



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais
de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante**



Olinda Celeste Pereira Marques

**Coimbra
2008**



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais
de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante

Olinda Celeste Pereira Marques

Coimbra
2008

Foto da capa de CIFLORPAN (Centro de Investigaciones Farmacognósticas de la Flora Panameña), disponível no site do ICS-UNIDO (International Centre for Science and High Technology – United Nations Industrial Development Organisation), disponível em <http://www.ics.trieste.it/MedicinalPlant/>

Dissertação da candidatura ao grau de Mestre
apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

*Caminhante, são teus rastros
o caminho, e nada mais;
caminhante, não há caminho,
faz-se caminho ao andar.*

António Machado

Aos meus filhos Sara e Tiago

Ao Ricardo, meu marido e companheiro

Aos meus pais, Luz e António

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos os que contribuíram para a concretização deste trabalho.

À Professora Doutora Maria Eugénia Tavares de Pina, orientadora desta dissertação agradeço a sua orientação científica, a sua amizade e palavras de incentivo, tão importantes nos momentos de maior esmorecimento. Uma palavra de gratidão também pela sua disponibilidade e pela revisão crítica da presente dissertação.

À Professora Doutora Maria Teresa Batista, co-orientadora desta dissertação agradeço o seu empenho e envolvimento permanente, o entusiasmo e incansável disponibilidade. O meu mais profundo agradecimento pela forma como me acolheu, pela sua amizade e exigência e pela revisão cuidada e incansável desta dissertação.

À Dra Teresa Amaral expresso um sentido obrigado pela disponibilidade e amizade com que me recebeu, pelo apoio e conhecimentos transmitidos durante os ensaios realizados no Laboratório de Farmacognosia.

Ao Professor Doutor Adriano Barbosa de Sousa, manifesto o meu reconhecimento pelo acolhimento no Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À Professora Doutora Lúcia Salgueiro Couto, agradeço o bom acolhimento e a oportunidade de realização de ensaios no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

À Dra. Olga Lock de Ugaz, da Universidade Pontifícia Católica de Lima, Peru agradeço o generoso envio das cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. fundamentais para a concretização deste trabalho.

À Labialfarma, Laboratório de Biologia Alimentar e Farmacêutica agradeço a cedência de extracto de *Uncaria tomentosa* utilizado neste trabalho de investigação.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica e do Laboratório de Farmacognosia, em especial à Catarina Reis, Jucimary, Manuel Vueba, Rita Figueiras, Virginie Malinge, Artur Figueirinha, Daniele e Inês, expresso o meu agradecimento pelo apoio, disponibilidade e espírito de entreajuda.

Aos funcionários do Laboratório de Galénica e Tecnologia Farmacêutica, do Laboratório de Farmacognosia e da Biblioteca da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra agradeço a atenção e simpatia dispensada.

Uma homenagem especial a todos os amigos e familiares de cuja presença e convívio tive que abdicar, para que a concretização deste trabalho fosse possível.

À minha família, especialmente aos meus pais e irmãos, o meu imenso obrigada, pelo apoio incondicional e constante e pelo seu testemunho de vida; à minha mãe pelo sacrifício suplementar que a concretização deste trabalho lhe exigiu, com a minha admiração e amor.

Ao Ricardo agradeço o seu amor, compreensão e palavras de incentivo, mesmo nos momentos de maior desalento. Sem o seu apoio e companheirismo nunca teria conseguido percorrer este caminho.

Para os meus filhos Sara e Tiago, nascidos no decurso deste trabalho experimental, pequenos de mais para perceber os meus momentos de ausência e cansaço, imensamente grandes no amor que me dedicam, fica este trabalho.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
ÍNDICE GERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xvii
ABREVIATURAS	xix

Capítulo I - Considerações Gerais

1.1. IMPORTÂNCIA DA FITOTERAPIA ONTEM E HOJE	3
1.2. A UNCARIA TOMENTOSA	5
1.2.1. DESCRIÇÃO E UTILIZAÇÕES ETNOFARMACOLÓGICAS	5
1.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA	9
1.2.2.1. Alcalóides	9
1.2.2.2. Terpenóides	13
1.2.2.3. Esteróis	17
1.2.2.4. Flavanóides e outros compostos fenólicos	17
1.2.3. BIOACTIVIDADE	19
1.2.3.1. Actividade antioxidante	21
1.2.3.2. Actividade anti-inflamatória	23
1.2.3.3. Actividade anticancerígena	26
1.2.3.4. Actividade antiviral	30
1.2.3.5. Actividade antimicrobiana	30
1.2.3.6. Actividade imuno-estimulante	31
1.2.3.7. Actividade protectora neuronal	33
1.2.3.8. Acção protectora da pele	34
1.2.3.9. Actividade sobre os receptores estrogénicos	34
1.2.3.10. Actividade protectora do sistema cardiovascular de extractos, com alcalóides e proantocianidinas, do tipo dos presentes na <i>Uncaria tomentosa</i>	35
1.2.4. TOXICIDADE E EFEITOS SECUNDÁRIOS	36
1.2.5. INTERACÇÕES MEDICAMENTOSAS	37

1.3. PROANTOCIANIDINAS	39
1.3.1. BIOSÍNTESE	41
1.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS	41
1.3.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE O CONSUMO DE PROANTOCIANIDINAS	44
1.3.4. BIOACTIVIDADE	47
1.3.5. BIODISPONIBILIDADE	49
1.3.5.1. Efeito do tracto gastro-intestinal superior, nos flavanóis	51
1.3.5.2. Absorção, metabolismo e conjugação no intestino delgado ...	52
1.3.5.3. Metabolismo dos flavanóis no cólon	54
1.3.5.4. Constituintes da dieta que podem diminuir ou aumentar a biodisponibilidade dos flavanóis	59
1.3.6. EFEITOS COLATERAIS E TOXICIDADE	60
1.3.7. BIOACTIVIDADE DE EXTRACTOS ESSENCIALMENTE CONSTITUÍDOS POR PROANTOCIANIDINAS	60
1.3.7.1. Extracto de <i>Pinus maritima</i> (PYC)	61
1.3.7.2. Extracto de grão de uva rico em proantocianidinas (GSPE)	61
1.3.7.3. Procianidinas do cacau	63
1.4. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO E OBJECTIVOS	65
1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

*Capítulo II - Preparação e caracterização do decocto de *Uncaria tomentosa*. Comparação com outros produtos de uncária existentes no mercado*

2. INTRODUÇÃO	85
2.1. MATERIAIS	85
2.2. MÉTODOS	86
2.2.1. PREPARAÇÃO DO EXTRACTO DE UNCARIA TOMENTOSA	86
2.2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE NAS AMOSTRAS ESTUDADAS	87
2.2.2.1. Método gravimétrico	87
2.2.2.2. Método de Karl-Fisher	88
2.2.3. DOSAGEM DOS 3-FLAVANÓIS PELO MÉTODO DA VANILINA-ÁCIDO CLORÍDRICO	89
2.2.4. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO	90

2.2.5. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	93
Método do DPPH	94
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
2.3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE	96
2.3.2. RENDIMENTO EXTRACTIVO DAS CASCAS DE UNCARIA TOMENTOSA	96
2.3.3. DOSEAMENTO DE 3-FLAVANÓIS	97
2.3.4. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	98
2.3.5. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE	100
2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

Capítulo III - Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida para administração oral

3.1. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS	109
3.1.1. A FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA ORAL E O TRACTO GASTRO INTESTINAL	109
3.1.2. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS MAIS UTILIZADAS	111
3.1.3. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS, SEGUNDO O TIPO DE LIBERTAÇÃO	112
3.1.4. SELECÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DOS EXTRACTOS DE UNCARIA TOMENTOSA	113
3.2. MATERIAIS	115
3.3. MÉTODOS	116
3.3.1. PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS DURAS	116
3.3.2. SELECÇÃO DOS EXCIPIENTES	118
3.3.2.1. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	120
3.3.3. PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS COM UNCARIA TOMENTOSA	123
3.3.4. ENSAIOS DE CONTROLO DE QUALIDADE	123
3.3.4.1. Validação do método de doseamento de 3-flavanóis em suco gástrico	124
3.3.4.2. Ensaio de dissolução	126
3.3.4.3. Uniformidade de massa	128
3.3.4.4. Uniformidade de teor (dosagem)	128
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	129
3.4.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA VOLÚMICA APARENTE E DO VOLUME APARENTE	129

3.4.2.	SELECÇÃO DOS EXCIPIENTES PELO MÉTODO DA CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC)	129
3.4.3.	PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS COM UNCARIA TOMENTOSA	137
3.4.4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM	139
3.4.4.1.	Especificidade	139
3.4.4.2.	Linearidade	140
3.4.4.3.	Precisão	140
3.4.4.4.	Exactidão	141
3.4.5.	ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES	142
3.4.5.1.	Determinação do teor em 3-flavanóis	142
3.4.5.2.	Ensaio de dissolução	143
3.4.5.3.	Seleção das formas farmacêuticas	148
3.4.6.	ENSAIOS DE CONTROLO DE QUALIDADE	149
3.4.6.1.	Uniformidade de massa	149
3.4.6.2.	Uniformidade de teor	150
3.5.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

Capítulo IV - Estudo da actividade antioxidante das formas farmacêuticas desenvolvidas e de outras comercializadas – uma aproximação ao seu comportamento in vivo

4.	INTRODUÇÃO	159
4.1.	MATERIAIS	159
4.2.	MÉTODOS	160
4.2.1.	OPTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA AVALIAR A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE, EM AMOSTRAS SUJEITAS À ACÇÃO DO SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL	160
4.2.2.	ESTUDO DO COMPORTAMENTO DAS PROANTOCIANIDINAS, EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL	161
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	163
4.3.1.	ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FORMAS FARMACÊUTICAS DE UNCÁRIA, SUJEITAS À ACÇÃO DO SUCO GÁSTRICO	163
4.3.2.	DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE, PELO MÉTODO DO DPPH OPTIMIZADO PARA AMOSTRAS SOLUBILIZADAS EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL	166

4.3.3. ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS PROANTOCIANIDINAS, AO LONGO DO TEMPO, EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL	169
4.4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173

Capítulo V – Discussão Geral

5.1. DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	177
5.2. PERSPECTIVAS FUTURAS	181

ÍNDICE DE FIGURAS
Capítulo I

Figura 1. <i>Uncaria tomentosa</i> (flores, casca e espinhos)	7
Figuras 2 e 3. Alcalóides oxindólicos pentacíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	10
Figura 4. Alcalóides oxindólicos tetracíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	10
Figura 5. Alcalóides indólicos tetracíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	10
Figura 6. Alcalóides indólicos pentacíclicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	11
Figuras 7, 8 e 9. Alcalóides gluco-indólicos identificados na <i>Uncaria tomentosa</i>	12
Figura 10. Ácido ursólico	14
Figura 11. Ácido oleanólico	14
Figura 12. Glicósidos do ácido quinóvico	14
Figura 13. Ácido uncárico e seus derivados	14
Figura 14. Ácido florídico	15
Figura 15. Derivados do ácido ursólico	15
Figuras 16 e 17. Derivados do ácido quinóvico	15
Figura 18. Derivados do do ácido 19-hidroxiursólico	15
Figura 19. Tomentósido A	16
Figura 20. Tomentósido B	16
Figura 21. Triterpeno do tipo oleanólico	16
Figura 22. Campesterol	17
Figura 23. β -Sitosterol	17
Figura 24. Estigmasterol	17
Figura 25. 3-Flavanol	17
Figura 26. a) 3α -OH (Epicatequina); b) 3β -OH (Catequina)	18
Figura 27. Epigalhocatequina	18
Figura 28. a) α -H (Cinchonaina Ia) b) β -H (Cinchonaina Ib)	18
Figura 29. Galhato de epigalhocatequina	18
Figura 30. Ácido cafeico	19
Figura 31. Ácido protocatéquico	19
Figura 32. Canferol	19
Figura 33. Dihidrocanferol	19

Figura 34. Galactósido do canferol	19
Figura 35. Ácido quinico	21
Figura 36. Diferentes classes de flavonóides	39
Figura 37. Estruturas de procianidinas	40
Figura 38. Biossíntese de flavonóides	42
Figura 39. Comportamento das proantocianidinas em meio ácido	43
Figura 40. Procianidina B5 [epicatequina-(4 β -6)-epicatequina]	46
Figura 41. Características estruturais antioxidantes da catequina e do ácido cafeico	47
Figura 42. Metabolitos principais da epicatequina, produzidos no intestino delgado do rato	55
Figura 43. Metabolitos resultantes da degradação da catequina pela microflora intestinal	57

Capítulo II

Figura 44. Reacção entre um 3-flavanol e a vanilina	90
Figura 45. Grupos hidroxilo fenólicos das moléculas de catequina ou epicatequina	93
Figura 46. Estrutura do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo – DPPH	94
Figura 47. Curva de calibração da catequina pelo método da vanilina-ácido clorídrico	97
Figura 48. Perfil cromatográfico do extracto liofilizado	98
Figura 49. Perfil cromatográfico da mistura extracto liofilizado/casca pulverizada	99
Figura 50. Perfil cromatográfico do extracto comercial	99

Capítulo III

Figura 51. Termograma-tipo	121
Figura 52. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + lactose (1:1) e c) lactose α -monohidratada	130
Figura 53. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado + amido de milho (1:1); b) extracto liofilizado e c) amido de milho	131
Figura 54. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + estearato de magnésio (1:1) e c) estearato de magnésio	132
Figura 55. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + celulose microcristalina (1:1) e c) celulose microcristalina	133
Figura 56. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado + carboximetilcelulose	134

sódica (1:1); b) extracto liofilizado e c) carboximetilcelulose sódica	
Figura 57. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + amido glicolato de sódio (Explotab®) e c) Explotab®	134
Figura 58. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + lactose monohidratada (1:1); b) lactose monohidratada e (c) extracto comercial	135
Figura 59. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + amido de milho (1:1); b) extracto comercial e c) amido de milho	136
Figura 60. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + estearato de magnésio (1:1); b) extracto comercial e c) estearato de magnésio	136
Figura 61. Curva de calibração da catequina	140
Figura 62. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas contendo as formulações A1, A2 e B	144
Figura 63. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com as formulações A3; A4 e B	146
Figura 64. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com as formulações C1 e C2	147
Figura 65. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com uncária Naturmil®	147
 Capítulo IV	
Figura 66. Perfis cromatográficos, por CCF, sob acção da luz ultra-violeta a 366 nm (A) e a 254 nm (B)	170

ÍNDICE DE TABELAS**Capítulo I**

Tabela 1. Natureza química e distribuição dos alcalóides presentes em <i>Uncaria tomentosa</i>	11
---	-----------

Capítulo II

Tabela 2. Condições utilizadas na cromatografia líquida de alta resolução com detector de fotodíodos	92
Tabela 3. Quantidade de água em diferentes amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	96
Tabela 4. Quantificação dos 3-flavanóis presentes em amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	97
Tabela 5. Valores de IC ₅₀ de diferentes amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	101

Capítulo III

Tabela 6. Tamanhos de cápsulas duras e sua capacidade aproximada	116
Tabela 7. Determinação da massa volúmica aparente do produto em bruto e do produto reduzido	129
Tabela 8. Composição das cápsulas contendo extracto liofilizado	138
Tabela 9. Composição das cápsulas contendo a mistura de extracto liofilizado e casca pulverizada	138
Tabela 10. Composição das cápsulas contendo extracto comercial	139
Tabela 11. Repetibilidade e precisão intermédia	141
Tabela 12. Exactidão do método, expressa em percentagens de recuperação e de bias, na presença da lactose	141
Tabela 13. Quantificação dos 3-flavanóis presentes em amostras de <i>Uncaria tomentosa</i>	142
Tabela 14. Resultados referentes à uniformidade de massa de cápsulas extracto liofilizado e excipientes (A4) ou casca (B)	149
Tabela 15. Resultados referentes à uniformidade de massa de cápsulas com extracto comercial e amido de milho	149
Tabela 16. Resultados referentes à uniformidade de teor das formulações A4 e B	151

Capítulo IV

Tabela 17. Composição das cápsulas contendo extracto liofilizado	162
Tabela 18. Absorvâncias obtidas no ensaio preliminar para o controlo do DPPH, na ausência e na presença de 100 µl de suco gástrico artificial	164

Tabela 19. Sensibilidade do método do DPPH otimizado, na determinação da actividade antioxidante de extracto liofilizado, em suco gástrico artificial	165
Tabela 20. Actividade antioxidante da catequina em suco gástrico artificial, ao longo do tempo	165
Tabela 21. Redução do DPPH, com cápsulas de 100 mg de extracto liofilizado ..	166
Tabela 22. Redução do DPPH, pela acção antioxidante de cápsulas contendo a mistura do extracto liofilizado com a casca pulverizada	167
Tabela 23. Redução do DPPH, pela acção de cápsulas com 150 mg de extracto comercial	168
Tabela 24. Redução do DPPH, pela acção de cápsulas de uncária Naturmil™	169

RESUMO

A *Uncaria tomentosa* é uma planta muito utilizada na medicina tradicional do Peru, sendo-lhe atribuídas importantes propriedades no tratamento de diversas patologias

Neste trabalho, preparou-se um decocto a partir de cascas pulverizadas do caule de *Uncaria tomentosa*. Caracterizaram-se os perfis fenólicos de um liofilizado do decocto (extracto aquoso liofilizado) e da casca pulverizada, recorrendo à CLAR, com detector de matriz de díodos. Em ambas as amostras o constituinte maioritário foi o ácido cafeico, tendo sido igualmente identificados o ácido protocatéquico, a catequina e a epicatequina. Verificou-se ainda a presença de diversos compostos com perfis espectrais e máximos de absorção característicos de 3-flavanóis poliméricos, correspondentes a proantocianidinas.

Com fins comparativos, monitorizou-se a actividade antioxidante, do extracto aquoso liofilizado e dum extracto comercial da planta, pelo método do DPPH, determinando-se ainda, em ambas as amostras o conteúdo em proantocianidinas pelo método da vanilina. O extracto liofilizado apresentou actividade antioxidante e conteúdo em proantocianidinas manifestamente superior à do extracto comercial. Estes resultados sugerem uma correlação entre o conteúdo em proantocinidinas e a actividade antioxidante, o que corrobora dados anteriores obtidos no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra.

As formas farmacêuticas orais sólidas apresentam vantagens relativamente às preparações usadas na medicina tradicional: são de mais fácil administração, facilitando a adesão do doente à terapêutica e permitem conferir maior estabilidade dos constituintes activos e exactidão de doses a administrar.

Dado o papel significativo desempenhado pelos antioxidantes na prevenção de grande número de doenças, orientou-se a selecção quer do extracto a incluir na forma farmacêutica, quer da própria forma farmacêutica, no sentido de uma maior actividade antioxidante e conseqüentemente, maior teor em proantocianidinas. Tendo em conta estudos *in vitro* desenvolvidos por diversos autores, sobre a absorção de proantocianidinas, pareceu preferível optar por uma forma farmacêutica de libertação convencional, de modo a permitir a dissociação das proantocianidinas de maior peso

molecular, em 3-flavanóis de menor massa, os quais são mais facilmente absorvidos no intestino delgado.

Atendendo que o sucesso na formulação de uma forma farmacêutica depende da selecção criteriosa dos excipientes usados e que a incompatibilidade entre um fármaco e os seus excipientes pode modificar a sua estabilidade e biodisponibilidade, influenciando a sua eficácia e segurança, utilizou-se o método da calorimetria diferencial de varrimento, para detectar possíveis interacções.

Com o objectivo de seleccionar as formas farmacêuticas que apresentassem requisitos de qualidade e eficácia de modo a garantirem o efeito terapêutico realizaram-se ensaios de dissolução em suco gástrico artificial, a 37°C (100 rotações por minuto), pelo método das pás, ensaios de uniformidade de massa e ensaios de uniformidade de teor nas formulações seleccionadas. Tendo em conta os resultados obtidos por Calorimetria Diferencial de Varrimento e os critérios de libertação dos princípios activos definidos para as formas de libertação convencional – pelo menos 85% do fármaco libertado nos primeiros 60 minutos – seleccionaram-se duas formulações do extracto liofilizado, preparado de acordo com a metodologia tradicional: uma contendo 50 mg de extracto liofilizado e 336,7 mg de casca pulverizada, sem excipientes, outra com 100 mg de extracto liofilizado e os excipientes seleccionados em percentagens onde as suas características desagregantes fossem maximizadas: amido de milho (10%), lactose (20%) e celulose microcristalina (10%).

Foram ainda efectuados ensaios de dissolução no extracto comercial e amido de milho e com uma forma de apresentação disponível no mercado, contendo casca pulverizada, a uncária Naturmil®, apresentando-se ambas as formulações dentro dos critérios de qualidade ensaiados exigidos.

Com o objectivo de comparar a actividade antioxidante das formas farmacêuticas desenvolvidas com outras já comercializadas, optimizou-se o teste do DPPH para monitorizar a evolução da actividade antioxidante no decurso dos ensaios de dissolução em suco gástrico artificial.

A determinação da actividade antioxidante nas formulações desenvolvidas permitiu evidenciar, também em suco gástrico, a relação entre o conteúdo em proantocianidinas e a actividade antioxidante, uma vez que as formulações preparadas a partir do extracto liofilizado, com teor mais elevado de procianidinas apresentaram uma actividade antioxidante significativamente superior às restantes formulações.

Tendo em conta o resultado obtido com a mistura da casca pulverizada e do extracto liofilizado, em que a actividade antioxidante em suco gástrico decresce a partir dos 20 minutos, e os dados de alguns estudos sugerindo que a actividade antioxidante das procianidinas mais polimerizadas é superior à dos seus oligómeros de menor grau de polimerização, foi ainda efectuado um estudo para avaliar a evolução do grau de polimerização das proantocianidinas, ao longo do tempo, por cromatografia em camada fina. Constatou-se que a amostra contendo a mistura de extracto liofilizado e casca pulverizada apresentava maior grau de despolimerização entre os 20 e os 100 minutos, o que pode constituir uma das explicações para a diminuição da actividade antioxidante ao longo do tempo, nesta amostra.

ABSTRACT

Uncaria tomentosa is a plant widely used in Peru's traditional medicine. The decoction of the vine is used traditionally for many different health problems.

A decoction was made from the bark of *Uncaria tomentosa*. The phenolic profiles of decoction and bark were analysed using HPLC, with diode array detector. In both samples it was identified caffeic acid as the major constituent. It was also identified protocatechuic acid, catechin and epicatechin. There was also the presence of a large number of compounds with characteristic profile of 3-flavanols, possibly proanthocyanidines.

For comparative purposes aqueous dried extract, *Uncaria tomentosa* barks, and also a commercial extract of this plant were monitored for their antioxidant properties, against DPPH. The lyophilised aqueous extract of *Uncaria tomentosa* barks was the more active. This was also the extract with a high content of proanthocyanidins, determined through the vanillin method. These results support previous studies that suggest the importance of proanthocyanidins in the extract antioxidant potential.

Antioxidants play a significant role in the pathogenesis of many diseases. One of the goals of this study was to get a pharmaceutical form with both antioxidant activity and high proanthocyanidins content. Early studies *in vitro* demonstrated that procyanidin oligomers are hydrolysed to mixtures of monomers and dimers in gastric milieu. Since the absorption of monomers and dimers in the small intestine it's easier than proanthocyanidins with high molecular weight, it seemed preferable to select a pharmaceutical form of conventional release.

The success of a pharmaceutical form depends on the careful selection of the excipients used, because the incompatibility between a drug and its excipients can change its stability and bioavailability, influencing its effectiveness and safety. In order to select pharmaceutical forms were carried out compatibility studies between *Uncaria tomentosa* extracts and different excipients using differential scanning calorimetry (DCS) and tests of dissolution in simulated gastric juice, at 37 °C, with 100 revolutions per minute. The results obtained allow to select two formulations of dried extract prepared in accordance with the traditional methodology: capsules containing aqueous dried extract and sprayed *Uncaria tomentosa* barks (50 mg and 336,7 mg, respectively),

without any excipients; capsules with dried extract (100 mg) and the excipients selected; corn starch 10%, lactose 20% and microcrystalline cellulose 10%. These formulations were in accordance with the requirements for quality: tests of mass trials uniformity, and of content uniformity.

Dissolution tests were also conducted with commercial extract (with starch as an excipient) and a presentation form available on the market, containing only powdered bark, named uncária Naturmil®. All the formulations were within the parameters of quality defined: at least 85% of drug released at first 60 minutes.

In order to compare the antioxidant activity of pharmaceutical forms developed with other already marketed, the DPPH test was optimised to the new experimental conditions: samples solubilized in simulated gastric juice.

The determination of antioxidant activity in all formulations suggests that there is also in gastric juice, a relationship between the content in proantocianidinas and antioxidant activity, since the formulations with dried extract, evidencing increasing levels of procyanidins had an antioxidant activity significantly higher than other formulations.

Taking into account the results obtained with a mixture of pulverized bark with dried extract, where the antioxidant activity in gastric juice decreases in a significant way, between 20 and 40 minutes, and the results from other studies which suggest that the antioxidant activity of higher molecular weight procyanidins is more effective than their monomeric procyanidins, it was also made a study in order to know the evolution of polymerization degree of procyanidines, over time, by TLC. The results suggest that the mixture of dried extract and pulverized bark had lower molecular weight procyanidins from 20 to 100 minutes, in simulated gastric fluid, which may be one explanation for its decrease in antioxidant activity over time.

ABREVIATURAS

CCF	Cromatografia camada fina
CLAR	Cromatografia líquida de alta resolução
cm	Centímetro
C-MED-100 TM	Extracto aquoso padronizado de <i>Uncaria tomentosa</i> (<0,05% alcalóides pentacíclicos oxindólicos e indólicos)
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de fotodíodos
DL50	Dose letal média aguda
DMT	Dose máxima tolerável
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	2,2, difenil-1-picril-hidrazilo
DSC	Differential Scanning Calorimetry (Calorimetria Diferencial de Varrimento)
Eur.Ph.	European Pharmacopea (Farmacopeia Europeia)
F.P. VIII	Farmacopeia Portuguesa VIII
FDA	Food and Drug Administration
g	Gramma
GSPE	Extracto de sementes de uva rico em proantocianidinas
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HeLa	Linha de células humanas do carcinoma cervical
5-HT ₂	5-hidroxitriptamina ₂
IC ₅₀	Concentração da amostra que reduz em 50%, a absorvância da solução de DPPH.
IL	Interleucina
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LPS	Lipopolissacárido
MCF7	Linha celular do cancro da mama
MeOH	Metanol

mg	Miligrama
min	Minutos
ml	Mililitro
mm	Milímetro
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-KB	Factor nuclear kappa beta
ng	Nanograma
nm	Nanómetro
PAL	Fenilalanina-amónia-líase
PM	Peso molecular
POA	Alcalóides oxindólicos pentacíclicos
PYC	Pycnogenol - extracto padronizado obtido da casca de <i>Pinus maritima</i> .
RMN	Nuclear Magnetic Resonance (Ressonância Magnética Nuclear)
ROS	Espécies Reactivas de Oxigénio
SAOS	Linha celular humana do osteosarcoma
TNF- α	Factor tumor necrose α
TOA	Alcalóides oxindólicos tetracíclicos
USP	United States Pharmacopoeia (Farmacopeia dos Estados Unidos da América)
UV	Ultra-violeta
UV/VIS	Ultra-violeta/Vísivel
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ m	Micrómetro

Capítulo I

Considerações Gerais

1.1. IMPORTÂNCIA DA FITOTERAPIA ONTEM E HOJE

O homem sempre procurou e encontrou na natureza soluções para os seus problemas de saúde. A utilização das plantas medicinais na prevenção e tratamento das doenças é feita desde os tempos mais remotos da humanidade. De facto, descobertas realizadas junto dos restos mortais dos primeiros homínídeos, comprovam que já há cerca de 60000 anos se utilizavam diversas plantas, com fins medicinais. Durante milénios, o recurso à Fitoterapia, isto é a fármacos de origem vegetal, correspondeu a cerca de 90% dos medicamentos utilizados para o alívio e cura das doenças (Cunha *et al.*, 2003). Se considerarmos o medicamento sob o ponto de vista cronológico, constatamos que a preponderância na utilização das plantas se manteve até cerca de 1930, altura em que o aparecimento das primeiras sulfamidas foi o ponto de partida para o aparecimento de milhares de moléculas sintéticas (Bezanger-Beauquesne *et al.*, 1986). A descoberta de medicamentos como os antibióticos, os analgésicos ou os anti-inflamatórios salvou muitíssimas vidas, o que, aliado à boa aceitação e eficácia deste tipo de produtos, levou a generalizar-se a sua utilização por parte da população. Nos países desenvolvidos, este facto, bem como a migração das populações dos meios rurais para as grandes cidades fez com que muitos dos conhecimentos que eram parte integrante do saber popular, relativamente ao uso das plantas, se perdessem, parecendo inevitável que a utilização das plantas medicinais pelos cidadãos se reduziria progressivamente até se tornar quase insignificante (Farinha e Cepêda, 2000).

Nos anos sessenta do século XX, as graves consequências da utilização da talidomida em mulheres grávidas despertaram a opinião pública para os possíveis inconvenientes dos medicamentos de síntese. A farmacovigilância ganhou importância e aumentaram as exigências de segurança para os medicamentos produzidos pela indústria farmacêutica (Farinha e Cepêda, 2000), assistindo-se em simultâneo ao aumento do uso e interesse pelas medicinas tradicionais, essencialmente através da utilização das plantas medicinais (WHO Information, 2003). Para este facto terá contribuído também o elevado custo de muitos tratamentos que utilizavam os medicamentos convencionais, o que encorajou as populações e certos governos sobretudo da Ásia, África e América Latina a utilizar a medicina tradicional nos cuidados de saúde primários (WHO Information, 2003). De facto, uma fracção significativa das populações dos países em desenvolvimento permanece dependente dos conhecimentos ancestrais sobre plantas

para os cuidados de saúde (Noumi *et al.*, 1999), não só por razões de ordem económica, mas também pelo reduzido número de pessoal habilitado disponível para administrar os cuidados de saúde (De Feo, 1992), usando estes produtos em alternativa, ou em simultâneo, com os medicamentos de síntese (Farinha e Cepêda, 2000).

Entre os países desenvolvidos, nomeadamente na Europa e América do Norte, mais de 50% da população utiliza a medicina alternativa ou complementar, pelo menos uma vez, durante a vida. O interesse por este tipo de medicina aumentou também entre a classe médica. Na Alemanha, por exemplo, entre 1995 e 2000 quase duplicou o número de médicos que fizeram formação específica em Fitoterapia (WHO Information, 2003).

O ressurgimento da Fitoterapia é acompanhado por duas ideias pouco precisas: a primeira é que as plantas medicinais são desprovidas de toxicidade, cuja utilização e manipulação podem ser confiadas a qualquer pessoa (Newall *et al.*, 1996). A segunda é a tendência a classificar esse produto num determinado grupo farmacológico, apenas com o conhecimento de um constituinte da planta.

O uso das plantas medicinais, em particular as espontâneas, tem gerado alguns problemas, pois é fácil fazer a colheita de espécies próximas, ou de aspecto semelhante, ou utilizar partes da planta, diversas, mas com acções terapêuticas e toxicidade diferentes (Newall *et al.*, 1996). Além disso, com as plantas medicinais, assim como com todos os medicamentos, é necessário ter precauções na sua utilização em grupos especiais de pacientes, como as grávidas e também com as contra-indicações e potenciais interacções com outros medicamentos.

Por outro lado, a actividade farmacológica duma planta inteira nem sempre resulta da simples soma dos efeitos isolados bem conhecidos, já que estes associados no mesmo extracto vegetal podem anular-se, ou pelo contrário, ter um efeito sinérgico, originando uma actividade que é, em muitos casos, diferente do que se poderia supor. Erradamente, fazem-se interpretações precipitadas que atribuem determinada actividade terapêutica a uma planta, apenas pela determinação qualitativa dos seus constituintes (Farinha e Cepêda, 2000). Métodos científicos sensíveis, para a investigação fitoquímica e para a determinação das suas actividades biológicas estão actualmente disponíveis e têm que ser tidos em conta, para uma investigação séria e criteriosa nesta área (Newall *et al.*, 1996).

Também a ter em conta são os problemas ligados às variações normais nos produtos naturais, quanto ao teor em determinados constituintes, em diferentes amostras

da mesma planta, a sua fraca estabilidade e as condições exigidas para a conservação destes produtos, que tornam mais complexa a problemática das plantas medicinais (Cunha *et al.*, 2003) e constituem por si só um desafio.

Há duas maneiras de seleccionar os produtos naturais para potencial uso futuro em medicamentos. O método clássico baseia-se no conhecimento fitoquímico, taxonómico, estudos farmacológicos e métodos de despistagem aleatórios. Os estudos etnofarmacológicos têm, no entanto, ganho popularidade entre os investigadores, por terem em conta as plantas e os conhecimentos da medicina tradicional, orientando as investigações na área das plantas medicinais e dos seus constituintes (Williams, 2001). Têm sido aplicados muitos ensaios físico-químicos e bioquímicos em estudos *in vitro*, sendo, no entanto, ainda muito escassos os estudos *in vivo* com plantas medicinais e seus constituintes bioactivos.

Em Portugal, como em outros países europeus, nomeadamente no Reino Unido, a maioria das plantas medicinais ainda não possui autorização de introdução no mercado, como medicamento (Newall *et al.*, 1996).

Neste contexto, parece urgente o aparecimento de um enquadramento legal para estes produtos, de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia (Mukherjee e Verpoorte, 2003). É essencial, por um lado, o controlo sanitário, botânico e químico da planta e por outro, o desenvolvimento de formulações adequadas, com avaliação das suas propriedades farmacocinéticas, para que seja garantida a sua eficácia terapêutica (Palma *et al.*, 2002).

1.2. A UNCARIA TOMENTOSA

1.2.1. DESCRIÇÃO E UTILIZAÇÕES ETNOFARMACOLÓGICAS

Dados recentes demonstram que a floresta tropical contém perto de metade das cerca de 500000 espécies de plantas que se estima existirem no mundo, das quais menos de 1% foram investigadas relativamente à sua actividade farmacológica. A descoberta de um novo fármaco de uma planta desta região é sempre uma ajuda importante para os esforços de conservação da floresta húmida e para a melhoria das condições de vida, conservação e valorização da cultura dos povos desta região, antes que os seus

conhecimentos sobre os usos tradicionais das plantas sejam esquecidos ou destruídos (Di Stasi *et al.*, 2002)

No Peru, existem cerca de 20000 espécies de plantas diferentes, aproximadamente 8% do número total de plantas em todo o mundo. A maior parte delas são nativas e crescem na Amazônia Peruana (Kloucek *et al.*, 2005). Os conhecimentos de Fitoterapia dos Andes, no Peru, são muito antigos, enraizados na cultura pré-colombiana (De Feo, 1992). Estes conhecimentos integraram, nos últimos séculos, aspectos da medicina ocidental convencional, pelos numerosos contactos com espanhóis, portugueses e outros europeus. Actualmente, esta cultura continua viva e, muitas vezes, representa a única forma prática de medicina a que as pessoas podem ter acesso, no seu dia a dia (De Feo, 2003).

O género *Uncaria* integra a tribo *Coptosapelteae* (Laus, 2004), mais concretamente a subtribo *Mitragyninae* (Keplinger *et al.*, 1999), da subfamília *Cinchonoideae* (Mur *et al.* 2002). Conhecem-se pelo menos 36 espécies de uncária, pelo que obviamente existem dificuldades na sua correcta identificação. A *Uncaria tomentosa* é uma *Rubiaceae*, cujas cascas são utilizadas pelo menos há 2000 anos na medicina tradicional de algumas tribos peruanas, especialmente os Asháninka (Pilarski *et al.*, 2006), povo a quem é atribuído também o nome de Kampa (Pimenta, 2005).

A *Uncaria tomentosa* é popularmente conhecida por unha de gato (Desmarchelier *et al.*, 1997), garabato (De Feo, 1992), vilcacora, samento (Falkiewicz e Łukasiak, 2001) e em casos especiais, saventáro (Reinhard, 1999). Nos Estados Unidos e Europa Ocidental, é conhecida como unha de gato ou saventaro, na Áustria e na Alemanha como Katzenkralle (Falkiewicz e Łukasiak, 2001), nomes que podem encontrar-se na literatura científica e também nas suas preparações comerciais. O seu nome mais comum – unha de gato – está relacionado com a morfologia da planta, com garras, a lembrar unhas (Cheng *et al.*, 2007).

A *Uncaria tomentosa* pode encontrar-se na floresta húmida Amazónica e outras áreas tropicais da América Central e do Sul: no Belize, Guatemala, Peru, Venezuela, Trindade e Tobago, Suriname (Keplinger *et al.*, 1999), Colômbia, Bolívia (Cunha *et al.*, 2003) e Brasil (Ganzera *et al.*, 2001), mas fundamentalmente numa região limitada dos Andes, no Peru, crescendo em bosques com muita luz, entre os 600 e 800 metros de altitude (Cunha *et al.*, 2003).

Nesta região existem sobretudo duas espécies, que se distinguem pelas flores e pelos espinhos: a *tomentosa* e a *guianensis*. A *Uncaria tomentosa* (Fig. 1) é uma trepadora gigante cuja altura, na planta adulta, pode atingir entre 10 a 30 metros (Miranda *et al.*, 2001). As folhas são perenes e as flores pequenas e amarelo-esbranquiçadas (Ganzera *et al.*, 2001) e os espinhos são pequenos, pontiagudos e de consistência lenhosa (Keplinger *et al.*, 1999). O formato e consistência dos espinhos da *Uncaria tomentosa* facilita a sua aderência à casca e ramos das árvores, sendo frequentemente encontrada em copas de árvores com 20 a 30 metros de altura (Miranda *et al.*, 2001). As flores surgem nos meses de Outubro e Novembro. O fruto é bivalvo medindo até 9 mm de comprimento (Miranda *et al.*, 2001). As sementes amadurecem em Dezembro (Reinhard, 1999) e são muito pequenas, longitudinais e aladas (Miranda *et al.*, 2001).



Figura 1. *Uncaria tomentosa* (flores, casca e espinhos)
(Miranda *et al.*, 2001)

A *Uncaria guianensis* é uma planta de dimensões mais reduzidas, rasteira, cujo comprimento na planta adulta pode variar entre 5 e 10 metros (Miranda *et al.*, 2001). As flores são vermelho alaranjadas e os espinhos mais curvados que os da *Uncaria tomentosa* (Keplinger *et al.*, 1999), o que dificulta a sua aderência às árvores (Miranda *et al.*, 2001).

A parte comercial de ambas as espécies é a casca do caule e da raiz. Entretanto, por razões de conservação e também por maiores dificuldades na colheita não se recomenda o aproveitamento das raízes. O abate deve ser realizado efectuando-se o corte preferivelmente a 100 cm de altura da base, para aumentar a probabilidade da planta voltar a brotar no tronco remanescente (Miranda *et al.*, 2001).

Como as cascas de ambas as espécies são semelhantes e presentemente é mais fácil encontrar a espécie *Uncaria guianensis*, que cresce em altitudes mais baixas, muitas vezes encontra-se no mercado uma mistura de ambas as espécies, sob o mesmo nome de unha de gato. Existem também outras espécies com o nome comum de unha de gato (ou uña de gato) na América Latina, mas que não pertencem ao género *Uncaria*, nem mesmo à família das *Rubiaceae*. A multiplicidade de plantas que existem com o nome de unha de gato reflecte-se no grande número de produtos que são vendidos com este nome, nos mercados de rua do Peru, todos eles alegando possuir acções contra uma longa lista de doenças (Reinhard, 1999).

Do ponto de vista dos Asháninka, um ser humano logo após o nascimento é constituído por uma parte física e outra espiritual que comunicam entre si por um elemento de regulação. Os distúrbios na saúde podem surgir a partir de qualquer uma destas três componentes, sendo classificadas em doenças físicas, psicológicas e do elemento de regulação. Para eliminar a perturbação deste último elemento e restabelecer a saúde são utilizadas preparações de plantas especiais – "saventaro". A *Uncaria tomentosa* é uma dessas plantas (Keplinger *et al.*, 1999). As suas cascas têm sido usadas pelos povos nativos da área onde ela cresce espontaneamente sob a forma de decocto (Ganzera *et al.*, 2001), por via interna (De Feo, 1992).

A avaliação científica e as publicações sobre a eficácia e a toxicidade dos produtos naturais, especialmente com dados humanos, são ainda raras. Embora a *Uncaria tomentosa* seja classificada como suplemento alimentar, seria útil tanto científica, como comercialmente poder avaliá-la, quer com estudos em animais, quer em humanos (Sheng *et al.*, 2001). Isto é ainda mais importante quando se sabe que a *Uncaria tomentosa* está disponível em muitos sites da Web, onde lhe são atribuídas propriedades para diversos problemas de saúde: tratamento da asma, reumatismo, artrite, inflamação, gastrite, tumores cancerígenos, doenças infecciosas, abscessos, doenças da pele, na recuperação pós parto, na prevenção de doenças, e nas irregularidades do ciclo menstrual (Aquino *et al.*, 1991; De Feo, 1992; Aquino *et al.*,

1997; Sheng *et al.*, 1998; Keplinger *et al.*, 1999; Cunha *et al.*, 2003; Garcia Prado *et al.*, 2007).

1.2.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Factores externos como o clima ou a luz podem conduzir à variação dos constituintes activos de muitas espécies vegetais, enquanto que a hereditariedade pode originar a ocorrência de diferentes quimiotipos. Por esta razão, são necessários elevados padrões de fabrico e controlo de qualidade na produção de medicamentos a partir de plantas medicinais, com uma especificação clara da composição química (Mur *et al.*, 2002). De acordo com Laus e colaboradores (1997) é pouco provável que uma única substância ou um grupo de substâncias seja responsável por todas as actividades da *Uncaria tomentosa*. Os estudos fitoquímicos revelaram a presença de uma variada gama de metabolitos bioactivos: alcalóides, triterpenos, glicósidos e flavonóides.

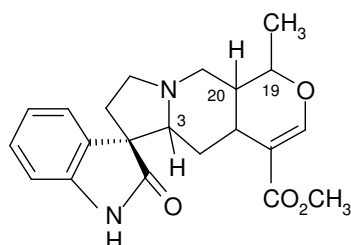
1.1.2.1. Alcalóides

Os alcalóides formam um grupo heterogéneo de substâncias orgânicas que incluem na sua fórmula molecular carbono, oxigénio, hidrogénio e azoto, geralmente sob a forma de amina. Existem várias classes de alcalóides, todos com alguma acção fisiológica no ser humano e nos outros animais, o que tem sido utilizado para a produção de medicamentos.

Na *Uncaria tomentosa* os alcalóides são na sua maioria do tipo indólico e oxindólico. As diversas tentativas para avaliar o potencial terapêutico dos compostos desta planta levaram à descoberta de dois quimiotipos, com um padrão diferente: alcalóides oxindólicos tetracíclicos (TOA) e pentacíclicos (POA). Os alcalóides oxindólicos pentacíclicos são considerados como compostos marcadores da *Uncaria tomentosa*: são eles a uncarina F (Fig. 2a), a pteropodina (Fig. 2b), a mitrafilina (Fig. 2c), a especiofilina (Fig. 3a), a isopteropodina (Fig. 3b) e a isomitrafilina (Fig. 3c) (Ganzera *et al.*, 2001).

A rincofilina (Fig. 4a) e a isorincofilina (Fig. 4b), juntamente com as suas congéneres corinoxeína (Fig. 4c) e isocorinoxeína (Fig. 4d) são alcalóides oxindólicos

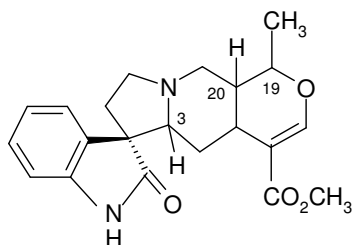
tetracíclicos, encontrados no quimiotipo TOA. Nas folhas e raízes das plantas deste quimiotipo também foram encontradas pequenas quantidades de alcalóides indólicos tetracíclicos: dihidrocorinanteína (Fig. 5a) e hirsutina (Fig. 5c), vestígios de hirsuteína (Fig. 5b) e excepcionalmente corinanteína (Fig. 5d).



2a) 3 β -H-, 19 α -Me, 20 α H (Uncarina F)

2b) 3 α -H-, 19 α -Me, 20 α H (Pteropodina)

2c) 3 α -H-, 19 α -Me, 20 β H (Mitrafilina)

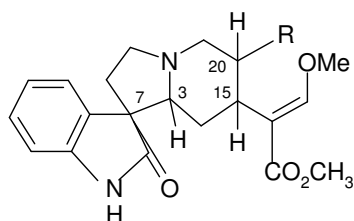


3a) 3 β -H, 19 α -Me, 20 α -H (Especiofilina)

3b) 3 α -H, 19 α -Me, 20 α -H (Isopteropodina)

3c) 3 α -H, 19 α -Me, 20 β -H (Isomitrafilina)

Figuras 2 e 3. Alcalóides oxindólicos pentacíclicos identificados na *Uncaria tomentosa*



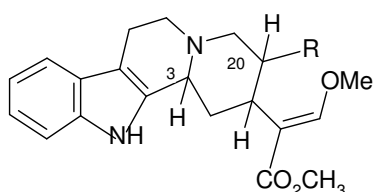
4a) 3 α -H-, 7 β -H-, 15 α -H-, 20 β -etil (Rincofilina)

4b) 3 α -H-, 7 α -H-, 15 α -H-, 20 β -etil (Isorincofilina)

4c) 3 α -H-, 7 β -H-, 15 α -H-, 20 β -vinil (Corinoxeína)

4d) 3 α -H-, 7 α -H-, 15 α -H-, 20 β -vinil (Isocorinoxeína)

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



5a) 3 α -H, 20 β -H, 20-etil (Dihidrocorinanteína)

5b) 3 β -H, 20 β -H, 20-vinil (Hirsuteína)

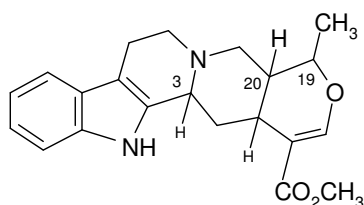
5c) 3 β -H, 20 β -H, 20-etil (Hirsutina)

5d) 3 α -H, 20 β -H, 20-vinil (Corinanteína)

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

Supõe-se que os alcalóides oxindólicos são sintetizados a partir do alcalóide indólico estereoquimicamente correspondente à aquamigina (Fig. 6a).

A *Uncaria tomentosa* possui também pequenas quantidades de alcalóides indólicos pentacíclicos: tetrahydroalstonina (Fig. 6b) e isoajmalicina (Fig. 6c) (Laus *et al.*, 1997).



6a) 3 β -H, 19 α -Me, 20 α -H (Aquamigina)

6b) 3 α -H, 19 α -Me, 20 α -H (Tetrahydroalstonina)

6c) 3 β -H, 19 α -Me, 20 β -H (Isoajmalicina)

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

A distribuição dos alcalóides nas várias partes desta planta foi estudada por diversos investigadores (Tabela 1).

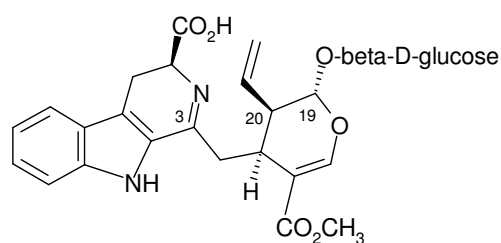
Tabela 1. Natureza química e distribuição dos alcalóides presentes em *Uncaria tomentosa* (Keplinger *et al.*, 1999; Heitzmann *et al.*, 2005)

	Alcalóides Pentacíclicos	Alcalóides Tetracíclicos
Alcalóides Oxindólicos	uncarina F (Fig. 2a) C, R, F	rincofilina (Fig. 4a) R, F, Fl isorincofilina (Fig. 4b) R, F corinoxeina (Fig. 4c) R, F isocorinoxeina (Fig. 4d) R, F
	pteropodina (Fig. 2b) C, R, F	
	mitrafilina (Fig. 2c) C, R, F	
	especiofilina (Fig. 3a) C, R, F	
	isopteropodina (Fig. 3b) C, R, F	
	isomitrafilina (Fig. 3c) C, R, F	
Alcalóides Indólicos	aquamimigina (Fig. 6a) F, R	dihidrocorinanteína (Fig. 5a) R, F
	tetrahydroalstonina (Fig. 6b) F	hirsuteina (Fig. 5b) R, F
	isoajmalicina (Fig. 6c) F	hirsutina (Fig. 5c) R, F
		corinanteina (Fig. 5d) R, F

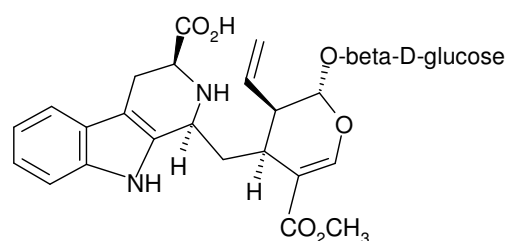
C – casca do caule, R – casca da raiz, F – Folhas, Fl – flores

Observaram-se concentrações mais elevadas em folhas jovens, nas quais o alcalóide principal é a uncarina F (Fig. 2a). Em doses mais baixas também ocorrem pteropodina (uncarina C) (Fig. 2b), especiofilina (Fig. 3a) e isopteropodina (uncarina E) (Fig. 3b). Nas folhas maduras a especiofilina é o alcalóide predominante (Laus *et al.*, 1997). A mitrafilina (Fig. 2c) ocorre em algumas das folhas mais envelhecidas, e a isomitrafina (Fig. 2c) na casca do caule (Laus, 2004).

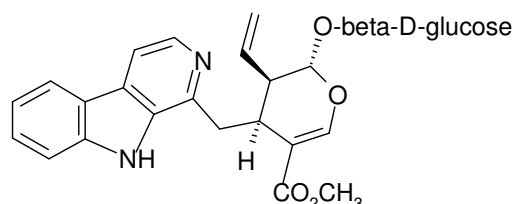
Foram ainda isolados a 5 α -carboxistrictosidina (Fig. 7), da casca da raiz (Aquino *et al.*, 1991) e três alcalóides gluco-indólicos, 5 α -carboxistrictosidina (Fig. 7), a 3,4-dihidro-5-carboxistrictosidina (Fig. 8) e lialosido (Fig. 9).



7. 5 α -Carboxistrictosidina



8. 3,4-Dihidro-5-carboxistrictosidina



9. Lialosido

Figuras 7, 8 e 9. Alcalóides gluco-indólicos identificados na *Uncaria tomentosa*

1.2.2.2. Terpenóides

Os terpenóides, também conhecidos como terpenos são substâncias que ocorrem na natureza produzidos por uma grande variedade de plantas e animais. Estes compostos têm um vasto leque de propriedades biológicas, incluindo efeitos tão diversos como actividades quimioprotectoras, em situações de cancro, antimicrobianas, antifúngicas, antivirais, antihiperglicémicas, anti-inflamatórias e antiparasitárias (Paduch *et al.*, 2007).

Os terpenóides são produtos naturais, com esqueletos de carbono, derivados do isopreno. Contêm oxigénio em vários grupos funcionais, ligações duplas e, em geral, um ou mais anéis. Esta classe de compostos subdivide-se em hemiterpenos (com uma unidade de isopreno), monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos. Uma subclasse dos triterpenos (com seis unidades de isopreno) são os esteróis, que derivavam biogeneticamente dos triterpenos e são quimicamente semelhantes às hormonas esteróides dos animais.

A *Uncaria tomentosa* contém principalmente triterpenos derivados do ácido ursólico (Fig. 10), ou oleanólico (Fig. 11) ou quinóvico, este último normalmente encontrado na forma glicosilada (Fig. 12).

Estes compostos estão presentes principalmente nas cascas do caule e da raíz. A partir das cascas da *Uncaria tomentosa* já foram isolados onze glicósidos do ácido quinóvico (Fig. 12a-l), três triterpenos polihidroxilados, ácido uncárico (Fig. 13a), o ácido 3 β , 6 β , 19 α - trihidroxi-23-oxo-Urs-12-en-28-óico (Fig. 13b) e ácido floridico (Fig. 14) (Cerri *et al.*, 1988; Aquino *et al.*, 1989; Aquino *et al.*, 1990; Aquino *et al.*, 1991; Aquino *et al.*, 1997).

Além disso, foram ainda identificados e isolados a partir da *Uncaria tomentosa* um triterpeno polihidroxilado (Fig. 13c), o ácido ursólico (Fig. 10) e o ácido oleanólico (Fig. 11) (Aquino *et al.*, 1991) e três triterpenos poli-oxigenados derivados das estruturas do ácido ursólico ou quinóvico (Fig. 15-17) (Aquino *et al.*, 1997).

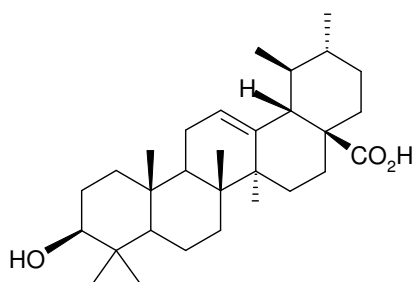


Figura 10. Ácido ursólico

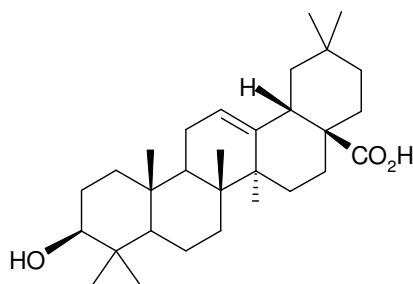
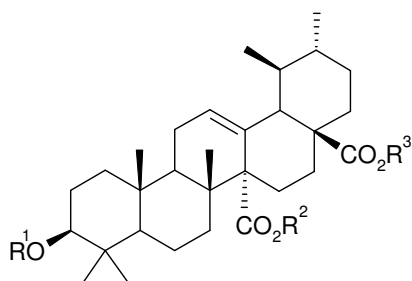
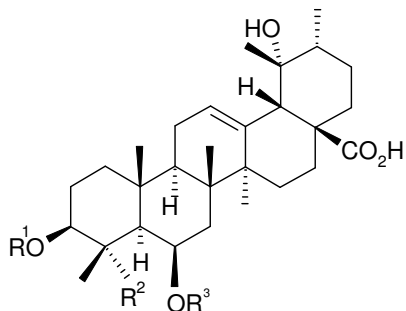


Figura 11. Ácido oleanólico



- 12a)** $R^1 = \text{Glc-(3}\rightarrow\text{1)-Fuc}$, $R^2 = \text{Glc}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12b)** $R^1 = \text{Glc-(3}\rightarrow\text{1)-Fuc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12c)** $R^1 = \text{Glc-(3}\rightarrow\text{1)-Fuc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Glc}$
 - 12d)** $R^1 = \text{Qui}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Glc}$
 - 12e)** $R^1 = \text{Fuc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Glc}$
 - 12f)** $R^1 = \text{H}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{Glc-Glc}$
 - 12g)** $R^1 = \text{Rha}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12h)** $R^1 = \text{Rha-(3}\rightarrow\text{1)-Glc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12i)** $R^1 = \text{Qui-(3}\rightarrow\text{1)-Glc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12j)** $R^1 = \text{Qui-(3}\rightarrow\text{1)-Gal}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12k)** $R^1 = \text{Rha-(3}\rightarrow\text{1)-Glc}$, $R^2 = \text{Glc}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12l)** $R^1 = \text{Glc}$, $R^2 = \text{Glc}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12m)** $R^1 = \beta\text{-Fuc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \beta\text{-Glc}$
 - 12n)** $R^1 = \beta\text{-Fuc-}\beta\text{-Glc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \text{H}$
 - 12o)** $R^1 = \beta\text{-Fuc-}\beta\text{-Glc}$, $R^2 = \text{H}$, $R^3 = \beta\text{-Glc}$
- (Glc=Glucose, Fuc=Fucose, Qui=Quinovose, Rha=Ramnose, Gal=Galactose)

Figura 12. Glicósidos do ácido quinóvico



- 13a)** $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^3 = \text{CH}_3$ (Ácido uncarico)
- 13b)** $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^3 = \text{CHO}$
- 13c)** $R^1 = R^3 = \text{H}$, $R^3 = \text{CO}_2\text{H}$

Figura 13. Ácido uncarico e seus derivados

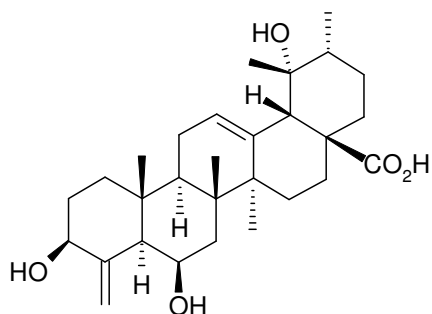


Figura 14. Ácido floridico

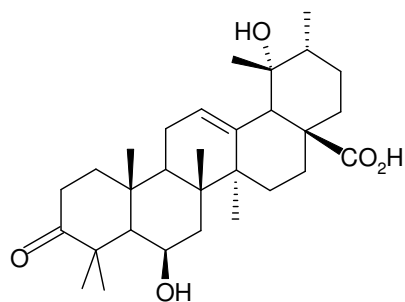
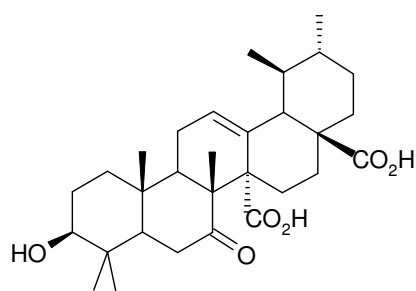
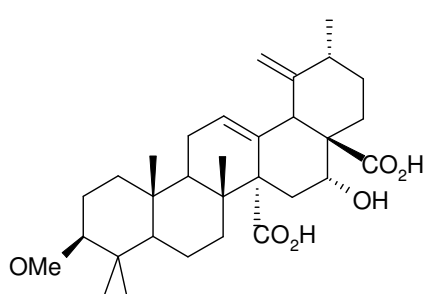


Figura 15. Derivados do ácido ursólico



Figuras 16 e 17. Derivados do ácido quinóvico

Nos últimos dez anos foram também descobertos dois triterpenos derivados do do ácido 19-hidroxiursólico (Fig. 18a-b) (Kitajima *et al.*, 2000) e dois glicósidos *n*-triterpenos, derivados de ácido piroquinóvico: os tomentósidos A (Fig. 19) e B (Fig. 20) (Kitajima *et al.*, 2003).

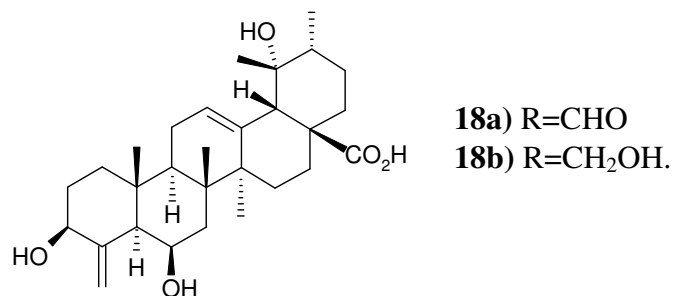


Figura 18. Derivados do do ácido 19-hidroxiursólico

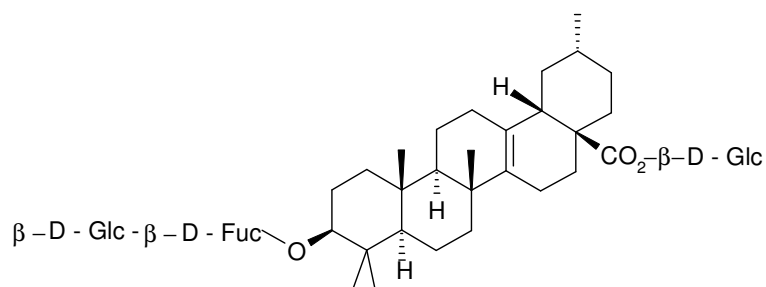


Figura 19. Tomentósido A

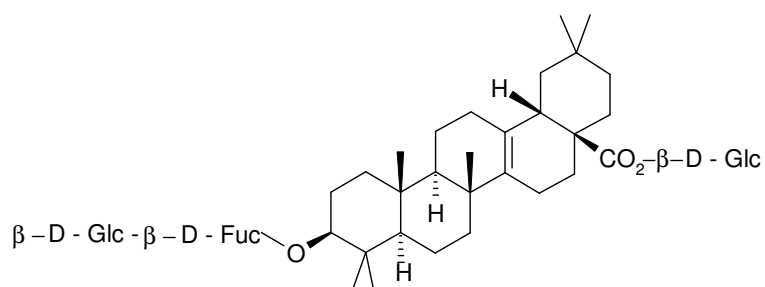


Figura 20. Tomentósido B

Finalmente, foram ainda isolados um triterpeno do tipo oleanólico (Fig. 21) e três glicósidos do ácido quinóico (Fig. 12m-o) (Kitajima *et al.*, 2004). Outros estudos permitiram ainda identificar os seguintes compostos nas cascas: um glicósido do ácido iridoide 7-deoxilogânico (Muhammad *et al.*, 2001) e um triterpeno: 7 α -acetoxidihidronomilina (Heitzman *et al.*, 2005).

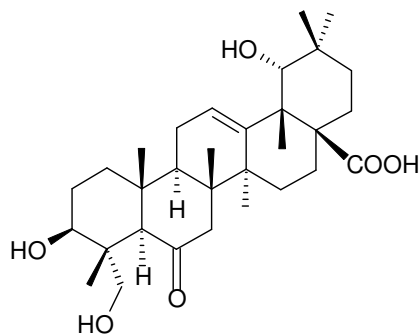


Figura 21. Triterpeno do tipo oleanólico

1.2.2.3. Esteróis

Na fracção esteróide da *Uncaria tomentosa* foram identificados campesterol (Fig. 22), β -sitosterol (Fig. 23) e estigmasterol (Fig. 24), sendo o β -sitosterol, o mais representativo (Senatore *et al.*, 1989).

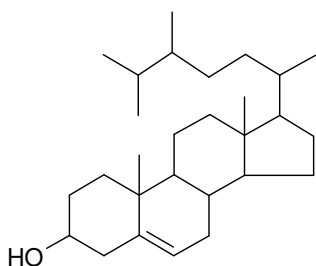


Figura 22. Campesterol

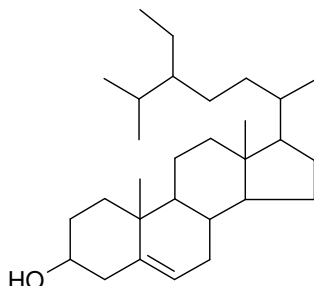


Figura 23. β -Sitosterol

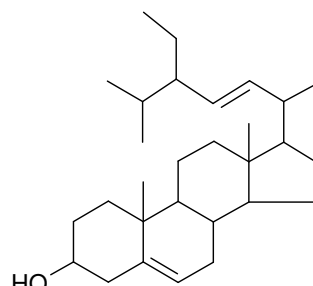


Figura 24. Estigmasterol

1.2.2.4. Flavanóides e outros compostos fenólicos

Os taninos condensados são macromoléculas diméricas ou poliméricas. O seu elemento estrutural base é um 3-flavanol (Fig. 25), sendo por isso também denominados flavanóides. São exemplos a epicatequina (Fig. 26a), catequina (Fig. 26b) e epigallocatequina (Fig. 27). A unidade 3-flavanol tem o típico esqueleto flavonóide C6–C3–C6. Os três anéis distinguem-se pelas letras A, B, C (Fig. 25). Diferem estruturalmente, de acordo com o número de grupos hidroxilo em cada anel aromático e com a estereoquímica dos carbonos assimétricos do heterociclo (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

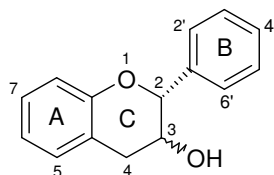


Figura 25. 3-Flavanol

Na *Uncaria tomentosa* foram isoladas a partir da casca, a epicatequina (Fig. 26a), catequina (Fig. 26b), epigallocatequina (Fig. 27), cinchonaína Ia e Ib (Fig. 28a-b), e o galhato de epigallocatequina (Fig. 29) (Sandoval *et al.*, 2002; Heitzman *et al.*, 2005).

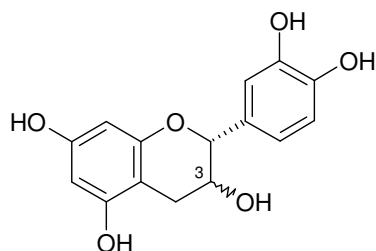


Figura 26.
a) 3 α -OH (Epicatequina)
b) 3 β -OH (Catequina)

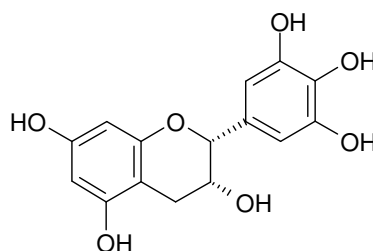


Figura 27. Epigalhocatequina

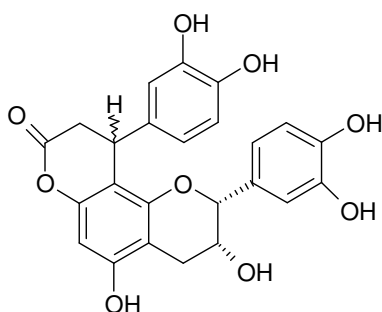


Figura 28.
a) α -H (Cinchonaina Ia)
b) β -H (Cinchonaina Ib)

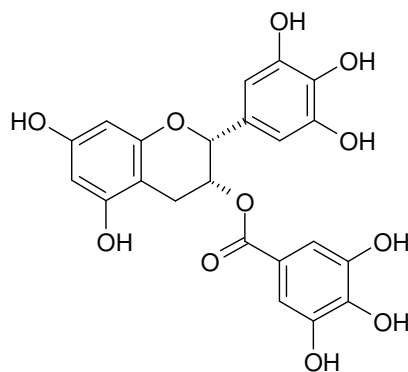


Figura 29. Galhato de epigalhocatequina

Na decocção de cascas de *Uncaria tomentosa*, analisada por cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) acoplada a um detector de matriz de díodos (DAD) foi evidenciada a presença de ácidos fenólicos: ácido cafeico (Fig. 30) e ácido protocatéquico (Fig. 31), e 3-flavanóis monoméricos, tais como a catequina (Fig. 26b) e a epicatequina (Fig. 26a), oligoméricos (dímeros e trímeros) e ainda proantocianidinas poliméricas (Gonçalves *et al.*, 2005).

Outros estudos revelaram ainda a presença na *Uncaria tomentosa* de flavonóis como canferol (Fig. 32) e dihidrocanferol (Fig. 33) (Pilarski *et al.*, 2007), bem como trifolina (galactósido do canferol) (Fig. 34) (Heitzman *et al.*, 2005).

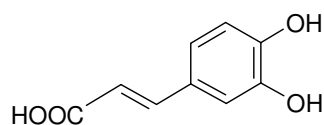


Figura 30. Ácido cafeico

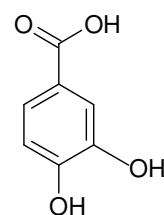


Figura 31. Ácido protocatéquico

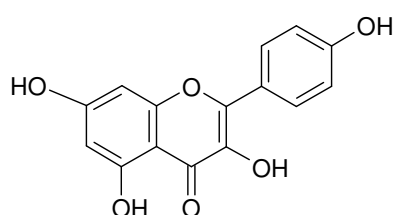


Figura 32. Canferol

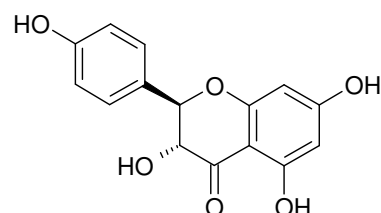


Figura 33. Dihidrocanferol

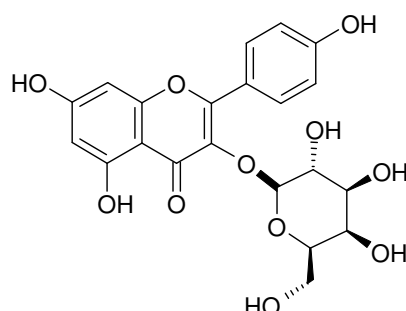


Figura 34. Galactósido do canferol

1.2.3. BIOACTIVIDADE

Os estudos farmacológicos da *Uncaria tomentosa* têm sido desenvolvidos com extractos da planta, bem como com compostos dela isolados (Ganzera *et al.*, 2001). Muitos autores atribuem aos alcalóides a maioria das actividades biológicas. De facto, a maior parte das preparações comerciais desta planta apenas referem alcalóides oxindólicos (Keplinger *et al.*, 1999) padronizando-as para elevados teores de alcalóides

pentacíclicos (superior a 97%) (Falkiewicz e Lukasiak, 2001). No entanto, muito poucos estudos têm testado a fracção dos alcalóides oxindólicos pentacíclicos isoladamente (Garcia Prado *et al.*, 2007). Ainda assim, existem alguns estudos que sugerem uma relação entre os alcalóides totais da *Uncaria tomentosa* e os seus benefícios nas dificuldades de memória associadas a disfunção dos sistemas colinérgicos (Abdel-Fattah *et al.*, 2000). Adicionalmente, foram ensaiados seis alcalóides oxindólicos isolados das raízes da *Uncaria tomentosa*: pteropodina (Fig. 2b), mitrafilina (Fig. 2c), isopteropodina (Fig. 3b), isomitrafilina (Fig. 3c), rincofilina (Fig. 4) e isorincofilina (Fig. 5). Com excepção da mitrafilina e da rincofilina todos os alcalóides demonstraram um efeito pronunciado sobre a fagocitose, determinada em dois ensaios *in vitro* (Wagner *et al.*, 1985).

Tem sido sugerido que os dois diferentes quimiotipos da *Uncaria tomentosa*, caracterizados por possuir alcalóides tetracíclicos e pentacíclicos são antagónicos. Na verdade, os alcalóides tetracíclicos oxindólicos actuam predominantemente no sistema nervoso central e periférico (Reinhard, 1999) e os resultados de estudos recentes indicam que os seus efeitos sobre os outros sistemas podem ser antagónicos aos dos alcalóides pentacíclicos. Talvez por esta razão, os curandeiros Asháninka que há mais de dois mil anos usam tradicionalmente a *Uncaria tomentosa*, recorram apenas às plantas que pertencem ao quimiotipo pentacíclico (Keplinger *et al.*, 1999), apelidando-as de savéntaro (com origem nas palavras indígenas saveshi = planta, anteáro = potente) (Reinhard, 1999). De facto, os alcalóides pentacíclicos oxindólicos parecem exhibir actividades imunomoduladoras e imunoestimulantes, revelando-se importantes no combate à SIDA e antiamiloidose, implicada na doença de Alzheimer (Muhammad *et al.*, 2001). No entanto, também tem sido referidos benefícios para alcalóides oxindólicos tetracíclicos da *Uncaria tomentosa* (Kang *et al.*, 2004, Matsumoto *et al.*, 2005), como é o caso da hirsutina, hirsuteína, corinanteína e dihidrocorinanteína. A hirsutina tem sido o alcalóide mais amplamente investigado, tratando-se de um potente agente antiviral, com acção relaxante na musculatura lisa, contribuindo assim para a redução da pressão arterial. Tem ainda actividade antiespasmódica, protectora da mucosa gastrointestinal, acção antiarrítmica, anticonvulsivante e analgésica. Os outros alcalóides indólicos tetracíclicos parecem ter propriedades semelhantes (Falkiewicz e Lukasiak, 2001).

Supõe-se, no entanto, que muitos efeitos desta planta são devidos a outros constituintes. Recentemente, têm sido realizados estudos com extractos de *Uncaria tomentosa*, preparados de forma semelhante à dos índios nativos da América do Sul, em que a planta é cozida em água, durante a noite, antes de ser administrada por via oral (Mammone *et al.*, 2006). Verificou-se que estes extractos possuem baixos teores de alcalóides (<0,05%), embora se revelem muito eficazes no tratamento da inflamação crónica e transtornos gastrointestinais (Sheng *et al.*, 2005). Num estudo com o C-Med-100™, um extracto hidrossolúvel de *Uncaria tomentosa*, formulado de modo a reproduzir a utilização tradicional, foi identificado o ácido quínico (Fig. 35) e os seus ésteres (QAE's) (Sheng *et al.*, 2005).

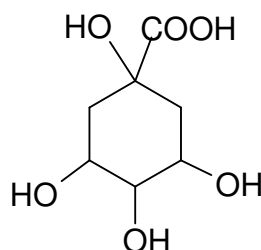


Figura 35. Ácido quínico

Por via oral, os ésteres do ácido quínico sofrem hidrólise ácida no estômago ou hidrólise enzimática pela microflora intestinal, convertendo-se em ácido quínico. Os resultados deste estudo são uma forte evidência que os QAE's são um dos componentes bioactivos do C-Med-100™ (Mammone *et al.*, 2006). De facto, o ácido quínico possui, *in vivo*, um dos efeitos do C-MED-100™, prolonga a sobrevivência dos linfócitos, embora possam existir outros constituintes que contribuem igualmente para esta resposta biológica. Esses compostos devem actuar sinergicamente com o ácido quínico, o que poderá explicar a concentração de ácido quínico relativamente elevada, que é necessária para obter um efeito semelhante *in vivo* ao do C-MED-100™ (Akesson *et al.*, 2005).

1.2.3.1 Actividade antioxidante

Os antioxidantes desempenham um papel significativo na prevenção de um grande número de doenças (Sandoval *et al.*, 2002), já que podem evitar danos causados pelas espécies reactivas oxidantes em biomoléculas vitais, como o DNA, os lípidos e as

proteínas. De facto, o ser humano está continuamente a ser exposto a diversos poluentes ambientais, incluindo pesticidas, resíduos químicos tóxicos, fumo do cigarro, mesmo em fumadores passivos, poluentes do ar nas zonas urbanas, ozono, radiação e stresse físico. Todos estes factores produzem efeitos nocivos na saúde humana, devido às enormes quantidades de radicais livres deles resultantes (Bagchi *et al.*, 2000).

O stresse oxidativo está envolvido em fenómenos como a mutagénese, carcinogénese, peroxidação lipídica, alterações da função membranar e ainda a oxidação e fragmentação de proteínas. A principal chave na prevenção das doenças cardiovasculares, degenerativas e tumorais está em manter o equilíbrio entre as substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Supõe-se por isso que os antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção das doenças crónicas. Tem sido demonstrado que alguns suplementos alimentares e produtos com actividade antioxidante conferem protecção significativa às células epiteliais do intestino, sujeitas a stresse oxidante pró-apoptótico. Em linhas celulares, decoções de *Uncaria tomentosa* e de chá verde demonstraram ser mais eficazes do que a vitamina C, parecendo ter actividade sobre as vias intracelulares que regulam a morte celular. Estes dados indicam que a dieta ou a ingestão de suplementos alimentares ricos em antioxidantes pode revelar-se preciosa para limitar a fisiopatologia de inúmeras doenças associadas com a inflamação do intestino (Williams *et al.*, 2001).

Foi observada actividade antioxidante e actividade captadora de radicais livres, tanto contra a peroxidação lipídica, como contra os danos no DNA, em extractos metanólicos de cascas da *Uncaria tomentosa* (Desmarchelier *et al.*, 1997).

Avaliações *in vitro* de extractos aquosos e etanólicos da casca do caule da *Uncaria tomentosa* demonstraram propriedades antioxidantes (Pilarski *et al.*, 2006), apesar de ser ainda controversa a natureza dos compostos aos quais deve ser atribuída esta actividade. Num estudo em que se pretendia correlacionar a composição polifenólica e as propriedades antioxidantes dos decoctos de *Uncaria tomentosa*, preparados de acordo com a medicina tradicional peruana, verificou-se que a supressão das proantocianidinas conduziam à perda das propriedades antioxidantes, sugerindo uma importante contribuição destes compostos para a referida actividade (Gonçalves *et al.*, 2005). Estes resultados revelam-se de grande importância pois a casca de *Uncaria tomentosa* contém cerca de 12% de procianidinas, enquanto que, no extracto seco o seu conteúdo pode atingir 48% (Falkiewicz e Lukasiak, 2001).

1.2.3.2. Actividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta celular multilateral que é de importância vital na manutenção da homeostase quando o organismo é atacado por agentes nocivos ou sujeito a lesões mecânicas dos tecidos. Esta resposta está associada a um aumento acentuado no número de leucócitos polimorfonucleares e monócitos no tecido afectado e com a libertação de mediadores inflamatórios. O factor tumor-necrose (TNF- α) é uma potente citocina pró-inflamatória, mediador fundamental nas condições inflamatórias crónicas (Sandoval *et al.*, 2000). O TNF- α é citotóxico para os linfócitos e em algumas situações pode agir no sentido de inibir o sistema imune. No entanto, o TNF- α e outras citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) ou a interleucina-6 (IL-6), as quimiocinas, os factores de crescimento e certas enzimas (a ciclooxigenase 2 ou a óxido nítrico sintetase induzível) são genes quiescentes em condições normais.

Fenómenos como a inflamação, a infecção ou a estimulação do sistema imune activam a transcrição de vários factores, induzindo a transcrição e tradução. De facto, está demonstrado que a regulação da transcrição do factor nuclear kappa beta (NF- κ B) é uma importante chave para o controlo dos processos de apoptose e de produção de citocinas pró-inflamatórias (Beg e Baltimore, 1996), uma vez que o NF- κ B pode regular a activação de diversas citocinas pró-inflamatórias, incluindo o TNF- α , as IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8, a activação da LPS e a fosforilo-quinase da MAP (Allen-Hall *et al.*, 2007). Portanto, a inibição do NF- κ B traduz-se em propriedades anti-inflamatórias, pois deste modo se impede uma reacção exagerada dos processos inflamatórios, que pode ser muito prejudicial para os tecidos normais do organismo. Para além disso, porque as citocinas pró-inflamatórias constituem a mais importante fonte de produção endógena de radicais livres em seres humanos, a inibição do NF- κ B é também anti-mutagénica, pois reduz a acumulação de danos genéticos, ao longo do tempo, nem sempre devidamente removidos por processos de reparação do DNA (Mammone *et al.*, 2006). Em condições ideais, a resolução dos processos inflamatórios conduz à recuperação completa da integridade do tecido afectado. No entanto, se essa resposta não for submetida a um rigoroso controlo, os componentes celulares e extracelulares dos tecidos adjacentes ao local da inflamação podem ficar danificados, o que se traduz numa situação conhecida como doença inflamatória crónica.

A doença de Chrohn e a colite ulcerosa são as duas formas mais comuns de doença inflamatória intestinal. Embora a etiologia da doença inflamatória intestinal permaneça incerta, há cada vez mais indícios de que os oxidantes, os radicais livres e a flora bacteriana desempenham um papel importante na patogénese da inflamação do tubo digestivo (Sandoval-Chacón *et al.*, 1998). Estes processos estão também relacionados com várias doenças como a aterosclerose e a artrite, julgando-se ser ainda um dos factores causadores de mais de 30% dos cancros humanos.

A *Uncaria tomentosa* é consumida em todo o mundo principalmente pelas suas propriedades anti-inflamatórias. No entanto, dependendo do processo de extracção os produtos dela obtidos diferem muitas vezes nas suas actividades anti-inflamatórias. Por isso, é muito importante otimizar-se o processo de extracção de modo a obter produtos da *Uncaria tomentosa*, com elevada actividade anti-inflamatória (Aguillar *et al.*, 2002).

Os extractos de *Uncaria tomentosa* são utilizados como suplementos alimentares com acção anti-inflamatória sem, todavia existirem dados suficientes de evidência clínica, segurança e eficácia (Mur *et al.*, 2002). Num estudo com um extracto da casca de *Uncaria tomentosa* obtido através de um processo simples de extracção aquosa observou-se actividade antioxidante com doses entre 3-10 µg/ml e acção anti-TNF- α , com doses entre 1,2-30 ng/ml. Isto é particularmente impressionante porque o extracto não se trata de um produto químico puro, o que sugere que a unha de gato pode ser um excelente adjuvante no tratamento da inflamação crónica (Sandoval *et al.*, 2000). Num outro estudo, *in vivo*, as actividades de dois extractos diferentes, com diferentes conteúdos em alcalóides, obtidos a partir de duas plantas de *Uncaria tomentosa* foram comparados: o extracto hidro-alcoólico apresentou maior actividade do que o extracto aquoso, na inibição da activação de NF- κ B, em comparação com a actividade da indometacina. No entanto, o extracto aquoso foi mais eficaz do que o hidro-alcoólico para inibir as cicloxigenases (Aguillar *et al.*, 2002). Adicionalmente, num trabalho conduzido pela equipa de investigação de Sandoval-Chacón (1998) foi evidenciado que a administração de 100 µg/ml de *Uncaria tomentosa* diminuiu os fenómenos de apoptose induzida pelo peroxinitrito e a expressão de genes associados com a indução da inflamação, impedindo a activação do factor de transcrição NF- κ B. As acções anti-inflamatórias da unha gato ocorreram em doses que são consistentes com a prática da medicina tradicional, o que proporciona uma forte evidência para a hipótese de que a

Uncaria tomentosa é um eficaz agente anti-inflamatório (Sandoval-Chacón *et al.*, 1998).

Sabe-se também que a libertação do TNF- α a partir dos monócitos é estimulada pelo tratamento com diversos agentes químicos, incluindo o lipolissacárido bacteriano (LPS), que é uma potente endotoxina bacteriana, libertada a partir da membrana externa das bactérias gram-negativas, e que actua como um imuno-estimulante. Foi demonstrado que o tratamento com extractos etanólicos de *Uncaria tomentosa* inibiu a secreção de TNF- α , dependente do LPS, mas reforçou a secreção de IL-1 β , dependente do LPS. Isto pode ser clinicamente relevante, uma vez que o bloqueio específico do TNF- α , geralmente usando terapias à base de anticorpos, tem sido um processo utilizado para o tratamento de algumas doenças inflamatórias crónicas, como a artrite reumatóide e a doença de Crohn. Estes dados sugerem que os extractos de *Uncaria tomentosa* não actuam apenas no NF- κ B, mas também de forma específica na expressão do TNF- α e da IL-1 β . Além disso, o tratamento com extractos de *Uncaria tomentosa* inibiu a activação da via da MAP quinase, de uma forma dose-dependente, mas sem aumentar a morte celular (Allen-Hall *et al.*, 2007).

A inalação do ozono tem sido associada à inflamação das vias respiratórias e a alterações funcionais dos pulmões. A administração de um decocto das cascas de *Uncaria tomentosa*, durante oito dias, em ratos machos expostos ao ozono (O₃) conduziu a níveis significativamente mais baixos de proteínas no lavado broncoalveolar, menor grau de necrose epitelial, maior número de núcleos de células epiteliais intactas na parede brônquica e diminuição do número de neutrófilos infiltrados no lúmen brônquico, quando comparados com os dos ratinhos controlo. Daqui se inferiu que o extracto de *Uncaria tomentosa* parece evitar a inflamação respiratória induzida pelo ozono, em ratos do sexo masculino (Cisneros *et al.*, 2005).

Os alcalóides parecem não interferir na actividade anti-inflamatória (Sandoval *et al.*, 2002), pelo menos exclusivamente, pois equaciona-se a hipótese desta actividade poder resultar de uma combinação de diversos compostos que actuam sinergicamente (Heitzman *et al.*, 2005). Para confirmar esta teoria Mammone *et al.* (2006) demonstrou que um extracto aquoso de *Uncaria tomentosa*, com baixos teores de alcalóides (<0,05%) apresentou eficácia no tratamento da inflamação crónica (Sheng *et al.*, 2005).

Por outro lado, estudos realizados após o fraccionamento dos extractos sugerem que as actividades biológicas da *Uncaria tomentosa*, como a inibição da produção de

TNF- α e óxido nítrico pelos macrófagos, induzida pelo LPS, possam estar associadas a compostos polares, não alcalóidicos, ocorridos nas fracções. Em termos de potência, estas fracções apresentam bioactividade consistente com a do extracto seco concentrado, o que sugere que são eles que estão na origem dos efeitos da *Uncaria tomentosa* sobre a produção do TNF- α e do óxido nítrico (Sandoval *et al.*, 2002). Estes resultados são coerentes com a hipótese de que é pouco provável que uma única substância ou um grupo de substâncias possa ser responsável por todas as acções terapêuticas da *Uncaria tomentosa* (Aquino *et al.*, 1991; Laus *et al.*, 1997). A confirmar esta teoria, foi comprovada a actividade antioxidante de um ácido quinóico glicosado, isolado da *Uncaria tomentosa* (Aquino *et al.*, 1991). Além disso, foi ainda comprovada uma moderada actividade anti-inflamatória da fracção esteróide da *Uncaria tomentosa* (Senatore *et al.*, 1989).

Apesar destas descobertas, actualmente as formulações comerciais de *Uncaria tomentosa* continuam a ser padronizadas em função do seu conteúdo em alcalóides.

1.2.3.3. Actividade anticancerígena

Os produtos naturais têm desempenhado um papel significativo na descoberta e desenvolvimento de novos agentes com actividade no cancro. Fazendo uma retrospectiva dos novos medicamentos aprovados pela Food and Drug Administration (FDA), nos Estados Unidos da América, durante o período de 1981 a 2002, com actividade anticancerígena verificou-se que 62% dos fármacos eram de origem natural (Gonzales e Valerio, 2006).

Foi concebido um estudo para explorar de forma mais aprofundada a actividade anti-proliferativa de alguns dos constituintes da unha de gato. Essa actividade foi avaliada na HL-60, uma linha de células de leucemia promielocíticas. Concluiu-se, embora com precaução, uma vez que esse facto poderia estar relacionado também com a presença de outros fitoquímicos, que a mais elevada actividade se verificava nas preparações ricas em alcalóides pteropodina/isomitrapfilina e isopteropodina (Pilarski *et al.*, 2007). Outro trabalho foi realizado para demonstrar a acção antitumoral da mitrafilina, um alcalóide pentacíclico oxindólico, extraído da casca interna da *Uncaria tomentosa*. A sua potente actividade antiproliferativa foi demonstrada em duas linhas de

células cerebrais humanas (neuroblastoma e glioma maligno) (Garcia-Prado *et al.*, 2007).

A reparação do DNA é importante na manutenção da viabilidade celular e na estabilidade genómica. As células respondem a danos no DNA de uma das seguintes formas: tolerando o dano, reparando os danos, sujeitando-se à apoptose. O fenómeno tumoral resulta dos danos não reparados (Sheng *et al.*, 2000a).

Foi demonstrado que os extractos aquosos da casca de *Uncaria tomentosa* e as suas fracções exercem uma actividade anti-proliferativa directa no crescimento do MCF7, a linha celular do cancro da mama mais amplamente utilizada (Riva *et al.*, 2001). Num outro estudo, com três diferentes linhas celulares: SAOS (linha celular humana do osteosarcoma), HeLa (linha de células humanas do carcinoma cervical) e novamente o MCF7 foi utilizada casca da raíz da *Uncaria tomentosa*, em ensaios de citotoxicidade. Os extractos foram preparados de acordo com o procedimento da medicina tradicional, liofilizados e o resíduo resuspenso em água (120 mg/ml e 240 mg/ml) e *n*-butanol (240 mg/ml). A actividade pareceu ser dose-dependente, com as doses mais elevadas mostrando efeito citostático. O efeito inibitório do extracto de *Uncaria tomentosa* foi mais forte em células HeLa. Por outro lado, demonstrou-se a indução da apoptose pela fracção solúvel em η -butanol de *Uncaria tomentosa*, através da activação da caspase 3 (de Martino *et al.*, 2006). A fim de elucidar o mecanismo molecular da apoptose induzida por esta planta medicinal utilizaram-se quatro solventes extractivos de diferentes polaridades; *n*-hexano, acetato de etilo, *n*-butanol e metanol. Em seguida, aplicou-se o método da exclusão de células coradas pelo azul de trypan e o método da citometria de fluxo para detectar as fracções com actividade anti-tumoral, numa linha celular de leucemia HL-60. Verificou-se que as fracções do extracto solúveis em acetato de etilo foram particularmente capazes de induzir a apoptose. Porém também as fracções do *n*-hexano e *n*-butanol demonstraram importante actividade anti-tumoral, quando comparadas com a fracção metanólica. Na verdade, a fracção do extracto de *Uncaria tomentosa* solúvel em acetato de etilo induziu a morte celular pela contracção do corpo celular e condensação da cromatina (o que é característico da apoptose). Outras investigações sobre o mecanismo molecular envolvido na apoptose permitiram descobrir que este fenómeno ocorre através da produção de espécies reactivas de oxigénio, libertação do citocromo C e indução da actividade das caspases (Cheng *et al.*, 2007).

Com o objectivo de elucidar o mecanismo de acção dos extractos aquosos da casca de *Uncaria tomentosa*, foi determinada a influência destes sobre as células do meristema da raiz de *Allium cepa*, o que constitui um teste simples e um modelo barato de células vegetais, comumente usado para avaliar potenciais produtos com propriedades anticancerígenas. Confirmou-se a actividade antimitótica do extracto da casca de *Uncaria tomentosa*, demonstrado pela redução ou inibição das divisões celulares do meristema, provando-se assim a sua influência sobre determinadas fases particulares da mitose. Por outro lado, observou-se que todas as divisões celulares do meristema da raiz de cebola permaneceram inalteradas, durante o período pós-incubação, o que indica que o extracto não causou aberrações cromossómicas permanentes, e que as células de cebolas, não foram mortas. Todos estes resultados parecem aumentar a esperança na utilização complementar dos extractos de *Uncaria tomentosa* no tratamento do cancro, no ser humano (Kuras *et al.*, 2006).

A fracção solúvel em água do extracto de *Uncaria tomentosa*, sem os seus compostos de elevado peso molecular, conhecido por C-MED-100™, foi utilizada num estudo *in vitro* usando modelos celulares, tendo sido demonstrada uma inibição da proliferação celular, dose dependente, em duas linhas celulares humanas de leucemia e uma linha celular de linfoma, que parece ser mediada através da indução da apoptose (Sheng *et al.*, 1998). Pensa-se que melhorar a reparação do DNA, reduzindo os danos que desencadeiam os processos da carcinogénese e estimulando a resposta imune, impedindo ou invertendo a transformação progressiva das células pré-malignas em células malignas terá grande viabilidade para impedir o desenvolvimento dos cancros invasivos (Sheng *et al.*, 2000a). Em outro estudo, o C-MED-100™ foi administrado oralmente a um grupo de voluntários, durante oito semanas consecutivas. Num dos grupos administrou-se diariamente um comprimido de 250 mg e ao outro um comprimido de 350 mg deste extracto aquoso de *Uncaria tomentosa*. Nos grupos a quem foram administrados estes suplementos, registou-se uma reparação do DNA mais eficiente, quer através do SSB (danos do DNA), quer do DSB (danos do DNA letais para a célula), induzida pela radiação, tudo isto sem efeitos tóxicos resultantes da administração da droga (Sheng *et al.*, 2001).

Por outro lado, os fármacos utilizados na quimioterapia do cancro são drogas em que muitas vezes a utilização da dose terapêutica está limitada pelos efeitos tóxicos, não selectivos, sobre os tecidos normais. A toxicidade hematológica é a forma mais nefasta

que ocorre com a maior parte dos fármacos antineoplásicos utilizados na prática clínica (Sheng *et al.*, 2000b). Quer nos ratos, quer nos voluntários humanos a quem foi administrado um suplemento de C-MED-100™, registou-se uma tendência crescente para a elevação dos glóbulos brancos. Utilizando o C-MED-100™ no tratamento da leucopenia induzida pela quimioterapia observou-se, utilizando o rato como modelo, que todas as fracções de glóbulos brancos foram proporcionalmente elevadas, resultados também confirmados por exame microscópico. O mecanismo não é conhecido, mas todos os resultados parecem apoiar a tese de um reforço geral do sistema imune, induzido pelo extracto hidrossolúvel de *Uncaria tomentosa* (Sheng *et al.*, 2000b).

Os extractos aquosos de *Uncaria tomentosa* utilizados nestes estudos continham apenas vestígios de alcalóides do tipo dos alcalóides pentacíclicos oxindólicos e indólicos (<0,05%) (Sheng *et al.*, 2000b; Sheng *et al.*, 2001), e por consequência estes compostos não poderiam ser os únicos constituintes activos. Estes investigadores propuseram o ácido quínico (Fig. 35) e análogos, como constituintes activos do extracto aquoso de unha de gato, que continha mais de 8% dos CAEs na sua composição (Sheng *et al.*, 2001, Mammone *et al.*, 2006).

De entre os terpenóides que fazem parte da composição do extracto de *Uncaria tomentosa*, o ácido ursólico (Fig. 10), um importante componente de diversas plantas, tem sido numerosas vezes referido na literatura como possuindo diversas actividades farmacológicas. Ao ácido ursólico tem sido imputada uma acção inibitória significativa na proliferação de diversas linhas celulares tumorais: A549 (carcinoma do pulmão), SK-OV-3 (carcinoma do ovário), SK-MEL-2 (cancro da pele), XF498 (tumor cerebral), HCT-15 (cancro do cólon), SNU-1 (cancro do estômago), L1210 (leucemia murine) e B16-F₀ (melanoma murine). Foi sugerido que a citotoxicidade e o efeito apoptótico do ácido ursólico nas células tumorais deve estar relacionado com a activação da enzima endonucleótica e subsequente activação da polimerase (ADP-ribose), que poderão conduzir à lise da célula (Kim *et al.*, 1998).

Por outro lado, na busca incessante de produtos com actividade anticancerígena, foi investigado o efeito protector de dois triterpenos: o ácido ursólico e o oleanólico, que fazem parte de muitas plantas, tendo sido demonstrado que ambos possuem uma importante actividade protectora (60 e 90 % respectivamente), contra a peroxidação lipídica induzida em microsomas isolados do fígado do rato, *in vitro* (Balanehru e Nagarajan, 1991).

1.2.3.4. Actividade antiviral

Numa era em que continuam a surgir novas doenças virais, como a SIDA, os produtos naturais com actividade antiviral e imunomoduladora poderão vir a desempenhar um papel significativo no tratamento e controlo dessas doenças. No entanto, a descoberta de novos compostos com actividade antiviral não tem sido fácil. Ainda existem relativamente poucos medicamentos e entre aqueles cujo uso está já aprovado é elevado o leque de efeitos secundários, o que é agravado pela capacidade que apresentam de induzir uma rápida resistência entre as estirpes virais alvo (Williams, 2001).

Os extractos de *Uncaria tomentosa* também são passíveis de ter efeitos antivirais. Este efeito foi demonstrado com a infecção por Rhinovirus tipo 1B, em células HeLa. As procianidinas cinchonaína Ia (Fig. 28a) e cinchonaína Ib (Fig. 28b) e a (-)-epicatequina (Fig. 26a), isoladas a partir da casca de *Uncaria tomentosa*, bem como um glicósido do ácido quinóico (Fig. 12f) foram considerados responsáveis simultaneamente pela actividade anti-inflamatória e antiviral, predominantemente a actividade anti-VSV (vírus da estomatite vesicular) (Aquino *et al.*, 1989; Heitzman *et al.*, 2005).

1.2.3.5. Actividade antimicrobiana

Problemas de saúde habitualmente associados com microorganismos têm sido ultrapassados com a administração de *Uncaria tomentosa*. Um extracto etanólico apresentou actividade anti-bacteriana contra: *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli* em concentração de 16 mg/ml ou inferiores (Kloucek *et al.*, 2005). Esta planta medicinal foi considerada muito promissora no combate do *Staphylococcus aureus*, microorganismo que se encontra envolvido em infecções nosocomiais e que tem revelado resistência a diversos agentes anti-microbianos. A eficácia da *Uncaria tomentosa* foi também verificada para as *Enterobacteriaceae* que têm sido implicadas em graves doenças periodontais (Ccahuana-Vasquez *et al.*, 2007).

São necessários ainda mais estudos de Fitoquímica para determinar os tipos de compostos responsáveis pelo efeito anti-bacteriano da *Uncaria tomentosa* (Kloucek *et al.*, 2005).

1.2.3.6. Actividade imunoestimulante

A resposta imune do ser humano é um fenómeno extremamente complexo que envolve mecanismos inatos e adquiridos (Williams, 2001). Existem dados históricos, tanto empíricos, como científicos que demonstram a actividade imunomoduladora de certas plantas (Spelman *et al.*, 2006).

Quatro alcalóides foram isolados das raízes de *Uncaria tomentosa*: isomitrafalina, isopteropodina, isorincofilina e pteropodina, os quais parecem aumentar a actividade dos fagócitos quer *in vitro*, como *in vivo* (Wagner *et al.*, 1985). No entanto, resultados aqui apresentados sugerem que, para além dos alcalóides deverá haver outros constituintes activos, nos extractos aquosos de *Uncaria tomentosa*, de que é exemplo o C-MED-100™ e que contribuem para o reforço da resposta imunológica (Sheng *et al.*, 1999).

Estudos realizados com o C-MED-100™, um extracto aquoso da *Uncaria tomentosa*, praticamente desprovido dos compostos de elevado peso molecular e dos alcalóides indólicos e oxindólicos, observou-se um reforço dose-dependente da fitohemaglutinina (PHA) e a proliferação de linfócitos e aumento dos leucócitos, em ratos (Sheng *et al.*, 1999). Em voluntários humanos, foi administrada uma vacina pneumocócica, 30 dias após início da suplementação com um comprimido de 350 mg de C-MED-100™. Após duas administrações diárias, durante dois meses, não houve efeitos colaterais tóxicos e registou-se uma melhoria estatisticamente significativa da resposta imune, expressa por uma elevação no índice de linfócitos/neutrófilos no sangue periférico e uma resposta imunitária pneumocócica mais eficiente (Lamm *et al.*, 2001).

Com o objectivo de compreender melhor o efeito imunomodulador verificado, um grupo de ratinhos foi alimentado com o C-Med 100™, verificando-se um aumento dose-dependente no número de células do baço, mantendo-se as proporções normais entre as células B e T, as células *natural killer* (células NK), os granulócitos e os linfócitos de memória. Não houve também modificações detectáveis da arquitectura linfóide do baço, mesmo após tratamentos de longo prazo, e quando o tratamento foi

interrompido, o número de células regressou aos níveis normais, em quatro semanas. Concluiu-se que o tratamento prolongado com o C-Med-100™ aumenta significativamente a sobrevivência dos linfócitos na periferia dos órgãos linfóides, sem aumentar a sua taxa de proliferação, o que sugere a sua utilização como um agente potencial para acelerar a recuperação clínica dos doentes com leucopenia (Akesson *et al.*, 2003).

Extractos aquosos da casca do caule da *Uncaria tomentosa*, provenientes de diferentes áreas do Peru demonstraram acção estimulante, em macrófagos dos ratos, com o conseqüente aumento de produção de interleucina-1 e interleucina-6 (Lemaire *et al.*, 1999).

Com o objectivo de caracterizar melhor a actividade imuno-estimulante da *Uncaria tomentosa* sobre os constituintes celulares do sistema imunitário, foi avaliada a resposta hematopoiética em ratos infectados com *Listeria monocytogenes* e tratados com o extracto desta planta. Esta bactéria Gram-positiva, intracelular facultativa, tem sido amplamente utilizada como modelo experimental para estudar os mecanismos envolvidos na defesa antimicrobiana inata e mediada por células. Ela replica-se principalmente dentro dos macrófagos, desencadeando um notável aumento da resposta imunitária inata, o que exige interações entre neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK) e células T. Durante as fases iniciais da infecção, a produção e a migração dos fagócitos derivados de células progenitoras hematopoiéticas, da medula óssea para os tecidos infectados, desempenham um papel importante na limitação do crescimento bacteriano, e depende da presença de factores específicos de crescimento chamados de factores estimulantes de colónias (CSFs). A administração oral de 50 e 100 mg/kg de um extracto aquoso de *Uncaria tomentosa*, sete dias antes de uma dose sub-letal de bactérias, impediu a mielossupressão e, concomitantemente, restaurou os números de células progenitoras dos macrófagos-granulócitos (*granulocyte-macrophage colony-forming cells*), ou abreviando - CFU-GM) do baço. De grande importância é o facto de que a dose de 100 mg/kg do extracto de *Uncaria tomentosa* controlou a produção dos factores estimulantes das colónias (CSFs), assim como os CFU-GM. Os resultados obtidos demonstram que esta planta tem um efeito estimulante sobre a resposta hematopoiética em ratinhos infectados e normais, que pode ser responsável, pelo menos em parte, pelo reforço da protecção, face a uma infecção letal. Foi ainda observado, no mesmo estudo, um aumento da produção de IL-1 e IL-6 em ratinhos não infectados,

tratados com 100 mg/kg de extracto de *Uncaria tomentosa*. Tanto a IL-1, como a IL-6 são necessárias para a resistência à listeriose, surgindo durante a fase inicial da infecção. Além disso a IL-1 também entra em sinergia com a IL-12, estimulando a produção de interferon- γ (IFN- γ), essencial para a activação dos macrófagos. Estes resultados, no conjunto, sugerem que esta planta modula indirectamente a actividade imunológica e, provavelmente, impede a supressão da resposta imune induzida pela *Listeria*, induzindo uma maior reserva de progenitores mielóides na medula óssea, em consequência da libertação de citocinas (CSFs, IL-1 e IL-6) biologicamente activas (Eberlin *et al.*, 2005).

1.2.3.7. Actividade protectora neuronal

Os alcalóides de que é bom exemplo a morfina, têm sido amplamente utilizados na história humana para aliviar a dor. No entanto, durante muito tempo não foi feita nenhuma relação entre o conteúdo de alcalóides da *Uncaria tomentosa* e a actividade antinociceptiva. Tendo em conta este facto, foram analisadas as propriedades antinociceptivas de uma fracção de *Uncaria tomentosa* contendo 95% de alcalóides oxindólicos, em modelos nociceptivos químicos e térmicos, em ratos. Foi demonstrado que a administração sistémica da *Uncaria tomentosa* provoca uma inibição dose-dependente da resposta comportamental nociceptiva em ratos submetidos a estímulos indutores de dor química e térmica e um envolvimento dos mecanismos serotoninérgicos nesta actividade. Além disso, os resultados do presente estudo mostraram que a fracção de *Uncaria tomentosa* produz actividade antinociceptiva que parece ser mediada por uma interacção com os receptores 5-hidroxitriptamina₂ (5-HT₂) (Jurgensen *et al.*, 2005).

Existem também estudos com a rincofilina e a isorincofilina, os principais alcalóides tetracíclicos oxindólicos das espécies de *Uncaria*. Estes alcalóides actuam sobre o sistema cardiovascular e também no sistema nervoso central com efeitos protectores sobre a isquemia cerebral e a sedação (Shi *et al.*, 2003). A rincofilina demonstrou efeito protector dos danos induzidos pela dopamina na linha celular de neurónios NT₂ (Shi *et al.*, 2002). Supõe-se que os receptores de neurotransmissores, como o N-metil-D-aspartato (NMDA), muscarínicos M₁ e a 5-hidroxitriptamina₂ estão envolvidos no processo (Kang *et al.*, 2004). Mais recentemente, num outro trabalho, verificou-se que a isorincofilina e também a isocorinoxeína, suprimem a função do

receptor 5-HT₂, de forma dose dependente, em ratos. A rincofilina e a corinoxéina, estereoisómeros da isorincofilina e da isocorinoxéina, respectivamente, não tiveram esse efeito inibitório nesta tão importante resposta comportamental mediada por receptores (Matsumoto *et al.*, 2005).

1.2.3.8. Acção protectora sobre a pele

A pele é o maior órgão do corpo e pode ser vista como a principal barreira defensiva que protege o resto dos nossos órgãos internos das agressões do meio ambiente. De acordo com esta função biológica, a pele tem a capacidade de absorver nutrientes, toxinas ou metabolitos de dentro ou fora do corpo. Por conseguinte, as primeiras manifestações do envelhecimento precoce geralmente ocorrem neste órgão. A aplicação tópica de antioxidantes diminui os danos de DNA e de outros danos macromoleculares subsequentes, apresentando-se assim como uma forma de tratamento eficaz. Foi assim investigada a possibilidade de utilizar extractos aquosos de *Uncaria tomentosa*, na aplicação tópica em culturas primárias da pele, para reforçar a protecção da pele perante a exposição a radiação ultravioleta (UV). Os resultados demonstraram claramente que a co-incubação com C-Med-100™ reduziu a morte celular da pele, perante a exposição UV, e essa protecção foi reforçada por um aumento concomitante da reparação do DNA. Assim, concluiu-se que o C-Med-100™ ou os seus constituintes bioactivos documentados poderiam tornar-se potencialmente úteis para proporcionar protecção solar reforçada (Mammone *et al.*, 2006).

1.2.3.9. Actividade sobre os receptores estrogénicos

O extracto aquoso de *Uncaria tomentosa* parece interagir em locais distintos no receptor de estrogénio (Salazar e Jayme, 1998) o que poderá estar relacionados com a sua acção especial de contraceção (Kuras *et al.*, 2006). Na verdade, uma redução significativa na ligação específica do estradiol foi detectada 1 hora após exposição ao extracto aquoso de *Uncaria tomentosa* (Salazar e Jayme, 1998).

1.2.3.10. Actividade protectora do sistema cardiovascular de extractos com alcalóides e proantocianidinas do tipo dos presentes na *Uncaria tomentosa*

Alcalóides tetracíclicos da *Uncaria*, tais como a rincofilina e a isorincofilina actuam principalmente sobre o sistema cardiovascular (Shi *et al.*, 2003), exercendo efeitos hipotensores e vasodilatadores. No entanto, o mecanismo de acção não é claro, apesar de alguns resultados sugerirem que podem actuar através de múltiplas vias Ca^{2+} (Zhang *et al.*, 2004). Os estudos farmacológicos com os alcalóides tetracíclicos: hirsutina, hirsuteína, rincofilina, isorincofilina e dihidrocorinanteína, isolados da *Uncaria rhynchophylla*, alcalóides também presentes no quimiotipo TOA da *Uncaria tomentosa* revelaram ter um efeito hipotensor, em ratos, que poderá ser parcialmente devido ao efeito vasodilatador induzido pelo bloqueio da acção dos α -adrenoreceptores (Ozaki Y., 1989). A rincofilina mostrou também inibir a agregação das plaquetas, em coelhos (Chen *et al.*, 1992), enquanto a hirsutina também revelou ter efeito antiarrítmico em arritmias induzidas pela aconitina, em ratinhos, e arritmias induzidas pela ubaína, em cobaias (Ozaki Y., 1989). Outro estudo indica igualmente que a hirsutina e a dihidrocorinanteína têm efeitos directos sobre o músculo cardíaco através da inibição de múltiplos canais iónicos, o que pode explicar a sua actividade cronotrópica negativa e antiarrítmica (Masumiya *et al.*, 1999). Apesar destes resultados, a realidade é que quase todos os extractos de *Uncaria tomentosa* disponíveis comercialmente, são padronizados para uma elevada concentração de alcalóides pentacíclicos (Falkiewicz e Lukasiak, 2001) e, talvez, por esta razão, não existam estudos sobre os efeitos benéficos dos alcalóides da *Uncaria tomentosa* no sistema cardiovascular.

No entanto, existem também outros compostos na *Uncaria tomentosa* que podem contribuir para essa actividade. Na verdade, de acordo com Gonçalves e colaboradores (2005), a decocção da casca da *Uncaria tomentosa* é composta principalmente por ácidos fenólicos, essencialmente ácido cafeico e proantocianidinas e no contexto da saúde cardiovascular, os 3-flavanóis, receberam recentemente atenção (Keen *et al.*, 2005).

1.2.4. TOXICIDADE E EFEITOS SECUNDÁRIOS

Centenas de produtos naturais estão à disposição do consumidor, embora alguns possam ser potencialmente tóxicos quando ingeridos em doses elevadas ou em combinação com outros medicamentos (Santa Maria *et al.*, 1997). É também necessário dispor de mais informações para avaliar os efeitos adversos destes produtos. Sabe-se que os extractos de *Uncaria tomentosa* não devem ser usados em mulheres que querem engravidar, ou durante a gravidez, devido à sua actividade contraceptiva e até que os seus efeitos sejam mais conhecidos, é aconselhável evitar também o uso do extracto de *Uncaria tomentosa* em mulheres a amamentar e em crianças com menos de três anos (Williams, 2001).

Devido ao sabor amargo do extracto de *Uncaria tomentosa* pode ocorrer uma ligeira náusea, após a sua ingestão (Williams, 2001), devendo ser utilizada com precaução em doentes com dispepsia (Cunha *et al.*, 2003). No entanto, não foram observados outros efeitos adversos nas doses de *Uncaria tomentosa* que são normalmente utilizadas.

As preparações de *Uncaria tomentosa* tradicionalmente usadas entre os índios nativos da América do Sul estão agora disponíveis comercialmente nos Estados Unidos da América e outros países industrializados (Valerio e Gonzalez, 2005), como uma medicina alternativa. Apesar da sua longa história de utilização médica, há flagrante falta de estudos de toxicidade (Sheng *et al.*, 2000a).

Num estudo com dez ratinhos em jejum foi administrada uma suspensão aquosa a 40% de raiz de *Uncaria tomentosa* contendo 35 mg de alcalóides totais pentacíclicos oxindólicos por g. A morte de dois dos dez ratinhos ocorreu nas primeiras 4 horas de tratamento, tendo-se observado hemorragia do estômago e dos intestinos, e ainda palidez do fígado e do baço. A dose letal média aguda (DL50) do extracto aquoso foi superior a 16 g/kg corporal (Keplinger *et al.*, 1999).

Em vitelos foi demonstrado que uma preparação certificada de *Uncaria tomentosa* (decocto das cascas), não apresentava toxicidade quanto aos parâmetros hematológicos de rotina: plaquetas e eritrócitos, concluindo-se que a *Uncaria tomentosa* é um produto seguro para o sistema hematopoiético e que pode ser útil como um moderado potenciador da imunidade celular em bezerros (Bednarek *et al.*, 2004).

Com o C-MED-100™, tanto em animais como em seres humanos, a DL 50 e a DMT (dose máxima tolerável) foram superiores a 8 g/Kg, o que faz com que seja comparável à DL 50 do sal de cozinha (8-10 g/Kg). Num estudo piloto realizado com voluntários humanos, uma dose diária de 350 mg (5mg /kg), por 6 semanas, não originou sinais ou sintomas tóxicos (Sheng *et al.*, 2000a).

Foi ainda realizado um estudo sobre os potenciais efeitos tóxicos *in vitro* de extractos aquosos da casca de *Uncaria tomentosa*, testando diferentes concentrações desta planta em mamíferos (linhagem celular de hamster chinês) e células bacterianas. Os extractos não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas (10, 20, 30, 40, 50, 75 e 100 mg/ml) (Santa Maria *et al.*, 1997).

Em resumo, os estudos toxicológicos disponíveis não revelaram toxicidade grave resultante da ingestão oral de extractos de *Uncaria tomentosa* e foram sugestivos de um baixo potencial de toxicidade oral aguda e subaguda (Valerio e Gonzalez, 2005).

Além disso, em estudos com a dose tópica simulada de 5 mg/ml de C-Med-100™, utilizados em cultura de pele humana, não foi observada toxicidade associada com a presença ou ausência de irradiação ultravioleta, quando avaliada por exame histopatológico da célula. Pelo contrário, o C-Med-100™ protegeu a pele contra as queimaduras solares e a morte celular induzida pelos UVB. No entanto, os efeitos tóxicos resultantes da absorção sistémica do C-Med-100™ e os efeitos cumulativos da exposição repetida aos UVB não foram avaliados neste estudo (Mammone *et al.*, 2006).

1.2.5. INTERACÇÕES MEDICAMENTOSAS

Apesar dos efeitos benéficos relatados pelos próprios utilizadores, o uso indiscriminado dos extractos e da própria casca de *Uncaria tomentosa* sem quaisquer critérios médicos pode, em alguns casos, ser perigoso. No entanto, existem poucos estudos sobre as suas interacções medicamentosas e efeitos secundários.

Sabe-se que não deve ser usada em doentes com órgãos transplantados, ou enxertos de pele, que estão a utilizar fármacos imunossupressores, devido às suas propriedades imunoestimulantes (Cunha *et al.*, 2003).

Os radiobiocomplexos tais como o pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) são marcadores amplamente utilizados em estudos de cintilografia (tomografia

computadorizada de emissão *single-photon*) principalmente da tiróide, mas também do cérebro e estômago. Um estudo utilizando ratos Wistar sugeriu que a *Uncaria tomentosa* pode agir de forma significativa, sobre a biodistribuição do $\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$, em órgãos específicos, como o coração, o pâncreas e o músculo. Embora estes resultados tenham sido obtidos com animais, é recomendável prudência na interpretação dos exames da medicina nuclear, quando o paciente está a utilizar esta planta, porque ela pode confundir o diagnóstico com consequências inesperadas (Moreno *et al.*, 2007).

Além disso, uma vez que a rincoflina tem um efeito anti-hipertensor, o seu uso concomitante pode potenciar a acção de fármacos anti-hipertensores e deve ser evitado (Williams, 2001).

1.3. PROANTOCIANIDINAS

Os polifenóis são micronutrientes abundantes nas nossas dietas cujo interesse aumentou consideravelmente devido aos seus potenciais efeitos benéficos na saúde humana. Há compostos fenólicos que são marcadores de uma dada espécie de planta ou mesmo dum órgão ou tecido particular dessa planta.

Os flavonóides são os mais abundantes polifenóis das nossas dietas. Podem ser divididos em várias classes (Fig. 36), de acordo com o grau de oxidação e de insaturação do heterociclo. Temos assim: flavonóis (nomeadamente a quercetina), flavonas (nomeadamente a luteolina), isoflavonas (nomeadamente a genisteína), flavanonas (nomeadamente a naringenina), antocianidinas (nomeadamente a cianidina), flavanóis (nomeadamente a epicatequina) e as proantocianidinas, ou taninos condensados, que são flavanóis poliméricos (Scalbert e Williamson, 2000; Spencer, 2003).



Figura 36. Diferentes classes de flavonóides.

Os flavonóides estão amplamente distribuídos entre as plantas medicinais e em muitos alimentos de origem vegetal, nomeadamente o vinho tinto, o chá, as maçãs, o chocolate, ou o cacau.

As proantocianidinas são caracterizadas por possuírem estrutura polifenólica, peso molecular elevado, capacidade de precipitar macromoléculas (proteínas, hidratos de carbono, celulose) e alcalóides. Nos vegetais superiores podem-se distinguir dois grandes grupos de taninos: os hidrolisáveis e os condensados, encontrados em numerosas lenhosas e em algumas plantas superiores herbáceas (Kolodziej *et al.*, 2001). Foi ainda identificado um terceiro grupo de taninos, os florotaninos, encontrados em espécies de vários géneros de algas castanhas (Porter, 1989).

Os taninos condensados são um dos grupos mais ubíquos nas plantas (Kolodziej *et al.*, 2001). Encontram-se em todos os órgãos das plantas (folhas, raízes, cascas e lenhos), podendo a mesma planta apresentar simultaneamente os dois grupos de taninos, os hidrolisáveis e os condensados, embora predomine um deles. A riqueza relativa em taninos varia consoante os órgãos, a idade, ou o estado de maturação. Encontram-se dissolvidos nos vacúolos, normalmente combinados sob a forma de complexos solúveis.

Os taninos condensados são macromoléculas diméricas ou poliméricas, que têm como unidade estrutural básica o 3-flavanol, ligado por uniões carbono-carbono. Os mais simples e mais comuns são dímeros ligados em 4→8. Os oligómeros superiores são formados por sucessivas adições de mais unidades 3-flavanol.

Concluiu-se que os polímeros que contêm predominantemente unidades de epicatequina e catequina têm de longe a mais ampla distribuição e ocorrem mais frequentemente. Designam-se por procianidinas (Fig. 37) (Porter, 1989). Os oligómeros e polímeros formados por sucessivas unidades de galhocatequina ou epigalhocatequina designam-se por prodelfinidinas.

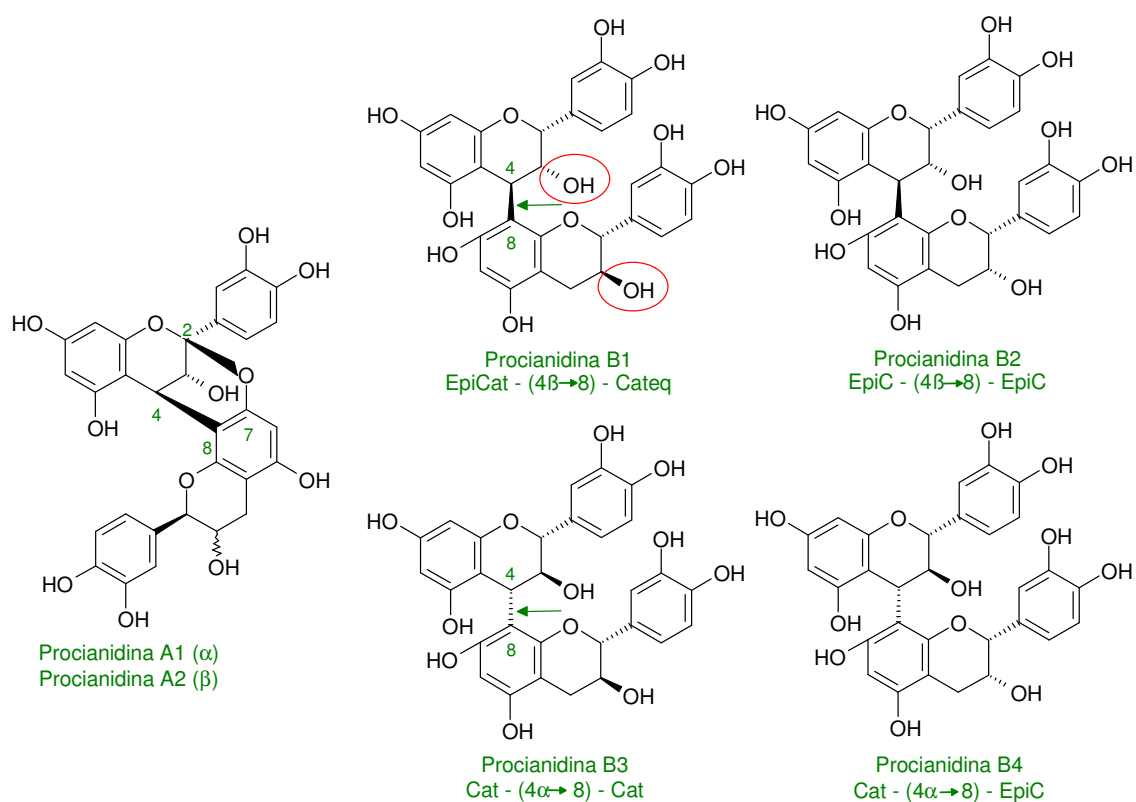


Figura 37. Estruturas de procianidinas

Nos últimos anos tem sido dado a estes compostos um interesse considerável devido às suas propriedades biológicas, encontrando-se presentes em muitas preparações comercializadas. Estudos realizados no Laboratório de Farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, comprovam a actividade antioxidante/anti-radicalar de decoctos preparados a partir de cascas da *Uncaria tomentosa*, provenientes do Peru e sugerem que essa actividade está particularmente associada às proantocianidinas neles presentes (Gonçalves *et al.*, 2005).

1.3.1. BIOSSÍNTESE

A estrutura básica dos taninos condensados, o 3-flavanol, é biossintetizada por uma via mista (Fig. 38): via do ácido chiquímico e via do acetato. O ácido chiquímico é o precursor do composto inicial da síntese dos flavonóides: a fenilalanina. Este aminoácido aromático depois de desaminado pela fenilalanina-amónia-líase (PAL) produz ácido cinâmico. Este, por acção da 4-hidroxilase cinamato é convertido em ácido *p*-cumárico. Estas duas enzimas estão associadas: o ácido cinâmico não é libertado pela PAL, mas sim transferido directamente para o centro activo da segunda enzima. Posteriormente, ocorre a adição da CoA, catalisada pelo *p*-cumarato/CoA liase, originando a *p*-cumaroil-CoA, que ao reagir com três moléculas de malonil-CoA forma a naringenina chalcona. Esta reacção é catalizada pela chalcona sintetase. Finalmente, ocorre a ciclização do anel, catalizada pela chalcona isomerase, para dar origem à naringenina. Desta forma, nos flavanóides, o anel A é formado via acetato, enquanto o anel B resulta da via chiquimato e os três átomos de carbono que ligam o anel A ao anel B derivam do fosfoenolpiruvato (Samuelsson, 1999).

Subsequentes hidroxilações, reduções e metilações conduzem à formação das diferentes classes de taninos condensados.

1.3.2. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

Os taninos possuem a capacidade de precipitar macromoléculas (proteínas, hidratos de carbono, celulose, alcalóides). É precisamente esta capacidade de precipitar proteínas, em especial as proteínas salivares na cavidade bucal, que lhes confere o seu carácter adstringente facilmente reconhecido em alimentos ricos em taninos (Santos-

Buelga e Scalbert, 2000). São normalmente substâncias amorfas, verificando-se que a sua solubilidade na água diminui à medida que aumenta o peso molecular. Os taninos são ainda solúveis no álcool e acetona, pouco solúveis no éter e acetato de etilo e insolúveis no éter anidro, clorofórmio e benzeno.

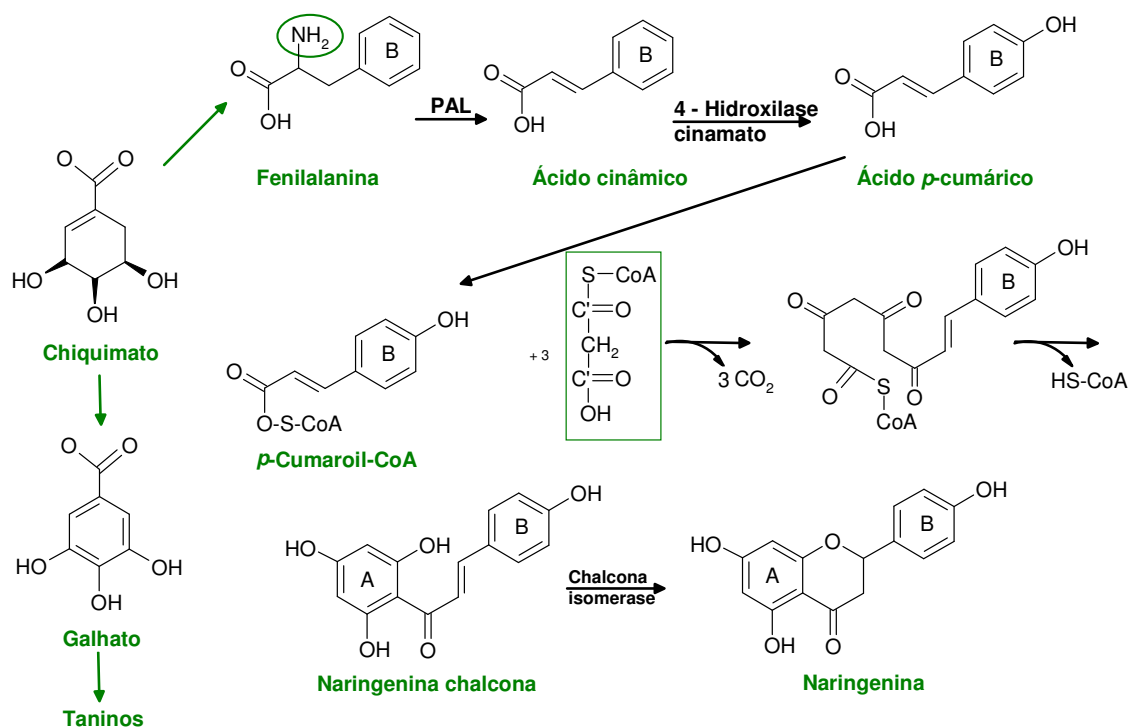


Figura 38. Biossíntese de flavonóides

Oxidam-se facilmente por acção do ar, e principalmente em meio alcalino, originando soluções coradas de amarelo ou castanho. Com os metais pesados formam quelatos. São substâncias redutoras, originando complexos corados com o cloreto férrico, de coloração azul (no caso dos hidrolisáveis) ou verde (no caso das proantocianidinas), característica que pode ser utilizada para a sua identificação.

Sob a acção da temperatura sofrem decomposição térmica, originando pirocatecol (1,2-dihidroxibenzeno), no caso das proantocianidinas, razão porque também são designados por taninos pirocatéquicos.

Contrariamente aos taninos hidrolisáveis, as proantocianidinas são muito resistentes à hidrólise. A reacção mais característica deste grupo de taninos (Fig. 39) baseia-se na rotura, em meio ácido, das ligações interflavânicas, resultando as unidades inferiores, na forma livre, e carbocátions correspondentes às unidades de extensão, os

quais, por oxidação dão lugar às antocianidinas correspondentes. A designação dos taninos condensados por proantocianidinas relaciona-se precisamente com esta sua conversão parcial em antocianidinas, em meio fortemente ácido.

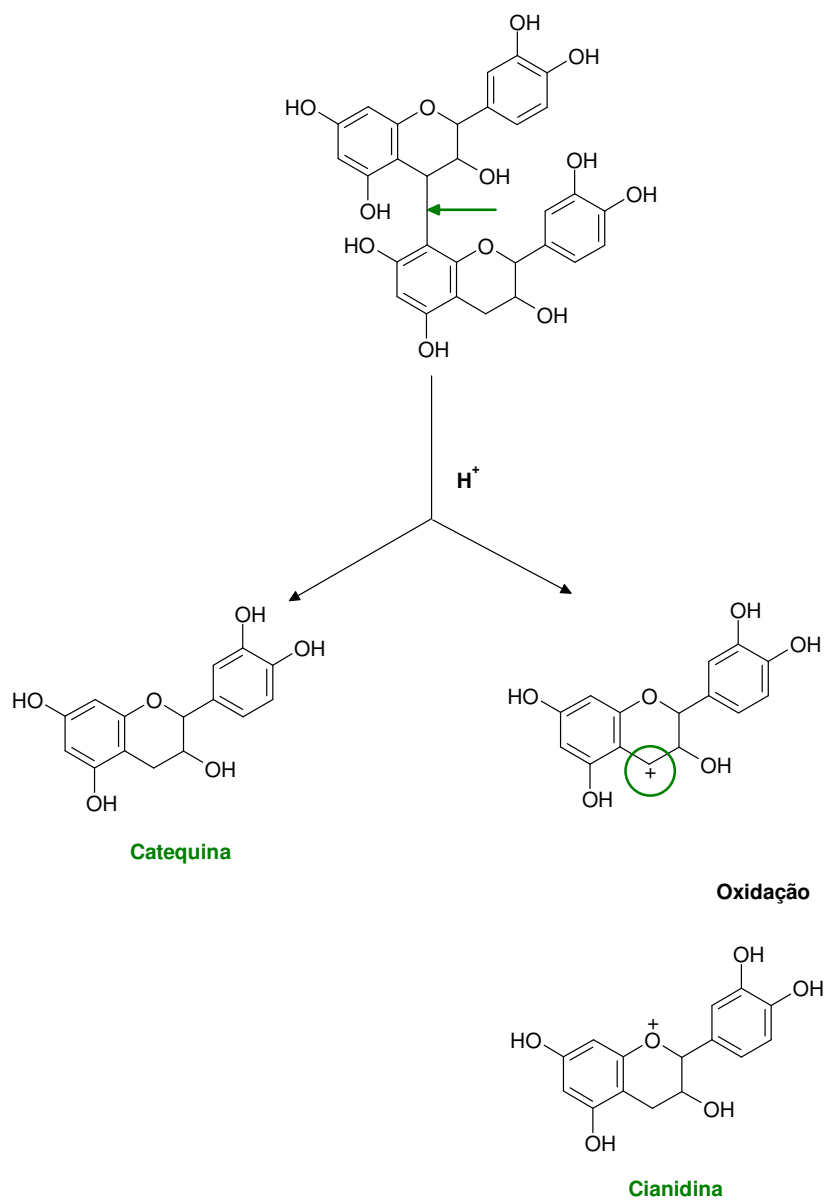


Figura 39. Comportamento das proantocianidinas em meio ácido

A facilidade com que a ligação interflavânica é clivada pelos ácidos varia muito: as ligações 4→6 são mais resistentes a esta clivagem do que as ligações mais frequentes, 4→8 (Schofield *et al.*, 2001).

A extracção das proantocianidinas é geralmente realizada por decocção, com misturas hidro-alcoólicas ou de água e acetona, recorrendo-se a técnicas cromatográficas para o seu isolamento e identificação.

Em meio ácido os 3-flavanóis podem ainda sofrer reacções de substituição electrofílica com aldeídos. Quando esta reacção tem lugar com a vanilina forma-se um produto intermediário que se desidrata rapidamente para originar o produto final da reacção, um composto corado, usado para a análise espectrofotométrica dos 3-flavanóis e seus derivados, nomeadamente as proantocianidinas.

A vanilina reage nas posições 6 e 8 do anel A, posições de carácter fortemente electronegativo, mas não reage nem como o anel B dos 3-flavanóis, nem com as flavonas ou flavonóis, por possuírem um grupo cetona na posição 4, características que dão a esta reacção uma certa especificidade.

Outro aldeído largamente utilizado é o p-dimetilaminocinamaldeído (DMACA) que apresenta a vantagem em relação ao vanilinaldeído de não ser sensível à luz, gerando cromóforos com máximos de absorvância entre 632 e 640 nm (Porter, 1989).

1.3.3. DADOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE O CONSUMO DE PROANTOCIANIDINAS

O interesse nutricional dos fenóis vegetais especialmente os flavonóides, tem aumentado significativamente, uma vez que os dados epidemiológicos apoiam a ideia de que existe uma relação entre o seu consumo e a redução dos factores de risco das doenças cardiovasculares, de certos tipos de cancro e de certas doenças neurodegenerativas (Keen *et al.*, 2005).

As proantocianidinas são bioflavonóides polifenólicos amplamente representados em grãos de cacau, chá, cebola, frutas frescas como maçãs (Rice-Evans *et al.*, 1996), uvas, morangos, vinho tinto (Spencer *et al.*, 2000), legumes (Pataki *et al.*, 2002), nozes, sementes, flores e cascas (Yamakoshi *et al.*, 2002), que possuem diversas propriedades biológicas e são geralmente considerados seguros para o consumo humano (Bentivegna *et al.*, 2002).

Considerando que os flavonóides são absorvidos em quantidade suficiente, a sua actividade antioxidante fisiológica poderia, pelo menos em parte, explicar a nível

epidemiológico a relação inversa entre o consumo dos alimentos que os contém e a incidência de diversas doenças crônicas (Rein *et al.*, 2000b). Vários dados epidemiológicos referentes ao consumo de vinho e chá, ricos em proantocianidinas e estudos experimentais em animais e em culturas de células, utilizando quer alimentos ricos em proantocianidinas, quer proantocianidinas puras, têm sugerido que estas previnem o cancro e as doenças cardiovasculares em seres humanos (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Na verdade, em muitos países, uma alta ingestão de gorduras saturadas está fortemente correlacionada com uma elevada taxa de mortalidade por doença coronária, mas não é este o caso de algumas regiões da França, onde ocorre o chamado "paradoxo francês", o que tem sido atribuído à ingestão regular de vinho tinto, na dieta. O principal flavanóide do vinho tinto é a catequina, numa concentração de 190 mg/ml, mas também existe o ácido gálico, a epicatequina e outros flavonóides, em pequena quantidade. Alguns autores pensam que é a combinação dos antioxidantes fenólicos existentes no vinho que, com consumo regular a longo prazo, pode proteger contra a aterogénese (Harborne e Williams, 2000).

O potencial benefício dos compostos fenólicos para as doenças cardiovasculares está possivelmente relacionada com as suas propriedades antioxidantes (Hollman, 2001). Em 1993, num estudo epidemiológico feito em 805 homens, com idades compreendidas entre os 65 e os 84 anos, durante mais de 5 anos foi estabelecida uma relação inversa entre o consumo de flavonóides (ingestão de chá, cebolas e maçãs) e a mortalidade por doença coronária (Hertog *et al.*, 1993). Ainda num estudo prospectivo realizado entre 1986 e 1998, que incluiu mais de 34000 mulheres, com idades entre os 55 e os 69, verificou-se uma diminuição do risco de morte devido à doença cardiovascular, relacionada com o consumo de catequina e epicatequina (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Também foi comprovada a relação inversa entre o consumo de chá e seus flavonóides e a incidência de enfarte do miocárdio (Geleijnse *et al.*, 2002).

Um estudo epidemiológico revelou que o risco de demência foi significativamente inferior nos indivíduos que tinham consumido a maior quantidade de flavonóides, provavelmente devido às suas poderosas propriedades antioxidantes (Commenges *et al.*, 2000).

Num outro trabalho com proantocianidinas, Arts e colaboradores (2002) estabeleceram uma relação epidemiológica inversa entre o consumo de catequina e a incidência de cancro rectal, em mulheres pós-menopáusicas.

Outros alimentos tais como maçãs e produtos de cacau também têm mostrado uma poderosa actividade antioxidante, proporcional ao seu conteúdo de flavonóides (Azizah *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2003). No caso do cacau, as suas diversas actividades biológicas, incluindo a actividade anti-inflamatória e a anticoagulante, são atribuídas a um grupo de polifenóis, que incluem os monómeros do 3-flavanol: (-) epicatequina e (+) catequina, e vários oligómeros constituídos por estas unidades monoméricas, nomeadamente a procianidina B2 (Fig.37) e a procianidina B5 (Fig.40). O chá verde e o vinho tinto também apresentam quantidades significativas de polifenóis, mas eles estão principalmente presentes sob a forma de ésteres do galhato, no chá, e sob a forma de monómeros de catequina no vinho (Lotito *et al.*, 2000).

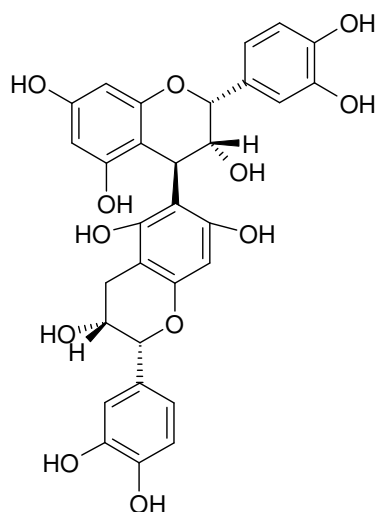


Figura 40. Procianidina B5
[epicatequina-(4 β -6)-epicatequina]

Supõe-se que as propriedades antioxidantes estão particularmente relacionadas com os grupos hidroxilo acoplados ao anel fenilo (Hollman, 2001) (Fig. 41). A característica estrutural mais significativa que justifica as suas propriedades redutoras é a estrutura catecol (3',4'-dihidroxilo) do anel B, apesar da ligação dupla insaturada C₂-C₃ e um grupo hidroxilo no anel C (C₃) também poderem dar algum contributo (Rice-Evans, 2001).

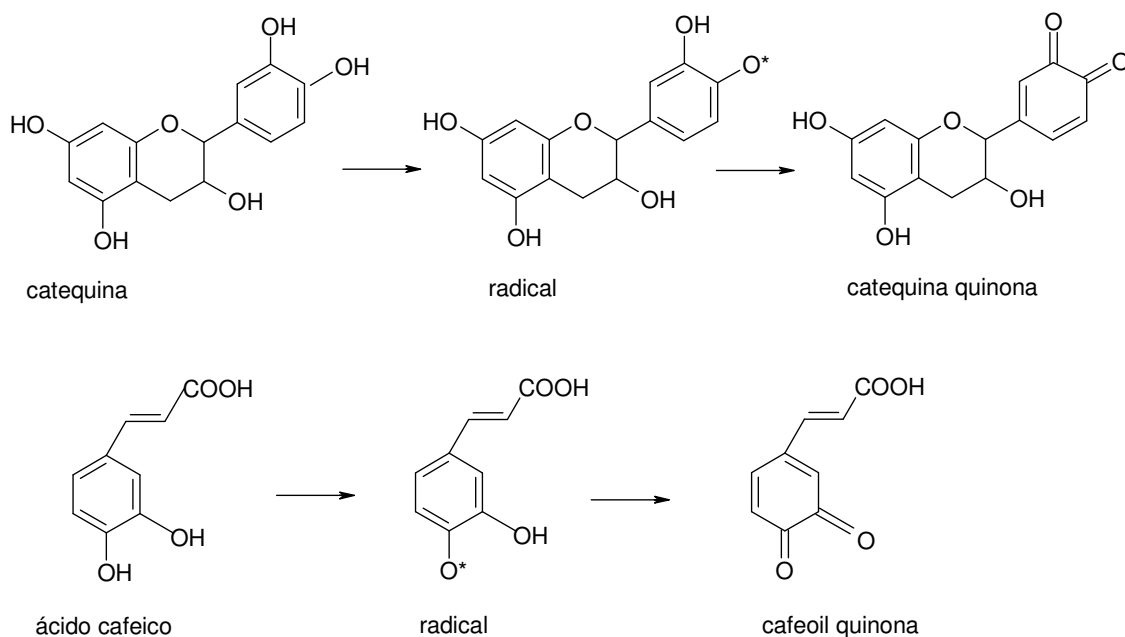


Figura 41. Características estruturais antioxidantes da catequina e do ácido cafeico (Rice-Evans, 2001)

O aumento do consumo de frutas e legumes frescos e o seu complemento com antioxidantes biodisponíveis e seguros pode ser muito importante porque alguns dados indicam que não se obtêm vitaminas e minerais antioxidantes suficientes dos alimentos que consumimos diariamente (Bagchi *et al.*, 2000). A *Uncaria tomentosa* possui constituintes bioativos que fazem desta planta medicinal uma excelente fonte natural de antioxidantes (flavanóides) e anti-inflamatórios (Sandoval *et al.*, 2002).

1.3.4. BIOATIVIDADE

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL), as principais lipoproteínas transportadoras do colesterol em circulação, são sensíveis à oxidação, facto que tem sido relacionado com a patogénese da aterosclerose. Verificou-se num estudo *in vitro* que a catequina, epicatequina e procianidinas inibem a oxidação das LDL de forma muito significativa, após o tratamento com diferentes agentes oxidantes (Lotito *et al.*, 2000; Steinberg *et al.*, 2002; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Em indivíduos saudáveis a quem foi fornecido um suplemento com cacau em pó e chocolate preto (fonte

alimentar de monómeros e oligómeros de 3-flavanóis) ficou demonstrado o efeito favorável sobre a susceptibilidade oxidativa das LDL (Mathur *et al.*, 2002).

Há estudos indiciadores de que a epicatequina induz o relaxamento vascular actuando sobre o endotélio e aumentando o nível de óxido nítrico (Chen *et al.*, 2002). Isto provoca um aumento do fluxo sanguíneo, mas uma diminuição na resistência vascular sistémica.

A catequina parece inibir a agregação das plaquetas, processo que está intimamente relacionado com o desenvolvimento e o progresso de ateromas e, por conseguinte, com o processo trombótico (Pignatelli *et al.*, 2000). Por outro lado, ocorrem efeitos sinérgicos da catequina com outros flavonóides, nomeadamente a quercetina na inibição da agregação plaquetária induzida pelo colagénio e na adesão das plaquetas ao colagénio (Pignatelli *et al.*, 2000; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). O consumo de proantocianidinas atenuou o desenvolvimento da aterosclerose da aorta, em coelhos (Gonthier *et al.*, 2003), melhorou a recuperação cardíaca durante a reperfusão após isquémia, em ratos (Pataki *et al.*, 2002); modulou a produção de TGF- β 1, o factor de crescimento transformador da citocina (Mao *et al.*, 2003), e aumentou os níveis plasmáticos de óxido nítrico, produzindo um efeito arterial vasorelaxante (Heiss *et al.*, 2003). Estes resultados sugerem que as proantocianidinas da dieta podem contribuir para reduzir a incidência de doenças cardiovasculares (Gonthier *et al.*, 2003).

De acordo com Abou-Agag *et al.* (2001), os efeitos cardioprotectores dos flavanóides também podem ser atribuídos, pelo menos em parte, à capacidade demonstrada pela catequina e epicatequina para aumentar a actividade fibrinolítica (Lamuela-Raventós, 2005).

O stresse oxidativo tem sido associado à perda neuronal nas doenças neurodegenerativas relacionadas com a idade e durante o declínio cognitivo. Os flavonóides têm sido referidos como desempenhando um papel útil na protecção do sistema nervoso central contra o stresse oxidativo, embora o mecanismo de acção seja desconhecido. A epicatequina e o seu principal metabolito 3'-*O*-metil-epicatequina, bem como o canferol, dois compostos que fazem parte da composição da *Uncaria tomentosa* inibem *in vitro* a toxicidade neuronal induzida pelas LDL oxidadas, podendo esta planta ser usada na protecção contra os agentes da apoptose neuronal causada pelo stresse oxidativo (Schroeter *et al.*, 2001).

Weyant e colaboradores (2001) observaram que a catequina, adicionada à dieta em concentrações de 0,1 e 1%, diminuiu a formação de tumores no intestino num modelo de ratos dotados de um defeito genético na *Apc* semelhante ao que origina a maioria dos cancros do colón, no homem, sugerindo que as proantocianidinas da dieta podem contribuir para a prevenção do cancro (Gonthier *et al.*, 2003).

Por outro lado, em 2001, a equipa de Kolodziej fez um estudo com as proantocianidinas e compostos relacionados tendo concluído que estes compostos têm *in vitro* actividade antileishmania, o que pode ser considerado como uma resposta imunológica benéfica.

O efeito antioxidante tem sido comprovado também com 3-flavanóis isolados, inclusive catequina, epicatequina, procianidinas (Zhu *et al.*, 2002a), e para alguns dos seus metabolitos. Um dos principais metabolitos da epicatequina, o 3'-*O*-metilepicatequina, demonstrou efeito protector contra a morte celular causada pelo stress oxidativo (Spencer *et al.*, 2001a e 2001b), e quer a epicatequina, quer este metabolito demonstraram capacidade para proteger contra danos celulares causados pela exposição a radiações UVA, numa cultura de fibroplastos humanos (Basu-Modak *et al.*, 2003). *In vivo*, o seu consumo melhorou o *status* antioxidante em seres humanos e ratos (Gonthier *et al.*, 2003), aumentou a resistência dos eritrócitos à hemólise induzida por agentes oxidantes em ratos (Zhu *et al.*, 2002b), diminuiu o teor de lípidos em produtos de oxidação do plasma humano (Wang *et al.*, 2000; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005).

1.3.5. BIODISPONIBILIDADE

Os polifenóis não estão distribuídos uniformemente nos tecidos vegetais e a fragmentação dos produtos alimentares durante o seu processamento, tanto pode resultar na perda como no enriquecimento em alguns compostos fenólicos.

É extremamente difícil fazer uma estimativa da ingestão diária de polifenóis, por várias razões, incluindo a diversidade estrutural, a falta de padronização dos métodos analíticos e as variações de conteúdo num determinado género alimentar. A ingestão de polifenóis depende em grande parte dos hábitos e preferências alimentares, constituindo as proantocianidinas uma importante fracção do total de flavonóides ingerido nas dietas ocidentais (Gu *et al.*, 2004).

Para a actividade biológica dos flavonóides contribuem vários factores, nomeadamente a sua absorção, distribuição nos tecidos celulares após a absorção, e as suas formas bioactivas (Keen *et al.*, 2005). Além disso, existem também alguns resultados sugerindo que um elevado consumo de polifenóis pode aumentar a sua biodisponibilidade, devido à saturação.

A maior parte dos estudos indicam concentrações mínimas no intervalo de 10 a 30 μM , para as principais actividades biológicas, excepto para actividade antioxidante, que ocorre para concentrações mais baixas. No entanto, é importante ter em conta a probabilidade de ocorrência de sinergismos (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Esta importante propriedade foi demonstrada, por exemplo, com a mistura complexa do Pycnogenol (PYC), um extracto padronizado obtido a partir da casca de *Pinus maritima*. O PYC é constituído por uma mistura de derivados de 3-flavanóis, que exhibe um efeito biológico superior do que qualquer um dos seus constituintes administrados isoladamente (Packer *et al.*, 1999).

Muitos extractos e alimentos com conteúdo importante em proantocianidinas têm sido submetidos a estudos epidemiológicos, químicos e farmacológicos que comprovam a sua actividade farmacológica (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). As principais fontes de proantocianidinas nas dietas ocidentais são o chá, chocolate, maçãs, pêras, uvas e vinho tinto, mas o estudo da biodisponibilidade das catequinas tem sido realizado essencialmente após a ingestão de cacau ou do chá (Manach *et al.*, 2005).

A actividade biológica dos flavonóides tem sido realizada maioritariamente *in vitro*, em sistemas isolados, sobretudo com alimentos ricos em flavonóides, como o cacau. Embora os resultados obtidos em tais estudos não possam ser extrapolados directamente para os estudos *in vivo*, eles podem dar uma ideia da concentração plasmática e dos níveis que se devem alcançar nos tecidos alvo para obter efeitos perceptíveis (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2008).

Uma prova indirecta da absorção dos polifenóis através da barreira intestinal é o aumento da capacidade antioxidante do plasma, após o consumo de alimentos ricos nestes compostos. Outras provas directas da biodisponibilidade de alguns compostos fenólicos foram as suas concentrações detectadas no plasma e na urina após a ingestão ou compostos puros ou de alimentos onde estão presentes esses compostos (Scalbert e Williamson, 2000).

Presume-se que as proantocianidinas sejam biodisponíveis e que efectivamente atinjam os tecidos alvo, embora os conhecimentos existentes sobre a absorção e metabolismo se limitem a um grupo restrito dos flavonóides da dieta (Heim *et al.*, 2002, Yang *et al.*, 2008). Foi comprovada a absorção da catequina, epicatequina e de procianidinas diméricas, na sequência de um aumento da sua concentração plasmática, após a ingestão de diferentes produtos que os contêm (Rein *et al.*, 2000b; Wang *et al.*, 2000; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Após a ingestão de chá verde, em voluntários humanos foi identificado, em amostras de urina, o ácido gálgico e os seus principais metabolitos 4-*O*-metilados, assim como a epicatequina, podendo estes compostos ser utilizados como biomarcadores na avaliação desta bebida (Ito *et al.*, 2005).

A biodisponibilidade dos polifenóis está relacionada com a sua natureza química. Consequentemente, os polifenóis mais abundantes na nossa dieta alimentar não são necessariamente aqueles que conduzem à mais alta concentração de metabolitos activos nos tecidos-alvo (Manach *et al.*, 2005). Na verdade, é importante ter em conta inclusive o tipo de enantiómero presente em cada alimento. Num estudo em ratos, com a catequina, foi demonstrado que o chocolate para além do seu principal 3-flavanol, a (-)-epicatequina, contém, ao contrário da maior parte dos alimentos, principalmente (-)-catequina, em vez do (+)-enantiómero de catequina. Em todas as concentrações estudadas, a absorção intestinal de (-)-catequina foi menor do que a absorção intestinal de (+)-catequina e as concentrações plasmáticas de (-)-catequina obtidas foram significativamente menores do que as de (+)-catequina.. Estes resultados podem ser a explicação para a baixa biodisponibilidade da catequina, quando se consome chocolate ou outros produtos que contenham cacau (Donovan *et al.*, 2006).

1.3.5.1 Efeito do tracto gastro-intestinal superior, nos flavanóis

Apesar de poucos, existem alguns estudos que demonstram a acção da saliva sobre a estrutura dos 3-flavanóis oligo- e poliméricos. A incubação de oligómeros de procianidinas (dímeros a hexâmeros) na saliva humana, durante 30 minutos, não se traduziu em unidades oligoméricas menores, o que permitiu inferir que estes compostos permanecem intactos na boca antes de entrar para o esófago e para o estômago (Spencer, 2003). Contudo, há trabalhos que evidenciam a interacção entre os 3-flavanóis e as proteínas salivares. As interacções proteína-tanino são essencialmente um

fenómeno dinâmico de superfície, geralmente reversível, em que as principais forças são efeitos hidrofóbicos, reforçados pela criação de pontes de hidrogénio. As proteínas salivares, tal como outras proteínas ricas em prolina, possuem uma grande afinidade para as proantocianidinas, principalmente para os seus oligómeros superiores (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). Verificou-se também que a (+)-catequina tem uma maior afinidade para as proteínas salivares do que a (-)-epicatequina, indicando mais uma vez a importância do efeito da estrutura dos 3-flavanóis na sua interacção com as proteínas. Além disso, os dímeros das procianidinas ligadas em 4→8 tiveram uma maior afinidade para as proteínas ricas em prolina, do que as que estão ligadas pelo 4→6 (de Freitas e Mateus, 2001), supondo-se que essas interacções podem ter importância na sua biodisponibilidade (Spencer, 2003). Estes complexos podem ser estáveis durante todo o processo de digestão, o que permite a absorção e retenção de proteínas alimentares nutricionalmente mais úteis (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

Foi sugerido que as proantocianidinas poderiam ser degradadas durante a sua passagem pelo estômago. A degradação dos oligómeros das procianidinas (trímeros a hexâmeros) em monómeros e dímeros foi observada, *in vitro*, durante a incubação das procianidinas do cacau, com suco gástrico simulado (pH 2.0), durante 1-3,5 horas (Spencer *et al.*, 2000). Contudo, num outro estudo, constatou-se que as procianidinas do chocolate (procianidinas B2, B5 e C1) eram estáveis durante o trânsito gástrico, em seres humanos. A diferença de resultados observada nos dois estudos foi explicada pelo efeito tampão dos outros constituintes do bolo alimentar, no chocolate, o que resulta num pH de valor mais elevado, insuficiente para que ocorra a hidrólise, das proantocianidinas, e também pelo menor tempo de exposição às condições ácidas, inferior a 50 minutos (Rios *et al.*, 2002).

1.3.5.2. Absorção, metabolismo e conjugação no intestino delgado

Embora o conhecimento sobre a biodisponibilidade e metabolismo das proantocianidinas ainda seja limitado, muitos estudos sugerem que os monómeros e as procianidinas de baixa polimerização são absorvidos no intestino delgado (Nandakumar *et al.*, 2008).

De facto, a procianidina B2 foi detectada no plasma humano, 30 minutos após o consumo de cacau, rico em flavanóis (Holt *et al.*, 2002). Também a administração oral

de procianidina B2 permitiu detectar não só este dímero, como também a (-)-epicatequina e a 3'-*O*-metil-epicatequina, no plasma e na urina, atingindo uma concentração plasmática máxima, 30 a 60 minutos após a sua administração (Baba *et al.*, 2002). Em ambas as situações a absorção foi menos eficiente (inferior a 0,5%) do que a dos monómeros epicatequina e catequina, que são absorvidos entre 22-55% (Baba *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2002; Gonthier *et al.*, 2003). Por outro lado, há dados que sugerem a ocorrência de uma absorção selectiva da epicatequina relativamente à catequina, e da procianidina B2 relativamente à procianidina B5 (Zhu *et al.*, 2002b).

Estudos *in vitro* sugerem que as actividades antioxidantes das procianidinas oligoméricas são superiores às dos monómeros (Arteel e Sies, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Lotito *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004). No entanto, a estabilidade quer dos monómeros, quer dos dímeros é pH dependente (Zhu *et al.*, 2002a). Foi demonstrado que a (-)-epicatequina, (+)-catequina, epicatequina-(4 β -8)-epicatequina (procianidina B2) e epicatequina-(4 β -6)-epicatequina (procianidina B5) são estáveis a pH 5.0, apenas ocorrendo a sua epimerização a pH 7.4, ou maiores, em períodos de incubação superiores a 2 horas (Zhu *et al.*, 2002a). Verificou-se *in vitro* que os polifenóis do tipo catecol, como a epigalhocatequina ou o galhato de epigalhocatequina se oxidam rapidamente em pH neutro e alcalino (Spencer, 2003). O galhato da epigalhocatequina oxidou-se em poucos minutos, em suco intestinal, sem enzimas, a pH 8,5, originando dímeros, que por serem rapidamente absorvidos também podem contribuir para os efeitos farmacológicos que lhe são imputados, eventualmente relacionados com a actividade antioxidante que exibem (Yoshino *et al.*, 1999).

Estudos *in vitro* demonstraram ainda que a adição de ácido ascórbico a uma mistura de monómeros e dímeros no suco intestinal simulado (pH 8.5) e no tampão fosfato de sódio (pH 7.4) aumentou significativamente a sua estabilidade (Zhu *et al.*, 2003). No entanto, na extrapolação dos ensaios *in vitro*, para o que sucede *in vivo*, é importante ter em conta a capacidade dos polifenóis de se ligarem às proteínas presentes nos alimentos e a capacidade dos próprios alimentos de tamponar o pH intestinal, limitando a extensão oxidativa dos 3-flavanóis (Spencer, 2003).

Uma vez na circulação mesentérica, os 3-flavanóis existem predominantemente na forma conjugada. Imediatamente após a absorção, estes compostos são metabolizados nas células epiteliais, originando conjugados polares (Donovan *et al.*, 1999), derivados dos 3-flavanóis 3'-*O*- e 4'-*O*-metilados e as formas

O-metil-glucuronidadas (Fig. 42). Estes metabolitos foram detectados nos fluídos serosos, sugerindo que são as formas mais biodisponíveis no intestino delgado (Spencer, 2003). Embora estes metabolitos predominem após a absorção, por metabolização fase I e II, no fígado, ainda são detectados em pequenas quantidades, os flavanóis nativos. Em concordância com esta hipótese, outros estudos demonstraram que a catequina e epicatequina são amplamente metabolizadas e conjugadas durante a transferência a partir do lúmen do intestino para a superfície serosa. Entre os principais metabolitos detectados estão as formas glucuronidadas, mas também se encontram em quantidades significativas as formas *O*-metilada e as metil-*O*-glucuronidadas (Kuhnle *et al.*, 2000; Spencer, 2003). A corroborar com estes dados, um estudo realizado após o consumo de vinho tinto e de vinho tinto desprovido de álcool revelou que os níveis de catequina e 3'-*O*-metil-catequina livres eram muito baixos (Donovan *et al.*, 1999). De facto, podem ter lugar no fígado fenómenos de glucuronidação e metilação complementares, bem como de sulfatação (Donovan *et al.*, 1999; Spencer, 2003). Para além de estarem presentes no plasma e urina de animais de experiência e de seres humanos (Baba *et al.*, 2000; Baba *et al.*, 2002; Donovan *et al.*, 2002a e 2002b) os 3-flavanóis conjugados foram ainda encontrados na bile de ratos (Donovan *et al.*, 2001) e no tecido cerebral de ratos (Abd El Mohsen *et al.*, 2002).

1.3.5.3. Metabolismo dos 3-flavanóis no cólon

A absorção intestinal dos polifenóis pode ser elevada, apesar de, a maior parte que é ingerida (75-99%) não ser encontrada na urina, e as concentrações plasmáticas raramente ultrapassarem 1 μ M após o consumo de 10-100 mg de um determinado composto. A avaliação da capacidade antioxidante do plasma sugere que mais compostos fenólicos estão presentes, sob a forma de metabolitos, em grande parte desconhecidos, produzidos pelos tecidos ou pela microflora do cólon. Diversos estudos no ser humano revelam que os 3-flavanóis são extensamente metabolizados no organismo, o que envolve conjugação e metilação dos grupos hidroxilo e a clivagem dos anéis heterocíclicos. Para além dos conjugados praticamente não foram caracterizados mais nenhuns metabolitos em seres humanos. De qualquer modo, a bioactividade destes metabolitos será diferente dos compostos iniciais, embora sejam estes os testados nos sistemas *in vitro* (Hollman, 2001).

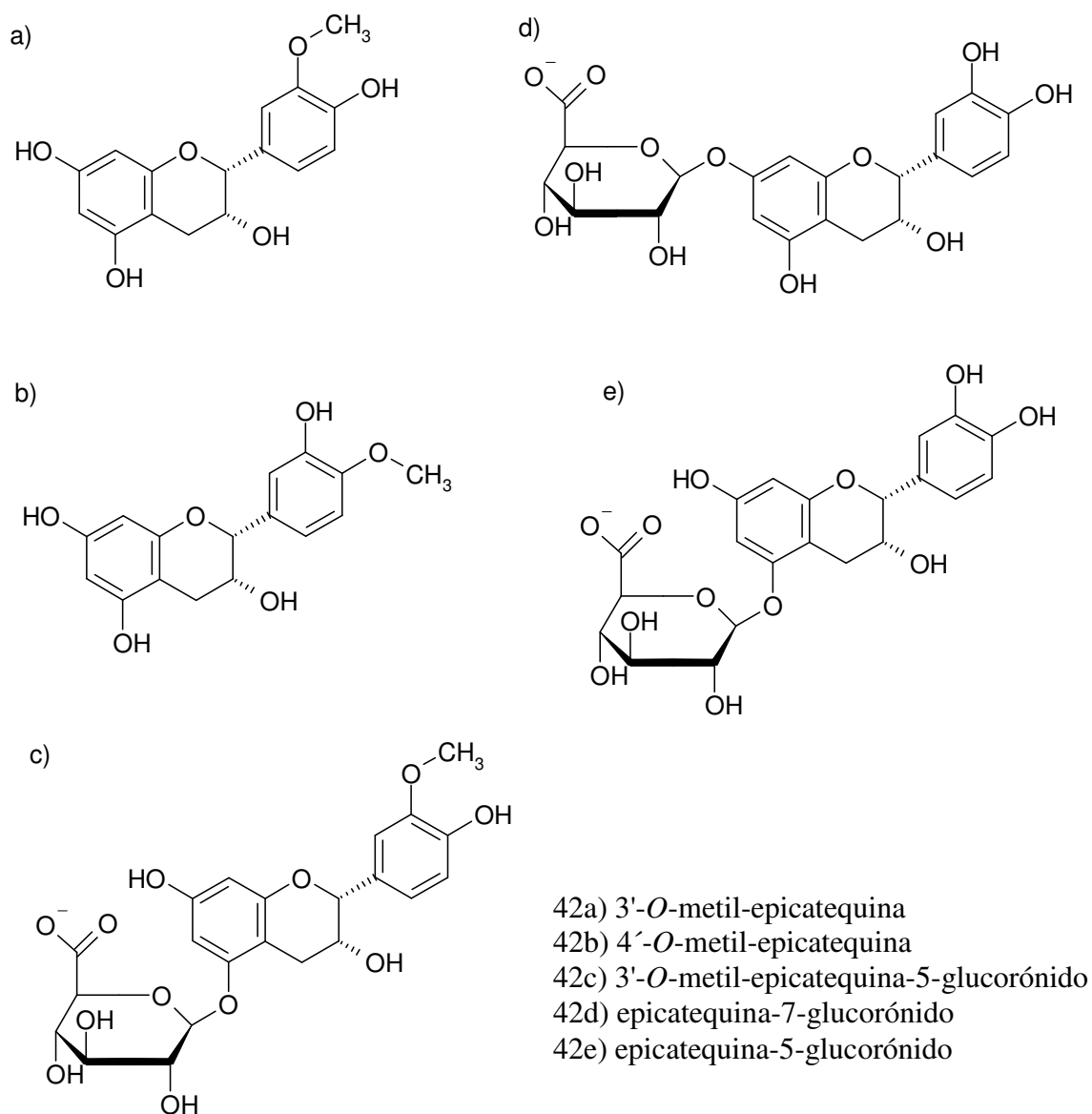


Figura 42. Metabolitos principais da epicatequina, produzidos no intestino delgado do rato

Os polifenóis não absorvidos no estômago ou intestino delgado são levados para o cólon, o mesmo ocorrendo com os polifenóis absorvidos, metabolizados no fígado e excretados na bÍlis ou directamente para o intestino delgado, na forma de metabolitos.

O cólon contém $\approx 10^{12}$ microorganismos/cm³ possuindo assim um enorme potencial catalítico e hidrolítico, que favorece as reacções de desconjugação (Scalbert e Williamson, 2000). Como as proantocianidinas mais polimerizadas não são absorvidas

através da barreira intestinal, chegam ao cólon onde podem ser degradadas pela microflora em moléculas mais simples, tais como metabolitos aromáticos ácidos (Depréz *et al.*, 2000). Alguns estudos indicam que existem dois tipos de bactérias nas fezes humanas capazes de metabolizar estes compostos: *Enterococcus caseliflavus* que só clivam as moléculas de açúcar e *Eubacterium ramulus* que degradam o anel aromático (Schneider *et al.*, 1999). Os metabolitos microbianos de baixo peso molecular podem contribuir para as actividades biológicas das proantocianidinas, pois tornam-se muito mais biodisponíveis, podendo ser absorvidos através do cólon (Scalbert e Williamson, 2000). A microflora do cólon pode assim desempenhar um papel crucial na formação de ácidos aromáticos facilmente absorvidos, explicando-se desta forma algumas das actividades biológicas das procianidinas. Corroborando esta hipótese Rios *et al.* (2003) registaram o aumento da excreção urinária de quatro ácidos fenólicos, em seres humanos, 9-48 horas após o consumo de cacau, o que sugere a sua origem microbiana. Esses ácidos fenólicos (ácido *m*-hidroxifenilpropiónico, ácido 3,4-dihidroxifenilacético, ácido *m*-hidroxibenzóico e ácido *m*-hidroxifenilacético), possíveis produtos de degradação das procianidinas pelas bactérias do cólon são agentes redutores, contribuindo também para as propriedades antioxidantes dos 3-flavanóis do cacau.

Em ratos alimentados com uma dieta suplementada com catequina foram identificadas na urina, catequina intacta, 3'-*O*-metilcatequina, e outros metabolitos de origem microbiana (Gonthier *et al.*, 2003).

Estes metabolitos continuam a possuir um grupo fenólico livre e podem actuar como antioxidantes, contribuindo para a protecção dos tecidos contra o stress oxidativo (Gonthier *et al.*, 2003), ao ter um efeito local no cólon ou ao serem absorvidos (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Consequentemente, os metabolitos de origem microbiana devem ser ponderados nos estudos que pretendem avaliar os potenciais efeitos biológicos dos produtos ricos em procianidinas (Keen *et al.*, 2005). Por outro lado, mudanças na composição da microflora do cólon podem explicar as grandes variações inter-individuais na sua biodisponibilidade (Scalbert e Williamson, 2000).

A origem microbiana dos ácidos aromáticos identificados como metabolitos de catequina está parcialmente elucidada (Fig. 43). A catequina é degradada nos ácidos 3,4-dihidroxifenilvalérico e 3-hidroxifenilvalérico, que são posteriormente β -oxidados nos ácidos 3,4-dihidroxifenilpropiónico, 3-hidroxifenilpropiónico e 3-hidroxibenzóico.

O ácido 3-hidroxibenzóico é conjugado com a glicina no fígado e rins para formar ácido 3-hidroxihipúrico. O ácido *m*-cumárico também foi detectado como um metabolito da catequina, originado a partir da desidrogenação do ácido 3-hidroxifenilpropiónico. Provavelmente o ácido *m*-cumárico é o precursor do ácido ferúlico, também excretado em ratos alimentados com catequina (Gonthier *et al.*, 2003).

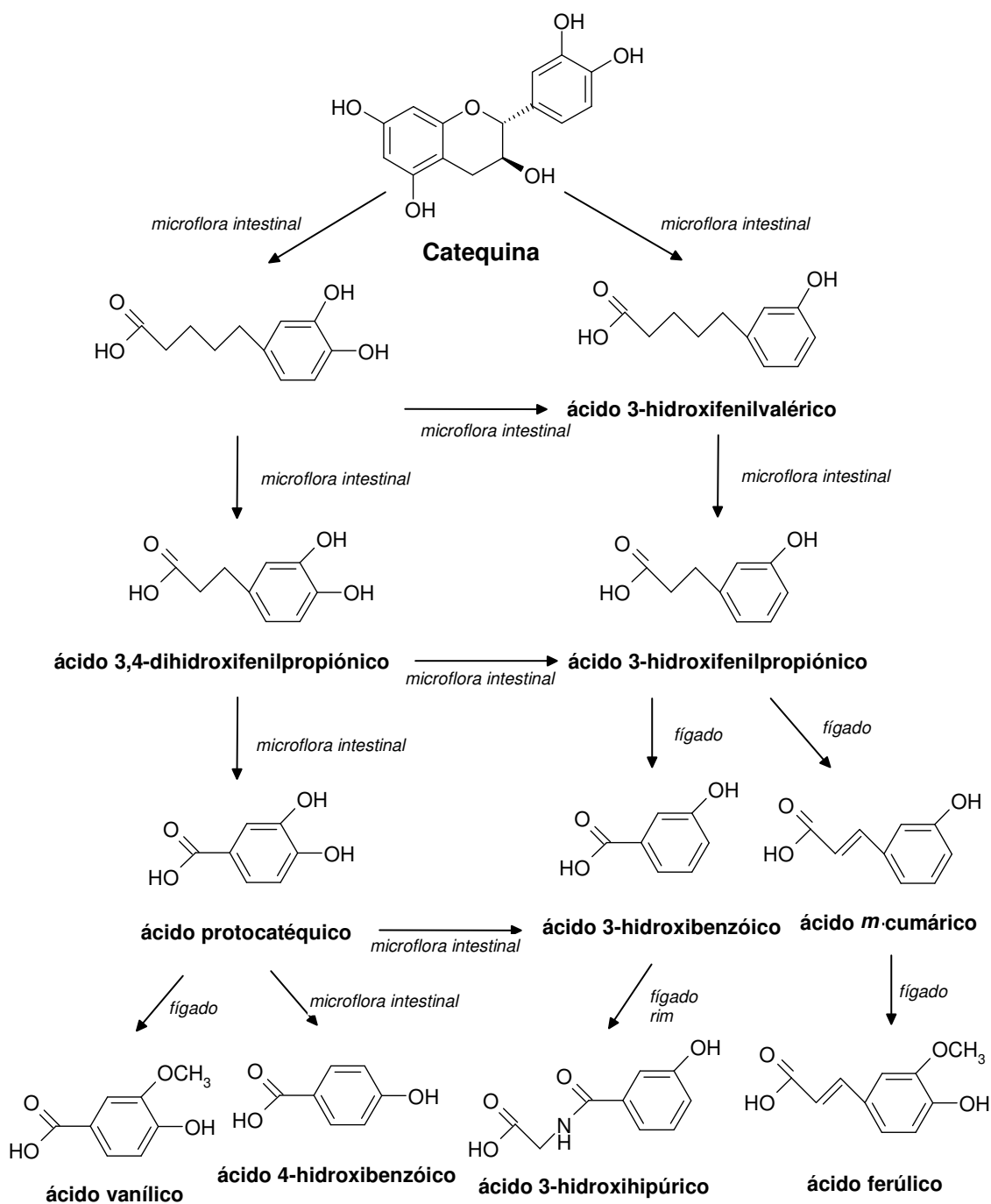


Figura 43. Metabolitos resultantes da degradação da catequina pela microflora intestinal (Gonthier *et al.*, 2003)

Os outros metabolitos da catequina derivam muito provavelmente do ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico por uma série de reacções catalisadas pela microflora intestinal. O ácido protocatéquico resulta da descarboxilação do ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico e a sua desidroxilação conduz à formação do ácido 3-hidroxibenzóico e 4-hidroxibenzóico. O ácido protocatéquico também é metilado em ácido vanílico no fígado.

Em ratos alimentados com a procianidina B3 foram identificados, na urina, os mesmos ácidos aromáticos que os formados a partir da catequina, apesar de se terem registado taxas de excreção mais elevadas de ácidos 3,4-dihidroxifenilacético e 3-hidroxifenilacético. O primeiro metabolito pode ter sido originado a partir da α -oxidação do ácido 3,4-dihidroxifenilpropiónico, uma reacção catalisada pela microflora, pouco comum com os polifenóis das plantas. O ácido 3-hidroxifenilacético deriva da desidroxilação microbiana do ácido 3,4-dihidroxifenilacético.

A dieta suplementada com a procianidina trimérica C2 e a dieta contendo polímeros da catequina, até sete unidades, originou a excreção urinária de apenas três metabolitos: os ácidos 3-hidroxifenilvalérico, 3-hidroxifenilpropiónico e *m*-cumárico. Estes metabolitos também foram produzidos a partir das dietas com catequina e com a procianidina B3, mas a sua recuperação urinária total para o trímero e o polímero foi muito inferior. Verificou-se então que a recuperação de metabolitos microbianos, diminui à medida que o grau de polimerização da procianidina aumenta, tendo sido 21 vezes menor para a mistura de polímeros do que para o monómero da catequina (Gonthier *et al.*, 2003).

Também após a suplementação de 69 voluntários humanos com um extracto de sementes de uva, rica em proantocianidinas se observou um aumento consistente na excreção de ácido 3-hidroxifenilpropiónico, dados que estão em consonância com a hipótese de que este composto é o principal ácido fenólico que resulta do metabolismo *in vivo* das proantocianidinas. Conhecer as concentrações deste ácido fenólico pode revelar-se útil para investigar melhor os efeitos das proantocianidinas da dieta (Ward *et al.*, 2004).

Admite-se que a polimerização das procianidinas possa reduzir a acessibilidade do substrato à degradação microbiana devido à natureza polimérica da procianidina ou a interações da procianidina com proteínas no lúmen do tubo digestivo (Spencer, 2003). A degradação microbiana mais limitada dos polímeros das procianidinas também

poderia ser explicada pelas suas bem documentadas propriedades antimicrobianas. Esta actividade sobre os microrganismos tem sido atribuída à sua capacidade de inibir as enzimas microbianas extracelulares, de modo a formar complexos com os substratos necessários para o crescimento microbiano, ou a afectar directamente o metabolismo microbiano através de inibição de fosforilação oxidativa. Sendo assim, a degradação microbiana das proantocianidinas deve ser melhor avaliada nos seres humanos, apesar de algumas actividades das procianidinas poderem não necessitar a sua absorção através da barreira intestinal (Gonthier *et al.*, 2003).

As proantocianinas podem ter um impacto directo sobre a flora da mucosa intestinal, protegendo-a contra o stresse oxidativo ou contra a acção de agentes cancerígenos (Manach *et al.*, 2005), ou podem ter um impacto indirecto através da interacção com outros nutrientes como o ferro (Gonthier *et al.*, 2003) ou os lípidos, no tubo digestivo (Manach *et al.*, 2005).

1.3.5.4. Constituintes da dieta que podem diminuir ou aumentar a biodisponibilidade dos 3-flavanóis

Foi demonstrado *in vitro*, que a adição de ácido ascórbico às proantocianidinas aumentou significativamente a sua estabilidade, em meio alcalino, talvez por impedir parcialmente a degradação ou epimerização dos flavanóides no intestino, antes da sua absorção. O mesmo estudo também sugere que a estabilidade e o perfil dos flavanóides em alimentos e bebidas contendo cacau pode ser significativamente influenciado pelo tipo de ácido utilizado nesses produtos (Zhu *et al.*, 2003). Além disso, os componentes da dieta contendo polifenóis e a sua interacção com a matriz alimentar podem também ter um efeito relevante sobre a sua biodisponibilidade oral. Serafini e colaboradores (2003) salientaram que o leite adicionado ao chocolate diminui a absorção dos polifenóis do chocolate, anulando consequentemente os potenciais benefícios do chocolate preto. Por outro lado, o consumo de alimentos ricos em hidratos de carbono combinados com chocolate poderá aumentar a absorção de 3-flavanóis, enquanto os alimentos ricos em lípidos e proteínas ou o tratamento com famotidina, um antagonista dos receptores H₂ da histamina, com efeito antiácido, parecem não ter um efeito significativo na sua absorção (Scramm *et al.*, 2003).

1.3.6. EFEITOS COLATERAIS E TOXICIDADE

Quando falamos do conteúdo de proantocianidinas em alimentos de origem vegetal, são observadas grandes discrepâncias em diferentes autores, o que pode ser explicado por diferenças no tipo de estudos utilizados, nomeadamente, a natureza, variedade, fase de maturação, parte da amostra considerada, entre outros. Os valores publicados indicam estimativas de ingestão de flavonóides, catequinas e proantocianidinas pelo consumidor médio americano na faixa dos 460-1000 mg/dia (Santos-Buelga e Scalbert, 2000). A concentração de flavonóides necessária para induzir mutações e citotoxicidade pode não ser fisiologicamente possível através de fontes alimentares; no entanto, o uso de suplementos com flavonóides pode eventualmente resultar na exposição a níveis potencialmente tóxicos (Skibola e Smith, 2000), pelo que o consumo de grandes quantidades destes alimentos enriquecidos ou suplementos não deve ainda ser incentivado (Halliwell, 2007).

As procianidinas têm sido consideradas antinutricionais por poderem interagir com proteínas e inibir certas enzimas (Mennen *et al.*, 2005) ou poderem ter um impacto indirecto através da interacção com os lípidos no tubo digestivo (Manach *et al.*, 2005) e outros nutrientes como o ferro (Gonthier *et al.*, 2003). As procianidinas são os principais compostos da nossa dieta alimentar que afectam a biodisponibilidade de ferro; um consumo excessivo destes compostos pode causar anemia em pessoas com alto risco de deficiência de ferro. Por outro lado, elas podem ser eficazes para tratar a sobredosagem de ferro (Santos-Buelga e Scalbert, 2000).

Esta capacidade de ligação depende do grau de polimerização das proantocianidinas; moléculas de maiores dimensões tendem a ligar-se de forma mais eficiente (Santos-Buelga e Scalbert, 2000) e tem de ser tida em consideração quando estamos a avaliar possíveis interacções de plantas que contenham estes constituintes.

1.3.7. BIOACTIVIDADE DE EXTRACTOS ESSENCIALMENTE CONSTITUÍDOS POR PROANTOCIANIDINAS

Apesar da comunidade científica começar a estar sensível à importância do estudo dos 3-flavanóis mono- e poliméricos, na *Uncaria tomentosa* são mínimos os

resultados orientados para estes compostos. No entanto, as significativas actividades biológicas imputadas aos 3-flavanóis presentes em extractos vegetais e a concentração expressiva destes compostos na *Uncaria tomentosa* reforçam a importância que podem ter nas aplicações terapêuticas desta planta.

1.3.7.1. Extracto de *Pinus maritima* (PYC)

O picnogenol (PYC) é um extracto padronizado, obtido a partir da casca do pinheiro bravo francês, *Pinus maritima*, constituído principalmente por procianidinas oligoméricas e ácidos fenólicos. Atribui-se-lhe um papel importante quer como imunomodulador ou como agente anti-inflamatório. Estudos em ratos infectados pelo retrovírus LP-BM5 (um modelo animal válido para o HIV) sugerem que o PYC pode atrasar o desenvolvimento de disfunções imunitárias em sequência da infecção pelo retrovírus. É também usado em patologias cerebrais, tais como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson. Foram igualmente demonstrados os seus benefícios cardiovasculares, tais como a actividade vasodilatadora, a inibição da enzima de conversão da angiotensina e a capacidade de aumentar a micro circulação, pelo aumento da permeabilidade capilar (Packer *et al.*, 1999).

Num estudo com a fracção rica em procianidinas oligoméricas do PYC foi demonstrada significativa acção inibitória da α -glucosidase, resultados que podem constituir uma explicação para a diminuição dos níveis de glicose registados em estudos clínicos com este extracto, em doentes diabéticos (Schafer e Hogger, 2007).

Um dos mecanismos subjacentes aos efeitos biológicos do PYC parece ser a sua interacção com as proteínas celulares, nomeadamente com as enzimas. Os resultados dum estudo com a enzima xantinaoxidase demonstraram a capacidade deste extracto originar a mudança de conformação desta enzima, conduzindo à sua inibição (Moini *et al.*, 2000; 2002).

1.3.7.2. Extracto de sementes de uva rico em proantocianidinas (GSPE)

Foi comprovada a biodisponibilidade de um extracto de sementes de uva rico em proantocianidinas IH636 (GSPE), assim como a sua acção contra radicais livres, a peroxidação lipídica e a danificação do DNA, que se mostrou superior à das

vitaminas C, E e β -caroteno, tanto em modelos *in vitro* como *in vivo* (Bagchi *et al.*, 2000). Extractos de sementes de uva ricos em proantocianidinas inibiram reacções oxidativas mais eficazmente do que o ascorbato ou a catequina, o que foi atribuído ao facto das procianidinas oligoméricas serem antioxidantes mais eficazes do que os seus monómeros homólogos (Hu *et al.*, 2004). Foi demonstrado também o seu efeito anti-inflamatório na inflamação experimental em ratos, por inibição da formação de IL-1 β e TNF α (Li *et al.*, 2001).

O GSPE adicionado a uma dieta rica em cálcio para ratos com os ossos das mandíbulas debilitados parece aumentar a qualidade e resistência óssea, no período de crescimento (Gunjima *et al.*, 2004). Ainda em ratos suplementados, num outro estudo com um extracto de sementes de uva observaram-se mudanças de expressão ou modificações de determinadas proteínas do cérebro, consistentes com uma acção neuroprotectora (Deshane *et al.*, 2004). Verificou-se também que a pré-exposição ao GSPE, pode atenuar significativamente danos no DNA, apoptose, necrose e morte celular de células hepáticas (Ray *et al.*, 1999).

O GSPE também ajuda a ultrapassar os efeitos tóxicos associados a agentes quimioterápicos nas células saudáveis (Bagchi *et al.*, 2000) e até mesmo originar quimioprevenção de indutores de cancro da mama, dependendo esta actividade do tipo de dieta em que o agente é administrado. O papel modulador da dieta em ratos adultos sugere que as intervenções clínicas de quimioprevenção ou quimioterapia contra o cancro da mama ou outros tumores possam ter necessidade de considerar todo o regime alimentar do paciente enquanto tais intervenções são administradas (Kim *et al.*, 2004).

Em ratos, foi também demonstrado o papel protector das proantocianidinas das sementes de uva contra o desenvolvimento de cancro da pele induzido pelos UV, o que sugere a sua utilidade na diminuição dos efeitos adversos induzidos pelos UV na pele humana (Katiyar, 2008).

A administração de GSPE, por via oral, a ratos com diabetes conduziu a um efeito anti-hiperglicémico, que foi reforçado pela administração conjunta da procianidina e uma dose baixa de insulina, tendo-se demonstrado que a procianidina imita o papel da insulina *in vivo* (Pinent *et al.*, 2004).

Em ratos machos e em fêmeas, a administração de extracto de sementes de uva não produziu toxicidade generalizada, nos órgãos ou sistémica, para doses de 1,78 e 2,15 g/Kg de peso corporal, respectivamente (Bentivegna e Whitney, 2002), nem

evidência de mutagenicidade, com doses de 2 e 4 g/kg de peso corporal (Yamakoshi *et al.*, 2002).

1.3.7.3. Procianidinas do cacau

O cacau contém 3-flavanóis monoméricos (epicatequina e catequina) e procianidinas oligoméricas. Produtos diferentes à base de cacau apresentam, *in vitro*, uma notável actividade antioxidante e anti-radicalar. Inibem a oxidação das LDL, um processo implicado na aterosclerose (Mazur *et al.*, 1999), a activação e função plaquetária, bem como o crescimento de células humanas de cancro (Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Além disso, foi documentado um aumento da capacidade antioxidante do plasma e uma diminuição na concentração de produtos da oxidação plasmática após o consumo de chocolate rico em procianidinas (Rein *et al.*, 2000b).

O papel biológico da 5-lipoxigenase está estreitamente relacionado com a biossíntese de leucotrienos. Estudos *in vitro* com epicatequina e os seus oligómeros relacionados, a partir de cacau, sugerem a inibição da 5-lipoxigenase humana por estes compostos (Schewe *et al.*, 2002) que podem conferir alguma capacidade anti-inflamatória, vasoprotectora e antibroncoconstritora (Sies *et al.*, 2005).

Noutros estudos utilizando diferentes tipos de chocolate, foi salientado que o chocolate preto, onde o teor de 3-flavanóis é maior, tinha um efeito significativo na inibição da agregação plaquetária (Innes *et al.*, 2003; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). Além disso, as procianidinas de cacau adicionadas a amostras de sangue humano inibiram a activação plaquetária, em resposta à adrenalina. Foi também observada a inibição da actividade plaquetária após o consumo de uma bebida de cacau (Rein *et al.*, 2000a) e da administração de suplementos de procianidinas de cacau (Murphy *et al.*, 2003) em voluntários saudáveis.

1.4. APRESENTAÇÃO DO TRABALHO E OBJECTIVOS

Referências a curas milagrosas despertaram o interesse científico e comercial pela *Uncaria tomentosa*, de tal modo que já em 1997 existiam mais de 50 suplementos dietéticos de unha de gato, só nos Estados Unidos. Hoje, na internet, é fácil encontrar e comprar uma grande variedade de comprimidos ou cápsulas preparadas a partir de extractos ou da casca pulverizada desta planta, nem sempre mencionando a parte ou partes da planta utilizadas, ou o método de extracção.

No que concerne à qualidade, eficácia, estabilidade e segurança as plantas medicinais deviam seguir regras oficiais semelhantes às das substâncias quimicamente definidas, o que ainda não se verifica. Em termos de saúde pública é fundamental garantir o controlo de qualidade dos produtos medicinais à base de plantas, desde a colheita, até à dispensa numa dada forma farmacêutica. No entanto, em muitas preparações de plantas medicinais existe falta de informação sobre os mecanismos de acção, aplicações, doses apropriadas, formulações e também sobre estabilidade, origem, parte da planta ou mesmo espécie utilizada.

Tendo em conta a multiplicidade de plantas que existem com o nome de unha de gato são grandes os riscos de confusão entre plantas de espécies próximas, bem como o número de fraudes e adulterações provocada por falta de conhecimento dos produtores e distribuidores e por uma fiscalização deficiente.

Atendendo também à forma de preparação tradicional do decocto de *Uncaria tomentosa*, à natureza deste extracto de conservação precária, ao seu sabor amargo, as formas farmacêuticas sólidas orais revestem um papel importante para uma administração mais agradável, segura e eficaz. Estas formas farmacêuticas são estáveis e de fácil transporte, revelando-se muito úteis para mascarar odores e sabores desagradáveis, possibilitando uma administração mais cómoda e em doses adequadas. Com regulamentação apropriada é também mais facilmente assegurado o controlo de qualidade da matéria-prima em todas as fases desde a colheita, até a sua administração.

Por outro lado, dado o papel significativo desempenhado pelos antioxidantes na prevenção de um grande número de doenças, reveste-se de grande importância o facto de estarem demonstradas, *in vitro*, as propriedades antioxidantes do decoctos da casca de *Uncaria tomentosa*, para o que significativamente contribuem os 3-flavanóis mono- e poliméricos (proantocianidinas).

Atendendo à composição química da *Uncaria tomentosa* em alcalóides, terpenóides, esteróis, flavonóides e proantocianidinas, que lhe conferem as propriedades farmacológicas mencionadas na revisão bibliográfica, é de reconhecer que esta planta medicinal constitui o modelo ideal para a obtenção de formas farmacêuticas.

Para que tal seja possível são fundamentais os conhecimentos de Tecnologia Farmacêutica, que possibilitem obter preparações dotadas da máxima eficácia, doseadas com a maior precisão e apresentadas sob uma forma que facilite a sua conservação e administração e favoreça a sua biodisponibilidade.

Face ao exposto anteriormente e considerando que são escassos os trabalhos de investigação que aplicam os conhecimentos da Tecnologia Farmacêutica às plantas medicinais, estabelecemos para este trabalho de investigação os seguintes objectivos:

- Padronização de um decocto de cascas da *Uncaria tomentosa*, com base na correlação entre o seu perfil fenólico e a sua actividade antioxidante;
- Desenvolvimento, preparação e optimização de formas farmacêuticas sólidas orais a partir do decocto e de um extracto comercial de *Uncaria tomentosa*, de modo a favorecerem a adesão à terapêutica;
- Selecção da forma ou formas farmacêuticas que apresentem requisitos de qualidade, segurança e eficácia terapêutica;
- Comparação da actividade antioxidante das formas farmacêuticas desenvolvidas com outras já comercializadas, evidenciando a necessidade de comprovar, quer na matéria-prima, quer na forma farmacêutica a(s) actividade(s) biológica(s) imputada(s) à planta medicinal.

Atendendo aos objectivos propostos, o trabalho experimental foi estruturado da seguinte forma:

- Preparação e caracterização do decocto de *Uncaria tomentosa*. Comparação com outros produtos de uncária existentes no mercado (Capítulo II)
- Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida para administração oral (Capítulo III)
- Estudo da actividade antioxidante das formas farmacêuticas desenvolvidas e de outras comercializadas – uma aproximação ao seu comportamento *in vivo*. (Capítulo IV)

1.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abd El Mohsen M.M., Kuhnle G., Rechner A.R., Schroeter H., Rose S., Jenner P. e Rice-Evans C.A., 2002. Uptake and metabolism of epicatechin and its access to the brain after oral ingestion. *Free Radical Biology & Medicine* 15, 1693-1702.
- Abdel-Fatah M., Matsumoto K., Tabata K., Takayama H., Kitajima M., Aimi N. e Watanabe H., 2000. Effects of *Uncaria tomentosa* total alkaloid and its components on experimental amnesia in mice: elucidation using the passive avoidance test. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 52, 1553-1561.
- Aguilar, J. L., Rojas, P., Marcelo, A., Plaza, A., Bauer, R., Reininger, E., Klaas, C. A. e Merfort, I., 2002. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 81, 271-276.
- Akesson C., Pero R.W., e Ivars F., 2003. C-Med 100™, a hot water extract of *Uncaria tomentosa*, prolongs lymphocyte survival *in vivo*. *Phytomedicine* 10, 23.
- Akesson C., Lindgren H., Pero R., Leanderson T. e Ivars F., 2005. Quinic acid is a biologically active component of the *Uncaria tomentosa* extract C-Med 100™. *International Immunopharmacology* 5, 219-229.
- Allen-Hall L., Cano P., Arnason J.T., Rojas R., Lock O. e Lafrenie R.M., 2007. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1beta and TNF-alpha. *Journal of Ethnopharmacology* 109, 312-317.
- Aquino R., Simone F. De e Pizza C., 1989. Plant metabolites. Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products* 4, 679-685.
- Aquino R., Simone F. De, Vincieri F. F. e Pizza C., 1990. New polyhydroxylated triterpenes from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Products* 3, 559-564.
- Aquino R., De Feo V., De Simone F., Pizza, C. e Cirino G., 1991. Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Products* 54, 453-459.
- Aquino R., De Tommasi N., De Simone F. e Pizza C., 1997. Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 45, 1033-1040.
- Arteel G.E. e Sies H., 1999. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters* 26, 167-170.
- Arts I.C., Jacobs D.R. Jr, Gross M., Harnack L.J. e Folsom A.R., 2002. Dietary catechins and cancer incidence among postmenopausal women: the Iowa Women's Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 13, 373-382.

- Azizah A.H., Ruslawati N.M. N. e Swee Tee T., 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. *Food Chemistry* 64, 199-202.
- Baba S., Osakabe N., Yasuda A., Natsume M., Takizawa T., Nakamura T. e Terao J., 2000. Bioavailability of (-)-epicatechin upon intake of chocolate and cocoa in human volunteers. *Free Radical Research* 33, 635-641.
- Baba S., Osakabe N., Natsume M., Muto Y., Takizawa T. e Terao J., 2001. *In Vivo* comparison of the bioavailability of (+)-catechin, (-)-epicatechin and their mixture in orally administered rats. *The Journal of Nutrition* 131, 2885-2889.
- Baba S., Osakabe N., Natsume M. e Terao J., 2002. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1, 142-148.
- Bagchi D., Bagchi M., Stohs S. J., Das D. K., Ray S. D., Kuszynsky C. A., Joshi S. S. e Pruess H. G., 2000. Free radicals and graped seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicology* 148, 187-197.
- Balanehru S. e Nagarajan B., 1991 Protective effect of oleanolic acid and ursolic acid against lipid peroxidation. *Biochemistry International* 24, 981-990.
- Basu-Modak S., Gordon M.J., Dobson L.H., Spencer J.P., Rice-Evans C. e Tyrrell R.M., 2003. Epicatechin and its methylated metabolite attenuate UVA-induced oxidative damage to human skin fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 15, 910-921.
- Bednarek D., Łukasiak J., Kondracki M., Żurowska K., Falkiewicz B. e Niemczuk, 2004. Analysis of phenotype and functions of peripheral blood leukocytes in cellular immunity of calves treated with *Uncaria tomentosa*. *Bull Vet Inst Pulawy* 48, 289-296.
- Beg A.A., Baltimore D., 1996 An essential role for NF-kappaB in preventing TNF-alpha-induced cell death. *Science* 274, 782-784.
- Bentivegna S.S. e Whitney K.M., 2002. Subchronic 3-month oral toxicity study of grape seed and grape skin extracts. *Food and Chemical Toxicology* 40, 1731-1743.
- Bezanger-Beauquesne L., Pinkas M. e Torck, 1986. *Les Plantes dans la therapeutique moderne*. Editeur Maloine, Paris, 5-7.
- Ccahuana-Vasquez R.A., Santos S.S., Koga-Ito C.Y. e Jorge A.O., 2007. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Brazilian Oral Research* 21, 46-50.
- Cerri R., Aquino R., Simone F. De e Pizza, C., 1988. New quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Natural Products* 2, 257-261.

- Chen C.X., Jin R.M., Li Y.K., Zhong J., Yue L., Chen S.C. e Zhou JY, 1992. Inhibitory effect of rhynchophylline on platelet aggregation and thrombosis. *Zhongguo Yao Li Xue Bao* 13, 126-130.
- Chen Z.Y., Yao X.-Q., Chan F. L., Lau C.-W. e Huang Y., 2002. (-)Epicatechin induces and modulates endothelium dependent relaxation in isolated rat mesenteric artery rings. *Acta Pharmacologica Sinica* 23, 1188 -1192.
- Cheng A.C., Jian C.B., Huang Y.T., Lai C.S., Hsu P.C. e Pan M.H., 2007. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chemistry and Toxicology* 45, 2206-2218.
- Cisneros F. J., Jayo M. e Niedziela L., 2005. An *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract protects mice against ozone-induced lung inflammation. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 355-364.
- Commenges D., Scotet V., Renaud S., Jacqmin-Gadda H., Barberger-Gateau P. e Dartigues J.F., 2000. Intake of flavonoids and risk of dementia. *European Journal of Epidemiology* 16, 357-363.
- Cunha, A. Proença., Silva, Roque A., Pereira da e Rodrigues O., 2003. Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia. Serviço de Educação e Bolsas, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 9-11.
- de Feo. V., 1992. Medicinal and magical plants in the northern Peruvian Andes. *Fitoterapia* 63, 417-440.
- de Feo, V., 2003. Ethnomedical field study in northern Peruvian Andes with particular reference to divination practices. *Journal of Ethnopharmacology* 85, 253-256.
- de Freitas V. e Mateus N., 2001. Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 49, 940-945.
- de Martino, Martinot J.L., Franceschelli S., Leone A., Pizza C. e de Feo V., 2006. Proapoptotic effect of *Uncaria tomentosa* extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 91-94.
- Di Stasi L. C., Oliveira G. P., Carvalhaes M. A., Queiroz-Junior M., Tien O. S., Kakinami S. H. e Reis M. S., 2002. Medicinal plants popularly used in the brazilian tropical atlantic forest. *Fitoterapia* 73, 69-91.
- Déprez S., Brezillon C., Rabor S., Philippe C., Mila I., Lapierre C. e Scalbert A., 2000. Polymeric proanthocyanidins are catabolized by human colonic microflora into low-molecular-weight phenolic acids. *The Journal of Nutrition*, 2733-2738.
- Deshane J., Chaves L., Sarikonda K. V., Isbell S., Wilson L., Kirk M., Grubbs C., Barnes S., Meleth S. e Kim H., 2004. Proteomics analysis of rat brain protein

- modulations by grape seed extract. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 7872-7883.
- Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J. e Ciccia G., 1997. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research* 11, 254-256.
- Donovan J. L., Bell J. R., Kasim-Karakas S., Bruce German J., Walzem R. L., Hansen R. J. e Waterhouse A. L., 1999. Catechin is present as metabolites in human plasma after consumption of red wine. *The Journal of Nutrition* 129, 1662-1668.
- Donovan J.L., Crespy V., Manach C., Morand C., Besson C., Scalbert A. e Rémésy C., 2001. Catechin is metabolized by both the small intestine and liver of rats. *The Journal of Nutrition* 131, 1753-1757.
- Donovan J.L., Manach C., Rios L., Morand C., Scalbert A. e Rémésy C., 2002a. Procyanidins are not bioavailable in rats fed a single meal containing a grapeseed extract or the procyanidin dimer B3. *The British Journal of Nutrition* 87, 299-306.
- Donovan J.L., Kasim-Karakas S., German J.B. e Waterhouse A.L., 2002b Urinary excretion of catechin metabolites by human subjects after red wine consumption. *The British Journal of Nutrition* 87, 31-37.
- Donovan J.L., Crespy V., Oliveira M., Cooper K.A., Gibson B.B. e Williamson G., 2006. (+)-Catechin is more bioavailable than (-)-catechin: relevance to the bioavailability of catechin from cocoa. *Free Radical Research* 40, 1029-1034.
- Eberlin S., dos Santos L.M. e Queiroz M.L., 2005. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *International Immunopharmacology* 5, 1235-1246.
- Falkiewicz, B. e Lukasiak J., 2001. Vilcacora [*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. and *Uncaria guianensis* (Aublet) Gmell.] – a review of published scientific literature. *Case Reports and Clinical Practice Revue* 2, 305-316.
- Farinha A. e Cepêda A. M., 2000. Qualidade de Medicamentos à Base de Plantas Medicinais. *Boletim LEF* 27, 1-9.
- Frankel, E. N., 1999. Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. *Fett/Lipid* 101, 450-455S.
- Ganzera M., Muhammad I., Khan R. A. e Khan I. A., 2001. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. *Planta Medica* 67, 447-450.
- Garcia Prado E., Garcia Gimenez M.D., De la Puerta V. R., Espartero Sanchez J.L. e Saenz Rodriguez M.T., 2007. Antiproliferative effects of mitraphylline, a

pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines. *Phytomedicine* 14, 280-284.

- Geleijnse J.M., Launer L.J., Van der Kuip D.A., Hofman A. e Witteman J.C., 2002. Inverse association of tea and flavonoid intakes with incident myocardial infarction: the Rotterdam Study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75, 880-886.
- Gonçalves, C., Dinis, T. e Batista, M.T., 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.
- Gonthier, M. P., Donovan J. L., Texier O., Felgines C., Remesy C., e Scalbert A., 2003. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 837-844.
- Gonzales G.F. e Valerio L.G. Jr., 2006. Medicinal plants from Peru: a review of plants as potential agents against cancer. *Anticancer-Agents in Medicinal Chemistry* 6, 429-444.
- Gu L., Kelm M. A., Hammerstone J. F., Beecher G., Holden J., Haytowitz D., Gebhardt S., e Prior R. L., 2004. Concentrations of proanthocyanidins in common foods and estimations of normal consumption. *The Journal of Nutrition* 134, 613-617.
- Gunjima M., Tofani I., Kojima Y., Maki K. e Kimura M., 2004. Mechanical evaluation of effect of Grape Seed Proanthocyanidins extract on debilitated mandibles in rats. *Dental Materials Journal* 23, 67-74.
- Halliwel B., 2007. Dietary polyphenols: Good, bad, or indifferent for your health? *Cardiovascular Research* 73, 341-347.
- Harborne J. B. and Williams C. A., 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55, 481-504.
- Heigl D. e Franz G., 2003. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. *Pharmazie* 58, 881-885.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. e Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heiss C., Dejam A., Kleinbongard P., Schewe T. e Sies H, 2003. Vascular Effects of Cocoa Rich in Flavan-3-ols *JAMA, American Medical Association* 290, 1030-1031.
- Heitzman, Mary E., Neto Catherine, C., Winiarz, Elizabeth, Vaisberg, Abraham J. e Hammond and Gerald B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria (Rubiaceae)*. *Phytochemistry* 66, 5-29.

- Hertog M.G., Feskens E. J., Hollman P. C., Katan M. B. e Kromhout D., 1993. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 23, 1007-1011.
- Hollman, P. C. H. , 2001. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 81, 842-852.
- Holt R. R., Lazarus S. A., Sullards M. C., Zhu Q. Y., Schramm D. D., Hammerstone J. F., Fraga C. G., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2002. Procyanidin dimer b2 (epicatechin-(4 β -8)-epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 798-804.
- Hu M., McClements D. J. e Decker E- A., 2004. Antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich extract from grape seed in whey protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5272-5276.
- Innes A.J., Kennedy G., McLaren M., Bancroft A.J. and Belch J.J., 2003. Dark chocolate inhibits platelet aggregation in healthy volunteers. *Platelets* 14, 325-327.
- Ito H., Gonthier M.P., Manach C., Morand C., Mennen L., Rémésy C. e Scalbert A., 2005. Polyphenol levels in human urine after intake of six different polyphenol-rich beverages. *The British Journal of Nutrition* 94, 500-509.
- Jurgensen S., Dalbo S., Angers P., Santos A.R. e Ribeiro-do-Valle R.M., 2005 Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 81, 466-477.
- Kang T-H., Murakami Y., Takayama H., Kitajima M., Aimi N., Watanabe H. e Matsumoto K., 2004. Protective effect of rhynchophylline and isorhynchophylline on *in vitro* ischemia-induced neuronal damage in the hippocampus: putative neurotransmitter receptors involved in their action. *Life Sciences* 76, 331-343.
- Katiyar S.K., 2008. Grape seed proanthocyanidines and skin cancer prevention: inhibition of oxidative stress and protection of immune system. *Molecular Nutrition Food Research* 52, 71S-76S.
- Keen C.L., Holt R.R., Oteiza P.I., Fraga C.G. e Schmitz H.H., 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 298S-303S.
- Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M. P. e Teppner H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. *Journal of Ethnopharmacology* 64, 23-24.
- Kim S. H., Ahn B-Z. and Ryu S. Y, 1998. Antitumour effects of ursolic acid isolated from *Oldenlandia diffusa*. *Phytotherapy Research* 12, 553-556.

- Kim H., Hall P., Smith M., Kirk M., Prasain J. K., Barnes S. e Grubbs C., 2004. Chemoprevention by grape seed extract and genistein in carcinogen-induced mammary cancer in rats is diet dependent. *The Journal of Nutrition* 134, 3445S-3452S.
- Kitajima M., Hashimoto K., Yokoya M., Takayama H. e Aimi N., 2000. Two new 19-hydroxyursolic acid-type triterpenes from Peruvian 'Uña de Gato' (*Uncaria tomentosa*). *Tetrahedron* 56, 547-552.
- Kitajima M., Yokoya M., Takayama H. e Aimi N., 2002. Synthesis and absolute configuration of a new 3,4-dehydro- β -carboline-type alkaloid, 3,4-dehydro-5(S)-5-carboxystrictosidine, isolated from Peruvian uña de gato (*Uncaria tomentosa*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 50, 1376-1378.
- Kitajima M., Hashimoto K., Yokoya M., Takayama H., Sandoval M. e Aimi N., 2003. Two new nor-triterpene glycosides from Peruvian "Uña de Gato" (*Uncaria tomentosa*). *Journal of Natural Products* 66, 320-323.
- Kitajima M., Hashimoto K., Sandoval M., Aimi N. e Takayama H., 2004. New oleanan-type triterpene and cincholic acid glycosides from Peruvian uña de gato (*Uncaria tomentosa*). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52, 1258-1261.
- Kloucek P., Polesny Z., Svobodova B., Vlkova E. e Kokoska L., 2005. Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Callería District. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 309-312.
- Kolodziej, H., Kayser, O., Kiderlen, A. F., Ito H., Hatano T., Yoshida T. e Foo L.Y., 2001. Proanthocyanidins and related compounds: antileishmanial activity and modulatory effects on nitric oxide and tumor necrosis factor- α -release in the murine macrophage-like cell line RAW 264.7. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 24, 1016-1021.
- Kuhnle G., Spencer J.P., Schroeter H., Shenoy B., Debnam E.S., Srai S.K., Rice-Evans C. e Hahn U., 2000. Epicatechin and catechin are O-methylated and glucuronidated in the small intestine. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 22, 507-512.
- Kuras M., Nowakowska J., Sliwinska E., Pilarski R., Ilasz R., Tykarska T., Zobel A. e Gulewicz K., 2006. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 211-221.
- Lamm, S., Sheng Y., Pero R. W., 2001. Persistent response to pneumococcal vaccine in individuals supplemented with a novel water soluble extract of *Uncaria tomentosa*, C-Med-100™. *Phytomedicine* 8, 267-274.
- Lamuela-Raventós R. M., Roméro-Pérez A. I., Andrés-Lacueva C. e Tornero A., 2005. Review : Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International* 11, 159-176.

- Laus G., Brössner D. e Keplinger K., 1997. Alkaloids of Peruvian *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 45, 855-860.
- Laus G., 2004. Advances in chemistry and bioactivity of the genus *Uncaria*. *Phytotherapy Research* 18, 259-274.
- Lee K. W., Kim Y. J., Kim D-O, Lee H. J. e Lee C. Y., 2003. Major phenolics in apple and their contribution to the total antioxidant capacity. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 51, 6516- 6520.
- Lemaire I., Assinewe V., Cano P., Awang, V. C. D. e Arnason, J. T., 1999. Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). *Journal of Ethnopharmacology* 64, 109-115.
- Li W-G., Zhang X-Y., Wu Y-J. and Tian X., 2001. Anti-inflammatory effect and mechanism of proanthocyanidins from grape seeds. *Acta Pharmacologica Sinica* 22, 1117-1120.
- Lotito S. B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H. H., Steinberg F. M., Keen C. L. e Fraga C. G., 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 945-951.
- Mammone T., Akesson C., Gan D., Giampapa V. e Pero R. W., 2006. 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*, 20, 178-183.
- Manach C., Williamson G., Morand C., Scalbert A. e Rémésy C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 230S-242S.
- Mao T.K. Van De Water J., Keen C.L., Schmitz H.H. e Gershwin M.E., 2003. Cocoa flavonols and procyanidins promote transforming growth factor-beta1 homeostasis in peripheral blood mononuclear cells. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 228, 93-99.
- Markham K.R. e Bloor S. J., 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice, In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans, C.A. and Packer, L. Eds. Marcel Dekker Inc., New York, 1-34.
- Masumiya H., Saitoh T., Tanaka Y., Horie S., Aimi N., Takayama H., Tanaka H. e Shugenobu K., 1999. Effects of hirsutine and dihydrocorynantheine on the action potentials of sino-atrial node, atrium and ventricle. *Life Sciences* 65, 2333-2341.
- Mathur S., Devaraj S., Grundy S.M., Jialal I., 2002. Cocoa products decrease low density lipoprotein oxidative susceptibility but do not affect biomarkers of inflammation in humans. *Journal of Nutrition* 132, 3663-3667.

- Matsumoto K., Morishige R., Murakami Y., Tohda M., Takayama H., Sakakibara I. e Watanabe H., 2005. Suppressive effects of isorhynchophylline on 5-HT_{2A} receptor function in the brain: Behavioural and electrophysiological studies *European Journal of Pharmacology* 517, 191-199.
- Mazur A., Bayle D., Lab C., Rock E., e Rayssiguier Y., 1999. Inhibitory effect of procyanidin rich extract on LDL oxidation *in vitro*. *Atherosclerosis* 145, 421-422.
- Mennen L.I., Walker R., Bennetau-Pelissero C. e Scalbert A., 2005. Risks and safety of polyphenol consumption. *The American Journal of Clinical Nutrition* 81, 326S-329S.
- Miranda E.M., Sousa J. A. e Pereira R. C. A., 2001. Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha de gato (*Uncaria* spp.) no Vale do Rio Juruá, AC. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, Embrapa, Brasil. Documentos 68, 1-24.
- Moini H., Guo Q. e Packer L., 2000. Enzyme inhibition and protein-binding action of the procyanidin-rich french maritime pine bark extract, pycnogenol: effect on xanthine oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48, 5630-5639.
- Moini H., Guo Q. e Packer L., 2002. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase inhibition by the procyanidin-rich French maritime pine bark extract, pycnogenol: a protein binding effect. *Advances in experimental medicine and biology* 545, 141-149.
- Moreno S.R., Silva A.L., Diré G., Honeycut H., Carvalho J.J., Nascimento A.L., Pereira M., Rocha E.K., Oliveira-Timóteo M., Arnobio A., Olej B., Bernardo-Filho M. e Caldas L.Q., 2007. Effect of oral ingestion of an extract of the herb *Uncaria tomentosa* on the biodistribution of sodium pertechnetate in rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40, 77-80.
- Muhammad I., Dunbar, D.C., Khan, R. A., Ganzera M. e Khan, I. A., 2001. Investigation of Uña de Gato I. 7-Deoxyloganic acid and 15N NMR spectroscopic studies on pentacyclic oxindole alkaloids from *Uncaria tomentosa*. *Phytochemistry* 57, 781-785.
- Mur E., Hartig F., Eibl G. e Schirmer M., April 2002. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 29, 656-658.
- Murkherjee P. e Verpoort R., 2003. GMP for Botanicals. Regulatory and Quality Issues on Phytochemicals. Business Horizons Pharmaceutical Publishers. New Delhi. India
- Murphy K.J., Chronopoulos A.K., Singh I., Francis M.A., Moriarty H., Pike M.J., Turner A.H., Mann N.J. and Sinclair A.J., 2003. Dietary flavanols and

- procyanidin oligomers from cocoa (*Theobroma cacao*) inhibit platelet function. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 1466-1473.
- Nandakumar V., Singh T. e Katiyar S.K., 2008. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. *Cancer Letters* 269, 378-387.
- Newall C. A., Anderson L. A. e Phipplipson J. D., 1996. *Herbal Medicines – A Guide for Health-Care profesionels*. The Pharmaceutical Press. London, VIII.
- Noumi E., Houngue F. e Lontsi D., 1999. Traditional Medicines in primary health care: plants used for the treatment of hypertension in Bafia, Cameroon. *Fitoterapia* 70, 134-139.
- Ozaki Y., 1989. Pharmacological studies of indole alkaloids obtained from domestic plants, *Uncaria rhynchophylla* Miq. and *Amsonia elliptica* Roem. et Schult. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 94, 17-26.
- Packer L., Rimbach G. and Virgili F., 1999. Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*pinus maritima*) bark, pycnogenol. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 704-724.
- Paduch R., Kandefler-Szerszeń M., Trytek M. e Fiedurek J., 2007. Terpenes: substances useful in human healthcare. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 55, 315-327.
- Pataki T., Bak I., Kovacs P., Bagchi D., Das D. K. e Tosaki A., 2002. Grape Seed Proanthocyanidins improved cardiac recovery during reperfusion after ischemia in isolated rat hearts. *The American Journal of Clinical Nutrition* 75, 884-899.
- Pignatelli P., Pulcinelli F.M., Celestini A., Lenti L., Ghiselli A., Gazzaniga P.P. e Violi F., 2000. The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *The American Journal of Clinical Nutrition* 72, 1150-1155.
- Pilarski R., Zielinski H., Ciesiolka D. e Gulewicz K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 18-23.
- Pilarski R., Poczekaj-Kostrzewska M., Ciesiołka D., Szyfter K. e Gulewicz K., 2007. Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Pharmacological Reports* 59, 565-572.
- Pimenta J., 2005. Ashaninka, *Enciclopédia Povos Indígenas no Brasil*. ISA (Instituto Sócioambiental) (<http://www.socioambiental.org/pib/epi/ashaninka/nome.shtml>).
- Pinent M., Blay M., Bladé M. C., Salvadó M. J., Arola L. e Ardévol Al., 2004. Grape seed-derived procyanidins have an antihyperglycemic effect in streptozotocin-induced diabetic rats and insulinomimetic activity in insulin-sensitive cell lines. *Endocrinology* 145, 4985-4990.

- Porter, L. J., 1989. *Methods in Plant Biochemistry I*. Academic Press Limited.
- Ray S. D., Kumar M. A. e Bagchi D., 1999. A novel phroanthocyanidin IH636 grape seed extract increases *in vivo* Bcl-XI expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 369, 42-58.
- Rein D., Lotito S., Holt R. R., Keen C. L., Schmitz H. H., e Fraga C. G., 2000b. Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *Journal of Nutrition* 130, 2109S-2114S.
- Rein D., Paglieroni T. G., Pearson D. A., Wun T, Schmitz H. H., Gosselin R. e Keen C. L., 2000a. Cocoa and wine polyphenols modulate platelet activation and function. *The Journal of Nutrition* 130, 2120S-2126S.
- Reinhard, K-H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: cat's claw, uña de gato, or saventaro. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 5, 143-151.
- Rice-Evans C. A., Miller N. J. e Paganga G., 1996. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine* 20, 933-956.
- Rice-Evans, C. A., 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797-807.
- Rios L., Lazarus S. A., Rémésy C., Scalbert A., e Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1106-1110.
- Rios L.Y, Gonthier M.P., Rémésy C., Mila I., Lapierre C., Lazarus S.A., Williamson G. e Scalbert A., 2003. Chocolate intake increases urinary excretion of polyphenol-derived phenolic acids in healthy human subjects. *American Journal of Clinical Nutrition* 77, 912-918.
- Riva L., Coradini D., Di Fronzo G., De Feo V., Tommasi N., De Simone F. e Pizza C., 2001. The antiproliferative effects of *Uncaria tomentosa* extracts and fractions on the growth of breast cancer cell line. *Anticancer Research* 21, 2457-2461.
- Salazar, E.L. e Jayme, V., 1998. Depletion of specific binding sites for estrogen receptor by *Uncaria tomentosa*. *Proceedings of the Western Pharmacology Society* 41, 123-124.
- Samuelson G., 1999. *Drugs of Natural Origin. A textbook of Pharmacognosy*. 4th.revised edition. Apotekarsocieteten. Sweden.
- Sandoval M., Charbonnet R. M., Okuhama N. N., Roberts J., Krenova Z., Trentacosti A. M. e Miller M. J. S., 2000. Cat's claw inhibits TNF- α production and

- scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 71-78.
- Sandoval, M., Okuhama N. N., Zhang X.-J., Condezo L. A., Lao J., Angeles F. M., Musah R. A., Bobrowski P. e Miller M. J. S., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325-37.
- Sandoval-Chacón, M, Thompson, J. H., Zhang, X. J., Liu, X., Mannick, E. E., Sadowska-Krowicka, H., Charbonnet, R. M., Clark, D. A., Miller, M. J., 1998, Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF- κ B. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 12, 1279-1289.
- Santa Maria A., Lopez A, Diaz M. M., Alban J., Galan de Mera A., Orellana J. A. V. e Pozuelo J. M., 1997. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays *in vitro*. *Journal of Ethnopharmacology* 57, 183-187.
- Santos-Buelga C. e Scalbert A., 2000. Proanthocyanidins and tannin-like compounds: nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80, 1094-1117.
- Scalbert, A. e Williamson, G., 2000. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 2073S-2085S.
- Schafer A. e Hogger P., 2007. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes research and clinical practice* 77, 41-46.
- Schewe T., Kühn H., Sies H., 2002. Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *The Journal of Nutrition* 132, 1825-1829.
- Schneider H., Schwiertz A., Collins M.D. e Blaut M., 1999. Anaerobic transformation of quercetin-3-glucoside by bacteria from the human intestinal tract. *Archives of Microbiology* 171, 81-91.
- Schofield J. A. , Hagerman A.E. e Harold A., 1998. Loss of tannins and other phenolics from willow leaf litter. *Journal of Chemical Ecology*. 24, 1409-1421.
- Schofield P., Mbugua D.M. e Pell A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Sciences Technology* 91, 21-40.
- Schramm D.D., Karim M., Schrader H.R., Holt R.R., Kirkpatrick N.J., Polagruto J.A., Ensunsa J.L., Schmitz H.H. e Keen C.L., 2003. Food effects on the absorption and pharmacokinetics of cocoa flavanols. *Life Sciences* 4, 857-869.
- Schroeter H., Spencer J.P., Rice-Evans C. e Williams R.J., 2001. Flavonoids protect neurons from oxidized low-density-lipoprotein-induced apoptosis involving c-Jun N-terminal kinase (JNK), c-Jun and caspase-3. *The Biochemical Journal* 358, 547-557.

- Schroeter H., Heiss C., Balzer J., Kleinbongard P., Keen C.L., Hollenberg N.K., Sies H., Kwik-Urbe C., Schmitz H.H. e Kelm M., 2006. (-)-Epicatechin mediates beneficial effects of flavanol-rich cocoa on vascular function in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 24, 1024-1029.
- Senatore, A., Cataldo A., Iaccarino F. P.e Elberti M. G., 1989. Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*. *Bollettino Societa di Biologia Sperimentale* 65, 517-520.
- Serafini M., Bugianesi R., Maiani G., Valtuena S., De Santis S. e Crozier A., 2003. Plasma antioxidants from chocolate. *Nature* 28,1013.
- Sheng Y., Pero, R, Amiri, A. e Bryngelsson, C., 1998. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. *Anticancer Research* 18, 3363-3368.
- Sheng Y., Bryngelsson, C. e Pero, R., 2000a. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-Med-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 115-26.
- Sheng Y. C., Pero, R. e Wagner, H., 2000b. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Phytomedicine* 7, 137-143.
- Sheng, Y., Holmgren K., Pero, R. W., 2001. DNA repair enhancement of aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* in a human volunteer study. *Phytomedicine* 8, 275-282.
- Sheng Y., Akesson C., Holmgren K., Bryngelsson, C., Giamapa V. e Pero, R., 2005. An active ingredient of Cat's claw water extracts. Identification and efficacy of quinic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 577-584.
- Shi J.S. e Kenneth H. G., 2002. Effect of rhynchophylline on apoptosis induced by dopamine in MT2 cells. *Acta Pharmacologica Sineca* 23, 143-149.
- Shi J.S., Yu J.X., Chen X.P. e Xu R.X, 2003. Pharmacological actions of *Uncaria* alkaloids, rhynchophylline and isorhynchophylline. *Acta Pharmacologica Sineca* 24, 97-101.
- Sies H., Schewe T., Heiss C. and Kelm M., 2005. Cocoa polyphenols and inflammatory mediators. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 304S-312S.
- Silberberg, M.; Morand, C.; Mathevon, T.; Besson, C.; Manach, C.; Scalbert, A. e Remesy, C., 2005. The bioavailability of polyphenols is highly governed by the capacity of the intestine and of the liver to secrete conjugated metabolites. *European Journal of Nutrition*, 1-9.

- Skibola C.F. and Smith M.T., 2000. Potential health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radical Biology & Medicine* 29, 375-383.
- Spelman K., Burns J., Nichols D., Winters N., Ottersberg S. e Tenborg M., 2006. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. *Alternative Medicine Review: a Journal of Clinical Therapeutic* 11, 128-150.
- Spencer J.P., Chaudry F., Pannala A. S., Srail S. K., Debnam E. e Rice Evans C., 2000. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical-Research-Communication* 27, 236-241.
- Spencer, J. P., Schroeter H., Crossthaihe A. J., Gunter K., Williams R. J. e Rice-Evans C., 2001a. Contrasting influences of glucuronidation and *O*-methylation of epicatechin on hydrogen peroxide-induced cell death in neurons and fibroblasts. *Free Radical Biology and Medicine* 31, 1139-1146.
- Spencer J.P., Schroeter H., Rechner A.R. e Rice-Evans C., 2001b Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. *Antioxidants & Redox Signaling* 3, 1023-1039.
- Spencer. J.P., 2003. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *The Journal of Nutrition* 133, 3255S-3261S.
- Steinberg, F. M., Holt R. R., Schmitz H. H. e Keen L., 2002. Cocoa procyanidin chain length does not determine ability to protect LDL from oxidation when monomer units are controlled. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 645-652.
- Takahashi T., Kamiya T., Hasegawa A. e Yokoo Y., 1999. Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells *in vitro* and activate hair follicle growth *in vivo*. *The Journal of Investigative Dermatology* 112, 310-316.
- Valerio L.G. Jr e Gonzales G.F., 2005. Toxicological aspects of the South American herbs cat's claw (*Uncaria tomentosa*) and Maca (*Lepidium meyenii*): a critical synopsis. *Toxicological Reviews* 24, 11-35.
- Wagner, H., Kreutzkamp, B. e Jurcic, K., 1985. Die Alkaloide von *Uncaria tomentosa* und ihre Phagozytose-steigernde Wirkung. *Planta Medica* 51, 419-423.
- Wang J. F., Schramm D. D., Holt R. R., Ensunsa J. L., Fraga C. G., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2000. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *Journal of Nutrition* 130, 2115S-2119S.
- Ward N. Croft K. D., Pudley I. B. e Hodgson J. M., 2004. Supplementation with grape seed polyphenols results in increased urinary excretion of

3-hydroxyphenylpropionic acid, an important metabolite of proanthocyanidins in humans. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 52, 5545-5549.

- Weyant M. J., Carothers A. M., Dannenberg A. J. e Bertagnolli M. M., 2001. (+)-Catechin inhibits intestinal tumor formation and suppresses focal adhesion kinase Activation in the Min/+ Mouse. *Cancer Research* 61, 118-125.
- WHO Information, May 2003. Fact Sheet n°134 (disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>).
- Williams J.E., 2001. Review of antiviral and immunomodulating properties of plants of the Peruvian rainforest with a particular emphasis on Uña de Gato and Sangre de Grado. *Alternative Medicine Review* 6, 567-579.
- Yamakoshi J., Saito M., Kataoka S. e Kikuchi M., 2002. Safety evaluation on proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food and Chemical Toxicology* 40, 599-607.
- Yang C.S., Sang S., Lambert J.D. e Lee M.J., 2008. Bioavailability issues in studying the health effects of plant polyphenolic compounds. *Molecular Nutrition Food Research* 52, 139S-151S.
- Yoshino K., Suzuki M., Sasaki K., Miyase T. e Sano M., 1999. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 223-229.
- Zhang W.B., Chen C.X., Sim S.M. e Kwan C.Y., 2004. *In vitro* vasodilator mechanisms of the indole alkaloids rhynchophylline and isorhynchophylline, isolated from the hook of *Uncaria rhynchophylla* (Miquel). *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 369, 232-238.
- Zhu Q. Y., Holt R. R., Lazarus S. H., Ensunsa J. L., Hammerstone J. F., Schmitz, H. H. e Keen, C. L., 2002a. Stability of the flavan-3-ols epicatechin and catechin and related dimeric procyanidins derived from cocoa. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50, 1700-1705.
- Zhu Q.Y., Holt R.R., Lazarus S.A., Orozco T.J. e Keen C.L., 2002b. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Experimental Biology and Medicine* (Maywood) 227, 321-329.
- Zhu Q. Y., Hammerstone J. J., Jazarus S. A., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2003. Stabilizing effect of ascorbic acid on flavan-3-ols and dimeric procyanidins from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 828-833.

Capítulo II

Preparação e caracterização do decocto de *Uncaria tomentosa*
Comparação com outros produtos de uncária existentes no mercado

2. INTRODUÇÃO

Os decoctos da casca do caule da *Uncaria tomentosa*, preparados de acordo com a medicina tradicional peruana têm sido usados para o tratamento de vários problemas de saúde (Ganzera *et al.*, 2001; Sheng *et al.*, 2005).

Estudos efectuados para avaliar a composição polifenólica deste tipo de extractos evidenciaram a presença de ácidos fenólicos, essencialmente ácido cafeico e proantocianidinas. Foi demonstrada a sua elevada capacidade antioxidante e verificado que a supressão das proantocianidinas conduzia a uma subsequente perda das propriedades antioxidantes. Estes resultados sugeriram uma importante contribuição das proantocianidinas para a referida actividade (Gonçalves *et al.*, 2005).

Admite-se actualmente que os antioxidantes desempenham um papel importante na prevenção de um grande número de doenças (Sandoval *et al.*, 2002). O stresse oxidativo que está envolvido em fenómenos como a mutagénese, a carcinogénese, a peroxidação lipídica, as alterações da função da membrana e ainda a oxidação e fragmentação de proteínas (Lamuella-Raventós *et al.*, 2005), pode ser minimizado pelo recurso a antioxidantes.

O uso de suplementos alimentares e produtos com actividade antioxidante tem aumentado nos últimos anos, à medida que foram surgindo estudos epidemiológicos que associaram as dietas ricas em antioxidantes à redução da incidência de diversas doenças crónicas (Rice-Evans, 2001).

A avaliação da actividade antioxidante e dos compostos por ela responsáveis reveste-se de extrema importância no estudo dos extractos usados directamente ou administrados sob a forma de preparações farmacêuticas.

2.1. MATERIAIS

Neste trabalho foram analisadas três diferentes amostras de *Uncaria tomentosa*:

a) Cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd) DC, Matsu S.A., das Agroindústrias Chanchamayo, Lima, Peru; gentilmente enviadas pela Dra. Olga Lock de Ugaz, da Universidade Pontifícia Católica de Lima, Peru. O material foi conservado em lugar

seco, ao abrigo da luz, no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

b) Extracto de *Uncaria tomentosa* (Cat's Claw dry extract 3% alkaloids) (lote Y061803-UNA), gentilmente oferecido pela empresa Labialfarma, Felgueira, Portugal, amostra adiante designada simplesmente por extracto comercial.

c) Cápsulas manufacturadas como suplemento alimentar, constituídas por casca pulverizada, “Unha de gato 500”, Naturmil®, distribuídas em Portugal pela DietMed, Produtos Dietéticos e Medicinais, Lda, que passará a ser denominada por uncária Naturmil®.

Os reagentes utilizados, todos de grau analítico foram: acetato de sódio trihidratado (62767.050); ácido acético 96% (lote C10 Z122162); ácido clorídrico fumante 37% (1.00317.1000); ácido fórmico (lote K35590264601); metanol LiChrosolv (K35802407); tartarato de sódio di-hidratado (lote 011A473864), todos da Merck, Darmstadt, Alemanha; DPPH (2,2, difenil-1-picril-hidrazilo) (lote 013k1351), Sigma-Aldrich Chemie, Alemanha; vanilina (lote 24605078) Fluka Chemika, Suíça.

Como padrão utilizou-se a catequina monohidratada, mínimo 98% (lote 58H1174), Sigma-Aldrich Chemie, Alemanha.

2.2. MÉTODOS

2.2.1 PREPARAÇÃO DO EXTRACTO DE *UNCARIA TOMENTOSA*

A extracção de compostos bioactivos em produtos naturais (cascas, folhas, frutos, sementes, raízes) pode ser feita com solventes de polaridades diferentes, isoladamente, ou em misturas, de acordo com a natureza dos compostos que se pretende extrair (Andreo e Jorge, 2006). Algumas etapas preliminares devem, no entanto, ser realizadas para facilitar o processo de extracção e conservar os compostos antioxidantes, que são sensíveis à acção da luz, pH, oxigénio e temperatura (Azizah *et al.*, 1999; Andreo e Jorge, 2006). As partes da planta a utilizar são normalmente pulverizadas, pois assim, o material a extrair apresenta maior superfície de contacto com o solvente de extracção. Posteriormente os extractos são concentrados, liofilizados e/ou congelados.

A divisão física do material a extrair é um dos passos críticos na preparação das amostras. Neste trabalho, a casca da *Uncaria tomentosa*, a parte da planta habitualmente utilizada na medicina tradicional peruana (Keplinger *et al.*, 1999), foi pulverizada e a sua granulometria calibrada através de tamizes (Endecotts mesh N° 060, Aperture 0,098 250 mm).

Protocolo experimental

Foram pesados, em balança analítica (Mettler AE 240) cerca de 0,750 g de amostra de *Uncaria tomentosa* pulverizada. Esta quantidade foi colocada num matraz, ao qual se adicionaram 150 ml de água destilada. A mistura foi levada à ebulição em bico de Bunsen, transferindo-se então para banho de água fervente, onde se manteve durante 40 minutos. Findo este tempo, o decocto foi arrefecido até à temperatura ambiente e o volume aferido a 250 ml, com água destilada.

Decantou-se e filtrou-se por um papel de filtro (Whatman) de 12 cm de diâmetro, rejeitando-se os primeiros 50 ml de filtrado, segundo procedimento para a determinação de taninos nos fármacos vegetais (F.P. VIII, 2005).

Concentrou-se sob vácuo, em evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R:114 – Waterbath B-480), a temperatura inferior a 40 °C, até um volume reduzido.

O extracto concentrado foi finalmente liofilizado (FTS Systes EZ-Dry-150) e conservado, ao abrigo da luz e da humidade, no frio, a -20 °C, até à sua utilização.

Este procedimento foi repetido aproximadamente uma centena de vezes, de forma a obter quantidade suficiente de liofilizado, que constituísse um lote homogéneo, a utilizar em todos os ensaios.

O rendimento de cada extracto foi expresso em massa seca de planta.

2.2.2. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE NAS AMOSTRAS ESTUDADAS

2.2.2.1. Método gravimétrico

A massa seca das cascas de *Uncaria tomentosa* foi calculada a partir de 12 réplicas de 0,05 g de amostra. Utilizou-se o método gravimétrico, por perda de massa,

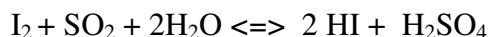
em estufa aquecida a 100°C durante 24 h e subsequentes aquecimentos de 1 h até peso constante.

A massa seca da uncária Naturmil® foi calculada a partir de 3 réplicas de 0,100 g de amostra, pelo processo anteriormente descrito.

2.2.2.2. Método de Karl-Fisher

A massa seca dos extractos foi calculada a partir de 0,100 g de amostra, utilizando o método de Karl-Fisher.

O método de Karl Fischer é um método titrimétrico, referido na *Eur.Ph.* (2005) e baseia-se na oxidação do SO₂ pelo I₂, em presença da água.



Utiliza-se o reagente de Karl Fisher, preparado pela acção de dióxido de enxofre sobre uma solução de iodo, numa mistura de piridina anidra e metanol anidro. A água reage com este reagente em duas etapas, sendo construída uma molécula de iodo por cada molécula de água presente.



(RN = Base)

Protocolo experimental

O reagente de Karl Fisher deve ser padronizado diariamente, por não ser estável, devido à presença de metanol em excesso. O método deve decorrer em meio anidro.

A determinação do título foi feita com o tartarato de sódio (Na₂C₄H₆O₆.2H₂O), tendo em conta que a molécula (PM = 230,09 g), possui 0,156 g de água.

Aliquotas de 0,100 g de amostra foram injectadas na célula de reacção do coulómetro (787KF TITRINO Metrohm), na qual o iodo para a reacção de Karl-Fischer é gerado no ânodo. Quando toda a água da amostra tiver sido titulada, ocorre um

excesso de iodo e a titulação termina. Subsequentemente, é possível calcular a % de água presente na amostra, a partir do volume de reagente de Karl Fisher gasto, com base na estequiometria de reacção, uma mole de iodo reage com uma mole de água, sendo a quantidade de água proporcional à corrente total integrada de acordo com a Lei de Faraday (efectuada automaticamente pelo aparelho).

2.2.3. DOSEAMENTO DE 3-FLAVANÓIS PELO MÉTODO DA VANILINA-ÁCIDO CLORÍDRICO

Os 3-flavanóis (Fig. 25) possuem no anel A uma densidade electrónica especialmente elevada devido à presença de grupos hidroxilos fenólicos, característica que os torna particularmente sensíveis ao ataque electrofílico. Em meio ácido podem sofrer facilmente reacções de substituição electrofílica com aldeídos, nas posições 6 e 8 do anel floroglucinólico, pelo facto destas posições terem um carácter fortemente electronegativo.

Quando a reacção ocorre com aldeídos aromáticos, os produtos da reacção são solúveis e corados, característica que é usada para a análise quantitativa espectrofotométrica dos 3-flavanóis monoméricos e dos seus polímeros.

A reacção não depende do tipo de hidroxilação do anel B e está limitada a flavonóides com grupos hidroxilo não substituídos *meta* orientados, com a ligação C₂-C₃ saturada e sem grupo cetona em C₄. Estas características tornam-na muito específica para as proantocianidinas (Waterman e Mole, 1994), embora possam surgir reacções cruzadas com alguns compostos específicos (Schofield *et al.*, 2001).

Neste trabalho a quantificação das proantocianidinas foi realizada por uma técnica que utiliza a vanilina. Este aldeído reage com os 3-flavanóis (Fig. 44) dando origem a compostos corados, que absorvem a 500 nm (Julkunen-Tiito, 1985).

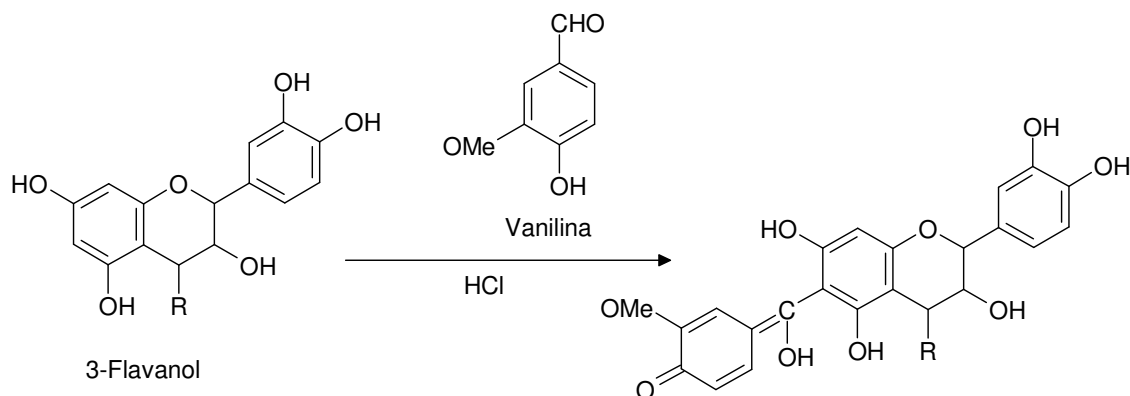


Figura 44. Reacção entre um 3-flavanol e a vanilina

Protocolo experimental.

Colocaram-se 100 μ l do extracto solubilizado em metanol (MeOH) anidro, num tubo de ensaio protegido por papel de alumínio. Juntaram-se 3 ml de vanilina a 4% (w/v), no mesmo solvente e agitou-se vigorosamente a mistura, no vórtex, durante um minuto. Adicionou-se imediatamente 1,5 ml de ácido clorídrico (HCl) concentrado. A mistura foi novamente sujeita a agitação vigorosa, durante um minuto no vórtex.

A absorvância foi lida a 500 nm, após 20 minutos à temperatura ambiente, num espectrofotómetro (Hitachi U-2000).

Os ensaios foram lidos contra um branco, preparado do mesmo modo, mas contendo 3 ml de MeOH anidro, em substituição dos 3 ml da solução metanólica de vanilina a 4%.

Traçou-se uma curva de calibração, usando como padrão a catequina e definindo-se o intervalo dentro do qual deviam estar compreendidas as absorvâncias dos ensaios.

Os resultados da dosagem das proantocianidinas foram expressos em percentagem de catequina (g de catequina / 100 g de liofilizado).

2.2.4. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO

A cromatografia líquida de alta resolução (CLAR) consiste na partição dos componentes de uma mistura entre a fase móvel e a fase estacionária. Forças físicas e

químicas actuam entre os solutos e as duas fases, sendo responsáveis pela retenção dos solutos sobre a coluna cromatográfica. A diferença na magnitude dessas forças determina a resolução e portanto a separação dos vários constituintes das amostras, mesmo quando complexas.

Este método analítico tornou-se progressivamente o mais popular para o estudo de plantas com compostos fenólicos (Miniati, 2007; Qian *et al.*, 2007), dada a sua versatilidade, sensibilidade e menor tempo de análise.

Uma importante característica dos compostos fenólicos é o facto das suas duplas ligações C–C lhes conferirem propriedades cromóforas, o que permite a combinação da CLAR com detectores de ultravioleta/luz visível (UV /VIS), razão porque são frequentemente utilizados na análise qualitativa e quantitativa de amostras contendo compostos fenólicos (Markham e Bloor, 1998). Os detectores de fotodíodos, selectivos a determinados comprimentos de onda, permitem fazer a aquisição espectral dos compostos eluídos, tornando este tipo de detector útil na identificação e monitorização da pureza dos compostos (Nikolin *et al.*, 2004). Os espectros obtidos são então comparados com os de compostos padrão (Miniati, 2007).

Nas plantas medicinais os compostos fenólicos são maioritariamente solúveis em solventes polares. Esta característica possibilita a utilização de colunas de fase reversa, e fases móveis polares (Waksmunfzka-Hajnos, 1998). No entanto, há compostos que por serem fortemente adsorvidos por este tipo de fase estacionária não são convenientemente separados (Schofield *et al.* 1998). São disto exemplo as proantocianidinas poliméricas, que neste sistema cromatográfico originam um arqueamento da linha de base. Nestas situações têm sido sugeridas colunas de fase normal, que são mais polares, apesar da sua menor resolução (Waksmunfzka-Hajnos, 1998).

Quase todos os compostos fenólicos têm um pico máximo de absorção no intervalo 270-280 nm (Miniati, 2007). No entanto, outros comprimentos de onda são frequentemente usados para a detecção mais selectiva de certas classes de compostos fenólicos. Absorções adicionais ocorrem, com as catequinas no intervalo 220-230 nm, ou na região dos 330 nm com os flavonóides e os ácidos hidroxicinâmicos (Miniati, 2007).

Protocolo experimental.

As amostras foram solubilizadas em MeOH a 50%. Posteriormente as soluções foram microfiltradas através de um filtro de 0,45 µm de poro, desgaseificadas e por fim injectadas. A identificação dos compostos foi feita, sempre que possível, por comparação com os respectivos padrões, preparados e injectados nas mesmas condições (Tabela 2).

Tabela 2. Condições utilizadas na Cromatografia Líquida de Alta Resolução com detector de matriz de díodos

Equipamento	Cromatógrafo Gilson equipado com duas bombas, modelos 305 e 306, misturador modelo 811 B e módulo manométrico modelo 805, acoplado um detector de fotodíodos (DAD) modelo 170 e uma estação de controlo e tratamento de dados Unipoint System (Unipoint® 2.10 Gilson)		
Fase Móvel	Eluente A - Solução aquosa de ácido fórmico a 5% Eluente B – Metanol		
Pré-Coluna	HICHRUM (4 µm, 30 mm x 4 mm i.d.) C18.		
Coluna	Coluna analítica da Waters Spherisorb S5, fase ODS-2, partículas de 5 µm (250 mm x 4.6 mm)		
Temperatura da coluna	24 °C		
Fluxo	1 ml. min ⁻¹		
Gradiente	Tempo (min)	% Eluente A	% Eluente B
	0	95	5
	10	85	15
	35	65	35
	50	50	50
	60	0	100
	70	0	100
Detecção	280 e 320 nm		

2.2.5. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

As espécies reactivas de oxigénio (ROS) oxidam proteínas celulares, ácidos nucleicos e lipídios (Heim *et al.*, 2002).

A oxidação lipídica é um processo em cadeia, complexo, que envolve uma grande variedade de radicais e que é influenciada pela temperatura, luz, ar, propriedades físico-químicas do substracto e pela presença de catalizadores ou inibidores da oxidação (Frankel, 1999; Koleva *et al.*, 2002). Em alimentos e sistemas biológicos a oxidação é, em geral, despoletada por vestígios de metais catalizadores, como o ferro, na presença de hidroperóxidos, compostos altamente susceptíveis à decomposição, especialmente na presença de metais.

Os antioxidantes inibem não apenas a formação de hidroperóxidos, mas também a sua decomposição (Frankel, 1999).

Os flavonóides são reconhecidos quer pela sua actividade antioxidante, quer pela sua capacidade de quelação de metais (Frankel, 1999). Muitos dos seus efeitos benéficos relacionam-se precisamente com estas suas duas propriedades (Heim *et al.*, 2002). Nos 3-flavanóis como a catequina ou a epicatequina a actividade antioxidante é atribuída aos grupos hidroxilo fenólicos, especialmente os grupos 3',4'-OH do anel B e 5,7-OH do anel A, e aumenta proporcionalmente com o número de grupos OH, nos anéis A e B (Frankel, 1999) (Fig. 45). Em particular a configuração dos grupos hidroxilo do anel B parece ser determinante, já que estes possuem elevada capacidade de ceder um hidrogénio e um electrão aos radicais hidroxilo, peróxido e peroxinitrito, estabilizando-os e originando radicais de flavonóides relativamente estáveis (Heim *et al.*, 2002).

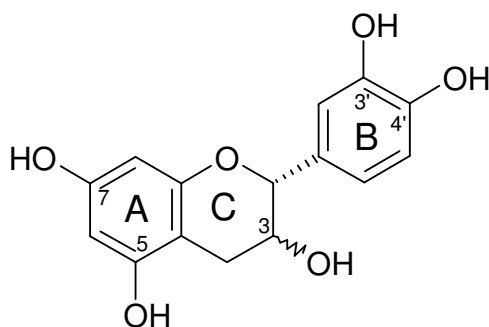


Figura 45. Grupos hidroxilo fenólicos das moléculas de catequina ou epicatequina

Método do DPPH

Uma vez que um dos mais importantes papéis dos antioxidantes é a sua actividade anti-radical, utiliza-se frequentemente esta propriedade para avaliar a capacidade antioxidante (Blois, 1958).

O DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazilo) (Fig. 46) é um radical livre estável que é capaz de aceitar um electrão ou um átomo de hidrogénio tornando-se num não radical que dificilmente se oxida (Blois, 1958). Apesar do DPPH ser um radical sem importância biológica, é vulgarmente utilizado em trabalhos apara avaliar a actividade antioxidante em extractos de plantas (Lamaison *et al*, 1990, 1991; Exarchou *et al.*, 2002; Tepe, 2008).

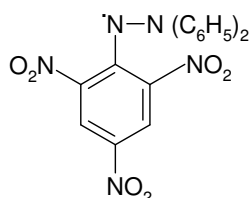
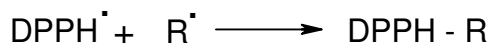
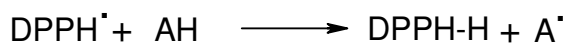


Figura 46. Estrutura do radical livre 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo – DPPH

Devido ao electrão desemparelhado, o DPPH apresenta-se fortemente corado de violeta, com absorção a 517 nm. Se o electrão emparelhar essa coloração desaparece numa estequiometria proporcional ao número de electrões captados, resultando numa descoloração da solução de violeta para amarelo (Blois, 1958).



Deste modo, a absorção a 517 nm é proporcional à quantidade de DPPH[•] residual, após a reacção com um antioxidante (AH) ou outro radical (R[•]).

O método do DPPH é rápido, simples, sensível e reprodutível e não requer equipamentos especiais. Embora não seja discriminativo em relação a um determinado grupo de radicais dá uma ideia geral acerca da capacidade antioxidante de um extracto

(Koleva *et al.*, 2002). Sabe-se que o DPPH pode ser reduzido por acção da cisteína, glutatona, ascorbato, tocoferóis, compostos aromáticos polihidroxilados e aminas aromáticas. No entanto, não oxida a glicose, as purinas, as pirimidinas e os compostos aromáticos com um único grupo hidroxilo, como a tirosina, o que lhe confere especificidade.

Protocolo experimental

Utilizou-se uma solução de DPPH a 500 μ M em metanol. A reacção decorreu na presença de tampão acetato, a pH 6.

Para a preparação do controlo colocou-se 1 ml de tampão, 1,5 ml de MeOH e 0,5 ml de DPPH, num tubo de ensaio protegido por papel de alumínio. Agitou-se vigorosamente a mistura durante 30 segundos e fez-se a leitura a 517 nm, contra um branco (preparado com 1 ml de tampão e 2 ml de MeOH), ao fim de 15 minutos.

As amostras liofilizadas foram solubilizadas em MeOH a 50%, em balão volumétrico.

No caso das amostras contendo casca pulverizada foi necessário proceder previamente à extracção, com MeOH a 50%, em vortex, procedimento seguido de centrifugação. O processo foi repetido, até esgotamento total dos compostos fenólicos (avaliada por uma solução de hidróxido de sódio (NaOH), a 20%), utilizando-se os sobrenadantes para os ensaios de determinação da actividade antioxidante.

Para a realização do ensaio colocou-se 1 ml de tampão, 1,4 ml de MeOH, 0,1 ml de amostra e 0,5 ml de DPPH, num tubo de ensaio protegido por papel de alumínio. Agitou-se vigorosamente a mistura durante 30 segundos e fez-se a leitura a 517 nm, contra um branco (preparado com 1 ml de tampão, 1,9 ml de MeOH e 0,1 ml de amostra).

Os resultados foram expressos em IC₅₀, ou seja, em concentração da amostra que reduziu em 50%, a absorvância da solução de DPPH.

2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE HUMIDADE

Utilizou-se o método gravimétrico para a determinação do teor de humidade do material usado na preparação dos decoctos (casca pulverizada de *Uncaria tomentosa*) e da uncária Naturmil®.

A percentagem de água presente em diferentes liofilizados de *Uncaria tomentosa* foi calculada pelo método de Karl-Fisher. Os resultados são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Quantidade de água em diferentes amostras de *Uncaria tomentosa*

	Teor de água (%)
Extracto liofilizado	4,27
Extracto comercial	4,50
Casca pulverizada	7,75 ± 0,60 ^a
Uncária Naturmil®	8.52 ± 0,62 ^a

^a cada valor representa a média ± desvio padrão (n=12, para a casca e n=3, para a uncária Naturmil®)

Os resultados obtidos com os extractos secos encontram-se dentro dos limites definidos, uma vez que o seu teor em água é inferior a 5% (F.P. VIII, 2005).

2.3.2. RENDIMENTO EXTRACTIVO DAS CASCAS DE *UNCARIA TOMENTOSA*

O rendimento em liofilizado, do decocto, expresso em peso seco de casca de *Uncaria tomentosa* foi de 14,85%.

2.3.3. DOSEAMENTO DE 3-FLAVANÓIS

O doseamento dos 3-flavanóis foi realizado por método previamente validado no Laboratório de Farmacognosia. Considerando este facto, foi traçada uma curva de calibração usando como composto de referência, a catequina, a partir da qual se calculou a equação da recta e o coeficiente de determinação, r^2 . A curva de calibração obtida foi: $y = 1,123x + 0,025$ em que y é a absorvância e x a concentração de 3-flavanóis, reportados à catequina, em mg/ml (Fig. 47).

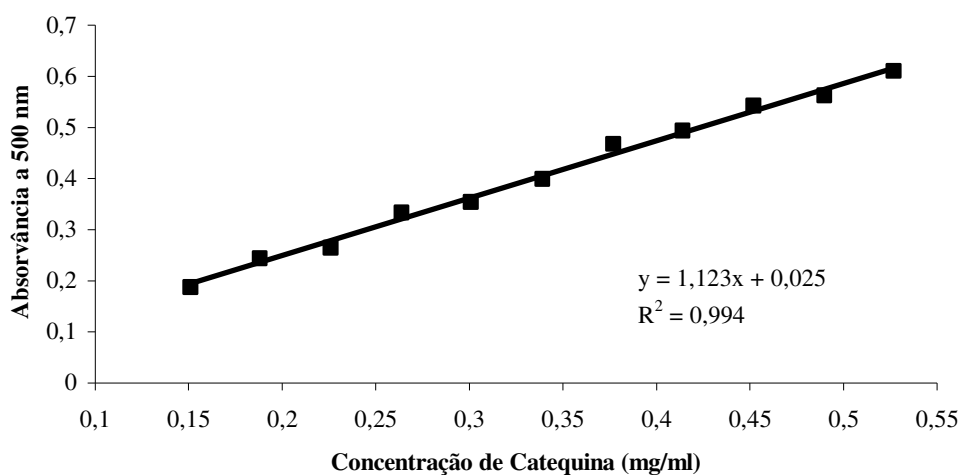


Figura 47. Curva de calibração da catequina pelo método vanilina-ácido clorídrico

Os resultados obtidos no doseamento dos 3-flavanóis encontram-se resumidos na Tabela 4.

Tabela 4. Quantificação dos 3-flavanóis presentes em amostras de *Uncaria tomentosa*

	3-Flavanóis (g %) ^a
Extracto liofilizado	10,64 ± 0,44
Extracto comercial	1,22 ± 0,13
Casca pulverizada	1,16 ± 0,44

^a cada valor representa a média ± desvio padrão (n=3) da concentração expressa em g de catequina, por 100 g de amostra seca

2.3.4. IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A figura 48 ilustra o perfil cromatográfico, registado a 280 e 320 nm, do extracto liofilizado. A comparação dos tempos de retenção dos constituintes do decocto, com o de padrões permitiu fazer a identificação de diversos compostos fenólicos.

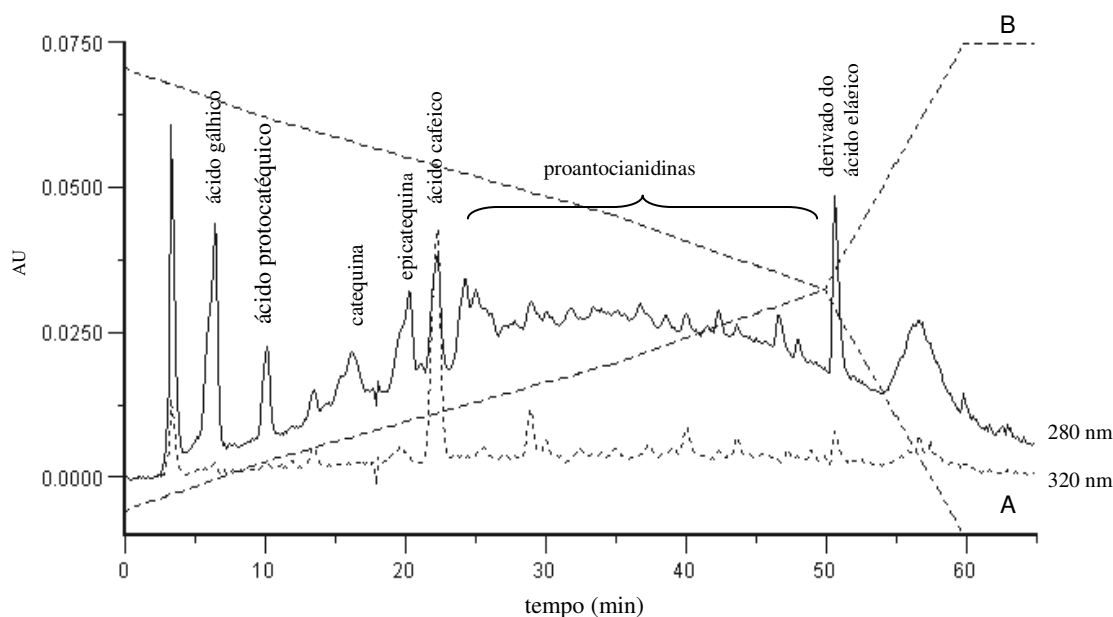


Figura 48. Perfil cromatográfico do extracto liofilizado
Gradiente do ácido fórmico a 5% (A) e do MeOH (B), ao longo da corrida cromatográfica

Detectou-se o ácido gálgico, ácido protocatéquico, catequina, epicatequina e um derivado do ácido elágico. Ocorrem ainda numa zona ampla, outros compostos com perfis espectrais que sugerem a presença dos derivados oligo- e poliméricos dos 3-flavanóis; as proantocianidinas.

O perfil cromatográfico da mistura da casca pulverizada, com o extracto liofilizado, obtido a partir dela (Fig. 49) permitiu detectar os constituintes comuns ao extracto liofilizado, embora o ácido gálgico ocorra em proporções inferiores. Destaca-se de novo numa zona ampla um grupo de compostos com perfis espectrais comuns aos 3-flavanóis, sugerindo a presença de proantocianidinas.

O cromatograma do extracto comercial (Fig. 50) é nitidamente distinto dos anteriores. Apenas foram identificados o ácido cafeico e uma proantocianidina, um

resultado que corrobora a baixa pequena percentagem de 3-flavanóis (1,22%), avaliada pelo método da vanilina-ácido clorídrico.

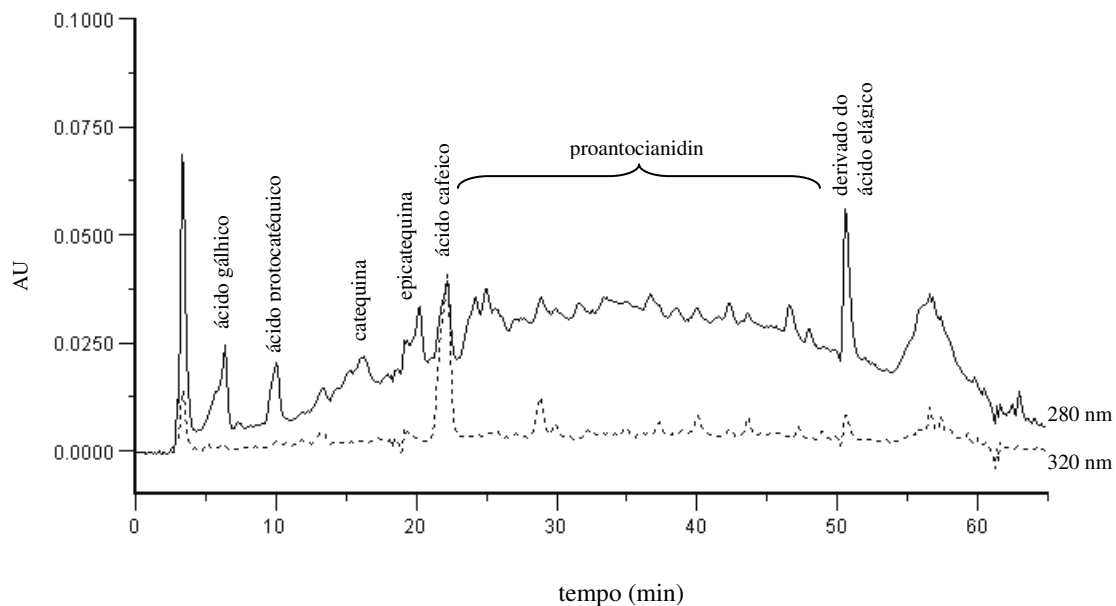


Figura 49. Perfil cromatográfico da mistura extracto liofilizado/casca pulverizada

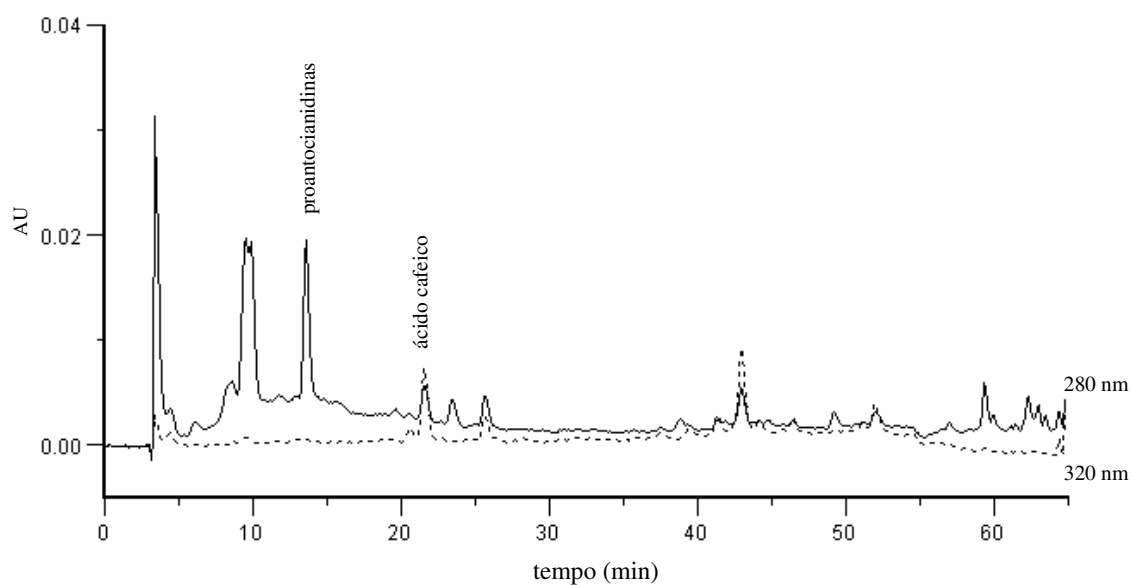


Figura 50. Perfil cromatográfico do extracto comercial

2.3.5. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE

De acordo com ensaios realizados no Laboratório de Farmacognosia da Universidade de Coimbra, com diferentes concentrações de DPPH, verificou-se que, nas condições estabelecidas e para o intervalo de concentrações utilizado, as soluções seguem a Lei de Lambert-Beer. Nas mesmas condições e a 517 nm, a absorvância das soluções é directamente proporcional à concentração da espécie absorvente, o DPPH (Correia, 2005).

Inicialmente foram monitorizadas as cinéticas da reacção de cada amostra, com o radical livre DPPH. Nos diferentes ensaios de controlo realizados, a absorvância a 517 nm manteve-se praticamente imutável (em valores muito próximos de 1,0), ao longo do tempo da reacção (30 minutos). Pelo contrário, na presença das amostras, ocorreu uma diminuição da absorvância proporcional à sua actividade radicalar, estando este comportamento de acordo com o descrito por Blois (1958). Apesar de em concentrações diferentes todas as amostras reagiram prontamente com o DPPH, tendo-se observando uma diminuição brusca da absorvância a 517 nm, nos primeiros 5 minutos. Este fenómeno corresponde a um elevado consumo do radical e consequente diminuição da sua concentração inicial na mistura reaccional. Ultrapassados os primeiros cinco minutos, a velocidade de consumo de DPPH reduziu consideravelmente e os valores de absorvância progressivamente atingiram um estado estacionário, ao fim de 15 minutos.

Os valores de IC_{50} , para as diferentes amostras, encontram-se ilustrados na Tabela 5.

Todas as amostras apresentaram actividade antioxidante mas a quantidade de cada amostra necessária para diminuir 50% da absorvância inicial da solução de DPPH (IC_{50}) foi consideravelmente diferente em cada caso.

Destacaram-se os valores de IC_{50} obtidos com o extracto liofilizado preparado conforme metodologia anteriormente descrita, a partir das cascas de *Uncaria tomentosa*, e que indicam uma elevada actividade antioxidante. Estes dados estão de acordo com os anteriormente obtidos no Laboratório de Farmacognosia, da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (Gonçalves *et al.*, 2005).

Tabela 5. Valores de IC₅₀ de diferentes amostras de *Uncaria tomentosa*

	IC ₅₀ (µg/ml) ^a
Extracto liofilizado	7,34 ± 0,06
Casca pulverizada	75,03 ± 5,33
Mistura (Extracto+casca) ^b	14,28 ± 1,00 ^c
	85,49 ± 6,33 ^d
Extracto comercial	59,21 ± 1,67
Uncaria Naturmil®	268,92 ± 29,33

^a média ± desvio padrão (n=3), resultados reportados a massa seca da amostra.

^b Na mistura extracto liofilizado+casca para mais facilmente comparar resultados procurou-se trabalhar com quantidades equivalentes 50/50, que permitissem expressar o IC₅₀, tendo em conta a relação anteriormente calculada de 100 g de casca pulverizada para 14,850 g de liofilizado.

^c expresso em extracto liofilizado

^d expresso em casca pulverizada

Relativamente à mistura da casca pulverizada e do extracto liofilizado, os resultados obtidos não indicam qualquer efeito sinérgico para a actividade anti-radicalar.

2.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andreo D. e Jorge N., 2006. Antioxidantes naturais: Técnicas de extracção. B.CEPPA, Curitiba, 24, 2, 319-336.
- Azizah A.H., Ruslawati N.M. N. e Swee Tee T., 1999. Extraction and characterization of antioxidant from cocoa by-products. Food Chemistry 64, 199-202.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the use of a stable free radical. Nature 26, 4617.
- Correia H., 2005. *Agrimonia eupatoria* L. e *Equisetum telmateia* Ehrh. Perfil polifenólico e capacidade de captação de espécies reactivas de oxigénio. Dissertação de candidatura ao grau de mestre apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- European Pharmacopea (Eur. Ph.), 2005. 5th edition, Council of Europe. Strasbourg. France.
- Farmacopeia Portuguesa F.P.VIII), 2005. Edição Oficial, Ministério da Saúde. Infarmed. Lisboa.
- Exarchou V., Nenadis N., Tsimidou M., Gerothanassis I.P., Troganis A. e Boskou D., 2002. Antioxidant activities and phenolic composition of extracts from Greek oregano, Greek sage, and summer savory. Journal of Agricultural Food Chemistry 11, 50, 5294-5299.
- Frankel, E. N., 1999. Food antioxidants and phytochemicals: present and future perspectives. Fett/Lipid 101, 450-455S.
- Ganzera M., Muhammad I., Khan R. A. e Khan I. A., 2001. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. Planta Medica 67, 447-450.
- Gonçalves, C., Dinis, T. e Batista, M.T., 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. Phytochemistry 66, 89-98.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. e Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. Journal of Nutritional Biochemistry 13, 572-584.
- Julkunen-Tiitto R., 1985. Phenolic constituents in the leaves of northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. Journal of Agriculture and Food Chemistry 33, 213-217.
- Keplinger K., Laus G., Wurm M., Dierich M. P. e Teppner H., 1999. *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC. - Ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results. Journal of Ethnopharmacology 64, 23-24.

- Koleva, Irina I., van Beek T. A., Linssen J. P.H., de Groot A. and Evstatieva L. N., 2002. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. *Phytomedical Analysis* 13, 8-17.
- Lamaison, J.L. Petitjean-Freytet C. e Carnet A., 1990. Rosmarinic acid, total hydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of *Apiaceae*, *Borraginaceae* and *Lamiceae* medicinals. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 48, 103-108.
- Lamaison J.L., Petitjean-Freytet C. e Carnat A., 1991. Medicinal *Lamiaceae* with antioxidant properties, a potential source of rosmarinic acid. *Pharmaceutical Acta Helvetiae* 66, 185-188.
- Lamuela-Raventós R. M., Roméro-Pérez A. I., Andrés-Lacueva C. e Tornero A., 2005. Review: Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International* 11, 159-176.
- Markham K.R. e Bloor S. J., 1998. Analysis and identification of flavonoids in practice, In *Flavonoids in health and disease*. Rice-Evans, C.A. and Packer, L. Eds. Marcel Dekker Inc., New York, 1-34.
- Miniati Enrico, 2007. Assessment of phenolic compounds in biological samples. *Ann Ist Super Sanità* 43, 362-368.
- Nikolin B., Imamović B., Medanhodžić-Vuk S. e Sober M., 2004. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences* 4, 5-9.
- Quian Z-M., Li H-J., Li P. Ren M-T. E Tang D., 2007. Simultaneous qualitation and quantification of thirteen bioactive compounds in flos *loniceræ* by high-performance liquid chromatography with diode array detector and mass spectrometry. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 55, 1073-1076.
- Rice-Evans, C. A., 2001. Flavonoid antioxidants. *Current Medicinal Chemistry* 8, 797-807.
- Sandoval, M., Okuhama N. N., Zhang X.-J., Condezo L. A., Lao J., Angeles F. M., Musah R. A., Bobrowski P. e Miller M. J. S., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325-337.
- Sheng Y., Akesson C., Holmgren K., Bryngelsson, C., Giamapa V. e Pero, R., 2005. An active ingredient of cat's claw water extracts. Identification and efficacy of quinic acid. *Journal of Ethnopharmacology* 96, 577-584.
- Schofield J. A., Hagerman A.E. e Harold A., 1998. Loss of tannins and other phenolics from willow leaf litter. *Journal of Chemical Ecology* 24, 1409-1421.
- Schofield P., Mbugua D.M. e Pell A.N., 2001. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Sciences Technology* 91, 21-40.
- Tepe B., 2008. Antioxidant potentials and rosmarinic acid levels of the methanolic extracts of *Salvia virgata* (Jacq), *Salvia staminea* (Montbret & Aucher ex

Bentham) and *Salvia verbenaca* (L.) from Turkey. *Bioresource Technology* 99, 1584-1548.

Waterman P.G. e Mole S., 1994. *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, 237.

Waksmundzka-Hajnos M., 1998. Chromatographic separations of aromatic carboxylic acids. *Journal of Chromatography. Biomedical Sciences and Applications* 717, 93-118.

Capítulo III

Desenvolvimento de forma farmacêutica sólida para administração oral

3.1. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS

A formulação de extractos provenientes de plantas medicinais necessita de monitorização particular conducente a formas farmacêuticas tanto ou mais eficazes que os extractos usados na medicina tradicional.

A via oral para administração de fármacos constitui o meio mais divulgado de administração dos mesmos para efeitos sistémicos, supondo-se que 90% de todas as substâncias activas usadas em terapia para acção sistémica sejam administradas por esta via. Quando um novo fármaco é descoberto, uma das primeiras questões que se coloca a uma companhia farmacêutica é saber se aquele poderá ser administrado por via oral, pois se a auto-medicação não for possível as vendas do medicamento constituem uma pequena fracção do que poderiam ser (Prista *et al.*, 1995; Winfield *et al.*, 2003).

Dos medicamentos que são administrados oralmente, as formas sólidas são as preferidas, pelo facto de permitirem a administração de uma única dose exacta de fármaco. Por outro lado, as formas líquidas são formuladas para conterem uma dose em 5 ou 30 ml de veículo, pedindo-se ao doente que meça a dose indicada com um utensílio de medida, o que afecta a precisão requerida.

3.1.1. A FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA ORAL E O TRACTO GASTRO INTESTINAL

Se considerarmos o trajecto de uma forma farmacêutica administrada por via oral verificamos que, de uma forma geral, depois de permanecer algum tempo na boca, passa através do esófago, para o estômago, e deste último para o intestino delgado, onde se processa a absorção das substâncias activas. Para que tal seja possível, são transformadas nesse trajecto por acção das enzimas presentes na saliva, suco gástrico e suco pancreático. Posteriormente, a porção residual não absorvida é eliminada pelo intestino grosso. A mucosa do intestino delgado, pela sua elevada vascularização e grande superfície (vilosidades e válvulas coniventes), está fisiologicamente adaptada à absorção (Prista *et al.*, 1995).

O estômago possui algumas características fisiológicas com elevada importância: trata-se de um órgão oco e pouco vascularizado, que serve como área de

armazenamento para os alimentos, contraindo-se ritmicamente e misturando-os com as enzimas. As células que revestem a superfície gástrica segregam três substâncias importantes: muco, ácido clorídrico (HCl) e pepsinogénio - o precursor da pepsina, uma enzima que fracciona as proteínas. O muco cobre as células do revestimento do estômago para as proteger dos danos que a elevada acidez e as próprias enzimas lhes poderiam causar. O suco gástrico produzido é composto assim por HCl, pepsinogénio, mucina e factor intrínseco. O HCl proporciona o ambiente fortemente ácido necessário para que a pepsina fraccione as proteínas. A elevada acidez do estômago também actua como uma barreira contra as infecções, pois elimina a maior parte das bactérias (Berkow *et al.*, 1997).

Entre os factores que influenciam a velocidade de esvaziamento gástrico encontram-se o tipo de alimentos, o seu volume, a pressão osmótica, o pH e capacidade tampão, a temperatura e também a idade e o estado de saúde do indivíduo. O conteúdo gástrico abandona o estômago com uma velocidade que é proporcional ao seu volume, ou seja, a velocidade de esvaziamento é maior com grandes volumes, embora o processo exponencial não se mantenha assim até ao fim do processo. Com pequenos volumes há um lapso de tempo até que o esvaziamento se inicie, daí também a importância da ingestão de apreciáveis volumes de líquido quando se ingere um medicamento, por estar favorecida a mais rápida transferência do fármaco do estômago para o intestino, onde será absorvido. Por outro lado, a ingestão concomitante de substâncias viscosas, ou de gorduras irá retardar o esvaziamento gástrico (Prista *et al.*, 1995). Deste modo, factores como a presença e o tipo de alimentos, o estado de saúde e mesmo a postura, tem influência no tempo necessário para o início de acção de fármacos administrados por via oral, que pode ser muito variável (Winfield *et al.*, 2003).

O estômago liberta o seu conteúdo (quimo) no duodeno, primeiro segmento do intestino delgado. O jejuno e o íleo formam o resto do intestino delgado, localizando-se a seguir ao duodeno. O quimo entra no duodeno através do esfíncter pilórico em quantidades que o intestino delgado possa digerir. Quando este se enche, o duodeno indica ao estômago que pare o esvaziamento. O duodeno recebe enzimas do pâncreas e biliar do fígado, que contribuem de forma importante para os processos de digestão e de absorção. O peristaltismo também ajuda a digestão e a absorção ao revolver os alimentos e ao misturá-los com as secreções intestinais, libertando-se pequenas

quantidades de enzimas que digerem as proteínas, os açúcares e as gorduras. A consistência do conteúdo intestinal muda gradualmente conforme avança através do intestino delgado. No duodeno é segregada rapidamente água para diluir a acidez do conteúdo digestivo procedente do estômago. À medida que o bolo digestivo vai passando para a porção inferior do intestino delgado torna-se mais líquido dado que vão sendo acrescentados água, muco, bílis e enzimas pancreáticos (Berkow *et al.*, 1997). O pH do suco intestinal aumenta do duodeno, onde o pH é de 5 a 6, até ao íleo, onde o pH é cerca de 8, atingindo no cólon valores de 8,3-8,4 (Prista *et al.*, 1995).

A zona do intestino delgado mais propícia à absorção é assim a porção duodeno-jejuno (Prista *et al.*, 1995). Os primeiros centímetros do revestimento duodenal são lisos, mas o resto do revestimento tem pregas, pequenas projecções (vilosidades e microvilosidades) que aumentam de forma extraordinária a área da superfície do revestimento do duodeno, permitindo com isso uma maior e mais eficaz absorção. A parede intestinal também liberta muco e água, que lubrificam e dissolvem o conteúdo intestinal, ajudando a dissolver os fragmentos digeridos. Finalmente, a parede intestinal possui uma elevada vascularização, o que possibilita a condução dos elementos absorvidos para o fígado, através da veia porta (Berkow *et al.*, 1997). Assim sendo, os fármacos administrados por esta via podem ser metabolizados no fígado, no denominado efeito de primeira passagem, antes de atingirem a circulação sistémica. Este processo pode ter importantes implicações na sua biodisponibilidade (Winfield *et al.*, 2003).

3.1.2. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS MAIS UTILIZADAS

As cápsulas duras têm ganho grande aceitação, a tal ponto que constituem hoje, juntamente com os comprimidos, as formas mais correntes de administração oral de fármacos.

Segundo a F.P. VIII (2005), os comprimidos são preparações sólidas contendo uma dose de uma ou de várias substâncias activas, sendo geralmente obtidos por compressão de um volume constante de partículas. Podem ser deglutidos ou mastigados, bem como dissolvidos ou desagregados em água, antes da administração ou permanecerem na boca para aí libertarem a substância activa. Geralmente as substâncias

activas são adicionadas de excipientes como diluentes, aglutinantes, desagregantes, lubrificantes, entre outros, necessários à obtenção da forma farmacêutica, mas que podem modificar o seu comportamento no tracto gastro-intestinal.

Os comprimidos apresentam um conjunto de vantagens e que podemos sintetizar em: precisão na dosagem, conservação muito superior à das soluções, rapidez na preparação, economia, atendendo à facilidade de produção e rendimento, boa apresentação, fácil deglutição e reduzido volume.

Segundo a F.P. VIII (2005), as cápsulas são preparações sólidas constituídas por um invólucro duro ou mole, de forma e capacidade variáveis, contendo uma dose de substância activa. O invólucro é constituído por gelatina ou por outras substâncias cuja consistência pode ser ajustada por adição, por exemplo, de glicerina ou de sorbitol. Podem igualmente juntar-se outros excipientes, como agentes tensioactivos, opacificantes, conservantes antimicrobianos, edulcorantes, aromatizantes e corantes, estes últimos permitindo a sua mais fácil identificação e protecção da luz (Winfield *et al.*, 2003). São consideradas uma das melhores formas para acondicionar substâncias medicamentosas, pois protegem-nas da acção do ar, da luz e da humidade. Além disso, são facilmente administradas, pois graças à elasticidade das suas paredes, são de mais fácil deglutição que os comprimidos. Possibilitam ainda, em alguns casos, a associação de substâncias normalmente incompatíveis, permitem mascarar o sabor e odor desagradáveis dos fármacos; podem ser preparadas com grande facilidade e precisão de dosagem, ocupam pequeno volume, tem uma boa conservação e a sua apresentação é agradável.

3.1.3. FORMAS FARMACÊUTICAS SÓLIDAS ORAIS, SEGUNDO O TIPO DE LIBERTAÇÃO

Considerando o modo de cedência da substância activa, as formas farmacêuticas sólidas orais podem classificar-se, de acordo com a F.P. VIII (2005) em formas farmacêuticas de libertação convencional e formas farmacêuticas de libertação modificada. As formas farmacêuticas de libertação convencional, ou imediata são preparações em que a libertação da(s) substância(s) activa(s) não foram objecto de uma modificação deliberada resultante de um processo específico de formulação e/ou de um

método de fabrico especial. Dentro deste grupo, existem as formas de libertação muito rápida (libertando 80% do fármaco em 15 minutos) e as formas de libertação imediata, onde o sistema farmacêutico serve apenas de suporte à substância activa, libertando-se 85% do fármaco entre os 15 e os 60 minutos.

As formas farmacêuticas de libertação modificada são preparações em que a libertação da(s) substância(s) activa(s) foi objecto, quanto à velocidade e/ou ao local onde ocorre, de uma modificação deliberada resultante de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial. Dentro deste grupo incluem-se as formas de libertação retardada, onde a libertação do princípio activo é retardada por um período de tempo determinado, após o qual a libertação é quase imediata, as formas de libertação sequencial, um tipo especial de forma farmacêutica que se caracteriza por uma libertação sequencial da(s) substância(s) activa(s) e as formas de libertação prolongada, onde a libertação do princípio activo é reduzida após a sua administração, de modo a manter a actividade terapêutica, a reduzir os efeitos tóxicos, ou para atingir qualquer outro fim terapêutico.

As formas de libertação modificada permitem diminuir o número de administrações diárias, contribuir para a diminuição ou mesmo desaparecimento dos picos plasmáticos, aumentar as concentrações plasmáticas eficazes para os princípios activos de semi-vida biológica relativamente curta, diminuir a acumulação do fármaco no organismo, proteger o fármaco de uma eventual degradação pelos fluidos biológicos, nomeadamente o suco gástrico e economizar o fármaco (Kwit, 1963; Bourke *et al.*, 2000; Manadas *et al.*, 2002).

3.1.4. SELECÇÃO DA FORMA FARMACÊUTICA SÓLIDA PARA ADMINISTRAÇÃO ORAL DOS EXTRACTOS DE *UNCARIA TOMENTOSA*

Conforme já foi referido, existem na *Uncaria tomentosa* compostos de grupos químicos diferentes que podem contribuir para a sua actividade. Estudos anteriores indicaram que a decocção da casca da *Uncaria tomentosa* é composta principalmente por ácidos fenólicos, essencialmente ácido gálgico, ácido cafeico, ácido protocatéquico e proantocianidinas. Estas substâncias parecem ter grande importância no contexto da saúde cardiovascular (Keen *et al.*, 2005) e nas actividades anti-inflamatória, antiviral

(Aquino *et al.*, 1989; Heitzman *et al.*, 2005) e antioxidante (Gonçalves *et al.*, 2005; Pilarski *et al.*, 2006).

Na tentativa de seleccionar a forma farmacêutica mais adequada para se proceder à administração dos extractos de *Uncaria tomentosa* atendeu-se a dados fornecidos por diferentes estudos que têm sido desenvolvidos.

Os conhecimentos existentes sobre a absorção e metabolismo das proantocianidinas são ainda insuficientes (Heim *et al.*, 2002), mas diferentes estudos confirmaram a absorção da catequina, epicatequina e procianidinas diméricas como resultado de um aumento da sua concentração plasmática, após a sua ingestão (Wang *et al.*, 2000; Rein *et al.*, 2000b; Lamuela-Raventós *et al.*, 2005). No caso dos dímeros, como a procianidina B2 a sua absorção é menos eficiente do que os monómeros epicatequina e catequina, mas podem ser detectados no plasma humano, 30 a 60 minutos após a sua administração (Baba *et al.*, 2001; Baba *et al.*, 2002; Holt *et al.*, 2002; Gonthier *et al.*, 2003). A absorção de proantocianidinas é mais difícil, dado o seu elevado peso molecular (Scalbert e Williamson, 2000).

Estudos *in vitro* sugeriram que as proantocianidinas (trímeros a hexâmeros) podem ser degradadas durante a sua passagem pelo estômago em monómeros e dímeros. Esta constatação foi feita durante a incubação das procianidinas do cacau, com suco gástrico artificial (pH 2), durante 1-3,5 horas (Spencer *et al.*, 2000). Contudo, num outro estudo, constatou-se que as procianidinas do chocolate (procianidinas B2, B5 e C1) são estáveis durante o trânsito gástrico, em seres humanos. A diferença de resultados observada nos dois estudos pode ser explicada pelo efeito tampão dos outros constituintes do bolo alimentar no chocolate, o que resulta num pH de valor mais elevado, insuficiente para que ocorra a hidrólise das proantocianidinas e também pelo menor tempo de exposição às condições ácidas, inferior a 50 minutos (Rios *et al.*, 2002). Em qualquer dos casos, a eventual degradação das proantocianidinas em monómeros e dímeros, durante a passagem pelo estômago, bastante provável de acordo com estudos efectuados *in vitro*, não parece justificar a opção por uma forma farmacêutica de libertação modificada, pois a absorção no intestino delgado de monómeros e dímeros é bem mais fácil que a das proantocianidinas com elevado peso molecular (Scalbert e Williamson, 2000).

Em estudos de concepção e formulação de comprimidos, usando extractos secos de plantas, como material activo foram detectados alguns inconvenientes que poderiam

pôr em causa a qualidade do produto final, já que os extractos secos têm em geral fracas propriedades reológicas e de compactibilidade, dificultando a sua utilização, em métodos de compressão directa. Numerosos trabalhos foram desenvolvidos para resolver este tipo de problemas, como a granulação por via húmida, a compressão directa dos extractos, ou a selecção dos excipientes adequados que possibilitem a produção, a partir dos extractos secos das plantas, e comprimidos por compressão directa, em alguns casos com sucesso (Palma *et al.*, 2002).

Por outro lado, não se pode esquecer que a conservação dos princípios activos dos extractos secos de plantas varia grandemente de acordo com os excipientes utilizados e o método de compressão, conduzindo a alterações mais importantes quando se efectua uma granulação por via húmida (Pourrat *et al.*, 1978).

Tendo em conta o anteriormente exposto, uma vez que as cápsulas são consideradas uma boa alternativa para acondicionar substâncias medicamentosas, seleccionou-se esta forma farmacêutica para administrar os extractos de *Uncaria tomentosa*.

3.2. MATERIAIS

Nos estudos de desenvolvimento de forma farmacêutica sólida para administração oral, para além dos materiais mencionados no Capítulo II, foram ainda utilizados os seguintes reagentes: carbonato de sódio decahidratado (lote A714591 737), cloreto de sódio (lote K32104204 324), hidróxido de sódio (lote OC122500) e pepsina da mucosa gástrica do porco (lote F1424885 608) Merck, Alemanha; índio de grau de pureza 99,998%, ponto de fusão 156,65 °C (lote 7440-796), Aldrich, Alemanha. Como diluentes e desagregantes utilizaram-se: lactose monohidratada GranuLac® 200, Meggle, Alemanha; celulose microcristalina Avicel PH-101®, carboximetilcelulose sódica reticulada (croscarmellose) (lote 59/05M), amido glicolato de sódio (Explotab®), carboximetilcelulose sódica, estearato de magnésio e amido de milho, todos de grau analítico; cápsulas de gelatina de tamanho nº 0 e 1, Shionogi Qualicaps, Japão; cápsulas de gelatina de tamanho nº 2, Scherer, Ontário, Canada.

O meio de dissolução utilizado foi preparado segundo a USP 30/NF 25 (2006).

Suco gástrico artificial: cloreto de sódio (2 g), pepsina purificada da mucosa do estômago do porco (3,2 g), ácido clorídrico fumante (7 ml) e água destilada, em quantidade suficiente para perfazer 1000 ml.

3.3. MÉTODOS

3.3.1. PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS DURAS

A preparação das cápsulas duras consiste fundamentalmente no enchimento dos invólucros que são adquiridos no comércio. Estes são constituídos por duas partes cilíndricas abertas numa das extremidades, de fundo hemisférico. As substâncias activas, geralmente sólidas, são introduzidas na parte mais comprida e de diâmetro menor, sendo depois encaixada a outra parte, que funciona como tampa (F. P. VIII, 2005).

Os receptáculos estão disponíveis em oito tamanhos, com diferentes capacidades, sendo designados por números (Tabela 6).

Tabela 6. Tamanhos de cápsulas duras e sua capacidade aproximada

	Número da cápsula							
	000	00	0	1	2	3	4	5
Capacidade (ml)	1,37	0,95	0,68	0,50	0,37	0,30	0,21	0,13

Para uma pequena preparação, bastaria escolher os invólucros de capacidade adequada ao volume ocupado pela massa do pó e enchê-los, com auxílio de funis e calcadores, ou por meio de compressores-doseadores. No entanto, só por mero acaso a quantidade de pó prescrita numa formulação encherá exactamente um invólucro gelatinoso de dado número. Ora como o processo de enchimento das cápsulas é habitualmente volumétrico impõe-se que estas fiquem perfeitamente cheias, de modo a evitar erros posológicos. Além disso, não é aconselhável a existência de uma camada de ar sobre os pós susceptíveis de se alterarem. Nestas circunstâncias, é necessário completar, com pó inerte, o volume a acondicionar num dado receptáculo, caso aquele

volume seja inferior a 90% da sua capacidade. Normalmente, escolhida a capacidade de um invólucro, o pó a acondicionar é adicionado de pós inertes que funcionam como diluentes (lactose, amido, carbonato de magnésio, entre outros). A adição de estearato de magnésio como lubrificante é frequente, por facilitar o enchimento das cápsulas (Prista *et al.*, 1995; Winfield *et al.*, 2003).

Correctamente, a escolha do invólucro a utilizar deve fazer-se avaliando o volume aparente de uma dada massa de pó, a acondicionar num determinado número de cápsulas. O volume aparente de um pó é igual à soma do volume ocupado pelas suas partículas, com o volume de ar intersticial. A determinação do volume aparente é um ensaio muito simples que, fundamentalmente, consiste em medir, num recipiente transparente, o volume ocupado por uma dada quantidade de pó.

Com o objectivo de tornar os resultados reprodutíveis é fundamental normalizar o número, a intensidade e a frequência de batimentos que permitem expulsar parte do ar que o pó contém. Habitualmente, submete-se o pó, acondicionado em proveta volumétrica, a ciclos de 1250 batimentos, que se repetem até que o seu volume aparente sofra uma diminuição inferior a 2%. Este procedimento é realizado em dispositivos próprios para o efeito, que permitem a realização automática deste ensaio (F.P.VIII, 2005).

Quando se trabalha em pequena escala, é possível realizar um ensaio mais simples que consiste em lançar o pó num recipiente graduado, realizando então um número de batimentos adequado até à obtenção de volume constante (Van Ooteghem, 1966).

Em função do volume aparente e da massa do pó é fácil calcular a sua massa volúmica aparente, que se exprime em g/ml.

Os volumes aparentes foram obtidos de acordo com o procedimento descrito na F.P. VIII.

A leitura do volume ocupado pela massa (m) de cada um dos componentes utilizados foi feita antes do ensaio (V_0) e ao fim de 1250 batimentos (V_{1250}). Obteve-se assim o volume bruto, ou volume aparente antes da compactação (V_0) e o volume aparente após a compactação, ou volume reduzido (V_{1250}).

As massas volúmicas aparentes foram determinadas pela relação entre a massa de amostra e o volume por esta ocupado: massa volúmica aparente antes da

compactação, ou massa volúmica do produto em bruto: m/V_0 (g/ml) e massa volúmica aparente após compactação, ou massa volúmica do produto reduzido: m/V_{1250} (g/ml).

3.3.2. SELECÇÃO DOS EXCIPIENTES

Entre os excipientes de utilização corrente na preparação de cápsulas seleccionaram-se aqueles cujas características se poderiam revelar mais úteis:

- Diluentes - produtos inertes que se adicionam aos pós com a finalidade de obter formulações de massa conveniente, quando as substâncias activas são utilizadas em pequenas quantidades, assegurando um enchimento adequado das cápsulas.

Um dos diluentes solúveis mais utilizado nas formulações é a α -lactose monohidratada, comercializada sob a forma de um pó (200 mesh), ou de pequenos cristais (80 e 100 mesh) de cor branca, desprovidos de cheiro e com sabor doce, cujo ponto de fusão é de 201-202 °C. Tem também bom poder aglutinante. As reacções adversas a este excipiente estão quase sempre relacionadas com a intolerância à lactose, que ocorre em pessoas com deficiência na enzima intestinal lactase. Por esta razão todas as preparações farmacêuticas que a contenham devem mencionar este facto (Rowe *et al.*, 2006).

Como diluente insolúvel o amido de milho, que se apresenta como um pó branco, desprovido de cheiro e sabor que aumenta instantaneamente de volume (em 5 a 10%) em contacto com a água, a 37°C, ao qual não se atribuem situações de incompatibilidade e as reacções alérgicas são raras; constitui uma boa alternativa, à lactose.

Pode referir-se ainda a celulose microcristalina (Avicel) diluente insolúvel, que pode ser usado isoladamente (em concentrações de 20 a 90%) ou associado à lactose, ou ao amido. Apresenta ainda algumas propriedades como lubrificante (em concentrações de 5 a 20%) e acção desagregante, quando utilizada em percentagens próximas de 10%. Trata-se de um pó branco cristalino, desprovido de cheiro e sabor, que carboniza no intervalo 260-270 °C e que está comercialmente disponível, com partículas de diferentes tamanhos. É incompatível com agentes oxidantes fortes. Como não é absorvida sistemicamente tem baixo potencial de toxicidade (Rowe *et al.*, 2006).

- Desagregantes - produtos que permitem acelerar a dissolução ou a desagregação dos compostos na água, ou nos líquidos do organismo. Estes compostos podem actuar por diferentes processos. Mais frequentemente incham em contacto com a água como no caso dos amidos e derivados de celulose, o que permite uma penetração rápida do líquido, mas podem simplesmente dissolver-se na água, abrindo assim canalículos que facilitam a desagregação, tal como a lactose. A escolha de um desagregante ou duma mistura de desagregação para uma dada fórmula, é um assunto a ponderar, tendo em conta as características que se desejam para uma dada fórmula. Entre os desagregantes mais utilizados é ainda o amido o que mais se emprega. Utiliza-se na proporção de 5 a 15%, dando geralmente bons resultados a 10%.

Tem sido descrito o uso de derivados de amido, como o amido glicolato de sódio, de rápida desagregação conhecido pelo nome de Explotab®. Trata-se de um pó branco, ou esbranquiçado, desprovido de odor e sabor, que não funde mas carboniza a aproximadamente 200 °C. É praticamente insolúvel em água, aumentando cerca de 300 vezes o seu volume quando com ela contacta. Muito usado em formulações orais, é um material considerado seguro e não irritante, embora incompatível com o ácido ascórbico (Rowe *et al.*, 2006).

Outros desagregantes utilizados com frequência são os derivados da celulose, como a carboximetilcelulose sódica. Apresenta-se como um pó branco, ou esbranquiçado, desprovido de odor, empregando-se em concentrações próximas dos 2% (Prista *et al.*, 1995), que se torna acastanhado a temperaturas próximas dos 227 °C e carboniza aproximadamente a 252 °C. Entre as incompatibilidades destaca-se o facto de precipitar em soluções ácidas com pH <2 (Rowe *et al.*, 2006).

A croscarmelose sódica, ou carboximetilcelulose sódica reticulada é usada como desagregante em cápsulas, em concentrações que podem ir dos 10 aos 25%. Trata-se de um pó branco ou acinzentado, desprovido de odor e geralmente referido como não tóxico e não irritante, embora o seu consumo em altas doses, superiores às utilizadas nas formulações habituais possa ter um efeito laxante. É insolúvel em água, aumentando 4-8 vezes em volume quando com ela contacta.

- Lubrificantes - substâncias capazes de facilitar o deslizamento dos pós, ou granulados, diminuindo a sua tendência para aderir aos instrumentos utilizados para a sua manipulação. O estearato de magnésio é dos mais frequentemente utilizados, em

concentrações que variam dos 0,5% aos 5%. Trata-se de um pó branco, com cheiro a ácido esteárico e gosto característico, que funde no intervalo de temperaturas 117-150 °C. É hidrofóbico e pode retardar a dissolução de um fármaco, pelo que devem usar-se concentrações tão baixas quanto possível. A redução do tempo de mistura é importante para evitar a formação de aglomerados hidrofóbicos que não dispersam após a solubilização do invólucro de gelatina das cápsulas. Este facto pode muitas vezes ser ultrapassado pela inclusão de um desagregante na formulação (Rowe *et al.*, 2006).

3.3.2.1 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

O sucesso na formulação de uma forma farmacêutica depende da selecção criteriosa dos excipientes usados para tornar a administração mais fácil, melhorar a adesão do doente, promover a libertação e a biodisponibilidade do fármaco, ou protegê-lo da degradação (Mura *et al.*, 1998). A incompatibilidade entre um fármaco e os seus excipientes pode modificar a sua estabilidade e biodisponibilidade, influenciando a sua eficácia e segurança (Verma e Garg, 2005). A análise térmica inclui um conjunto de métodos em que uma determinada propriedade física é avaliada, em função da temperatura, enquanto a substância em estudo é submetida a um intervalo devidamente programado e controlado de temperaturas (Giron, 1990). Pode ser utilizada como uma importante ferramenta para a investigação e previsão de qualquer interacção físico-química entre os componentes de uma formulação, ou seja para avaliar a existência de possíveis incompatibilidades entre um princípio activo e os diferentes excipientes (Mura *et al.*, 1998).

Quando uma substância é aquecida ou arrefecida, ocorre uma mudança na sua estrutura, ou composição, transformação esta que se relaciona com uma troca de calor. A análise calorimétrica diferencial de varrimento (DSC) é utilizada para a medida do fluxo de calor (ΔT) emitido ou absorvido por uma amostra e a determinação da temperatura de uma transição térmica durante uma variação controlada de temperatura. Nesta técnica estabelece-se a medida da energia necessária para uma diferença de temperatura aproximadamente zero entre uma amostra e uma substância inerte usada como referência, quando estas são submetidas a regimes idênticos de temperatura, num ambiente de arrefecimento ou de aquecimento numa taxa controlada (Santos, 2005). Ao surgir uma diferença de temperatura entre a amostra e a referência, no decurso do ciclo

de aquecimento, automaticamente o circuito electrónico produz um incremento no aquecimento do elemento de menor temperatura, suficiente para restabelecer o equilíbrio e cuja potência é registada, originando-se um termograma (Fig. 51), no qual a área do pico (ΔH) representa a variação da entalpia. A variação térmica da amostra pode ser definida pela temperatura correspondente ao máximo do pico (ponto A) e pelo início do desvio da linha de base (ponto B). Uma vez completada a variação da temperatura, relativamente à referência, é retomada a linha de base e $\Delta T = 0$.

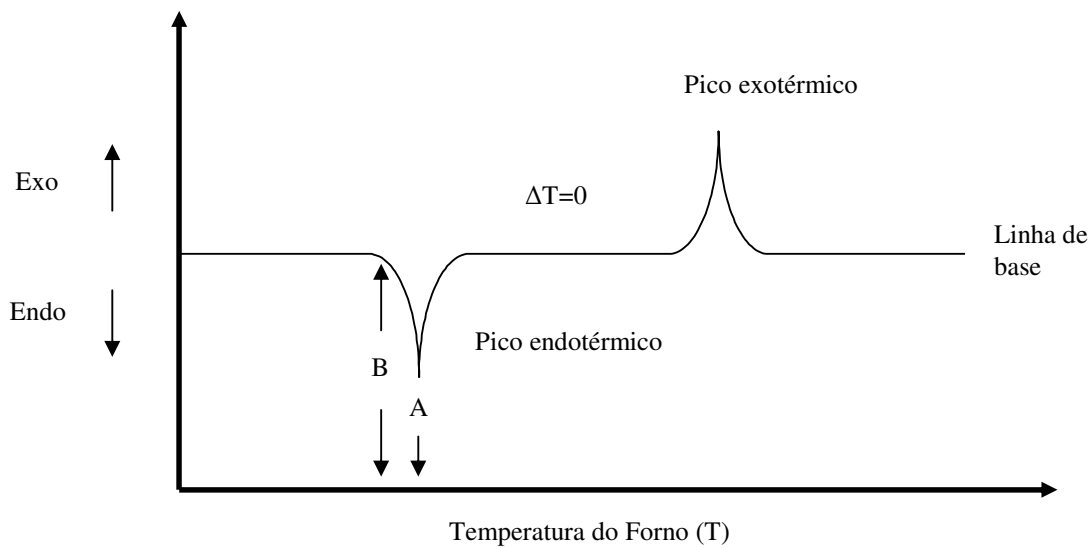


Figura 51. Termograma-tipo (adaptado de Canotilho *et al.*, 1992)

Observando a influência do aquecimento a velocidade constante é possível registar fenómenos tais como: fusão, cristalização, ebulição, sublimação, desidratação, transições sólido-sólido, transições vítreas e transições polimórficas. Estas transições podem ser endotérmicas ou exotérmicas. Destas experiências podem também ser obtidos valores de entalpia, entropia e/ou capacidade calorífica, com base na quantificação do calor envolvido nas transições observadas.

Esta técnica é usada com sucesso na pesquisa rápida de possíveis incompatibilidades fármaco-excipientes. Apresenta uma importante vantagem: apenas uma pequena quantidade de fármaco e excipientes é necessária para a executar (Clas *et al.*, 1999).

Para avaliação dos termogramas foram considerados os seguintes critérios, conhecidos como os Postulados de Van Dooren (1983):

- Em DSC trabalha-se numa região onde as substâncias fundem. Reacções de degradação ou transformações que ocorrem a essas temperaturas podem não acontecer à temperatura ambiente;

- Se a curva da mistura é uma simples sobreposição das dos componentes isolados, uma incompatibilidade entre essas substâncias é altamente improvável;

- Em alguns casos a sobreposição acima citada não é claramente visível quando as transições térmicas do princípio activo e do excipiente são coincidentes;

- Uma nova transição térmica antes do pico de fusão mais baixo pode indicar incompatibilidade. O mesmo se pode dizer quando um dos picos de um dos componentes desaparece por completo;

- Se um dos componentes da mistura se degrada antes da fusão do outro componente, é possível que este venha a reagir com os produtos da decomposição. Torna-se assim impossível prever a existência de uma incompatibilidade;

- Se um eutético é formado, obtém-se uma transição térmica dessa nova entidade.

Embora alguns autores reconheçam que a presença de uma interacção físico-química entre os componentes não significa necessariamente que exista incompatibilidade entre eles, é sempre uma prova inequívoca da sua interacção. (Balestrieri *et al.*, 1996).

A combinação da calorimetria diferencial de varrimento (DSC) com outras técnicas como a espectroscopia no infra-vermelho (Clas *et al.*, 1999), técnicas microscópicas (Mura *et al.*, 1998) ou análise quantitativa por CLAR deve ser realizada sempre que possível, sendo necessário tomar-se precauções redobradas na interpretação dos resultados quando isto não for exequível (Verma e Garg, 2005).

Protocolo experimental

Aproximadamente 2 mg de cada um dos componentes da fórmula farmacêutica foram analisados isoladamente para a caracterização do seu perfil térmico. Uma mistura binária com 1 mg de amostra e igual quantidade de um excipiente foi analisada por DSC. A pesagem foi feita em cápsulas de alumínio para DSC, as quais foram hermeticamente fechadas num selador de cápsulas.

A análise térmica foi realizada num sistema de calorimetria de varrimento diferencial de fluxo de calor (DSC-50, Shimadzu Co., Kioto, Japan), associado a um

sistema de análise térmica (TA-50 I, Shimadzu, Co., Kioto, Japan). O sistema foi calibrado para a temperatura usando como padrão o índio, cujo ponto de fusão é de 156,65 °C. Usou-se um intervalo de temperatura entre a ambiente e os 400 °C. A taxa de aquecimento foi de 10 °C/min, sob atmosfera de azoto a um fluxo de 20 ml/min.

As cápsulas de alumínio seladas contendo a amostra foram usadas em paralelo com uma cápsula de referência de idêntica configuração, vazia e selada (Clas *et al.*, 1999).

3.3.3. PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS COM *UNCARIA TOMENTOSA*

Uma vez escolhida a capacidade do invólucro, a quantidade exacta de uncária a incluir em cada formulação foi pesada individualmente. Adicionaram-se os excipientes em quantidade adequada.

Utilizou-se o método de enchimento manual, lançando para cada hemireceptáculo, em encapsulador munido de funis, a dose pretendida. Finalmente procedeu-se ao encerramento de cada cápsula pelo encaixe das duas partes do invólucro.

3.3.4. ENSAIOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

A F. P.VIII (2005) preconiza um conjunto de ensaios para garantir a qualidade da forma farmacêutica preparada. No caso das cápsulas duras para uso oral é importante que satisfaçam os seguintes requisitos: ensaio de dissolução, uniformidade de massa e uniformidade de teor, A realização do ensaio de dissolução torna dispensável a realização dos ensaios de desagregação.

As formas farmacêuticas desenvolvidas a partir das plantas medicinais devem reger-se pelos mesmos parâmetros (Mukherjee e Verpoorte, 2003).

3.3.4.1. Validação do método de doseamento de 3-flavanóis em suco gástrico

A USP 30, 2007 define a validação de métodos analíticos como sendo “o processo que fornece uma evidência documentada de que o método é adequado ao uso pretendido”

Parâmetros analíticos da validação avaliados neste trabalho:

- Especificidade – constitui o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método analítico e deve ser reavaliada continuamente durante a validação e subsequente uso do método. Pode ser obtida de várias maneiras, entre as quais avaliar a amostra isenta e a amostra adicionada de outros produtos, de modo a avaliar possíveis interferências (ICH, 2005).

Protocolo experimental

Começou por se realizar o varrimento do espectro electromagnético (entre 190 e 900 nm) para avaliar a possibilidade de se fazer a dosagem das amostras do ensaio de dissolução, a partir das leituras da absorvância, a um dado comprimento de onda, de forma contínua, no espectrofotómetro (Shimadzu UV-1603).

A linha de base foi corrigida com o branco (suco gástrico). Utilizaram-se concentrações das amostras que se aproximassem daquelas que iriam ser utilizadas nos ensaios reais.

- Linearidade - é a capacidade de um método de dosagem fornecer resultados directamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo determinado (Harvey, 2000; ICH, 1995).

A determinação da linearidade compreende várias etapas:

a) assegurar que o intervalo linear estabelecido abrange as concentrações a determinar;

b) utilizar uma gama de padrões de concentrações crescentes, recomendando-se, no mínimo, a utilização de cinco concentrações diferentes;

c) definir a curva de calibração que relacione a concentração do padrão com a resposta, neste caso absorvância, segundo a equação,

$$y = mx + b$$

onde y representa a absorvância, m o declive da curva e b a ordenada na origem, quando o valor de x, isto é a concentração, for nulo.

d) tratamento estatístico dos dados, destacando-se o coeficiente de determinação (r^2), que reflecte o grau de relação ou ligação entre as variáveis x (concentração) e a absorvância (y), sendo o valor óptimo 1. Contudo, com valores de r^2 de 0,9999 considera-se que existe uma relação com probabilidade muito elevada. Os valores de r^2 superiores a 0,999 são aceitáveis na maioria dos métodos analíticos. O coeficiente de variação dos factores de resposta deve ser preferivelmente inferior a 2% e nunca superior a 5%, caso contrário existe falta de linearidade (Green, 1996; Barros, 2002).

Protocolo experimental:

Foi preparada uma solução-mãe de catequina, com concentração de 10 mg catequina/100 ml de suco gástrico artificial (USP 30, 2007). A linearidade do método foi determinada pela análise de seis soluções padrão, preparadas por diluição adequada da solução-mãe de modo a se obterem as seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 mg catequina / ml. O ensaio foi realizado em triplicado.

- Precisão - expressa o grau de concordância entre uma série de medidas de tomas múltiplas, a partir de uma mesma amostra homogénea, em condições definidas (ICH, 1995). O estudo da precisão englobou a avaliação de dois parâmetros:

a) Repetibilidade, também denominada precisão intra-dia, é a medida da precisão de um método efectuado nas mesmas condições, sobre a mesma amostra, pelo mesmo analista, no mesmo laboratório, com os mesmos equipamentos, geralmente num curto intervalo de tempo e pode ser expressa pelo coeficiente de variação (CV). Os métodos analíticos requerem um CV de 1 a 2% (Ermer e Ploss, 2005).

b) Precisão intermédia, também denominado ensaio inter-dia, é a medida da precisão de um método analítico efectuado sobre a mesma amostra, mas em condições diferentes no referente a operadores, equipamentos, dias, ou uma combinação destes factores (ICH, 1995).

Protocolo experimental:

Na determinação da repetibilidade foram efectuadas no mesmo dia leituras espectrofotométricas sucessivas das soluções padrão com concentração de catequina de 0,01; 0,04; 0,06; 0,08 e 0,10 mg/ml.

A precisão intermédia foi avaliada pela leitura destas soluções padrão em 3 dias diferentes.

- Exactidão - indica a capacidade do método analítico de proporcionar resultados os mais próximos possíveis do valor aceite como verdadeiro. A sua avaliação baseia-se na determinação de erros sistemáticos, associados à medição dos resultados. É frequentemente expressa em termos de percentagem de recuperação, ou de *bias*, isto é a diferença entre uma média de valores de resultados com o valor aceite, como verdadeiro ou correcto.

Protocolo experimental:

Para a determinação da exactidão do método foram preparadas soluções de catequina com diferentes níveis de fortificação, designadamente concentrações de catequina (0,02; 0,04 e 0,08 mg/ml), n=3, contendo lactose numa relação de 1:1.

3.3.4.2. Ensaio de dissolução

Os estudos de dissolução são uma ferramenta indispensável para prever de forma eficaz o comportamento *in vivo* das formas farmacêuticas. De facto, a absorção de um fármaco ao nível do tracto gastro-intestinal é condição essencial para a sua presença na circulação sistémica. O processo de absorção de fármacos veiculados em formulações farmacêuticas sólidas, para administração oral, depende da libertação da substância activa a partir da respectiva formulação, da sua solubilização em condições fisiológicas e da sua permeabilidade ao longo do tracto gastro-intestinal. Dada a influência crítica dos dois primeiros parâmetros na eficácia das formulações farmacêuticas sólidas orais, que se traduz na velocidade e extensão do fenómeno de absorção, torna-se essencial que sejam avaliados nos estudos de pré-formulação.

A verificação da qualidade final da forma farmacêutica, em termos de biodisponibilidade só pode ser obtida a partir de estudos *in vivo*, realizados em animais

de laboratório ou em seres humanos, mas os modelos *in vitro* já permitem prever o progresso da libertação do fármaco e da sua absorção *in vivo*. Estes ensaios são importantes levando não só à redução dos custos e trabalho necessários ao desenvolvimento de uma forma farmacêutica, mas também à diminuição do número e dimensão de ensaios clínicos requeridos e a um controlo da qualidade mais eficiente.

Utilizam-se equipamentos simples, robustos, padronizados e usados em todo o mundo, pelo que são recomendados como primeira escolha, pela *Eur. Ph.* (2005), para os ensaios de dissolução *in vitro* de formulações para libertação imediata ou modificada.

O equipamento descrito na F.P. VIII (2005) consiste num aparelho com pá agitadora, constituído por seis recipientes cilíndricos com capacidade de 1 litro, munidos de tampa que evita a evaporação, agitador e banho termostaticado, que permite manter a temperatura do líquido de dissolução a $37\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante todo o ensaio. Em cada recipiente é colocada uma só cápsula, fazendo-se uma média das leituras obtidas nos seis recipientes. As amostras podem retirar-se em contínuo, através de um sistema automático, se se pretender fazer as leituras por UV. Se tal não acontecer retira-se uma amostra de 10 em 10 minutos (repondo o volume que se retirou, para manter as condições iniciais). Este ensaio permite conhecer a quantidade de substância activa que se dissolve, num determinado intervalo de tempo.

Estudos utilizando as metodologias oficiais são realizados por rotina em fármacos sintéticos, mas pouco usados quando se trata de fármacos de origem vegetal, o que constitui um amplo campo de investigação.

Num trabalho em que se utilizaram diferentes plantas medicinais: *Passiflora*, *Senna* e *Ginkgo* e alguns dos seus extractos secos, disponíveis comercialmente (Tagliatoli *et al.*, 2001), procurou investigar-se a sua biodisponibilidade *in vitro*. Os dados obtidos, evidenciaram que o estabelecimento dos perfis de dissolução dos extractos de plantas medicinais deve ser efectuado durante o desenvolvimento de uma forma farmacêutica, de modo a garantir a qualidade e a eficácia e portanto contribuir para a garantia do efeito terapêutico.

Com o objectivo de conhecer os perfis de dissolução das formas farmacêuticas preparadas a partir de extractos da *Uncaria tomentosa* fizeram-se os estudos de dissolução, utilizando os métodos oficiais.

Protocolo experimental

Os ensaios de dissolução foram realizados num aparelho de dissolução (Vankel VK 7000), empregando-se o método das pás e 700 ml de meio de dissolução (suco gástrico artificial).

Preparou-se suco gástrico artificial segundo a USP 30.

Utilizou-se uma velocidade de agitação de 100 rotações por minuto, fazendo-se as leituras por um período de 180 minutos, tempo considerado suficiente para garantir o esvaziamento gástrico em situações normais e avaliar a importância de um elevado tempo de exposição ao suco gástrico das proantocianidinas (Spencer *et al.*, 2000; Rios *et al.*, 2002).

A quantidade de substância activa dissolvida, em função do tempo, foi expressa em percentagem. Embora haja alguma divergência entre os documentos oficiais, estas formas farmacêuticas sólidas orais deverão libertar pelo menos 85% do fármaco, entre os 15 e os 60 minutos (Manadas *et al.*, 2002).

3.3.4.3. Uniformidade de massa

Protocolo experimental

Pesou-se uma cápsula cheia. Sem perder quaisquer fragmentos do invólucro, abriu-se a cápsula e extraiu-se o seu conteúdo tão completamente quanto possível. Pesou-se o invólucro e calculou-se a massa do seu conteúdo, por diferença. Repetiu-se a operação com mais 19 cápsulas.

Deste modo, foram pesadas individualmente vinte unidades retiradas ao acaso do mesmo lote e foi determinada a massa média. Não mais de 2 unidades poderão diferir em mais de 10% da massa média encontrada e, em nenhum caso, poderão exceder o dobro dessa percentagem.

3.3.4.4. Uniformidade de teor (dosagem)

O ensaio da uniformidade de teor, baseia-se na determinação do teor individual em princípio activo das unidades que constituem a amostra, permitindo verificar se estes se encontram dentro dos limites estabelecidos em relação ao teor médio da amostra.

Protocolo experimental

Normalmente são tomadas ao acaso dez cápsulas e doseadas individualmente as substâncias activas de cada uma, recorrendo a um método analítico apropriado.

3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1. DETERMINAÇÃO DA MASSA VOLÚMICA APARENTE E DO VOLUME APARENTE

Este ensaio permitiu obter a massa volúmica do produto em bruto (m/V_0) e do produto reduzido (m/V_{1250}), respectivamente antes e após compactação, a partir da massa de amostra, do volume aparente antes da compactação (V_0) e do volume aparente após a compactação, ou volume reduzido (V_{1250}).

Os valores obtidos encontram-se representados na Tabela 7.

Tabela 7. Determinação da massa volúmica aparente do produto em bruto e do produto reduzido

	Extracto liofilizado	Casca pulverizada	Extracto comercial	Uncária Naturmil® 500
m/V_0 (g/ml)	0,01	0,35	0,50	0,47
m/V_{1250} (g/ml)	0,25	0,60	0,70	0,79

Estas determinações foram fundamentais para a selecção do tamanho da cápsula mais adequado.

3.4.2. SELECÇÃO DOS EXCIPIENTES PELO MÉTODO DA CALORIMETRIA DIFERENCIAL DE VARRIMENTO (DSC)

Na literatura é pouco vulgar encontrar-se estudos de DSC, realizados com extractos de plantas medicinais, o que pode justificar-se por terem uma composição complexa, e por isso a análise dos respectivos termogramas poder não ser simples.

Tendo em conta estes factos, uma vez que se pretende desenvolver uma forma farmacêutica oral de libertação convencional, optou-se por seleccionar, na primeira fase deste estudo alguns dos excipientes mais utilizados, em particular a lactose, o amido de milho e o estearato de magnésio. Numa segunda fase, tendo em conta as dificuldades encontradas na desagregação completa do conteúdo das cápsulas, nos ensaios de dissolução (secção 3.4.3.), efectuaram-se também curvas térmicas de DSC do extracto liofilizado com alguns desagregantes de uso comum, como a celulose microcristalina e a carboximetilcelulose sódica.

Prepararam-se misturas binárias (1:1) do extracto com os excipientes e sempre que necessário foram repetidas na razão fármaco-excipiente a utilizar na formulação.

A curva térmica do extracto (Fig. 52) apresentou um pico endotérmico largo, logo que se iniciou o processo de aquecimento, provavelmente relacionado com a perda de água, por parte das amostras. A temperaturas elevadas ocorreu a sua decomposição térmica.

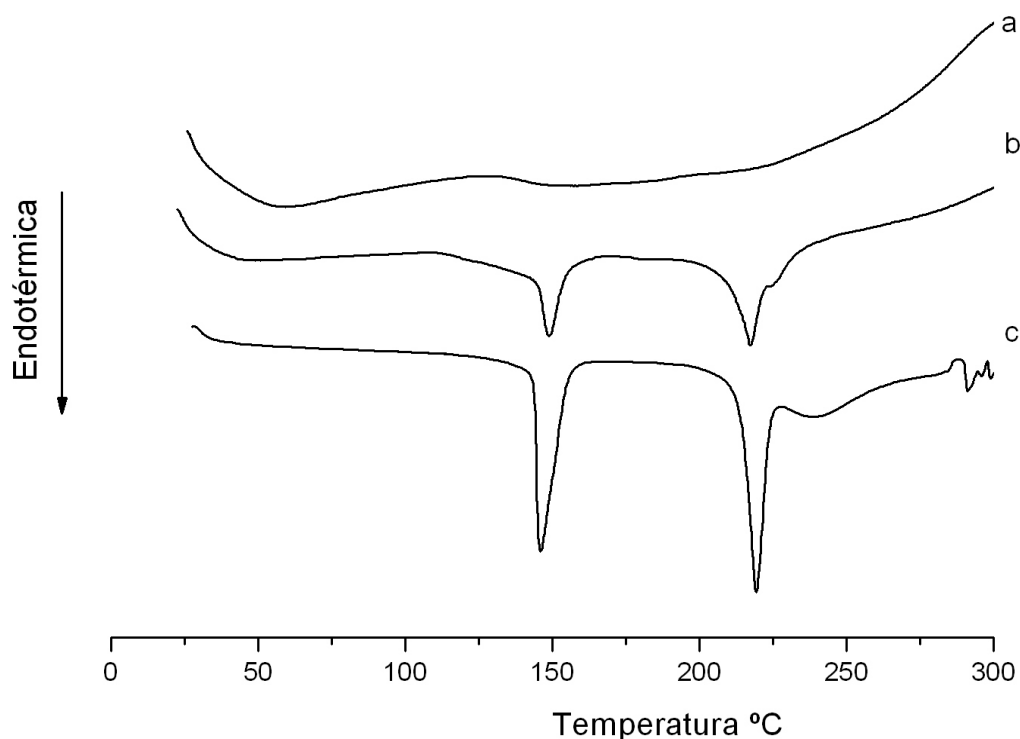


Figura 52. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + lactose (1:1) e c) lactose α -monohidratada

Por outro lado, a α -lactose monohidratada apresentou uma primeira transição endotérmica determinada experimentalmente a 146,01 °C, relacionada com a reacção de desidratação. Apresentou ainda um segundo pico a 219,22 °C, que corresponde ao ponto

de fusão. A temperaturas superiores ocorreu a sua decomposição térmica. Os valores determinados experimentalmente estão de acordo com o descrito na literatura (Balestrieri *et al.*, 1996).

A análise da curva de DSC da mistura do extracto liofilizado com a lactose monohidratada (Fig. 52b) demonstrou diminuição dos picos endotérmicos de fusão da lactose e discreto deslocamento das temperaturas dos picos máximos. Fenómeno idêntico foi observado quando o ensaio foi realizado na relação adequada à formulação.

Este comportamento revelou alguma interação entre estes compostos a temperaturas elevadas, que pode não significar necessariamente incompatibilidade. É possível que à temperatura ambiente as interações entre o extracto liofilizado e a lactose decorram de forma mais lenta e possam ser negligenciáveis.

A análise das curvas térmicas do extracto liofilizado com o amido de milho (Fig. 53) não revelou alterações significativas que possam indicar algum tipo de interação, um comportamento que confirma a ausência de incompatibilidades, referida na bibliografia para este excipiente (Rowe *et al.*, 2006).

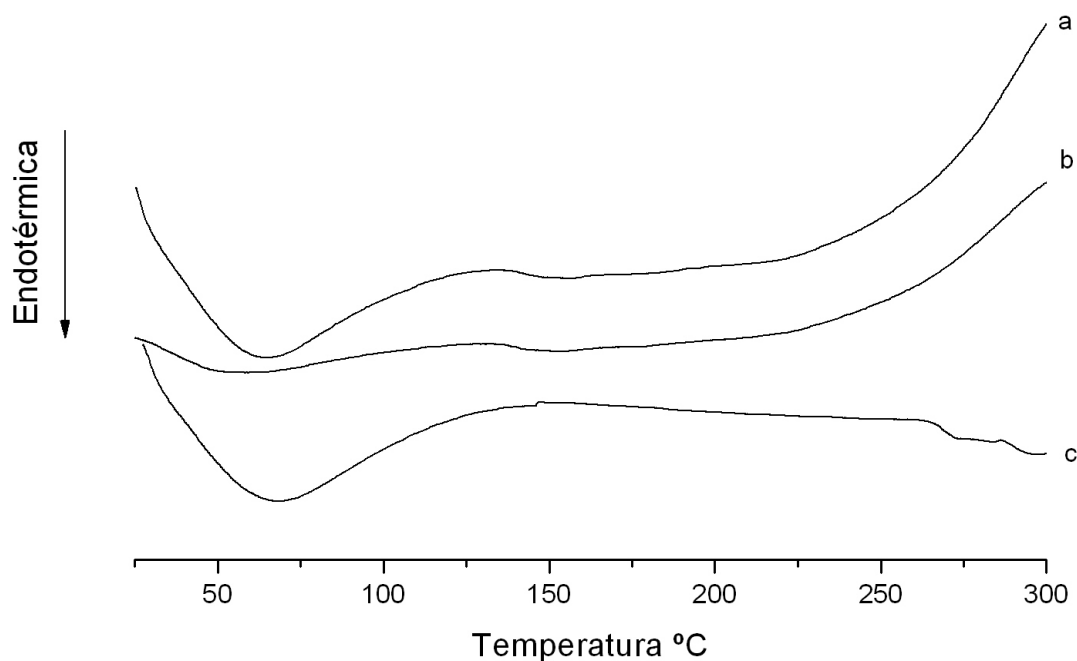


Figura 53. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado + amido de milho (1:1); b) extracto liofilizado e c) amido de milho

A curva de DSC, correspondente ao estearato de magnésio (Fig. 54) apresentou uma configuração típica de perda de água entre 40 e 75 °C, um pico endotérmico de fusão a 108,39 °C (Miller e York, 1985) e um pico exotérmico a 174,03 °C.

O termograma da mistura apresentou uma diminuição acentuada dos picos correspondentes ao estearato de magnésio, o que sugere importante interação. A confirmação da incompatibilidade, já identificada com diversas substâncias (Rowe *et al.*, 2006) teria de ser feita por outro tipo de técnicas como a espectroscopia do infravermelho. A utilização deste excipiente terá de ser feita com precauções acrescidas e sempre em quantidades muito pequenas, conforme é corrente em Tecnologia Farmacêutica.

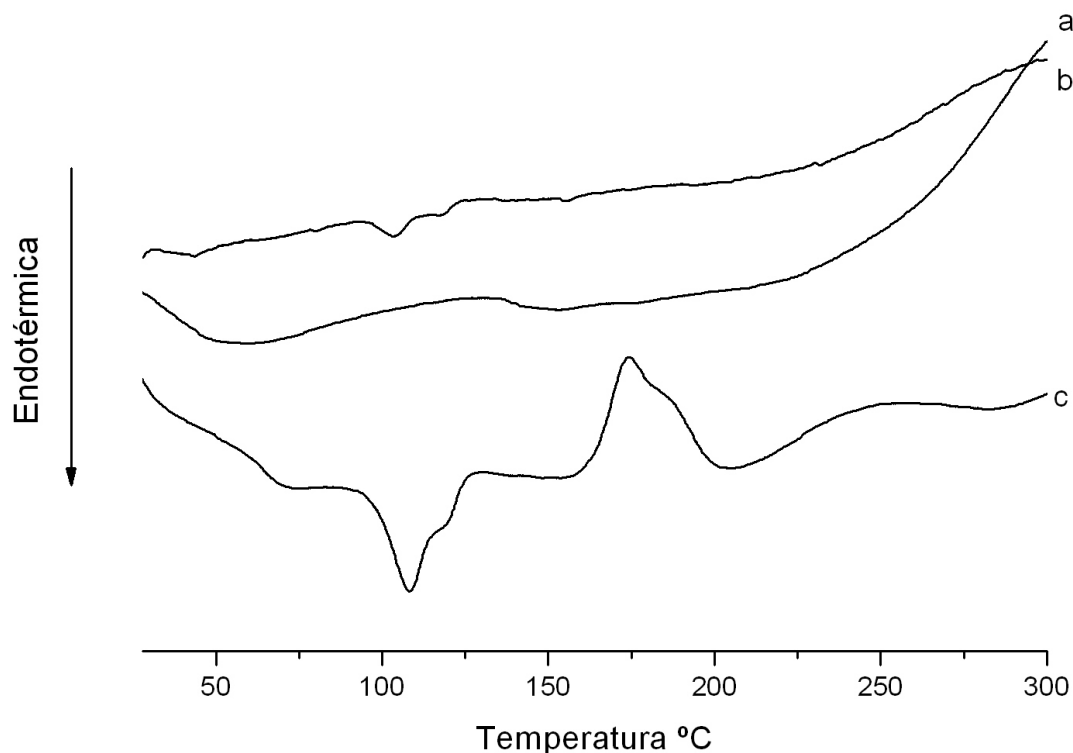


Figura 54. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + estearato de magnésio (1:1) e c) estearato de magnésio

A análise das curvas de DSC do extracto liofilizado com a celulose microcristalina não revelou alterações significativas (Fig. 55). Pode observar-se uma curva endotérmica larga no início do processo de aquecimento das amostras que termina um pouco acima dos 100°C e que deverá estar relacionado com a perda de água (Verma e Garg, 2005). No caso da celulose microcristalina esta curva tem um máximo a 61,91 °C, valor praticamente sobreponível ao da mistura, indicando uma grande improbabilidade de interações e consequentes incompatibilidades entre os

componentes (Fig. 55). A temperatura muito elevada decorre a decomposição térmica das amostras.

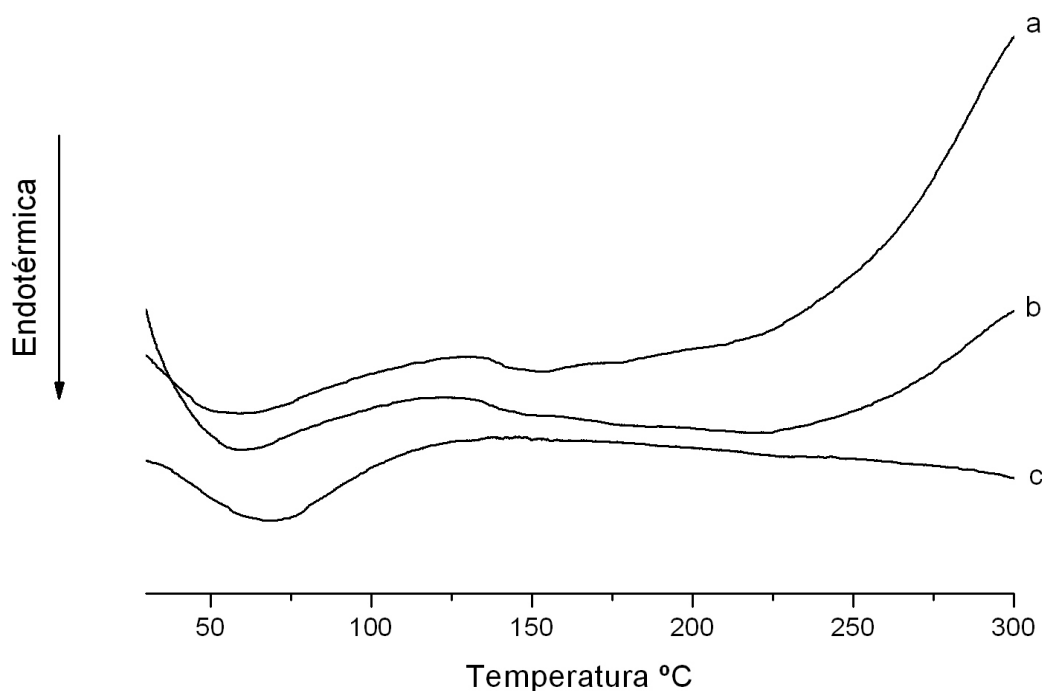


Figura 55. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + celulose microcristalina (1:1) e c) celulose microcristalina

Os comportamentos térmicos do extracto liofilizado e da carboximetilcelulose sódica são apresentados na Figura. 56, com curva endotérmica larga que se inicia logo que o processo de aquecimento das amostras começa a decorrer e que deverá estar relacionado com a perda de água absorvida. A mistura revelou compatibilidade entre os dois componentes.

O comportamento térmico do extracto liofilizado e do amido-glicolato de sódio (Explotab®) foi também estudado (Fig. 57). À semelhança do amido de milho, o Explotab® apresentou uma curva endotérmica larga, com máximo a 67,82 °C, característico da desidratação, sendo termicamente estável até cerca de 260 °C, exibindo a temperaturas superiores a 270 °C um pico exotérmico correspondente à sua decomposição. No entanto o comportamento térmico da mistura com o extracto liofilizado foi substancialmente diferente, o que sugere interacção extracto liofilizado-Explotab®.

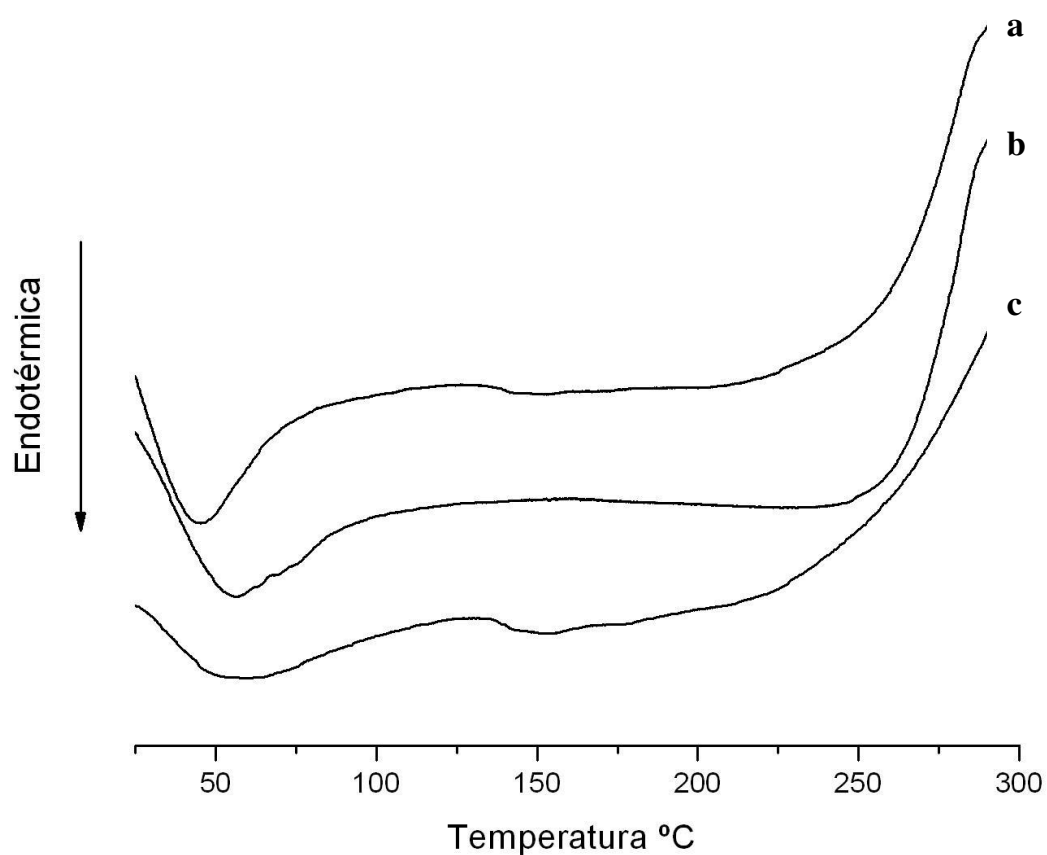


Figura 56. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado + carboximetilcelulose sódica (1:1); b) extracto liofilizado e c) carboximetilcelulose sódica

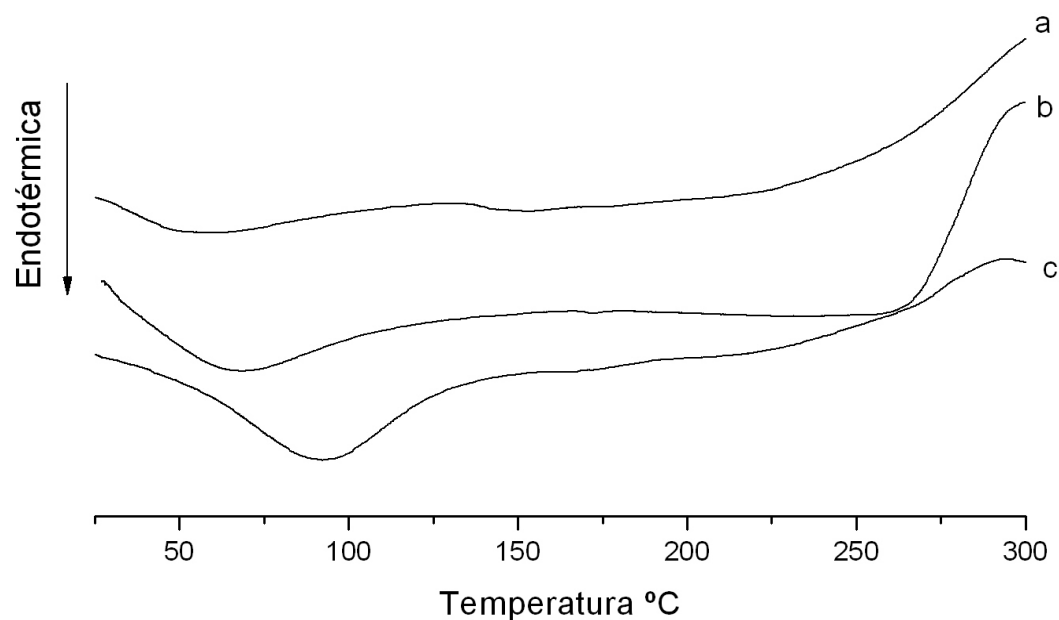


Figura 57. Termogramas de DSC: a) extracto liofilizado; b) extracto liofilizado + amido glicolato de sódio (Explotab®) e c) Explotab®

Com o objectivo de investigar as possíveis interacções do extracto comercial e alguns excipientes e poder comparar o comportamento térmico dos dois extractos, aplicou-se o DSC ao estudo do extracto comercial.

A curva de DSC do extracto comercial (Fig. 58) é muito semelhante à do extracto liofilizado. Apresentou uma curva endotérmica larga, entre 60 e 140 °C, provavelmente também aqui relacionada com a perda de água. Não existe no termograma qualquer pico endotérmico, o que reflecte a composição complexa do extracto.

A mistura do extracto comercial com a lactose monohidratada demonstrou que o seu comportamento térmico se mantém, mas com visível depressão dos picos endotérmicos da desidratação e da fusão da lactose. Este comportamento indicativo de possibilidade de interacção, pode ser explicado pela presença do extracto comercial.

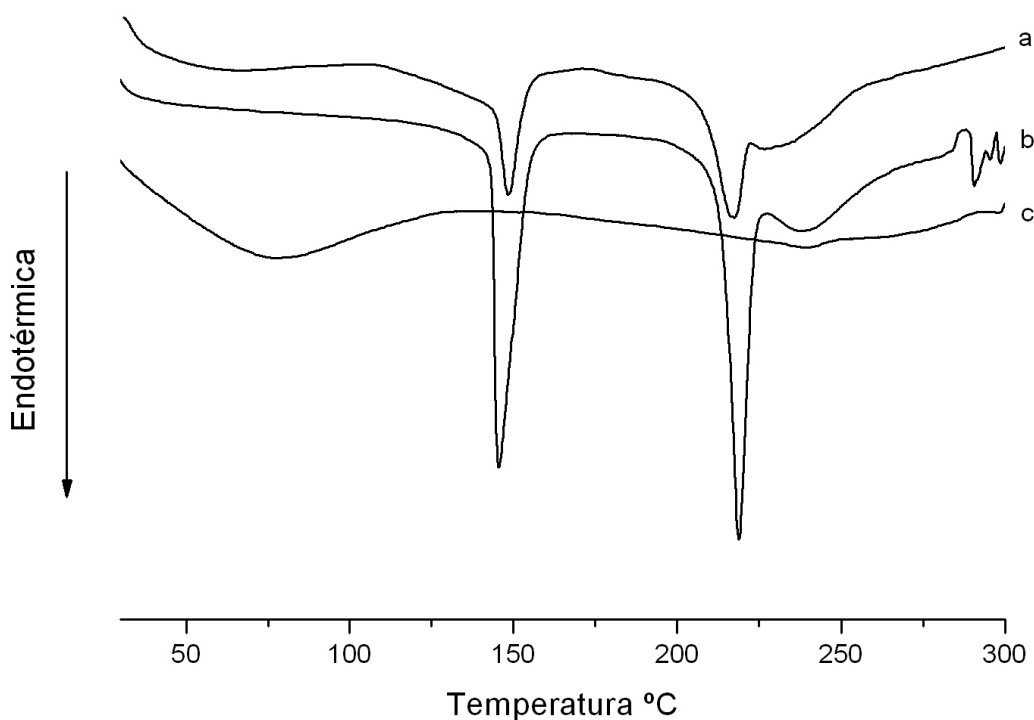


Figura 58. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + lactose monohidratada (1:1); b) lactose monohidratada e c) extracto comercial

A mistura entre o extracto comercial e o amido de milho não revelou qualquer interferência (Fig. 59).

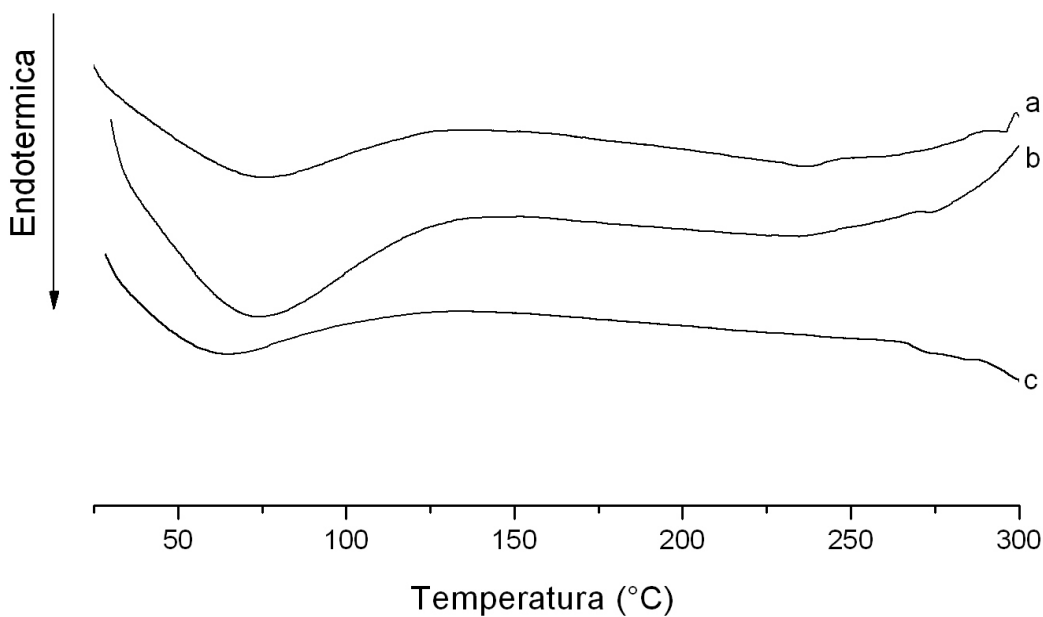


Figura 59. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + amido de milho (1:1); b) extracto comercial e c) amido de milho

Como já foi referido, o termograma do estearato de magnésio determinado (Fig. 60) apresentou uma configuração típica de perda de água entre 40 e 75 °C, um pico endotérmico, a 108,39 °C e um pico exotérmico a 174,03 °C.

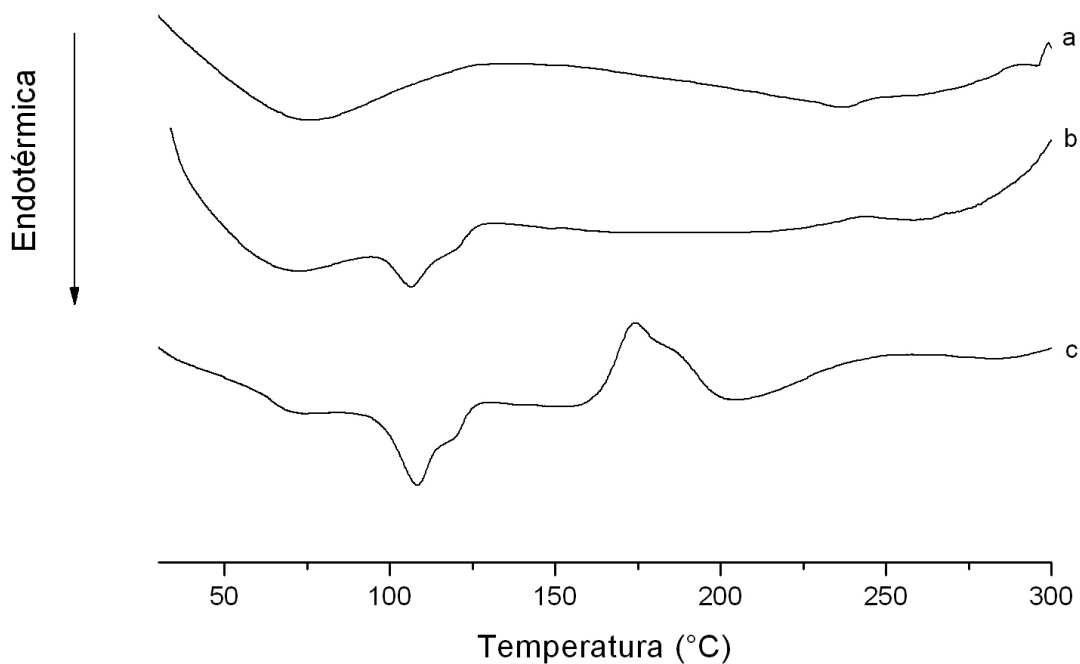


Figura 60. Termogramas de DSC: a) extracto comercial + estearato de magnésio (1:1); b) extracto comercial e c) estearato de magnésio

Relativamente à mistura observou-se uma diminuição considerável dos picos correspondentes ao estearato de magnésio, o que sugere algum tipo de interacção, cuja confirmação só é possível por outros métodos (CLAR, espectroscopia de infra-vermelho, espectroscopia de Raman).

Embora não se conheça a amplitude da interacção dos extractos de *Uncaria tomentosa* com os excipientes – lactose monohidratada, amido glicolato de sódio e estearato de magnésio, nem o efeito que o tempo poderia ter na consolidação dessas reacções de interacção e as implicações que isso teria no estabelecimento do prazo de validade, parece ser uma opção mais correcta, tendo em conta os resultados obtidos por calorimetria diferencial de varrimento, seleccionar o amido de milho, como diluente para as formas sólidas orais a desenvolver com ambos os extractos de *Uncaria tomentosa*.

As interacções observadas entre o extracto liofilizado, lactose monohidratada, amido glicolato de sódio e estearato de magnésio, combinações de excipientes frequentemente encontradas nas formulações de *Uncaria tomentosa* encontradas no mercado, necessitam de ser confirmadas por outro tipo de técnicas. Apesar de aplicação mais complexa pelo facto da *Uncaria tomentosa* e respectivos extractos se tratarem de misturas e não de um composto puro, pode ser um importante desafio, para um trabalho futuro a desenvolver nesta área, empregar a espectroscopia do infra-vermelho e também a técnica da cromatografia líquida de alta resolução às misturas do extracto com estes excipientes (Santos, 2005).

3.4.3. PREPARAÇÃO DE CÁPSULAS COM *UNCARIA TOMENTOSA*

O objectivo foi o de preparar cápsulas com 100 mg de extracto liofilizado de *Uncaria tomentosa*. A escolha desta dosagem de entre outras possíveis foi feita após pesquisa das doses encontradas nas formulações comerciais, obtidas por processos semelhantes (como o ManaXX®) e consulta bibliográfica das doses terapêuticas (Mur *et al.*, 2000; Sandoval *et al.*, 2000, Sheng *et al.*, 2000a). Por outro lado, esta dose de extracto liofilizado equivale também de forma aproximada à quantidade de casca pulverizada utilizada inicialmente para a preparação dos decoctos, ou seja aproxima-se

da quantidade existente numa chávena de chá de decocto, preparada de acordo com a sua utilização na medicina tradicional.

A composição das formulações com 100 mg de extracto liofilizado utilizadas encontra-se resumida na Tabela 8.

Tabela 8. Composição das cápsulas contendo extracto liofilizado

Componentes	Formulação (mg)			
	A1	A2	A3	A4
Extracto liofilizado	100,00	100,00	100,00	100,00
Lactose monohidratada	-	-	25,00	33,30
Amido de milho	-	70,00	16,60	16,66
Celulose micro-cristalina	-	-	16,60	16,66
Explotab	-	-	6,70	-
Estearato de magnésio	-	-	1,70	-
Tamanho do invólucro	nº 2	nº 1	nº 1	nº 1

Com o objectivo de avaliar algum tipo de sinergismo entre a casca pulverizada e o extracto liofilizado, prepararam-se cápsulas na proporção de 1:1, tendo em conta a relação anteriormente determinada entre a casca pulverizada e o rendimento do extracto liofilizado (secção 2.3.2). A inclusão de quaisquer excipientes não pareceu conveniente dado o volume ocupado pela mistura que praticamente perfaz a capacidade do invólucro (Tabela 9).

Tabela 9. Composição das cápsulas contendo a mistura de extracto liofilizado e casca pulverizada

Componentes	Formulação (mg)
	B
Extracto liofilizado	50,00
Casca pulverizada	336,70
Tamanho do invólucro	nº 0

Colocou-se ainda a hipótese de preparar cápsulas de casca pulverizada de *Uncaria tomentosa* com quantidade equivalente aos 100 mg de extracto liofilizado. No entanto, esta quantidade de casca pulverizada ultrapassa largamente a capacidade da cápsula de tamanho nº 0, não sendo usual em seres humanos a utilização de cápsulas de volume superior, dada a sua mais difícil deglutição.

Em relação ao extracto comercial de *Uncaria tomentosa*, com reduzida percentagem de 3-flavanóis e actividade antioxidante consideravelmente inferior à do extracto liofilizado de *Uncaria tomentosa* preparado laboratorialmente, optou-se por utilizar a quantidade de 150 mg por cápsula (Tabela 10).

Tabela 10. Composição das cápsulas contendo extracto comercial

Componentes	Formulação (mg)	
	C1	C2
Extracto comercial	150,00	150,00
Lactose monohidratada	60,00	-
Amido de milho	-	45,00
Estearato de magnésio	3,00	-
Tamanho do invólucro	nº 2	nº 2

3.4.4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE DOSAGEM

3.4.4.1. Especificidade

Todas as amostras de *Uncaria tomentosa* apresentaram uma absorção significativa a 279-281 nm, que é comum aos 3-flavanóis mono- e poliméricos.

Subsequentemente, verificou-se que a catequina, um 3-flavonol monomérico, manteve uma absorção estável durante quatro horas, quando solubilizada em suco gástrico artificial, a 37 °C.

O varrimento do espectro com os excipientes, em concentrações próximas das usadas nas formulações, permitiu despistar possíveis interferências destes nesta zona do espectro. Nenhum dos excipientes ensaiados (lactose monohidratada, amido de milho e celulose microcristalina) apresentou qualquer absorção a este comprimento de onda.

3.4.4.2. Linearidade

Verificou-se a linearidade entre a leitura da absorvância da catequina, a 279 nm e a respectiva concentração, no intervalo de concentrações entre 0,01 e 0,10 mg/ml (Fig. 61). A equação da regressão linear obtida foi $y = 11,975x + 0,016$, com um coeficiente de determinação de 0,999.

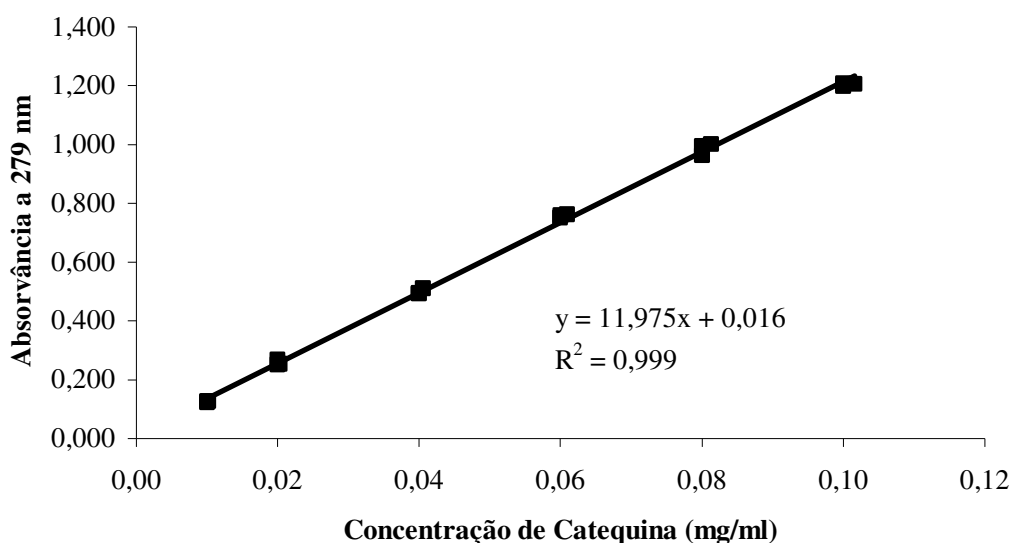


Figura 61. Curva de calibração da catequina

O coeficiente de variação dos factores de resposta obtido foi de 2,70%, um valor concordante com uma boa linearidade (Green, 1996, Barros, 2002).

3.4.4.3. Precisão

Na Tabela 11 apresentam-se os resultados correspondentes ao estudo da precisão (repetibilidade e precisão intermédia).

Os valores obtidos indicam uma precisão do método dentro dos parâmetros estabelecidos (Green, 1996).

Tabela 11. Repetibilidade e precisão intermédia

Concentração mg/ml	Repetibilidade CV (%)	Precisão intermédia CV (%)
0,01	1,34	1,35
0,04	1,187	1,97
0,06	0,629	0,80
0,08	1,68	2,05
0,10	0,91	0,44

n=3 e n=9, na precisão intra e inter-dia, respectivamente

3.4.4.4. Exactidão

Na Tabela 12 apresentam-se os resultados das percentagens de recuperação das soluções anteriormente descritas, em relação ao valor teórico (100%), bem como a diferença entre a concentração média determinada e a concentração teórica ou *bias*. As percentagens de recuperação variaram entre 99,72% e 100,02%. Por sua vez os valores de *bias* variaram entre -0,07 e 0,081. Tais valores indicam uma boa exactidão do método.

Tabela 12. Exactidão do método, expressa em percentagens de recuperação e de *bias*, na presença da lactose

Concentração mg/ml	Recuperação ^a (%)	Desvio (%)
0,02	100,02 ± 4,45	-0,07
0,04	99,72 ± 1,18	0,081
0,08	99,34 ± 1,67	-0,013

^a média ± desvio padrão (n=3)

3.4.5. ENSAIOS DE DISSOLUÇÃO E OPTIMIZAÇÃO DAS FORMULAÇÕES

3.4.5.1. Determinação do teor em 3-flavanóis

As amostras de *Uncaria tomentosa* foram pesadas para balão volumétrico de 10 ml, e os volumes acertados com suco gástrico artificial. Aqueceu-se a 37°C, sob agitação, durante 1 h, efectuando-se uma filtração, antes de efectuar a leitura das absorvâncias. Estas condições pretenderam simular as do ensaio de dissolução, permitindo determinar o teor de proantocidinas, expressa em catequina, pela interpolação dos resultados a partir da curva de calibração obtida.

A leitura das absorvâncias após uma hora teve em conta os dados de estabilidade do padrão de catequina, em meio ácido, e o tempo máximo de libertação estabelecido para as formas de libertação convencional.

Tabela 13. Quantificação dos 3-flavanóis presentes em amostras de *Uncaria tomentosa*

	3-Flavanóis^a (%)
Extracto liofilizado	29,62 ± 1,48
Extracto comercial	7,43 ± 0,82
Casca pulverizada	5,90 ± 0,09
uncária Naturmil	3,15 ± 0,02

^a média ± desvio padrão (n=3), concentração expressa em g de catequina, por 100 g de amostra

A percentagem de 3-flavanóis expressa em catequina obtida nas amostras em estudo, embora diferente da obtida pelo método da vanilina-ácido clorídrico (ensaios com condições e metodologia diferente), constituiu uma confirmação da hipótese anteriormente colocada de uma elevada percentagem de 3-flavanóis no extracto liofilizado, muito superior às restantes amostras. Entre as amostras a variação da percentagem de 3-flavanóis varia também na mesma relação.

3.4.5.2. Ensaio de dissolução

Os ensaios foram realizados aplicando o método da pá agitadora, seguindo os critérios recomendados pela F.P.VIII (2005). Utilizou-se suco gástrico artificial, à temperatura de 37 °C, com a velocidade de agitação a 100 rotações por minuto, sendo analisadas no mínimo seis cápsulas de cada formulação desenvolvida ou especialidade farmacêutica em estudo. A leitura espectrofotométrica das absorvâncias foi efectuada em contínuo, durante 180 minutos. As concentrações reportadas a catequina foram obtidas por interpolação na curva de calibração calculada anteriormente.

Com base nos resultados anteriormente obtidos por calorimetria diferencial de varrimento, foram ensaiadas cápsulas contendo extracto liofilizado e amido de milho (formulação A2). Tendo em conta a falta de estudos nesta área e o objectivo deste trabalho, decidiu avaliar-se inicialmente em termos de ensaios de dissolução também uma formulação muito simples contendo unicamente extracto liofilizado na sua composição (formulação A1).

Embora os ensaios preliminares não tenham indicado qualquer efeito sinérgico nas condições ensaiadas entre a mistura da casca pulverizada e o extracto liofilizado, em termos de actividade anti-radicalar (secção 2.3.5.), pretendeu-se ainda assim preparar essa mistura, no sentido de confirmar, com outro tipo de técnicas os resultados obtidos, ou encontrar outras explicações que possam justificar a sua utilização conjunta, na mesma forma farmacêutica (formulação B).

Para todas as formulações, foram realizados no mínimo seis ensaios.

Durante os ensaios de dissolução (Fig. 62) foi observado que, enquanto a mistura da casca com o extracto liofilizado (B) se desagregava rapidamente, encontrando-se no final do ensaio apenas vestígios da casca não solúveis, dispersos no meio de dissolução, no caso das formulações contendo extracto liofilizado, com ou sem amido de milho (A2 e A1, respectivamente), a desagregação ocorria de forma lenta, observando-se nos copos de dissolução no final do ensaio, a integridade de parte significativa do conteúdo do invólucro, observável visualmente. A explicação para este fenómeno deverá estar nas propriedades físico-químicas do extracto liofilizado, tendo a formulação com o extracto liofilizado isolado (A1) apresentado perfil de dissolução mais baixo. Ao fim de 60 minutos apenas 72% do extracto liofilizado se libertou, o que

é inferior àquilo que está definido nos documentos oficiais para este tipo de formas farmacêuticas.

A forma farmacêutica contendo extracto liofilizado e amido de milho (A2), está de acordo com as exigências definidas (pelo menos 85% do fármaco libertado, entre os 15 e os 60 minutos).

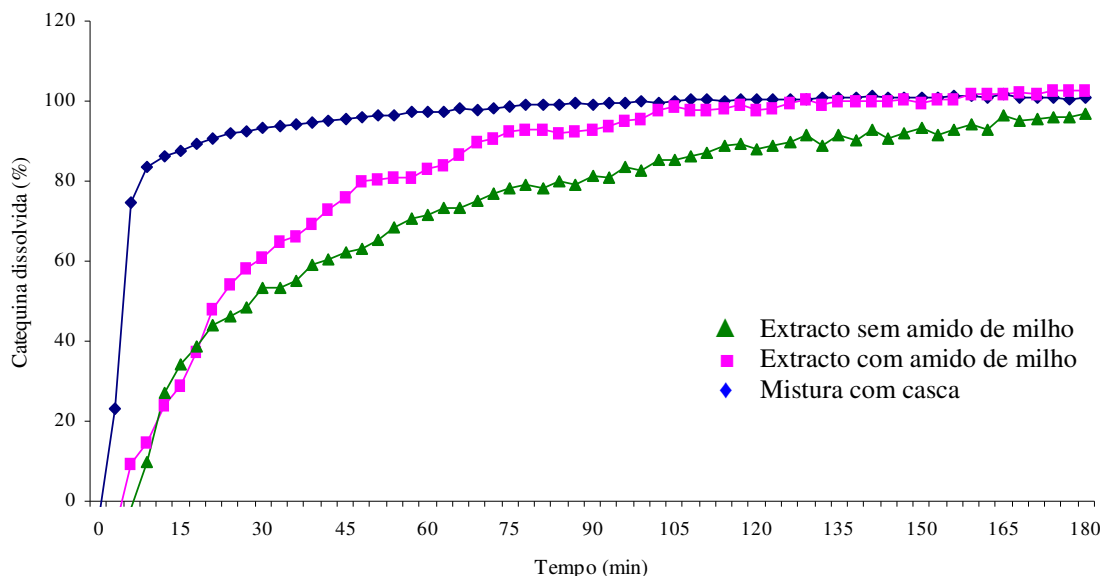


Figura 62. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas contendo as formulações A1 (▲), A2 (■) e B (◆)

Numerosos métodos têm sido propostos para aumentar a taxa de dissolução dos fármacos fracamente solúveis, como a utilização de ciclodextrinas, de tensoactivos, ou de superdesagregantes, como a carboximetilcelulose sódica (Lauro *et al.*, 2001). Em geral, a taxa de dissolução também pode ser aumentada pela diminuição do tamanho da partícula do fármaco. Excepcionalmente, no entanto, pode verificar-se o inverso, devido a propriedades de superfície, como a carga eléctrica, resultando numa diminuição da área em contacto com o solvente (Tagliatoli *et al.*, 2001). Tendo em conta que o extracto liofilizado se trata de um pó com partículas extremamente pequenas pode ser esta a explicação.

Estes resultados sugerem que enquanto a mistura casca/extracto liofilizado (B) não revela necessidade de adição de qualquer excipiente adicional, podendo até ser esta uma razão fundamentada para se encontrar este tipo de misturas em formas farmacêuticas comerciais de *Uncaria tomentosa*, a formulação contendo o extracto

liofilizado isolado não pode ser utilizada como forma de libertação convencional, por não obedecer aos critérios estabelecidos.

Com o objectivo de melhorar o perfil de dissolução das formas farmacêuticas com extracto liofilizado realizou-se um ensaio de dissolução preliminar, com cápsulas duras, contendo 100 mg de extracto liofilizado e diversas misturas de excipientes, nas concentrações adequadas para se aquilatar o seu efeito desagregante. Estes ensaios incluíram todos os excipientes com estas características, cuja interacção com o extracto liofilizado tinha sido avaliada por DSC.

Apesar dos resultados obtidos por calorimetria diferencial de varrimento evidenciarem algum tipo de interacção entre o extracto liofilizado e três dos excipientes ensaiados: a lactose monohidratada, o amido glicolato de sódio e o estearato de magnésio optou-se por incluí-los em algumas das formulações a fim de avaliar a sua importância.

Entre os excipientes seleccionados para estes estudos destaca-se a celulose microcristalina, cuja presença parece aumentar ligeiramente a solubilidade em meio ácido; estudos *in vitro* já realizados com dois flavonóides (a naringina e o seu metabolito naringenina), evidenciaram um aumento da dissolução (Lauro *et al.*, 2001). Outro estudo, com flavonóides, também largamente distribuídos nos fármacos vegetais e com bastante interesse terapêutico: a rutina e a quercetina, mas com baixas taxas de dissolução, a partir de formas orais sólidas utilizaram-se diversos super-desintegrantes, entre os quais a carboximetilcelulose sódica, o que contribuiu para a melhoria do seu perfil de dissolução. Tendo em conta estes resultados e as suas reconhecidas propriedades em tecnologia farmacêutica (polímero altamente hidrofílico, mas insolúvel em água, capaz de intumescer em grande escala, promovendo a interacção das partículas do fármaco, com o solvente), optou-se por incluí-la nas formulações (Lauro *et al.*, 2002).

Curiosamente, apesar de diversas tentativas em contrário, a utilização da lactose monohidratada como excipiente, em percentagens que variavam entre os 15 e os 20% pareceu ser um elemento decisivo na obtenção de uma forma de libertação convencional, com óptimo perfil de dissolução. Assim sendo, embora por técnicas de DSC tenham sido detectados sinais de alguma interferência do extracto liofilizado com a lactose, e por isso ser preferível uma formulação que não a contivesse, por não ter sido

possível no âmbito deste estudo, utilizar outro tipo de técnicas que confirmassem a existência de incompatibilidade entre ambos, decidiu-se pela sua aplicação.

Seleccionaram-se as formulações com melhor perfil de dissolução e realizaram-se seis ensaios para cada formulação, de acordo com as condições anteriormente definidas, que estão representadas na Fig.63.

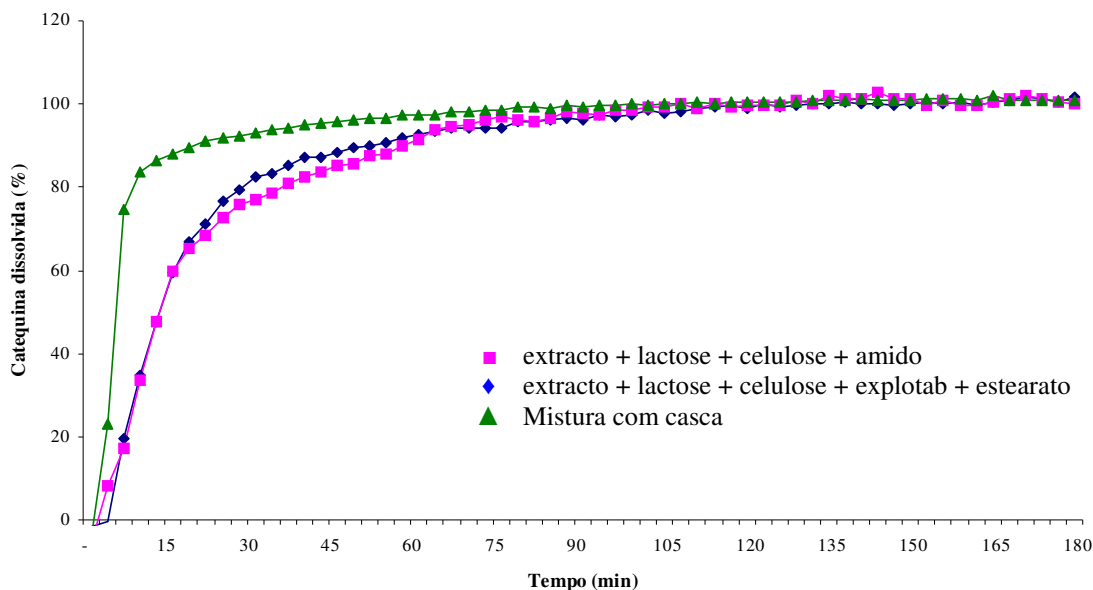


Figura 63. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com as formulações A3 (◆); A4 (■) e B (▲)

Com o objectivo de poder efectuar estudos comparativos efectuaram-se ainda dois perfis de dissolução com o extracto comercial (Fig. 64) (correspondentes a seis ensaios de dissolução, por formulação), utilizando como excipientes o amido de milho ou a lactose monohidratada, não se verificando qualquer problema de dissolução com as duas formulações, o que confirma mais uma vez, as diferentes características dos extractos de *Uncaria tomentosa* ensaiados.

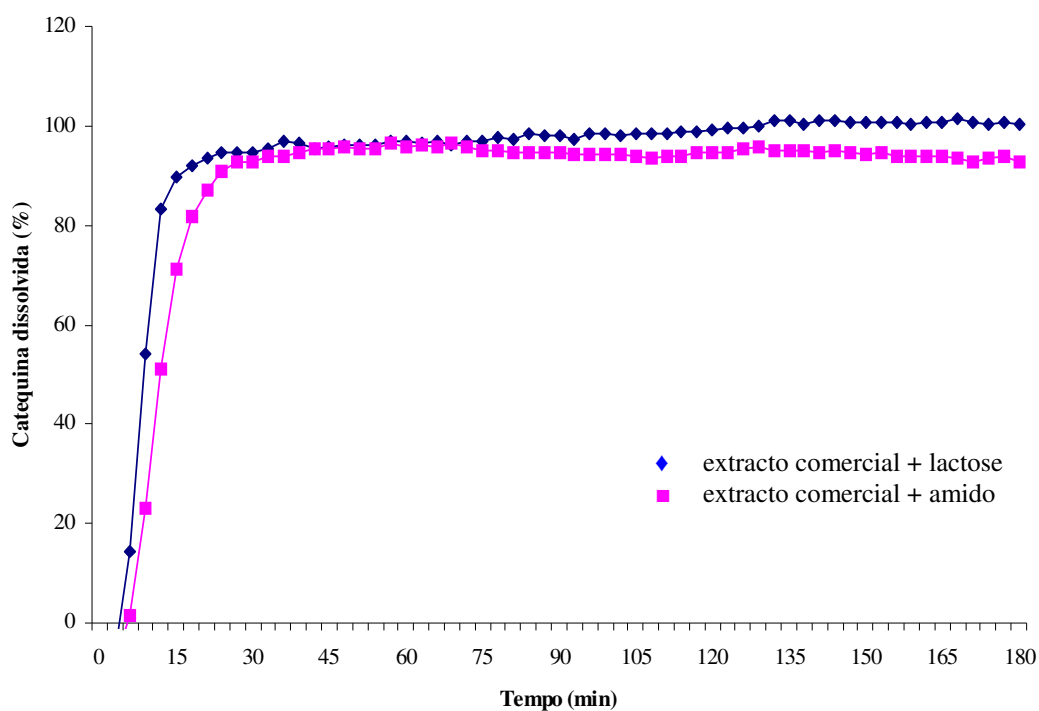


Figura 64. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com as formulações C1 (♦) e C2 (■)

Finalmente, efectuou-se ainda um ensaio de dissolução com as cápsulas comerciais de uncária Naturmil®, para se poder comparar o seu perfil de dissolução com as restantes amostras (Fig.65).

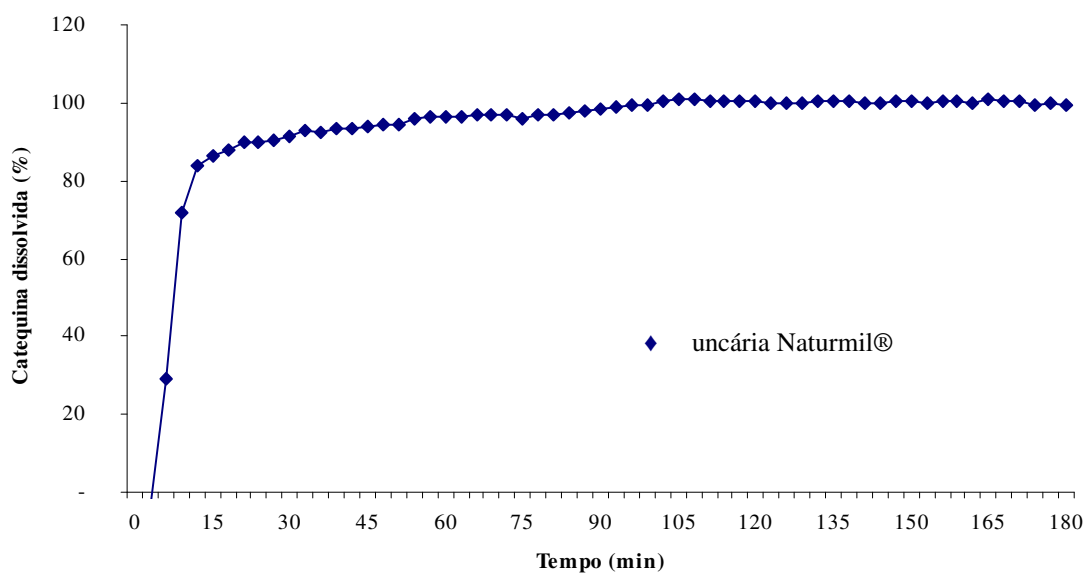


Figura 65. Perfil de dissolução cumulativa das cápsulas duras com uncária Naturmil® (♦)

Avaliando-se as curvas de percentagem de catequina dissolvida em função do tempo – perfil de dissolução – observou-se que as formulações desenvolvidas obedecem aos critérios propostos pela USP30 (2007) para o ensaio de dissolução, uma vez que a dissolução após 60 minutos foi superior a 85% da quantidade existente, tendo por isso um perfil de dissolução adequado a formas farmacêuticas de libertação convencional.

3.4.5.3. Seleção das formas farmacêuticas

Tendo em conta que entre os objectivos deste trabalho se destaca a selecção de formas farmacêuticas que apresentem requisitos de qualidade e eficácia de modo a garantir o efeito terapêutico, a análise dos perfis de dissolução revela-se muito importante. Por outro lado, pretende-se avaliar a actividade antioxidante das formas farmacêuticas desenvolvidas.

Tendo em conta estes factores, duas formulações contendo o extracto liofilizado revelaram-se muito interessantes: a primeira é constituída pela mistura do extracto liofilizado com a casca pulverizada (formulação B). Tem um óptimo perfil de dissolução, dissolvendo-se completamente em menos de 20 minutos no suco gástrico. A segunda seleccionou-se de entre as formulações de extracto liofilizado com melhor perfil de dissolução (A3 e A4). Optou-se pela formulação A4, contendo 100 mg extracto liofilizado, 33,3 mg de lactose monohidratada (20%), 16,66 mg de amido de milho (10%) e 16,66 mg de celulose microcristalina (10%), percentagens onde as acções desagregantes dos excipientes estão potencializadas (Rowe *et al.*, 2006). Esta opção foi realizada tendo em conta que ambas as formulações (A3 e A4) possuem um perfil de dissolução perfeitamente enquadrado nos requisitos das formas de libertação convencional, mas a formulação A3 incluir não apenas um, mas três excipientes, com os quais parece haver algum tipo de interacção, segundo os resultados obtidos em calorimetria diferencial de varrimento e não parecer sensato seleccionar uma forma farmacêutica com um possível potencial de incompatibilidade extracto / excipientes.

No caso do extracto comercial, a seleccionar-se uma formulação para ensaio comparativo da actividade antioxidante, optar-se-ia por aquela que contém apenas amido de milho (C2), por assim se minimizarem as possibilidades de interacção extracto liofilizado/excipiente.

3.4.6. ENSAIOS DE CONTROLO DE QUALIDADE

3.4.6.1. Uniformidade de massa

A análise referente aos resultados estatísticos do ensaio da uniformidade de massa das formulações seleccionadas contendo extracto liofilizado (A4 e B), encontram-se representados na Tabela 14.

A análise referente aos resultados estatísticos do ensaio da uniformidade de massa das formulações contendo extracto comercial (C2), encontra-se representada na Tabela 15.

Tabela 14. Resultados referentes à uniformidade de massa de cápsulas extracto liofilizado e excipientes (A4) ou casca (B)

Formulações	Parâmetros ^a				
	Média (mg)	Desvio Padrão	CV (%)	Máximo (mg)	Mínimo (mg)
A4	164,11	2,05	1,51	166,80	159,60
B	381,80	2,07	1,26	386,40	378,60

^a (n= 20)

Tabela 15. Resultados referentes à uniformidade de massa de cápsulas com extracto comercial e amido de milho

Formulações	Parâmetros ^a				
	Média (mg)	Desvio Padrão	CV (%)	Máximo (mg)	Mínimo (mg)
C2	250,51	4,13	3,99	197,50	179,40

^a (n= 20)

Tendo em conta que nas três formulações seleccionadas nenhuma das 20 unidades de cápsulas do mesmo lote pesadas difere da massa média encontrada em percentagem superior a 10%, pode afirmar-se que qualquer um destes lotes de cápsulas com *Uncaria tomentosa* está de acordo com aquilo que é definido para o ensaio da uniformidade de massa.

3.4.6.2. Uniformidade de teor

Habitualmente neste ensaio são tomadas aleatoriamente dez unidades das diferentes amostras, doseando-se individualmente a substância activa de cada uma delas, recorrendo a um método analítico apropriado. Tendo em conta que, este trabalho se debruçou em particular sobre um dos grupos de compostos que fazem parte da composição destes extractos de *Uncaria tomentosa*: as proantocianidinas, o ensaio da uniformidade de teor deveria fazer a quantificação deste grupo de taninos.

A preparação não satisfaz o ensaio se o teor individual de mais de três unidades se afastar dos limites de 85 e 115%, ou se uma, ou mais unidades se afastarem dos limites de 75 e 125% do mesmo valor.

A primeira e principal dificuldade para a concretização deste ensaio com as duas formulações contendo extracto liofilizado é a quantidade relativa extremamente elevada de extracto liofilizado exigida (1,5 g, dum lote inicial total de 8,344 g). Por esta razão optou-se por aplicar o ensaio apenas a quatro cápsulas, de cada formulação.

A segunda dificuldade relaciona-se com o facto do extracto comercial possuir apenas uma percentagem muito pequena de proantocianidinas (cerca de 1%), não fazendo sentido realizar um ensaio de uniformidade de teor baseado neste parâmetro. Seria necessário padronizar este extracto para outro tipo de compostos, realizando então o ensaio de uniformidade tendo como referência esses compostos.

Tendo em conta esta constatação optou-se por aplicar o ensaio apenas nas duas formulações em estudo contendo extracto liofilizado (A4 e B) realizando as leituras no espectrofotómetro Shimadzu UV-1603.

Utilizou-se o método da vanilina-ácido clorídrico descrito no capítulo II.

Os resultados referentes aos ensaios de uniformidade de teor encontram-se na Tabela 16.

Tabela 16. Resultados referentes à uniformidade de teor das formulações A4 e B

Formulações	Conc. teórica (mg /ml)	Conc, obtida (mg /ml)	Teor de catequina (%)
A4	10,638	9,131 ± 0,441	85,833
B	9,238	8,56 ± 0,229	92,660

(n=4)

Apesar das limitações verificadas na realização deste ensaio, pode concluir-se que a formulação do extracto liofilizado e excipientes satisfaz as exigências do ensaio de uniformidade de teor.

A formulação contendo a mistura da casca pulverizada e o extracto liofilizado encontra-se no limite daquilo que é aceitável em termos de conformidade com os ensaios de uniformidade de teor, satisfazendo ainda assim as exigências fixadas.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aquino R., Simone F. De e Pizza C., 1989. Plant metabolites. Structure and *in vitro* antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. *Journal of Natural Products* 4, 679-685.
- Baba S., Osakabe N., Natsume M., Muto Y., Takizawa T. e Terao J., 2001. *In Vivo* comparison of the bioavailability of (+)-Catechin, (-)-Epicatechin and their mixture in orally administered rats. *The Journal of Nutrition* 131, 2885-2289.
- Baba S., Osakabe N., Natsume M. e Terao J., 2002. Absorption and urinary excretion of procyanidin B2 [epicatechin-(4 β -8)-epicatechin] in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 1, 33, 142-148.
- Balestrieri F., Magri A. D., Magri A. L., Marini D. e Sachini A., 1996. Application of differential scanning calorimetry to the study of drug-excipient compatibility. *Thermochimica Acta* 285, 337-345.
- Barros C. B., 2002. Validação de Métodos Analíticos. *Biológico* 64, 175-177.
- Berkow R., Beers M. H. e Fletcher A. J., 1997. Manual Merck Saúde para a Família. Oceano Grupo Editorial e Merck.
- Bourke M., Hayes A., Doyle M. e McCarroll M., 2000. A comparison of regularly administered sustained release oral morphine with intramuscular morphine for control of postoperative pain. *Anesthesia and Analgesia* 90, 427-430.
- Canotilho J., Sousa A.T. e Cunha Pinto J., 1992. Análise térmica: interesse em tecnologia farmacêutica. *Revista Portuguesa de Farmácia* 42, 5-12.
- Clas, S.-D., Dalton C. R. e Hancock B. C., 1999. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. *Research Focus* 2, 311-320.
- Ermer J. e Ploss H. J., 2005. Validation in pharmaceutical analysis Part II: central importance of precision to establish acceptance criteria and for verifying and improving the quality of analytical data. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37, 859-870.
- European Pharmacopoeia, 5th edition, 2005. Council of Europe, Strasbourg. France.
- Farmacopeia Portuguesa VIII, 2005. Edição Oficial, Ministério da Saúde, Infarmed, Lisboa, volume I.
- Giron D., 1990. Thermal analysis in pharmaceutical routine analysis. *Acta Pharmaceutica Jugoslava* 40, 95-157.
- Gonçalves, C., Dinis, T. e Batista, M.T., 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.

- Gonthier, M.P., Donovan J. L., Texier O., Felgines C., Remesy C. e Scalbert A., 2003. Metabolism of dietary procyanidins in rats. *Free Radical Biology & Medicine* 35, 837-844.
- Green M. J., 1996. A practical guide to analytical method validation. *Analytical Chemistry* 68, 305A-309A.
- Harvey D., 2000. *Modern Analytical Chemistry*. McGrawHill.
- Heim K. E., Tagliaferro A. R. e Bobilya D. J., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- Heitzman, Mary E., Neto Catherine, C., Winiarz, Elizabeth, Vaisberg, Abraham J. e Hammond and Gerald B., 2005. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria (Rubiaceae)*. *Phytochemistry* 66, 5-29.
- Holt R. R., Lazarus S. A., Sullards M. C., Zhu Q. Y., Schramm D. D., Hammerstone J. F., Fraga C. G., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2002. Procyanidin dimer B2 (epicatechin-(4 β -8)-epicatechin) in human plasma after the consumption of a flavanol-rich cocoa. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 798-804.
- International Conference on Harmonization (ICH), 1995. Validation of Analytical procedures: methodology, Q2B (CPMP/ICH/281/95).
- Keen C.L., Holt R.R., Oteiza P.I., Fraga C.G. e Schmitz H.H., 2005. Cocoa antioxidants and cardiovascular health. *American Journal of Clinical Nutrition* 81, 298S-303S.
- Kwit N. T., 1963 Oral sustained-release medications. *The American Journal of Nursing* 63, 74-76.
- Lamuela-Raventós R. M., Roméro-Pérez A. I., Andrés-Lacueva C. e Tornero A., 2005. Review: Health effects of cocoa flavonoids. *Food Science and Technology International* 11, 159-176.
- Lauro M. R., Torre M. L., Maggi L., De Simone F., Conte U. e Aquino R., 2001. Tablet formulation for the fast and sustained-release of flavonoids: naringin and naringenin. *S.T.P. Pharma Sciences* 11, 265-269.
- Lauro M. R., Torre M. L., Maggi L., De Simone F., Conte U. e Aquino R., 2002. Fast and slow release tablets for oral administration of flavonoids: rutin and quercetin. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 28, 371-379.
- Manadas R., Pina M. E. e Veiga F., 2002. A dissolução in vitro na previsão da absorção oral de fármacos em formas farmacêuticas de liberação modificada. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas* 38, 375-399.
- Miller T.A. e York P., 1985. Physical and chemicals characteristics of some high purity magnesium stearate and palmitate powders. *International Journal of Pharmaceutics* 23, 55-67.

- Mur E., Hartig F., Eibl G. e Schirmer M., April 2002. Randomized double blind trial of an extract from the pentacyclic alkaloid-chemotype of *Uncaria tomentosa* for the treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology* 29, 656-658.
- Mura P., Faucci M. T., Manderioli A., Bramanti G., e Ceccarelli L., 1998. Compatibility study between ibuprofen and pharmaceutical excipients using differential scanning calorimetry, hot-stage microscopy and scanning electron microscopy. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18, 151-163.
- Murkherjee P. e Verpoort R., 2003. GMP for Botanicals. Regulatory and Quality Issues on Phytomedicines. Business Horizons Pharmaceutical Publishers.
- Palma S., Luján C., Llabot J. M., Barboza G., Manzo R. H. e Allemandi D. A., 2002. Design of *Peumus boldus* tablets by direct compression using a novel dry plant extract. *International Journal of Pharmaceutics* 233, 191-198.
- Pilarski R., Zielinski H., Ciesiolka D. e Gulewicz K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 18-23.
- Pourrat A., Renoux R. e Jean D., 1978. Formulation de comprimés à base de citroflavonoïdes. Contrôles et étude de la conservation. *Annales pharmaceutiques françaises* 36, 253-262.
- Prista L. N., Alves A. C. e Morgado R., 1995. Tecnologia Farmacêutica, I Volume, 5ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian. Lisboa.
- Rein D., Lotito S., Holt R. R., Keen C. L., Schmitz H. H., e Fraga C. G., 2000b. Epicatechin in human plasma: *in vivo* determination and effect of chocolate consumption on plasma oxidation status. *Journal of Nutrition* 130, 2109S-2114S.
- Rios L., Lazarus S. A., Rémésy C., Scalbert A., e Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1106-1110.
- Rowe R., Sheskey, P. e Owen S., 2006. Handbook of Pharmaceutical Excipients, Fifth Edition. Pharmaceutical Press. London. UK. Chicago. USA.
- Sandoval M., Charbonnet R. M., Okuhama N. N., Roberts J., Krenova Z., Trentacosti A. M. e Miller M. J. S., 2000. Cat's claw inhibits TNF- α production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. *Free Radical Biology and Medicine* 29, 71-78.
- Santos, Helton, M.M., 2005. Desenvolvimento e avaliação biofarmacêutica de pellets matriciais de libertação prolongada. Dissertação de candidatura ao grau de doutor apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.
- Scalbert, A. e Williamson, G., 2000. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of Nutrition*, 2073S-2085S.
- Sheng Y., Bryngelsson, C. e Pero, R., 2000a. Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-Med-100™, a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. *Journal of Ethnopharmacology* 69, 115-26.

- Spencer J.P., Chaudry F., Pannala A. S., Srai S. K., Debnam E. e Rice Evans C., 2000. Decomposition of cocoa procyanidins in the gastric milieu. *Biochemical and Biophysical-Research-Communication* 27, 236-241.
- Tagliatoli V., Bilia A. R., Mazzi G., Mercati V. e Vicieri F. F., 2001. Evaluation of the dissolution behaviour of some commercial herbal drugs and their preparations. *Pharmazie* 56, 868-870.
- USP 30 NF 25, 2007. The United States Pharmacopoeia 30th edition. The National Formulary 25th, Rockville: United States Pharmacopoeial Convention, Inc.
- Van Dooren, A.A., 1983. Design for Drug-excipient interaction studies. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 9, 43-55.
- Van Ooteghem M., 1966. The division of powders into cachets and gelatin capsules. *Journal de Pharmacie de Belgique* 21, 73-85.
- Verma R. K. e Garg S., 2005. Selection of excipients for extended release formulations of glipizide through drug-excipient compatibility testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 38, 633-644.
- Wang J. F., Schramm D. D., Holt R. R., Ensunsa J. L., Fraga C. G., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2000. A dose-response effect from chocolate consumption on plasma epicatechin and oxidative damage. *Journal of Nutrition* 130, 2115S-2119S.
- Winfield A. J. e Richards R. M. E., 2003. *Pharmaceutical practice*. Elsevier Health Sciences.

Capítulo IV

Estudo da actividade antioxidante das formas farmacêuticas
desenvolvidas e de outras comercializadas
– uma aproximação ao seu comportamento *in vivo*

4. INTRODUÇÃO

Sabe-se que os antioxidantes assumem um papel significativo na prevenção de um grande número de doenças (Sandoval *et al.*, 2002). Diversos estudos têm vindo a atribuir importante actividade antioxidante aos extractos aquosos, etanólicos ou metanólicos da *Uncaria tomentosa* (Desmarchelier *et al.*, 1997; Pilarski *et al.*, 2006), estando essa actividade supostamente associada à presença de proantocianidinas (Gonçalves *et al.*, 2005).

Ao pretender fazer-se um estudo comparativo para a eficácia antioxidante das formas farmacêuticas de *Uncaria tomentosa* desenvolvidas neste trabalho com outras existentes no mercado, procedeu-se à monitorização desta actividade *in vitro*, antes e após exposição ao suco gástrico artificial.

Com este objectivo, tomaram-se em atenção os resultados previamente obtidos, em particular os dados da análise quantitativa de 3-flavanóis, obtidos pelo método da vanilina-ácido clorídrico, os resultados da actividade antioxidante inferidos pelo método do DPPH e os perfis de dissolução das formas farmacêuticas ensaiadas.

4.1. MATERIAIS

Utilizaram-se cápsulas com extracto liofilizado (formulação A4 e B), com extracto comercial (formulação C2) e de uncária Naturmil. Todas as amostras analisadas correspondem à planta *Uncaria tomentosa*, tendo sido descritas anteriormente nos Capítulos II e III. Recorreram-se ainda aos seguintes reagentes: acetona (lote K37426814 726) e tolueno (lote K18213575), ambos da Merck, Alemanha; ácido sulfúrico (lote 0151210002), da J.T.Baxter.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. OPTIMIZAÇÃO DO ENSAIO PARA AVALIAR A ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE, EM AMOSTRAS SUJEITAS À ACÇÃO DO SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL

O método do DPPH é rápido, simples, sensível e reprodutível e não requer equipamentos especiais. No entanto, o pH precisa estar compreendido entre 5,0 a 6,5, pois, só nesse intervalo, a absorção a 517 nm é independente do pH. Para garantir resultados óptimos utiliza-se a solução tampão acetato (Blois M., 1958).

Protocolo experimental

Utilizou-se uma solução de DPPH a 500 µM em metanol e uma solução de tampão acetato, com pH 6,5. Este valor de pH resultou de uma optimização do método visando a não interferência do pH do suco gástrico artificial na redução do DPPH.

Para a preparação do controlo colocou-se 1 ml de tampão acetato pH 6,5, 1,4 ml de MeOH, 100 µl de suco gástrico artificial e 0,5 ml de DPPH, num tubo de ensaio protegido por papel de alumínio. Agitou-se vigorosamente a mistura durante 30 segundos e fez-se a leitura a 517 nm, contra um branco (preparado com 1 ml de tampão, 1,9 ml de MeOH e 100 µl de suco gástrico artificial).

Para a realização do ensaio colocou-se 1 ml de tampão, 1,4 ml de MeOH, 0,1 ml de amostra em suco gástrico artificial e 0,5 ml de DPPH, num tubo de ensaio protegido por papel de alumínio. Agitou-se vigorosamente a mistura durante 30 segundos e fez-se a leitura a 517 nm, contra um branco (preparado com 1 ml de tampão, 1,9 ml de MeOH e 0,1 ml de suco gástrico artificial).

O registo da variação da absorvância a 517 nm, foi feito 10 minutos após a adição do DPPH.

Cápsulas de *Uncaria tomentosa* em estudo (formulações A4, B, C2 e uncária Naturmil®) foram colocadas nas mesmas condições do ensaio de dissolução, ou seja, em 700 ml de suco gástrico artificial, a 37 °C, sob agitação.

Alíquotas das amostras (100 µl) foram recolhidas, em intervalos de tempo definidos: a primeira no tempo zero, logo que a cápsula é colocada em suco gástrico e as seguintes, com intervalos de 20 minutos. A última recolha foi efectuada aos

100 minutos, altura em que todas as formulações em estudo atingiram a estabilidade nos perfis de dissolução. Foram efectuados três ensaios pelo método do DPPH optimizado, para cada formulação desenvolvida, ou em estudo, com medições da absorvância em duplicado.

A partir dos valores de absorvância obtidos determinou-se a percentagem de redução do DPPH, calculada a partir da diferença entre a absorvância dos ensaios e a absorvância dos controlos.

4.2.2. ESTUDO DO COMPORTAMENTO DAS PROANTOCIANIDINAS, EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL

Com o objectivo de se verificar as alterações eventualmente sofridas pelos compostos fenólicos do extracto liofilizado e da sua mistura com a casca pulverizada, pela acção do suco gástrico artificial, recorreu-se a um ensaio *in vitro*. A dissociação dos compostos fenólicos foi monitorizada por recurso a um sistema cromatográfico em camada fina (CCF), segundo Escribano-Bailón e colaboradores (1992), com algumas modificações, o qual permite correlacionar os valores de R_f com o grau de polimerização das proantocianidinas.

Protocolo experimental

Tendo por base as formulações seleccionadas (A4 e B), de acordo com os perfis de dissolução e os resultados da calorimetria diferencial de varrimento, prepararam-se cápsulas de composição proporcional (A5 e B5), cuja composição se encontra resumida na Tabela 17.

Cada cápsula foi colocada em 70 ml de suco gástrico artificial, a 37°C, sob agitação (em agitador com termóstato Yellowline MSC basic C). Retiraram-se duas aliquotas de 20 ml; uma aos 20 minutos (quando, de acordo com os resultados obtidos nos perfis de dissolução a libertação já se encontrava dentro dos critérios estabelecidos para as formas de libertação convencional e outra aos 100 minutos (quando se atingiu a estabilidade nos perfis de dissolução de ambas as formulações) (secção 3.4.5.2.).

Tabela 17. Composição das cápsulas contendo extracto liofilizado

Componentes	Formulação (mg)			
	A4	A5	B	B1
Extracto liofilizado	100,00	10,00	50,00	5,00
Lactose monohidratada	33,30	3,33	-	-
Amido de milho	16,66	1,66	-	-
Celulose micro-cristalina	16,66	1,66	-	-
Casca pulverizada	-	-	336,70	33,67
Extracto liofilizado em cada aliquota de 20 ml (mg/ml)	-	2,86	-	1,43
Casca pulverizada em cada aliquota de 20 ml /mg/ml)	-	-	-	9,62

As alíquotas de 20 ml foram aplicadas em cartuchos Sep-Pak (C-18 Cartridges for Solid-Phase Extraction, Waters), activados com 5 ml de H₂O Milli-Q e 5 ml MeOH LiChrosolv. O ácido clorídrico foi eliminado por lavagens com água, até pH aproximadamente neutro, para parar eventuais reacções hidrolíticas, seguido de eluição dos compostos fenólicos retidos no cartucho com MeOH 50% (6 ml) e MeOH (6 ml). A eluição total dos compostos fenólicos foi monitorizada com uma solução aquosa de NaOH, a 20%.

Todas as amostras preparadas foram centrifugadas (centrifugadora Sigma 3K10) a 4000 rotações, durante 20 minutos. O sobrenadante foi filtrado sob-vácuo e concentrado à secura em evaporador rotativo, a cerca de 37 °C. O resíduo foi retomado em 1 ml de metanol. As amostras foram microfiltradas e denominadas de A₂₀ e A₁₀₀, quando correspondiam ao extracto liofilizado e excipientes (formulação A5) e de B₂₀ e B₁₀₀, quando correspondiam à mistura do extracto com a sua casca pulverizada (formulação B1), respectivamente após 20 e 100 minutos, sob acção do suco gástrico artificial.

Para a análise cromatográfica das amostras sujeitas à acção do suco gástrico utilizaram-se placas pré-revestidas de gel de sílica 60F254, da Merck.

Foram preparadas também duas amostras com extracto liofilizado (2,89 mg/ml) e mistura de extracto liofilizado com a casca pulverizada (1,46 mg + 10,49 mg/ml,

respectivamente) em concentrações equivalentes, às anteriores, mas solubilizadas em metanol a 50%. Foram designadas por L e M, respectivamente.

Tendo por base o anteriormente exposto foram aplicadas, 50 µl de cada amostra e 20 µl de solução padrão de catequina, que se utilizou como referência.

A placa foi desenvolvida com a mistura de tolueno-acetona-ácido acético (3:7,5:1), a 15 cm de altura.

Após a eliminação da fase móvel procedeu-se à revelação, observando a placa à luz ultra-violeta, a 254 e 366 nm.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1. ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE DE FORMAS FARMACÊUTICAS DE UNCÁRIA, SUJEITAS À ACÇÃO DO SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL

Ao modificar o solvente das amostras, que passou a ser suco gástrico artificial e não MeOH a 50%, registou-se a alteração do pH do meio de 6,0 para 5,0, com a adição da amostra (100 µl). A influência do pH do meio reaccional foi bem patente, logo para o controlo do DPPH (Tabela 18), notando-se um acréscimo da absorção, com a diminuição do pH.

Ensaio utilizando o extracto liofilizado, em suco gástrico determinaram os valores de IC₅₀, expressos em massa seca, correspondentes aproximadamente ao dobro do esperado (cerca de 15.96 µg de extracto liofilizado/ml, em vez dos 7,34 µg de extracto liofilizado/ml para a amostra solubilizada em MeOH a 50% (Capítulo II)

Estes resultados revelaram que existe também para as amostras uma significativa influência da presença do suco gástrico artificial, no meio da reacção. Tendo em conta que a reacção deve ocorrer a pH≈5,5-6,0 (Blois M., 1958) ensaiaram-se soluções de tampão acetato com pHs superiores, tendo-se verificado que o pH 6,5 não alterava os resultados, quando reportados a amostras solubilizadas em MeOH a 50%.

Tabela 18. Absorvâncias obtidas no ensaio preliminar para o controlo do DPPH, na ausência e na presença de 100 µl de suco gástrico artificial

	Absorvância a 517 nm
Ensaio de controlo do DPPH, em presença de 100 µl de MeOH 50%	1,18
	1,09
	1,12
Ensaio de controlo do DPPH, na presença de 100 µl de suco gástrico	1,77
	1,44
	1,70

Outra limitação que podia ocorrer na aplicação deste método à determinação da actividade antioxidante *in vitro* das formulações com *Uncaria tomentosa* sujeitas à acção do suco gástrico artificial, seria a falta de sensibilidade deste método para ser aplicado às concentrações dos antioxidantes previsivelmente presentes nos ensaios de dissolução.

Com o objectivo de verificar a sensibilidade deste teste, colocou-se em suco gástrico, a 37 °C, sob agitação uma cápsula contendo extracto liofilizado e excipientes, em concentrações equivalentes às dos ensaios de dissolução. Os resultados obtidos (Tabela 19) confirmaram a viabilidade de utilização do teste do DPPH modificado para a determinação da actividade antioxidante das formulações em estudo, *in vitro*.

Foi ainda realizado um ensaio de verificação da estabilidade da catequina, em suco gástrico artificial (Tabela 20).

Os dados obtidos ilustram a estabilidade da actividade antioxidante da catequina em suco gástrico, o que corrobora resultados de Yoshino e colaboradores (1999) e valida a utilização do método optimizado para o estudo *in vitro* que nos propusemos realizar.

Tabela 19. Sensibilidade do método do DPPH otimizado, para a determinação da actividade antioxidante de extracto liofilizado, em suco gástrico artificial

Tempo (min.)	Controlo	Ensaio ^a	% Redução do DPPH
t ₀	1,04	1,01 ± 0,00	3,87 ± 0,03
15	–	0,77 ± 0,08	24,42 ± 3,92
30	–	0,79 ± 0,00	22,66 ± 0,03
45	–	0,79 ± 0,03	23,00 ± 1,60
60	0,99	0,78 ± 0,01	25,22 ± 0,64
90	–	0,78 ± 0,06	25,12 ± 3,14

^a média ± desvio padrão de dois ensaios realizados com cápsulas contendo a formulação A5, em 70 ml de suco gástrico artificial

Tabela 20. Actividade antioxidante da catequina em suco gástrico artificial, ao longo do tempo

Tempo (min.)	Absorvância do controlo a 517 nm	Absorvância do ensaio a 517 nm	% Redução do DPPH
t ₀	1,03	1,04 ± 0,01	1,14 ± 1,23
20	1,02	0,81 ± 0,05	19,97 ± 4,46
40	1,04	0,82 ± 0,00	21,70 ± 0,40
60	1,04	0,81 ± 0,01	22,81 ± 1,10
80	1,03	0,81 ± 0,01	21,45 ± 0,66
100	1,04	0,82 ± 0,01	21,73 ± 1,12

Simulação dos ensaios de dissolução (n=2) de 26,53 mg catequina em 70 ml de suco gástrico artificial, a 37 °C, sob agitação

4.3.2. DETERMINAÇÃO DA ACTIVIDADE ANTIOXIDANTE, PELO MÉTODO DO DPPH OPTIMIZADO PARA FORMAS FARMACÊUTICAS EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL

Utilizou-se o protocolo experimental de determinação da actividade antioxidante, optimizado para amostras solubilizadas em suco gástrico artificial.

Nos ensaios com extracto liofilizado (100 mg) verificou-se uma redução do DPPH que se mostrou máxima ao fim de 40 minutos (Tabela 21). A percentagem de redução permaneceu relativamente estável ao longo do tempo ensaiado, após os 20 minutos, altura em que, segundo o perfil de dissolução obtido (Fig. 63), mais de 80% do fármaco estava libertado e os 100 minutos, quando se atinge a estabilidade no perfil de dissolução.

Tabela 21. Redução do DPPH, com cápsulas de 100 mg de extracto liofilizado

Tempo (min.)	Absorvância do Controlo a 517 nm ^a	Absorvância do Ensaio a 517nm ^a	% Redução
t ₀	1,06 ± 0,03	1,06 ± 0,03	-0,02
20	1,08 ± 0,02	0,92 ± 0,03	14,99
40	1,09 ± 0,02	0,90 ± 0,04	17,26
60	1,12 ± 0,02	0,92 ± 0,03	17,25
80	1,10 ± 0,00	0,92 ± 0,02	16,50
100	1,07 ± 0,06	0,91 ± 0,01	15,19

^a média ± desvio padrão (n=3, nos ensaios de controlo) e (n=6, nos ensaios). Resultados obtidos com cápsulas contendo a formulação A4

Conforme se pode deduzir a partir da análise dos resultados da Tabela 22, existe uma importante redução do DPPH para a forma farmacêutica constituída pela mistura do extracto liofilizado com a casca pulverizada, atingindo o seu valor máximo aos 20 minutos. Esta redução foi obtida com 4,6 µg/ml de extracto liofilizado (ou 32,05 µg de casca pulverizada seca) em suco gástrico artificial, que corresponde a um teor de 3-flavonóis de 468 ng/ml.

No entanto, ao contrário do ensaio anterior a percentagem de redução é significativamente diferente ao longo do tempo. Segundo o perfil de dissolução (Fig. 63), esta formulação foi de desagregação muito rápida, tendo aos 20 minutos libertado a totalidade prevista da substância activa, expressa em catequina, embora a estabilidade do perfil de dissolução só se tenha obtido por volta dos 60 minutos.

Tabela 22. Redução do DPPH, pela acção antioxidante de cápsulas contendo a mistura do extracto liofilizado com a casca pulverizada.

Tempo (min.)	Absorvância do Controlo a 517 nm ^a	Absorvância do Ensaio a 517nm ^a	% Redução
t ₀	1,04 ± 0,03	0,98 ± 0,04	6,21
20	1,04 ± 0,04	0,72 ± 0,11	30,94
40	1,02 ± 0,04	0,78 ± 0,12	23,63
60	1,07 ± 0,07	0,88 ± 0,07	17,20
80	1,06 ± 0,05	0,93 ± 0,04	11,99
100	1,07 ± 0,08	0,91 ± 0,08	14,53

^a média ± desvio padrão (n=3, nos ensaios de controlo) e (n=6, nos ensaios). Resultados obtidos com cápsulas contendo a formulação B

Durante o processo de validação do método de dosagem da catequina em suco gástrico artificial (secção 3.4.4.1.) foi efectuado um ensaio com a catequina, constatando-se que a absorvância se mantinha estável ao longo do tempo (quatro horas). Estes resultados corroboram estudos obtidos por outros autores. No entanto, num ensaio *in vitro*, com procianidinas do cacau, incubadas em suco gástrico artificial (pH 2), durante 1-3,5 horas verificou-se a sua passagem a monómeros e trímeros (Spencer *et al.*, 2000). Num outro estudo, também com as procianidinas do chocolate já se constatou a sua estabilidade ao nível gástrico, no homem. A discrepância de resultados pode ser explicada segundo os autores, pelo efeito tampão de outros alimentos presentes na dieta humana, que aumentam o valor do pH para valores que não possibilitam a hidrólise das proantocianidinas, e também pela curta exposição às condições de acidez, inferior a 50 minutos (Rios *et al.*, 2002). Por isso, só em condições de pH no estômago suficientemente baixas pode ocorrer uma rápida clivagem das procianidinas (Spencer, 2003). É isso o que provavelmente sucede nos estudos *in vitro* realizados neste trabalho.

Uma explicação possível para a diminuição da percentagem de redução do DPPH, que se começa a fazer sentir a partir dos 40 minutos e é ainda mais acentuada aos 60 minutos, tendendo depois para uma certa estabilidade, pode residir precisamente na degradação, das proantocinidinas presentes, a monómeros e trímeros, dado que vários estudos indicam que a actividade antioxidante dos oligómeros das procianidinas é superior à dos seus monómeros (Arteel and Sies, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Lotito *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004). Esta hipótese poderá ser verificada, conhecendo o grau de polimerização das proantocianidinas da casca pulverizada e extracto liofilizado, ao longo do tempo, em suco gástrico.

Conforme se pode inferir a partir da análise dos resultados da Tabela 23, existe apenas uma pequena percentagem de redução do DPPH, por acção do extracto comercial. Estes resultados eram previsíveis tendo em conta a pequena percentagem de proantocianidinas presentes neste extracto (apenas 1,22% de proantocinidinas, expressas em catequina, uma quantidade cerca de dez vezes inferior à do extracto liofilizado (10,64%). Também os valores de IC₅₀ obtidos para o extracto comercial (59,21 µg/ml) é cerca de nove vezes superior à do extracto liofilizado (7,34 µg/ml). A percentagem de redução embora pequena foi relativamente estável ao longo do tempo.

Tabela 23. Redução do DPPH pela acção de cápsulas com 150 mg de extracto comercial

Tempo (min.)	Absorvância do Controlo a 517 nm ^a	Absorvância do Ensaio a 517nm ^a	% Redução
t ₀	1,04 ± 0,03	1,02 ± 0,01	1,68
20	1,02 ± 0,02	1,00 ± 0,02	2,25
40	1,03 ± 0,03	1,00 ± 0,01	3,02
60	1,03 ± 0,01	1,00 ± 0,01	2,20
80	1,08 ± 0,04	1,00 ± 0,02	7,20
100	1,04 ± 0,01	1,01 ± 0,01	3,02

^a média ± desvio padrão (n=3, nos ensaios de controlo e n=6, nos ensaios). Resultados obtidos com cápsulas contendo a formulação C2

Finalmente, efectuaram-se ensaios com as cápsulas contendo uncária Naturmil™. Conforme ilustra a Tabela 24, existe apenas uma maior redução do DPPH ao fim de 20 minutos. Esta redução foi idêntica à do extracto liofilizado, dele diferindo pelo decréscimo registado aos 60 minutos. Um perfil idêntico foi verificado com a mistura extracto liofilizado/casca pulverizada.

Tabela 24. Redução do DPPH pela acção de cápsulas de uncária Naturmil™.

Tempo (min.)	Absorvância do Controlo a 517 nm ^a	Absorvância do Ensaio a 517nm ^a	% Redução
t ₀	1,04 ± 0,04	1,03 ± 0,05	1,78
20	1,05 ± 0,06	0,90 ± 0,11	13,76
40	1,01 ± 0,02	0,95 ± 0,07	6,02
60	1,01 ± 0,03	0,94 ± 0,07	6,83
80	1,01 ± 0,01	0,94 ± 0,02	6,72
100	1,01 ± 0,03	0,94 ± 0,02	7,52

^a média ± desvio padrão de três determinações (nos ensaios de controlo) e seis determinações nos ensaios com amostras. Resultados obtidos com 500 mg de uncária Naturmil®

4.3.3. ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO GRAU DE POLIMERIZAÇÃO DAS PROANTOCIANIDINAS, AO LONGO DO TEMPO, EM SUCO GÁSTRICO ARTIFICIAL

Para o estudo do comportamento das proantocianidinas presentes nas formulações desenvolvidas, submetidas a suco gástrico artificial, sob agitação, ao longo do tempo, recorreu-se à cromatografia de camada fina (CCF). Neste sistema, a migração dos compostos depende da sua massa molecular. Desta forma, é possível inferir sobre o grau de polimerização das proantocianidinas presentes nas amostras, o qual varia numa razão inversa com os valores de R_f (Escribano-Bailón *et al.*, 1992).

Os perfis cromatográficos por CCF sob acção da luz ultra-violeta a 254 e 366 nm estão representados na Figura 66.

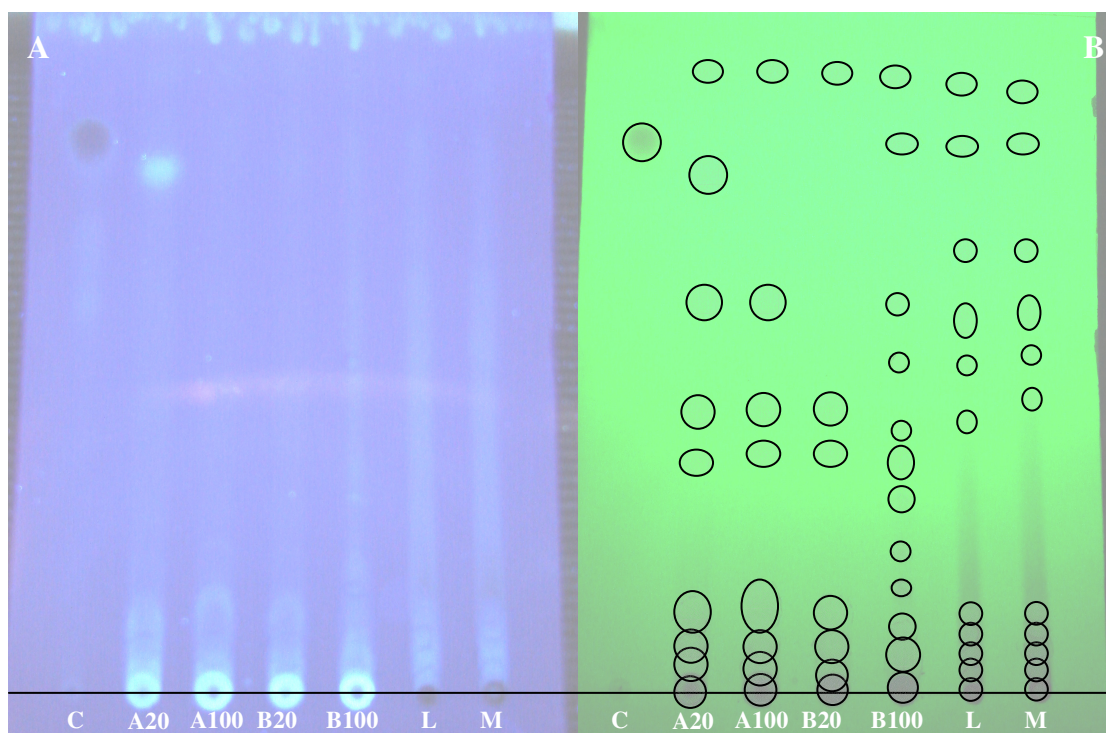


Figura 66. Perfis cromatográficos, por CCF, sob acção da luz ultra-violeta a 366 nm (A) e a 254 nm (B),

Resultados obtidos após eluição com tolueno-acetona-ácido acético e secagem da placa. C – padrão da catequina; A20 e A100 – extracto liofilizado e excipientes; B20 e B100 - mistura da casca e seu extracto liofilizado, respectivamente após 20 minutos e 100 minutos, em suco gástrico artificial; L - extracto liofilizado e M - mistura da casca com o seu extracto liofilizado, solubilizados ambos em MeOH a 50%

Da observação aos UV foi evidente a 366 nm a coloração esverdeada, correspondente à catequina (C). Neste comprimento de onda, registaram-se também várias manchas azuis claras fluorescentes, com R_f muito baixos, próximas do ponto de aplicação das amostras A₂₀, A₁₀₀, B₂₀ e B₁₀₀, com comportamento característico dos flavonóides (Wagner *et al.*, 1984). A amostra L₂₀ apresentou um composto de R_f elevado (0,93), se reportado à catequina e que poderá corresponder ao ácido cafeico.

As amostras L e M apresentaram uma série de manchas que começaram amarelas (próximo do ponto de aplicação da amostra e pouco a pouco se tornaram violeta fluorescentes, cores que também correspondem a diferentes flavonóides.

Em todas as amostras em estudo predominaram sobretudo manchas de R_f bastante baixo, próximos do ponto de aplicação, o que significa que estão maioritariamente presentes polímeros de 3-flavanóis.

No entanto, o perfil cromatográfico na parte média e superior do cromatograma é significativamente diferente entre o B₂₀ e B₁₀₀. De facto, em B₂₀ foram detectadas

maioritariamente proantocianidinas correspondentes a hexâmeros e heptâmeros, encontrando-se ausentes proantocianidinas de menor grau de polimerização. Atendendo a que o aumento do tempo de permanência no suco gástrico pode levar a um acréscimo na despolimerização das proantocianidinas, pode-se inferir que esta ocorrência pode estar na base da redução da actividade antioxidante verificada aos 100 minutos (Tabela 22). Estes resultados parecem suportar a hipótese de que os oligómeros superiores de proantocianidinas apresentam maior actividade antioxidante do que os seus monómeros e proantocianidinas de baixo grau de polimerização tal como foi sugerido por outros investigadores (Arteel e Sies, 1999; Takahashi *et al.*, 1999; Lotito *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2004).

4.4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arteel G.E. e Sies H., 1999. Protection against peroxynitrite by cocoa polyphenol oligomers. *FEBS Letters* 26, 167-170.
- Blois, M. S., 1958. Antioxidant Determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 4617, 26.
- Desmarchelier C., Mongelli E., Coussio J. e Ciccia G., 1997. Evaluation of the *in vitro* antioxidant activity in extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Phytotherapy Research* 11, 254-256.
- Escribano-Bailón T., Gutiérrez-Fernandes Y., Rivas-Gonzalo J. e Santos-Buelda C., 1992. Characterization of procyanidins of *Vitis vinifera* variety Tinta del País grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40, 1795-1799.
- Gonçalves, C., Dinis, T. e Batista, M.T., 2005. Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity. *Phytochemistry* 66, 89-98.
- Hu M., McClements D. J. e Decker E- A., 2004. Antioxidant activity of a proanthocyanidin-rich extract from grape seed in whey protein isolate stabilized algae oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52, 5272-5276.
- Lotito S. B., Actis-Goretta L., Renart M.L., Caligiuri M., Rein D., Schmitz H. H., Steinberg F. M., Keen C. L. e Fraga C. G., 2000. Influence of oligomer chain length on the antioxidant activity of procyanidins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276, 945-951.
- Pilarski R., Zielinski H., Ciesiolka D. e Gulewicz K., 2006. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *Journal of Ethnopharmacology* 104, 18-23.
- Rios L., Lazarus S. A., Révész C., Scalbert A., e Williamson, G., 2002. Cocoa procyanidins are stable during gastric transit in humans. *The American Journal of Clinical Nutrition* 76, 1106-1110.
- Sandoval, M., Okuhama N. N., Zhang X.-J., Condezo L. A., Lao J., Angeles F. M., Musah R. A., Bobrowski P. e Miller M. J. S., 2002. Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content. *Phytomedicine* 9, 325-337.
- Spencer. J.P., 2003. Metabolism of tea flavonoids in the gastrointestinal tract. *The Journal of Nutrition* 133, 3255S-3261S.
- Takahashi T., Kamiya T., Hasegawa A. e Yokoo Y., 1999. Procyanidin oligomers selectively and intensively promote proliferation of mouse hair epithelial cells *in vitro* and activate hair follicle growth *in vivo*. *The Journal of Investigative Dermatology* 112, 310-316.

Wagner H., Bladt S., e Zgainski E. N., 1984. *Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas* (Translated by A. Scott). Springer Verlag. Berlin, Hidelberg, New York, Tokio..

Yoshino K., Suzuki M., Sasaki K., Miyase T. e Sano M., 1999. Formation of antioxidants from (-)-epigallocatechin gallate in mild alkaline fluids, such as authentic intestinal juice and mouse plasma. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 10, 223-229.

Zhu Q. Y., Hammerstone J. J., Jazarus S. A., Schmitz H. H. e Keen C. L., 2003. Stabilizing effect of ascorbic acid on flavan-3-ols and dimeric procyanidins from cocoa. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 828-833.

Capítulo V

Discussão Geral

5.1 DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Um decocto de cascas do caule de *Uncaria tomentosa*, forma em que esta planta é mais comumente usada em medicina tradicional, mostrou apreciável actividade para a captação do radical DPPH, revelando significativa actividade antioxidante. Atendendo aos numerosos estudos que sugerem a importância dos antioxidantes na prevenção dos danos causados pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS), implicadas em numerosas doenças cardiovasculares, degenerativas e tumorais este extracto pode constituir um importante meio para minimizar muitas das patologias associadas às ROS.

O rastreio da actividade antioxidante realizado em diferentes extractos e cascas de *Uncaria tomentosa* que nos propusemos estudar foi proporcional à sua percentagem de 3-flavanóis mono- e poliméricos (proantocianidinas), determinada pelo método da vanilina-ácido clorídrico, tendo revelado maior actividade para o extracto liofilizado preparado no nosso laboratório. Estes resultados estão em concordância com estudos anteriores realizados.

São vários os estudos epidemiológicos, químicos e farmacológicos que comprovam a actividade farmacológica das proantocianidinas, relacionando o consumo de produtos que as possuem com a protecção contra o stresse oxidativo e seus efeitos, nomeadamente a ocorrência de tumores e aterosclerose. Tem vindo a ser também demonstrada a bioactividade de outras plantas medicinais com elevado conteúdo de proantocianidinas.

São raros os trabalhos de investigação que apliquem os princípios da Tecnologia Farmacêutica às plantas medicinais. No entanto, é cada vez mais consensual que as plantas medicinais e os seus extractos devem seguir regras oficiais semelhantes às das substâncias quimicamente definidas, no que concerne à qualidade, eficácia, estabilidade e segurança.

O desenvolvimento de formas farmacêuticas a partir de extractos facilita a administração e a adesão à terapêutica por parte do doente e aumenta a sua estabilidade. Isto é particularmente importante tendo em conta que a decocção de *Uncaria tomentosa* preparada de acordo com a medicina tradicional tem sabor amargo e é de precária conservação. Não só a actividade antioxidante diminui, como também constitui um bom meio para o desenvolvimento de fungos.

As cápsulas desenvolvidas neste trabalho contêm na sua composição uma dose de extracto liofilizado ou mistura desse extracto liofilizado com a casca pulverizada de *Uncaria tomentosa* sensivelmente equivalentes à toma de um decocto. Consequentemente, estas formas farmacêuticas integram não apenas um constituinte activo, mas sim uma mistura complexa de diversos compostos bioactivos.

No decurso do desenvolvimento das formas farmacêuticas foi patente a importância dos ensaios de compatibilidade dos constituintes químicos dos extractos e/ou das cascas da *Uncaria tomentosa*, com os excipientes. A utilização do DSC constituiu um importante contributo na selecção dos excipientes mais adequados.

As formas farmacêuticas seleccionadas obedecem aos parâmetros de controlo de qualidade propostos pela F.P. VIII para as cápsulas duras. Devem realçar-se os ensaios de simulação da passagem pelo estômago que exibiram perfis de dissolução que asseguraram em menos de 20 minutos a libertação *in vitro*, de mais de 85% dos seus constituintes activos monitorizados neste estudo, com base nos 3-flavanóis mono- e polimerizados (proantocianidinas).

Em suco gástrico artificial, as formas farmacêuticas contendo extracto liofilizado preparado laboratorialmente exibiram actividades antioxidantes, ao longo do tempo, superiores às restantes formulações.

A formulação que exibiu melhor actividade antioxidante foi a constituída pela mistura do extracto liofilizado com a casca de *Uncaria tomentosa*, particularmente quando não sujeita a períodos em suco gástrico artificial superiores a 20 minutos. A percentagem de redução do DPPH foi obtida com 4,6 µg/ml de extracto liofilizado, correspondente a um teor de 468 ng/ml de proantocianidinas, expresso em catequina. É também esta a formulação onde a libertação se dá de forma mais rápida, segundo o perfil de dissolução. Estes dados sugerem que é esta, de entre as formulações estudadas aquela onde a actividade antioxidante do extracto liofilizado foi maximizada.

No entanto, são necessárias precauções na extrapolação destes resultados obtidos *in vitro*, para o que sucede *in vivo*. Resultados de diversos estudos sugerem que apenas os monómeros e, em menor percentagem os dímeros e trímeros são absorvidos no intestino delgado.

A aplicação de aliquotas do extracto liofilizado e casca pulverizada, sujeitas a acção do suco gástrico artificial, durante 20 e 100 minutos em cromatografia em camada delgada sugeriu a passagem de parte das proantocianidinas aos seus oligómeros menos

polimerizados, na mistura casca pulverizada/ extracto. Estes resultados corroboram com resultados obtidos por outros autores *in vitro* onde decorre a passagem das proantocianidinas aos seus oligómeros menos polimerizados sob acção do suco gástrico artificial, em períodos superiores a 50 minutos.

No entanto, *in vivo* o tempo de permanência no estômago pode ser insuficiente para que ocorra esta despolimerização. Por outro lado, é importante ter em conta vários factores como a capacidade das proantocianidinas se ligarem às proteínas presentes nos alimentos e a capacidade dos próprios alimentos de tamponarem o pH intestinal, limitando a extensão oxidativa dos 3-flavanóis.

A extrapolação dos resultados obtidos para o que sucede *in vivo* é complexa, mas constitui um passo importante.

Concluindo, podemos afirmar que com a realização deste trabalho de investigação foi possível desenvolver e otimizar cápsulas para administração oral a partir do extracto da *Uncaria tomentosa*, com actividade antioxidante, de acordo com os objectivos propostos.

5.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma das características que marcou de forma profunda este trabalho foi a sua interdisciplinaridade. Duas áreas diferentes da Farmácia estiveram, desde o início envolvidas na investigação: a Tecnologia Farmacêutica e a Farmacognosia.

A aplicação de métodos e formas de trabalho comuns numa das áreas, mas pouco habituais na outra área, revelou-se um dos aspectos mais aliciantes deste trabalho, mas também um dos aspectos mais complexos. Embora complementares cada uma das áreas científicas de investigação tem uma cultura e uma linguagem própria que deriva do próprio objecto de estudo. Na pesquisa das actividades biológicas e na correlação dessas actividades com a natureza química do(s) composto(s) nelas envolvidos trabalha-se em escalas mais pequenas, com processos de extracção, fraccionamento e isolamento mais morosos que não permitem a obtenção, em fases iniciais de investigação, de grandes quantidades, nem a aplicação linear de todas as técnicas da Tecnologia Farmacêutica às plantas medicinais.

Apesar das óbvias vantagens e da importância que uma análise integrada pode proporcionar, existe um conjunto de desafios que terão que ser enfrentados para que se possa aprofundar esta relação de interdisciplinaridade. A urgência de uma legislação apropriada que estabeleça um compromisso entre a qualidade dos produtos fitoterápicos e as especificidades próprias da sua composição foi sentida como uma importante necessidade durante a execução deste trabalho.

O caminho seguido durante este trabalho é apenas um pequeno contributo. São imensas as possibilidades de investigação nesta área multidisciplinar.

Concretamente em relação à *Uncaria tomentosa* destacam-se algumas perspectivas de trabalho futuras, apenas possíveis pela aplicação de ambas as áreas da farmácia:

A utilização da técnica do DSC revelou interacção dos extractos de *Uncaria tomentosa* com o estearato de magnésio e, em menor grau com a lactose mono-hidratada e o amido glicolato de sódio. Apesar das dificuldades de aplicação de métodos de espectroscopia (Raman, infra-vermelhos), ou de cromatografia líquida de alta resolução a misturas complexas como a da *Uncaria tomentosa* e excipientes, poderia ser muito

interessante tentar-se a aplicação deste tipo de técnicas para se poder avançar na compreensão destes potenciais sinais de incompatibilidade.

Atendendo a que as cápsulas contendo a mistura de extracto liofilizado com a sua casca pulverizada se destacaram pelo seu óptimo perfil de dissolução e significativamente superior actividade antioxidante após 20 minutos em suco gástrico artificial seria interessante poder avaliar esta mistura em proporções casca/extracto liofilizado diferentes da ensaiada, de forma a poderem maximizar-se estas características.

A realização de ensaios de dissolução com as formulações desenvolvidas em suco entérico, bem como a avaliação da actividade antioxidante nestas condições constituiria uma melhor aproximação àquilo que ocorre *in vivo*.

Por outro lado, tendo em conta a escassez de estudos *in vivo* com a *Uncaria tomentosa* e a difícil transposição dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, seria muito interessante avaliar a biodisponibilidade das formas farmacêuticas desenvolvidas nos seres humanos, ou em animais, monitorizando a sua actividade antioxidante em todo o percurso do tracto gastro-intestinal até ao cólon, onde segundo alguns autores as proantocianidinas ainda podem actuar como antioxidantes, contribuindo para a protecção dos tecidos contra o stresse oxidativo, ao ter um efeito local no cólon, ou ao serem absorvidos.

Finalmente, parece também bastante promissor avaliar a possibilidade de sinergismo dos extractos aquosos de *Uncaria tomentosa*, de comprovada elevada anti-radicalar, com outros compostos antioxidantes, como a vitamina C, conforme é sugerido por diversos estudos.