

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Fracionamento e caracterização química da fração insolúvel em água de *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC e avaliação da potencial atividade antifúngica e de dano celular sobre espécies patogênicas de *Candida* spp.**

**Ânderson Ramos Carvalho**

**Porto Alegre, Junho de 2016.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Fracionamento e caracterização química da fração insolúvel em água de *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC e avaliação da potencial atividade antifúngica e de dano celular sobre espécies patogênicas de *Candida* spp.**

**Ânderson Ramos Carvalho**

**Orientador: Prof. Dr. George González Ortega**

**Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Meneghello Fuentefria**

**Porto Alegre, Junho de 2016.**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo  
que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) e Laboratório de Pesquisa em Micologia Aplicada (GPMA) na Faculdade de Farmácia da UFRGS.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Flóri Carvalho e Rejane Ramos Carvalho, pelo constante apoio, força e incentivo durante a graduação e na realização desse trabalho.

À minha irmã, Franceli, pelos conselhos e ajuda nos momentos mais difíceis.

À minha namorada, Lucélia, que soube entender o pouco tempo e como os prazos diminuem quando se está atarefado.

Ao meu orientador, Professor George González Ortega, pelo exemplo de profissional e por toda a ajuda concedida durante a minha graduação sempre preocupado com o meu maior aprendizado.

Aos meus colegas do Laboratório de Desenvolvimento Galênico (LDG) da Faculdade de Farmácia da UFRGS e a doutoranda Vanessa Zafaneli Bergamo pela colaboração prestada e todo o apoio para a realização do trabalho.

Esse trabalho foi redigido em formato de artigo, seguindo as normas para submissão de artigo da revista "Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences", disponíveis no Anexo 1.

**Fracionamento e caracterização química da fração insolúvel em água de *Uncaria tomentosa* (Wild.) DC e avaliação da potencial atividade antifúngica e de dano celular sobre espécies patogênicas de *Candida* spp.**

Ânderson Ramos Carvalho<sup>1</sup>, Vanessa Zaffaneli Bergamo<sup>2</sup>, Alexandre Meneghello Fuentefria<sup>2</sup>, George González Ortega<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup> - Laboratório de Desenvolvimento Galênico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> - Laboratório de Micologia Aplicada, Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

\* George G. Ortega, Faculdade de Farmácia, PPGCF, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga 2752, 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: ortega@farmacia.ufrgs.br

## RESUMO

*Uncaria tomentosa* (unha-de-gato) é uma videira de ampla distribuição nas florestas tropicais das Américas. Sua casca tem sido tradicionalmente usada pelos povos indígenas para distúrbios gástricos. Além disso, imunestimulante, antiviral, antitumoral e atividade antimicrobiana foram relatados e frequentemente atribuídas aos alcalóides, polifenóis, e glicosídeos ácidos quinóvicos que ocorrem nele. Este estudo tem como objetivo o fracionamento e posterior caracterização da casca aquosas frações insolúveis por meio de técnicas de FTIR e LC-DAD. As frações codificados FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP foram então testadas quanto à atividade antifúngica contra espécies patogênicas de *Candida* spp. pelo método de microdiluição em caldo. A concentração inibitória mínima (MIC) foi determinada de acordo com a M27-A3 2008 diretrizes CLSI, e dano celular pelo ensaio de MTT. Os perfis LC-DAD foram diferentes para as frações estudadas. A análise de FTIR mostrou grande interação entre PVPP e polifenóis. Os valores de MIC foram bastante semelhantes em relação às frações FUT1, FUT2 e FUT-PVPP (31,25 ug / ml). No entanto, foi inferior para FUT3 (62,50 ug / ml), e ainda não significativa para a FUT4 (250 ug / ml). Notável, a FUT1 foi a única de induzir dano celular significativa (44,52%), e, portanto, os resultados do ensaio de MIC divergiram frontalmente daqueles adquiridos após os MTT. Algumas evidências suportam a hipótese de viés contra a precisão do teste MTT, principalmente devido à absorção a 570-690 nm, que também é inerente aos compostos polifenólicos que ocorrem em frações de Unha de gato.

**Palavras-chave:** *Uncaria tomentosa*; unha-de-gato, antifúngico; polifenóis; frações aquosas; interação química.



## ABSTRACT

*Uncaria tomentosa* (cat's claw) is a vine widely disseminated in the American rainforests. Its stem bark has been traditionally used by indigenous peoples for gastric disorders. Also, immunostimulant, antiviral, antitumor, and antimicrobial activities were reported and frequently ascribed to the alkaloids, polyphenolics, and quinovic acid glycosides occurring in it. This study aims the fractioning and further characterization of the bark aqueous insoluble fractions by FTIR and LC-DAD techniques. The coded fractions FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 and FUT-PVPP were then assayed regarding the antifungal activity against pathogenic species of *Candida* spp. by microdilution broth method. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was assayed according to M27-A3 2008 CLSI guidelines, and cell damage by the MTT assay. The LC-DAD profiles were different for the studied fractions. The FTIR analysis showed great interaction between PVPP and polyphenols. MIC values were quite similar regarding the fractions FUT1, FUT2, and FUT-PVPP (31.25 ug / ml). Yet, it was lower for FUT3 (62.50 ug / ml), and even nonsignificant as in FUT4 (250 ug / ml). Noteworthy, only FUT1 fraction was able to induce significant cell damage (44.52%), and, therefore, the results from MICT assay diverged frontally from those gained after the MTT ones. Some evidence supports the hypothesis of bias against the MTT test accuracy, mostly due to the absorption at 570 to 690 nm, which is also inherent to polyphenolic compounds occurring in the cat's claw fractions.

Keywords: *Uncaria tomentosa*; cat's claw; antifungal; polyphenols; aqueous fractions; chemical interaction.

## INTRODUÇÃO

*Uncaria tomentosa* (Wild.) DC (Rubiaceae), conhecida como Unha de gato ou Cat's Claw, é uma liana cuja casca encontra uso amplo e milenar na medicina popular de diversos povos indígenas da América Latina. Na medicina tradicional peruana, *Uncaria tomentosa* (UT) é utilizada, principalmente, para o tratamento de desordens gástricas. Todavia, pesquisas recentes mostraram que diferentes partes e formas extrativas também possuem atividade antiartrítica (Castilhos *et al.* 2015), antimutagênica (Rizzi *et al.* 1993) antiinflamatória (Aguilar *et al.* 2002), assim como antiviral e imunomoduladora para Dengue (Reis *et al.* 2008), anti-herpética (De Souza e Cimerman, 2010) anticancerígena para células de bexiga (Dietrich *et al.* 2014). Várias dessas atividades foram atribuídas aos alcaloides tetra e pentacíclicos, contudo, também ácidos fenólicos, ácidos quinóicos, proantocianidinas, di-terpenos, taninos e flavonoides constam entre as substâncias bioativas da espécie (Pilarski *et al.* 2006).

Nesse contexto, cabe destacar a riqueza em polifenóis na espécie utilizada, que inclui um total de 32 compostos identificados até o momento. As diferentes famílias de compostos fica evidenciadas na figura 1 e 2 entre esses compostos constam: ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos, monômeros de flavan-3-óis (+)-catequina e (-)-epicatequina, dímeros de procianidina (B1, B2, B3, B4, B5, B7 e outros dois compostos de estrutura desconhecida) e trímeros de procianidina (C1, T2 e uma de estrutura desconhecida), flavalignanas (quatro estruturas desconhecidas pertencente a família de cinchonas) e dímeros de pelargonidina (Navarro *et al.* 2015).

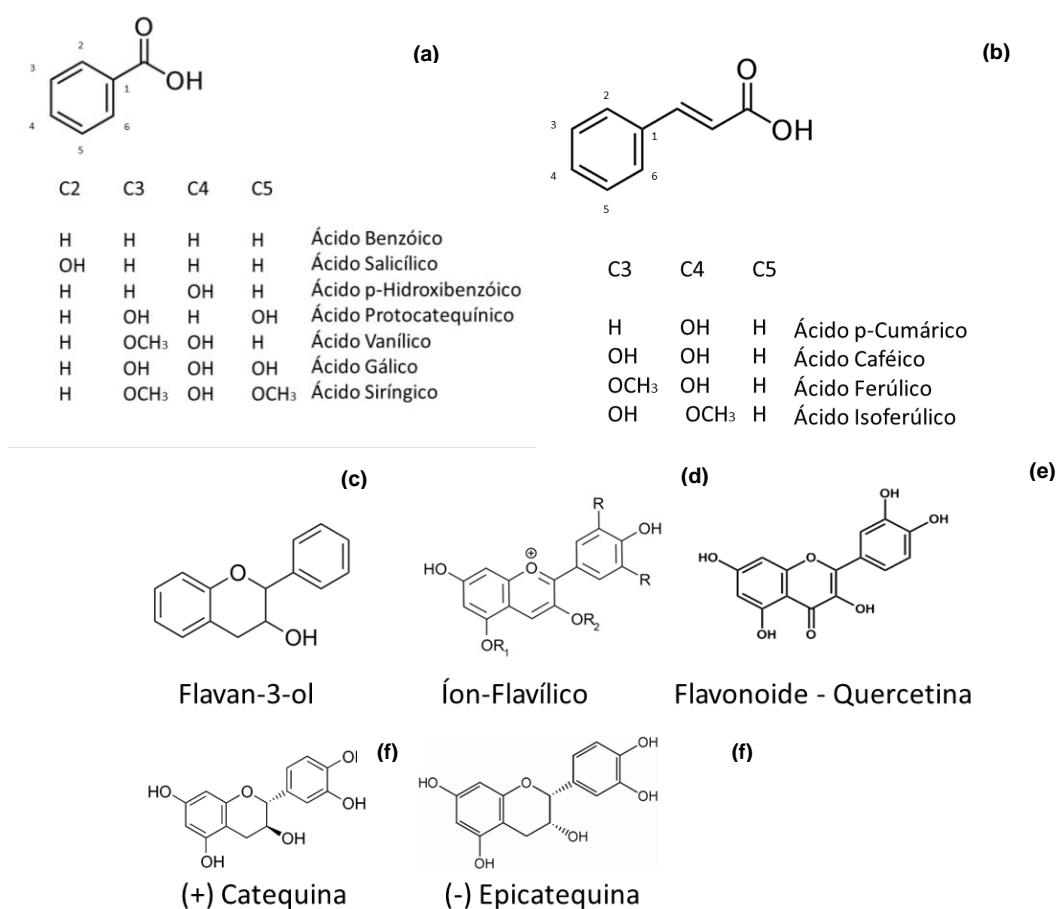


Figura 1. Estruturas dos principais compostos fenólicos presentes no extrato de *U. tomentosa*. (a) ácidos hidroxibenzoicos, (b) ácidos hidroxicinâmicos, (c) Monômeros de Flavan-3-ol (d) antocinidinas derivadas do íon flavílico (e) Flavonoides (f) Monômeros de cianidinas.

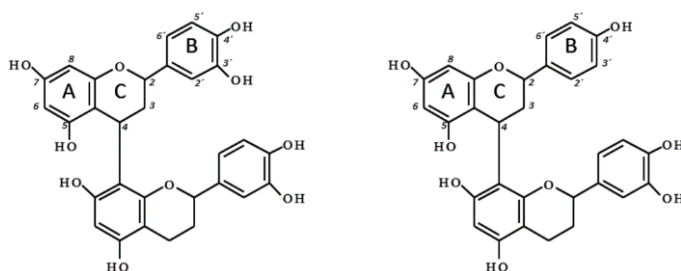


Figura 2. Estruturas químicas da formação de procianidinas e propelargodinininas pela ligação 4 → 8β, respectivamente.

Além de poucos relatos isolados na literatura acerca da atividade antifúngica da UT foi encontrado um estudo utilizando um gel-creme (Aristoflex®) de UT (Paiva *et al.* 2009) e a atividade antifúngica das cascas de UT, porém não apresenta atividade contra o gênero *Candida* (Ccahuana-Vasquez *et al.* 2007). A atividade antifúngica e efeito sinérgico com os antifúngicos fluconazol e terbinafina contra *Candida* spp foram relatados recentemente (Moraes *et al.* 2016), no entanto, dada a complexidade química dessa fração não foi possível estabelecer uma correspondência precisa com o grupo de substâncias responsáveis pelo efeito sinérgico.

Desse modo o presente trabalho descreve o fracionamento da fração insolúvel em água utilizando água a diferentes temperaturas e a polivinilpirrolidona reticulada (PVPP), dispensando assim o uso de solventes orgânicos. A atividade antifúngica *in vitro* de cada uma das frações resultantes foi testada contra isolados de *Candida* spp.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Material Vegetal

Uma amostra seca de casca de caule de *Uncaria tomentosa* (UT), coletada no Peru em maio de 2005, autenticado como J. Campos, Nº 10500, foi gentilmente doada pela Quimer Ervas e Especiarias (São Paulo, Brasil), tendo depósito de voucher no Herbário da Universidade Nacional de São Marcos (Lima, Peru). A amostra foi seca a 40° C em estufa de circulação convectiva (Memmert, Germany) e moída em moinho de facas (SK1 Retsch, Germany), provido de tamis com abertura de 2 mm.

### Obtenção do Extrato de *Uncaria tomentosa*

Uma quantidade de 150 g foi extraída, por maceração sob agitação magnética (300 rpm) (RO 15 Power, IKA, Alemanha) por 2h, em uma solução hidroetanólica 50% (v/v), a 23 ± 1°C. O extrato bruto obtido foi filtrado (Whatmann N°2), concentrado sob vácuo (Rotoevaporador Büchi, B-480, EUA), a 40 °C, até metade do seu volume original e, a seguir, resfriado *overnight* a 10°C. O sedimento formado foi separado por filtração (Whatmann N°2), dessecado a 37 °C (Biomatic, 1305) por 24 h e codificado como **FUT1**.

### Fracionamento aquoso à frio

Aproximadamente 50 mg do FUT 1 foram colocados em tubo Falcon e adicionados de 10,0 ml de água purificada. A preparação foi sonicada durante 10 min (Elma Transonic 460), agitada em agitador Vórtex (Q-220 Quimis, São Paulo, Brasil) por 2 min, até completa

homogeneização O homogeneizado foi centrifugado a 5000 G (Janetzki T32A, Berlim, Alemanha) durante 20 min. O procedimento foi repetido pelo menos dez vezes. Os sobrenadantes foram reunidos, congelados a 4 °C, liofilizados logo a seguir (Edwards, Modulyo, 4K) por fim codificados como **FUT2**. Foi obtida uma massa de 23 mg.

#### **Fracionamento aquoso à quente**

O resíduo resultante do *Fracionamento aquoso à frio* foi tratado de igual forma como descrito no item *Fracionamento à frio*, contudo, utilizando água a 60 °C. Os sobrenadantes foram reunidos, congelados, liofilizados e codificados como **FUT3**. Foram obtidos 12 mg.

#### **Fração insolúvel**

As fases insolúveis resultantes das etapas *Fracionamento aquoso à frio* e *Fracionamento aquoso à quente* após filtração foram reunidas, congeladas a 4 °C, liofilizadas da forma usual e codificadas como **FUT4**. A massa obtida foi de 15 mg.

#### **Purificação por adsorção em PVPP**

Uma amostra de 90 mg **FUT1** foi dispersa com 400 ml de água purificada, agitada magneticamente (300 rpm) durante 1 h até completa homogeneização. À mistura foram adicionados 20 g de PVPP (Divergan F, BASF). A preparação novamente agitada magneticamente por 1h, filtrada primeiramente sob vácuo (Whatmann N°2) e depois através de membrana PTFE de 0,45 µm (Milipore). O filtrado foi congelado a 4 °C e liofilizada do modo usual. O produto resultante foi codificado como FUT-PVPP. Foi obtida uma massa de 32 mg.

#### **Análise de Infravermelho com transformada de Fourier**

Amostras de 5 mg das frações FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP foram analisadas na faixa de 4000–600 cm<sup>-1</sup>, com resolução de 4 cm<sup>-1</sup> e 40 acumulações, em espectrofotômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR, Shimadzu DR-8001, EUA).

#### **Caracterização dos polifenóis por CLAE-DAD**

Para a caracterização do perfil de polifenóis das amostras FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP foi utilizado método de CLAE em fase reversa (Pavei *et al.* 2010), com detecção em 244, 280 e 325 nm, empregando rutina, ácido cafeico e ácido clorogênico como substâncias de referência (Sigma Aldrich, EUA). As amostras foram caracterizadas na concentração de 5 mg%. Polifenóis presentes nas diferentes frações foram preliminarmente identificados pelos respectivos tempos de retenção e analogia entre os espectros UV. Os ensaios foram realizados a 23 °C, em triplicata.

#### **Análise das Frações Obtidas em Espectrofotômetro de Ultravioleta-Visível**

Os espectros foram obtidos no intervalo de 180-820 nm, utilizando cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico (espectrofotômetro HP Agilent 8452A-DAD) e o processamento de dados com software Chemstation (versão A09.01). As concentrações de trabalho foram as mesmas utilizadas tanto no teste antifúngico e na obtenção das frações.

## Determinação do teor de polifenóis por espectrofotometria UV-AI<sub>3</sub>

Soluções de FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP em água foram preparadas de modo a corresponder a uma faixa de concentração de 6 µg/ml a 33 µg/ml. As absorvâncias foram lidas em seis pontos equidistantes e o teor de flavonoides calculado utilizando quercetina como substância de referência. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

*Curva e calibração.* Foi preparada utilizando seis soluções metanólicas na faixa de concentração de 6,0 a 30 µg/ml, em triplicata. A absorvância foi lida em 425 nm, 30 min após adição de 1,0 ml de solução metanólica de AlCl<sub>3</sub> 0,5%, acidificada com HCl 1N (Pękal e Pyrzynska, 2014).

## Micro-organismos de ensaio

Três isolados clínicos de *C. tropicalis* (72A, 72P e 57A), dois de *C. albicans* (ATCC18804 e CA01), um de *C. glabrata* (RL26), um isolado de *C. parapsilosis* RL36 pertencente ao micoteca do Laboratório de Micologia Aplicada da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) - Brasil, foram utilizados neste estudo.

## Teste de avaliação antifúngica – Concentração inibitória mínima (CIM)

Soluções na faixa de concentração de 500 para 0,98 µg/mL foram preparadas em água na concentração de 1 mg/mL, exceto para FUT1 e FUT4, quando foi utilizada a solução de dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Brasil) a 1% como solubilizante. As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com o protocolo M27-A3 (CLSI,2008), utilizando placas de 96 poços. O valor de CIM foi definido como a menor concentração da amostra capaz de não apresentar crescimento visual. Adicionalmente, o potencial efeito antifúngico da solução de DMSO a 1% foi testado em separado. Foi utilizado controle positivo para averiguação do crescimento dos micro-organismos e como controle negativo apenas a presença de RPMI 1640 (Gibco, New York, USA). O ensaio foi efetuado em duplicata.

## Teste de Dano Celular por MTT

Após o tempo de incubação e avaliação visual do CIM, leitura colorimétrica foi realizada com suspensão MTT (sal de tetrazólio 3- (4,5- dimethylthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) e o percentual de dano celular (DC%) foi calculado segundo a equação:

$$DC\% = 1 - [(A_{570nm} - A_{690nm \text{ com a fração}}) / (A_{570nm} - A_{690nm \text{ sem a fração}})] \times 100,$$

Onde a absorvância com a fração é o poço de interesse e a absorvância sem a fração são os poços controle de crescimento.

## Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste T seguido do teste de Tukey (Minitab 16, EUA). Resultados com valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente diferentes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Fracionamento dos Extratos

No presente trabalho evitou-se o uso de solventes orgânicos como meio de fracionar e purificar a fração de UT insolúvel em água (FUT1). O tema foi motivo de trabalhos anteriores (Verza *et al.* 2008, Borré 2010), que visaram o uso de água a diferentes temperaturas e de PVPP como forma de purificar de extratos de UT ricos em polifenóis.

A comparação visual das diferentes frações mostra graduações de cor claramente diferentes, provavelmente devidas a concentrações diferentes de polifenóis, tidos como as responsáveis pela coloração características dos extratos de casca de UT.



Figura 3. Comparação visual da graduação de cor de soluções metanólicas a 5% de FUT3, FUT1 e FUT-PVPP respectivamente.

### Análise por CLAE-DAD

Os cromatogramas por CLAE-DAD referentes às amostras FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP, obtidos em 244 nm; 280 e 325 nm são apresentados na figura 4 e 5, respectivamente.

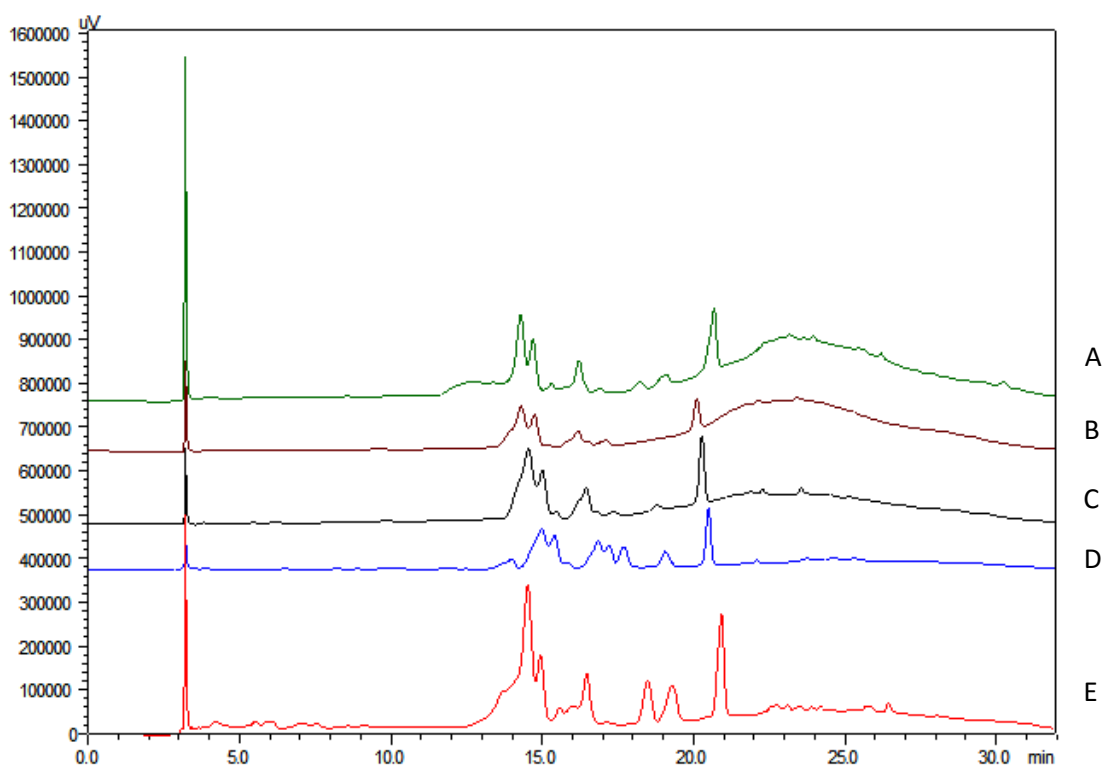


Figura 4 – Cromatogramas por CLAE-DAD das frações , em 244 nm. (A) FUT1 (B) FUT4 (C) FUT3 (D) FUT-PVPP (E) FUT2

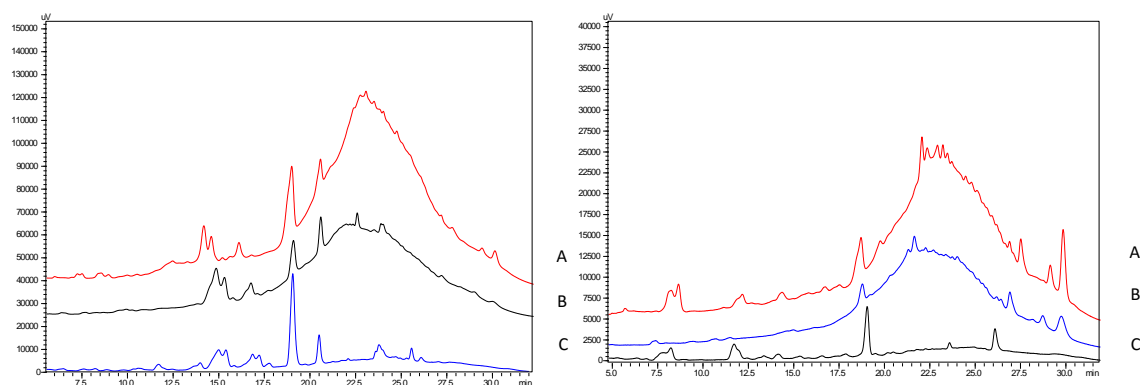


Figura 5. [A] FUT1; [B] FUT3; [C] FUT-PVPP monitorados no comprimento de onda 280 nm e 325 nm respectivamente.

Os cromatogramas das diferentes frações mostraram diferenças evidentes nos três comprimentos de onda de 244, 280 e 325 nm. As frações FUT1, FUT2, FUT3 e FUT4 se caracterizam por apresentarem uma protuberância ou *bulge*, formada por um conjunto complexo de picos na faixa de tempo de retenção (TR) de 20 e 30 min de corrida. Esse conjunto responde a uma elevada concentração de taninos e antocianidinas em extratos de *U. tomentosa* (Moraes *et al.* 2015). Observa-se que essa característica é ausente na FUT-PVPP, o que foi atribuído à complexação inespecífica, principalmente, de taninos e antocianidinas pelo polímero (Laborde *et al.* 2006; Verza *et al.* 2008).

Adicionalmente, para as cinco amostras analisadas foram detectados pelo menos dez picos majoritários simples, comuns a todas elas, exceto no caso da FUT4. Nesta fração, derivada das frações FUT2 e FUT3, os picos 5 e 6, com TR 16 e 17 min, mostraram estar ausentes, não assim nas respectivas frações que lhe deram origem nem no FUT1, nem FUT-PVPP (Tabela 1). Quando comparadas as magnitudes das áreas integradas dos principais picos, FUT2 mostrou picos discretos mais intensos do que FUT1 ou a FUT4.

Tabela 1. Áreas dos principais picos nas frações FUT1, FUT2, FUT3 e FUT4 e FUT-PVPP, monitorados por CLAE-DAD em 244 nm

Amostra	Pico 1	Pico 2	Pico 3	Pico 4	Pico 5	Pico 6	Pico 7	Pico 8	Pico 9	Pico 10
FUT1	2049619	916951	1036892	75866	388183	559192	2093354	98829	116686	184811
FUT2	5541765	1084838	484284	768868	1905711	2036303	3384346	3384346	174000	145539
FUT3	5313085	2012138	206912	1698955	103122	275242	2044194	20222	35035	44320
FUT4	1211074	534438	256947	159094	≈0	≈0	757929	68288	12677	7009
FUT-PVPP	528722	2731645	1332987	1532423	903462	672911	1537296	142884	21547	11822

No caso específico da fração FUT-PVPP a ausência do conjunto de picos após 20 min de TR refletiu-se na obtenção de uma fração de cor amarelo clara. Concomitantemente, observou-se diminuição das áreas dos principais picos dessa fração, indicando a sua inclusão na matriz formada pela PVPP e, portanto, sua remoção pela filtração subsequente. Partindo do pressuposto que a vários desses picos lhes foi atribuída natureza polifenólica (Cabral *et al.* 2010), ambos fatores parecem estar relacionados com a adsorção inespecífica de polifenóis pela PVPP, independentemente da massa moleculares desses (Verza, 2008). Segundo Dong *et al.* (2011), a adsorção pela PVPP de polifenóis depende diretamente do número de grupos hidroxila e de a massa molecular do polifenol ser elevada. Dessa maneira, a adsorção dos taninos e antocianidinas são preferenciais a outros componentes presentes nas frações obtidas como fica evidente no cromatograma da FUT tratada com PVPP. Contudo, há evidências de

que flavonoides de menor massa molecular, como quercetina e catequina, também são adsorvidos na PVPP, dependendo do pH do meio (Durán-Lara *et al.* 2014). Nesse caso, a complexação é favorecida pelas distâncias moleculares entre as hidroxilas fenólicas da quercetina e o grupamento amida da PVPP, assim como pela interação hidrofóbica entre anéis aromáticos do polifenol e a cadeia polivinílica da PVPP. No presente caso, uma situação similar parece ocorrer em relação ao pico com retenção de 26 minutos, identificado como quercetina por co-eluição e similitude entre espectros UV-Vis. Esse pico ocorre em todas as frações analisadas, exceto na fração FUT-PVPP., ocorre uma preferência de retirada desses oligômeros em detrimento dos monômeros.

Para fração FUT3, a área dos picos detectados após 20 min foi menor e melhor resolvida, quando comparada à FUT1. Este fato sugere concentração e riqueza menores em FUT3, refletindo-se em picos simples mais discretos, como consequência dos dois processos de extração aplicados. A análise comparativa dos mesmos picos observados em FUT4 e FUT1, tende a corroborar a permanência dos polifenóis de alta massa molecular na primeira delas, após as sucessivas extrações com água fria e água quente.

## **Análise por Infravermelho**

Todas as análises de infravermelho assemelham-se aos espectros de absorção típica de polifenóis, como anteriormente relatado (Heneczkowski *et al.* 2001) (Figura 6)

O espectro da FUT1 mostrou uma banda forte em  $3340\text{ cm}^{-1}$  (OH estiramento),  $1606\text{ cm}^{-1}$  (estiramento C=C do anel, característico de compostos fenólicos),  $1445\text{ cm}^{-1}$  ( C=C aromático) e  $1065\text{ cm}^{-1}$  (anel aromático C-H), coincidentes com o relatado na literatura (Moraes *et al.* 2015). Já a FUT2 apresentou acréscimo de duas bandas em  $1695\text{ cm}^{-1}$  e  $1519\text{ cm}^{-1}$  que correspondem a cetona aromática e estiramento vibracional de anéis aromáticos, conjuntamente com outras alterações menores. A FUT-3 demonstrou um espectro com melhor resolução das absorções predominantes, destacando-se a absorção em  $1518\text{ cm}^{-1}$ , também observado em FUT2 e FUT4. O espectro da fração FUT4 mostrou ser similar ao observado para FUT1, contudo, com uma melhor resolução. Destaca-se a absorção em  $1518\text{ cm}^{-1}$  que é coincidente nos espectros de FUT2, FUT3, mas não com FUT1, assim como a banda em  $1281\text{ cm}^{-1}$  que está ausente em FUT4, mas que é observada em FUT1.

De modo geral, os espectros revelaram a presença predominante dos mesmos grupamentos funcionais composições nas frações FUT1, FUT2, FUT3 e FUT4, entretanto, com composições qualitativas diferentes, como o sugerem os deslocamentos das bandas de absorção de  $3340\text{ cm}^{-1}$  para  $3306\text{ cm}^{-1}$  e de  $1606\text{ cm}^{-1}$  para  $1615\text{ cm}^{-1}$ , provavelmente associadas ao conteúdo fenólico nas diferentes frações. Da mesma forma, a diminuição da absorção em  $1615\text{ cm}^{-1}$  (C=O ) e  $1695\text{ cm}^{-1}$  (C=C ) em FUT2 sugere uma contribuição diferenciada do grupamento C=C aromático em relação às carbonilas.

O tratamento com PVPP objetivou a remoção, ainda que parcial e até inespecífica, de polifenóis, reduzindo assim o número de substâncias associadas à atividade antifúngica relatada por Moraes *et al* (2015). O espectro de FUT-PVPP mostrou diminuição da banda apresentada próximo a  $1065\text{ cm}^{-1}$ , assim como o surgimento de bandas adicionais em  $1423\text{ cm}^{-1}$ ,  $1462\text{ cm}^{-1}$  e  $1494\text{ cm}^{-1}$  e troca do estiramento em  $1606\text{ cm}^{-1}$  por uma banda de mesma intensidade em  $1644\text{ cm}^{-1}$ . Considerando que o espectro da PVPP mostrou absorção em  $1644\text{ cm}^{-1}$ ,  $1494\text{ cm}^{-1}$ ,  $1462\text{ cm}^{-1}$ ,  $1422\text{ cm}^{-1}$  e  $1290\text{ cm}^{-1}$  (Fig. S1), características da PVPP, as alterações acima relatadas foram atribuídas à formação de um complexo polifenol-PVPP.



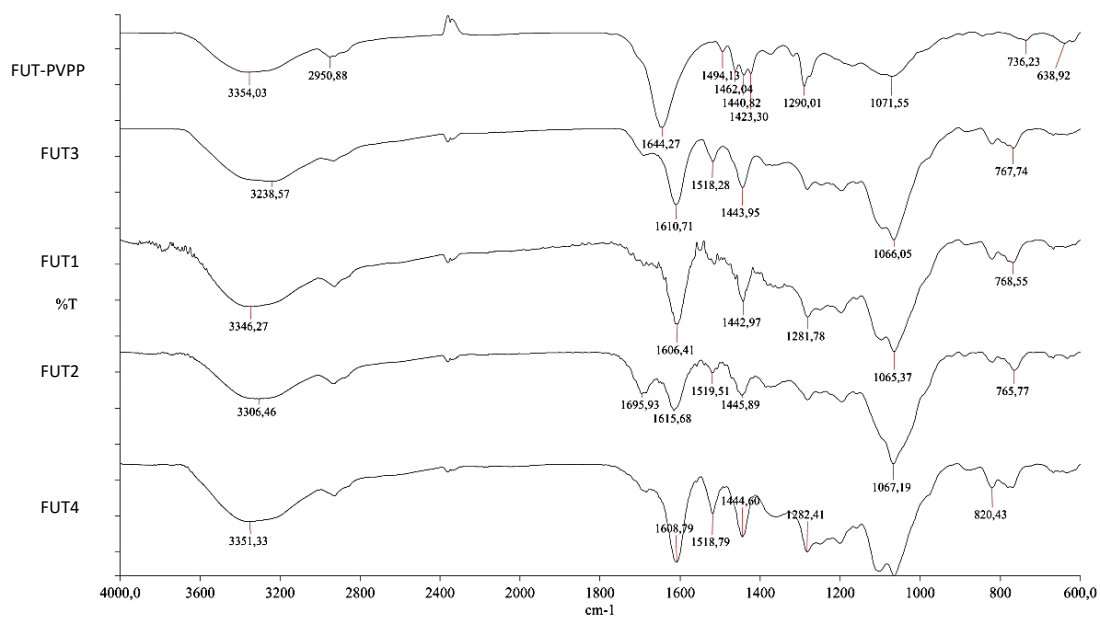


Figura 6 – Espectro de Infravermelho das frações FUT-PVPP, FUT3, FUT1, FUT2 e FUT4.

### Análise das Frações Obtidas em Espectrofotômetro na região do Visível

Os espectros das frações FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP foram obtidos de soluções metanólicas, mantendo mesma concentração de amostra, 500 µg/ml (Figura 7).

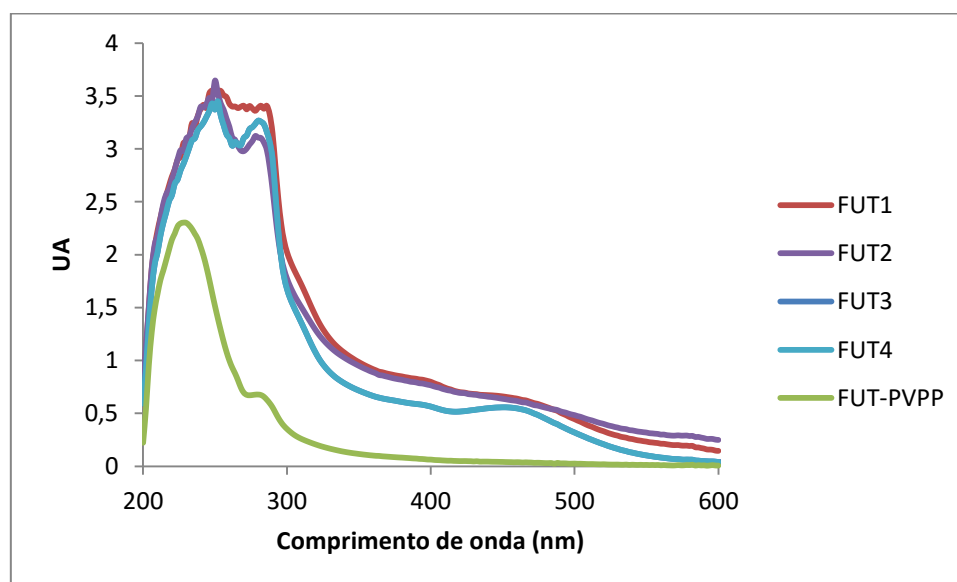


Figura 7. Espectro UV-Vis das frações obtidas na concentração de 500 µg/ml.

Os espectros de FUT-1 e FUT-2, mas principalmente os referentes a FUT4 e FUT3 mostraram ser sobreponíveis ao longo da região de 200-600 nm. Isso corrobora a similitude observada nos respectivos cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. De modo contrário, a FUT-PVPP diferiu notadamente dos demais espectros, mostrando baixa absorção acima de 340 nm, o que coincide com a fraca coloração dessa fração. Mais ainda, a razão 2,24:0,6 entre as

absorbâncias medidas em 234 e 286 nm e a própria localização dos máximos de absorção diferiram claramente da mesma razão e dos máximos observados nas outras frações. Isso reflete uma alteração tangível na composição dessas frações quando tratadas com PVPP.

#### Determinação do teor de polifenóis por espectrofotometria UV- $AlCl_3$

Para a determinação do teor de polifenóis foi selecionada a quercetina por esse ser um flavonoide de distribuição ubíqua no reino vegetal e frequentemente utilizada como substância de referência (Mammen *et al.* 2012). A relação entre absorção e concentração de quercetina tratada com  $AlCl_3$  mostrou ser linear na faixa de concentração analisada, permitindo a obtenção da equação linear pelo método dos quadrados mínimos (Minitab 16).

$$Y = 0,0606x + 0,0446 \quad (R^2 \ 0,9967),$$

onde Y = unidades absorção (UA); e x= concentração ( $\mu g/ml$ ).

A aplicação dessa equação no cálculo do teor de polifenóis nas diferentes frações de UT resultou em teores marcadamente diferentes (Tabela 2).

Tabela 2- Determinação do teor de polifenóis nas frações FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP de casca de *Uncaria tomentosa*, mediante formação de complexo com  $AlCl_3$

	Concentração amostra ( $\mu g/ml$ )	Concentração polifenóis ( $\mu g/ml$ )	Teor de percentual de polifenóis na amostra (%)
FUT1	250,0	13,56 $\pm$ 3,44	33,9 $\pm$ 8,6
FUT2	250,0	4,18 $\pm$ 2,08	10,4 $\pm$ 5,2
FUT3	250,0	2,28 $\pm$ 0,13	5,7 $\pm$ 0,3
FUT4	250,0	9,45 $\pm$ 0,04	23,6 $\pm$ 0,1
FUT-PVPP	250,0	0,04 <sup>a</sup>	0,103 <sup>a</sup>

(a) Absorção relativa apenas à primeira diluição, em função do baixo teor de polifenóis na fração.

Corroborando com os dados obtidos nas análises por CLAE-DAD e FT-IR, FUT-PVPP apresentou o menor teor de polifenóis entre todas as demais frações. De modo contrário, FUT1 foi a fração com maior teor desses compostos.

Qualitativamente, os espectros foram bastante parecidos na região 200-280 nm, provavelmente, devido à sobreposição de absorções de múltiplos componentes. De modo contrário, acima de 280 nm as frações mostraram clara diferença espectral. Em princípio, a formação de complexos polifenol- $AlCl_3$  resulta em deslocamentos batocrômicos e hiperocrômicos das absorções originais, que servem como um meio de quantificar o teor dos polifenóis na amostra analisada. Esse princípio tem se aplicado, principalmente, aos flavonoides, ao se formar complexos do íon  $Al^{3+}$  com a carbonila em C-4 e a hidroxila fenólica em C-5 ou C-3 grupos (Woisky e Salatino, 1998; Pękal e Pyrzyńska, 2014). Contudo, a reação não é específica, uma vez que também pode ocorrer a formação de complexos multimoleculares entre  $Al^{3+}$  e hidroxilas fenólicas de moléculas de polifenóis diferentes, que não apenas as de flavonoides.

As antocianidinas de UT, especificamente, costumam mostrar máximos de absorção em torno de 550 nm. A conjunção com as análises por CLAE-DAD, os resultados sugerem que o teor de antocianidinas é menor nas amostras FUT2 e FUT3, permanecendo em grande parte na fração

mais insolúvel FUT4. Entretanto, outros polifenóis, além das antocianidinas, também podem mostrar um comportamento análogo.

### Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados do ensaio de Concentração Inibitória Mínima mostram valores no intervalo de 32,5 a 250 µg/ml para apenas uma das cepas, as demais cepas testadas não apresentaram inibição frente às diferentes amostras (Tabela 3)

Tabela 3. Valores de CIM para espécies de *Candida* spp., determinados para as frações FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP

	<i>C. glabrata</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. tropicalis</i>			<i>C. albicans</i>	
	RL26	RL36	72A	72P	57 <sup>a</sup>	ATCC18804	CA01
FUT1	>500 <sup>a</sup>	>500	>500	>500	31,25	>500	>500
FUT2	>500	>500	>500	>500	31,25	>500	>500
FUT3	>500	>500	>500	>500	62,5	>500	>500
FUT4	>500	>500	>500	>500	250	>500	>500
FUT-PVPP	>500	>500	>500	>500	31,25	>500	>500

<sup>a</sup> Todos os valores de CIM foram expressos em µg/ml

Nos casos em que o DMSO a 1% foi utilizado como solvente de amostras, não foi evidenciada qualquer inibição contra as cepas quando testado isoladamente. Dessa forma, é possível ordenar a atividade antifúngica como: FUT1=FUT2=FUT-PVPP>FUT3>FUT4.

Considerando os resultados por CLAE-DAD, FT-IR, UV e UV-AICl<sub>3</sub>, assim como a atividade sobre *C. tropicalis* 57A, é possível propor algumas relações envolvendo polifenóis de maior massa molecular, incluindo taninos e antocianidinas. Assim esse grupo de substância parece ter uma participação minoritária na atividade antifúngica, visto que a fração FUT4, caracterizada por um elevado teor desta classe de polifenóis, apresentou o menor valor de CIM. De modo contrário, a fração FUT3 que possui ainda uma quantidade desses compostos mostrou um valor de CIM duas vezes maior do que FUT1, FUT2 e FUT-PVPP.

O resultado obtido com FUT-PVPP merece especial atenção, uma vez que implica uma atividade antifúngica equivalente a FUT1 e FUT2, apesar, porém, de uma fração significativa de polifenóis ter sido removida mediante adsorção com PVPP. Se confirmado, esse resultado reduz grandemente o leque das possíveis substâncias antifúngicas.

### Teste de Dano Celular por MTT

O teste de dano celular apresentou resultado equivalente ao CIM apenas para a FUT1, para as demais frações não foi observado prejuízo celular, pelo contrário, ocorreu acréscimo no crescimento.

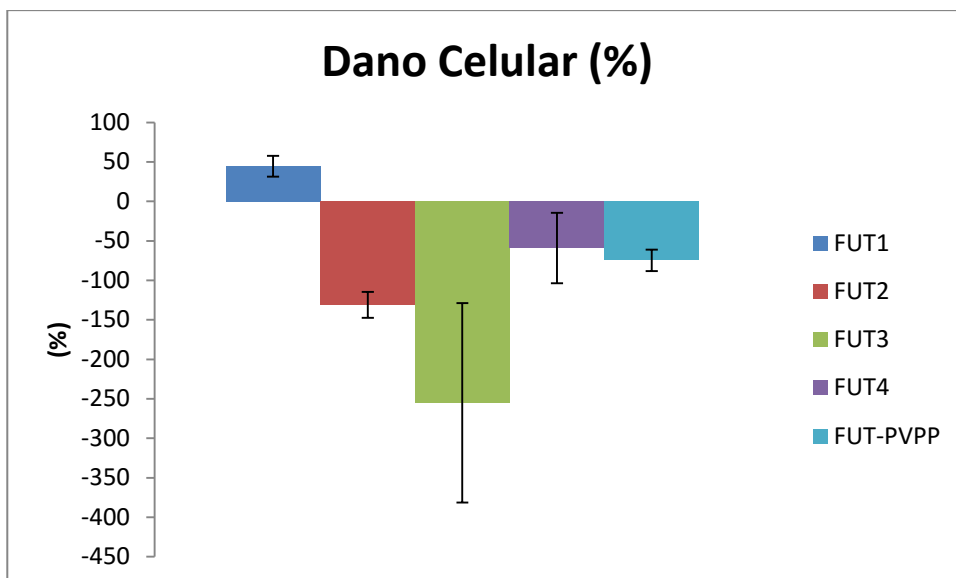


Figura 9. Dano celular (%) para as amostras FUT1, FUT2, FUT3, FUT4 e FUT-PVPP.

Nesse trabalho fica evidente que para as amostras FUT1, FUT2, FUT3 e FUT-PVPP demonstraram uma inibição do crescimento, porém quando comparado com o teste de dano celular, apenas a fração FUT1 parece de acordo com a CIM. As demais frações mesmo com o valor de CIM especificados anteriormente não corroboram com os resultados encontrados pelo dano celular.

Uma possível explicação para essa aparente incongruência envolve o princípio do método e a presença de polifenóis de alta massa molecular. O princípio do método baseia-se formação dos cristais de formazan mediante redução do sal tetrazólico MTT pela ação da enzima succinato desidrogenase presente nas mitocôndrias das células vivas.

No presente trabalho, a maior quantidade de taninos e antocianidinas observada em FUT1, FUT3 e FUT4 está relacionada com danos bastante diferentes. Uma vez que essas frações apresentaram composição química semelhante, é possível que ocorra interação formação dos cristais de formazan. Observa-se também que essas frações absorvem em 570 e 690 nm, conseqüentemente, esse fato poderia falsear a absorvância hipoteticamente atribuída a um aumento da produção dos cristais, levando a resultados pseudo-negativos. Alguns trabalhos na literatura indicam que alguns compostos fenólicos, ou com potencial antioxidante, podem reduzir o MTT ao sal de formazan sem a presença de células (Bruggisser *et al.* 2002). Em outro estudo foi demonstrado que além dos compostos acima mencionados também ocorre interferência por taninos, principalmente, pelo grupamento orto-fenólico presente em muitos dos taninos e polifenóis (Wisman *et al.* 2008). Entre esses polifenóis, a quercetina e o campferol possuem esse grupamento na posição C-3 e, portanto interagiriam com o MTT.

Levando em conta essas interações, a fração FUT-PVPP não tem nem a quercetina, nem os dímeros de antocinidinas que reagem com o MTT deslocando-o. Possivelmente possuam outro derivado de flavona na fração, ou o polímero adsorvente utilizado na purificação da amostra interaja com o MTT. A análise por espectrofotometria UV-VIS da mistura de MTT e PVPP na razão 1:1, como pode ser observado na Figura 10, mostrou deslocamento hipercrômico no espectro UV-Vis, o que pode explicar os grandes desvios encontrados nos valores de dano celular com as amostras purificadas com PVPP.

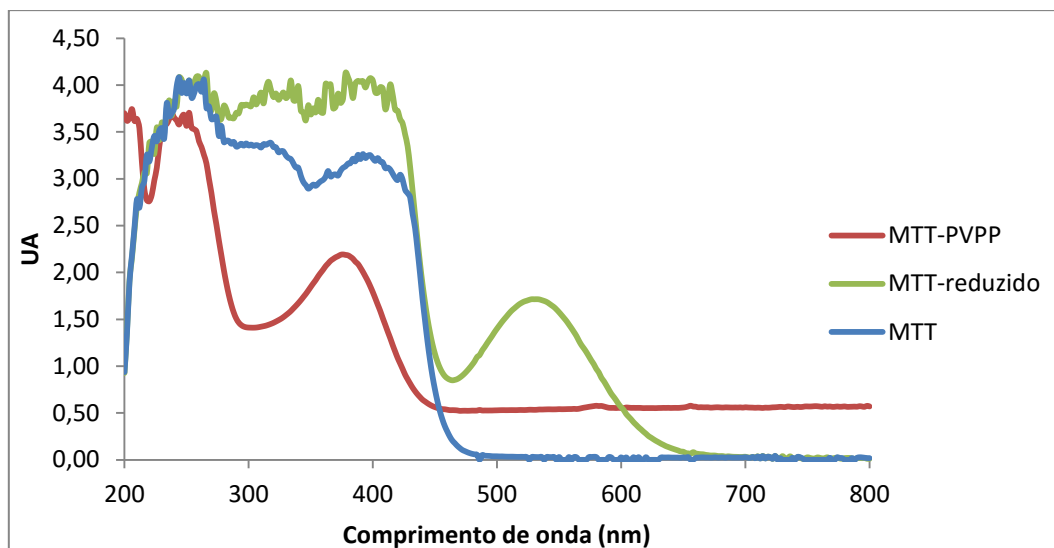


Figura 10. Espectros UV-Vis do MTT, MTT reduzido e MTT-PVPP.

## CONCLUSÕES

O fracionamento conseguiu separar as diferentes frações insolúveis em água sem a utilização de solventes orgânicos ou resinas;

A PVPP foi eficaz na retirada da fração de polifenóis de maior massa molecular, como ficam evidentes com as análises de CLAE-DAD e UV-Vis. O método, contudo, mostrou ser inespecífico no que tange a polifenóis de menor massa molecular;

Não foi evidenciada uma relação contundente entre atividade antifúngica e a composição das diferentes frações, exceto um isolado, especificamente, *C. tropicalis* 57A,

Os valores de CIM e de dano celular utilizando MTT mostraram ser discrepantes, sugerindo-se uma interação entre os componentes polifenólicos e a formação de cristais de formazan;

Extratos brutos ou frações ricas em compostos provenientes de plantas podem alterar os resultados de testes com MTT, o que sugere a necessidade de testes de comprobatórios preliminares.

## REFERÊNCIAS

AGUILAR, J.L.; ROJAS, P.; MARCELO, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C.A.; MERFORT, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). *J Ethnopharmacol.*, v. 2 p.271-276, 2002.

BRUGGISSER, R.; VON DAENIKEN, K.; JUNDT, G.; SCHAFFNER, W.; TULLBERG-REINERT, H. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med.*, v.5, p.445-448, 2002.

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A.; SANTOS, S. S. F.; KOGA-ITO, C, Y.; JORGE, A. O. C. Antimicrobial activity of *Uncaria tomentosa* against oral human pathogens. *Braz. oral res.*, v.21, p.46-50, 2007.

DE SOUZA, A.L.; CIMERMAN, S. *Uncaria tomentosa* (Cat's claw): a potential therapeutic strategy for herpes labialis. *Rev Panam Infectol.*, v.12, p.51-57, 2010.

DIETRICH, F.; KAISER, S.; ROCKENBACH, L.; FIGUEIRÓ, F.; BERGAMIN, L.S.; CUNHA, F.M.D.; MORRONE, F.B.; ORTEGA, G.G.; BATTASTINI, A.M.O. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. *Food Chem Toxicol.*, v.67, p.222-229, 2014.

DONG, Z.B.; LIANG, Y.R.; FAN, F.Y.; YE, J.H.; ZHENG, X.Q.; LU, J.L. Adsorption behavior of the catechins and caffeine onto polyvinylpyrrolidone. *J Agric Food Chem.*, v.8,p.4238-4247, 2011.

DURÁN-LARA, E.F.; LÓPEZ-CORTÉS, X.A.; CASTRO, R.I.; AVILA-SALAS, F.; GONZÁLEZ-NILO, F.D.; LAURIE, V.F.; SANTOS, L.S. Experimental and theoretical binding affinity between polyvinylpyrrolidone and selected phenolic compounds from food matrices. *Food Chem.*, v.168, p.464-470, 2015.

FOO, L. Proanthocyanidins: gross chemical structures by infrared spectra. *Phytochemistry.*, v20, p.1397-1402, 1981.

HENECZKOWSKI, M.; KOPACZ, M.; NOWAK, D.; KUŹNIAR, A. Infrared spectrum analysis of some flavonoids. *Acta Pol Pharm.*, v.6, p.415-420, 2001.

LABORDE, B.; MOINE-LEDOUX, V.; RICHARD, T.; SAUCIER, C.; DUBOURDIEU, D.; MONTI, J.P. PVPP-polyphenol complexes: a molecular approach. *J Agric Food Chem.*, v.12, p.4383-4389, 2006.

MAMMEN, D.; DANIEL, M. A critical evaluation on the reliability of two aluminum chloride chelation methods for quantification of flavonoids. *Food Chem.*, v.3, p.1365-1368, 2012.

MORAES, R. C.; LANA, A.D.; KAISER, S.; CARVALHO, AR.; OLIVEIRA, L.F.S.; FUENTEFRIA, A.M.; ORTEGA, G.G. Antifungal activity of *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C. against resistant non-albicans *Candida* isolates. *Ind Crop Prod* v.69, p.7-14, 2015.

MORAES, R.C. 2016. Dados não publicados.

NAVARRO HOYOS, M.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; MURILLO, MASIS. R.; MARTÍN-ÁLVAREZ, P.J.; ZAMORA, RAMIREZ. W.; MONAGAS, M.J.; BARTOLOMÉ, B. Phenolic Assesment of *Uncaria tomentosa* L. (Cat's Claw): Leaves, Stem, Bark and Wood Extracts. *Molecules.*, v.12, p.22703-22717, 2015.

PAIVA, L. C.; RIBEIRO, R. A.; PEREIRA, J. V.; OLIVEIRA, N. M. C. Avaliação clínica e laboratorial do gel da *Uncaria tomentosa* (Unha de Gato) sobre candidose oral. *Rev. bras. Farmacogn.*, v.19, p.423-428, 2009.

PAVEI, C.; KAISER, S.; BORRÉ, G.L.; ORTEGA, G.G. Validation of a LC method for polyphenols assay in cat's claw (*Uncaria tomentosa*). *J Liq Chromatogr R T.*, v.33, p.1551-1561, 2010.

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Anal Method.*, v.7, p.1776-1782, 2014.

PILARSKI, R.; ZIELIŃSKI, H.; CIESIOŁKA, D.; GULEWICZ, K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J Ethnopharmacol.*, v.104, p.18-23, 2006.

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

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

VERZA, S. G.; PAVEI, C.; ORTEGA, G. G. Study of the Specificity of Cross-Povidone (PVPP) as binding agent in the quantification of polyphenolic compounds. *J Brazili Chem Soc.*, v.8, p.1627-1633, 2008.

WANG, P.; HENNING, S.M.; HEBER, D. Limitations of MTT and MTS-based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols. *PLoS One.*, 2010 (v.5, e10202, 2010.

WISMAN, K.N.; PERKINS, A.A.; JEFFERS, M.D.; HAGERMAN, A.E. Accurate assessment of the bioactivities of redox-active polyphenolics in cell culture. *J Agric Food Chem.*, v.17, p.7831-7837, 2008.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicult Res.*, v.2 p.99-105, 1998.

**Anexo 1**

**Manuscript´s form and presentation**



## STRUCTURE

**Title Page:** This must include the manuscript full title (it must be brief providing exact information of the contents), authors' full names, institutional affiliations (University, College, Department) through numbers. The corresponding author must be identified with an asterisk, giving the complete address, including the electronic mail. Those information must be left in the text and after the filiation.

**Abstract:** On a separate page, provide a summary of not more than 200 words. It must concisely and specifically describe the objectives of the study, techniques used, the essential results and what the authors concluded from the results.

**Uniterms:** These should be strictly related to the contents and limited to 6 (six).

**Abstract in Portuguese:** It should be presented after the conclusions. This should follow the same content of the abstract presented in English.

**Uniterms in Portuguese:** must follow uniterms in English and be presented after the abstract in Portuguese.

**Introduction:** This should state briefly and clearly the objectives of the investigation with reference to previous works. Extensive review of the literature should be avoided and substituted for references of recent publications where such reviews may be found.

**Material and Methods:** These should be described in sufficient detail that the work can be reproduced. Procedures and techniques readily available in the literature require only a citation of the original source, except when they are substantially modified. Reports of experimental studies on humans and animals must certify that the research received prior approval by the appropriate institutional review body (Committee of Bioethics).

**Results and Discussion:** Results must be presented concisely and in logical order. Where possible, use figures or tables to present data rather than text. When appropriate give the range, standard deviation and indicate the significances of differences between numerical values obtained. Discussion should interpret the results and assess their significance in relation to previous work in the field. Speculation not warranted by actual data should be avoided. Presenting those items separately is optional.

**Conclusions:** These must be drawn from the text and restricted to the limits of data obtained

**Acknowledgments:** These should be typed in a special paragraph under separate heading preceding the section of References. They should be kept to a minimum consistent with the requirements of courtesy and disclosure.

**References:** They should be prepared and listed according to The Brazilian Association of Technical Standards (ABNT.NBR 6023). Entries should be arranged in alphabetical order by author at the end of the paper. All authors' names should be given. "Accuracy of reference data is the responsibility of the author". For examples see the site [www.bcq.usp.br](http://www.bcq.usp.br)

#### PRESENTATION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be sent in 30-36 lines, 1,5 spaced, in the Word for Windows. All manuscripts must be accompanied with a letter signed by the authors, and submitted, only, by electronic way.

#### Additional Information

**Text citations:** References should be cited in the text by the authors' names, with only the first letter in capital letter followed by the year of publication. For more than three authors, the first has to be cited followed by the expression *et al.* (in italics). For more than one citation with the same authors and year of publication they must be differentiated by small letters close to the year.

**Illustrations:** Graphs, tables, chemical structures, equations, maps, figures, photos must be included in the text immediately after being cited. Maps, figures and photos must be presented also in separate files with the extensions TIF or JPG, and 300 dpi resolution. **Each BJPS issue will present a chosen illustration in its cover.** Tables should be numbered consecutively in Roman numerals and Figures in Arabic, followed by their titles. The word TABLE and FIGURE should appear in capital letters in the title or in the legend, but not in the text. Legends should accompany them as well as be present in the text.

**Nomenclature:** Unities of weight and measurements, names of plants, animals and chemicals should be mentioned according to International Rules available. For national manuscripts names of drugs must follow the current Denominações Comuns Brasileiras(DCB). Trademarks may be mentioned only once in the text (between parenthesis and initial in capital letter)