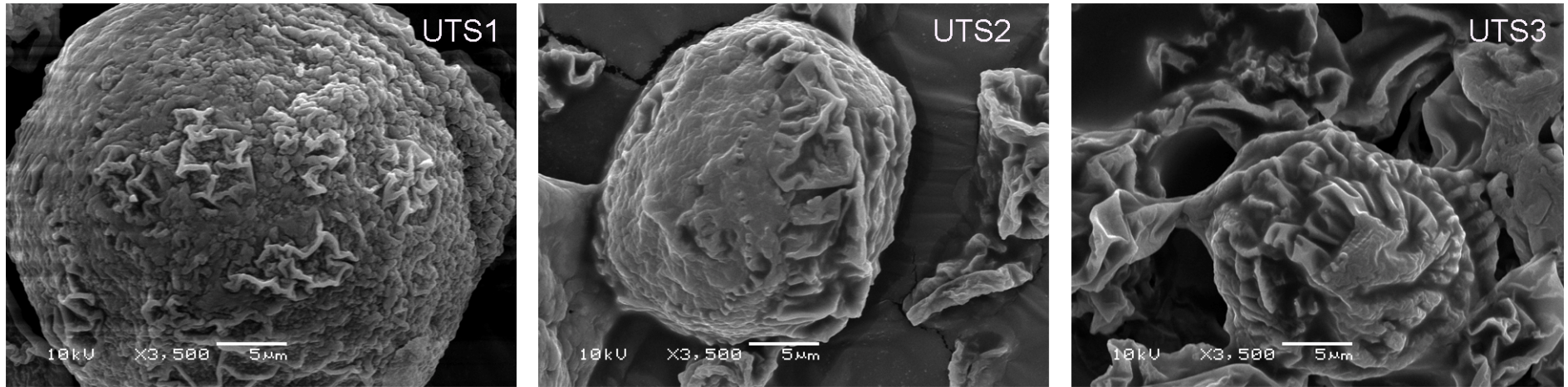


Fig.2



Capítulo 2. Desenvolvimento de método analítico aplicado aos derivados quinóvicos de *Uncaria tomentosa*

INTRODUÇÃO

Diversos relatos científicos e etnofarmacológicos sobre *Uncaria tomentosa* assinalam atividades biológicas e efeitos farmacológicos. Em virtude de sua relevância documental, aos alcalóides oxindólicos é atribuída grande parte das atividades relatadas, embora, muitas destas ainda permaneçam pouco esclarecidas, fruto em parte da falta de uma relação com os outros grupos químicos presentes na espécie.

Objetivando ampliar o escopo analítico destinado à espécie, possibilitando um estreitamento entre o grupo químico responsável pelos efeitos farmacológicos já relatados e outros potenciais, esta etapa do trabalho destina-se ao desenvolvimento e validação de um método analítico por CLAE aplicado à quantificação dos derivados quinóvicos presentes em *Uncaria tomentosa*. O capítulo apresenta-se na forma de artigo, submetido para publicação no periódico *Phytochemical Analysis*.

Artigo 2.

Submetido ao Periódico Phytochemical Analysis

LC method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*)

Cabral Pavei; Samuel Kaiser; Gustavo Luis Borre; George Gonzalez-Ortega*

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil

*Corresponding author

e-mail adress: ortega@farmacia.ufrgs.br

Phone: (55) 51- 3308-5278

Fax: (55) 51- 3308-5347

ABSTRACT:

Introduction: *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Rubiaceae), commonly know as Cat's Claw or "Uña de Gato" is a medicinal plant widely spread in the rain forest of South America and the main bioactive compounds related for this species include quinovic acid derivates.

Objective: Developed and validated a reliable reversed phase LC method was for assay of quinovic acid glycosides in crude and dried extracts of *Uncaria tomentosa* bark.

Methodology: The LC method consist of a RP-18 column in gradient mode (Formic Acid-Acetonitrile) using Alpha-hederin was used as standard and UV-detection at 205 nm.

Results: High coefficient of determination with lower R.S.D was achieved for the standard analysis, with linearity in the range 2.0 –10.0 µg/mL and recovery

in ranged from 98.0 to 102.6 %, and was applied successfully to a crude extract and two intermediate derivates produced by spray and freeze drying process.

Conclusion: The method was able to determine accurately and specifically quinovic derivatives using a simple method and therefore can be used as a valid method being also applicable to routine analysis of *Uncaria tomentosa*.

Keywords: Column liquid chromatography; *Uncaria tomentosa*; quinovic derivatives assay; intermediate products.

INTRODUCTION

Uncaria tomentosa (Willd) DC. is a climbing tree native from Central and South America, where is commonly known as “uña-de-gato” or “cat’s claw”. Its bark is widely used in traditional medicine for the treatment of gastritis, asthma and arthritis (Heitzman *et al.*, 2005). Phytopharmaceuticals derived from its steam bark are currently marketed in more than 30 countries as tea, capsules and tablets (Gattuso *et al.*, 2004).

Concerning its chemical composition is worth mentioning the presence of indole and oxindole alkaloids (Hemingway; Phillipson, 1974; Wagner *et al.*, 1985; Laus *et al.*, 1997) along with antocians (Montenegro de Matta *et al.*, 1976) and acid triterpenes, specifically, quinovic acid derivatives (Cerri *et al.*, 1988; Aquino *et al.*, 1997). Certainly the alkaloids fraction had been the main focus of the principal analytical efforts (Stuppner *et al.*, 1992; Laus; Keplinger, 1994; Ganzera *et al.*, 2001). However, several relevant therapeutic activities including

anti-inflammatory and antiviral properties were been also ascribed to the late substances group (Aquino *et al.*, 1989; Aquino *et al.*, 1991). From an analytical point of view there are very few studies regarding the characterization and content assay of triterpenes in that specie. Montoro *et al.* (2004) have previously described a LC/MS method to characterize the quinovic compounds in crude extract. As far as we know, no validated assay method for quinovic derivatives in extracts from *U. tomentosa* is available up today. In that context, the present work aims the development and validation of an easy LC-method designed to the quality control of *U. tomentosa* raw material. Its applying is also exemplified with two technological intermediate products obtained by two different drying processes.

EXPERIMENTAL

Chemical and Solvents. Stem barks of *Uncaria tomentosa*, dried and ground, were kindly donated by Laboratorios Induquímica S.A., Lima, Peru. The mobile phase was prepared with acetonitrile and formic acid had HPLC grade (Merck, Darmstadt, Germany) and ultrapure water (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA). Colloidal silicon dioxide (Aerosil® 200) proceeded from Degussa (Germany). Alpha-hederin (Extrasynthese, France) was employed as external standard.

HPLC Analysis. The reversed-phase gradient method was performed employing a Shimadzu LC 10 Class (Tokyo/Japan) provided with a FCV-10 AL system controller, a LC-10 AD pump system, a SIL-10 A automatic injector (20 µL-loop) and a SPD-M20A (Tokyo, Japan). The data were processed by LC-Solution Multi-PDA software. A column Sinergy Fusion RP-18 150 x 3.9 mm

i.d., 5 μm (Phenomenex, Torrance, CA, USA) protected by a RP-18 guard column (4.0 x 3.0 mm i.d.) (Phenomenex, USA) was used. The detection was at 205 nm. The mobile phase consisted of formic acid 0.01 % (solvent A) and acetonitrile:formic acid 0.01% (90:10; v/v) (solvent B). A gradient elution program was developed: 0–3 min 29.0% B; 3–14 min 38.0% B; 14–15 min 38.0 % B; 15-30 min 57.0% B and 30-37 min 57.0% B. The flow rate was kept constant at 1.0 mL/min and the analyses were conducted at $35 \pm 1^\circ\text{C}$.

Alpha-hederin standard solutions. Stock solutions of alpha-hederin were prepared dissolving an accurately weighted 20.0 mg-sample in 100,0 mL of acetonitrile:water (50:50; v:v). Appropriate dilutions were prepared to yield concentrations of 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The samples were filtered through a 0.45 μm membrane (Millipore, Bedford, USA) prior to injection. Each analysis was repeated three times, over a 3-days period. The slope and other statistical parameters of the calibration curves were calculated by linear regression (Minitab 14[®], USA).

Samples preparation and calibration curve. The extractive solution was prepared by a 4-days maceration, using an hydroethanolic solution (40%; v/v) and a drug:solvent ratio of 1.0:10 (w/w). The mixture was pressed, filtered and concentrated under vacuum to half of their original weight. An aliquot of concentrated extract was submitted to a preliminary cleanup by solid phase extraction on polystyrene macroporous resin (Diaion HP-20, Supelco, USA) and eluted afterwards with a mixture methanol:water (v/v) applying a decreasing polarity gradient. The fraction containing quinovic derivatives (90% MeOH

fraction) was used throughout this work to assess unexpected modifications in the LC-profile due to triterpene instability.

For the calibration curve, stock solutions of the concentrated extract were prepared using acetonitrile:water (25:75; v/v) as a solvent. Appropriate aliquots were diluted to 50.0 mL with acetonitrile:formic acid 0.01 % (30:70; v:v) to produce concentrations of 0.1; 0.2; 0.3; 0.4 e 0.5 mg/mL, expressed by dry residue.

Validation parameters. The linearity tests comprised regression analysis, ANOVA test, Durbin-Watson test for residues and the analysis of the confidence intervals for the linear coefficient (constant systematic error). Precision was evaluated by the determination of repeatability and intermediary precision for both standard and sample solution. The repeatability was evaluated by analysis of nine samples evaluated at a same day and expressed by the relative standard deviation (R.S.D). The intermediate precision was assessed by analysis in triplicate of the extractive solution, in three different days. The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation (S.D) and the slope (S) of the calibration curves, according to the ICH (2005). Accuracy was determined by recovery, adding three (4.0, 6.0 and 8.0 µg/mL) measured amounts of alpha-hederin to sample solution.

The method validation was conducted considering the purity index of UV spectra recorded by a PDA detector (Shimadzu, Tokyo, Japan). For quantitative determination, peaks areas in the sample chromatograms were calculated using the regression equation from the alpha-hederin calibration curve. The major constituent (coded as Peak 1) was assayed separately and its concentration

expressed in alpha-hederin. The sum of the peaks coded as 1 to 7 areas (SPA) expresses the total quinovic content.

Analysis of freeze-dried and spray-dried extracts of *Uncaria tomentosa*.

The spray-dried extract was prepared by addition of colloidal silicon dioxide (30 % w/w) to the concentrated extract. The suspension was dried at once in a Production Minor NIRO spray drier (GEA, Soeborg, Denmark) under continuous mechanical stirring. For monitoring purpose, an aliquot of concentrated extract was immediately freeze-dried in parallel, without further addition of process excipients (Modulyo 4L, Edwards, USA). Samples of both dried extracts were diluted in acetonitrile:water (50:50 v/v) to 50.0 mL, yielding concentrations of 0.3 mg/mL. The samples were filtered through a 0.45 mm membrane filter (Millipore, HVHP) prior to injection. Evaluation of each point was repeated three times.

RESULTS AND DISCUSSION

The potential anti-inflammatory and antiviral activities of quinovic acid and related compounds derived from *Uncaria tomentosa* was earlier related. This found and the lack of published analytical methods concerning the assay of that fraction reinforce the aim of the present work. Regarding the LC analysis of triterpenes by UV detection specifically, it is critical due to the absence of practical absorption above 220 nm. For reason of that the previous method reported by Montoro et al. (2004) involves LC-MS detection, but it remained restricted to the characterization of the main *U. tomentosa* quinovic acid derivatives. However, with the rigid control in the variation of the chromatographic baseline a wider range of polarity of triterpenes can be

assayed by UV-detection. Despite some limitations UV-detection continues to be considered the more practical technique in the analytical routine.

Method validation

For quantification analysis alpha-hederin was selected as reference substance because quinovic standards are not available on the market. Moreover, alpha-hederin and quinovic derivatives possess aglycones with similar structure patterns (figure 1) and polarity, once the number of methyl groups presents in the aglycone is equivalent. The increased of polarity owing the presence of a carboxyl group in the C-14 position of quinovics is partially counterbalanced by the hydroxymethyl group attached at C-4 of alpha-hederin. It explains because the quinovic derivatives from *U. tomentosa* behave more polar than alpha-hederin.

Here figure 1

Selectivity and specificity

The chromatogram of alpha-hederin and the absorbance exhibited at the range of 200-205 nm is presented on figure 2.

Here figure 2

The peaks 1 to 7 showed identical spectral behavior in PDA as alpha-hederin and a satisfactory chromatographic separation (figure 3). The need of cleanup step prior to analysis arose after previously established tests (omitted in this paper). Its application on the present LC method allowed a better baseline because the elimination of the major phenolic compounds and other interfering substances which also absorb above 220 nm. Chromatographic parameters for the alpha-hederin and the more conspicuous peak (coded as Peak 1) are shown in table 1.

Here figure 3

Here table 1

Linearity of calibration

The linearity of the method was assessed through the calibration curves of alpha-hederin and also that of Peak 1 embracing a three days-test. The regression analysis for alpha-hederin standard demonstrated significant linear regression for the concentration range of 2.0 to 10.0 µg/mL. The fitted regression equation was $y = 7227.59x - 758.68$ ($r^2 = 0.9997$). No evidence of systematic error could be detected after analysis of the intercept confidence coefficients and no data autocorrelation was assessed by the Durbin-Watson test ($dv = 1.76$; $\alpha 0.05$). The LOD and LOQ were 0.16 and 0.47 µg/mL, respectively.

Calibration curve for the Peak 1 was thoroughly satisfactory ($r^2 = 0.9991$) and no regression deviation was observed for the calculated equation $y = 96.59x - 1020.92$. The linear regression model was consistent with normality and autocorrelation after the Durbin-Watson test ($dv = 2.14$; $\alpha 0.05$).

Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ)

The calculated LOD and LOQ were 13.87 and 42.05 $\mu\text{g/mL}$, respectively, demonstrating the sensitivity of the method.

Repeatability and intermediate precision

The results for repeatability and intermediate precision tests are shown in table 2.

Here table 2

The parameters of the precision of the standard and extract demonstrated a R.S.D. lower than 1.82 % for repeatability, and was less than 2.52 % for inter-day precision. This variation can be considered satisfactory since the maximum accepted limit is usually 5 % for phytochemicals (FDA, 2001)

Recovery and accuracy

The results for recovery test performed for Peak 1 and alpha-hederin ranged from 98.0 to 102.6 %, with R.S.D. lower than 1.2 % in both cases.

Dried extracts analysis

The method developed was applied to the assay the quinovic content in two drying extracts from *Uncaria tomentosa*. The first one was prepared by freeze drying and the other ones by spray drying using colloidal silicon dioxide. The LC chromatograms were comparable for both products and no noticeable qualitative differences could be assessed. Quantitatively, the quinovic content in the freeze drying was higher than in the spray drying extract (Table 3). The decreasing quinovic content may be ascribed to the deleterious effect due to the thermal change associated to the spray drying process or to an irreversible adsorption on the silicon dioxide surface.

Here table 3

With regard to the concentrated extract from *Uncaria tomentosa*, the percentage content of total quinovic derivative, by the sum of the areas of majority peaks characterized as triterpenes was 0.31 g%. Considering only the more conspicuous Peak 1, the content was 0.11 g%. Both results were expressed as alpha-hederin in 100 g of dried drug.

As a conclusion, the reversed-phase HPLC method for assay of quinovic derivatives in *Uncaria tomentosa* extracts showed good separation and resolution, satisfying all the criteria recommended in the validation guidelines. The method was able to determine accurately and specifically quinovic derivatives using a simple method, that can be implemented in routine assays when *Uncaria tomentosa* is used either as raw material or dried extracts of the species.

Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for the financial support and to Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF-UFRGS). S.K. and G.L.B received CNPq grant.

REFERENCES

- Aquino R, Vicenzo F, Francesco S. 1989. Plant Metabolites. structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *J Nat Prod* **52**: 679-685.
- Aquino R, Vicenzo F, Francesco S. 1991. Plant Metabolites. New compounds and anti inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod* **54**: 453-459.
- Aquino R, De Tommasi N, De Simone F, Pizza C. 1997. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* **45**: 1035-1040.
- Cerri R, Aquino R, De Simone F, Pizza C. 1988. New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *J Nat Prod* **51**: 257-261.
- FDA 2001. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. CDER: Rockville.
- 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. *Plant Med* **67**: 447-450.

Gattuso M, Di Sapio O, Gattuso S, Li Pereyra E. 2004. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. *Phytomedicine* **11**: 213-223.

Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB. 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria*. *Phytochemistry* **66**: 89-98.

Hemingway SR, Phillipson JD. 1974. Alkaloids from S. American species of *Uncaria* (Rubiaceae). *J. Pharm. Pharmacol.*, **26**: 113P.

International Conference on Harmonization (ICH) 2005. *Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. Geneva.

Laus G, Keplinger D. 1994. Separation of stereoisomer 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**: 855–860.

Montenegro de Matta S, Delle Monache F, Ferrari F, Marini-Bettolo GB. 1976. Alkaloids and procyanidins of an *Uncaria* sp. from Peru. *Farmaco* **31**: 527–535.

Montoro P, Carbone V, Quiroz JDZ, De Simone F, Pizza C. 2004. Identification and quantification of components in extracts of *Uncaria tomentosa* by HPLC-ES/MS. *Phytochem Anal* **15**: 55-64.

Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G. 1992. HPLC analysis of main oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Chromatographia*, **34**, 597-600.

Wagner H, Kreutzkamp B, Jurcic K. 1985. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytosesteigernde Wirkung. *Planta Med* **51**: 419-423.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Structure of (A) alpha-hederin and (B) general substitution patterns in quinovic derivatives

Figure 2. Alpha-hederin LC chromatogram and the corresponding UV spectrum

Figure 3. LC chromatograms of the *Uncaria tomentosa* extract (upper image) and quinovic derivatives fraction (lower image) showing exclusion of the major phenolic fraction after cleanup step. Detection at 205 nm

TABLES

Table 1 - HPLC parameters for the standard alpha-hederin and for Peak 1 in the *Uncaria tomentosa* extract.

Sample	Rt; min (R.S.D. %)	K' (R.S.D. %)	N (R.S.D. %)	T (R.S.D. %)	Rs (R.S.D. %)	α (R.S.D. %)
Standard	26.31 (0.05)	0.04 (4.29)	176360 (1.22)	1.00 (2.59)	-	-
Extract (Peak 1)	23.96 (0.85)	0.27 (2.35)	113158 (2.55)	1.03 (3.01)	4.36 (2.30)	1.33 (1.08)

Note: retention time (Rt), capacity factor (k'), number of theoretical plates (N), tailing factor (T), resolution (Rs) and separation factor (α).

Table 2. Repeatability and intermediate precision for the standard alpha-hederin and Peak 1 in the *Uncaria tomentosa* extract.

Parameter	Alpha-hederin		Peak 1	
	Concentration (µg/mL)	R.S.D (%)	Extract concentration (mg/mL)	R.S.D (%)
Repeatability	6.0	0.77	0.3	1.09
Intermediary precision		1.82		2.52

Table 3. Quantification of quinovic acid glycosides in dried extracts from *Uncaria tomentosa* bark.

Sample	Concentration ($\mu\text{g/mL}$)	
	Peak 1	SPA
Freeze dried	120.97	319.44
Spray dried	112.10	296.95

Note: Peak 1: majority peak; SPA: sum of the peaks areas (peaks 1 to 7).

Figure 1.

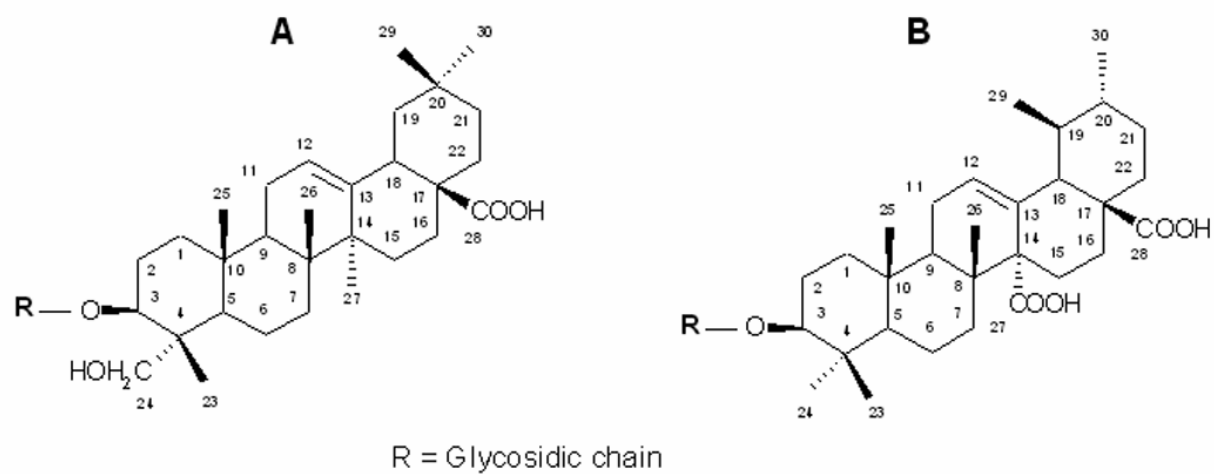


Figure 2.

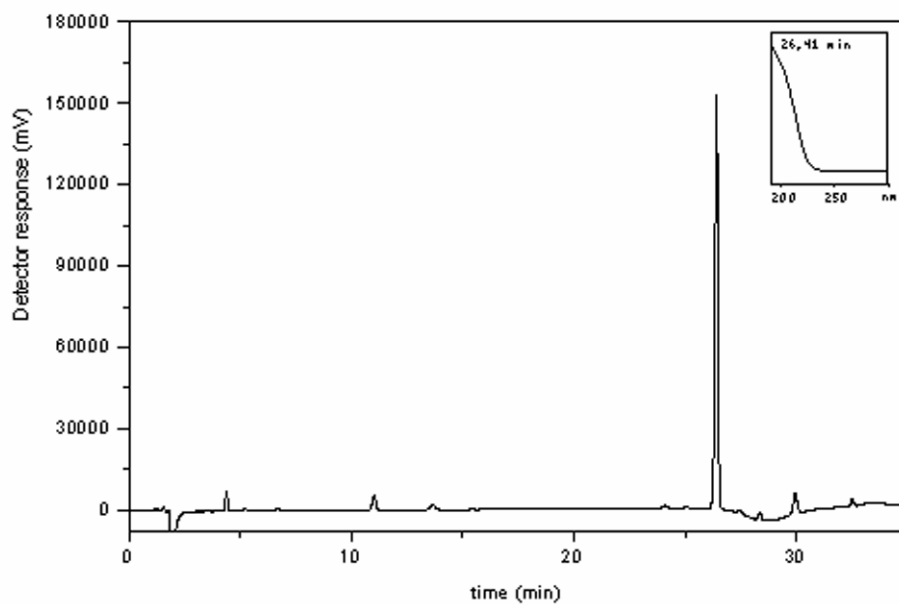
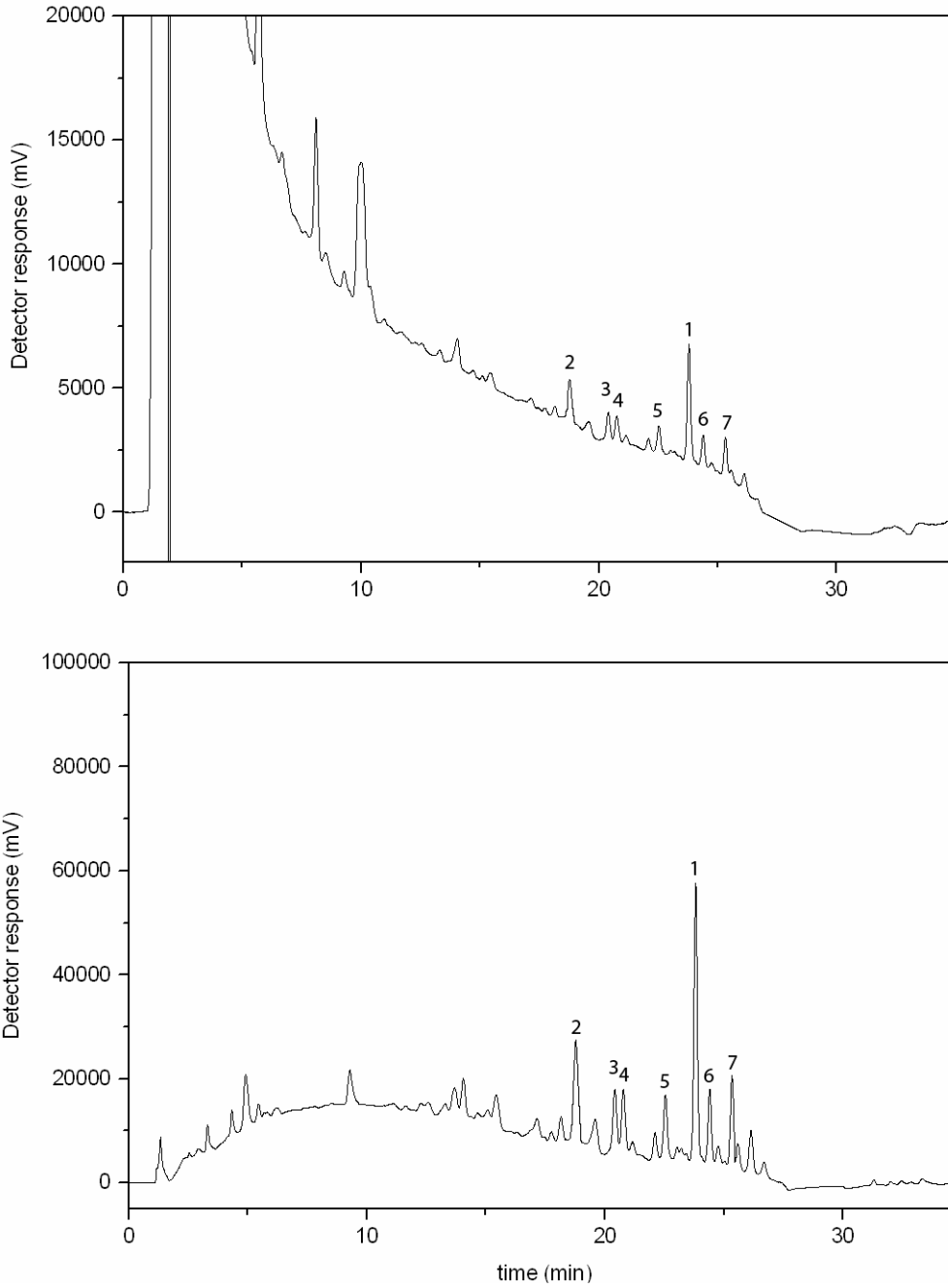


Figure 3.



Capítulo 3. Desenvolvimento de método analítico aplicado aos derivados fenólicos de *Uncaria tomentosa*

INTRODUÇÃO

Os estudos de atividade antioxidante de extratos brutos e parciais de *Uncaria tomentosa* têm demonstrado resultados com elevado potencial, especialmente *in-vitro*, estando esta atividade vinculada ao teor de polifenóis, representados na espécie pelos taninos, procianidinas e derivados cafeoilquinicos.

Van Girkel (1998), em estudo qualitativo, sugeriu que os polifenóis poderiam ser utilizados como marcadores químicos para diferenciar diferentes espécies do Gênero *Uncaria*. Contudo, não são descritos trabalhos posteriores destinados à análise deste relevante grupo fitoquímico.

Sob esta ótica, foi desenvolvido e validado método por CLAE para análise de derivados fenólicos em *Uncaria tomentosa*, apresentado a seguir na forma de artigo submetido para publicação no periódico *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*.

Artigo 3.
*Submetido ao Periódico Journal of Liquid Chromatography and Related
Technologies*

**Validation of a LC Method for Polyphenols assay in Cat's Claw
(*Uncaria tomentosa*)**

Cabral Pavei, Samuel Kaiser, Gustavo L. Borré, George G. Ortega*

Faculdade de Farmácia, PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul
(UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90610-000. Porto Alegre, RS, Brazil

Shortened version of the title: LC Method for Polyphenols assay
in Cat's Claw

**Address correspondence to G.G. Ortega, Faculdade de Farmácia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000,
Porto Alegre, RS, Brazil - e-mail: ortega@farmacia.ufrgs.br*

Abstract

A reversed-phase LC method was developed and validated for the separation and assay of the main polyphenols in extracts from barks of *Uncaria tomentosa*. The LC method consists of a RP-18 column, in gradient mode (trifluoroacetic acid-methanol) using chlorogenic acid, caffeic acid and rutin as external standards and UV-detection at 325 nm. The method showed a good specificity, linearity, precision and accuracy for standards compounds and for the five major peaks from bark extract. Calibration curves were linear with determination

coefficients higher than 0.99. The repeatability and intermediary precision for the five major peaks ranged from 1.09 to 5.60% and 1.25 to 6.28%, respectively. The accuracy values for chlorogenic acid, caffeic acid and rutin in the bark extract were 97.17, 98.84 and 101.78%, respectively. The LC method was applied successfully to one commercial spray-dried and four different freeze-dried extracts produced from barks and roots of *U. tomentosa*.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, polyphenols assay, Column liquid chromatography, validation

1. Introduction

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae), commonly known as Cat's Claw or "Uña de Gato", is a medicinal plant widely spread in the rain forest of Central and South America and largely used in folk medicine to rheumatism, arthritis, gastrointestinal disorders, weakness and viral infections.^[1,2] The main bioactive compounds related for this species include alkaloids,^[3,4,5] phenolic^[2] and quinovic acid derivatives.^[6,7] Several assay methods have been developed focusing the alkaloid fraction.^[8,9,10] However, recently studies have been showing the importance of the polyphenols and its relationship with the anti-inflammatory and antioxidant properties.^[11,12,13] From an analytical point of view there are few studies regarding the characterization and content assay of phenolic compounds in *U. tomentosa*. In addition, these methods were not

designed to quantitative evaluation, but only to the establishment of the polyphenols profile in samples, without validation issues.^[12,13,14]

In this context, the aim of this study was to develop and validate a LC method for the separation and assay of the main polyphenols occurring in crude extract from barks of *U. tomentosa*. Further, the method was applied to three other different freeze-dried and one spray dried extracts, in view to compare its polyphenol content.

2. Experimental

2.1 Plant Materials

Dried and ground stem barks of *U. tomentosa* were kindly gifted by Laboratorios Induquímica S.A. (Lima, Peru). Roots of *Uncaria tomentosa* were purchase from Quimer Ervas e Especiarias (São Paulo, Brazil). A commercial spray-dried extract (CE) was purchased from one of the most important Brazilian suppliers of cat's claw and used for analytical comparison purpose.

2.2 Chemical and Reagents

Methanol (Tedia, USA), trifluoroacetic acid p.a (TFA) (Vetec, Brazil), and HPLC grade water (Milli-Q system, Millipore, USA) were used for the mobile phase preparation. The chlorogenic acid (Fluka, batch 455159/1, Switzerland), caffeic acid (Extrasynthese, batch 0381024, France) and rutin (Sigma, batch 128K1177, USA) were used as external standards.

2.3 HPLC Analysis

The reversed-phase gradient method was performed employing a Shimadzu liquid chromatography LC 10 Class (Tokyo, Japan) provided with a FCV-10 AL system controller, a LC-10 AD pump system, a SIL-10 A automatic injector (20 μ L-loop) and a SPD-10 A ultraviolet-visible detector. The data were processed by LC-10 CLASS software. A Gemini RP-18 (250 x 4 mm i.d., 5 μ m) (Phenomenex, Torrance, USA) column coupled to a pre-column Lichorosorb C-18 (Waters, USA) was used. The main peaks were monitored with a Shimadzu Prominence SPD-M20A (Tokyo, Japan), in the range of 190-800 nm, controlled by LC-Solution Multi-PDA software.

Separation was performed using a gradient elution, which consisted on TFA 0.1% (v/v) (A) and methanol:TFA (99.9:0.1; v/v) (B), as follows: 0-10 min 30.0% to 40.0% B, 10-18 min 40.0% to 60.0% B, 18-22 min 60.0% B, 22-28 min 60.0% to 30.0% B. The flow rate was adjusted to 0.9 mL min⁻¹, the wavelength to 325 nm and the injection volume to 20 μ L. The analyses were performed at 23 \pm 1 $^{\circ}$ C.

The polyphenols were identified, comparing its retention time and the corresponding UV-spectra to that obtained from the standards compounds.

2.4 Standard Curves

Stock solutions of chlorogenic acid (CLA), caffeic acid (CFA) and rutin (RUT) were prepared transferring amounts of the standards substances accurately weighted to 50.0 mL of methanol. Appropriate dilutions were prepared using methanol: TFA 0.1% (50:50 v/v) to yield concentrations ranging from 8.16 to 48.96 μ g mL⁻¹ for CLA, 0.26 to 1.56 μ g mL⁻¹ for CFA, and 5.08 to 50.76 μ g

mL⁻¹ for RUT. The samples were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore, USA) prior to injection. Each result expresses de mean peak area of three injections.

2.5 Samples Preparation

2.5.1 Preparation of the Hydroethanolic Extracts

The extractive solutions of the barks (HB) and of the roots (HR) were prepared by a 4 days-maceration, using an hydroethanolic solution 40% (v/v) and a drug:solvent ratio of 1:10 (w/v). Separately each mixture was pressed, filtered and concentrated under vacuum at 50 °C up to half of their original weights. The concentrates were immediately freeze-dried (Modulyo 4L, Edwards, USA).

2.5.2 Preparation of the Aqueous Extracts

The extractive solutions of the barks (AB) and of the roots (AR) were prepared, by decoction 4 g-samples of bark and root in 200 mL of water for 45 min, as in the traditional Peruvian medicine.^[1] After cooling, both extractive solutions were filtered separately and the final volumes adjusted to 200 mL. The filtrates were immediately freeze-dried (Modulyo 4L, Edwards, USA).

2.5.3 Freeze-Dried Extract Calibration Curve

Stock solution of HB was prepared dissolving an accurately weighted sample of 1005 mg in 50.0 mL of methanol:water (50:50 v/v). Appropriate dilutions were prepared, using methanol: TFA 0.1% (50:50 v/v) to yield concentrations of 1.93, 3.87, 5.8, 7.73, and 9.67 mg mL⁻¹. The samples were filtered through a 0.45 µm

membrane prior to injection. The results were expressed by the mean of peak areas from three injections.

2.6 Method Validation

The validation of the analytical method comprised linearity, repeatability, intermediary precision, and accuracy tests according to the International Conference on the Harmonization (ICH) guideline.^[15]

The linearity test comprised regression analysis, ANOVA, Durbin-Watson test for residues and the analysis of the confidence intervals for the linear coefficient (constant systematic error). The limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation (S.D) and the slope (S) of the calibration curves.^[15] The system suitability parameters were obtained from chromatograms of the standards solution and HB solutions and the results were expressed by the mean of three determinations for both cases.

The precision parameters, reproducibility and intermediary precision, were evaluated for both standards compounds, as well as for HB solutions. The repeatability was evaluated by analysis of nine samples in the same day. The intermediary precision was determined by analysis, in triplicate, of three different samples in three consecutive days. The results were expressed as the relative standard deviation (R.S.D).

The accuracy was evaluated through the recovery test after spiking known amounts of standards solutions in the HB solution to give final concentrations of 15.50, 23.86, 32.14 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CLA, 0.62, 0.90, 1.16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of CFA, and 13.37, 23.34, 33.29 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of RUT.

The quantitative determination, peaks areas in the sample chromatograms was performed using the regression equations from the CLA, CFA and RUT calibration curves. The major constituents were assayed separately, where the peaks corresponding to standards compounds were expressed as such, while the unidentified peaks (coded as peak 1, peak 2, peak 3 and peak 4) were expressed as CLA.

2.7 Analysis of the Samples

Samples of the HB, HR, AB, AR and commercial extract were appropriated diluted with methanol:TFA 0.1% (50:50 v/v) to yield a final concentration of 5.8 mg mL⁻¹. The samples were filtered through a 0.45 µm membrane prior to injection. The results were expressed by the mean of peak areas obtained from three injections.

3. Results and discussions

The LC-chromatograms from the standards CLA, CAF and RUT at 325 nm and their respective UV-spectra are shown in Fig. 1. In all cases, both spectra and absorption maxima agreed to those related in the current literature.^[16]

Figure 1

The occurrence of CLA, CAF and RUT could be demonstrated in HB samples after comparison of retention time, purity index similarity above 0.99 and UV-spectra (Fig. 2). The two others conspicuous peaks observed in the HB

chromatogram were coded as peak 1 and peak 2, and exhibit UV-spectra patterns typical of flavonoids, specifically, flavone and flavonol, respectively.^[16]

Figure 2

The system suitability parameters for CLA, CAF and RUT peaks in the standard and extract solutions are shown in Table 1. The capacity factor (k'), number of theoretical plates (N) and tailing factor (Tf) for both peaks ranged from 1.58 to 5.60, 3372 to 100380 and 0.72 to 1.30, respectively. These results for all parameters evaluated are in accordance with the ICH guidelines indicating that the chromatographic system developed shown a suitable performance for the *U. tomentosa* samples analysis.^[17]

Table 1

The results of the regression analysis for the standards compounds CLA, CFA and RUT are shown in Table 2. The method shown to be linear in the concentration range evaluated for all external standards, with regression coefficients (R^2) higher than 0.999. No evidence of constants systematic error could be assessed after analysis of the confidence limits calculated for the intercept, which included zero. The LOD and LOQ values were clearly below the lowest curve concentration assayed showing a good sensitivity for the

standards and suitability for the analytical purposes, according ICH guidelines.^[15]

Table 2

The absence of linearity deviation in the range from 1.93 to 9.67 mg mL⁻¹ for all peaks evaluated is demonstrated by the R² values higher than 0.99, despite the complex composition of the sample. The confidence limits calculated for the intercept included zero, demonstrating the absence of constant systematic error. No residues autocorrelation was evidenced by Durbin-Watson test for regression residues in any of the five major peaks here considered, since the all *d* values calculated were higher than the critical *d_U* limit (*d_U* = 1,36, α 0.05).^[18]

The precision of the LC method was evaluated through the repeatability and intermediary precision tests (Table 3). The repeatability for the HB demonstrated that the analyzed peaks presented a R.S.D. range from 1.09 to 5.60%. This data could be considered satisfactory since the majority of similar research data suggest a R.S.D. below to 8% as acceptable.^[19] The intermediary precision for the peaks was lower than 6.28%, being results until up to 15% considered appropriated when the matrix complexity is taken into account.^[20]

The results of repeatability and intermediary precision tests of the standards compounds confirmed the method precision with R.S.D. values lower than 2.6% for both precision parameters.

Table 3

Recovery test were performed to assess the method accuracy. The results of the recovery test considering the standard compounds CLA, CFA and RUT are shown in Table 4. The recovery results were 97.17, 98.84 and 101.78%, respectively, with R.S.D. lower than 3.2% in all analyzed concentrations.

Table 4

The LC method was applied to compare the polyphenol content in four freeze-dried extracts and one commercial spray-dried extract of *U. tomentosa*. The chromatographic profiles of the dried extracts are shown in Fig. 3. Both chromatograms of HB and AB derived from bark (Fig 2 and 3, respectively) were quite similar, as well as for both chromatograms of HR and AR derived from roots. These results indicate that bark and roots afforded a similar LC-profile despite of liquid extractor or extraction technique.

Figure 3

In the chromatographic profile of the roots extracts (HR and AR) six major peaks could be detected, being two of them identified as CLA and RUT by UV-spectra comparison. Both root extracts present four characteristic peaks coded as 1, 2, 3 and 4, with UV-spectra resembling closely those currently observed for flavonoids (Fig. 2 and 3). Their absorption maxima located between 300–380 nm and 240–280 nm are typical of the cinnamoyl and benzoyl group observed in derivatives of quercetin and isorhamnetin.^[16] Peaks 3 and 4 could be detected neither in the aqueous extract from bark nor the commercial extract, but peaks 1 and 2 are undoubtedly present in both extracts (Fig. 2). These results demonstrate the discriminative capacity of developed and validated LC method when applied to samples obtained from different parts (barks and roots) of the specie.

The similarity of CE chromatographic profile with the HR and AR chromatographic profiles suggests strongly that this extract outcome from *U. tomentosa* roots instead of barks.

The calculated polyphenol content in the different extracts are shown in Table 5. In the roots extracts, the polyphenol content was about 3 times higher than those determined for both barks extracts, probably due to presence of the flavonols (peaks 3 and 4) absent in bark extracts. The polarity of both solvents and the extraction method used in this work seem to play a secondary role in the barks extracts and roots extracts, since only small changes were observed in the polyphenol content of those extracts. From an analytical point of view, maceration with hydroethanolic solution was slightly more efficient than

decoction with water for the extraction of polyphenols in the analyzed cat's claw barks and roots. In the CE, the polyphenol content was low in comparison with the other freeze-dried extracts, probably due to high concentration of the drying excipients in this spray-dried extract.

Table 5

4. Conclusions

The LC method for developed and validated for assay of polyphenols in hydroethanolic extract from bark of *U. tomentosa* was specific, linear, precise and accurate. Furthermore, the LC method was discriminatory when applied to different extracts from barks and roots of the specie. Thus, the easy proposed LC method is suitable for quantification of polyphenols and can be used in the quality control of *U. tomentosa* barks samples, as well as for differentiate barks samples of roots samples.

5. Acknowledgments

The authors are grateful to Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF-UFRGS), for the financial and technical support. S.K and G.L.B received grant from CNPq.

6. References

1. Keplinger K, Laus G, Wurm M, Dierich MP, Teppner H (1999) *J Ethnopharmacol* 64:23-34. doi:10.1016/S0378-8741(98)00096-8
2. Heitzman ME, Neto CC, Winiarz E, Vaisberg AJ, Hammond GB (2005) *Phytochemistry* 66:2-29. doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.022
3. Hemingway SR, Phillipson JD (1974) *J Pharm Pharmacol* 26:s113P.
4. Wagner H, Kreutzkamp B, Jurcic K (1985) *Planta Med* 51:419-423.
5. Laus G, Brössner D, Keplinger K. (1997) *Phytochemistry* 45:855–860. doi:10.1016/S0031-9422(97)00061-7
6. Cerri R, Aquino R, De Simone F, Pizza C (1988) *J Nat Prod* 51:257-261. doi:10.1021/np50056a010
7. Aquino R, De Tommasi N, De Simone F, Pizza C (1997) *Phytochemistry* 45:1035-1040. doi:10.1016/S0031-9422(96)00716-9
8. Stuppner H, Sturm S, Konwalinka G (1992) *Chromatographia* 34:597-600. doi: 10.1007/BF02269869
9. Laus G, Keplinger D (1994) *J Chromatogr* 662:243-249.
10. Ganzera M, Muhammad I, Khan RA, Khan IA (2000) *Planta Med* 67:447-450.
11. Sandoval M, Okuhama NN, Zhang XJ, Condezo LA, Lao J, Angeles FM, Musah RA, Bobrowski P, Miller MJ (2002) *Phytomedicine* 9:325-337.
12. Gonçalves C, Dinis T, Batista MT (2005) *Phytochemistry* 66:89-98. doi:10.1016/j.phytochem.2004.10.025
13. Amaral S, Mira L, Nogueira JMF, Da Silva AP, Florêncio MH (2009) *Bioor Med Chem* 17:1876-1883. doi:10.1016/j.bmc.2009.01.045

14. Sterbova D, Matejicek D, Vicek J, Kuban V (2004) *Anal Chim Acta* 513:435-444. doi:10.1016/j.aca.2004.03.031
15. International Conference on Harmonization (ICH) (2005) Q2(R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva.
16. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB (1970) *The systematic identification of flavonoids*. Springer-Verlag, New York.
17. Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (1994) *Reviewer Guidance: Validation of Chromatographic Methods*, Rockville.
18. Draper NR, Smith H (1998) *Applied regression analysis*. John Wiley & Sons, New York.
19. Andlauer W, Martena MJ, Fürst P (1999) *J Chromatogr A* 849:341-348. doi:10.1016/S0021-9673(99)00597-X
20. Food and Drug Administration (FDA) (2001) *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, Rockville.

Tables

Table 1. System suitability parameters for standards peaks (left) and the five major peaks (right, italic) detected in the HB chromatogram.

Peak	k'		N		Tf		Rs	
Chlorogenic acid	1.72	<i>1.58</i>	7039	<i>7400</i>	1.19	<i>1.30</i>	NA	<i>NA</i>
Cafeic acid	2.61	<i>2.51</i>	13852	<i>3372</i>	1.19	<i>0.72</i>	7.05	<i>5.34</i>
Peak 1	NA	3.48	NA	<i>15220</i>	NA	<i>1.13</i>	NA	<i>6.51</i>
Peak 2	NA	5.03	NA	<i>26094</i>	NA	<i>1.16</i>	NA	<i>13.96</i>
Rutin	5.56	<i>5.60</i>	100380	<i>45246</i>	1.13	<i>0.99</i>	28.73	<i>7.04</i>

Note: k': capacity factor; N: number of theoretical plates; Tf: tailing factor; Rs: resolution; NA: not applicable

Table 2. Linearity, LOD and LOQ parameters for the standards compounds.

Substance	R ²	Regression equation	LOD (µg mL ⁻¹)	LOQ (µg mL ⁻¹)
Chlorogenic acid	0.9998	y = 30913x + 6513.15	0.38	1.14
Caffeic acid	0.9996	y = 107511.2x + 1145.91	0.02	0.05
Rutin	0.9997	y = 23082.43x - 5365.81	0.44	1.35

R²: regression coefficient; LOD: Limit of Detection; LOQ: Limit of Quantification

Table 3. Repeatability and intermediary precision for the main five peaks detected in the HB chromatogram.

Substance	Standards compounds		HB	
	Repeatability	Intermediary precision	Repeatability	Intermediary precision
	R.S.D (%)	R.S.D (%)	R.S.D (%)	R.S.D (%)
Chlorogenic acid	0.87	2.60	1.09	1.25
Caffeic acid	1.21	2.51	3.30	6.28
Peak 1	NA	NA	5.60	3.03
Peak 2	NA	NA	3.84	5.80
Rutin	0.32	0.63	3.30	3.83

NA: not applicable

Table 4. Recovery test for chlorogenic acid, caffeic acid and rutin in HB.

Substance	Theoretical concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Experimental concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%); R.S.D (%)	Total recovery (%); R.S.D (%)
Chlorogenic acid	15.50	15.57	100.43; 0.56	
	23.86	23.26	97.51; 0.33	97.17; 3.54
	32.14	30.08	93.57; 0.42	
Caffeic acid	0.62	0.65	104.55; 1.71	
	0.90	0.89	98.61; 3.17	98.84; 5.67
	1.16	1.08	93.34; 0.28	
Rutin	13.37	13.28	99.36; 0.65	
	23.34	23.86	102.21; 0.41	101.78; 2.20
	33.29	34.55	103.77; 0.52	

Table 5. Polyphenol contents in different freeze-dried extracts (HB, HR, AB, AR) and commercial extract (CE).

Substance	Concentration g% (w,w)				
	mean; (R.S.D%)				
	HB	HR	AB	AR	CE
Chlorogenic acid	0.38; (0.29)	0.84; (2.71)	0.56; (0.55)	0.69; (0.58)	0.30; (0.95)
Caffeic acid	0.02; (1.49)	NA	0.02; (1.10)	NA	NA
Peak 1*	0.16; (0.24)	0.56; (5.89)	0.18; (2.26)	0.50; (3.55)	NA
Peak 2*	0.16; (2.18)	0.78; (0.50)	0.18; (1.00)	0.74; (2.03)	0.02; (1.36)
Peak 3*	NA	0.56; (0.89)	NA	0.51; (2.88)	NA
Peak 4*	NA	1.23; (4.22)	NA	1.21; (1.21)	0.05; (4.91)
Rutin	0.40; (2.09)	0.42; (9.59)	0.40; (2.51)	0.29; (2.14)	0.02; (2.20)
Total	1.12; (0.92)	4.39; (2.33)	1.34; (0.76)	3.94; (0.35)	0.40; (0.50)

NA: not applicable; *Calculated as CLA

Figure Captions

Figure 1. Chromatographic profiles of the standards compounds and their respective UV-spectra (200 - 500 nm).

Figure 2. LC-Chromatograms and UV-spectra (200 - 500 nm) showing the presence of chlorogenic acid, caffeic acid, rutin, and two still unidentified flavonoids in HB samples. Detection at 325 nm.

Figure 3. LC-chromatograms recorded at 325 nm for the *U. tomentosa* hydroethanolic extract from root (HR); aqueous extract from bark (AB); aqueous extract from root (AR); and commercial extract (CE) along with UV-spectra (200 – 500 nm) of the peak 3 and peak 4.

Figure 1.

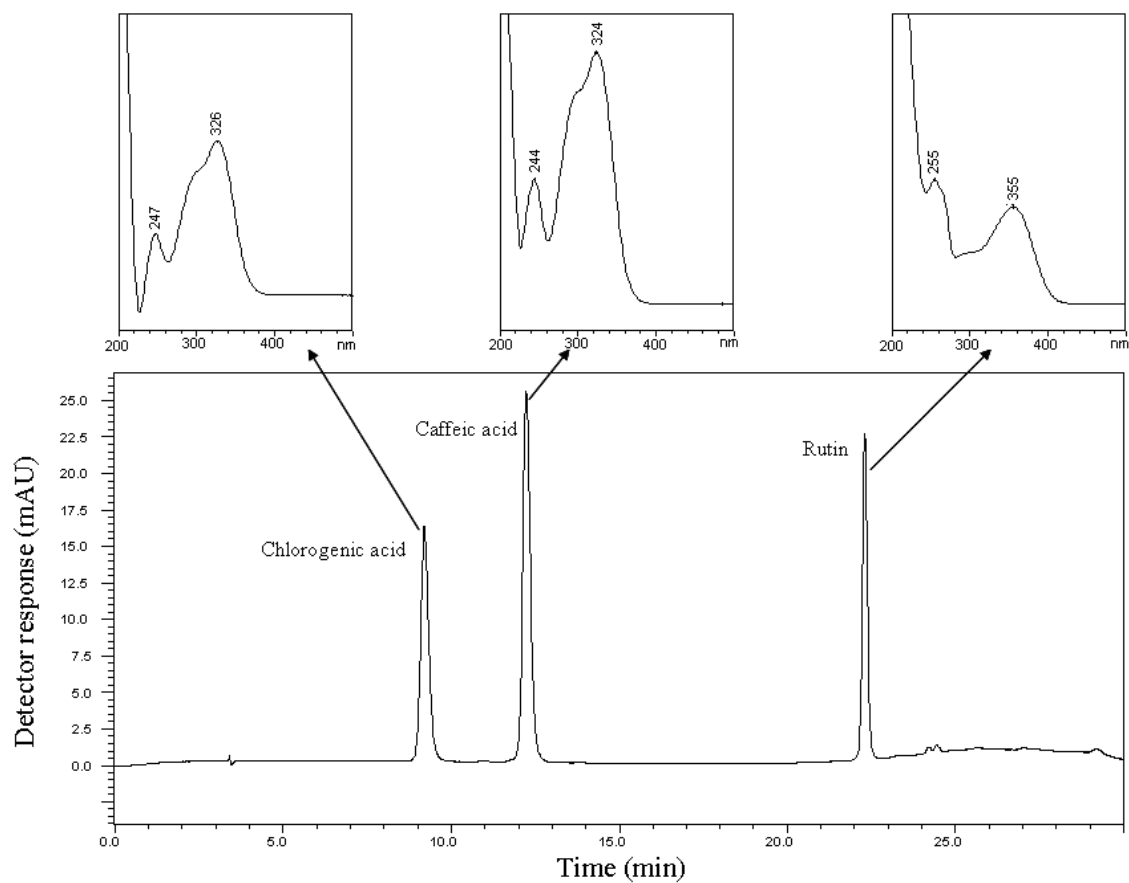


Figure 2.

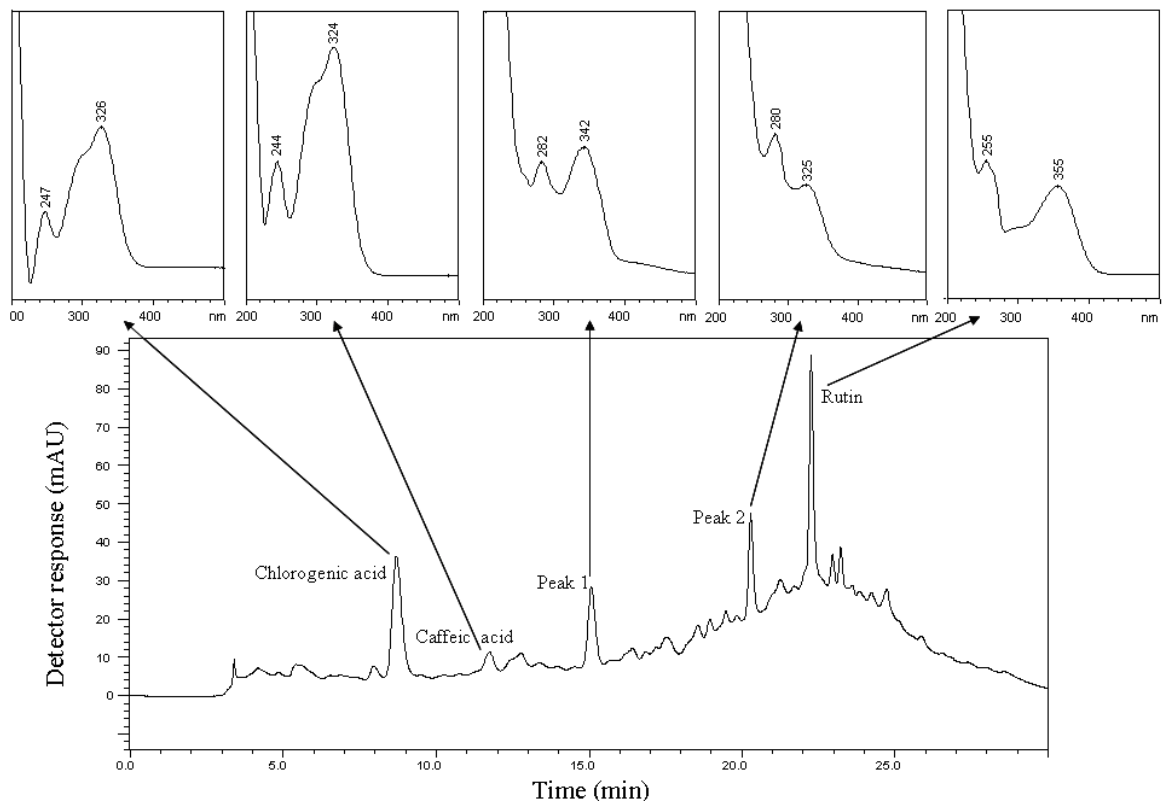
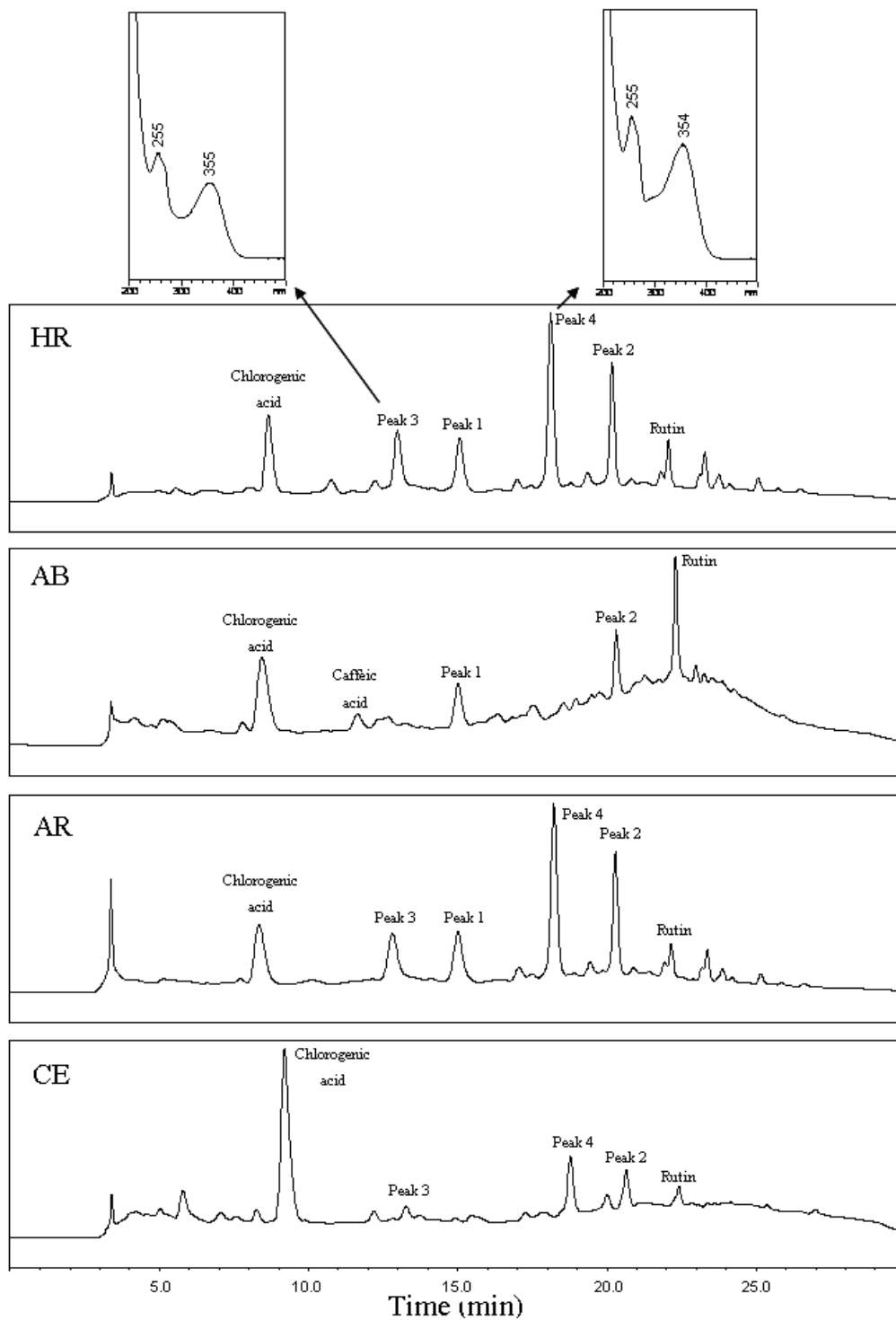


Figure 3.



Conclusões

- A avaliação analítica e tecnológica da matéria-prima permitiu caracterizar o lote de matéria-prima de *Uncaria tomentosa* utilizado.
- A metodologia analítica desenvolvida e validada permitiu o monitoramento e o controle de qualidade das frações bioativas de interesse de forma rápida, exata e precisa.
- As frações de polifenóis, triterpenos e alcalóides apresentaram comportamentos diferenciados quanto à manutenção da integridade química durante as etapas de transformação da matéria-prima, sendo a fração de alcalóides a mais susceptível a alterações químicas, especificamente, isomerização em meio aquoso promovida por efeito térmico.
- A hipótese de desenvolvimento de frações tecnologicamente caracterizadas mostrou-se viável no caso dos polifenóis, alcalóide e triterpenos de *Uncaria tomentosa*, sendo possível identificar os parâmetros críticos ao processo.
- As frações enriquecidas em polifenóis e alcalóides exibiram toxicidade frente à linhagem de glioma C6 de ratos e U-137-MG de humanos, não afetando na mesma extensão células saudáveis de hipocampo.
- Apenas a fração enriquecida de triterpenos apresentou uma retraída atividade imunoadjuvante em camundongos, quando presente em vacinas empregando como modelo o Herpes vírus bovino tipo 5.

Conclusões

- A obtenção de frações em separado oportuniza o estudo de atividades biológicas de forma diferenciada, através de uma abordagem até o momento inédita para a espécie.
- O estabelecimento das variáveis envolvidas no processo de obtenção de frações enriquecidas bioativas associado à monitoração qualitativa e quantitativa em separado destes grupos químicos oportuniza novos estudos de atividades biológicas sob uma ótica diferenciada.

Referências

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

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

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

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

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

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

CARR Jr, R.L.; Evaluating Flow Properties of Solids. **Chemical Engineering**, v.72, n.2, 1965

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

CIMAROSTI, H.; RODNIGHT, R.; TAVARES, A.; PAIVA, R.; VALENTIM, L.; ROCHA, E.; SALBEGO, C.G. An investigation of neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. **Neuroscience Letter**, v.315, p.33-36, 2001.

DA SILVA, F.A. **Avaliação tecnológica e atividade antioxidante de produtos secos por *spray-drying* de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. – Aquifoliaceae (erva-mate)** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2007. Tese de Doutorado

DALSGAARD, K. Saponin adjuvants. 3. Isolation of a substance from *Quillaja saponaria* Molina with adjuvant activity in food and mouth disease vaccines. **Archiv für die gesamte Virusforschung**, v.44, p.243-254, 1973.

DESMARCHELIER, C.; MONGELLI, E.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Evaluation of the in vitro antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Phytotherapy Research**, v.11, p.254–256, 1997

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

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

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

GUYOT, J.C.; ARNAUD, P.; BECOURT, P.; CASSIERE, J.P.; CHULIA, D.; DUCHÊNE, D.; FERRAND, D.; GOUAIHARDOU, J.; LANGLOIS, C.; LEQUIEN, C.; MANFROI, F.; POURCELOT, Y.; RENOUX, R.; SEGOT, S.; TOURE, P. Commentaires relatifs aux méthodes générales d'analyse des formes orales solides récemment introduites dans les pharmacopées française et européenne. Rapport d'une commission SFSTP. **S.T.P. Pharma Pratiques**, v. 5, n.6, p.482-494, 1995.

HAUSNER, H.H. Friction conditions in a mass of metal powder. **Int. J. Metall.**, v.3, p.7-13, 1967.

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

FERIA-ROMERO, I.; LAZO, E.; PONCE-NOYOLA, P.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, C.M.; RAMOS-VALDIVIA, A.C. Induced accumulation of oleanolic acid and ursolic acid in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. **Biotechnology Letters**, v.27, p. 839-843, 2005.

FLORES-SÁNCHEZ, I.J.; ORTEGA-LÓPEZ, J.; MONTES-HORCASITAS, M.C.; RAMOS-VALDIVIA, A.C. Biosynthesis of sterols and triterpenes in cell suspension cultures of *Uncaria tomentosa*. **Plant Cell Physiology**, v.43, n.12, p.1502-1509, 2002.

GATTUSO, M.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, S.; LI PEREYRA, E. Morphoanatomical studies of *Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis* bark and leaves. **Phytomedicine**, v.11, p.213-223, 2004.

GARCIA PRADO, E.; GARCIA GIMENEZ, M.D.; DE LA PUERTA VAZQUEZ, R.; ESPARTERO SANCHEZ, J.L.; SAENZ RODRIGUES, M.T. Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. **Phytomedicine**, v.14, p.280-284, 2007.

GRIEBELER, S.A. **Validação de metodologia analítica para matéria-prima vegetal, extrato seco e cápsulas de gelatina dura contendo extrato seco de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2006. Dissertação de Mestrado Profissionalizante

HEITZMAN, M.E.; NETO, C.C.; WINIARZ, E.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria*. **Phytochemistry**, v.66, p.89-98, 2005.

HEMINGWAY, S.R.; PHILLIPSON, J.D. Alkaloids from South American species of *Uncaria* (Rubiaceae). **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.26, p.113, 1974.

KAZAKEVICH, Y.; LOBRUTTO, R. **HPLC for pharmaceutical scientists**, New York: John Wiley & Sons, 2007.

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

KITAJIMA, M.; HASHIMOTO, K.I.; YOKOYA, M.; TAKAYAMA, H.; SANDOVAL, M.; AIMI, N. Two new nor-triterpenes glycosides from Peruvian *Una de gato* (*Uncaria tomentosa*). **Journal of Natural Products**, v. 66, p.320-323, 2000.

LAHOUD, V.; LLIZARBE, S.; BALLONA, P. Estudio clínico-radiográfico comparativo del recubrimiento pulpar indirecto con pasta a base de *Uncaria tomentosa*. **Odontología Sanmarquina**, v.1, n.6, p.9-19, 2000.

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

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

LIST, P.H.; SCHMIDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989.

MOHAMED, A.F.; MATSUMOTO, K.; TABATA, K.; TAKAYAMA, H.; KITAJIMA, M.; AIMI, N.; WATANABE, H. Effects of *Uncaria tomentosa* total alkaloid and its components on experimental amnesia in mice: Elucidation using the passive avoidance test. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.52, p.1553-1561, 2000.

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

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

NORABERG, J.; KRISTENSEN, B.W.; ZIMMER, J. Markers for neuronal degeneration in organotypic slice cultures. **Brain Research Prot.**, v.3, p.278-290, 1999.

ORTEGA, G.G; PAVEI, C.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Processo de obtenção de fração purificada de substâncias saponosídicas e uso de substâncias saponosídicas. Instituto Nacional de Propriedade Intelectual, **PI0501510-3 A2**, 25p., 2006.

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

PEIXOTO, M.P.G. **Saponinas dos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (mate): desenvolvimento de metodologia analítica, estudos físico-químicos e biológicos.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. 2009. Tese de Doutorado

PERO, R.W. Isolation, purification and identification of a bioactive component of a water soluble extract of a botanical species, e.g. *Uncaria tomentosa*, useful for enhancing the immune, anti-inflammatory, anti-tumor and DNA repair processes. **Patent US.2003017998**, 20p., 2002.

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

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

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

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

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

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

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

SANDOVAL-CHACON, M.; THOMPSON, J.H.; ZHANG, X.J.; LIU, X.; MANNICK, E.E.; SANDOWSKA-KROWICKA, H.; CHARBONNET, R.M.; CLARK, D.A.; MILLER, M.S.J. Anti-inflammatory actions of Cat's Claw : The role of NF-KB. **Aliment pharmacology Therapy**, v.12, p.1279-1289, 1998.

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

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

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

SNOW, A. D.; CASTILLO, G.M.; CHOI, P.Y.; NGUYEN, B.P. Proanthocyanidins for the treatment of amyloid and alpha-synuclein diseases. **Patent WO-2003074062**, 87p., 2003.

SPIEGELFERD, C. Cat's claw herbal remedy. Trade & Enviromental database (TED). **Case Studies**, v.15, n.1, p.772, 2005.

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

SYRIMIS, A. *Uncaria tomentosa*: A review. **British Journal of Phytotherapy**, v.5, n.1, p.29-31, 1999.

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

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

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

VERZA, S.G. **Avaliação de atividades biológicas de saponinas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill e *Chenopodium quinoa* W. – Desenvolvimento e caracterização de complexos imunoestimulantes e imunoadjuvantes.** Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Tese de Doutorado (em andamento).

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

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

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

ZHI-CHEN, L. **General control methods for vegetable drugs.** Geneva: WHO, 1980.

Apêndice 1. Laudo de Certificação Botânica e Autorização de Importação

CERTIFICACIÓN BOTÁNICA

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

Certifica:

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

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

Nombre vulgar: “Uña de gato”

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

Lima, 08 junio del 2006

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urbanización Santa Luzmila





MINISTERIO DE AGRICULTURA
INSTITUTO NACIONAL DE RECURSOS NATURALES
INRENA

Nº 007892 -AG-INRENA

PERMISO PARA FAUNA Y FLORA SILVESTRE

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

EXPORTACION IMPORTACION RE-EXPORTACION

Válido por 60 días calendarios

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

UÑA DE GATO (*Uncaria tomentosa*)

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

PRODUCTO CON FINES COMERCIALES*****

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

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

Lima, 03 de 07 del 2006

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

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

Acta n° 340-06
O.A n° 6559971154

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

Apêndice 2. Aprovação Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
CARTA DE APROVAÇÃO

pro:pesq

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2007793


Título : OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DE FRAÇÕES PURIFICADAS FARMACOLOGICAMENTE ATIVAS PRESENTES EM UNCARIA TOMENTOSA (WILLD) DC. (Unha-de-gato)

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
GEORGE GONZALEZ ORTEGA	PESQ RESPONSÁVEL	ortega@farmacia.ufrgs.br	33085218
CABRAL PAVEI	PESQUISADOR	00117373@ufrgs.br	
MARIA PAULA GAROFO PEIXOTO	PESQUISADOR	peixoto_mpaula@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 31 , ata nº 111 , de 24/07/2008 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, quarta-feira, 30 de julho de 2008


ILMA SIMONI BRUM DA SILVA
Coordenador do CEP-UFRGS

