

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

**Isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (Willd.)
DC. (Unha-de-Gato) induzida por fatores tecnológicos e sua influência
sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga
T24 e RT4**

SAMUEL KAISER

PORTO ALEGRE, 2012

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

**Isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.
(Unha-de-Gato) induzida por fatores tecnológicos e sua influência sobre a
atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4**

Dissertação apresentada por **SAMUEL
KAISER** para obtenção do TÍTULO DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. George González Ortega

PORTO ALEGRE, 2012

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 23.03.2012 pela Banca examinadora constituída por:

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

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

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

Kaiser, Samuel

Isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (Unha-de-Gato) induzida por fatores tecnológicos e sua influência sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4 / Samuel Kaiser. -- 2012.
189 f.

Orientador: George González Ortega.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. *Uncaria tomentosa*. 2. alcalóides oxindólicos. 3. cinética de isomerização. 4. otimização de extração. 5. atividade citotóxica. I. Ortega, George González, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG). Análises complementares foram realizadas na Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico Farmacêutico (CDTF), Laboratório Nacional Agropecuário (LANAGRO-RS) e Laboratório de Enzimologia Aplicada do Departamento de Bioquímica desta universidade.

*Dedico este trabalho aos meus queridos pais,
Leoni Kaiser e Iara Maria Hatwig Kaiser,
e ao meu avô Afonso Guilherme Hatwig.
Fontes eternas de inspiração e força.*

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer ao Professor Dr. George G. Ortega por todos esses anos de convivência e ensinamentos que me engrandeceram tanto intelectualmente como pessoalmente. A você professor meu muito obrigado por todas as oportunidades de crescimento que me proporcionaste.

A Professora Dr. Ana Maria Oliveira Battastini e a Mestranda Fabricia Dietrich do Departamento de Bioquímica desta universidade pela colaboração na avaliação da atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais.

Ao pessoal do LDG, em especial aos meus colegas Simone e Pedrinho, pela grata convivência diária que certamente vai deixar saudades e boas recordações.

Ao meu grande amigo e colega Cabral Pavei com o qual tive a oportunidade de convívio e aprendizagem desde a minha iniciação científica que certamente me ajudaram e muito na realização deste trabalho. Valeu Cabral!

Aos meus amigos, tanto aos de infância na longínqua São Paulo das Missões quanto aos que adquiri durante esses 8 anos em Porto Alegre, agradeço muito pelos momentos de diversão e comemorações e, principalmente, pelo carinho e a amizade.

A toda a minha família por ter propiciado a base sólida para construção de meu caráter.

Aos meus irmãos Moacir e Suzana, a quem amo de coração, pela a força e por sempre acreditarem em mim.

A minha madrinha Lucia a quem amo muito por ter me criado e por ter sido sempre a minha segunda mãe. OBRIGADO DINHA!

Aos meus pais, Leoni e Iara, por tudo que me ensinaram e pelo amor incondicional que sempre tiveram por mim. AMO VOCÊS PAI E MÃE!

RESUMO

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. é uma liana nativa da região Amazônica popularmente conhecida como “unha-de-gato”. Três principais frações bioativas reconhecidas estão presentes em suas cascas, a saber: polifenóis, derivados do ácido quinóico e alcalóides oxindólicos. Aos últimos são atribuídas diversas atividades biológicas, dentre as quais a antitumoral. No entanto, a elevada suscetibilidade dos alcalóides oxindólicos à isomerização pode implicar em atividades biológicas diferenciadas, dependendo do método de processamento da matéria-prima. Assim, este trabalho teve como objetivo avaliar a ocorrência de isomerização dos alcalóides oxindólicos nas etapas de extração e de purificação, e sua influência sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4. Para isso foi desenvolvido e validado, de forma satisfatória, um método analítico por CLAE-PDA, que permitiu monitorar a isomerização em diferentes processos extrativos, a saber, maceração estática, maceração dinâmica, turbo-extração, ultrassom e refluxo. A isomerização pôde ser evitada apenas com o emprego da maceração dinâmica e ultrassom. Além disso, a cinética de isomerização dos alcalóides, induzida por aquecimento sob refluxo, foi bem ajustada pelo modelo de Weibull de quatro parâmetros. O processo de maceração dinâmica pôde ser satisfatoriamente otimizado permitindo a obtenção de rendimentos máximos para as três frações bioativas mediante aplicação de um desenho experimental de Box-Behnken. Uma fração purificada em alcalóides oxindólicos foi obtida por fracionamento com resina de troca iônica, de modo a evitar a ocorrência de isomerização. Esta fração purificada apresentou atividade citotóxica dose-dependente significativa sobre as linhagens de células tumorais T24 e RT4. Contudo, o potencial citotóxico não foi alterado pela isomerização induzida pelo aquecimento sob refluxo, indicando um efeito sinérgico dos alcalóides oxindólicos ou uma relação estrutura-atividade bastante complexa.

Palavras chave: *Uncaria tomentosa*, alcalóides oxindólicos, cinética de isomerização, otimização de extração, fração purificada, atividade citotóxica.

ABSTRACT

Isomerization of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. (cat's claw) induced by technological processing and its influence about cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cell lines.

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. is a vine from the Amazonian rainforest, commonly known as “cat’s claw” or “uña-de-gato”. Concerning its barks chemical composition is worth mentioning the presence of polyphenols, quinovic acid glycosides, and oxindole alkaloids to which several biological activities are ascribed, including antitumoral activity. Nevertheless, these alkaloids are easily prone to isomerization, and that can alter the biological activities of cat’s claw preparations. This work aimed to evaluate the oxindole alkaloid isomerization in the extraction and purification steps, as well as assess its effect on the cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cell lines. An HPLC-PDA method was satisfactorily developed and validated for that intend. Five extraction process commonly used in phytomedicine preparation were studied, namely, static maceration, dynamic maceration, turbo-extraction, ultrasound-assisted extraction, and reflux. Both dynamic maceration and ultrasound-assisted extraction avoided the alkaloid isomerization. Isomerization kinetics previously induced by heating under reflux was well fitted by four-parameters Weibull model. Optimal extraction conditions for obtaining the maximal yields of oxindole alkaloids, polyphenols and quinovic acid glycosides by dynamic maceration extraction could be established by applying a Box-Behnken design. The ion-exchange process was developed to obtain an oxindole alkaloid purified fraction avoiding alkaloid isomerization. This fraction showed a significant and dose-dependent cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cell lines. However, both isomerized and non-isomerized alkaloid fractions present an equivalent cytotoxic activity, suggesting a synergic effect among oxindole alkaloids or a rather complex structure-activity relationship.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, oxindole alkaloids, isomerization kinetics, extraction optimization, purified fraction, cytotoxic activity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1a. Alcalóides indólicos e oxindólicos isolados de <i>Uncaria tomentosa</i> .	40
Tabela 1b. Condições cromatográficas empregadas na análise de metabólitos secundárias relevantes em <i>Uncaria tomentosa</i> .	50
Tabela 1c. Produtos disponíveis no mercado derivados de <i>Uncaria tomentosa</i> .	51
Tabela 1.1. HPLC-PDA validation parameters concerning to individual alkaloid contents in dynamic maceration (DM) extract of cat's claw bark.	85
Tabela 1.2. Oxindole alkaloid contents of cat's claw preparations obtained by different extraction processes.	86
Tabela 1.3. Influence of heating under reflux on the oxindole alkaloid profile of dynamic maceration (DM) extract.	87
Tabela 1.4. Coefficients of determination (R^2) and regression variance (S) after fitting of kinetic data through linear and non-linear models.	88
Tabela 1.5. Fitted values of the four-parameters Weibull model for kinetic curves of oxindole alkaloids after heating under reflux of dynamic maceration (DM) extract.	88
Tabela 1.6. Equilibrium constants (K) and isomerization rate coefficients (k_{ij}) for conversion of (1)mitraphylline to (2)isomitraphylline in the dynamic maceration (DM) extract and reference solution.	89
Tabela 2.1. Box-Behnken experimental and theoretical responses for yields of polyphenols (PPH), pentacyclic oxindole alkaloids (POA), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) and quinovic acid glycosides (QAG) after dynamic maceration process.	116
Tabela 2.2. ANOVA of regression model for polyphenols (PPH), pentacyclic oxindole alkaloids (POA), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA), and quinovic acid glycosides (QAG) yields.	117

Tabela 2.3. Regression coefficients calculated for polyphenols (PPH), pentacyclic oxindole alkaloids (POA), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA), and quinovic acid glycosides (QAG) yields. 118

Tabela 2.4. Comparison among experimental yields and predicted yields of polyphenols (PPH), pentacyclic oxindole alkaloids (POA), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA), and quinovic acid glycosides (QAG) determined in the optimized conditions. 119

Tabela 3.1. pH and conductivity values of eluates obtained in different steps of ion-exchange process and sub-fractions of third step eluate. 146

Tabela 3.2. Oxindole alkaloids recoveries in ion-exchange process and alkaloids content in oxindole alkaloid purified fraction (OAPF) and crude extract. 147

Tabela 3.3. Reproducibility of the ion-exchange process calculated from five consecutive processes performed with the same resin. 148

Tabela 3.4. Influence of heating under reflux time on the alkaloids content of oxindole alkaloid purified fraction (OAPF). 149

Tabela 3.5 IC₅₀ values of oxindole alkaloid purified fractions against T24 and RT4 human bladder cell lines. 150

Tabela 4a. Parâmetros de caracterização da solução extrativa das cascas de unha-de-gato. 189

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1a.** Exemplar adulto de *Uncaria tomentosa* (A) mostrando detalhes do caule (B) e dos tomentos (C). 37
- Figura 1b.** Mecanismo de isomerização dos alcalóides oxindólicos. 42
- Figura 1c.** Isomerização dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos com junção D/E em *cis*. 43
- Figura 1.1.** Oxindole alkaloids reported to *Uncaria tomentosa* bark. 81
- Figura 1.2.** HPLC-PDA profile of oxindole alkaloids in DM extract, at 245 nm (a); HPLC-MS/MS profiles monitoring the pseudomolecular ions $[M+H]^+$ at m/z 369.3 for pentacyclic oxindole alkaloid (POA), and m/z 385.4 for tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) (b); Distinctive transitions of POA at m/z 369.3 \rightarrow 337.1 (c), and TOA at m/z 385.4 \rightarrow 353.4 (d); MS/MS spectra of POA (e), and TOA (f). 82
- Figura 1.3.** HPLC-PDA monitoring of alkaloids isomerization after heating under reflux of pentacyclic oxindole alkaloid (POA) (a) and tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) (b) in dynamic maceration (DM) extract; Comparison of interconversion between (1)mitraphylline and (2)isomitraphylline in DM extract (c) and reference solution (d). 83
- Figura 1.4.** The first derivative (dx/dy) from the data fitted by Weibull equation in function of the reaction time of pentacyclic oxindole alkaloid (POA) having *cis* D/E ring junction (a) and POA with *trans* D/E ring junction (b) and tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) (c). 84
- Figura 2.1.** Preliminary extraction of polyphenols (PPH) (a) pentacyclic oxindole alkaloid (POA) (b) tetracyclic oxindole alkaloids (TOA) (c) and quinovic acid glycosides (QAG) (d) from cat's claw bark. 114
- Figura 2.2.** Response Surface plots (3-D) showing the effect of ethanol concentration (X_1 ; %, v/v), extraction time (X_2 ; h), and drug:solvent ratio (X_3 ; w/v) on the yields of

polyphenols (PPH), pentacyclic oxindole alkaloids (POA), tetracyclic oxindole alkaloids (TOA), and quinovic acid glycosides (QAG). 115

Figura 3.1. Isomerization of oxindole alkaloids from cat's claw. 142

Figura 3.2. HPLC-PDA profiles of oxindole alkaloids in different steps of ion-exchange process, at 245 nm showing: the absence of alkaloids in eluates from the first pass fraction, neutralization, and resin washing steps (**A**); presence and maintenance of alkaloid profile in oxindole alkaloid purified fraction (OAPF) from both crude extract and pre-purified extract (PPE) (**B**); the distribution of alkaloids in the sub-fractions of OAPF. 143

Figura 3.3. Comparative alkaloid profile of POA (**A**) and TOA (**B**) in the extract, pre-purified extract (PPE) and oxindole alkaloid purified fraction (OAPF). 144

Figura 3.4. Isomerization of POA (**A**) and TOA (**B**) in oxindole alkaloid purified fraction (OAPF) after heating under reflux monitored by HPLC-PDA. 144

Figura 3.5 Cytotoxic activity of oxindole alkaloid purified fraction (OAPF) against T24 (**A**) and RT4 (**B**) human bladder cell lines after 48h of treatment. 145

Figura 4a. Histograma da distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal após moagem. 184

Figura 4b. Curva cumulativa de retenção e passagem da matéria-prima vegetal após moagem. 184

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN - Acetonitrile

BBD - Box-Behnken Design

CCD - Central Composite Design

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CI₅₀ - Concentração Inibitória 50%

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CLAE-EM - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrômetro de Massas

CLAE-PDA - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Arranjo de Fotodiodos

CLAE-UV - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Detector de Ultravioleta

D - Composite Desirability Index

DM - Dynamic Maceration

DMR - Dinamic Maceration Extract after Heating under Reflux

DMSO - Dimethyl Sulfoxide

EM - Espectrômetro de Massas

HPLC-MS/MS - High Performance Liquid Chromatography - Mass Spectrometry/
Mass Spectrometry

HPLC-PDA - High Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector

IC₅₀ - Inhibitory Concentration 50%

K - Equilibrium Constant

k_{ij} - Isomerization Rate Coefficient

MMF - Morgan-Mercer-Flodin

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OAPF - Oxindole Alkaloid Purified Fraction

OAPF 5' - Oxindole Alkaloid Purified Fraction after a 5 min-heating under reflux

OAPF 15' - Oxindole Alkaloid Purified Fraction after a 15 min-heating under reflux

OAPF 45' - Oxindole Alkaloid Purified Fraction after a 45 min-heating under reflux

PBS - Phosphate Buffered Saline

POA - Pentacyclic Oxindole Alkaloids

PPE - Pre-Purified Extract

PPH - Polyphenols

PVPP - Cross-Linked Polyvinylpyrrolidone

QAG - Quinovic Acid Glycosides

RE - Reflux

RSM - Response Surface Methodology

SM - Static Maceration

TE - Turbo-Extraction

TLC - Thin Layer Chromatography

TOA - Tetracyclic Oxindole Alkaloids

UAE - Ultrasound-Assisted Extraction

UV - Ultravioleta

X_1 - Ethanol Concentration

X_2 - Extraction Time

X_3 - Drug:Solvent Ratio

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA	27
OBJETIVOS	31
REFERENCIAL TEÓRICO	35
Capítulo 1. Avaliação da influência de diferentes processos extrativos sobre a isomerização dos alcalóides oxindólicos de <i>Uncaria tomentosa</i> e determinação da cinética de isomerização induzida por aquecimento sob refluxo	53
Artigo 1. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods	57
Capítulo 2. Otimização da extração de alcalóides oxindólicos, polifenóis e derivados triterpênicos das cascas de <i>Uncaria tomentosa</i> mediante aplicação de desenho experimental de Box-Behnken e Análise de Superfície de Resposta	91
Artigo 2. Optimization of oxindole alkaloids, polyphenols, and quinovic acid glycosides extraction from cat's claw (<i>Uncaria tomentosa</i>) barks by Box-Behnken design	95
Capítulo 3. Influência da isomerização dos alcalóides oxindólicos sobre a atividade citotóxica em linhagem de células tumorais de bexiga T24 e RT4	121
Artigo 3. Influence of cat's claw oxindole alkaloids isomerization on the cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cell lines	125
DISCUSSÃO GERAL	151
CONCLUSÕES	159
PERSPECTIVAS	163
REFERÊNCIAS	167
ANEXOS	179
Anexo 1. Laudo de análise e certificação botânica da matéria-prima	181
Anexo 2. Caracterização da matéria-prima	183
Anexo 3. Obtenção e caracterização da solução extrativa e do extrato seco liofilizado	187
AGRADECIMENTO BOLSA	189

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação de mestrado foi redigida na forma de capítulos e encontra-se organizada da seguinte forma:

- Introdução e Relevância do Tema;
- Objetivos: geral e específicos;
- Referencial teórico;
- Capítulos 1 a 3: artigos a serem submetidos à publicação;
- Discussão Geral;
- Conclusões;
- Referências;
- Anexos;
- Agradecimento Bolsa.

**INTRODUÇÃO E
RELEVÂNCIA DO TEMA**

O desenvolvimento de derivados vegetais, incluindo fitoterápicos, envolve várias etapas de processamento, que podem alterar tanto características tecnológicas, como a composição química de determinada fração bioativa. Em princípio, essas características devem ser identificadas e controladas, visando preservar a constituição química original da matéria-prima vegetal. Contudo, técnicas de preparação oriundas da tradição etnofarmacológica nem sempre obedecem a esse pressuposto e, contrariamente, a essência da atividade biológica de interesse depende das transformações químicas induzidas durante o processamento da matéria-prima.

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae), popularmente conhecida como unha-de-gato ou *cat's claw*, é uma espécie amplamente distribuída na região Amazônica e outras regiões tropicais da América do Sul e Central, onde desempenha um importante papel socioeconômico (VALENTE, 2006). Relatos etnofarmacológicos descrevem o uso de decoctos das cascas no tratamento de úlceras gástricas, artrite reumatóide, infecções bacterianas e virais, alergias, asma e, até mesmo, câncer (REINHARD, 1999; HEITZMAN *et al.*, 2005; VALENTE, 2006). Algumas dessas atividades atribuídas à espécie foram posteriormente comprovadas por estudos científicos, sobretudo as atividades antiviral, anti-inflamatória e antitumoral (AQUINO *et al.*, 1990; MUR *et al.*, 2002; REIS *et al.*, 2008; PILARSKI *et al.*, 2010; GURROLA-DÍAZA *et al.*, 2011).

Unha-de-gato, conjuntamente com outras 70 espécies, compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Entre outras finalidades desta Relação consta a pesquisa de plantas medicinais e fitoterápicos, servindo como subsídio para a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (RENAFITO), propiciando a convergência de esforços para o desenvolvimento e produção de fitoterápicos eficazes e seguros (MACEDO; GEMAL, 2009).

Três frações bioativas estão presentes nas cascas de *U. tomentosa*, a saber, polifenóis, derivados triterpênicos e alcalóides. Aos alcalóides oxindólicos pentacíclicos são atribuídas às atividades biológicas mais relevantes da espécie.

Contudo, as evidências acumuladas nos últimos anos indicam que o perfil de alcalóides de unha-de-gato pode ser modificado por fatores tecnológicos atrelados à produção de extratos secos e processos de purificação, por exemplo. Assim, PAVEI *et al.* (2011) evidenciou a ocorrência de isomerização desses compostos associada à secagem por aspersão de extrato hidroetanólico obtido a partir das cascas de *U. tomentosa*. Além disso, foram relatadas por BORRÉ (2010) alterações no perfil dos alcalóides oxindólicos após processo de purificação por troca iônica. Nesse tocante, passa a ser motivo de questionamento se as propriedades biológicas, farmacológicas e etnofarmacológicas relatadas estão, de fato, atreladas ao perfil de alcalóides originalmente presente no farmacógeno, ou contrariamente, ao perfil de alcalóides advindo de modificações induzidas durante o processamento da matéria-prima vegetal. O presente trabalho se insere exatamente nesse tópico, visando esclarecer as interconversões entre os alcalóides oxindólicos em virtude da ocorrência de isomerização no decorrer do processamento tecnológico das cascas de *U. tomentosa*.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. induzida por fatores tecnológicos nas etapas de extração e fracionamento, visando obter uma fração purificada, bem como sua influência sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4.

Objetivos específicos

- i) Desenvolver e validar método analítico por CLAE-PDA para a quantificação dos alcalóides oxindólicos;
- ii) Avaliar a influência de diferentes processos de extração sobre a isomerização dos alcalóides oxindólicos;
- iii) Determinar a cinética de isomerização dos alcalóides oxindólicos induzida por aquecimento sob refluxo;
- iv) Otimizar a extração de alcalóides oxindólicos, polifenóis e derivados triterpênicos via desenho experimental, de modo a evitar a isomerização;
- v) Obter fração purificada em alcalóides oxindólicos, mediante processo de fracionamento, empregando resina de troca iônica, evitando a ocorrência de isomerização;
- vi) Obter frações purificadas com diferentes perfis de alcalóides oxindólicos mediante isomerização induzida por aquecimento sob refluxo;
- vii) Avaliar *in vitro* a atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4 das frações purificadas e sua relação com os perfis de alcalóides oxindólicos diferenciados pela isomerização.

REFERENCIAL TEÓRICO

Aspectos agronômicos e botânicos

O gênero *Uncaria* (Rubiaceae) é composto por cerca de 35 espécies distribuídas, em sua maioria, na África e Ásia (LAUS, 2004; HEITZMAN *et al.*, 2005), dentre as quais se destaca *Uncaria tomentosa* (Willdenow ex Roemer & Shultes) D.C.. Esta possui uma distribuição geográfica bastante ampla, podendo ser encontrada nas florestas tropicais da América do Sul e Central (Peru, Colômbia, Equador, Guiana, Venezuela, Trinidad-Tobago, Suriname, Guatemala, Costa Rica, Panamá e República Dominicana), ocupando o mesmo habitat de *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel., a principal responsável por equívocos e adulterações botânicas envolvendo a matéria-prima vegetal (QUINTELA; DE UGAZ, 2003; VALENTE, 2006). No Brasil, *U. tomentosa* se distribui nos estados do Amapá, Amazonas, Pará e, principalmente, do Acre (POLLITO, 2004).

Em estado silvestre *U. tomentosa* se apresenta como uma liana de crescimento vigoroso, com espinhos originados de pedúnculos abortivos, utilizados para galgar a copa das árvores de maior porte, sendo por isso popularmente conhecida como unha-de-gato (Figura 1a) (POLLITO; TOMAZELLO, 2006).

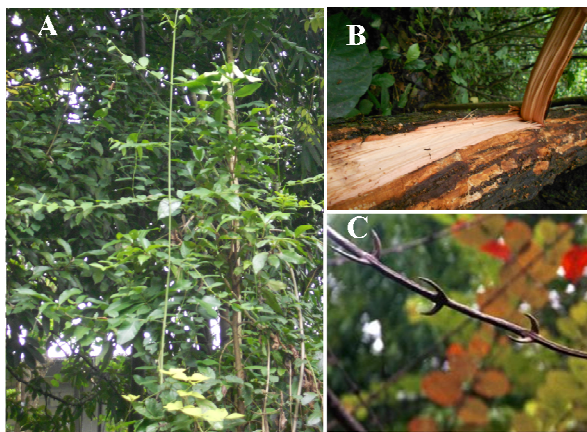


Figura 1a. Exemplar adulto de *Uncaria tomentosa* (A) mostrando detalhes do caule (B) e dos tomentos (C) (Imagens gentilmente cedidas pela Mestranda Evelyn Maribel Condori Peñaloza).

Aspectos fitoquímicos

O gênero *Uncaria* tem sido extensivamente estudado desde o início da década de 90, relatando-se a identificação de mais de 150 compostos, em sua maioria oriundos de *U. tomentosa*, fato que demonstra a importância da espécie em relação a sua filogenia. Esses compostos estão distribuídos majoritariamente em três classes distintas, a saber, polifenóis, derivados triterpênicos e alcalóides (LAUS, 2004; HEITZMAN *et al.*, 2005).

Polifenóis

A fração polifenólica presente em *U. tomentosa* é composta basicamente por ácidos fenólicos, monômeros de flavonóides, bem como por taninos de elevada massa molecular, predominantemente condensados e derivados da epicatequina e catequina, que podem perfazer até 20% da massa seca das cascas do caule (SANDOVAL *et al.*, 2000; GONÇALVES *et al.*, 2004; HEITZMAN *et al.*, 2005).

Alguns polifenóis foram propostos como marcadores químicos de diferenciação entre *U. tomentosa* e *U. guianensis*. Assim, a ausência de rutina em cascas de *U. tomentosa* foi sugerida como parâmetro de diferenciação, visto que esse flavonóide estaria presente apenas em *U. guianensis* (VAN GINKEL, 1996). Contudo, trabalhos posteriores revelaram a presença deste flavonóide em *U. tomentosa* (GRIEBELER, 2006; PAVEI *et al.*, 2010). Alternativamente, VALENTE *et al.* (2009) sugeriram a canferitrina para diferenciar ambas espécies, considerando a sua presença apenas em folhas e cascas de *U. guianensis*.

Derivados triterpênicos

Os derivados triterpênicos predominantes em *U. tomentosa* são heterosídeos derivados do ácido quinóico, ursólico e oleanólico, contendo uma ou duas cadeias de açúcar ligadas ao núcleo triterpênico (CERRI *et al.*, 1988; AQUINO *et al.*, 1990; AQUINO *et al.*, 1991; AQUINO *et al.*, 1997). Outros heterosídeos triterpênicos isolados das cascas de *U. tomentosa* são estritamente minoritários, como os derivados

do ácido 19 α -hidróxi-ursólico e do ácido piroquinóvico (KITAJIMA *et al.*, 2000; KITAJIMA *et al.*, 2003), até então não relatados para outras espécies vegetais.

Alcalóides

Aos alcalóides presentes em *U. tomentosa* é reservada maior atenção e importância, devido à abundância na espécie e, principalmente, às diversas e pronunciadas atividades biológicas atribuídas a estes compostos (REINHARD, 1999; LAUS, 2004; HEITZMAN *et al.*, 2005).

Os primeiros relatos da presença de alcalóides em *U. tomentosa* constam da década de 70, com o isolamento em quantidades significativas de rincofilina e isorrincofilina (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974). Estudos posteriores indicaram resultados discrepantes, gerando indícios de uma variabilidade representativa na composição total de alcalóides (STUPPNER *et al.*, 1992). Pela comparação da distribuição dos alcalóides em diferentes amostras de *U. tomentosa*, obtidas em distintos estágios de maturidade, épocas do ano, locais de coleta e distintas partes do vegetal, pôde-se confirmar a existência de uma elevada variabilidade em termos de teor de alcalóides e distribuição dos mesmos (LAUS *et al.*, 1997).

Os principais alcalóides de *U. tomentosa* consistem em compostos indólicos e seus derivados oxindólicos, que por sua vez são subdivididos em dois grupos: os tetracíclicos e os pentacíclicos (Tabela 1a). Ambos os grupos são formados por diastereoisômeros que, embora apresentem a mesma fórmula molecular, apresentam diferentes propriedades químicas, físicas e biológicas (IUPAC, 1976; LIMA, 1997).

Tabela 1a. Alcalóides indólicos e oxindólicos isolados de *Uncaria tomentosa* (HEMINGWAY; PHILLIPSON, 1974; MONTENEGRO DE MATTA *et al.*, 1976; WAGNER *et al.*, 1985).

Indólicos		Oxindólicos			
Pentacíclicos	Tetracíclicos	Pentacíclicos		Tetracíclicos	
Alcalóide	Alcalóide	Alcalóide	Configuração (Junção D/E)	Alcalóide	Configuração (R')
Acuamigina	Corinanteína	Isomitrafilina	3S, 7S, 15S, 19S, 20R (trans)	Corinoxaina	3S, 7S, 15S, 20R (vinil)
Angustina	Diidrocoringateína e seus N-óxidos	Mitrafilina	3S, 7R, 15S, 19S, 20R (trans)	Isocoringoxaina	3S, 7R, 15S, 20R (vinil)
Angustolina	Hirsuteína	Especiofilina (Uncarina D)	3R, 7S, 15S, 19S, 20S (cis)	Isorrincofilina	3S, 7S, 15S, 20R (etil)
Isoajmalicina	Hirsuteína e seus N-óxidos	Uncarina F	3R, 7R, 15S, 19S, 20S (cis)	Rincofilina	3S, 7R, 15S, 20R (etil)
Tetraidoalstonina		Pteropodina (Uncarina C)	3S, 7R, 15S, 19S, 20S (cis)		
		Isopteropodina (Uncarina E)	3S, 7S, 15S, 19S, 20S (cis)		

Baseados na composição relativa entre alcalóides oxindólicos tetracíclicos e pentacíclicos, LAUS *et al.* (1997) constataram a ocorrência de dois quimiotipos em *U. tomentosa*, botanicamente indistinguíveis entre si. Ambos parecem exercer atividades biológicas diferenciadas, já que apenas o tipo oxindólico pentacíclico demonstrou atividade imunológica significativa, atuando de forma eficaz como imunostimulante,

enquanto o tipo oxindólico tetracíclico mostrou ser ineficaz (KEPLINGER *et al.*, 1999).

Coube a LAUS e KEPLINGER (1994) o primeiro relato da isomerização dos alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* onde foi avaliado o comportamento da pteropodina e seus isômeros em solução metanólica, em função do tempo de refluxo. Estudos posteriores permitiram estabelecer a cinética e o mecanismo de isomerização dos alcalóides oxindólicos penta- e tetracíclicos, evidenciando uma cinética dependente do tipo de solvente, pH e temperatura (LAUS *et al.*, 1996; LAUS, 1998).

O mecanismo de isomerização proposto para os alcalóides oxindólicos envolve reações do tipo retro-Manich, com a formação de um *zwitterion* intermediário (Figura 1b). Este intermediário carregado pode ser estabilizado por solventes de elevada polaridade, o que favorece a isomerização ao diminuir a energia de ativação. Assim, a velocidade de isomerização é menor em solventes orgânicos se comparada à água, demonstrando uma boa correlação com a escala de polaridade de Dimroth-Reichardt. Modificações no pH revelaram que a velocidade de isomerização é menor em meio ácido do que em meio básico. A protonação de N-4 em meio ácido dificulta a formação do *zwitterion* intermediário ao formar uma ligação de hidrogênio intramolecular, envolvendo N-4 e a carbonila lactâmica. Em virtude disso, o equilíbrio e a cinética da reação em pH ácido são deslocados no sentido da formação de mitrafilina, pteropodina e especiofilina, que apresentam N-4 e carbonila da lactâmica em posição *syn*, em detrimento das demais formas isoméricas. Já a temperatura parece exercer um efeito discreto sobre a velocidade de isomerização, sendo que quanto maior a temperatura maior a velocidade (LAUS *et al.*, 1996; LAUS, 1998; KEPLINGER *et al.*, 1999; REINHARD, 1999).

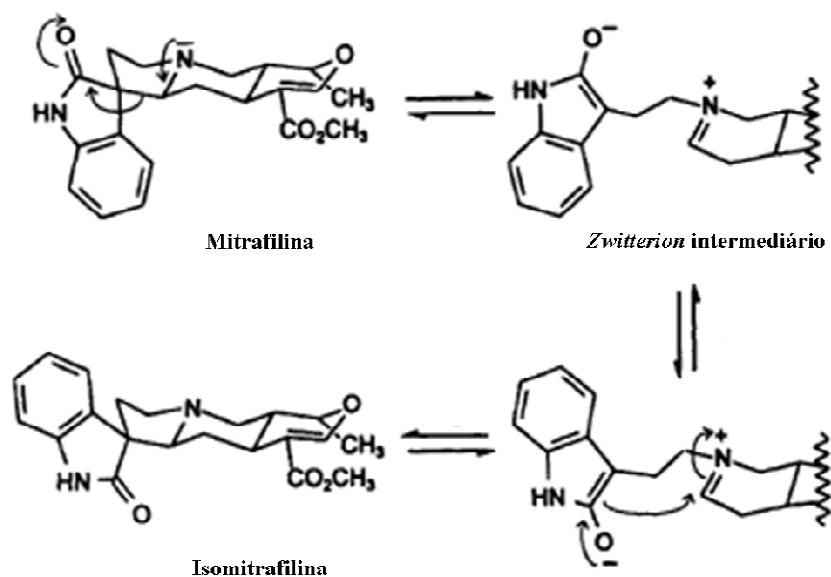


Figura 1b. Mecanismo de isomerização dos alcalóides oxindólicos (Adaptado de LAUS *et al.*, 1996).

No caso dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos, existem duas possibilidades de isomerização determinadas basicamente pela conformação da junção dos anéis D/E. A conformação em *trans* determina a ocorrência de interconversão entre mitrafilina e isomitrafilina (Figura 1b). Já para a conformação em *cis* existe a possibilidade de interconvesão entre quatro formas isoméricas distintas, a saber, pteropodina, isopteropodina, especiofilina e uncarina F (Figura 1c) (LAUS *et al.*, 1996). Com relação aos alcalóides oxindólicos tetracíclicos, a isomerização é definida pelo grupamento substituinte em C-19, onde a presença da etila determina a interconversão entre rincofilina e isorrincofilina. Já a presença de vinila em C-19 define a interconversão entre corinoxeina e isocorinoxeina (LAUS, 1998).

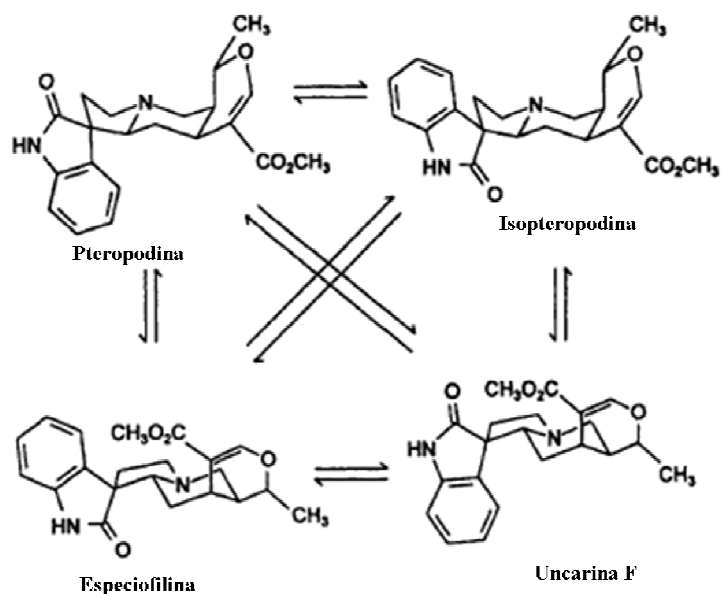


Figura 1c. Isomerização dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos com junção D/E em *cis* (Adaptado de LAUS *et al.*, 1996).

A grande variabilidade no perfil de alcalóides oxindólicos relatados para *U. tomentosa* pode estar relacionada não só com fatores inerentes à procedência das amostras analisadas, mas também com a isomerização desses induzida pelo processamento tecnológico (LAUS *et al.*, 1997; REINHARD, 1999), quer seja de extração da matéria-prima vegetal ou de purificação.

Reforçando esta hipótese, foi demonstrada a isomerização dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos induzida pela secagem por aspersão, tendo sido constatada as interconversões entre mitrafilina-isomitrafilina e pteropodina-isopteropodina na ordem de 14,9% e 12,2%, respectivamente (PAVEI *et al.*, 2011). De forma semelhante, BORRÉ (2010) constatou a possibilidade de isomerização durante processo de fracionamento por troca iônica, que foi associado ao caráter fortemente básico dos líquidos de eluição empregados.

Aspectos etnofarmacológicos e farmacológicos

Os relatos do uso pioneiro de decoctos e macerados das cascas e raízes de *U. tomentosa* estão associados à medicina indígena Asháninka, da região amazônica peruana, ainda que em período incerto. Especialmente nessa região e na região norte do Brasil, preparados da espécie são administrados em casos de úlceras gástricas, artrite reumatóide, infecções bacterianas e virais, alergias, asma e, até mesmo, câncer (REINHARD, 1999; HEITZMAN *et al.*, 2005; VALENTE, 2006).

Diversos estudos foram conduzidos a fim de investigar as atividades relatadas para o uso desta espécie na medicina popular, maioria deles focados na fração alcaloídica de *U. tomentosa*. Uma breve sinopse das atividades mais relevantes é apresentada a seguir. Nesta é destacando a existência, em muitos casos, de lacunas nas informações tecnológicas e químicas, que impedem identificar tanto as substâncias responsáveis pelas atividades farmacológicas específicas, quanto o grau de isomerização dos alcalóides nas preparações avaliadas.

Atividade anti-inflamatória

Experimentos *in vitro* relacionam a ação anti-inflamatória à prevenção da produção dos fatores transcripcionais NF- κ B e TNF- α , inibindo assim a transcrição de genes associados à inflamação e promovendo morte celular pela via apoptótica (SANDOVAL-CHACON *et al.*, 1998; SANDOVAL *et al.*, 2000; AKESSON *et al.*, 2003a; ALLEN-HALL *et al.*, 2007; ALLEN-HALL *et al.*, 2010). Efeitos anti-inflamatórios semelhantes foram constatados, após administração de extratos hidroetanólicos e decoctos, pela redução de edema em pata de rato (AQUINO *et al.*, 1991; AGUILAR *et al.*, 2002) e redução do dano celular em brônquios de ratos após inflamação pulmonar induzida por O₃ (CISNEROS *et al.*, 2005). Em ensaio clínico duplo-cego, randomizado, controlado por placebo, 20 mg de extrato enriquecido em alcalóides oxindólicos pentacíclicos, administrados por 52 semanas reduziram os sintomas associados à artrite reumatóide (MUR *et al.*, 2002; SETTY; SIGAL, 2005).

Os derivados do ácido quinóico e os alcalóides oxindólicos pentacíclicos, ambos presentes nos extratos brutos, apresentaram atividade anti-inflamatória atribuída a um efeito sinérgico entre estes grupos químicos (RIZZI *et al.*, 1993; HEITZMAN *et al.*, 2005). Contudo, o efeito dos extratos de *U. tomentosa* sobre os processos inflamatórios foi atribuído às propriedades antioxidantes dos polifenóis, sem a participação da fração de alcalóides oxindólicos (SANDOVAL *et al.*, 2000; GONÇALVEZ *et al.*, 2005; PILARSKI *et al.*, 2006; AMARAL *et al.*, 2009; KRISHNAIAH *et al.*, 2011).

Atividade imunoestimulante

A atividade imunoestimulante da espécie foi primeiramente evidenciada *in vitro* e *in vivo* pelo aumento da fagocitose em granulócitos, induzida pelos alcalóides oxindólicos pentacíclicos (WAGNER *et al.*, 1985). Posteriormente, foi observada a estimulação da secreção de citocinas (interleucina-1 e interleucina-6) em macrófagos alveolares, de forma dose-dependente, após incubação com extrato aquoso (LEMAIRE *et al.*, 1999). Um extrato ácido de *U. tomentosa*, rico em alcalóides, foi administrado por cinco meses em pacientes portadores do HIV, causando um acréscimo representativo nos níveis de linfócitos (KEPLINGER *et al.*, 1999). Da mesma forma, extratos e frações alcaloídicas isoladas de *U. tomentosa* aumentaram os fatores de liberação de linfócitos, sugerindo o potencial emprego dessas frações na terapia complementar em pacientes com alterações imunológicas graves (WAGNER *et al.*, 1985; WRUM *et al.*, 1998; WINKLER *et al.*, 2004). O extrato hidroetanólico das cascas e uma fração enriquecida em alcalóides oxindólicos pentacíclicos de *U. tomentosa* demonstraram atividade antiproliferativa contra o vírus da dengue tipo 2 em monócitos humanos, sendo a fração enriquecida em alcalóides a mais eficaz (REIS *et al.*, 2008). Além disso, este extrato foi capaz de aumentar a polpa branca do baço e timo, além de estimular a produção *in vivo* de linfócitos T e B. Adicionalmente, foi observado um perfil de citocinas compatível com uma resposta Th2 mediada, não sendo verificado efeito imunotóxico nos animais tratados (DOMINGUES *et al.*, 2011b).

Atividade antitumoral e antiproliferativa

O extrato de *U. tomentosa* apresentou uma atividade antitumoral apenas moderada em linhagem de células humanas de neuroblastoma (N-2A), quando comparado com outros 374 extratos vegetais de várias famílias e gêneros (MAZZIO; SOLIMAN, 2009). Contrariamente, diversos extratos, frações enriquecidas e alcalóides oxindólicos pentacíclicos isolados de *U. tomentosa* apresentam elevado potencial antitumoral, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, caracterizado por uma pronunciada atividade antiproliferativa, muitas vezes associada à atividade citotóxica. Ainda que as informações químicas e tecnológicas sejam frequentemente incompletas, cabe destacar a abrangência dos modelos avaliados que incluem: linhagens de células leucêmicas humanas (HL-60 e U-937) (STUPPNER *et al.*, 1993); linhagens de células leucêmicas humanas (K-562 e HL-60) e linhagem celular humana de linfoma (Raji) (SHENG *et al.*, 1998); linhagens celulares humanas de melanoma (SK-MEL), carcinoma epidermóide (KB), carcinoma ductal (BT-549) e carcinoma de ovário (SK-OV-3) (MUHAMMAD *et al.*, 2001); linhagem celular humana de carcinoma de mama (MCF7) (RIVA *et al.*, 2001); linhagem de células leucêmicas T linfoblásticas (CCRF-CEM-C7H2) (BACHER *et al.*, 2006); linhagens celulares humanas de osteossarcoma (SAOS), carcinoma de mama (MCF7) e carcinoma cervical (HeLa) (DE MARINO *et al.*, 2006); linhagens celulares humanas de neuroblastoma (SKN-BE(2)) e glioma (GANG) (GARCÍA-PRADO *et al.*, 2007); linhagem de células leucêmicas humanas (HL-60) (PILARSKI *et al.*, 2007; CHENG *et al.*, 2007); linhagem celular humana de carcinoma medular de tireóide (MTC-SK) (RINNER *et al.*, 2009); linhagens celulares humanas de sarcoma de Ewing's (MHH-ES-1) e carcinoma de mama (MT-3) (GIMÉNEZ *et al.*, 2010); linhagens celulares de gliomas de rato (C6) e humanos (U138-MG) (PAVEI, 2010); linhagens celulares humanas de adenocarcinoma de cólon (HT-29), adenocarcinoma colorretal (SW707), carcinoma cervical (KB), carcinoma de mama (MCF7), carcinoma de pulmão de células não-pequenas (A549), cistoadenocarcinoma ovariano (OAW-42), além de linhagens celulares de ratos, a saber, carcinoma pulmonar de Lewis (LLC LL/2) e melanoma (B16) (PILARSKI *et al.*, 2010); modelo de carcinosarcoma Walker-256 (DREIFUSS *et al.*, 2010);

linhagens celulares humanas de carcinoma colorretal (HCT116); carcinoma colorretal (SW480) e carcinoma cervical (HeLa) (GURROLA-DÍAZA *et al.*, 2011).

O mecanismo pelo qual ocorre a morte das células tumorais parece estar relacionado com a via apoptótica, induzida pela ativação de caspases (SHENG *et al.*, 1998; BACHER *et al.*, 2005; DE MARINO *et al.*, 2006; CHENG *et al.*, 2007; RINNER *et al.*, 2009). Contudo, pode existir um mecanismo alternativo de indução de apoptose ligado à capacidade das preparações de *U. tomentosa* em inibir a ativação do fator de transcrição NF- κ B, que depende do tipo celular e seu estado de ativação (ALLEN-HALL *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que o extrato e uma fração enriquecida em alcalóides oxindólicos pentacíclicos são capazes de inibir a via de sinalização Wnt, responsável pela ativação de genes que regulam a proliferação e diferenciação celular, sendo esta superativada em determinadas células tumorais, como no caso do carcinoma colorretal (SW480) (GURROLA-DÍAZA *et al.*, 2011).

Além da capacidade antitumoral pronunciada atribuída à espécie, o extrato hidroetanólico a 70% (v/v) das cascas, obtido por turbólise, foi capaz de estimular em modelo animal a proliferação de células progenitoras mielóides, demonstrando um potencial benéfico no tratamento da neutropenia induzida por quimioterapia (FARIAS *et al.*, 2011). No entanto, quando o mesmo extrato foi administrado em pacientes com câncer colorretal, na dose de 300 mg/dia, não houve redução dos efeitos adversos decorrentes da quimioterapia com 5-fluorouracil/leucovorina associada a oxaliplatina (FARIAS *et al.*, 2012).

Outras atividades relevantes

O extrato hidroetanólico das cascas de *U. tomentosa* foi capaz de prevenir a progressão do diabetes tipo 1 (imunomediada) em modelo animal atuando em diferentes vias de sinalização, sendo o efeito relacionado à capacidade imunomoduladora do extrato (DOMINGUES *et al.*, 2011a). Complementarmente, o decocto das cascas foi capaz de inibir *in vitro* a α -amilase e a α -glicosidase, enzimas

responsáveis pelo rápido aumento da glicose circulante determinado pela hidrólise de amido e maior absorção de glicose em nível intestinal. Os autores sugerem o potencial uso desse decocto como agente inibidor da digestão de carboidratos, indicado na redução da hiperglicemia pós-prandial em pacientes acometidos de diabetes tipo 2 (RANNILA *et al.*, 2010).

Aspectos analíticos

O estudo pioneiro na caracterização analítica de metabólitos oriundos de espécies de *Uncaria* foi desenvolvido por PHILIPSON e HEMINGWAY (1975), que analisaram a composição de alcalóides em 39 amostras empregando diferentes técnicas, visando o estabelecimento de uma sistematização química para o gênero (PHILIPSON; HEMINGWAY, 1975).

A análise por CCD dos constituintes da fração triterpênica presente em *U. tomentosa* foi realizada concomitantemente aos estudos de isolamento dos mesmos (AQUINO *et al.*, 1991). O perfil por CCD de alcalóides e flavonóides é relatado na comparação da constituição química das cascas de *U. tomentosa* e *U. guianensis* (VAN GINKEL, 1996). Complementarmente, foi proposto método de análise por CCD dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos em cascas e folhas de *U. tomentosa* e *U. guianensis*, sendo avaliados os seguintes parâmetros: largura da banda, volume da aplicação da amostra, distância de desenvolvimento, tipos de reveladores, concentração da amostra e diferentes sistemas de eluição (VALENTE *et al.*, 2006).

No que tange às técnicas quantitativas (Tabela 1b), STUPPNER *et al.* (1992a) relataram de modo pioneiro a separação por CLAE-UV dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos. Contudo a temperatura de análise (15 °C) compromete a reprodutibilidade do método. Alternativamente, os mesmos autores propuseram um método por eletroforese capilar, que propiciou adequada resolução e quantificação dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos (STUPPNER *et al.*, 1992b). Posteriormente, LAUS e KEPLINGER (1994) desenvolveram método via CLAE-UV isocrático para a

quantificação dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos, contudo, a complexidade da fase móvel e novamente a temperatura de análise (12 °C) dificultavam a reprodutibilidade do método. Posteriormente, GANZERA *et al.* (2001); GRIEBELER (2006); PAVEI *et al.* (2011) propuseram técnicas alternativas por CLAE-UV, aliando simplicidade e maior eficiência de separação, enquanto que MONTORO *et al.* (2004) relataram a caracterização e identificação dos principais alcalóides mediante CLAE-EM. Em todos esses casos, contudo se observam restrições enquanto à resolução dos picos correspondes a isomitrafalina e pteropodina, que tendem a co-eluir nos diferentes sistemas propostos e que apresentam espectros UV sobreponíveis. Neste sentido, BERTOL *et al.* (2012) propuseram uma técnica por CLAE-PDA que permite a adequada resolução entre isomitrafalina e pteropodina, assim como a quantificação concomitante dos alcalóides oxindólicos tetracíclicos rincofilina e isorrincofilina. Contudo, a temperatura de análise de 15 °C ainda parece ser um empecilho para a reprodutibilidade da técnica.

Diferentemente dos alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa*, há poucos métodos analíticos para a quantificação de polifenóis e derivados triterpênicos da espécie. Nesse contexto, cabe destacar o desenvolvimento e validação de métodos por CLAE-PDA destinados à quantificação desses em extratos hidroetanólicos das cascas de unha-de-gato (PAVEI *et al.*, 2010; PAVEI *et al.*, 2012). Pela análise dos polifenóis, foi possível observar a presença de cinco picos majoritários, dos quais três foram identificados como ácido clorogênico, ácido caféico e rutina, mediante comparação com substâncias de referência, sendo suas concentrações de 0,38; 0,02 e 0,40 g por 100 g de extrato liofilizado, respectivamente (PAVEI *et al.*, 2010). Por sua vez, a análise por UPLC/Q-TOF-MS da fração de triterpenos revelou a presença de sete picos com comportamento espectral característico de derivados do ácido quinóico (mz 487 → 469), em sua maioria monoglicosilados e diglicosilados. A concentração total de derivados triterpênicos expressa em α -hederina foi de 0,31 g por 100 g de matéria-prima vegetal (PAVEI *et al.*, 2012).

Tabela 1b. Condições cromatográficas empregadas na análise de metabólitos secundários relevantes em *Uncaria tomentosa* (Adaptado de PAVEI, 2010).

Parte vegetal (Grupo químico)	Coluna (Temperatura)	Fase Móvel	Detecção	Referência
Raízes (alcalóides ^a)	Lichrospher CH-18 (15 °C)	CH ₃ OH:CH ₃ CN: tampão fosfato pH 6,6 (20:20:60 v/v); gradiente	UV (245 nm)	STTUPNER <i>et al.</i> (1992b)
Cascas de raízes e tronco (alcalóides ^a)	LichroCART RP-18 (12 °C)	CH ₃ CN:éter: tampão fosfato pH 7,7 (34:1:65 v/v); isocrático	UV (254 nm)	LAUS; KEPLINGER (1994)
Cascas do caule (alcalóides ^{a,b})	Luna RP-18 (23 °C)	Tampão fosfato pH 7,0:CH ₃ CN (65:35 v/v); gradiente	UV (245 nm)	GANZERA (2001)
Cascas e folhas (alcalóides ^a e derivados triterpênicos)	Lichrsorb RP-18 e Symmetry RP-18 (23 °C)	CH ₃ OH:CH ₃ CN: tampão acetato pH5.0; gradiente	EM	MONTORO <i>et al.</i> (2004)
Cascas do caule e extrato seco (alcalóides ^a)	Lichrospher RP-18 (28 °C)	Tampão fosfato pH 7,0:CH ₃ CN (60:40 v/v); isocrático	UV (245 nm)	GRIEBELER (2006)
Cascas do caule e raízes (polifenóis)	Gemini RP-18 (23 °C)	TFA 0,1% (v/v): (metanol:TFA; 99,9:0,1; v/v); gradiente	UV (325 nm)	PAVEI <i>et al.</i> (2010)
Cascas do caule e extratos secos (alcalóides ^a)	Gemini RP-18 (35 °C)	Tampão fosfato pH 7,0:(CH ₃ CN:tampão fosfato pH 7; 95:5; v/v); gradiente	UV (245 nm)	PAVEI <i>et al.</i> (2011)
Cascas do caule (alcalóides ^{a,b})	Zorbax XDB (15 °C)	Tampão acetato de amônio 35 mM (pH 6,9): CH ₃ CN; gradiente	UV (245 nm)	BERTOL <i>et al.</i> (2012)
Cascas do caule e fração enriquecida (derivados triterpênicos)	Sinergy Fusion RP- 18 (35 °C)	Ácido fórmico 0,1%:(CH ₃ CN:ácido fórmico 0,1%; 90:10, v/v); gradiente	UV (205 nm)	PAVEI <i>et al.</i> (2012)

^a oxindólicos pentacíclicos; ^b oxindólicos tetracíclicos

Aspectos tecnológicos

Embora *U. tomentosa* seja extensivamente estudada quanto aos aspectos químicos e biológicos, contraditoriamente se constata uma evidente escassez de trabalhos abordando a obtenção de derivados tecnicamente elaborados a partir da matéria-prima vegetal. Os produtos disponíveis no mercado são predominantemente

extratos padronizados que diferem quanto ao modo de preparação e líquido extrator (Tabela 1c).

Tabela 1c. Produtos disponíveis no mercado derivados de *Uncaria tomentosa* (Adapatado de VALENTE, 2006).

Nome	Descrição	Fabricante
Krallendorn [®]	Extrato padronizado em alcalóides oxindólicos pentacíclicos obtido por tratamento das cascas com HCl seguido de extração (contém 1,3-1,75% de alcalóides totais sendo 97% destes pentacíclicos)	Immodal Phamaka GmbH (Volders, Áustria)
Savantaro [®]	Extrato etanólico padronizado das cascas (contém mais de 1,3% de alcalóides oxindólicos pentacíclicos)	Immodal Phamaka GmbH (Volders, Áustria)
C-MED-100 [®]	Extrato aquoso liofilizado obtido por aquecimento das cascas a 90-100 °C por 24 h e livre de substâncias de alta massa molecular (MM>1000) (contém aproximadamente 0,05% de alcalóides e mais de 8% de ésteres carboxi-alquílicos)	CampMed Inc. (Nova Iorque, EUA)
Vilcacora [™]	Extrato aquoso das cascas seco por aspersão	Laboratório Induquímica SA (Lima, Peru)

Provavelmene, o extrato padronizado mais empregado em modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, é comercializado como C-MED 100[®] (PERO, 2000). O extrato, obtido por decocção, é dializado por membranas de celulose a fim de remover as substâncias com massa molecular acima de 10 kDa. O permeado, com baixo teor de alcalóides, flavonóides e taninos, é seco por nebulização utilizando maltodextrina como adjuvante, e padronizado em 8% de ésteres alquilcarboxílicos. A este produto são atribuídas atividades imunoestimulante, anti-inflamatória, reparadora de DNA e antitumoral (SHENG *et al.*, 1998; SHENG *et al.*, 2000; PERO, 2002; AKESSON *et al.*, 2003a; AKESSON *et al.*, 2003b; MAMMONE *et al.*, 2006). O ácido quínico parece ser um dos componentes ativos presentes no C-MED 100[®] (AKESSON *et al.*, 2005).

No Brasil, o laboratório Herbarium protocolou junto à ANVISA o registro do Imunomax[®], fitoterápico na forma de creme-gel à base de *U. tomentosa* e indicado para o tratamento do *Herpes simplex*. Este produto contém extrato hidroetanólico a

40% (v/v) das cascas e a sua atividade é relacionada às ações imunomodulatória e anti-inflamatória da espécie (TRENTINI; TRENTINI, 2006).

A obtenção de frações biologicamente ativas e enriquecidas em alcalóides oxindólicos pentacíclicos, a partir de raízes de *U. tomentosa* e empregando-se processos de extração ácido-base e fluído supercrítico, foi pioneiramente realizada por KEPLINGER (1989) e depositada na forma de patente, sendo comprovada a atividade imunoestimulante das frações. Já CASTILLO *et al.* (2005) obtiveram fração de derivados fenólicos altamente solúveis em água a partir das cascas de *U. tomentosa*, mediante fracionamento por adsorção em fase sólida e CLAE em coluna preparativa. Esta fração, denominada PTI-777, demonstrou importantes efeitos centrais, sendo capaz de dissociar *in vitro* as fibrilas β -amilóides, envolvidas em uma série de processos degenerativos, incluindo o mal de Alzheimer.

Frações enriquecidas em alcalóides oxindólicos pentacíclicos, polifenóis e derivados triterpênicos foram obtidas com rendimentos satisfatórios a partir do extrato hidroetanólico das cascas, mediante fracionamento em fase polimérica sólida, empregando resina hidrofóbica macroporosa (Diaion[®] HP-20) e soluções de metanol:água em gradiente de polaridade decrescente. As frações polifenólica e alcaloídica apresentaram atividade antiproliferativa seletiva sobre linhagens de gliomas de ratos (C6) e humanos (U138-MG), sem exercerem dano celular em culturas organotípicas (PAVEI, 2010). Alternativamente, frações enriquecidas em alcalóides oxindólicos pentacíclicos e derivados triterpênicos foram obtidas mediante processo sequencial de separação empregando resina aniônica (Dowex Marathon[®] MSC) e resina macroporosa adsorvente (Diaion[®] HP-20) (BORRÉ, 2010).

Capítulo 1. Avaliação da influência de diferentes processos extrativos sobre a isomerização dos alcalóides oxindólicos de *Uncaria tomentosa* e determinação da cinética de isomerização induzida por aquecimento sob refluxo

Introdução

Diversos processos extrativos são aplicados às cascas de *U. tomentosa*. Neste sentido os relatos etnofarmacológicos apontam para o uso de decoctos e infusos com proporções variáveis de planta e tempos de extração que variam de 45 a 60 minutos (REINHARD, 1999; KEPLINGER *et al.*, 1999).

Sabidamente, os alcalóides oxindólicos são propensos a isomerização, que é dependente da polaridade do solvente e pH do meio, além de ser favorecida pelo aquecimento (LAUS *et al.*, 1996; LAUS, 1998). Contudo, não são conhecidos estudos que vinculem sua isomerização a processos extrativos usuais ou que mimetizem a técnica de preparação segundo a tradição etnofarmacológica.

Considerando, portanto, a elevada suscetibilidade dos alcalóides oxindólicos à isomerização e a abordagem incipiente disponível na literatura sobre este tópico, este capítulo foi destinado à avaliação da isomerização em cinco processos extrativos comumente empregados, a saber, maceração estática, maceração dinâmica, ultrassom, tubo-extração e refluxo. De forma complementar, foi avaliada a cinética de isomerização induzida por aquecimento sob refluxo, que pôde ser caracterizada e adequadamente ajustada a modelos não lineares como MMF (Morgan-Mercer-Flodin) e Weibull de quatro parâmetros.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Phytochemistry*.

Artigo 1. Cat's claw oxindole alkaloid isomerization induced by common extraction methods

A ser submetido ao periódico Phytochemistry

Abstract

Uncaria tomentosa (Willd.) DC. (Rubiaceae) is a climbing vine widely found in South American rainforest. The tetracyclic (TOA) and pentacyclic (POA) oxindole alkaloids are the foremost bioactive compounds isolated from its barks. Nonetheless, its main TOA and POA alkaloids, namely, rhyncophylline and isorhyncophylline, as well mitraphylline, isomitraphylline, speciophylline, uncarine F, pteropodine and isopteropodine, respectively, are prone to isomerization. Thus, changes on biological activities assigned to alkaloids can be expected after isomerization. In this work, the isomerization of cat's claw alkaloids in five commonly used extraction processes was evaluated, specifically, static maceration (SM), dynamic maceration (DM), turbo-extraction (TE), ultrasound-assisted extraction (UAE), and reflux (RE) by HPLC-PDA. Likely, heat associated to RE (85 °C) was accountable to the highest alkaloid isomerization ratio, followed by TE (70 °C). Also long-term extraction can elicit significant isomerization, as observed in SM. On the other hand, no significant isomerization was noticed in DM and UAE, which oxindole alkaloid profiles were comparable. Regarding mitraphylline and isomitraphylline interconversion after heating under reflux of DM, the isomerization rate coefficients (k_{12} and k_{21}) were respectively 0.0514 and 0.0312 %/min. These values differed from those achieved using aqueous solutions of both isolated alkaloids, namely, 0.0463 and 0.0232 %/min. Similarly, equilibrium constants (K) of both isolated mitraphylline and isomitraphylline were unlike after and before refluxing, specifically, 0.348 and 1.152, and 0.486 and 2.086. The isomerization curves of mitraphylline, isomitraphylline, rhyncophylline, isorhyncophylline, speciophylline, uncarine F, pteropodine, and isopteropodine could be fitted satisfactorily through the four-parameters Weibull model ($R^2 > 0.999$). In summary, the results showed a noteworthy divergence between kinetic data from refluxed extract and isolated compounds. Most likely, it can be related to the presence of other constituents of extract, like polyphenols and quinovic glycosides.

Keywords: *Uncaria tomentosa*, Rubiaceae, cat's claw, extraction process, oxindole alkaloids, isomerization kinetic.

Capítulo 2. Otimização da extração de alcalóides oxindólicos, polifenóis e derivados triterpênicos das cascas de *Uncaria tomentosa* mediante aplicação de desenho experimental de Box-Behnken e Análise de superfície de Resposta

Introdução

Três frações bioativas majoritárias estão presentes nas cascas de *U. tomentosa*, a saber, alcalóides oxindólicos, polifenóis e triterpenos derivados, principalmente, do ácido quinóico (HEITZMAN *et al.*, 2005). Para a extração das cascas são empregadas diversas técnicas como maceração, decocção, turbo-extração entre outras, utilizando-se diferentes solventes e proporções droga:solvente. No entanto, até o momento não se tem notícia acerca de estudos que visem racionalizar e otimizar a extração dos diferentes componentes das cascas de *U. tomentosa*, minimizando a isomerização dos alcalóides oxindólicos.

Face ao exposto, no presente capítulo é descrita a otimização da extração das frações bioativas presentes nas cascas de *U. tomentosa*, empregando o processo de maceração dinâmica, delineado segundo um experimento do tipo Box-Behnken de três fatores, em três níveis.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Food Chemistry*.

Artigo 2. Optimization of oxindole alkaloids, polyphenols, and quinovic acid glycosides extraction from cat's claw (*Uncaria tomentosa*) barks by Box-Behnken design

A ser submetido ao periódico Food Chemistry

Abstract

This work focused the optimization of the extraction by dynamic maceration of foremost bioactive compounds recognized to cat's claw (*Uncaria tomentosa*) barks, namely, polyphenols (PPH), pentacyclic (POA) and tetracyclic oxindole alkaloids (TOA), and quinovic acid glycosides (QAG). Initially, the extraction efficiency of hydroethanolic and hydromethanolic solutions ranging from 10 to 90% was compared. Similar yields were achieved for both solvents, being the hydroethanolic solutions selected for extraction optimization owing to your lesser toxicity. Aiming the search of optimal extraction conditions, a three level Box-Behnken design was applied, using ethanol concentration (X_1), extraction time (X_2) and drug:solvent ratio (X_3) as independent variables. After regression analysis all data fitting revealed $R^2 > 0.929$, and no lack-of-fit could be assessed in anyone ($p > 0.05$). X_1 showed positive linear effects on all PPH, POA, TOA, QAG extraction ($p < 0.05$). X_3 had negative linear effects only on PPH and POA indicating solvent saturation probably. No linear or quadratic effects associated to X_2 were significant, owing a favorable mass transfer facilitated by extraction process. Nonetheless, the curvatures in response surfaces were determined mainly by quadratic effect of X_1 . The maximum extraction yield regarding PPH, POA, TOA, QAG, and all compounds together were achieved with 50, 63, 62, 69, and 61% (v/v) of ethanol, respectively, linked to a drug:solvent ratio of 0.5:10 (w/v) and a extraction time of 2 h. In addition, the mathematical models developed showed a satisfactory predictive capability (82 – 107%).

Keywords: Cat's claw bark; extraction optimization; Box-Behnken design; polyphenols; oxindole alkaloids; quinovic acid glycosides.

Capítulo 3. Influência da isomerização dos alcalóides oxindólicos sobre a atividade citotóxica em linhagem de células tumorais de bexiga T24 e RT4

Introdução

A obtenção de frações purificadas a partir de extratos brutos de origem vegetal permite correlacionar constituição química e atividade biológica. Os alcalóides oxindólicos pentacíclicos de *U. tomentosa* apresentam atividade citotóxica significativa quando avaliados isoladamente nas mais variadas linhagens de células tumorais (MUHAMMAD *et al.*, 2001; BACHER *et al.*, 2006). No entanto, o potencial citotóxico dos alcalóides é diferenciado e parece ser dependente da linhagem celular avaliada. Além disso, quando extratos da espécie são avaliados quanto ao seu potencial citotóxico frente a linhagens de células tumorais, a atividade é relacionada principalmente ao conteúdo de alcalóides oxindólicos das preparações (PILARSKI *et al.*, 2010), relegando os demais constituintes do extrato a um plano secundário. Aliado a isso, considerando a elevada suscetibilidade dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos à isomerização (LAUS *et al.*, 1996), o controle estrito deste fenômeno deve ser considerado em processos de extração e fracionamento. Até o momento, não se tem conhecimento de estudos que avaliem a influência da isomerização sobre atividades biológicas atribuídas aos alcalóides de *U. tomentosa*.

Tendo em vista os fatos apresentados, este capítulo é destinado a avaliar a influência da isomerização sobre a atividade citotóxica em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4.

Este capítulo é apresentado na forma de artigo a ser submetido para publicação no periódico *Planta Medica*.

Artigo 3. Influence of cat's claw oxindole alkaloids isomerization on the cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cell lines

A ser submetido ao periódico Planta Medica

Abstract

The cytotoxic and cell antiproliferative activities have been ascribed to pentacyclic oxindole alkaloids from the barks of *Uncaria tomentosa*, a native vine from Amazonian rainforest. Former studies suggest that both activities can depend of genuine alkaloid profile present in raw material or their isomerized derivatives. This work addresses this standpoint, using for that purpose T24 and RT4 human bladder cell lines. Barks samples were extracted by dynamic maceration, pre-purified with cross-linked polyvinylpyrrolidone and properly fractioned by ion-exchange process to obtain an oxindole alkaloid purified fraction. The alkaloids isomerization at the purified fraction was induced by heating under reflux (85 °C), and the cytotoxicity of fractions after 5 min, 15 min, and 45 min of heating under reflux, previously assayed by HPLC-PDA, was evaluated at once. Non-isomerized purified fraction showed a significant and dose-dependent activity against both T24 and RT4 cell lines (IC₅₀: 164.13 and 137.23 µg/mL, respectively). Nonetheless, both results were equivalent to those observed after isomerization of purified fraction ($p > 0.05$). These results indicate a synergic effect of oxindole alkaloids or a complex structure-activity relationship.

Key words

Uncaria tomentosa, oxindole alkaloids, isomerization, cytotoxic activity, T24 and RT4 human bladder cell lines

DISCUSSÃO GERAL

A presente dissertação foi desenvolvida tendo como hipótese de trabalho a suscetibilidade dos alcalóides oxindólicos de *U. tomentosa* à isomerização, bem como sua atividade citotóxica sobre linhagens de células tumorais. Nesse sentido, cabe salientar o fato de as técnicas adotadas em trabalhos científicos nem sempre corresponderem às aquelas descritas em relatos etnofarmacológicos, o que pode acarretar em resultados dispares em termos de atividades biológicas.

Assim, a ocorrência de isomerização foi avaliada e monitorada no decorrer das diferentes etapas de processamento tecnológico da matéria-prima vegetal, englobando tanto a etapa de extração como a obtenção de uma fração purificada em alcalóides oxindólicos. Com o intuito de verificar o efeito da interconversão entre os alcalóides de unha-de-gato sobre a atividade citotóxica, foi realizado estudo *in vitro* utilizando células tumorais de bexiga T24 e RT4. Para estas linhagens de células não foram encontrados relatos que as associem aos alcalóides de unha-de-gato especificamente.

Desta forma, a etapa inicial do trabalho destinou-se a caracterização da matéria-prima vegetal, cuja autenticidade botânica foi previamente atestada mediante laudo botânico fornecido pela empresa beneficiadora da matéria-prima (Anexo 1). Assim, as cascas do caule de unha-de-gato foram inicialmente moídas e em seguida caracterizadas quanto a sua distribuição granulométrica e perda por dessecação (Anexo 2), afim de salvaguardar a reprodutibilidade dos resultados obtidos.

O método analítico via CLAE-PDA ora proposto para a quantificação dos alcalóides oxindólicos, tanto pentacíclicos (mitrafilina, isomitrafilina, especiofilina, uncarina F, pteropodina e isopteropodina) como tetracíclicos (rincofilina e isorrincofilina), pôde ser validado sem maiores contratempos. Pela especificidade do mesmo, foi possível avaliar a influência de diferentes processos extrativos empregados neste trabalho (a saber, maceração estática, maceração dinâmica, ultrassom, tubo-extração e refluxo) sobre a isomerização dos alcalóides. Também, optou-se por analisar paralelamente uma solução de referência contendo mitrafilina e isomitrafilina, na proporção de 3:1(m/m), que remete à proporção entre ambos existente no extrato obtido por maceração dinâmica.

Tanto a extração por maceração dinâmica quanto por ultrassonicação permitiram minimizar a isomerização e, portanto, são capazes de manter o perfil inicial de alcalóides oxindólicos presente nas cascas de unha-de-gato. Contrariamente, maceração estática, tubo-extração e refluxo induziram a isomerização dos alcalóides em graus diferentes. Na maceração estática foi observada uma pequena isomerização associada ao longo tempo de extração requerido (4 dias). Já na tubo-extração, o atrito gerado pelo cisalhamento decorrente da natureza fibrosa das cascas, ao aumentar a temperatura do meio (70 °C), induz a isomerização dos alcalóides de forma moderada. Dentre os processos avaliados, a extração sob refluxo foi capaz de induzir a isomerização em maior grau, fato associado à elevada temperatura de processo (85 °C).

Uma vez que a extração sob refluxo foi capaz de induzir a isomerização dos alcalóides de forma drástica, esse processo foi selecionado para realizar o estudo da cinética de isomerização. O comportamento não linear dos resultados foi ajustado utilizando dois modelos matemáticos usualmente aplicados para descrever processos contínuos, crescentes ou decrescentes: MMF (Morgan-Mercer-Flodin) e Weibull de quatro parâmetros. Neste caso, foi selecionado o modelo de quatro parâmetros da equação de Weibull que, além de conduzir a um melhor ajuste ($R^2 > 0,999$) em todos os casos, possibilita relacionar os valores dos parâmetros com algumas características das reações químicas, como *lag-time*, magnitude e equilíbrio de reação. Assim, foi possível demonstrar, através da utilização da primeira derivada (dy/dx) da equação de Weibull, que após 45 minutos sob refluxo se atinge uma situação de equilíbrio para todos os alcalóides considerados, o que leva a perfis de alcalóides claramente diferenciados daquele observado nas cascas de *U. tomentosa*. O comportamento da mitrafilina e isomitrafalina na solução de referência em aquecimento foi diferente do observado na solução extrativa, o que denota uma importante influência da matriz, que afeta tanto a velocidade de isomerização como a extensão com que a mesma ocorre (Capítulo 1).

Cabe ressaltar que a utilização popular das cascas de unha-de-gato é realizada mediante a preparação de infusos e dectotos, processos de extração a quente que levam

a isomerização dos alcalóides. Com isso, o perfil de alcalóides oxindólicos é modificado em função do processo extrativo o que pode, invariavelmente, alterar de forma positiva ou negativa a eficácia das preparações.

Neste trabalho foi possível também estabelecer condições de processo otimizadas que permitissem preservar ao máximo a composição dos alcalóides originalmente constatada em extratos obtidos por maceração dinâmica. Ao mesmo tempo, as condições otimizadas também permitiram maximizar os rendimentos de extração para as frações bioativas compostas por polifenóis e derivados triterpênicos. Para isso foi aplicado um desenho experimental do tipo Box-Behnken de três fatores em três níveis. Como fatores foram considerados a concentração de etanol em misturas hidroetanólicas empregadas como líquido extrator, proporção droga:solvente e tempo de extração. Condições ótimas para extração puderam ser determinadas mediante a aplicação do desenho experimental. Os resultados obtidos foram: 50, 63, 62 e 69% de etanol no líquido extrator e uma proporção droga:solvente de 0,5:10 (m/v), em 2 h de extração, para polifenóis, alcalóides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos, e quinóvicos, respectivamente. Já para a obtenção de um rendimento máximo considerando os quatro grupos conjuntamente, a concentração de etanol ideal no líquido extrator foi de 61%, sendo utilizada a mesma proporção droga:solvente (0,5:10, m/v) e mesmo tempo de extração (2 h). Além disso, os modelos matemáticos gerados a partir do desenho experimental empregado demonstraram adequada capacidade preditiva (82 – 107%) (Capítulo 2).

Aspectos importantes relacionados à extração foram evidenciados a partir do modelo experimental empregado como o índice de saturação do solvente à medida que se aumenta a proporção droga:solvente, que fica mais evidente no caso dos polifenóis e alcalóides oxindólicos pentacíclicos, componentes majoritários das cascas. Além disso, a agitação associada à maceração dinâmica acelera as etapas de lavagem e difusão intraparticular envolvidas no processo extrativo, o que é positivo já que evita a excessiva exposição da solução extrativa a luz e ao oxigênio, que podem desencadear processos oxidativos ou até mesmo facilitar a isomerização dos alcalóides.

A partir das condições ótimas para a obtenção do maior rendimento de alcalóides oxindólicos pentacíclicos determinadas mediante otimização de extração, foi obtida a solução extrativa das cascas de *U. tomentosa*, sendo esta caracterizada e posteriormente liofilizada (Anexo 3). O extrato seco liofilizado obtido foi empregado para a obtenção da fração purificada em alcalóides oxindólicos mediante a utilização de uma etapa inicial de pré-purificação com polivinilpirrolidona de ligações cruzadas para a remoção dos polifenóis de elevada massa molecular que perfazem cerca de 20% (m/m) do extrato. Posteriormente foi realizado um processo de troca iônica de cinco etapas em coluna utilizando resina aniônica que permitiu a obtenção de uma fração purificada em alcalóides oxindólicos pentacíclicos com recuperação e teor de 86% e 62%, respectivamente, contendo também 7% de alcalóides oxindólicos tetracíclicos. Nenhuma modificação significativa no perfil de alcalóides oxindólicos pentacíclicos decorrente da isomerização foi verificada durante o processo de purificação, sendo as pequenas diferenças observadas no decorrer do processo atribuídas a diferencial recuperação individual dos alcalóides. Já no caso dos alcalóides oxindólicos tetracíclicos, a baixa recuperação da rincofilina (53%) fez com que a proporção inicial presente no extrato em relação à isorrincofilina fosse modificada descartando-se assim a ocorrência da isomerização em virtude do processo de fracionamento (Capítulo 3).

Como a atividade citotóxica e antiproliferativa dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos é bastante conhecida e difundida na literatura frente as mais diversas linhagens de células tumorais, foi avaliada *in vitro* a atividade citotóxica da fração purificada em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4. A fração demonstrou atividade citotóxica significativa frente às linhagens avaliadas sendo obtidas repostas dose-dependentes. As CI_{50} determinadas foram de 164,13 e 137,23 $\mu\text{g/mL}$ para T24 e RT4, respectivamente, sendo, portanto, mais efetiva frente à linhagem RT4 (Capítulo 3).

Visando determinar a influência da isomerização sobre a atividade citotóxica, a fração enriquecida foi isomerizada mediante aquecimento sob refluxo sendo obtidas três frações liofilizadas com diferentes perfis de alcalóides que foram também avaliadas quanto ao seu potencial citotóxico *in vitro*. Contudo os valores de CI_{50}

determinados para as frações isomerizadas foram estatisticamente equivalentes entre si e a fração não-isomerizada ($p > 0,05$), indicando um provável efeito sinérgico dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos com relação à atividade citotóxica nas linhagens celulares avaliadas, ou ainda, a existência de uma relação estrutura-atividade bastante complexa (Capítulo 3). Entretanto, uma avaliação mais aprofundada acerca do comportamento dos alcalóides oxindólicos no meio de incubação após o período de tratamento, assim como a avaliação em diferentes linhagens celulares, podem esclarecer alguns dos resultados obtidos e surgem como perspectivas de trabalhos futuros.

CONCLUSÕES

- O método analítico por CLAE-PDA, desenvolvido e validado neste trabalho, permitiu o monitoramento da isomerização dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos e tetracíclicos nas etapas de extração e obtenção de uma fração purificada em alcalóides;
- Foi confirmada a isomerização dos alcalóides oxindólicos em extratos obtidos por maceração estática, turbo-extração e refluxo, ainda que em diferentes intensidades. Contrariamente, a extração por maceração dinâmica e ultrassom não induziram qualquer alteração significativa no perfil inicial de alcalóides. Essas constatações evidenciam claramente que o processo extrativo pode determinar a composição final de alcalóides oxindólicos em preparações de *U. tomentosa*;
- A cinética de isomerização induzida por aquecimento sob refluxo pôde ser monitorada de forma detalhada e o ajuste dos dados experimentais realizado satisfatoriamente mediante uso do modelo de Weibull de quatro parâmetros. Os alcalóides oxindólicos na solução extrativa apresentaram uma cinética de isomerização diferente em relação aos alcalóides isolados. Esse fato não só indica a influência da matriz sobre a isomerização, como também restringe a comparação direta de dados cinéticos procedentes de extratos e de substâncias isoladas;
- Mediante desenho experimental do tipo Box-Behnken e Análise de Superfície de Resposta, condições de extração capazes de minimizar a isomerização dos alcalóides e, simultaneamente, maximizar os rendimentos de alcalóides oxindólicos, polifenóis e derivados triterpênicos, puderam ser obtidas;
- O processo de troca iônica empregado propiciou a obtenção de uma fração purificada em alcalóides oxindólicos com elevado teor, de forma reprodutível e robusta, no entanto sem induzir a isomerização dos alcalóides;
- A fração purificada em alcalóides oxindólicos apresentou *in vitro* atividade citotóxica significativa e dose-dependente em linhagens de células tumorais de bexiga T24 e RT4. Contudo, o fato do potencial citotóxico não ser alterado após

a indução da isomerização dos alcalóides contraria vários relatos que demonstram uma atividade citotóxica diferenciada dos mesmos em diversas linhagens de células tumorais. Esses resultados sugerem a existência de efeitos sinérgicos entre os alcalóides, relações estrutura-atividade e, talvez, mecanismos de ação mais complexos.

PERSPECTIVAS



- O monitoramento dos alcalóides oxindólicos no decorrer de estudos biológicos, considerando as características do meio e as condições de incubação, surge como perspectiva de estudo;
- A avaliação da influência da isomerização sobre a atividade citotóxica em diferentes linhagens celulares também pode ajudar a elucidar a complexa relação estrutura-atividade que parece atrelada aos alcalóides oxindólicos pentacíclicos.

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.; LINDGREN, H.; PERO, R.W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100[®]. **International Immunopharmacology**, v.5, p.219–229, 2005.

AKESSON, C.; LINDGRENA, H.; PERO, R.W.; LEANDERSON, T.; IVARS, F. An extract of *Uncaria tomentosa* inhibiting cell division and NF- κ B activity without inducing cell death. **International Immunopharmacology**, v.3, p.1889–1900, 2003a.

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

ALLEN-HALL, L.; CANO, P.; ARNASON, J.T.; ROJAS, R.; LOCK, O.; LAFRENIE, R.M. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1 β and TNF- α . **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p.312–317, 2007.

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

AMARAL, S.; MIRA, L.; NOGUEIRA, J.M.F.; DA SILVA, A.P.; FLORENCIO, M.H. Plant extracts with anti-inflammatory properties—A new approach for characterization of their bioactive compounds and establishment of structure–antioxidant activity relationships. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.17, p.1876–1883, 2009.

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.; 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.

BACHER, N.; TIEFENTHALER, M.; STURM, S.; STUPPNER, H.; AUSSERLECHNER, M.J.; KOFLER, R.; KONWALINKA, G. Oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* induce apoptosis in proliferating, G0/G1-arrested and bcl-2-expressing acute lymphoblastic leukaemia cells. **British Journal of Haematology**, v.132, p.615–622, 2006.

BERTOL, G.; FRANCO, L., OLIVEIRA, B.H. HPLC Analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: sample preparation and analysis optimization by factorial design. **Phytochemical Analysis**, v.23, p.143–151, 2012.

BORRÉ, G.L. **Obtenção e análise de frações enriquecidas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC.** Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2010. Dissertação de Mestrado.

CASTILLO, G.; CHOI, P.; NGUYEN, B.; SNOW, A. **Methods of isolating amyloid-inhibiting compounds and use of compounds isolated from *Uncaria tomentosa* and related plants.** US patent nº 20040137092, 20p., 2005.

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.

CHENG, A.; JIAN, C.; HUANG, Y.; LAI, C.; HSU, P.; PAN, M. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactiveoxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.45, p.2206–2218, 2007.

CISNEROS, F.J.; JAYO, M.; NIEDZIELA, L. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, n.3, p.355–364, 2005.

DE MARTINO, L.; MARTINOT, J.L.S.; FRANCESCHELLI, S.; LEONE, A.; PIZZA, C.; DE FEO, V. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.91–94, 2006.

DOMINGUES, A.; SARTORI, A.; GOLIM, M.A.; VALENTE L.M.M.; DA ROSA, L.C.; ISHIKAWA, L.L.W.; SIANI, A.C.; VIERO R.M. Prevention of experimental diabetes by *Uncaria tomentosa* extract: Th2 polarization, regulatory T cell preservation or both? **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.635–642, 2011a.

DOMINGUES, A.; SARTORI, A.; VALENTE, L.M.M.; GOLIM, M.A.; SIANI, A.C.; VIERO, R.M. *Uncaria tomentosa* aqueous-ethanol extract triggers an immunomodulation toward a Th2 cytokine profile. **Phytotherapy Research**, v.25, p.1229–1235, 2011b.

DREIFUSS, A.A.; BASTOS-PEREIRA, A.L.; ÁVILA, T.V.; SOLEY, B.S.; RIVERO, A.J.; AGUILAR, J.L.; ACCO, A. Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. & Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, p.127–133, 2010.

FARIAS, I.; ARAÚJO, M.C.; ZIMMERMANN, E.S.; DALMORA, S.L.; BENEDETTI, A.L.; ALVAREZ-SILVA, M.; ASBAHR, A.C.C.; BERTOL, G.;

FARIAS, J.; SCHETINGER, M.R.C. *Uncaria tomentosa* stimulates the proliferation of myeloid progenitor cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, p.856–863, 2011.

FARIAS, I.L.G.; ARAÚJO, M.C.S.; FARIAS, J.G.; ROSSATO L.V.; ELSENBACH, L.I.; DALMORA, S.L.; FLORES, N.M.P.; DURIGON, M.; CRUZ, I.B.M.; MORSCH, V.M.; SCHETINGER, M.R.C. *Uncaria tomentosa* for reducing side effects caused by chemotherapy in CRC patients: clinical trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, in press, doi:10.1155/2012/892182, 2012.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, p.263–288, 2003.

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

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.

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

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

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

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

GURROLA-DÍAZA, C.M.; GARCÍA-LÓPEZ, P.M.; GULEWICZ, K.; PILARSKI, R.; DIHLMANN, S. Inhibitory mechanisms of two *Uncaria tomentosa* extracts affecting the Wnt-signaling pathway. **Phytomedicine**, v.18, p.683–690, 2011.

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

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

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Rules for the nomenclature of organic chemistry section E: Stereochemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v.45, p.11–30, 1976.

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

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

KITAJIMA, M.; HASHIMOTO, K.; YOKOYA, M.; TAKAYAMA, H.; AIMI, N. Two new 19-Hydroxyursolic acid-type triterpenes from Peruvian ‘Unã de Gato’ (*Uncaria tomentosa*). **Tetrahedron**, v.56, p.547–552, 2000.

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

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v.89, p. 217–233, 2011.

LAUS, G. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.259–274, 2004.

LAUS, G. Kinetics of isomerization of tetracyclic spiro oxindole alkaloids. **Journal Chemistry Society Perkin Transformation**, v.2, p.315–317, 1998.

LAUS, G.; BRÖSSNER, D.; KEPLINGER K. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p.855–860, 1997.

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

LAUS, G.; KEPLINGER, D. Separation of stereoisomer oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.662, n.2, p.243–249, 1994.

LIMA, V.L.E. Os fármacos e a quiralidade: uma breve abordagem. **Química Nova**, v.20, n.6, p.657–663, 1997.

MACEDO, E. V.; GEMAL, A. L. A produção de fitomedicamentos e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n.4, p.290–297, 2009.

MAMMONE, T.; AKESSON, C.; GAN, D.; GIAMPAPA, V.; PERO, R.W. A water soluble extract from *Uncaria tomentosa* (cat's claw) is a potent enhancer of DNA repair in primary organ cultures of human skin. **Phytotherapy Research**, v.20, p.178–183, 2006.

MAZZIO, E.A.; SOLIMAN, K.F.A. *In vitro* screening for the tumoricidal properties of international medicinal herbs. **Phytotherapy Research**, v.23, n.3, p.385–398, 2009.

MONTENEGRO DE MATTA, S.; DELLE MONACHE, F.; 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.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D.C.; KHAN, R.A.; GANZERA, M.; KHAN, I.A. Investigation of Unã De Gato I. 7-Deoxyloganic acid and ¹⁵N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Phytochemistry**, v. 57, p.781–785, 2001.

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

PAVEI, C. **Obtenção e avaliação de frações purificadas e farmacologicamente ativas presentes em *Uncaria tomentosa* (WILLD) DC. (unha-de-gato).** Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS. 2010. Tese de Doutorado.

PAVEI, C.; KAISER, S.; BORRE', G.L.; ORTEGA, G.G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v.33, p.1551–1561, 2010.

PAVEI, C.; BORRÉ, G.L.; KAISER, S.; ORTEGA, G.G. Alkaloid isomerization induced by spray drying of *Uncaria tomentosa* bark extracts. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.30, p.608–612, 2011.

PAVEI, C.; KAISER, S.; VERZA, S.G.; BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. HPLC-PDA method for quinovic acid glycosides assay in Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*) associated with UPLC/Q-TOF-MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, p.250–257, 2012.

PERO, R.W. **Method of preparation and pharmaceutical composition of an *Uncaria* water soluble extract.** WO patent n° 002571, 20p., 2000.

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.** US patent n° 074062, 20 p., 2002.

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.

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

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

PILARSKI, R.; FILIP, B.; WIETRZYK, J.; KURA'S, M.; GULEWICZ K. Anticancer activity of the *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. preparations with different oxindole alkaloid composition. **Phytomedicine**, v.17, p.1133–1139, 2010.

POLLITO, P.A.Z. **Dendrologia, anatomia do lenho e status de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil.** São Paulo: Escola superior de Agricultura Luiz de Queiroz. 2004. Tese de Doutorado.

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.

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

RANILLA, L.G.; KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants,

herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology**, v.101, p.4676–4689, 2010.

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.

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

RINNER, B.; LI, Z.X.; HAAS, H.; SIEGL, V.; STURM, S.; STUPPNER, H.; PFRAGNER, R. Antiproliferative and pro-apoptotic effects of *Uncaria tomentosa* in human medullary thyroid carcinoma cells. **Anticancer Research**, v.29, p.4519–4528, 2009.

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, A.M.; MILLER, M.J.S. Cat's claw inhibits TNF- α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology & Medicine**, v.29, n.1, p.71–78, 2000.

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

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- κ B. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.12, p.1279–1289, 1998.

SETTY, A.R.; SIGAL, L.H. Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, 2005.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R.W. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.69, p.115–126, 2000.

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.

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

STUPPNER, H.; STURM, S.; KONWALINKA, G. Capillary electrophoretic analysis of oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Chromatography**, v.609, p.375–380, 1992b.

STUPPNER, H.; STURM, S.; GEISEN, G.; ZMIAN, U.; KONWALINKA, G. A differential sensitivity of oxindole alkaloids to normal and leukemic cell lines. **Planta Medica**, v.59, p.A583, 1993.

TRENTINI, A.M.M.; TRENTINI, M.A.M. **Phytherapeutic compound for treatment of herpes comprises herbal extract from *Uncaria tomentosa*, vehicle and excipients**. WO patent n° 2006024120, 24p., 2006.

VALENTE, L.M.M.; BIZARRI, C.H.B.; LIECHOCKI, S.; BARBOZA, R.S.; DA PAIXÃO, D.; ALMEIDA, M.B.S.; BENEVIDES, P.J.C.; MAGALHÃES, A.; SIANI, A.C. Kaempferitrin from *Uncaria guianensis* (Rubiaceae) and its potential as a chemical marker for the species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1041–1045, 2009.

VALENTE, L.M.M. Unha-de-gato [*Uncaria tomentosa*] (Willd.) DC. e *Uncaria guianensis* (Aubl.) Gmel.]: Um panorama sobre seus aspectos mais relevantes. **Revista Fitos**, v.2, n.1, p. 48–48, 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.

WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B.; JURCIC, K. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytose-steigernde Wirkung. **Planta Medica**, v.51, n.5, p.419–423, 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.

ANEXOS



Anexo 2. Caracterização da matéria-prima

Preparação e caracterização da matéria-prima vegetal

O material vegetal composto de cascas rasuradas secas de unha-de-gato foi moído em moinho de facas (SK1 Retsch, Alemanha), provido de tamis de 2 mm, e caracterizado como descrito a seguir.

Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

Cerca de 1 g de material vegetal seco e moído foi acondicionado em pesa-filtro previamente tarado e deixado em estufa a 105 ± 2 °C por 2 horas. Após arrefecido em dessecador durante 30 minutos, o pesa-filtro contendo a amostra foi pesado e novamente mantido em estufa, sendo este procedimento realizado até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos como porcentagem de umidade residual pela média de três determinações.

Análise granulométrica (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

Cerca de 10 g de material vegetal seco e moído foram submetidos em tamisador automático a 60 vibrações por segundo durante 15 minutos. Foram selecionados tamises de abertura de malha nominal de 0,500; 0,425; 0,250; 0,106; 0,075 e 0,062 mm. As frações retidas nos tamises e coletor foram pesadas e os dados analisados pelo método gráfico. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

Resultados e Discussão

O teor de umidade presente na matéria-prima está diretamente relacionado à sua conservação, já que uma umidade residual elevada pode favorecer reações químicas de degradação e a proliferação microbiana. Assim, a porcentagem de umidade determinada para a matéria-prima ($7,92 \pm 0,21\%$) foi semelhante à obtida por BORRÉ (2010) que foi de $7,6 \pm 0,2\%$. Além disso, o valor determinado encontra-se de acordo

com os padrões aceitáveis, dado que o percentual de umidade máximo para o material vegetal varia de 8% a 14% nas diferentes farmacopéias (FARIAS, 2003).

A granulometria da matéria-prima pode influenciar a etapa de extração. Levando-se em consideração este fato, os dados referentes à análise granulométrica do material vegetal moído encontram-se nos gráficos abaixo (Figura 4a e 4b).

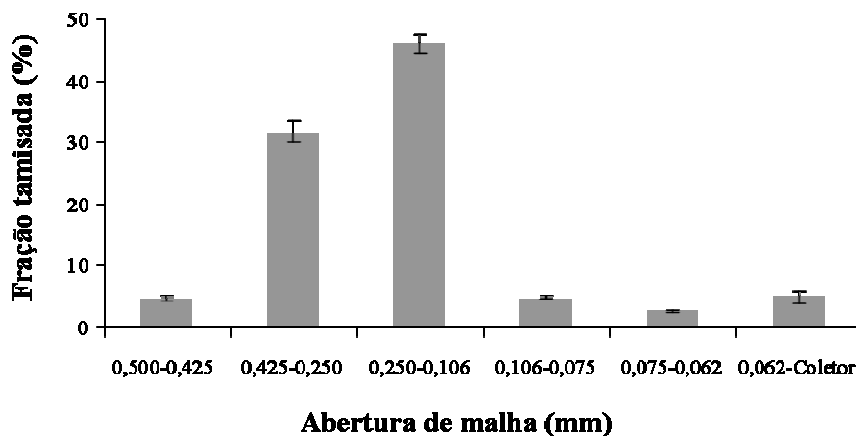


Figura 4a. Histograma da distribuição granulométrica da matéria-prima vegetal após a etapa de moagem.

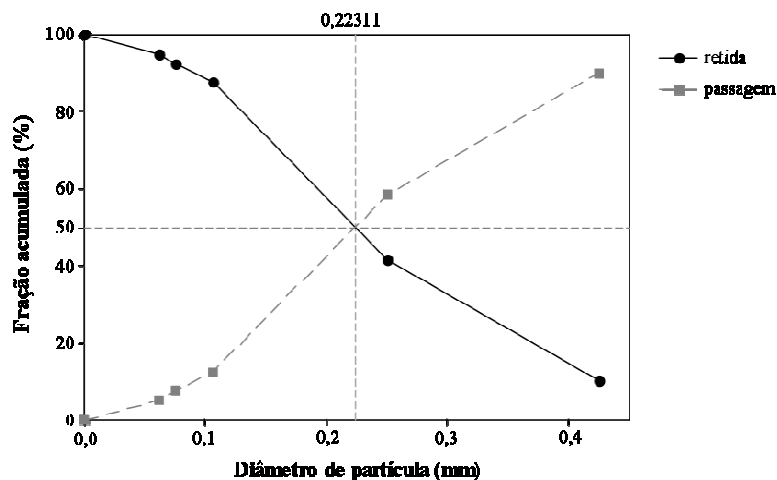


Figura 4b. Curva cumulativa de retenção e passagem da matéria-prima vegetal após moagem.

É possível observar uma distribuição granulométrica unimodal sendo que a maior proporção do material particulado encontra-se na faixa de 0,250 a 0,106 mm (Figura 4a). Adicionalmente, se for considerada a faixa granulométrica de 0,425 a 0,250 mm,

cerca de 80% do material particulado é contemplado. Também existe uma pequena porção de finos no material, mas que apenas perfaz cerca de 5% da matéria-prima. A partir da curva cumulativa foi possível estimar o diâmetro médio do material particulado que foi de 0,223 mm (Figura 4b).

Anexo 3. Obtenção e caracterização da solução extrativa e extrato seco liofilizado

Obtenção da solução extrativa e extrato seco liofilizado

Cerca de 25 g do material vegetal moído foram extraídos a temperatura ambiente (23 ± 1 °C) com solução hidroetanólica a 63% (v/v) por 2 horas sob maceração dinâmica a 300 rpm em agitador magnético (IKA RH basic 1, Alemanha), utilizando-se uma proporção droga:solvente de 0,5:10 (m/v). Posteriormente a mistura foi filtrada em papel (Whatmann, nº 2) sob vácuo sendo o volume retomado ao inicial no final do processo obtendo-se assim a solução extrativa. Para obtenção do extrato liofilizado, a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotatório (Büchi R-114, Switzerland) até metade de seu volume inicial sendo então congelada e liofilizada (Modulyo 4L, Edwards, USA).

Caracterização da solução extrativa

Determinação do resíduo seco

Cerca de 2 g da solução extrativa foram transferidos a tubo de ependorf e concentrados em estufa a 105 ± 3 °C por 4 horas. Em seguida o tubo foi mantido por mais 2 horas em estufa a 105 ± 3 °C. Após este período, o tubo foi arrefecido em dessecador por 30 minutos e pesado, sendo este procedimento realizado até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos pela média de três determinações.

Determinação da densidade relativa (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

A densidade da solução extrativa foi determinada a 25 °C em picnômetro de 10 mL previamente tarado. Os resultados foram expressos em g/mL pela média de três determinações.

Determinação do pH (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

O pH da solução extrativa foi determinado em potenciômetro à 25 °C, previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de três determinações.

Caracterização do extrato seco liofilizado

Determinação das características organolépticas

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

Determinação da perda por dessecação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988)

Cerca de 500 mg do extrato seco liofilizado foram acondicionados em pesa-filtro previamente tarado e deixado em estufa a 105 ± 2 °C por 2 horas. Após arrefecido em dessecador durante 30 minutos, o pesa-filtro contendo a amostra foi pesado e novamente mantido em estufa, sendo este procedimento realizado até a obtenção de peso constante. Os resultados foram expressos como porcentagem de umidade residual pela média de três determinações.

Resultados e Discussão

A solução extrativa foi obtida empregando-se as condições ótimas de extração para a obtenção do maior rendimento de alcalóides oxindólicos pentacíclicos (Capítulo 2).

Os resultados referentes à caracterização da solução extrativa são apresentados na tabela 4a.

Tabela 4a. Parâmetros de caracterização da solução extrativa das cascas de unha-de-gato.

Resíduo seco (%, m/m) $\bar{X} \pm S$	pH $\bar{X} \pm S$	Densidade relativa (g/mL) $\bar{X} \pm S$
0,45 ± 0,02	5,25 ± 0,02	0,91 ± 0,01

\bar{X} : média de três determinações; S: desvio padrão

O pH obtido ($5,25 \pm 0,02$) foi superior ao determinado anteriormente por PAVEI (2010) e BORRÉ (2010) para soluções extrativas de unha-de-gato, que foram de $4,75 \pm 0,01$ e $4,89 \pm 0,01$, respectivamente. Tal fato provavelmente está relacionado às diferentes condições de extração empregadas em ambos os trabalhos, já que a mesma foi realizada mediante maceração estática por quatro dias em solução hidroetanólica 40% (v/v) utilizando-se um proporção droga:solvente de 1:10 (m/v), condições estas não otimizadas para a obtenção de maiores rendimentos de alcalóides oxindólicos pentacíclicos. Além disso, os menores valores obtidos para densidade relativa e resíduo seco em comparação aos trabalhos anteriores, devem-se principalmente ao maior teor alcoólico do solvente empregado na extração (63%, v/v) e a menor proporção droga solvente (0,5:10, m/v), respectivamente.

A obtenção do extrato liofilizado a partir da solução extrativa teve como principal objetivo preservar a sua composição original por um longo período de tempo possibilitando, assim, seu armazenamento. O extrato seco liofilizado obtido apresentou-se como um pó fino, higroscópico, de coloração avermelhada, com odor adocicado característico. A umidade residual determinada foi de $7,05 \pm 0,25\%$, valor semelhante aos relatados anteriormente por PAVEI (2010) e BORRÉ (2010), que foram de $7,66 \pm 0,91\%$ e $7,31 \pm 0,22\%$, respectivamente.

AGRADECIMENTO BOLSA

Agradecemos o apoio financeiro da Cordenção de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) mediante concessão de bolsa de estudo.