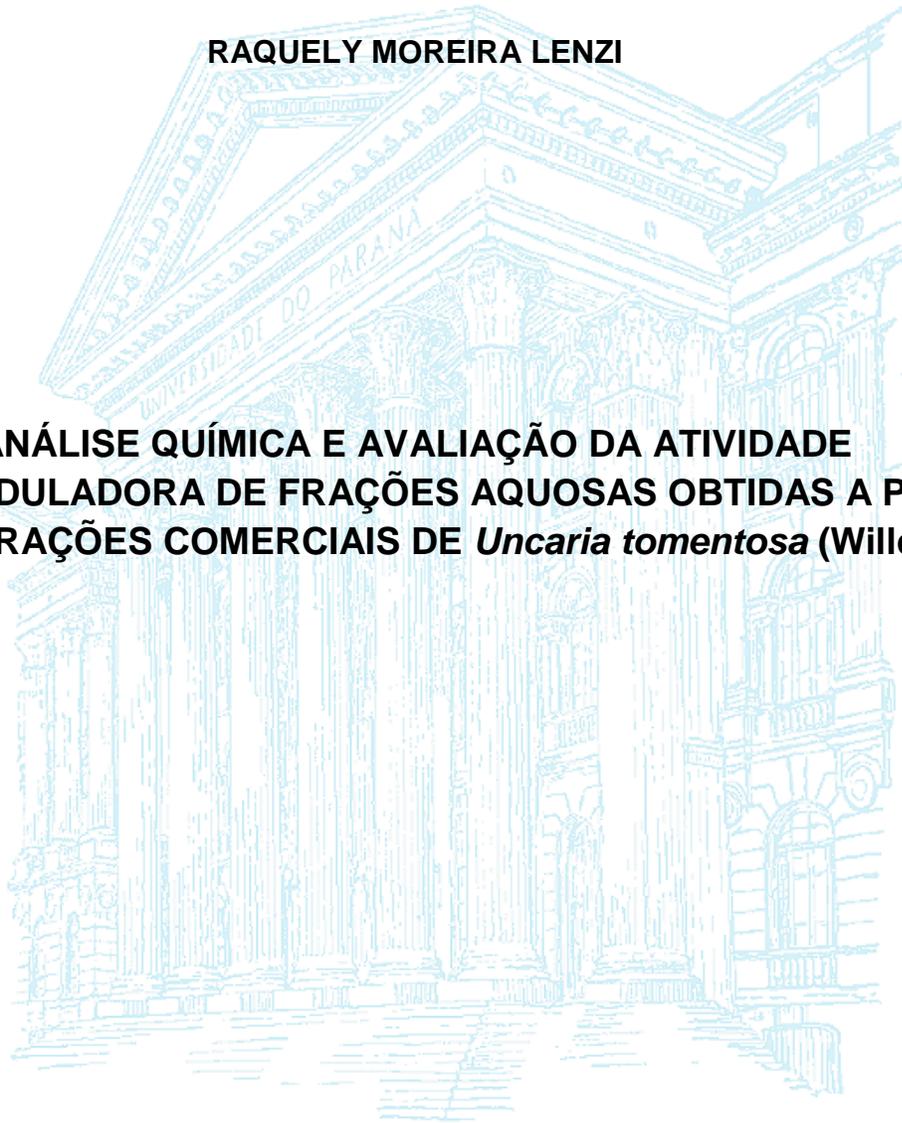


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

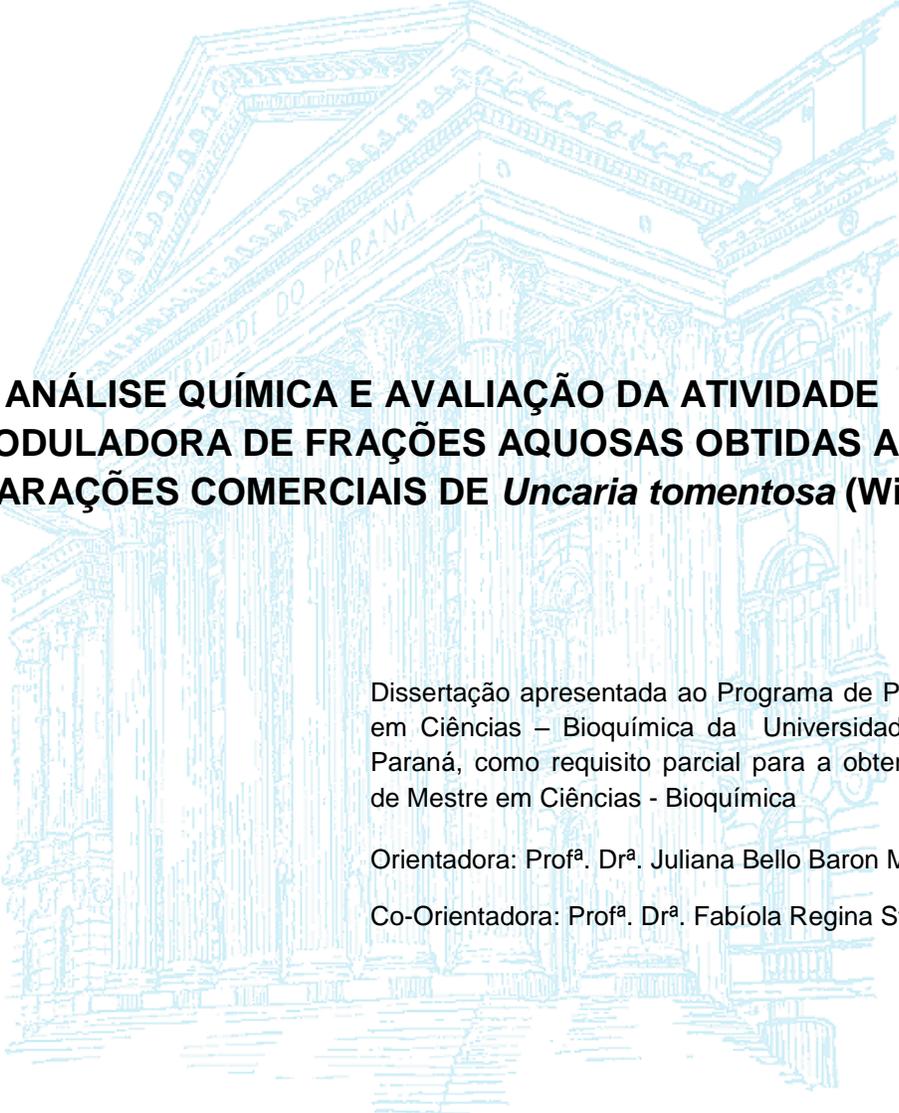
RAQUELY MOREIRA LENZI

ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
IMUNOMODULADORA DE FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS A PARTIR  
DE PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.



CURITIBA  
2011

**RAQUELY MOREIRA LENZI**



**ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE  
IMUNOMODULADORA DE FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS A PARTIR  
DE PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Ciências – Bioquímica da Universidade Federal do  
Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título  
de Mestre em Ciências - Bioquímica

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Bello Baron Maurer

Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fabíola Regina Stevan Hancke

**CURITIBA  
2011**

## TERMO DE APROVAÇÃO

RAQUELY MOREIRA LENZI

### ANÁLISE QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE FRAÇÕES AQUOSAS OBTIDAS A PARTIR DE PREPARAÇÕES COMERCIAIS DE *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências – Bioquímica, no Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná pela seguinte comissão examinadora:

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anita Nishiyama

Departamento de Fisiologia - UFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Mara Woranovicz Barreira

Dep. de Farmácia - UFPR

  
Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Juliana Belle Baron Maurer  
Dep. de Bioquímica e Biologia Molecular - UFPR

Curitiba, 29 de junho de 2011.

Ao Felipe, o sonho da minha vida...  
... e ao Daniel, por realizar o meu sonho.

## AGRADECIMENTOS

Acima de tudo agradeço a Deus, por me conceder dádivas que me permitiram chegar até aqui, e à Nossa Senhora, minha mãe, por ser minha intercessora.

Em especial à professora Juliana Maurer, minha orientadora querida e meu exemplo, pela sabedoria e conselhos que me ajudaram a crescer como pesquisadora e a realizar esse trabalho; pela dedicação sem limites e por superar todas as minhas expectativas. Obrigada por ser tão incrível.

Com muito carinho à minha co-orientadora, professora Fabíola, por estar disposta a me ensinar em todo momentos, mesmo em tardes e noites de finais de semana. Obrigada pelo carinho, amizade e dedicação.

À professora Selma, uma das melhores pessoas que conheci na minha vida. Obrigada por me orientar, mesmo não sendo minha orientadora. Mas obrigada, principalmente, por estar todos os dias ao nosso lado, iluminando o laboratório, e por ser tão querida e carinhosa.

À banca, composta pelas professoras Sandra e Anita, por compartilhar seus conhecimentos, pelas correções e por ajudarem a aprimorar essa dissertação.

À minha nova família, presente de Deus, que se tornou realidade graças à minha vinda a Curitiba para cursar o mestrado: ao Felipe, meu filho amado, que compartilhou comigo toda a redação dessa dissertação de dentro de meu ventre, e por me dar forças para ir adiante nesse caminho; e ao meu esposo Daniel, pelo amor incondicional e por viver esse mestrado comigo. Obrigada aos dois homens da minha vida, por me fazerem tão feliz.

À toda minha família, pela união, exemplo, incentivo e apoio. Agradeço em especial os meus pais Lindomar e Ivete, pois é deles o mérito de todas as minhas conquistas; e meus irmãos Gracilla, Débora e André, pela ajuda, companheirismo e paciência.

À minha prima amada Maeva, por compartilhar comigo o desafio de morar em Curitiba para cursar essa pós-graduação, me dando todo apoio e amor de família que precisei.

À minha melhor amiga Simone, por ser tão irmã. Obrigada por me aconselhar, me incentivar, me dar forças e por me ajudar na conclusão desse trabalho.

À Ana Livia e à Paola, por serem tão amigas, em todos os momentos da minha vida.

À Carol, presente do mestrado, por ser tão querida e amiga, pela ajuda especial para a realização desse trabalho e pela companhia divertida no laboratório.

Aos amigos Luciano e Fernanda pela ajuda essencial, pelo conhecimento e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Sem vocês esse trabalho não seria possível. Acima de tudo, agradeço a companhia e a amizade dos dois, que alegraram e tornaram mais prazeroso o desenvolvimento desse trabalho.

Aos companheiros do Laboratório NUPPLAMED: Melina, Fábio, Angélica, Fernando, Amanda, Sandra e aos alunos da UP, por me darem a alegria de compartilhar o laboratório com vocês.

Ao professor Aducto B. de Pereira-Netto (Dep. Botânica/UFPR), pela ajuda com a correção da dissertação e por disponibilizar o seu laboratório para a realização desse trabalho sempre que precisamos.

Ao Gustavo Bertol, pelas análises de alcalóides.

Ao Sr. Herculano S. Reis Filho do Laboratório de Histotecnologia, Departamento de Biologia Celular, por ceder os reagentes necessários para a confecção das lâminas para as análises de morfologia celular.

Ao Thales e à Ana Helena pela doação do soro, e ao professor Guilherme L. Sassaki pelo empréstimo da heparina bovina, os quais foram utilizados nos ensaios do complemento.

À Grazielli do Departamento de Química, pela ajuda nas análises de FT-IR.

Aos funcionários do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da UFPR.

Aos colegas do mestrado, por toda ajuda e companheirismo.

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Ciências Bioquímica pelo apoio e incentivo e à todos os professores, alunos e funcionários do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular.

Ao CNPq, PRONEX-Carboidratos e UGF/SETI/Gov.PR pelo apoio financeiro e à Fundação Herbarium pela doação do material vegetal.

A todos os professores e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se teus sonhos estão nas nuvens, não te preocupes, eles estão no lugar certo;  
agora construa os alicerces”.

*William Shakespeare*

## RESUMO

A *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., popularmente conhecida como unha-de-gato, é uma planta medicinal da Amazônia empregada no tratamento de várias doenças por possuir potentes atividades anti-inflamatórias e imunoestimulantes. O objetivo desse estudo foi analisar quimicamente duas frações aquosas obtidas a partir de dois diferentes extratos comerciais, os quais correspondem às principais formas de utilização dessa planta: decocto (fração D10a) e cápsulas fitoterápicas (1AERT). As análises químicas demonstraram a presença de compostos fenólicos (86% para D10a e 42% para 1AERT) e componentes glicídicos (45% para D10a e 28% para 1AERT), um baixo teor de proteínas (<10%), bem como a ausência de alcalóides (<0,01%) nessas frações. Entre os componentes glicídicos, 0,3% correspondem a arabinogalactanas-proteínas (AGPs) e 6% são açúcares ácidos na fração D10a, enquanto na 1AERT os teores desses compostos correspondem a 23 e 26%, respectivamente para D10a e 1AERT. Através da composição monossacarídica observou-se que a fração D10a é constituída principalmente de Rha (28%) e Glc (56%), e a 1AERT por Rha (8%), Ara (11%), Gal (23%) e Glc (26%). A atividade biológica dessas frações foi avaliada *in vitro* através do efeito exercido sobre cultura de macrófagos peritoneais de camundongos e sobre o sistema complemento humano. As frações não foram citotóxicas para os macrófagos nas concentrações de 0,32-320 µg/ml, em 48h de tratamento. Somente a fração 1AERT foi capaz de estimular a produção de NO após 48h de tratamento, exercendo um aumento de 50% na concentração de 320 µg/ml. Em relação à produção de citocinas, as frações apresentaram atividades semelhantes em diferentes intensidades após incubação de 24h. Na concentração de 320 µg/ml, a fração D10a aumentou a produção de TNF-α em 125% e de IL-6 em 1233%, e reduziu a produção de IL-1β em 85%. Já a fração 1AERT, na mesma concentração, aumentou a produção de TNF-α em 230% e de IL-6 em 664%, e reduziu a produção de IL-1β em 61%. Ambas as frações não exerceram efeito sobre a produção de IL-10. A atividade imunoestimulante em macrófagos pode ser observada também, após 24 h de tratamento, através do teste de retenção do corante vermelho neutro, que demonstrou a capacidade das frações em estimular a fagocitose em macrófagos, e através da análise morfológica das células, que apresentaram morfologia típica de macrófagos ativados. Além disso, as frações foram avaliadas quanto a capacidade de modulação do sistema complemento através do ensaio hemolítico, sendo caracterizadas como ativadoras do complemento através da via clássica. A fração D10a foi capaz de modular o sistema complemento através da via alternativa, enquanto a fração 1AERT apresentou efeitos pouco expressivos através dessa via. A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que as frações testadas podem ser classificadas como modificadoras da resposta biológica, e que ambas apresentaram as atividades imunoestimulantes e anti-inflamatórias descritas para *U. tomentosa*. As diferenças nas atividades observadas para cada fração estão relacionadas com a diferença na composição química, levando à conclusão de que a mistura de compostos bioativos é importante para a atividade apresentada por essa planta, e que a sua forma de utilização (decocto ou cápsulas fitoterápicas) interfere na atividade biológica encontrada.

Palavras-chave: *Uncaria tomentosa*, arabinogalactana-proteínas, macrófagos, sistema complemento

## ABSTRACT

*Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., a medicinal plant from the Amazon basin, popularly known as “Cat's claw”, has been widely used for its anti-inflammatory and immune-stimulant activities. In this study, two aqueous fractions, obtained from two different commercially available extracts, were chemically analyzed. These two fractions represent the major use forms of *U. tomentosa*: by decoction (fraction D10a) and phytotherapeutic capsules (1AERT). The chemical analysis demonstrated the presence of phenolic compounds (86% for D10a and 42% for 1AERT), carbohydrate compounds (45% for D10a and 28% for 1AERT), a low protein content (<10%), and absence of alkaloids (<0.01%) in those fractions. Among the carbohydrate compounds, 0.3% were arabinogalactan-proteins (AGPs) and 6 % were acidic sugars in fraction D10a, while AGPs were 23% and acidic sugars were 26% of the carbohydrate compounds in fraction 1AERT. Analysis of the monosaccharide content showed that fraction D10a consisted of Rha (28%) and Glc (56%), mainly, while fraction 1AERT consisted of Rha (8%), Ara (11%), Gal (23%) and Glc (26%). The biological activity of the fractions was evaluated in vitro through the analysis of their effect on culture cells of mouse peritoneal macrophages and on human complement system, as well. The fractions showed no cytotoxicity on the macrophages, when used in the 0.32-320 µg/ml range, for 48 hours. Fraction 1AERT was able to stimulate NO production, after 48 hours of treatment, enhancing NO production by 50%, when used at 320 µg/ml. No difference, towards cytokines production, was observed for both fractions, after incubation for 24h. Fraction D10a, at 320 µg/ml, increased TNF-α production in 125%, and IL-6 production in 1233%, while reducing IL-1β production in 85%. Fraction 1AERT, also at 320 µg/ml, increased TNF-α production in 230%, and IL-6 production in 664%, while reducing IL-1β production in 61%. None of the fractions had any effect on IL-10 production. After a 24 hours treatment, morphological analysis of the cells and the neutral red retention assay demonstrated the immune-stimulant activity of both fractions. Tests accessing the immune-stimulant activity of D10a and 1AERT fractions, showed increased phagocytosis and the typical morphology of activated macrophages in macrophages cultivated in the presence of both fractions. In addition, the fractions were evaluated for their ability to modulate the complement system, through the hemolytic assay. Results from these assays characterized both fractions as activators of the complement system through the classical pathway. Fraction D10a was able to modulate the complement system through the alternative pathway, while fraction 1AERT showed modest effects through the alternative pathway. From these results, it can be concluded that both fractions can be classified as modifiers of the biological response and presented the immune-stimulant and anti-inflammatory activities described for *U. tomentosa*. Differences in the observed activities for each fraction are related to differences in chemical composition, which leads to the conclusion that the mixture of the bioactive compounds is important for the activity showed by the plant. In addition, it can be concluded that the way the plant is used (decoction or phytotherapeutic capsules) interferes with the biological activity found.

Key-words: *Uncaria tomentosa*, arabinogalactan-proteins, macrophages, complement-system

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** - IMAGENS DA PLANTA *Uncaria tomentosa*. (A) DETALHE DO ESPINHO. (B) CAULE (CIPÓ) E FOLHAS. (C) CASCA DA RAIZ. (D) CASCA DA RAIZ PULVERIZADA..... 24
- FIGURA 2** - ALCALÓIDES REPRESENTATIVOS (MARCADORES QUÍMICOS) IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa*. (A) ALCALÓIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS (B) ALCALÓIDES OXINDÓLICOS TETRACÍCLICOS..... 29
- FIGURA 3** - OUTROS ALCALÓIDES IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa*. (A) ALCALÓIDES INDÓLICOS TETRACÍCLICOS. (B) ALCALÓIDES INDÓLICOS PENTACÍCLICOS. (C) ALCALÓIDES GLUCO-INDÓLICOS..... 30
- FIGURA 4** - TERPENÓIDES (A) E ESTERÓIS (B) IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa*..... 32
- FIGURA 5** - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FENÓLICOS PRESENTES NA *Uncaria tomentosa*..... 33
- FIGURA 6** - MODELO ESTRUTURAL HIPOTÉTICO DA UMA MOLÉCULA DE AGP..... 38
- FIGURA 7** - VISÃO GERAL DAS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO..... 48
- FIGURA 8** - ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ATRAVÉS DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS SEQUENCIAIS..... 55
- FIGURA 9** - DIFERENTES FORMAS DE PREPARO DA DECOÇÃO DA CASCA DA RAIZ DE *Uncaria tomentosa*, SEGUINDO DOSAGEM RECOMENDADA PELO ÍNDICE TERAPÊUTICO FITOTERÁPICO (ITF) DE 2008..... 56
- FIGURA 10** - OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA DECOÇÃO SEGUIDA DE PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA..... 57
- FIGURA 11** - PERFIL MONOSSACARÍDICO OBTIDO EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa*..... 82
- FIGURA 12** - GEL DE AGAROSE COM O REAGENTE B-GlcY PARA A DETECÇÃO DE AGPs DAS FRAÇÕES: **A/A'** - AMOSTRA 1AERT (10 mg/ml). **B/B'** - 2AERT (10 mg/ml). **C** - AEHOT (10 mg/ml). **D/D'** - D10a (60 mg/ml). **E/E'** - EP-D10a (60 mg/ml)..... 85

<b>FIGURA 13</b> - PERCENTAGEM DE AGP EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE CARBOIDRATO TOTAL DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	85
<b>FIGURA 14</b> - PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDO EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DAS FRAÇÕES AQUOSAS EERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	88
<b>FIGURA 15</b> - ESPECTRO PARCIAL DE RMN- <sup>13</sup> C (REGIÃO 115 A 45 PPM) DA FRAÇÃO 1AERT EM D <sub>2</sub> O, A 70°C.....	91
<b>FIGURA 16</b> - ESPECTRO PARCIAL DE RMN- <sup>13</sup> C (REGIÃO 115 A 55 PPM) DA FRAÇÃO AEHOT EM D <sub>2</sub> O, A 70°C.....	92
<b>FIGURA 17</b> - ESPECTRO PARCIAL DE RMN- <sup>13</sup> C (REGIÃO 115 A 45 PPM) DA FRAÇÃO D10a EM D <sub>2</sub> O, A 70°C.....	92
<b>FIGURA 18</b> - ESPECTROS DE FT-IR (REGIÃO DE 4000 A 400 cm <sup>-1</sup> ) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	94
<b>FIGURA 19</b> - ESPECTROS DE FT-IR (REGIÃO DE 4000 A 400 cm <sup>-1</sup> ) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS 1AERT, 2AERT E AEHOT DE <i>Uncaria tomentosai</i> .....	96
<b>FIGURA 20</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	98
<b>FIGURA 21</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	100
<b>FIGURA 22</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> APÓS 24h (A) E 48h (B) DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISSOSSOMOS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	102
<b>FIGURA 23</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 (A) E TNF-ALFA (B) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	104
<b>FIGURA 24</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 BETA (A) E IL-10 (B) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	105

<b>FIGURA 25</b> - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A AMOSTRA D10A DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS.....	116
<b>FIGURA 26</b> - EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A AMOSTRA 1AERT DE <i>Uncaria tomentosa</i> SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS.....	117
<b>FIGURA 27</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> , E DA HEPARINA NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA CLÁSSICA. (A) SEM PRÉ-INCUBAÇÃO. (B) COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS.....	121
<b>FIGURA 28</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE <i>Uncaria tomentosa</i> , E DA HEPARINA NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA ALTERNATIVA. (A) SEM PRÉ-INCUBAÇÃO. (B) COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS.....	123
<b>FIGURA 29</b> - EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT (A) E D10a (B) DE <i>Uncaria tomentosa</i> , E DA HEPARINA (C) NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA ALTERNATIVA, COM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO (0 A 60 MINUTOS) DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS.....	125
<b>FIGURA 30</b> - VALORES DE ICH50 DAS FRAÇÕES 1AERT (A) E D10a (B) DE <i>Uncaria tomentosa</i> , E DA HEPARINA (C) OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO CINÉTICO DA EHC-VA COM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS.....	128

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b> - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA PLANTA <i>Uncaria tomentosa</i> .....	23
<b>TABELA 2</b> - ESTUDOS DE FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL REALIZADOS COM AMOSTRAS DA PLANTA <i>Uncaria tomentosa</i> .....	26
<b>TABELA 3</b> - ESTUDOS DE FARMACOLOGIA CLÍNICA REALIZADOS COM AMOSTRAS DA PLANTA <i>Uncaria tomentosa</i> .....	27
<b>TABELA 4</b> - PAREDE CELULAR VEGETAL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS.....	36
<b>TABELA 5</b> - EFEITOS BIOLÓGICOS DE ARABINOGALACTANAS, ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS.....	40
<b>TABELA 6</b> - MEDIADORES DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS MACRÓFAGOS.....	43
<b>TABELA 7</b> - FONTES DO MATERIAL VEGETAL ( <i>Uncaria tomentosa</i> ) UTILIZADO PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS.....	54
<b>TABELA 8</b> - GRADIENTE UTILIZADO NAS ANÁLISES DOS ALCALÓIDES POR CLAE.....	65
<b>TABELA 9</b> - CONTROLES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS COM O SISTEMA COMPLEMENTO.....	76
<b>TABELA 10</b> - FRAÇÕES DE <i>Uncaria tomentosa</i> OBTIDAS APÓS OS DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÕES.....	78
<b>TABELA 11</b> - RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE <i>Uncaria tomentosa</i> OBTIDAS POR EXTRAÇÃO LABORATORIAL SEQUENCIAL E DECOCCÃO.....	79
<b>TABELA 12</b> - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	83
<b>TABELA 13</b> - COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AERT-YPF.....	87
<b>TABELA 14</b> - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS SOBRE O EFEITO DAS FRAÇÕES D10a E 1AERT NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, TNF-ALFA, IL-1 BETA E IL-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS.....	107

**TABELA 15** - ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS SOBRE O EFEITO DAS FRAÇÕES D10a E 1AERT DE *U. tomentosa* NA MODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO ATRAVÉS DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA..... 130

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1AERT	- 1ª Extração aquosa à temperatura ambiente
2AERT	- 2ª Extração aquosa à temperatura ambiente
Ac	- Anticorpo
AEHOT	- Extração aquosa a quente
Ag	- Antígeno
AGPs	- Arabinogalactana-proteínas
Ags	- Arabinogalactanas
AIDS	- Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANOVA	- Análise de variância
AR	- Artrite reumatóide
BRM	- Modificadores da resposta biológica
<i>bw</i>	- <i>body weight</i> – peso corporal
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
$\text{ClO}^-$	- Ânion hipoclorito
$\delta$	- Deslocamento químico
D.O.	- Densidade óptica
D-	- Decocto
$\text{D}_2\text{O}$	- Água deuterada
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DXR	- Doxorubicina
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EERT	- Extração etanólica a temperatura ambiente
EGTA	- Ácido etilenoglicol tetra-acético
EHC-VA	- Ensaio hemolítico do complemento - via alternativa
EHC-VC	- Ensaio hemolítico do complemento - via clássica
ELISA	- <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EP-	- Precipitado com etanol
EtOH	- Etanol
FT	- Transformada de Fourier
FT-IR	- Espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa
GF	- Fator de crescimento
GLC	- Cromatografia líquido-gasosa
GM-CSF	- Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos
GPI	- Glicosilfosfatidilinositol
GSF	- Fatores estimulantes de colônia
HA	- Tampão HEPES da via alternativa
HC	- Tampão HEPES da via clássica

HEPES	- N-(2-hidroxietil) piperazina N' (ácido 2-etano sulfônico)
HRGP	- Glicoproteínas vegetais ricas em hidroxiprolina
ICH <sub>50</sub>	- Inibição da hemólise induzida pelo complemento em 50%
IFN	- Interferon
Ig	- Imunoglobulina
IκB	- Subunidade inibidora do NF-κB
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível
ITF	- Índice Terapêutico Fitoterápico
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
LTDA	- Limitada
MAC	- Complexo de ataque à membrana
MBL	- Lectina sérica ligadora de manose
M-CSF	- Fator de estimulação de colônias de macrófagos
MEM	- Meio essencial mínimo de Eagle
MHS	- Mistura de soro humano
MTT	- Brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
n.e.	- Não estabelecido
NBT	- Nitroazul de tetrazólio
NF-κB	- Fator nuclear Kappa B
NO	- Óxido nítrico
NO <sub>2</sub>	- Dióxido de nitrogênio
NOS	- Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Ânion superóxido
OAs	- Alcalóides oxindólicos
OH <sup>•</sup>	- Radicais hidroxilas
PBS	- Solução de salina tamponada
PHA	- Fitohemoglutina
PLC	- Fosfolipase C
PLD	- Fosfolipase D
q.s.p.	- Quantidade suficiente para
RMN- <sup>13</sup> C	- Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze
ROIs	- Intermediários reativos de oxigênio
S-	- Sobrenadante
TCA	- Ácido tricloroacético
TFA	- Ácido trifluoroacético
THP <sub>1</sub>	- Linha celular da leucemia humana aguda monocítica
TLR	- Receptores <i>Toll-like</i>
TNF-α	- Fator de necrose tumoral
tr	- Traços
TRIS	- Hidroximetil aminometano
UV	- Ultravioleta

YPF - Fração precipitada com Yariv  
 $\beta$  - GlcY -  $\beta$ -glucosil Yariv

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>23</b>
2.1	<i>Uncaria tomentosa</i> .....	23
2.1.1	Informações botânicas.....	23
2.1.2	Histórico – Utilização na medicina tradicional.....	24
2.1.3	Uso popular.....	25
2.1.4	Estudos de farmacologia experimental e clínica.....	25
2.1.5	Compostos ativos.....	27
2.1.5.1	Alcalóides.....	28
2.1.5.2	Terpenóides.....	30
2.1.5.3	Fenóis.....	33
2.1.5.4	Outros compostos.....	33
2.2	ARABINOGALACATANA-PROTEÍNAS.....	35
2.2.1	AGPs e outros polissacarídeos relacionados e plantas medicinais.....	39
2.3	O SISTEMA IMUNE.....	41
2.3.1	Macrófagos.....	41
2.3.1.1	Fagocitose.....	42
2.3.1.2	Atividade citotóxica.....	43
2.3.1.3	Síntese e liberação de fatores (citocinas, componentes do complemento e enzimas hidrolíticas) .....	45
2.3.2	Sistema complemento.....	46
2.3.2.1	Via clássica.....	48
2.3.2.2	Via alternativa.....	49
2.3.2.3	Via das lectinas.....	49
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>51</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>53</b>
4.1	OBJETIVO GERAL.....	53
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	53
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>54</b>
5.1	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>U. TOMENTOSA</i> .....	54
5.1.1	Material vegetal.....	54

5.1.2	Extrações laboratoriais sequenciais.....	54
5.1.3	Decocção.....	56
5.1.4	Extração e purificação de arabinogalactana-proteínas (AGPs) obtidas de <i>U. tomentosa</i> .....	57
5.2	ANÁLISES QUÍMICAS.....	58
5.2.1	Dosagens colorimétricas.....	58
5.2.1.1	Carboidrato total.....	59
5.2.1.2	Ácidos urônicos.....	59
5.2.1.3	Proteínas.....	60
5.2.1.4	Fenol total.....	60
5.2.1.5	Amido.....	61
5.3	ENSAIO DE DIFUSÃO RADIAL EM GEL DE AGAROSE PARA QUANTIFICAÇÃO DE AGPS.....	62
5.4	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	62
5.4.1	Cromatografia de camada delgada.....	62
5.4.2	Cromatografia líquida gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS).....	63
5.4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	64
5.5	ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS.....	65
5.5.1	Espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR) .....	65
5.5.2	Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN- <sup>13</sup> C) .....	66
5.6	EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS – MODELOS ANIMAIS <i>in vitro</i> .....	66
5.6.1	Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos albinos Swiss....	66
5.6.2	Preparo das soluções-teste utilizadas nos experimentos com culturas de macrófagos.....	67
5.6.3	Obtenção de macrófagos peritoneais.....	68
5.6.4	Determinação da viabilidade celular.....	69
5.6.4.1	Método do azul de tripan.....	69
5.6.4.2	Método do MTT.....	69
5.6.4.3	Determinação da produção de óxido nítrico pelas culturas de macrófagos crescidas na ausência e presença das frações estudadas.....	70
5.6.4.4	Avaliação da retenção de lisossomos em culturas de macrófagos crescidas na ausência e na presença das frações estudadas.....	71
5.6.4.5	Dosagem de citocinas produzidas pela cultura de macrófagos crescidas ausência e na presença das frações estudadas.....	71

5.6.4.6	Análises morfológicas.....	72
5.7	TESTES DE FIXAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	73
5.7.1	Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro e coelho.....	73
5.7.2	Obtenção de soro humano.....	74
5.7.3	Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento.....	75
5.7.4	Avaliação da via clássica.....	75
5.7.5	Avaliação da via alternativa.....	77
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	77
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>78</b>
6.1	RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Uncaria tomentosa</i> POR DIFERENTES METODOLOGIAS (EXTRAÇÃO LABORATORIAL SEQUENCIAL E DECOCÇÕES).....	78
6.1.1	Dosagens colorimétricas.....	79
6.1.2	Determinação da composição monossacarídica neutra e ácida.....	81
6.1.3	Dosagem de AGPs.....	84
6.1.4	Obtenção e caracterização química da fração AERT-YPF.....	86
6.1.5	Determinação da presença de metabólitos especiais.....	87
6.1.6	Dosagem de alcalóides.....	89
6.1.7	Análises de espectroscopia de RMN- <sup>13</sup> C das frações 1AERT e D10a.....	89
6.1.8	Análises dos espectros de infravermelho.....	93
6.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	97
6.2.1	Efeito das frações 1AERT e D10a na viabilidade celular dos macrófagos.....	97
6.2.2	Produção de NO pelas culturas de macrófagos na presença e ausência das frações de <i>U. tomentosa</i> .....	99
6.2.3	Retenção de lisossomos.....	101
6.2.4	Dosagem de citocinas.....	103
6.2.5	Análises morfológicas.....	115
6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIXADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE <i>Uncaria tomentosa</i> .....	118
6.4	LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (LPS).....	133
6.5	DISCUSSÃO FINAL.....	134

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>139</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>141</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>163</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O conhecimento das plantas medicinais da Amazônia por povos tribais é relatado na literatura científica e bastante utilizado na medicina tradicional (HERNDON *et al.*, 2009). Os produtos naturais são considerados excelentes fontes para a descoberta de novos fármacos, dada a sua diversidade estrutural e grande variedade de atividades biológicas (FU; PANG; WONG, 2008). Vários efeitos imunomoduladores são atribuídos a plantas medicinais (ACTOR; DASGRUPTA, 2003; SPELMAN *et al.*, 2006), com grande potencial para o uso como agentes farmacológicos no tratamento de disfunções do sistema imunológico (CLEMENT-KRUZEL *et al.*, 2008).

A *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C., planta nativa da floresta amazônica e popularmente conhecida como unha-de-gato, é utilizada como um remédio natural e empregada em diversas aplicações terapêuticas de uma variedade de doenças, tais como artrite, gastrite, reumatismo e inflamações em geral (BLUMENTHAL *et al.*, 2003). Pesquisas envolvendo o extrato aquoso da *U. tomentosa*, principal forma de utilização dessa planta pela população, demonstraram que os compostos ativos presentes apresentaram atividade anti-inflamatória, antitumorigênica e imunomoduladora (SANDOVAL *et al.*, 2000; SHENG *et al.*, 1998; LEMAIRE *et al.*, 1999). Por muito tempo foi atribuído aos alcalóides oxindólicos, compostos presentes na unha-de-gato, a eficácia apresentada no uso dessa planta na medicina tradicional (SHENG *et al.*, 2005). Entretanto, extratos aquosos com baixas quantidades desses alcalóides ainda mostraram atividades biológicas eficazes (SHENG *et al.*, 2005), indicando que outros compostos poderiam ser responsáveis pelas atividades biológicas da *U. tomentosa*.

Moléculas encontradas na parede celular de plantas, conhecidas como arabinogalactana-proteínas (AGPs) e geralmente encontradas em extratos aquosos, poderiam ser responsáveis pela atividade biológica apresentada pela *U. tomentosa* (OKUMURA, 2009), pois estudos demonstraram que as AGPs são capazes de induzir *in vitro* a proliferação e produção de IgM em linfócitos e a produção de nitrito e IL-6 em macrófagos de camundongos (CLASSEN *et al.*, 2006); aumentar o potencial de lise (*in vitro*) das proteínas do sistema complemento (vias clássica e alternativa) sobre hemácias (ALBAN *et al.*, 2002); além de se ligarem à superfície celular de leucócitos humanos (THUDE *et al.*, 2006).

Tendo em vista que AGPs de outras plantas são potentes agentes moduladores positivos do sistema imune (YAMADA *et al.*, 1985; CLASSEN; BLASCHEK, 2002, 2006; THUDE *et al.*, 2006) a hipótese de que as AGPs de *U. tomentosa* poderiam ser responsáveis pela atividade imunomoduladora de extratos aquosos dessa planta precisa ser investigada.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Uncaria tomentosa*

#### 2.1.1 Informações botânicas

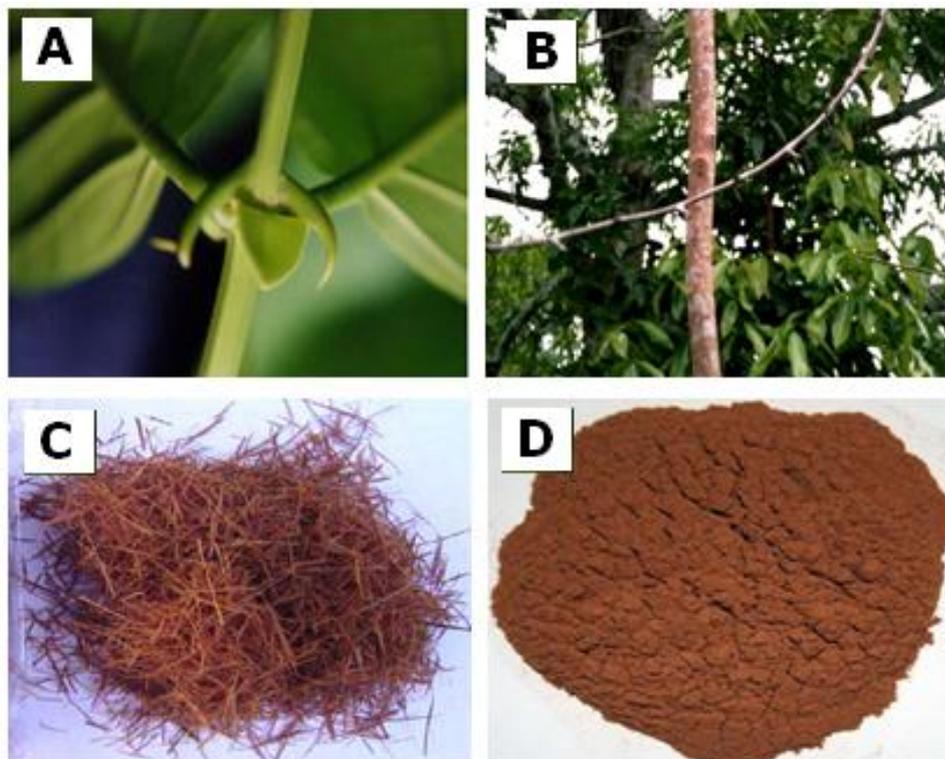
*Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. é uma planta pertencente à família Rubiaceae (TABELA 1) e popularmente conhecida como unha-de-gato, devido aos espinhos curvados presentes nas axilas foliares (FIGURA 1-A). Outra espécie com características morfoanatômicas muito similares, *Uncaria guianensis*, é também conhecida como “unha-de-gato”. Porém, nesta dissertação, esse termo se refere somente à *Uncaria tomentosa*.

**TABELA 1** - CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DA PLANTA *Uncaria tomentosa*

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Divisão</b>	Magnoliophyta
<b>Classe</b>	Magnoliopsida
<b>Subclasse</b>	Asteridae
<b>Ordem</b>	Rubiales
<b>Família</b>	Rubiaceae
<b>Gênero</b>	<i>Uncaria</i>
<b>Espécie</b>	<i>U. tomentosa</i>
<b>Nome binomial</b>	<i>Uncaria tomentosa</i> (Willd.) DC.

FONTE: Adaptado de CRONQUIST (1988)

Nativa da floresta amazônica, a unha-de-gato é uma trepadeira lenhosa que pode atingir uma altura de 20 a 30 metros (FIGURA 1-B). Sua distribuição geográfica abrange a América Central e o norte da América do Sul, incluindo Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, Nicarágua, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago e Venezuela (HÄNSEL *et al.*, 1992; TEPPNER; KEPLINGER; WETSCHING, 1984; CABIESES, 1994).



**FIGURA 1** – IMAGENS DA PLANTA *Uncaria tomentosa*. (A) DETALHE DO ESPINHO. (B) CAULE (CIPÓ) E FOLHAS. (C) CASCA DA RAIZ. (D) CASCA DA RAIZ PULVERIZADA

FONTE: <http://herbalguides.com/guides/cats-claw>; <http://www.rain-tree.com/Plant-Images/cats-claw-pic.htm>; <http://ccbolgroup.com/hierbas3E.html#CATS>; <http://psychoactiveherbs.com/catalog/index.php?cPath=160>

### 2.1.2 Histórico – Utilização na medicina tradicional

Registros de 2000 anos atrás indicam que a unha-de-gato já era utilizada pelos Incas e povos indígenas do Peru – Asháninka, Aguaruna, Cashibo e Canibo – para o tratamento de doenças como asma, artrite e reumatismo, além de inflamações em geral (TAYLOR, 2002).

O sucesso do seu uso pelas populações indígenas despertou a atenção de médicos da região, que passaram a receitar os decoctos de *Uncaria tomentosa* para o tratamento de câncer, com relatos de cura (JONG *et al.*, 1999). Em função dessas possíveis atividades anticarcinogênicas, a unha-de-gato ganhou grande destaque na comunidade científica a partir da década de 70, quando o pesquisador Klaus Keplinger, ao levar espécies da *Uncaria* para Innsbruck (Áustria), descobriu os primeiros alcalóides ativos dessa planta (JONG *et al.*, 1999). A partir de então, outros compostos químicos presentes na unha-de-gato já foram relatados. Em 1991, a unha-de-gato tornou-se ainda mais popular após sua promoção por Andres Garcia,

um ator popular mexicano, que declarou ter sido curado de um câncer de próstata através do uso dessa planta (JONG *et al.*, 1999). Somente em 1994, em uma conferência internacional realizada na Suíça, a unha-de-gato foi reconhecida oficialmente como planta medicinal pela Organização Mundial de Saúde (LORENZI; MATOS, 2008).

### 2.1.3 Uso popular

O extrato aquoso obtido por decocção (decocto) é a principal forma de utilização da unha-de-gato e consiste no cozimento em água de cascas, raízes, sementes e outras partes duras das plantas (ITF, 2008). As partes utilizadas são as folhas e a casca da raiz e do cipó (FIGURA 1-C). A segunda principal forma de utilização dessa planta é em forma de cápsulas, contendo casca da raiz ou do caule na forma pulverizada (FIGURA 1-D), ou extrato aquoso liofilizado. Diferente dos decoctos, esses materiais são padronizados em relação ao teor de mitrafilina, um alcalóide presente na unha-de-gato, considerada o composto marcador dessa planta medicinal. Além disso, há outras formas de comercialização com valor agregado, como pastilhas, unguentos (uso tópico), xaropes, saches filtrantes, bombons, balas, etc. (REVILLA, 2000).

### 2.1.4 Estudos de farmacologia experimental e clínica

Como descrito anteriormente, as pesquisas científicas tiveram início em 1970, para se investigar os benefícios da planta *U. tomentosa* no alívio dos sintomas do câncer, artrite e outras doenças. Em 1982, KEPLINGER e colaboradores demonstraram a capacidade dos extratos aquosos dessa planta em atuar no sistema digestório, ajudando pacientes com a doença de Crohn, colite, gastrite, além de tratar sintomas de reumatismo. Em 1986, um estudo realizado pelos mesmos pesquisadores indicou que os alcalóides encontrados nas raízes dessa planta eram capazes de estimular o sistema imunológico (STEINBERG, 1995). Em 1990, os glicosídeos do ácido quinóico, outros compostos presentes nos extratos da *Uncaria tomentosa*, passaram também a serem investigados e apresentaram atividade

antiviral (AQUINO *et al.*, 1990). A atividade antimutagênica da *Uncaria tomentosa* foi investigada em um estudo realizado por RIZZI e colaboradores em 1993, no qual os extratos da planta apresentaram um efeito protetor *in vitro* contra fotomutagênese induzida por 8-metoxipsoraleno e UVA em *S. typhimurium* TA 102.

As TABELAS 2 e 3 apresentam alguns estudos utilizando extratos da planta *U. tomentosa* entre os anos de 1997 e 2004.

**TABELA 2 - ESTUDOS DE FARMACOLOGIA EXPERIMENTAL REALIZADOS COM AMOSTRAS DA PLANTA *Uncaria tomentosa***

	<b>Amostra</b>	<b>Informações sobre os experimentos</b>	<b>Refs.</b>
<b>Atividade Anti-inflamatória</b>	extrato indefinido da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i>	O extrato inibiu a expressão do gene da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), por lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), a formação de nitrito e a morte celular, além de ativar o fator de transcrição nuclear – $\kappa\beta$ em macrófagos. A administração oral do extrato aquoso atenuou enterite provocada por indometacina em roedores.	(SANDOVAL-CHACON <i>et al.</i> , 1998)
	decocto da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i>	Os efeitos da amostra na produção do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em macrófagos de ratos estimulados com LPS foram avaliadas <i>in vitro</i> . O decocto suprimiu a produção de TNF- $\alpha$ em aproximadamente 65–85%.	(SANDOVAL <i>et al.</i> , 2000)
<b>Atividade Antitumorígenica</b>	extrato aquoso da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i>	Estudos <i>in vitro</i> demonstraram que a proliferação de células leucêmicas humanas (HL60) e uma linhagem de linfoma B humana, transformada pelo vírus Epstein-Bar, foram fortemente suprimidas na presença do extrato aquoso da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i> . O efeito supressor foi provocado pela indução de apoptose.	(SHENG <i>et al.</i> , 1998)
<b>Atividade Imunoestimulante</b>	extratos comerciais da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i>	O tratamento ( <i>in vitro</i> ) com os extratos comerciais da casca do cipó (em solução salina fosfato) provocaram a estimulação da produção de interleucina-1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6) por macrófagos alveolares de ratos. Em macrófagos estimulados com LPS, os extratos potenciaram os efeitos excitatórios do LPS na produção de IL-1 e IL-6, indicando um efeito ativador do sistema imune.	(LEMAIRE <i>et al.</i> , 1999)
	extrato aquoso da casca de cipó de <i>U. tomentosa</i>	Os efeitos imunomodulatórios foram avaliados após administração intragástrica da amostra em ratos. A proliferação de leucócitos estimulada por fitohemaglutinina (PHA) foi significativamente aumentada em esplenócitos de ratos tratados com doses de 40 mg/kg e 80 mg/kg <i>bw</i> ( <i>body weight</i> – peso corporal). Os níveis de glóbulos brancos dos grupos tratados com 40 mg/kg <i>bw</i> e 80 mg/kg por dia, durante oito semanas, ou 160 mg/kg <i>bw</i> por dia, durante quatro semanas, tiveram um aumento significativo quando comparados com os controles.	(SHENG; PERO; WAGNER, 2000)
<b>Teste de Toxicidade</b>	extrato aquoso da casca de cipó de <i>U. tomentosa</i>	A dose média letal e tóxica de uma única dose oral da amostra em ratos foi maior que 800 mg/kg <i>bw</i> . Apesar de os ratos serem tratados diariamente com extratos aquosos nas doses de 10 a 80 mg/Kg <i>bw</i> , por 8 semanas, ou 160 mg/kg <i>bw</i> por 4 semanas, nenhum sintoma de toxicidade aguda ou crônica foram observados. Além disso, nenhuma mudança no peso corporal, consumo de alimento, peso dos órgãos e mudanças patológicas nos rins, fígado, baço e coração, foi encontrada e associada ao tratamento.	(SHENG; PERO; WAGNER, 2000)
	extrato aquoso da casca do cipó de <i>U. tomentosa</i>	A amostra foi analisada para detectar a presença de compostos tóxicos nas células de ovário de <i>hamster</i> chineses e em células bacterianas ( <i>Photobacterium phosphoreum</i> ) <i>in vitro</i> . Nas concentrações de 10 a 20 mg.mt <sup>-1</sup> , os extratos não foram citotóxicos.	(SANTA MARIA <i>et al.</i> , 1997)

FONTE: O autor (2010)

**TABELA 3** - ESTUDOS DE FARMACOLOGIA CLÍNICA REALIZADOS COM AMOSTRAS DA PLANTA *Uncaria tomentosa*

	<b>Amostra</b>	<b>Informações sobre os experimentos</b>	<b>Refs.</b>
<b>Atividade Anti-inflamatória</b>	<i>U. tomentosa</i> ( <i>não detalhada</i> )	Piscoya e colaboradores, em um estudo duplo-cego controlado por placebo, com 45 pacientes portadores osteo-artrite do joelho, demonstram que a <i>U. tomentosa</i> representou um tratamento anti-inflamatório efetivo, diminuindo os sintomas dolorosos, sem efeitos deletérios no quadro hematológico ou na função hepática, utilizando 100 mg/dia por via oral durante 4 semanas consecutivas. A incidência e a freqüência de eventos adversos não foram diferentes do grupo placebo.	(GANZERA <i>et al.</i> , 2001)
	extrato de casca de cipó <i>U. tomentosa</i>	Administração oral de duas doses de 350 mg da amostra, contendo 0,05% de alcalóides oxindólicos e de 8 a 10% de carboxil ésteres, por dia, em voluntários humanos, estimularam o sistema imune, evidenciado pela elevação da taxa linfócitos/neutrófilos no sangue periférico e a decaimento reduzido em 5 meses, em 12 sorotipos, dos títulos de anticorpos da resposta à vacinação pneumocócica	(LAMM; SHENG; PERO, 2001)
<b>Teste de Toxicidade</b>	<i>U. tomentosa</i> ( <i>não detalhada</i> )	Em um grupo de voluntários humanos sadios, doses diárias de 5 mg/kg por via oral, durante 6 semanas consecutivas não evidenciaram toxicidade.	(LAUS, 2004)
	extrato aquoso da casca do cipó da <i>U. tomentosa</i>	Em outro estudo semelhante, um extrato aquoso da casca do cipó foi administrado para quatro voluntários humanos sadios, em doses diárias de 5 mg/kg por 6 semanas consecutivas. Nenhum efeito colateral foi relatado a julgar pela hematologia, alterações no peso corporal, diarreia, constipação, cefaléia, náusea, vômito, erupções cutâneas, edema e dor. Um significativo aumento no número de glóbulos brancos foi observado após 6 semanas de tratamento.	(SHENG; BRYNGELSSO N; PERO, 2000)

FONTE: O autor (2010)

### 2.1.5 Compostos ativos

O grupo dos produtos naturais inclui duas grandes classes: os metabólitos primários ou essenciais e os metabólitos secundários ou especiais.

Fazem parte do metabolismo primário, principalmente produtos que permitem a sobrevivência, o crescimento e a reprodução da planta. Eles compreendem os carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos, citocromos, clorofila, intermediários das vias anabólicas e catabólicas e nucleotídeos. Os metabólitos

primários são considerados, portanto, essenciais à sobrevivência das plantas (ALDRED, 2009).

Uma grande variedade de outras substâncias, denominadas metabólitos secundários ou especiais, também são produzidas pelas plantas. Os metabólitos secundários cumprem importantes funções na reprodução vegetal e defesa, como por exemplo, na proteção contra os animais predadores, bactérias, vírus, fungos ou parasitas; atração de polinizadores, entre outros (TAIZ; ZEIGER, 2006).

Os compostos secundários das plantas são geralmente classificados de acordo com suas vias biossintéticas. As três grandes famílias são: fenóis, terpenos e esteróides e ainda alcalóides (BOURGAUD *et al.*, 2001).

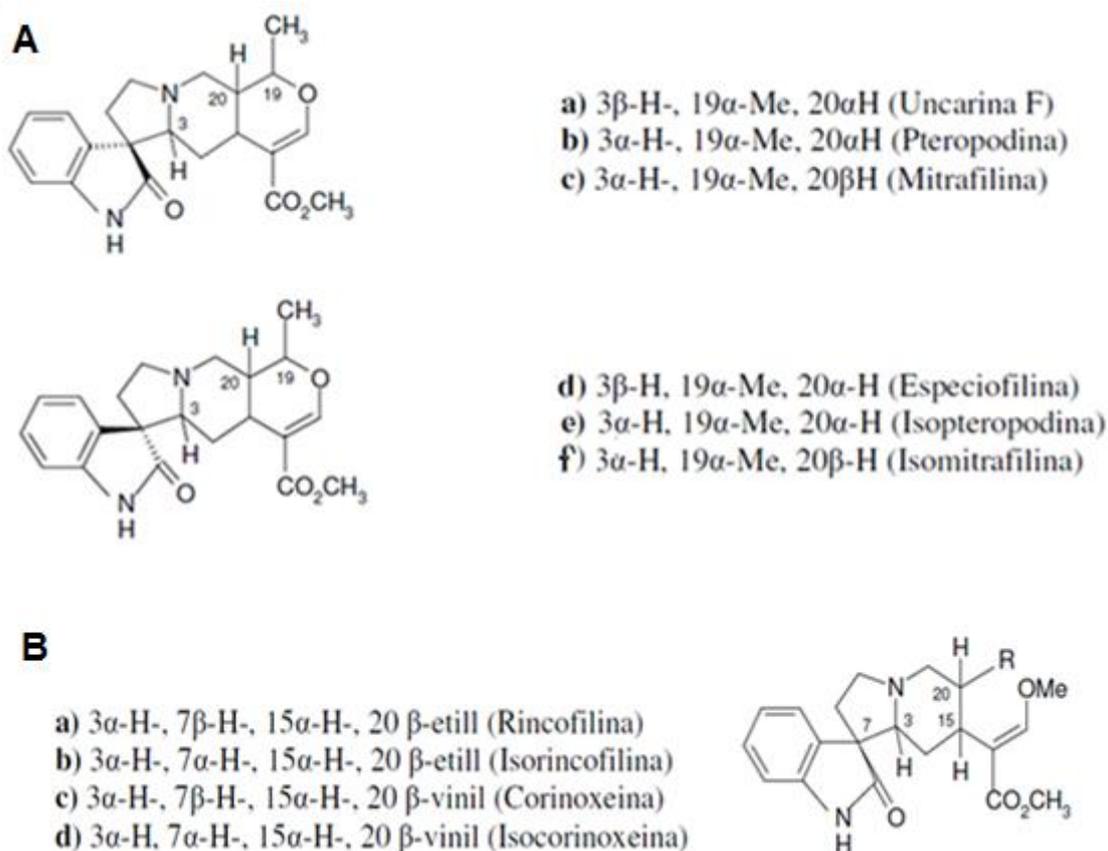
A casca da unha-de-gato contém uma série de metabólitos secundários, tais como alcalóides oxindólicos (OAs), polifenóis (flavonóides, proantocianidinas e taninos), terpenos (glicosídeos do ácido quinóico, triterpenos poliidroxilados) e saponinas (WAGNER; KREUTZKAMP; JURCIC, 1985; AQUINO *et al.*, 1989, 1990; LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997).

#### 2.1.5.1 Alcalóides

Os alcalóides pertencem ao grupo dos metabólitos secundários que são sintetizados a partir de aminoácidos, podendo conter de um a vários átomos de nitrogênio como constituintes dos anéis heterocíclicos (BOURGAUD *et al.*, 2001). Apresentam baixa massa molecular e são encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas (YAZAKI, 2006).

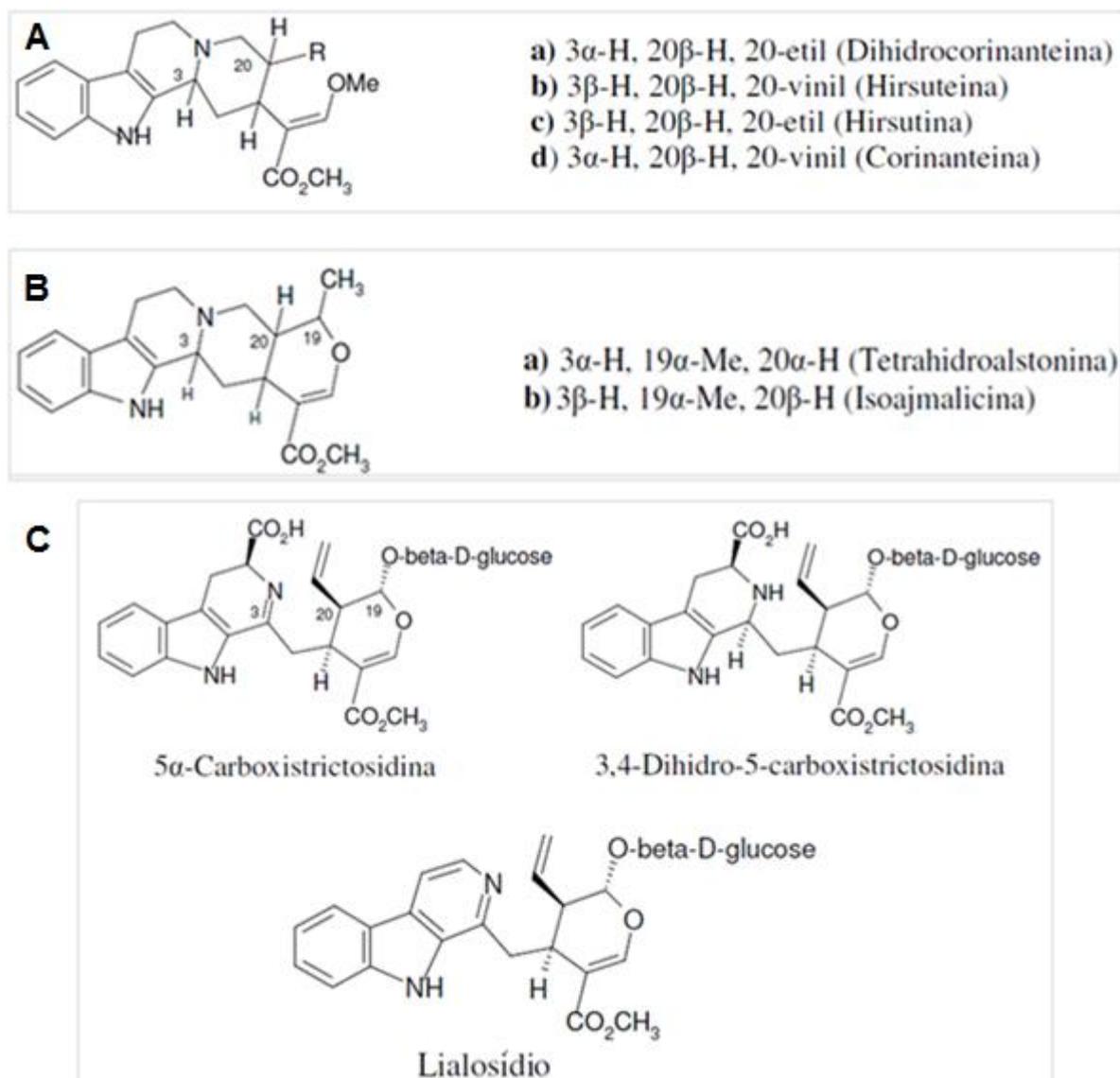
Os alcalóides podem ser classificados em tetracíclicos ou pentacíclicos, em relação à sua cadeia cíclica de carbonos, e/ou de acordo com o componente indólico presente na estrutura (indoalcalóides ou oxindoalcalóides) (WHO, 2007). Na *U. tomentosa*, encontram-se principalmente os oxindólicos pentacíclicos, os quais são considerados compostos marcadores dessa planta (GANZERA; MUHAMMAD; KHAN, 2001), como: uncarina F (FIGURA 2-Aa), pteropodina (FIGURA 2-Ab), mitrafilina (FIGURA 2-Ac), especiofilina (FIGURA 2-Ad), isopteropodina (FIGURA 2-Ae) e isomitrafalina (FIGURA 2-Af). Os oxindólicos tetracíclicos presentes incluem rincofilina (FIGURA 2-Ba), isorincofilina (FIGURA 2-Bb), corinoxeína (FIGURA 2-Bc)

e isocorinoxéina (FIGURA 2-Bd) (HÄNSEL *et al.*, 1992; LAUS; KEPLINGER, 1994; LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997; FARNSWORTH, 2002; REINHARD, 1997).



**FIGURA 2** - ALCALÓIDES REPRESENTATIVOS (MARCADORES QUÍMICOS) IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa*. (A) ALCALÓIDES OXINDÓLICOS PENTACÍCLICOS (B) ALCALÓIDES OXINDÓLICOS TETRACÍCLICOS  
 FONTE: MARQUES (2008)

A *Uncaria tomentosa* também apresenta outros alcalóides indólicos tetracíclicos, incluindo dihidrocorinanteína (FIGURA 3-Aa) e hirsutina (FIGURA 3-Ac), vestígios de hirsuteína (FIGURA 3-Ab) e corinanteína (FIGURA 3-Ad); e alcalóides indólicos pentacíclicos, como tetrahydroalstonina (FIGURA 3-Ba) e isoajmalicina (FIGURA 3Bb) (LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997); além de alcalóides gluco-indólicos, tais como a 5  $\alpha$ -carboxistrictosidina; a 3,4-dihidro-5-carboxistrictosidina e o lialosídio (FIGURA 3-C) (MARQUES, 2008).



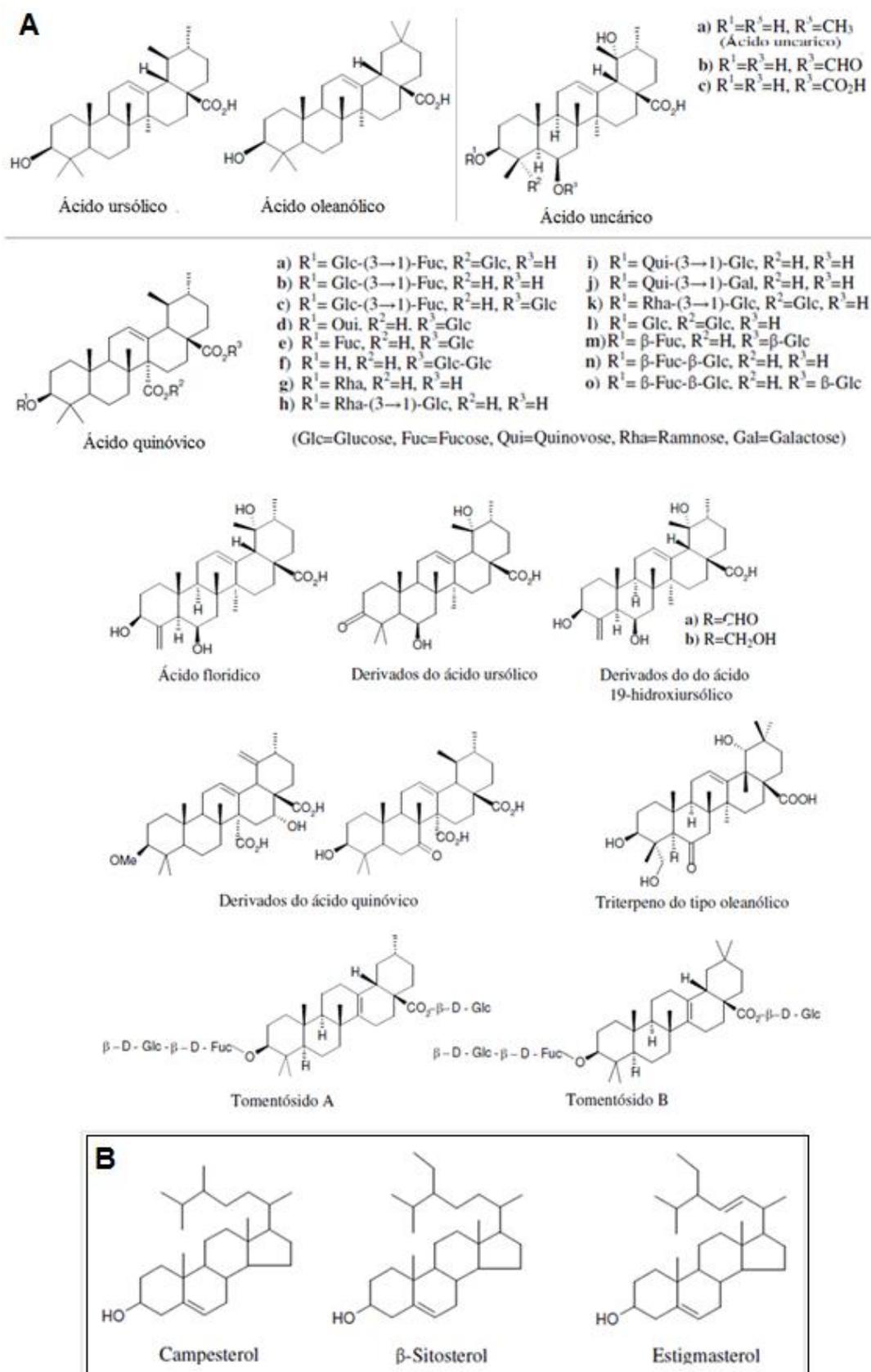
**FIGURA 3** – OUTROS ALCALÓIDES IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa*. (A) ALCALÓIDES INDÓLICOS TETRACÍCLICOS. (B) ALCALÓIDES INDÓLICOS PENTACÍCLICOS. (C) ALCALÓIDES GLUCO-INDÓLICOS  
 FONTE: MARQUES (2008)

### 2.1.5.2 Terpenóides

Os terpenóides são, provavelmente, os metabólitos secundários mais divergentes em relação à estrutura química (YAZAKI, 2006). Possuem esqueleto de carbono semelhante ao isopreno [ $\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{CH}=\text{CH}_2$ ], que consiste em uma molécula com 5 carbonos, ou unidade  $\text{C}_5$ . De acordo com o número de unidades monoméricas  $\text{C}_5$  presentes são classificados como:  $\text{C}_5$  hemiterpenos,  $\text{C}_{10}$  monoterpenos,  $\text{C}_{15}$  sesquiterpenos,  $\text{C}_{20}$  diterpenos,  $\text{C}_{25}$  sesterterpenos,  $\text{C}_{30}$

triterpenos,  $C_{40}$  tetraterpenos (carotenoides) e  $C_{5n}$  politerpenos (IUPAC, 1997). Uma subclasse dos triterpenos (com seis unidades de  $C_5$ ) são os esteróis, que derivavam biogeneticamente dos triterpenos e são quimicamente semelhantes aos hormônios esteróides dos animais (MARQUES, 2008).

A *Uncaria tomentosa* contém principalmente triterpenos derivados do ácido ursólico, oleanólico e quinóico, este último normalmente encontrado na forma glicosilada (MARQUES, 2008). As FIGURAS 4-A e 4-B apresentam alguns terpenóides e esteróis presentes na *Uncaria tomentosa*, respectivamente.

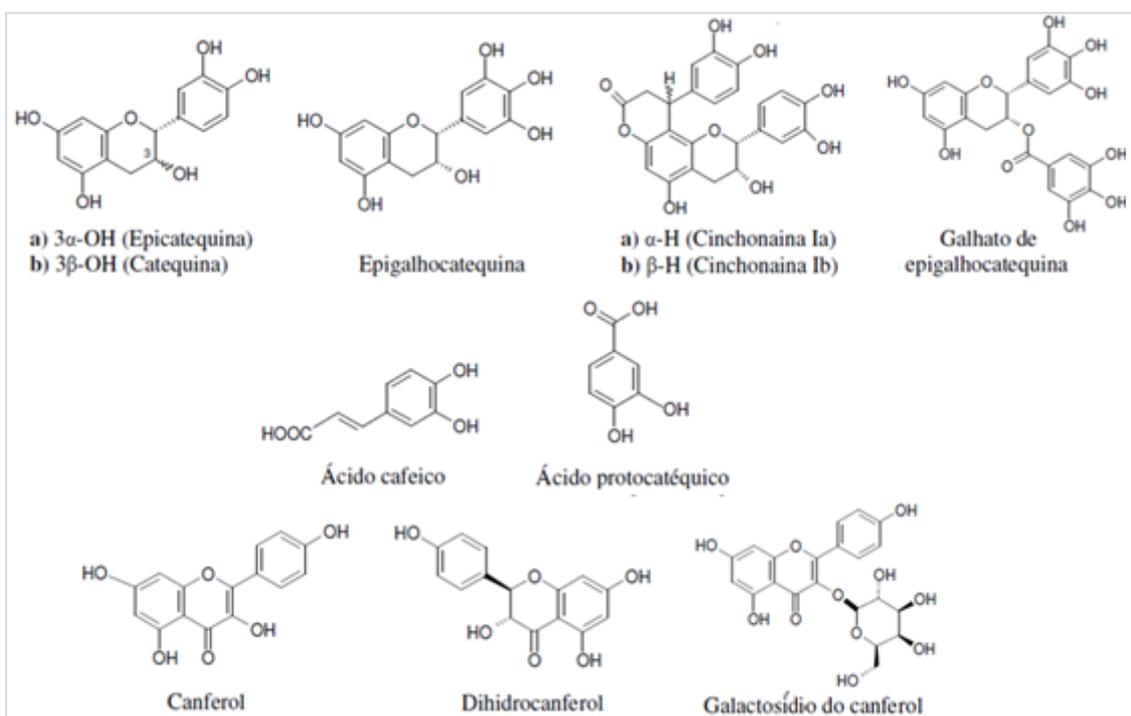


**FIGURA 4 – TERPENÓIDES (A) E ESTERÓIS (B) IDENTIFICADOS NA *Uncaria tomentosa***  
 FONTE: MARQUES (2008)

### 2.1.5.3 Fenóis

Fenóis são compostos que contêm um ou mais grupamentos hidroxila ligados a um benzeno ou outro anel aromático (IUPAC, 1997). Os metabólitos secundários fenólicos compreendem simples fenilpropanóides, incluindo cumarinas e lignanas, flavonóides, e polifenóis de alta massa molecular, tais como os taninos (YAZAKI, 2006).

Estão representados na FIGURA 5 os principais metabólitos secundários fenólicos presentes na *Uncaria tomentosa*.



**FIGURA 5** - METABÓLITOS SECUNDÁRIOS FENÓLICOS PRESENTES NA *Uncaria tomentosa*  
 FONTE: MARQUES (2008)

### 2.1.5.4 Outros compostos

Em 1960 acreditava-se que a eficácia da unha-de-gato na medicina tradicional era devido à presença dos alcalóides oxindólicos (SHENG *et al.*, 2005), em razão de suas atividades anti-inflamatórias, antioxidantes e citoprotetoras

(SANDOVAL-CHACON *et al.*, 1998). Por isso, esses compostos são os constituintes ativos mais investigados da *U. tomentosa*.

Entretanto, recentemente, extratos aquosos da unha-de-gato que não apresentavam quantidades significantes de alcalóides (<0.05%) ainda mostraram serem muito eficazes (SHENG *et al.*, 2005) nas atividades biológicas citadas para esta planta (TABELA 2).

SHENG e colaboradores (2005) avaliaram os extratos aquosos da casca do cipó da *U. tomentosa*, com baixo teor de alcalóides indólicos (<0,05% v/v), no tratamento de leucopenia quimicamente induzida em ratos. Inicialmente, os animais foram tratados com três injeções intraperitoneais de doxorubicina (DXR), na dose de 2 mg/kg, em intervalos de 24 horas, para induzir leucopenia. Nas primeiras 24 horas após a última administração de DXR, os ratos receberam diariamente doses de 80 mg/kg do extrato aquoso, via intragástrica, durante 16 dias. Os animais tratados com o extrato se recuperaram mais rapidamente do que os que receberam apenas DXR. Verificou-se também aumento significativo de glóbulos brancos. O mecanismo de ação do extrato nos leucócitos ainda não é conhecido.

Como citado anteriormente, alguns estudos têm sido realizados para se identificar outros compostos ativos não alcalóides, como por exemplo, os glicosídeos do ácido quinóico, que mostraram possuir atividades antivirais (AQUINO *et al.*, 1989) e anti-inflamatórias (TAYLOR, 2002).

Em relação aos compostos ativos, muitos trabalhos demonstram a presença de metabólitos secundários em diferentes tipos de extratos da *Uncaria tomentosa*. Porém, não há trabalhos publicados a respeito dos carboidratos (metabólitos primários) presente em extratos dessa planta. Por isso, no presente trabalho, destacam-se outros componentes, as arabinogalactana-proteínas (AGPs), proteoglicanas encontradas na parede celular de plantas, que são altamente solúveis em água, e que estão presentes nos extratos aquosos obtidos a partir da unha-de-gato, conforme demonstrado em um trabalho realizado no nosso laboratório por OKUMURA (2009).

Apesar dos poucos estudos enfocarem especificamente a atividade biológica das AGPs em modelos experimentais animais (YAMADA *et al.*, 1985; DIALLO *et al.*, 2001; ALBAN *et al.*, 2002; CLASSEN; BLASCHEK, 2002 e 2006; THUDE *et al.*, 2006), tem-se verificado que determinadas AGPs atuam como agentes imunomoduladores em sistemas biológicos.

Desta forma, as AGPs tornam-se interessantes alvos de estudos, pois estes compostos podem ser responsáveis ou mesmo contribuir com a atividade biológica apresentada pelos extratos com baixo teor de alcalóides indólicos obtidos da unha de gato.

## 2.2 ARABINOGALACATANA-PROTEÍNAS

Arabinogalactana-proteínas (AGPs) estão incluídas no grupo de glicoproteínas vegetais ricas em hidroxiprolina (HRGPs) e são produtos do metabolismo primário de vegetais inferiores e superiores de vários grupos taxonômicos (CLARKE; ANDERSON; STONE, 1979). As AGPs estão localizadas na parede celular, no lado externo da membrana plasmática, vacúolos, espaços intercelulares e em diferentes secreções e mucilagens (RUMYANTSEVA, 2005).

Em sua definição moderna, a parede celular vegetal é descrita como um tipo de matriz extracelular especializada capaz de resistir à pressão hidrostática intracelular (PETERS; HAGEMANN; THOMOS, 2000). Do ponto de vista estrutural, a parede celular vegetal consiste de uma porção microfibrilar, formada por celulose, e da porção matriz, na qual são encontrados polissacarídeos (hemiceluloses e pectinas), (glico)proteínas (por exemplo arabinogalactana-proteínas, extensinas e enzimas), além de lignina (BRETT; WALDRON, 1990) (TABELA 4). Do ponto de vista biotecnológico, os constituintes da parede celular vegetal, além de consistirem produtos de biomassa, apresentam várias aplicações em função de suas propriedades físico-químicas, nutricionais e/ou medicinais (TABELA 4).

**TABELA 4 - PAREDE CELULAR VEGETAL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS**

	Componentes	Tipos de polímeros constituintes	Características químicas	Aplicações biotecnológicas*	
<b>MICROFIBRILAR</b>	Celulose		Glucana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), linear e neutra	<i>alimentação de ruminantes biocombustíveis indústria de madeira indústria de papel</i>	
		(Arabino)Xilana	Xilana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) substituída em O-2 por GlcAp e O-2/O-3 por Araf, ramificada e ácida		
	Hemicelulose	(Galacto)Glucomanana	Cadeia principal de unidades alternadas de Manp e Glcp ligadas $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), substituídas ou não por Gal, linear ou ramificada e neutra	<i>agentes geleificadores aditivos dietéticos bioativos imunomoduladores emulsificantes</i>	
		Galactomanana	Cadeia principal de unidades de Manp ligadas $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), substituídas por Gal em O-6, ramificada e neutra		
		Arabinogalactana tipo II	Galactana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) substituída em O-6 por Galp e Ara (AG tipo II) e GlcAp, ramificada e ácida		
		Xiloglucana	Glucana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), substituída em O-6 por Xylp, ramificada e neutra		
<b>MATRIZ</b>		Glucana	Glucana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3), linear e neutra	<i>aditivos dietéticos bioativos imunomoduladores gelificantes emulsificantes trocaadores de íons</i>	
		Homogalacturonana	Galacturonana $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4), linear e ácida		
		Ramnogalacturonana I	Cadeia principal de unidades alternadas de GalAp O-2 ligadas e Rhap O-4 ligadas, substituídas por galactanas, arabinanas e/ou AG tipo I, ramificada e ácida		
	Pectinas	Ramnogalacturonana II	Cadeia principal de unidades de GalAp O-2 ligadas e Rhap O-4 ligadas, substituídas por variados monossacarídeos, ramificada e ácida		<i>aditivos dietéticos bioativos imunomoduladores gelificantes emulsificantes trocaadores de íons</i>
		Galactana	Galactana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4), linear e neutra		
		Arabinana	Arabinana $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5), linear e neutra		
		Arabinogalactana tipo I	Galactana $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) substituída em O-6 por Galp e O-3 por Ara (AG tipo I) e GlcAp, ramificada e ácida		
		Arabinogalactana-proteína	AG tipo II ligada a porção proteica rica em Hyp (alta glicosilação)		<i>bioativos imunomoduladores processamentos industriais</i>
	(Glico)Proteínas e enzimas	Extensina	Glicoproteína apresentando a porção glicídica rica em Ara (baixa glicosilação)		
		Enzimas	Peroxidases, Glucosidases, glucanases, entre outras		
Fenólicos	Lignina	Relação com parede secundária	<i>Compostos bioativos</i>		
		ácido ferúlico		Ligados a arabinoxilanas	

FONTE: BRETT; WALDRON (1990)

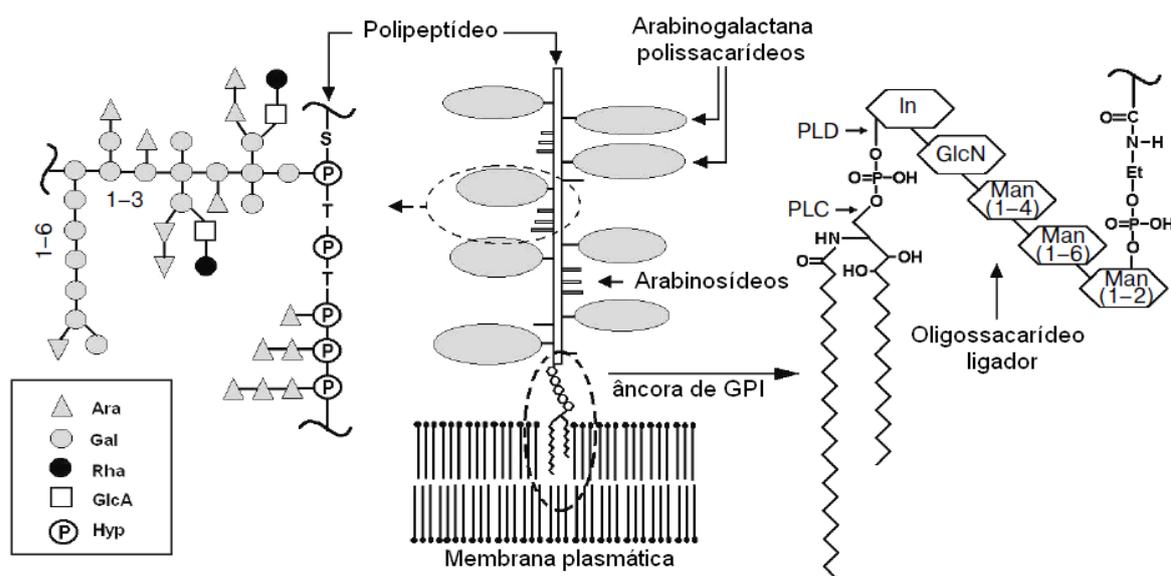
NOTA: \* Estão citadas algumas aplicações biotecnológicas dos principais grupos de componentes da parede celular.

Em plantas superiores, as AGPs são encontradas em folhas, caules, raízes, órgãos florais, sementes e em grandes quantidades nos troncos de algumas angiospermas e gimnospermas (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983). As AGPs apresentam várias funções relacionadas com o crescimento e desenvolvimento vegetal, tanto em nível vegetativo quanto reprodutivo e celular (SERPE; NOTHNAGEL, 1996 e 1999; MAJEWSKA-SAWKA; NOTHNAGEL, 2000; SHOWALTER, 2001).

Do ponto de vista estrutural, as AGPs consistem em um núcleo protéico de comprimento altamente variável e domínios complexos, uma ou mais cadeias laterais de arabinogalactanas (AG) (TABELA 4) e frequentemente contém uma âncora lipídica de glicosilfosfatidilinositol (GPI – *glycosylphosphatidylinositol*). Um esquema da estrutura de uma molécula de AGP está mostrado na FIGURA 6.

O polipeptídeo central contribui com 1 a 10% da massa molecular (CLARKE; ANDERSON; STONE, 1979). Dependendo da composição de aminoácidos do centro proteico, as AGPs são subdivididas em AGP clássicas e AGPs não-clássicas (NOTHNAGEL, 1997). A porção proteica das AGPs clássicas contém, principalmente, hidroxiprolina/prolina, alanina, serina, tirosina e glicina. Entretanto, a composição de aminoácidos das AGPs não clássicas varia consideravelmente (RUMYANTSEVA, 2005).

O componente glicídico é prevalente nas moléculas de AGP, as quais são classificadas, portanto, como proteoglicanas. Esta porção glicídica é constituída principalmente de D-galactopiranosose e L-arabinofuranose. A cadeia principal apresenta unidades de  $\beta$ -D-galactopiranosose unidas por ligações do tipo O-3, O-6 e O-3, e pode estar substituída por unidades de L-arabinofuranose ou apresentar nos terminais não redutores outros monossacarídeos menos abundantes, como  $\beta$ -L-Arap,  $\beta$ -L-Rhap,  $\beta$ -D-Glcp e  $\beta$ -D-GlcpA (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983). Considerando a estrutura química da porção glicídica, as AGPs são classificadas como arabinogalactanas tipo II (TABELA 4), que correspondem às arabino-3-6-galactanas (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983). O peso molecular varia geralmente entre 60 a 300 kDa (NOTHNAGEL, 1997), porém existem AGPs com massa molecular maior que 1 MDa (CLASSEN; WITTHOHN; BLASCHEK, 2000).



**FIGURA 6** - MODELO ESTRUTURAL HIPOTÉTICO DA UMA MOLÉCULA DE AGP

FONTE: RUMYANTSEVA (2005)

NOTA: Unidades de polissacarídeos (arabinogalactanas tipo II) e arabinooligosacarídeos estão ligadas através do oxigênio da hidroxiprolina ao centro protéico da AGP. A porção carboxi-terminal do polipeptídeo de AGP é modificada pela ligação de uma âncora de GPI, consistindo de etanolamina, um oligossacarídeo ligador, e um lipídeo inserido na membrana plasmática. Os sítios de clivagem específicos para fosfolipase C (PLC) ou fosfolipase D (PLD) estão indicados.

Uma importante característica das AGPs é que elas se ligam especificamente a um reagente químico sintético, conhecido como reagente  $\beta$ -glucosil Yariv ( $\beta$ -GlcY) (YARIV; RAPPORT; GRAF, 1962; YARIV; LIS; KATCHALSKI, 1967). Embora o mecanismo de interação entre a AGP e  $\beta$ -GlcY não seja completamente compreendido, a utilização do  $\beta$ -GlcY é uma ferramenta extremamente útil na purificação e quantificação de AGPs (NOTHNAGEL, 1997). Esse reagente é também utilizado para elucidar o papel das AGPs em processos biológicos (SEIFERT; ROBERTS, 2007). As principais formas de extração de AGPs diretamente de plantas *in natura* se dão através de extrações aquosas a temperatura ambiente (25°C) ou a quente (60°C). Como já comentado, a presença de AGPs em extratos aquosos de *U. tomentosa* já foi demonstrada por OKUMURA (2009).

### 2.2.1 AGPs e outros polissacarídeos relacionados e plantas medicinais

Os polissacarídeos de origem vegetal em geral são as mais conhecidas e mais potentes substâncias imunomoduladoras (PAULSEN, 2001) e têm se mostrado clinicamente terapêuticas (BLOCK; MEAD, 2003). Um dos principais mecanismos de potencialização do sistema imune apresentado por polissacarídeos vegetais parece envolver a sua capacidade em influenciar a função dos macrófagos e a ativação do sistema complemento (KRAUS, FRANZ, 1992).

Como citado anteriormente (item 2.1.5.4), poucos estudos enfocam especificamente a atividade biológica das AGPs em modelos experimentais animais. Por exemplo, em 2002, ALBAN e colaboradores demonstraram que AGPs extraídas de *Echinacea purpurea* aumentaram o potencial e lise das proteínas do sistema complemento (vias clássica e alternativa) sobre as hemácias, *in vitro*. THUDE e colaboradores (2006) verificaram, através de citometria de fluxo, que AGPs extraídas de partes aéreas de *Echinacea purpurea* se ligam à superfície celular de leucócitos humanos. Investigações farmacológicas de AGPs extraídas das raízes de *Echinacea* sp. e *Baptisia* sp. demonstraram diferentes atividades imunomoduladoras *in vitro*, tais como indução da proliferação e produção de IgM em linfócitos de camundongos e indução da produção de nitrito e IL-6 em macrófagos de camundongos (CLASSEN *et al.*, 2006). Estes, além de outros estudos realizados com AGPs e outros polissacarídeos relacionados de plantas medicinais estão resumidos na TABELA 5.

**TABELA 5 - EFEITOS BIOLÓGICOS DE ARABINOGALACTANAS, ARABINOGALACTANA-PROTEÍNAS E PECTINAS DE PLANTAS MEDICINAIS**

Nome botânico (nome comum) Parte usada	Propriedades medicinais da planta	Polímero (Estrutura química)	Atividades biológicas relatadas	Ref.
<i>Achyrocline satureoides</i> (macela) Parte aérea	Digestiva, hepatoprotetora, anti-inflamatória, antioxidante e anti-microbiana	Pectinas ácidas (RG tipo 1)	Fagocitose de granulócitos; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Anacardium occidentale</i> , (cajuero) Fruto - castanha, pseudofruto - caju, raiz, casca do fruto e do tronco, goma de exsudato	Diurética, anti-inflamatória, anti-sifilítica, anti-diabética, laxativa, anti-parasitária, fungicida e inseticida, anti-tumoral	Arabinogalactana ácida e AGP da goma de exsudato	Efeito inibitório de crescimento do sarcoma 180; efeito de alteração de adesão celular em HeLa e B16F10; cicatrização; estimulação de macrófagos; produção de óxido nítrico	MENESTRINA <i>et al.</i> (1996); STEVAN <i>et al.</i> (2001) e (2002); SCHIRATO <i>et al.</i> (2006)
<i>Angelica acutiloba</i> (angelica chinesa) -Raiz	Expectorante, antigripal e anti-inflamatória	Pectinas ácidas	Atividade anti-tumoral; efeito no sistema complemento	KIYOHARA <i>et al.</i> (1988); KIYOHARA & YAMADA (1989)
<i>Arnica Montana</i> (arnica) - Raiz, flores e cultura de células	Anti-inflamatória, analgésica, dermatológica, imunológica, anti-tumoral, anti-microbiana e de eliminação de hematomas	Arabinogalactanas	Atividade fagocítica de macrófagos; liberação de TNF pelos macrófagos; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Calendula officinalis</i> (calêndula) - Flores	Dermatológica, cicatrizante, anti-inflamatória, anti-microbiana	Arabinogalactanas Pectinas ácidas (RG tipo 1)	Fagocitose de granulócitos; atividade citotóxica e anti-tumoral com sarcoma 180 e carcinoma de Ehrlich	PAULSEN (2001)
<i>Echinaceae purpurea</i> (equinacea) - Raiz, parte aérea e cultura de células	Imunomoduladora, anti-inflamatória, anti-parasitária, cicatrizante, antigripal e expectorante	Arabinogalactanas AGPs, Pectinas ácidas (RG tipo 1)	Estimulação de macrófagos, aumento da produção de leucocitos, Liberação de interferon, interleucinas e TNF $\alpha$ pelos macrófagos, Atividade fagocítica de macrófagos	WAGNER <i>et al.</i> (1988); CLASSEN; WITTHOHN; BLASCHEK (2000); ALBAN <i>et al.</i> (2002); CLASSEN <i>et al.</i> (2006); THUDE <i>et al.</i> (2006)
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (alcaçuz) - Raiz	Expectorante, imunoestimulante, gastroprotetora e anti-inflamatória	Pectinas ácidas (RG tipo 1)	Atividade fagocítica de macrófagos; liberação de interferon pelos macrófagos; atividade mitogênica; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Malva sylvestris</i> (malva) – Folhas	Anti-inflamatória de vias respiratórias, hipoglicemiante e laxativa	Pectinas ácidas (RG tipo 1)	Efeito expectorante; efeito hipoglicemiante, Atividade fagocítica de macrófagos; efeito no sistema complemento	PAULSEN (2001)
<i>Panax ginseng</i> (ginseng) Raiz	Imunomoduladora, adaptogênica (combate ao stress), anti-tumoral, detoxificante, afrodisíaca, anti-microbiana	Arabinogalactanas	Atividade fagocítica de macrófagos; liberação de interferon pelos macrófagos; imunoestimulante	GAO <i>et al.</i> (1988); GAO <i>et al.</i> (1990)
<i>Plantago major</i> (tanchagem) - Folhas	Depurativa, cicatrizante, anti-inflamatória, diurética e adstringente	Arabinogalactanas Pectinas ácidas	Indução de TNF- $\alpha$ pelos macrófagos. Efeito no sistema complemento	SAMUELSEN <i>et al.</i> (1999); SAMUELSEN <i>et al.</i> (2000); MICHAELSEN <i>et al.</i> (2000)
<i>Uncaria tomentosa</i> (unha de gato) casca, folhas, raízes	Antirreumática, antibacteriana, anti-inflamatória, antimutagênica, antioxidante, anti-tumoral, anti-viral, citostática, depurativa, diurética, hipotensora, imunoestimulante, regeneradora celular, vermífuga	AGPs	n.e.	OKUMURA (2009)

FONTE: Modificado de PAULSEN (2001)

NOTA: n.e. não estabelecida para polímeros como arabinogalactanas, arabinogalactana-proteínas e/ou pectinas

## 2.3 O SISTEMA IMUNE

O sistema imune é um sistema de defesa notavelmente adaptativo, desenvolvido nos vertebrados para protegê-los de microorganismos patógenos invasores e de neoplasias. Ele está apto a gerar um grande número de células e moléculas capazes de reconhecer e eliminar especificamente uma variedade de invasores estranhos (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

A imunidade tem tanto componentes inespecíficos quanto componentes específicos. O componente inespecífico, a imunidade inata, é uma série de mecanismos de resistência a doenças que não é específico a um determinado patógeno (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000). É composto por células como neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos, macrófagos e células “natural killer”, e por fatores solúveis, incluindo o sistema complemento, proteínas de fase aguda, e enzimas (ABBAS, 2000). O componente específico, a imunidade adaptativa, apresenta um alto grau de especificidade assim como uma propriedade notável de memória, no qual se incluem os linfócitos T e B e as imunoglobulinas (ABBAS, 2000). Essa divisão é didática e elementos do sistema inato podem agir como efetores do sistema adaptativo.

Como as respostas imunes adaptativas necessitam de algum tempo para se ordenar, a imunidade inata fornece a primeira linha de defesa durante o período crítico logo após a exposição do hospedeiro ao patógeno. As imunidades inatas e adaptativas não agem independentemente uma da outra, mas sim como um sistema altamente cooperativo e interativo, produzindo uma resposta total mais eficaz (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

### 2.3.1 Macrófagos

Macrófagos são células que participam ativamente da resposta imunológica. Estas células pertencem ao sistema mononuclear fagocítico e representam a primeira linha de defesa do organismo, pois são as primeiras células a entrarem em contato com microorganismos ou mesmo partículas invasoras (ROSÁRIO, 2010).

Durante a hematopoiese na medula óssea, as células que dão origem aos monócitos e granulócitos se diferenciam em pró-monócitos e entram na corrente

sanguínea, onde posteriormente se tornam monócitos maduros. Esses por sua vez, migram para os tecidos onde se diferenciam em macrófagos tissulares específicos (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Embora normalmente em estado de repouso, os chamados macrófagos residentes, essas células podem se tornar ativadas por uma série de diferentes mecanismos e receptores da superfície celular, incluindo produtos bacterianos e antígenos particulados, citocinas, componentes do complemento, anticorpos, imunocomplexos, interações com linfócitos T e aderência (HAWRYLOWICZ; LEE, 1998).

Os macrófagos possuem importância fundamental nos sistemas de defesa inata do organismo como combate à infecção, fiscalização de tumores, depuração de resíduos não-inflamatórios, manutenção e reparação dos tecidos, regulação da hematopoiese, recrutamento e ativação de outras células inflamatórias. Essas funções são mediadas através de três principais mecanismos que serão abordados a seguir: fagocitose de antígenos particulados e microrganismos, atividade citotóxica, além de síntese e liberação de vários mediadores solúveis. Estas células desempenham também um papel importante na resposta imune adquirida através da sua capacidade de processar e apresentar antígenos e regular as respostas de linfócitos T (HAWRYLOWICZ; LEE, 1998).

#### 2.3.1.1 Fagocitose

Os macrófagos são capazes de ingerir os antígenos exógenos, como microorganismos inteiros e partículas insolúveis; e matéria endógena, tais como células do hospedeiro mortas ou lesadas, restos celulares e fatores de coagulação ativados (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

No primeiro passo da fagocitose, os macrófagos são atraídos e se movimentam em direção a uma variedade de substâncias produzidas pela resposta imune; esse processo é determinado quimiotaxia. O próximo passo é a aderência do antígeno à membrana celular do macrófago. Esta aderência induz às protrusões na membrana que se estendem ao redor do material aderido. A fusão dessas protusões aprisiona o material em uma estrutura ligada à membrana denominada de fagossomo que, então, entra na via do processo endocítico. Nessa via, um

fagossomo se move em direção ao interior da célula, e se funde com um lisossomo, formando um fagolisossomo. Os lisossomos contêm lisozimas e uma variedade de outras enzimas hidrolíticas que digerem o material ingerido. O conteúdo digerido é, então, eliminado em um processo denominado de exocitose (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

### 2.3.1.2 Atividade citotóxica

Inúmeras substâncias citotóxicas e antimicrobianas produzidas por macrófagos ativados podem destruir os microorganismos fagocitados (TABELA 6).

**TABELA 6 - MEDIADORES DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DOS MACRÓFAGOS**

<b>Citotoxicidade dependente de oxigênio</b>	<b>Citotoxicidade independente de oxigênio</b>
<b><i>Intermediários de oxigênio reativo</i></b>	Defensinas
$O_2^-$ (ânion superóxido)	Fator de necrose tumoral $\alpha$
$OH^\cdot$ (radicais hidroxilas)	Lisozima
$H_2O_2$ (peróxido de hidrogênio)	Enzimas hidrolíticas
$ClO^-$ (ânion hipoclorito)	
<b><i>Intermediários de nitrogênio reativo</i></b>	
$NO^\cdot$ (óxido nítrico)	
$NO_2$ (dióxido de nitrogênio)	
$HNO_2$ (ácido nitroso)	
<b><i>Outros</i></b>	
$NH_2Cl$ (monocloramina)	

FONTE: Adaptado de GOLDSBY; KINDT; OSBORNE (2000)

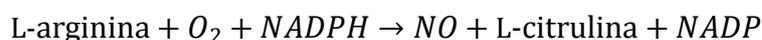
Os macrófagos ativados podem desencadear o *burst* respiratório e a produção de óxido nítrico, que são respostas bioquímicas de duas vias oxidativas distintas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Posteriormente à formação do fagolisossomo, haverá nos macrófagos a produção de intermediários reativos de oxigênio (ROIs), em um processo denominado *burst* respiratório, garantindo assim, a morte do patógeno e consequente proteção do hospedeiro (BABIOR, 1992). Estes produtos também funcionam como segundos mensageiros e moduladores do sistema imune (HUBERT; MARTHA; PIGANELLI, 2004)

O *burst respiratório* resulta na ativação de uma oxidase ligada à membrana que catalisa a redução do oxigênio em ânion superóxido, um intermediário reativo de oxigênio que é extremamente tóxico para os microorganismos fagocitados. O ânion superóxido também gera outros agentes oxidantes poderosos, incluindo radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Além destes, há também a produção de hipoclorito pela enzima mieloperoxidase, a partir do peróxido de hidrogênio e os íons cloreto, que são tóxicos aos microorganismos ingeridos (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Apesar das ROIs participarem ativamente dos mecanismos de eliminação de patógenos, evidências sugerem que a maior parte da atividade antimicrobiana dos macrófagos contra os patógenos bacterianos, fungos, helmintos e protozoários é devida ao óxido nítrico e às substâncias dele derivadas (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000; MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

Quando os macrófagos são ativados, por exemplo, pelos componentes da parede celular bacteriana, como o lipopolissacarídeo (LPS), eles começam a expressar níveis altos de óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima que oxida a L-arginina para obtenção da L-citrulina e óxido nítrico ( $\text{NO}^*$ ):



O óxido nítrico é um gás solúvel em água e em lipídeos, considerado uma espécie reativa de nitrogênio (MICHEL; XIE; NATHAN, 1995).

A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. Diretamente, o óxido nítrico pode reagir com metais, por exemplo, o ferro presente nas enzimas, e inativá-las. Assim, várias vias bioquímicas cruciais para a sobrevivência do patógeno (ciclo do ácido cítrico, cadeia transportadora de elétrons, síntese de DNA, etc.) seriam prejudicadas. (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Como um radical livre, este gás é capaz de reagir rapidamente com vários compostos, principalmente espécies contendo elétrons desemparelhados, como o oxigênio e intermediários reativos (ROSÁRIO, 2010). A reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido resulta na formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas. Este, na presença de íon hidrogênio, pode ser protonado, originando um radical altamente reativo e tóxico,

o hidroxil, aumentando efetivamente a ação tóxica do óxido nítrico e do ânion superóxido (BECKMAN; KOPPENOL, 1996).

Os macrófagos ativados também sintetizam lisozima e várias enzimas hidrolíticas, cujas atividades degradativas não necessitam de oxigênio. Além disso, essas células produzem um grupo de peptídeos antimicrobianos e citotóxicos, comumente conhecidos como defensinas, e secretam um fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), uma citocina que possui uma variedade de efeitos e é citotóxica para algumas células tumorais (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

### 2.3.1.3 Síntese e liberação de fatores (citocinas, componentes do complemento e enzimas hidrolíticas)

O desenvolvimento de uma resposta imune eficaz envolve diferentes tipos de células como linfóides, inflamatórias e hematopoiéticas. As complexas interações entre essas células são mediadas por um grupo de moléculas coletivamente denominadas de citocinas, para denotar o seu papel na comunicação célula-célula (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Citocinas são uma categoria diversa de proteínas reguladoras, incluindo as interleucinas (ILs), interferons (IFNs), fatores estimulantes de colônia ou hematopoiéticos (CSFs), fatores de necrose tumoral (TNF) e certos fatores de crescimento (polipeptídeos) (GFs). Em comum, são biologicamente ativas, agindo nas células por ligação de receptores específicos da membrana celular, em concentrações relativamente baixas (MEAGER, 2006). Essas moléculas são essencialmente proteínas ou glicoproteínas, com peso molecular variando de 8 a 30 kDa, e podem ser produzidas em todos os tecidos, pela maioria das células. Na maior parte dos casos, as citocinas são produzidas e agem localmente. Poucas entram na circulação sistêmica em quantidades biologicamente relevantes para desempenhar algum papel fisiológico importante (HOPKINS, 2003).

Algumas dessas moléculas, centrais para o desenvolvimento das respostas imunes, são secretadas pelos macrófagos ativados, como por exemplo, a interleucina 1 (IL1), a interleucina 6 (IL-6), e o TNF- $\alpha$ , que promovem as respostas inflamatórias (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000), e também a interleucina 10 (IL-10), que desempenha uma atividade anti-inflamatória (HAWRYLOWICZ; LEE, 1998).

A IL-1, principalmente produzida por monócitos e macrófagos, é um importante mediador que desempenha um papel chave na resposta imune e inflamatória de humanos. A família da IL-1 consiste de duas formas moleculares distintas, IL-1 alfa (IL-1 $\alpha$ ) e IL-1 beta (IL-1 $\beta$ ), as quais são codificadas por diferentes genes, mas possuem atividades biológicas análogas (DINARELLO, 1996).

A IL-6 é uma citocina multifuncional, produzida tanto por células linfóides quanto por células não-linfóides, as quais incluem macrófagos, fibroblastos e células endoteliais. Essa interleucina está envolvida em respostas imunes antígeno-específicas e reações inflamatórias (MATSUDA *et al.*, 1989).

O TNF- $\alpha$  desempenha um papel fundamental na defesa do hospedeiro e pode agir de forma autócrina em monócitos e macrófagos para melhorar as várias funções de resposta, como citotoxicidade às células tumorigênicas, e induzir a expressão de uma série de outros mediadores imunes e inflamatórios (BAUGH; BUCALA, 2001).

A IL-10 é descrita como inibidora da síntese de citocinas e desativadora de macrófagos. Sugere-se que essa interleucina pode atuar em um mecanismo de *feedback* negativo para prevenir possíveis efeitos nocivos da excessiva ativação de macrófagos durante a inflamação (BOGDAN; VODOVOTZ; NATHAN, 1991).

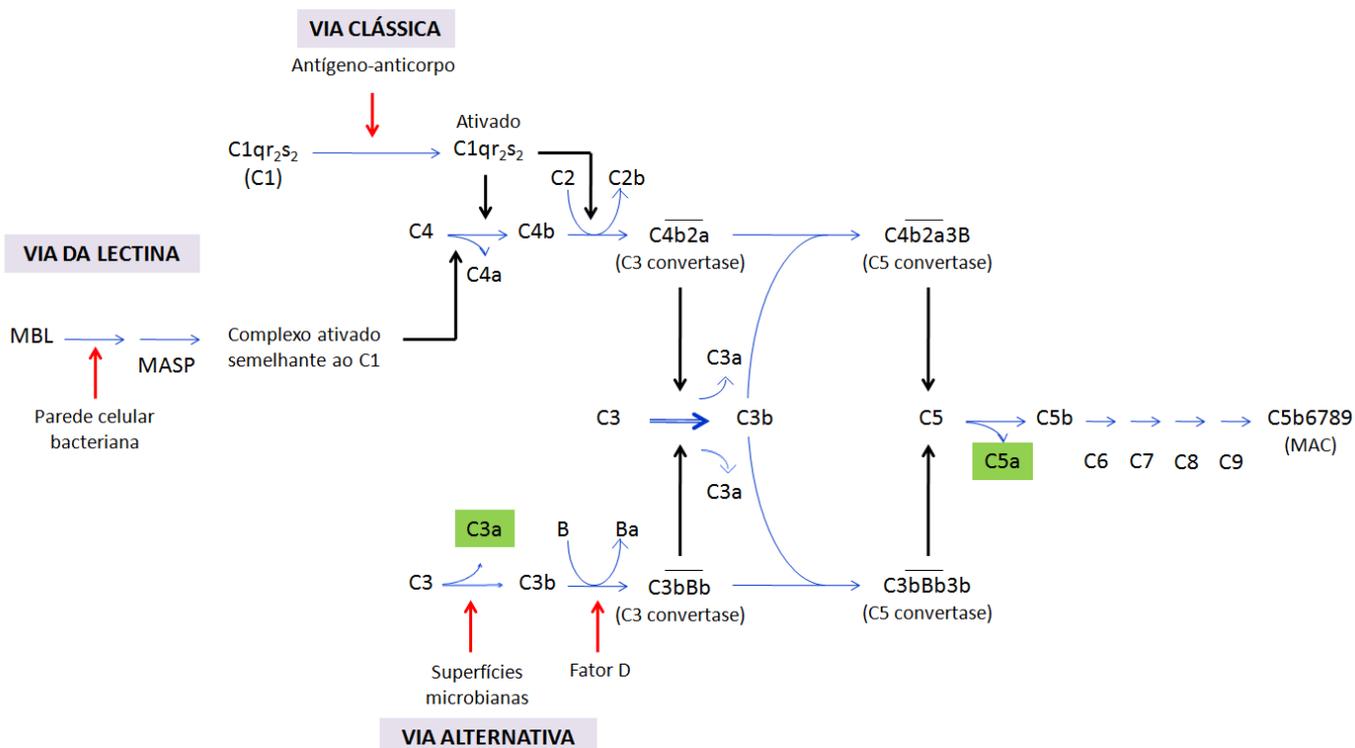
Os macrófagos ativados também secretam outros fatores envolvidos no desenvolvimento de uma resposta inflamatória. Os componentes do complemento são um grupo de proteínas que auxiliam na eliminação de patógenos estranhos e na promoção de uma reação inflamatória subsequente. O principal local de síntese das proteínas do complemento é no fígado, mas são produzidas também nos macrófagos localizados fora desse órgão. As enzimas hidrolíticas, presentes nos lisossomos dos macrófagos, também podem ser secretadas quando as células forem ativadas, contribuindo para uma resposta inflamatória (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

### 2.3.2 Sistema complemento

O sistema complemento é composto por um conjunto de proteínas séricas que têm por função proteger o organismo de agentes agressores, participando da imunidade inata e adaptativa (BITENCOURT, 2006).

Os componentes do complemento são designados pela letra C e por números (C1-C9), por letras (por exemplo, fator D) ou por nomes usuais (por exemplo, fator de restrição homólogo). Após ativação inicial, os diversos componentes interagem em uma cascata altamente regulada. A ativação pode resultar na clivagem de um componente, gerando dois fragmentos: um menor e outro maior, na maioria dos casos denominados de “a” e “b”, respectivamente. O fragmento maior se liga ao próximo componente da sequência, dando continuidade à cascata, mas pode tornar-se brevemente inativo caso essa ligação não ocorra. O fragmento menor se difunde a partir do sítio de ativação e, através da ligação a receptores específicos, pode dar início às respostas inflamatórias localizadas (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000). Por exemplo, os peptídios C5a e C3a provocam uma série de efeitos pró-inflamatórios, incluindo o recrutamento de leucócitos, degranulação de células fagocíticas, mastócitos e basófilos, contração da musculatura lisa e aumento da permeabilidade vascular (MOLLNES; KIRSCHFINK, 2006).

A ativação do complemento pode ser iniciada através de três principais vias: clássica, alternativa e das lectinas (FIGURA 7) (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009). A primeira etapa da ativação, culminando na formação do C5b, pode ocorrer por qualquer uma dessas vias. Já a etapa final, que conduz ao ataque à membrana, é a mesma em todas as vias.



**FIGURA 7 – VISÃO GERAL DAS VIAS DE ATIVAÇÃO DO COMPLEMENTO**

FONTE: Adaptado de GOLDSBY; KINDT; OSBORNE (2000)

NOTA: A via clássica é iniciada através da ligação do C1 aos complexos antígeno-anticorpo. A via alternativa é iniciada através de ligação do C3b às superfícies de ativação, tais como paredes celulares bacterianas. A via da lectina é iniciada pela ligação da proteína sérica MBL à superfície do patógeno. A via alternativa utiliza alguns componentes (ou fatores) que são únicos, enquanto que as vias clássicas e da lectina possuem os componentes comuns após o C1. Todas as três vias geram os mediadores inflamatórios C3a e C5a (em verde), as C3 e C5 convertases e o C5 ligado, que é convertido em um complexo de ataque à membrana (MAC) através de uma sequência comum de reações terminais. A hidrólise de C3 é o principal passo na amplificação de todas as vias, gerando grandes quantidades de C3b, que forma parte da C5 convertase. O C3b também pode se difundir da superfície de ativação e se ligar aos complexos imunes ou às superfícies celulares estranhas, onde ele atua como uma opsonina. As setas azuis indicam as etapas da reação; as setas pretas indicam a atividade enzimática e as vermelhas, a atividade de ativação.

### 2.3.2.1 Via clássica

A ativação da via clássica é na maioria das vezes dependente de anticorpo. Anticorpos secretados durante uma resposta imune humoral ou ainda anticorpos naturais podem se ligar à superfície ativadora e tornarem-se capazes de ativar o complemento (JANEWAY *et al.*, 2003).

Essa via é ativada principalmente quando o componente do complemento C1q interage com anticorpos ligados à superfície ativadora, (IgM e IgG). O C1q pode também, se ligar às proteínas C-reativa, amilóide sérica P, pentraxina 3, e outros

ligantes na superfície de células apoptóticas ou microbiana, ativando essa via (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009).

#### 2.3.2.2 Via alternativa

A via alternativa é autoativada, sem a presença de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais pela clivagem espontânea de C3 (FEARON, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006).

Essa via também pode ser acionada diretamente pela properdina, várias proteínas, lipídios, carboidratos e estruturas de superfícies invasoras (QU; RICKLIN; LAMBRIS, 2009).

#### 2.3.2.3 Via das lectinas

As lectinas são proteínas que se ligam a carboidratos. A via da lectina, de maneira semelhante à via alternativa, não depende de anticorpo para que seja ativada (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000). Essa via é disparada quando a lectina sérica ligadora de manose (MBL), se liga a carboidratos contendo manose que são comuns em bactérias (JANEWAY *et al.*, 2003) e vírus (KLEIN, 1990; THIEL *et al.*, 1997).

A ativação do complemento através de qualquer uma dessas três vias resulta na liberação de mediadores inflamatórios (C3a e C5a), bem como na formação do complexo de ataque à membrana (MAC) e consequente lise celular (RICKLIN; LAMBRIS, 2007).

Arabinogalactanas tipo II, pectinas ácidas, e AGPs (ver item 2.2) obtidas de diferentes plantas de uso medicinal, mostraram-se moléculas moduladoras do sistema complemento (YAMADA *et al.*, 1985; PAULSEN, 2001; CLASSEN; BLASCHEK, 2002; THUDE *et al.*, 2006).

Levando em consideração a forma de utilização de muitas plantas medicinais (extratos aquosos) e a possível presença de AGPs ou AGs nesses extratos, como já observado no chá verde (infusão de *Camellia sinensis*) (ZHOU *et al.*, 2009; ELE-EKOUNA *et al.*, 2011), as quais são capazes de modular o sistema

imune; sugere-se que essas moléculas poderiam ser também responsáveis pelas atividades biológicas apresentadas por essas plantas. Dessa forma, as AGPs ou AGs são interessantes alvos de estudos, pois podem ser fármacos em potencial.

### 3 JUSTIFICATIVA

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, estimada em cerca de 20% do número total de espécies de animais e vegetais (SUFFREDINI *et al.*, 2004). Esse patrimônio genético apresenta um valor econômico-estratégico inestimável (DAVILA; STEINDEL; GRISARD, 2004).

Do ponto de vista socioeconômico, um país como o Brasil, onde uma parte importante da população tem dificuldades na obtenção de medicamentos convencionais e adoece mais frequentemente, o uso criterioso da fitoterapia clínica no sistema público de saúde pode ser uma opção terapêutica importante e muitas vezes com menor custo para os pacientes (COMCIENCIA, 1999). A fitoterapia constitui uma forma de terapia medicinal que vem crescendo nos últimos anos. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta aproximadamente 22 bilhões de dólares (YUNES; PEDROSA; CECINEL FILHO, 2001).

Uma classe de medicamento que tem tido destaque são os imunostimulantes. Com a epidemia da AIDS, além das imunodeficiências permanentes ou temporárias, originadas da quimioterapia contra o câncer, do tratamento de pacientes transplantados e de indivíduos idosos, aumentaram a importância de pesquisas nessa área e a demanda desse tipo de medicamento. Além disso, representam uma alternativa para diminuir o aparecimento de resistência bacteriana, causada pelo uso inadequado de antibióticos, que serão utilizados de maneira mais racional e em doses menores, já que ambos deverão ser administrados em conjunto (BARÃO; GIORGIO, 1998).

Nesse contexto, destaca-se a *Uncaria tomentosa*, pois além de ser uma planta nativa da Floresta Amazônica, é amplamente utilizada como um fitoterápico. Estudos comprovam que os extratos aquosos da planta apresentam atividade imunostimulante, a qual tem sido atribuída, principalmente, aos alcalóides oxindólicos (SHENG, *et al.* 2005). Entretanto, outros compostos, as AGPs, também estão presentes nesses extratos (OKUMURA, 2009). Os poucos estudos em modelos experimentais animais, realizados acerca dessas moléculas demonstram que estas são imunomoduladoras positivas (YAMADA *et al.*, 1985; DIALLO *et al.*, 2001; ALBAN *et al.*, 2002; CLASSEN; BLASCHEK, 2002 e 2006; THUDE *et al.*, 2006). Portanto, o presente trabalho visa avaliar a hipótese de que as AGPs presentes nos extratos aquosos de *U. tomentosa* poderiam também contribuir com a

atividade imunoestimulante apresentada por essa planta. Assim, estudos científicos enfocando a investigação da composição química e da atividade biológica dos extratos obtidos de *U. tomentosa* poderão contribuir tanto para o melhor conhecimento de suas propriedades farmacológicas, quanto para a validação da utilização criteriosa do uso deste fitoterápico (YUNES; PEDROSA; CECINEL FILHO, 2001).

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

O presente projeto tem como objetivo geral verificar se as AGPs são componentes bioativos também responsáveis pela atividade imunomoduladora apresentada por extratos aquosos da planta *Uncaria tomentosa*.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) analisar e comparar quimicamente os extratos aquosos de *U. tomentosa* obtidos por diferentes metodologias (extração sequencial laboratorial e decocção);
- b) quantificar e isolar as AGPs obtidas a partir das frações solúveis desses extratos pelas metodologias acima citadas;
- c) analisar e caracterizar estruturalmente as AGPs obtidas a partir das frações solúveis dos extratos aquosos;
- d) avaliar, *in vitro*, o efeito imunomodulador das AGPs em macrófagos peritoneais obtidos de camundongos albinos Swiss, analisando parâmetros morfológicos e funcionais, como a retenção de lisossomos, produção de óxido nítrico e produção de citocinas (interleucina1- $\beta$ , interleucina-6, interleucina-10 e fator de necrose tumoral alfa);
- e) avaliar, *in vitro*, o efeito imunomodulador das AGPs através do teste de fixação do complemento, avaliando a via clássica e a via alternativa do sistema complemento;
- f) Relacionar as atividades biológicas dos extratos testados com a presença de AGPs;
- g) Contribuir para o melhor conhecimento sobre os componentes químicos e as propriedades farmacológicas das formas terapêuticas da *Uncaria tomentosa*, fortalecendo a utilização desta espécie na fitoterapia clínica.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *U. tomentosa*

#### 5.1.1 Material vegetal

As amostras vegetais de *Uncaria tomentosa* utilizadas nesse trabalho foram provenientes de duas fontes diferentes: Fundação Herbarium e comercial, como mostrado na TABELA 7.

**TABELA 7** – FONTES DO MATERIAL VEGETAL (*Uncaria tomentosa*) UTILIZADO PARA A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS AQUOSOS

Material Vegetal	Fonte		Lote
	Empresa	Nome Fantasia	
Casca do caule de <i>U. tomentosa</i> pulverizada	Fundação Laboratório Botânico Herbarium, Curitiba - PR	Herbarium	4887A9
Casca da raiz de <i>U. tomentosa</i> obtida no comércio	Oly & Orty Indústria e Comércio LTDA	Sabor da Natureza	SN/007

FONTE: O autor (2011)

Como citado anteriormente, de acordo com o uso popular, tanto a casca do caule, quanto a casca da raiz são utilizadas na decocção e não há diferenças significativas em relação à composição química dos extratos aquosos dessas duas partes da planta (LAUS, 2004).

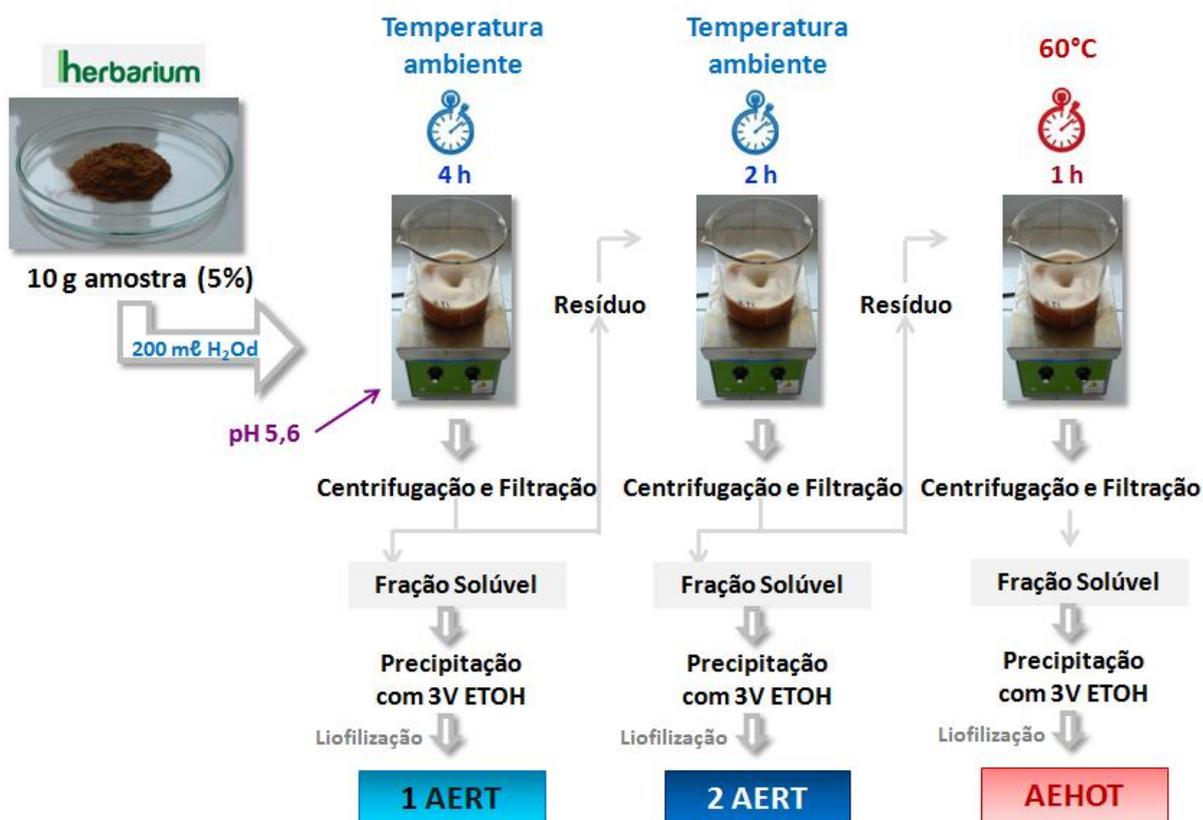
O material cedido pela Fundação Herbarium foi utilizado nas extrações laboratoriais sequenciais, enquanto que o material obtido do comércio foi submetido ao processo de decocção.

#### 5.1.2 Extrações laboratoriais sequenciais

A casca do caule pulverizada de *Uncaria tomentosa*, cedida pela Fundação Herbarium, é a matéria prima utilizada na fabricação das cápsulas também

comercializadas por essa empresa. De acordo com a referida empresa, este material vegetal está padronizado em relação ao conteúdo de mitrafilina (1%).

A partir desse material, foram realizadas três extrações aquosas sequenciais (FIGURA 8). Na primeira, 10 g do material vegetal foi adicionado a 200 mL de água destilada (extração a 5% m/v) e a solução resultante deixada em agitação mecânica por 4 h, a temperatura ambiente (25°C). Após centrifugação, a solução foi dividida em duas partes: uma fração solúvel, da qual, após precipitação etanólica e liofilização, obteve-se a fração 1AERT (do inglês, 1ª **Aqueous Extraction - Room Temperature**); e o resíduo, que originou a fração 2AERT, após ser submetido à 2ª extração aquosa, nas mesmas condições descritas anteriormente, porém, com 2 h de agitação. O segundo resíduo resultante foi novamente submetido à extração aquosa, a 60°C (a quente) durante 1 hora com agitação constante. Após centrifugação, seguida de precipitação etanólica e liofilização da porção solúvel, foi obtida a fração AEHOT (**Aqueous Extraction – Hot**).

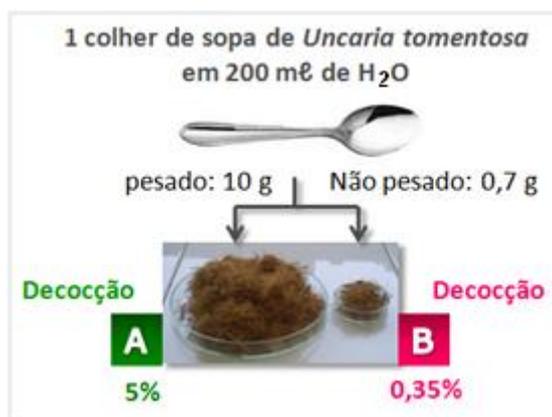


**FIGURA 8** – ESQUEMA DE OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES ATRAVÉS DAS EXTRAÇÕES AQUOSAS SEQUENCIAIS  
 FONTE: O autor (2011)

### 5.1.3 Decocção

A obtenção das frações a partir do material vegetal oriundo do comércio foi realizada através da decocção (FIGURA 9), seguindo a dose recomendada pelo Índice Terapêutico Fitoterápico (ITF, 2008): uma colher de sopa do material vegetal para cada xícara de água. Entretanto, pelo material utilizado (casca da raiz de *Uncaria tomentosa*) se tratar de um emaranhado de fibras, muito leve; a medida de uma colher de sopa pode ser feita de duas maneiras diferentes (FIGURA 9):

- O material foi pesado, seguindo a padronização de que uma colher de sopa corresponde a 10 g e uma xícara a 200 ml. Essa decocção foi chamada de “A” (extração a 5%);
- sem pesagem do material (com o intuito de simular o uso popular), onde uma colher de sopa da casca da raiz de *U. tomentosa* correspondeu a 0,7 g, em 200 ml de H<sub>2</sub>O. Essa decocção foi chamada de “B” (extração a 0,35%).



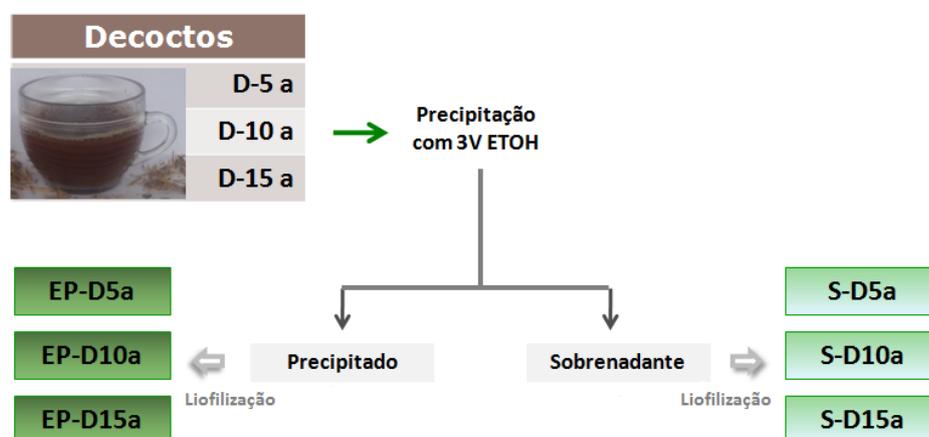
**FIGURA 9** – DIFERENTES FORMAS DE PREPARO DA DECOÇÃO DA CASCA DA RAIZ DE *Uncaria tomentosa*, SEGUINDO DOSAGEM RECOMENDADA PELO ÍNDICE TERAPÊUTICO FITOTERÁPICO (ITF) DE 2008

FONTE: O autor (2011)

Em relação ao tempo de decocção, de acordo com o ITF, após a fervura da água e a adição do material, o tempo de cozimento pode variar de 3 a 20 min. Neste trabalho, esse procedimento foi realizado em três tempos distintos: 5, 10 e 15 min, todos seguidos de um descanso de 10 min. Após a filtração, os decoctos obtidos apresentaram coloração escura, sabor amargo e um pH ácido de 5,2 (pHmetro

Gehaka, modelo PG 1800, São Paulo-SP, Brasil). Em seguida, esses decoctos foram liofilizados, obtendo-se seis frações diferentes: D5a, D10a e D15a, para a decocção a 5%; e D5b, D10b e D15b, para a decocção a 0,35%, onde o D corresponde à decocto, e o número se refere ao tempo de decocção.

Considerando que as seis frações provenientes da decocção não passaram por uma precipitação etanólica como as aquelas provenientes da extração sequencial laboratorial, três novas decocções, na concentração A, de 5, 10 e 15 min seguidas de precipitação etanólica foram realizadas (FIGURA 10), a fim de se obter uma melhor comparação entre as duas formas de extração aquosa realizadas nesse trabalho. Após a adição de etanol aos decoctos resultantes, observou-se a formação de precipitados, os quais foram liofilizados originando as frações: **EP-D5a**, **EP-D10a** e **EP-D15a** (do inglês, *Ethanol Precipitation*). O sobrenadante também foi liofilizado, originando as frações: **S-D5a**, **S-D10a** e **S-D15a**, onde o S corresponde à sobrenadante.



**FIGURA 10** – OBTENÇÃO DAS FRAÇÕES PROVENIENTES DA DECOCCÃO SEGUIDA DE PRECIPITAÇÃO ETANÓLICA  
 FONTE: O autor (2011)

#### 5.1.4 Extração e purificação de arabinogalactana-proteínas (AGPs) obtidas de *U. tomentosa*

As AGPs foram purificadas utilizando a precipitação seletiva com o reagente Yariv  $\beta$ -Glucosil<sub>3</sub> ( $\beta$ -GlcY) (GANE *et al.*, 1995). As amostras 1AERT (~20 mg) e

2AERT (~100mg) foram solubilizadas em 1 ml de NaCl 1% (m/v) durante 18h a temperatura ambiente, centrifugadas a 12.000 x g por 2 min, e o sobrenadante transferido para microtubos tipo *ependorf*. O mesmo volume de reagente  $\beta$ -GlcY [2 mg.ml<sup>-1</sup> em NaCl a 1% (m/v)], foi adicionado à amostra, e após agitação manual, a amostra foi mantida em repouso por 18 h, a 4°C. Decorrido este tempo, após 1 h de centrifugação a 14.000 x g, o complexo insolúvel obtido (AGP-Yariv) foi lavado sucessivamente com NaCl 1% (m/v) (3x) e metanol (2x) para remoção do excesso de  $\beta$ -GlcY. Após secagem, o material foi dissolvido em volume mínimo de dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionou-se ditionito de sódio em pó, para descomplexação. Lavagens sucessivas com água destilada, sob agitação em agitador tipo “vortex”, foram feitas até a solução se tornar amarelada. Esta solução amarela foi submetida à cromatografia de gel permeação em colunas PD-10 (Sephadex G-10) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) equilibrada com água destilada, para a retirada do excesso de sais. A amostra, após liofilização, correspondeu à fração obtida pela precipitação seletiva com reagente  $\beta$ -GlcY (AERT-YPF, do inglês *Yariv Precipitation Fraction*). O reagente  $\beta$ -GlcY foi sintetizado quimicamente como descrito por YARIV, RAPPORT e GRAF (1962).

## 5.2 ANÁLISES QUÍMICAS

### 5.2.1 Dosagens colorimétricas

Os teores de carboidrato total, ácido urônico, proteína, fenol total e amido das frações obtidas foram determinados através de dosagens colorimétricas, as quais estão descritas a seguir. Em todos os ensaios, 200  $\mu$ l da solução final foram transferidos para placas de 96 poços (fundo chato) (Techno Plastic products AG<sup>®</sup> - TPP, Trasadingen - Suíça) para posterior leitura em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), nos comprimentos de onda específico para cada metodologia.

### 5.2.1.1 Carboidrato total

O conteúdo de carboidrato total das frações obtidas foi analisado pelo método do fenol-ácido sulfúrico (FOX; ROBYT, 1991), utilizando D-glucose como padrão em concentrações de 4 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Nesse ensaio, açúcares simples, polissacarídeos e seus derivados, incluindo os metil-ésteres com grupos redutores livres, reagem com ácido sulfúrico sofrendo desidratação e subsequente complexação com o fenol, gerando uma coloração amarelo-alaranjado através de uma reação sensível e estável. A mudança da cor da solução é mensurada na região do visível através da espectroscopia e é proporcional à quantidade de açúcares presentes na amostra (DUBOIS *et al.*, 1956).

As amostras foram solubilizadas em  $\text{H}_2\text{O}$  na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , e 40  $\mu\text{l}$  dessas soluções transferidos para tubos tipo *ependorf* para microcentrifuga, em triplicata para cada amostra. Em seguida, 40  $\mu\text{l}$  de fenol a 5% (p/v) foram misturados às soluções cuidadosamente com o auxílio da própria pipeta. Por fim, 200  $\mu\text{l}$  de ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) concentrado foram adicionados, sendo misturados da mesma forma. Após aquecimento a 100°C (em estufa) por 10 min, seguido de resfriamento em banho de gelo, a absorbância foi lida a 490 nm.

### 5.2.1.2 Ácidos urônicos

A determinação da quantidade de ácidos urônicos presente nas frações foi realizada através de uma adaptação do método do *m*-hidroxibifenil descrito por FILIZETTI-COZZI & CARPITA (1991). Nesse microensaio, 100  $\mu\text{l}$  das amostras (previamente solubilizadas em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) foram pipetados em tubos tipo *ependorf* para microcentrifuga (em triplicata para cada amostra). Em seguida, foram adicionados 10  $\mu\text{l}$  de sulfamato de potássio (4 M, pH 1,6) e os tubos agitados em aparelho tipo vortex. Após a adição de 600  $\mu\text{l}$  de tetraborato de sódio (75 mM em  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) e agitação em vortex, os tubos foram aquecidos em estufa a 100°C por 15 min, e resfriados em banho de gelo. Por fim, 10  $\mu\text{l}$  de *m*-hidroxibifenil (0,15 % m/v em hidróxido de sódio aquoso a 0,5 % m/v) foram adicionados e os tubos novamente agitados em vortex. Após 10 min de repouso, a absorbância foi lida a 525 nm. A percentagem de ácido urônico foi calculada a partir

de uma curva analítica utilizando ácido D-glucurônico como padrão. O limite de sensibilidade do método é de 4 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ácido D-glucurônico.

#### 5.2.1.3 Proteínas

A dosagem de proteínas foi realizada através de um microensaio, adaptado do método colorimétrico descrito por BRADFORD (1976).

O reagente de Bradford contém como seu principal componente o corante Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução ácida. Este, ao ligar-se às proteínas, tem a sua absorvância alterada de 465 nm para 595 nm. Essa interação entre o Coomassie com a proteína estabiliza a forma aniônica do corante, causando uma visível mudança de coloração inicialmente do castanho para tons de azul, de acordo com a concentração da proteína. A absorvância pode ser medida em um espectrofotômetro ou leitor de microplacas, utilizando o comprimento de onda de 595 nm. A comparação dos resultados com uma curva padrão, com valores de concentrações conhecidos, permite a determinação da concentração da proteína em estudo.

A albumina bovina foi utilizada como padrão com o limite de sensibilidade de 4 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As amostras foram solubilizadas em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada na concentração de 1  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Dessas soluções, foram transferidos 40  $\mu\text{l}$  para tubos tipo *ependorf* para microcentrifuga (em triplicata para cada amostra), e em seguida, adicionados 400  $\mu\text{l}$  do reagente de proteínas (40 mg de Coomassie Blue G, 20 mL de etanol 95%, 40 mL de ácido o-fosfórico,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p. 1000 mL = 3x). Após agitação dos tubos em aparelho vortex, a absorvância foi lida a 595 nm.

#### 5.2.1.4 Fenol total

O teor de fenol total também foi determinado através de um microensaio utilizando o reagente de Folin Ciocalteu, adaptado de MORAIS e colaboradores (2009). O princípio do método é a reação entre o reagente de Folin-Ciocalteu, que possui coloração amarelo-esverdeada, e fenóis, com subsequente oxidação dos

fenóis e formação de um complexo azul. Essa reação é favorecida com o meio em pH alcalino, obtido pela adição de carbonato.

As amostras, na concentração de  $1 \text{ mg.mL}^{-1}$  em  $\text{H}_2\text{O}$ , foram adicionadas em tubos tipo *ependorf* para microcentrífuga ( $20 \mu\text{l}$ , em triplicata para cada amostra). Em seguida, foram adicionados  $100 \mu\text{l}$  do reagente de Folin Ciocalteu (10% v/v em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada). Os tubos foram agitados em vortex, e em seguida,  $80 \mu\text{l}$  de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 7,5% foram misturados às soluções, que foram novamente agitados em vortex. Após aquecimento em banho-maria a  $50^\circ\text{C}$  durante 5 min, a absorbância foi lida a 760 nm. A curva padrão foi preparada utilizando soluções de ácido gálico nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 30, 40 e  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 5.2.1.5 Amido

A dosagem de amido foi realizada através do microensaio adaptado de CHRASTIL (1987).

Em uma primeira etapa, as amostras foram deslipidificadas ao serem solubilizadas em metanol a 85% (2,5 mg em  $1,25 \text{ mL}$ ), aquecidas em banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  por 30 min, e centrifugadas a 4500 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e esse procedimento repetido mais 2x com o precipitado.

Na segunda etapa, os precipitados foram solubilizados em  $1,5 \text{ mL}$  de NaOH (0,25 M em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada) e aquecidos em banho-maria a  $95^\circ\text{C}$  por 30 min. A solução resultante foi denominada de *solução I*.

A quantificação do amido foi realizada na terceira e última etapa. Em tubos tipo *ependorf* para microcentrífuga, foram adicionados  $30 \mu\text{l}$  da *solução I*, mais  $1,5 \text{ mL}$  de ácido tricloracético (TCA) a 0,5% (v/v) em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Após agitação em vortex e adição de  $15 \mu\text{l}$  de lugol (1,27 g de  $\text{I}_2$ , 3 g de KI,  $\text{H}_2\text{O}$  destilada q.s.p.  $1000 \text{ mL}$ ), os tubos foram agitados imediatamente, incubados por 30 min à temperatura ambiente, e a absorbância lida a 620 nm. A percentagem de amido foi calculada a partir de uma curva analítica, utilizando cinco soluções padrões em vez das *soluções I*, contendo respectivamente 10, 20, 40, 60 e 80% de amilose (Sigma Aldrich.CO, St. Louis-MO, EUA), e a percentagem complementar (90, 80, 60, 40 e 20%, respectivamente) de amilopectina (Sigma Aldrich.CO, St. Louis-MO, EUA). As soluções padrões foram preparadas como descrito acima, a partir da segunda etapa.

### 5.3 ENSAIO DE DIFUSÃO RADIAL EM GEL DE AGAROSE PARA QUANTIFICAÇÃO DE AGPs

A quantificação das AGPs presentes nas frações obtidas foi feita por difusão radial em gel de agarose, de acordo com a metodologia descrita por VAN HOLST; CLARKE (1985). As frações foram solubilizadas em uma solução de NaCl a 1% e aplicadas em orifícios de uma placa de gel de agarose tipo C a 1% (Calbiochem, La Jolla-CA. EUA) contendo  $0,02 \text{ mg.mL}^{-1}$  do reagente  $\beta$ -GlcY. A placa foi incubada por 18h, em ambiente úmido a temperatura ambiente para difusão da amostra. O reagente  $\beta$ -GlcY foi sintetizado como descrito por YARIV, RAPPORT e GRAF (1962).

A análise da presença de AGP é feita através da formação do complexo AGP-Yariv, o qual se precipita no gel, formando um halo característico de coloração castanho-avermelhada. O diâmetro do halo formado é proporcional à quantidade de AGP presente na amostra. Com utilização de um paquímetro, o diâmetro interno dos halos foram mensurados, e a quantidade de AGP nas amostras foi calculada em relação à curva analítica utilizando como padrão a goma arábica (Sigma Aldrich.CO St. Louis-MO, EUA). O limite de sensibilidade do método é de 0,25 a 3  $\mu\text{g}$  de AGP.

### 5.4 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

#### 5.4.1 Cromatografia de camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para determinação qualitativa da composição monossacarídica das frações obtidas. A análise foi precedida pela hidrólise total das amostras com ácido trifluoracético (TFA) 2,5M, por 8 horas, a  $100^{\circ}\text{C}$ . Após evaporação do ácido, as amostras foram ressolubilizadas em  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, e em seguida, aplicadas em cromatoplasas Merck 60 F254 recobertas com sílica gel, utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v).

A corrida cromatográfica ascendente foi desenvolvida em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel. Após a cromatografia, os açúcares foram visualizados através de borrifamento com solução de orcinol 0,5% (m/v) em

etanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecimento a 100 °C, até o aparecimento de coloração. O perfil monossacarídico foi analisado através da comparação dos tempos de retenção observados para as amostras com os tempos de retenção de padrões de monossacarídeos.

A CCD também foi utilizada para a determinação qualitativa de metabólitos secundários do material cedido pela Herbarium e da fração D10a, de acordo com a metodologia descrita por HOUGHTON; RAMAN (1998). O material cedido pela Herbarium foi submetido à extração etanólica a 60% durante 18h. Após centrifugação, o precipitado foi descartado e o sobrenadante, liofilizado. A amostra resultante foi denominada de EERT (do inglês, *Ethanolic Extraction at Room Temperature*).

Para a corrida cromatográfica, também ascendente, as amostras EERT e D10a foram solubilizadas em H<sub>2</sub>O destilada e aplicadas em cromatoplasas Merck 60 F254 recobertas com sílica gel. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de clorofórmio:metanol:ácido acético (90:10:1 v/v). As bandas referentes aos metabólitos secundários foram visualizadas sob luz UV (254 nm) e os tempos de retenção, utilizados na comparação de amostras e padrões, foram calculados dividindo a distância percorrida pelas bandas pela distância total percorrida pela fase móvel (8,5 cm).

#### 5.4.2 Cromatografia líquida gasosa acoplada à espectroscopia de massa (GC-MS)

Através dessa técnica, a composição monossacarídica neutra das frações obtidas foi determinada em percentagem, precedida pela hidrólise total da amostra (~100 mg) com 75 µl de TFA 2,5M, por 2 horas, a 100°C (duplicata para cada fração), com posterior redução e acetilação dos produtos da hidrólise (ALBERSHEIM, 1967).

Os procedimentos de redução e acetilação foram realizados através da técnica do microensaio, desenvolvida por SAEMAN e colaboradores (1983). Toda vidraria utilizada nestes experimentos foi previamente limpa em solução sulfocrômica.

a) a redução foi realizada com a adição de 100 µl de boroidreto de sódio em meio básico (NaBH<sub>4</sub> 0,5M em NH<sub>4</sub>OH 2M) por 2h30 min a temperatura ambiente.

Após a redução, o excesso do agente redutor foi destruído com 20  $\mu\text{l}$  de ácido acético, e o material resultante, seco com fluxo de nitrogênio. Em seguida, foram realizadas duas lavagens com 250  $\mu\text{l}$  de ácido acético 5% em metanol, e duas com 250  $\mu\text{l}$  de metanol (todas seguidas de evaporação com nitrogênio), para remoção do ácido bórico.

b) a acetilação foi realizada com a adição de 250  $\mu\text{l}$  de anidrido acético por 2h30min a 100°C. Após a acetilação, o excesso de anidrido acético foi destruído com adição de 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$ , agitação em vortex e repouso de 10 min. Com a adição de 1ml de clorofórmio, a solução resultante apresentou duas fases: uma clorofórmica, onde os acetatos de alditóis formados estavam solubilizados; e uma aquosa, contendo resíduos e sais de sódio. A fase clorofórmica foi lavada por no mínimo 3 vezes com 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada, evaporada com fluxo de nitrogênio e analisadas por cromatografia líquido-gasosa (GLC).

As análises por GLC foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massa, utilizando uma coluna capilar OV-225 ou DB-210 (30 m x 0,25 mm d.i.), aquecido a 50 °C durante a injeção e então programada a 40 °C/min até 220 °C (constante).

#### 5.4.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A quantificação de alcalóides foi realizada no Herbarium Laboratório Botânico, pelo pesquisador Gustavo Bertol, em cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) Agilent-100 (Santa Clara, CA, EUA), degasser (G1379A), equipado com bomba quaternária (G1311A), injetor automático (G1313A), compartimento de coluna termostaticado (G1316) e detector de comprimento de onda variável UV-VIS (G1314A). O equipamento foi controlado pelo software Chemstation (Rev. A. 06.0x). As amostras foram diluídas com o respectivo solvente em balão volumétrico para posterior extração em banho de ultrassom (20 min) a 30°C, sendo para 1AERT: 2,48 mg/3 ml etanol (EtOH) 60%; AEHOT: 2,05 mg/3 ml de EtOH 60% e D10a: 24,97 mg/5 ml EtOH 60% e 24,97 mg/5 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . O volume de injeção da amostra foi de 10  $\mu\text{l}$ . As condições de análise foram padronizadas por BERTOL (2010). A separação cromatográfica foi realizada em coluna Zorbax XDB C-18 (150 x 4,6 mm; 3,5  $\mu\text{m}$  de tamanho de partícula) mantida a 15°C, a eluição dos

análise foi efetuada com a mistura variável da fase orgânica (acetoneitrila) e fase aquosa (ácido acético 0,2% em água ajustado a pH 6,90 com trietilamina), conforme gradiente da TABELA 8 abaixo mostrada, o comprimento de onda utilizado na detecção foi 245 nm. O alcalóide mitrafilina utilizado como padrão externo foi isolado da casca do caule de *U. tomentosa* por BERTOL (2010), possuindo tempo de retenção a 15,628 min. O resultado da concentração de mitrafilina nas amostras foi calculado de acordo com a curva analítica de mitrafilina construída no intervalo de 8,0 a 210,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

**TABELA 8** – GRADIENTE UTILIZADO NAS ANÁLISES DOS ALCALÓIDES POR CLAE

TEMPO (min)	FASE AQUOSA (%)	FASE ORGÂNICA (%)	FLUXO (mL/min)
0	65	35	0,80
18	65	35	0,80
29	50	50	0,80
31	50	50	0,80
32	65	35	0,80
38	65	35	0,80

FONTE: BERTOL (2010)

## 5.5 ANÁLISES ESPECTROSCÓPICAS

### 5.5.1 Espectroscopia de infravermelho acoplada ao transformador Fourier (FT-IR)

As análises espectroscópicas no infravermelho (IR) foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR), em espectrômetro da marca BRUKER, modelo Vertex 70 (Bruker; Karlsruhe - Alemanha), equipado com *beamsplitter* de KBr-broadband, detector RT-DLaTGS, fonte de IR Mir-Global; operando no modo de transmissão - pastilhas de brometo de potássio (KBr). As medidas foram realizadas entre 4.000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e acumulação de 16 varreduras (velocidade: 10 kHz). A função de apodização da Transformada de Fourier (FT) utilizada foi a Blackman-Harris 3 – Term.

As amostras foram analisadas sob forma de pastilhas. Para as confecção das mesmas, as amostras (~200  $\mu\text{g}$ , liofilizados para remoção das moléculas de

H<sub>2</sub>O) foram maceradas com KBr anidro (~250 mg), e submetidas a pressão de 8 toneladas por 60 segundos.

### 5.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de carbono treze (RMN-<sup>13</sup>C)

As frações 1AERT, AEHOT, D10a foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C, utilizando espectrômetro da marca BRUKER, modelo DRX 400, série Avance (Bruker; Karlsruhe - Alemanha), em tubos de 5 mm de diâmetro, a 70°C. As amostras foram dissolvidas em água deuterada (D<sub>2</sub>O), em uma concentração de aproximadamente 40 mg.mL<sup>-1</sup>. Os deslocamentos químicos foram expressos em  $\delta$  (ppm), utilizando acetona como padrão interno ( $\delta = 31,45$ ).

## 5.6 EXPERIMENTOS BIOLÓGICOS – MODELOS ANIMAIS *IN VITRO*

### 5.6.1 Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos albinos Swiss

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, segundo protocolo 452 do processo 23075.020117/2010-11 (ANEXO).

Os procedimentos gerais (PERES; CURI, 2005) para preparo de soluções e meio de cultura do cultivo animal estão descritos abaixo:

- a) procedimento de cultivo celular: todas as operações envolvendo o cultivo celular foram desenvolvidas em capela de fluxo laminar do tipo vertical II A1 equipada com filtro HEPA (“high efficiency particulate air”) da Filterflux<sup>®</sup> (Piracicaba, SP - Brasil);
- b) procedimentos de esterilização: pipetas, água, soluções salinas, aparelhos de filtração e peças acessórias como roscas e rolhas, foram esterilizadas em autoclave da marca Sercon, modelo HA (São Paulo, SP - Brasil) a temperatura de 120°C e 1 atm. de pressão por 30 min. Posteriormente, esse material foi seco em estufa Odontobrás R13 (Ribeirão Preto, SP -

Brasil) a 50°C. As vidrarias foram esterilizadas a seco em estufa a 180°C, por 5 horas. A esterilização das soluções termolábeis foi realizada por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato-nitrato de celulose, com poros de 0,22 µm da Techno Plastic products AG® (TPP) (Trasadingen – Suíça);

- c) testes de esterilidade: para verificação da eficácia dos procedimentos de esterilização, alíquotas de cada solução filtrada foram colocadas em estufa a 37°C, por no mínimo 3 dias antes do uso;
- d) soluções: todas as soluções utilizadas para o cultivo celular foram preparadas com água obtida em aparelho Milli-Q da Millipore;
- e) solução de salina tamponada (PBS): a solução estoque de salina tamponada composta por 40,5 mmol L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 680 mmol L<sup>-1</sup> de NaCl e 7,3 mmol L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4, foi esterilizada a 120°C e 1 atm., por 30 min e armazenada a 4°C. No momento do uso foi diluída cinco vezes com água bidestilada igualmente estéril;
- f) meio de cultura: para a manutenção celular, foi utilizado o meio essencial mínimo de Eagle (MEM) (Cultilab, Campinas-SP, Brasil) (PAUL, 1973) mantido a 4°C. Para o crescimento celular, o meio de Eagle foi enriquecido com soro fetal bovino estéril 5% (v/v) da Laborclin (Curitiba, PR - Brasil).

#### 5.6.2 Preparo das soluções-teste utilizadas nos experimentos com culturas de macrófagos

As frações 1AERT e D10a foram solubilizadas em PBS durante 24 h sob agitação magnética na concentração de 10 mg.mL<sup>-1</sup>. Essas soluções foram esterilizadas por ultrafiltração positiva, sob pressão, utilizando-se membranas de acetato-nitrato de celulose, com poros de 0,22 µm da Techno Plastic products AG® (TPP) (Trasadingen – Suíça). Em seguida, foi realizada a diluição das frações em meio Eagle estéril contendo 5% de soro fetal bovino, originando as soluções-teste utilizadas nos tratamentos das culturas de macrófagos. As soluções foram mantidas estéreis a 4°C até a utilização. As concentrações utilizadas variaram entre os experimentos, porém cada uma foi testada em triplicata. Além das soluções-teste,

em cada experimento foram realizados os tratamentos controles, sendo o negativo consistindo de meio de cultura somente, e o positivo, de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis-MO, EUA).

### 5.6.3 Obtenção de macrófagos peritoneais

O modelo animal utilizado para obtenção das células foi camundongos SWISS (*Mus musculus*) fêmeas, com cerca de 50 g e 45 dias de vida, provenientes do biotério do Setor de Ciências Biológicas, da UFPR. Os animais foram mantidos em ambiente controlado com fotoperíodo ciclo claro-escuro 12/12, temperatura entre 21 a 25°C e dieta composta por ração Purina e água “*ad libitum*”.

Após a eutanásia dos animais, foi feita a assepsia da região abdominal com álcool 70% e exposição da membrana peritoneal. Utilizando seringas e agulhas estéreis, 10 mL de PBS pH 7,4, a 4°C foram inoculados na cavidade peritoneal. Após massagem vigorosa, as células do exsudato peritoneal foram aspiradas com seringa, transferidas para tubos plásticos estéreis e centrifugadas por 2500 rpm por 15 min a 4°C, em centrífuga refrigerada da marca MPW Med Instruments, modelo MPW-350R (Warsaw, Polônia). As células precipitadas foram lavadas com 10 mL de solução de hemólise aquosa [hidroximetil aminometano (TRIS) 0,017 M; cloreto de amônio (NH<sub>4</sub>Cl) 0,144 M; pH7,4] para eliminação das possíveis hemácias presentes. Após nova centrifugação, as células foram ressuspensas em Meio Eagle estéril, contendo soro fetal bovino (5%). A contagem celular foi feita em câmara de Neubauer, utilizando microscópio invertido (marca Bel Engineering, modelo INV 100, Monza, Itália) e a avaliação da viabilidade celular foi realizada através do método do azul de Tripán.

A suspensão celular contendo os macrófagos (na concentração final de  $5 \times 10^5$  cél/mL ou  $1 \times 10^6$  cél/mL nos experimentos com interleucinas) foi aliqotada em poços de placas de cultura estéreis (Techno Plastic products AG<sup>®</sup> - TPP- Trasadingen - Suíça), as quais foram incubadas, para aderência das células, por 1h, a 37°C em atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> (incubadora Thermo Scientific, San Jose, CA – EUA). A monocamada de célula aderente foi lavada duas vezes com PBS estéril, pH 7,4 a 37°C, para retirada de células suspensas, adicionou-se meio de cultura juntamente

com as soluções-teste conforme a metodologia descrita para cada tipo de experimento.

#### 5.6.4 Determinação da viabilidade celular

##### 5.6.4.1 Método do azul de tripan

A determinação da viabilidade dos macrófagos peritoneais foi realizada pela técnica do corante vital azul de Tripan (Sigma – Aldrich, St Louis-MO, EUA) (PHILLIPS, 1973). Este corante é considerado de exclusão, pois penetra apenas em células em que a membrana plasmática perdeu sua integridade. As células coradas, portanto, são consideradas como não viáveis. A solução de Azul de Tripan foi preparada a 0,4% (m/v) em PBS, e adicionado o mesmo volume desse corante à uma alíquota da suspensão de células diluída 10 vezes em PBS. Os macrófagos foram contados utilizando hemocitômetro com câmaras de Neubauer em microscópio invertido (marca Bel Engineering, modelo INV 100, Monza, Itália). A percentagem de células viáveis foi calculada através da seguinte relação: % células viáveis =  $n^{\circ}$  de células não coradas/ $n^{\circ}$  de células totais x 100. Neste trabalho foram utilizadas somente as suspensões celulares com viabilidade acima de 95%.

##### 5.6.4.2 Método do MTT

A determinação da viabilidade celular pelo método do MTT (brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio, Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por REILLY *et al.* (1998). Segundo o princípio do método, as desidrogenases mitocondriais de células viáveis e metabolicamente ativas reduzem o sal tetrazólio que possui cor amarelada quando oxidado, formando cristais de formazan solúveis em DMSO, os quais, por sua vez, possuem cor roxa característica.

Para análise da viabilidade foram utilizadas placas de 96 poços contendo  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço, os quais foram previamente incubados, durante 48 h a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com as soluções-teste nas concentrações de 0,32,

1,25, 5, 20, 80 e 320  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Passado o tempo de tratamento, o meio foi removido e 180  $\mu\text{l}$  de meio Eagle, mais 20  $\mu\text{l}$  de solução de MTT a 5  $\text{mg.mL}^{-1}$  foram adicionados, onde a concentração final de MTT por poço foi de 500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As células foram novamente incubadas durante 3h, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após duas lavagens com PBS a 37°C pH 7,4 para remover o excesso de MTT, os cristais de formazan formados foram dissolvidos em DMSO. A leitura da absorbância em 550 nm foi realizada em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), utilizando-se o solvente DMSO como branco. Os resultados foram expressos em percentagens, considerando a absorbância do controle negativo (macrófagos crescidos na ausência de soluções-teste) como 100% de viabilidade.

#### 5.6.4.3 Determinação da produção de óxido nítrico pelas culturas de macrófagos crescidas na ausência e presença das frações estudadas

A avaliação da produção de óxido nítrico (NO) pelos macrófagos foi realizada indiretamente, a partir da determinação da concentração de nitrito, o qual é um produto estável da reação de produção de NO, presente no sobrenadante das culturas de macrófagos.

Primeiramente, as soluções-teste foram adicionadas às placas de 96 poços contendo  $5 \times 10^5$  macrófagos/poço. Após incubação por 48 h a 37°C em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  com as soluções-teste a 0,32, 1,25, 5, 20, 80, 160 e 320  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , alíquotas de 100  $\mu\text{l}$  de cada sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 100  $\mu\text{l}$  do reagente de Griess [solução de sulfanilamida a 1% (m/v) (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA) e solução de naftilenodiamida a 0,1% (m/v) (Sigma-Aldrich, St Louis-MO, EUA), na proporção de 1:1, ambas em ácido fosfórico 2.5% (v/v)]. Este reagente, na presença de nitrito, produz um composto de cor lilás. A densidade óptica (D.O.) de cada amostra foi então determinada em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA), em 540 nm. A concentração de nitrito, presente no sobrenadante das amostras, foi calculada em relação à curva padrão, utilizando como padrão nitrito de sódio diluído em meio de cultura, em concentrações de 10

$\mu\text{M}$  a  $100 \mu\text{M}$  (GREEN *et al.*, 1982). Os resultados foram expressos como quantidade de nitrito produzido em  $\mu\text{M}/5 \times 10^5$  células.

#### 5.6.4.4 Avaliação da retenção de lisossomos em culturas de macrófagos crescidas na ausência e na presença das frações estudadas

Para a avaliação da retenção de lisossomos foram utilizadas placas de 24 poços contendo  $1 \times 10^6$  macrófagos/poço, tratados com as soluções-teste nas concentrações de 5, 20, 80 e  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$  durante 48 h. Após remoção do meio,  $180 \mu\text{l}$  de meio Eagle mais  $20 \mu\text{l}$  de vermelho neutro estéril a 2% (m/v) foram adicionados. A placa foi novamente incubada a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ . (PIPE *et al.*, 1995). Após 30 min, o sobrenadante foi descartado e os poços lavados duas vezes com PBS pH 7,4. Em seguida, foram adicionados  $100 \mu\text{l}$  da solução de lise contendo ácido acético glacial:etanol 50%:água destilada v:v), e a absorbância lida a 550 nm em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA). Os resultados foram expressos em percentagens, considerando a absorbância do controle negativo (macrófagos crescidos na ausência de soluções-teste) como taxa de retenção de lisossomos basal.

#### 5.6.4.5 Dosagem de citocinas produzidas pela cultura de macrófagos crescidas ausência e na presença das frações estudadas

Numa primeira etapa,  $1 \times 10^6$  macrófagos/poço foram tratados durante 24h em placas de 24 poços, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , com as soluções-teste nas concentrações de 5, 20, 80 e  $160 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . Em seguida, cada sobrenadante ( $1 \text{mL}$ ) foi centrifugado (2000 rpm, por 5 min), aliquoteado em tubos tipo eppendorfs estéreis identificados, e estocados a  $-80^\circ\text{C}$  até utilização. Cada poço da placa de cultura originou, portanto, 4 eppendorfs contendo o mesmo sobrenadante, sendo que cada um foi destinado à dosagem de uma interleucina em duplicata: IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 ou TNF- $\alpha$ . Assim, com o mesmo sobrenadante, foi possível fazer a dosagem das quatro interleucinas.

As dosagens foram determinadas pelo método ELISA, utilizando kits específicos para cada citocina, adquiridos da empresa eBioscience (San Diego-CA, EUA). Os reagentes utilizados foram preparados de acordo com as especificações do fabricante.

Para o ensaio de ELISA, placas de poliestireno (“high binding protein” – catálogo nº 9018, Corning, Lowell, MA, EUA) com 96 orifícios, de fundo chato, foram sensibilizadas durante 18h a 4°C, com 100 µl/poço do anticorpo de captura para cada citocina. As placas foram lavadas 5 vezes com 250 µl/poço de tampão de lavagem em lavadora de placas (marca Bio Tek, Winooski, EUA), e em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µl/poço da solução de diluição. Após 1h de incubação a temperatura ambiente e 5 ciclos de lavagem das placas, 100 µl/poço das amostras e padrões específicos para cada citocina foram adicionados, e as placas novamente incubadas por 2h a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 5 vezes, e o anticorpo de detecção adicionado (100 µl/poço). Passada 1 h de incubação a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 5 vezes, 100 µl/poço da enzima Avidina-HRP foram adicionados e as placas novamente incubadas a temperatura ambiente por 30 min. Após 7 lavagens, 100 µl/poço do substrato cromógeno tetrametilbenzidina (TMB) foram adicionados, e incubados no escuro, por 15 min a temperatura ambiente. A reação foi bloqueada com 50 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1N e realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA) a 450 nm.

A curva padrão foi preparada utilizando oito concentrações do padrão específico para cada citocina testada (IL-1β, IL-6, IL-10 ou TNF-α). Os resultados foram expressos como quantidade de citocinas produzidas em pg.mL<sup>-1</sup>/1x10<sup>6</sup> células.

#### 5.6.4.6 Análises morfológicas

Às placas de 24 poços foi colocada uma lamínula em cada poço. Em seguida foi acrescentado 1x10<sup>6</sup> macrófagos/poço foram tratados durante 24h, a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, com as soluções-teste nas concentrações de 2,5, 10, 40 e 160 µg.mL<sup>-1</sup>. Após o tratamento com as soluções-teste o sobrenadante foi retirado e as lamínulas fixadas com solução de Bouin, durante 5 min, a temperatura ambiente. Em seguida, os macrófagos aderidos às lamínulas foram rotineiramente

corados com Giemsa (gentilmente cedido pelo Sr. Herculano S. Reis Filho do Laboratório de Histotecnologia, Departamento de Biologia Celular, UFPR). Depois disto as células foram desidratadas com acetonas e diafanizadas com xilol. A montagem das lâminas permanentes foi feita com resina Entelan. A análise morfológica dos macrófagos e as fotomicrografias foram realizadas no Departamento de Botânica da UFPR, utilizando microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

## 5.7 TESTES DE FIXAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO

Os procedimentos experimentais envolvendo os testes de fixação do sistema complemento foram aprovados tanto pelo Comitê de Experimentação e Ética Animal do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, segundo protocolo 452 do processo 23075.020117/2010-11, quanto pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da Universidade Federal do Paraná (UFPR/Hospital de Clínicas) (CAAE 0187.0.208.000-08; CEP 1739.156/2008-08) (ANEXO).

A atividade das vias clássica e alternativa do sistema complemento foi analisada através do experimento de ensaio hemolítico com eritrócitos de carneiro e eritrócitos de coelho, respectivamente (YAMADA *et al.*, 1985). Os resultados obtidos foram expressos em relação à percentagem de inibição de hemólise ( $ICH_{50}$ ), comparando com diferentes controles ou tratamentos (ausência e presença de soluções-teste em diferentes concentrações) como descrito por YAMADA e colaboradores (1985). O valor de  $ICH_{50}$  define a concentração de amostra que provoca 50% de inibição da lise de eritrócitos de carneiro ou coelho.

### 5.7.1 Preparo das suspensões de eritrócitos de carneiro e coelho

Para a avaliação da hemólise foram utilizadas suspensões de eritrócitos de carneiro (via clássica) e de coelho (via alternativa). Para o preparo da suspensão de eritrócitos de carneiro, 5 ml de sangue de carneiro foram colhidos por punção venosa, e adicionados a tubos plásticos contendo solução anticoagulante EDTA.Na<sub>2</sub>. O material foi centrifugado por 5 min a 1440 x g. Os eritrócitos foram lavados três

vezes com solução de NaCl a 0,9 % (m/v), e uma vez com tampão HEPES (10 mM, NaCl 150 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,11 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, pH 7,4). Este tampão foi referido como tampão HC (Hepes - Clássica). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos no mesmo tampão, obtendo-se uma concentração de 2,4% (v/v). Para a sensibilização dos eritrócitos de carneiro, foi adicionado o mesmo volume de hemolisina (soro de coelho antihemácia de carneiro, Laborclin, Curitiba, PR, Brasil) na concentração 1:1500, e o material incubado por 30 min a 37° C. Após a sensibilização, a suspensão de eritrócitos de carneiro, na concentração final de 1,2%, foi utilizada na avaliação da via clássica.

Para o preparo da suspensão de eritrócitos de coelho, 5 ml de sangue de coelho foram colhidos por punção cardíaca e adicionados em tubos contendo o anticoagulante EDTA.Na<sub>2</sub>. O material foi centrifugado por 5 min a 1440 x g. Os eritrócitos foram lavados três vezes com solução de NaCl a 0,9 % (m/v), e uma vez com tampão HEPES/EGTA com Mg<sup>+2</sup> (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MgCl<sub>2</sub> 7 mM, EGTA 10 mM) em pH 7,4. Este tampão foi denominado tampão HA (HEPES - Alternativa). Após a última centrifugação, os eritrócitos foram ressuspensos no tampão HA, obtendo-se uma suspensão de eritrócitos na concentração final de 2,4% (v/v), a qual foi utilizada para avaliação da via alternativa.

### 5.7.2 Obtenção de soro humano

Uma mistura de sangue humano foi utilizada como fonte dos componentes do sistema complemento. O sangue humano obtido de doadores voluntários foi coletado na ausência de anticoagulante. Após a coagulação na temperatura ambiente, e centrifugação (20 min, a 1440 x g, 15° C), obteve-se o soro. A mistura de soro humano (MHS) foi estocada a -80° C até a utilização.

A partir da MHS, foi realizada uma curva de titulação para determinação da quantidade de soro a ser utilizado nos ensaios. A MHS foi diluída (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:100, 1:200, 1:400 e 1:800) e testada para determinação da quantidade de MHS necessária para provocar 50% de lise do eritrócitos (carneiro ou coelho). Alíquotas de 50 µl de MHS (triplicata para cada diluição) foram adicionadas em tubos do tipo *ependorf*, juntamente com 50 µl da suspensão de eritrócitos de carneiro 1,2 % (v/v) sensibilizada com hemolisina (via clássica) ou eritrócitos de

coelho 2,4% (v/v) (via alternativa), e 20  $\mu\text{l}$  do tampão (HC ou HA) correspondente a cada via. Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C e centrifugados por 5 min a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato (Techno Plastic products AG® - TPP- Trasadingen - Suíça) para leitura a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas (marca Bio Tek, modelo EPOCH, Winooski, EUA)

### 5.7.3 Preparo das soluções-teste utilizadas nos testes de fixação do complemento

As frações 1AERT e D10a, bem como a heparina bovina (inibidora do sistema complemento) foram solubilizadas em tampão HEPES (10 mM, NaCl 150 mM) durante 24 h sob agitação magnética na concentração de 5  $\text{mg.mL}^{-1}$ . A partir dessas soluções, foram realizadas as diluições em série (fator 2) das amostras, originando as concentrações testadas nos experimentos: 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Essas são as concentrações finais das soluções-teste no experimento.

As amostras, em todas as concentrações, foram previamente testadas em um ensaio de hemólise similar aos ensaios das vias clássica e alternativa, porém, sem a adição de soro, para avaliar a capacidade hemolítica da amostra. Alíquotas de 20  $\mu\text{l}$  das soluções-teste foram adicionadas em tubos do tipo *ependorf*, juntamente com 50  $\mu\text{l}$  da suspensão de eritrócitos de carneiro 1,2 % (v/v) sensibilizada com hemolisina (via clássica) ou eritrócitos de coelho 2,4% (v/v) (via alternativa), e 50  $\mu\text{l}$  do tampão (HC ou HA) correspondente a cada via. Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C e centrifugados por 5 min a 1440 x g. O sobrenadante foi transferido para placas de 96 poços de fundo chato para leitura a 405 nm em espectrofotômetro de microplacas.

### 5.7.4 Avaliação da via clássica

Em tubos do tipo *ependorf* foram adicionados 20  $\mu\text{l}$  de cada solução-teste em concentrações finais de 1,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 833  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (triplicata para cada concentração), 50  $\mu\text{l}$  de soro humano diluído 1:32 em HC (diluição determinada pela titulação, correspondente a 50% de lise). Após 0 e 30 min de incubação prévia a

37°C, 50 µl da suspensão de eritrócitos de carneiro sensibilizados foram adicionados (MESSIAS *et al.*, 1994). Os tubos foram incubados por 30 min a 37°C, centrifugados por 5 min a 1440 x g e o sobrenadante transferido para placas de 96 poços (fundo chato) para leitura a 405 nm.

Tanto para a via clássica quanto para a via alternativa, a percentagem de inibição da hemólise foi obtida considerando como 100% de hemólise a absorbância do controle A (TABELA 9), no qual os 20 µl de solução-teste foram substituídos por 20 µl de tampão (HC ou HA). O valor de absorbância observado foi considerado como 100% de hemólise provocada pelo complemento.

Além do controle A, outros controles foram utilizados (TABELA 9), como o B, referente a 0% de hemólise, no qual os 50 µl de soro foram substituídos por tampão (HC ou HA); e o controle C, referente à hemólise total, no qual os 50 µl do soro e os 20 µl da solução-teste foram substituídos por 70 µl de triton X-100 a 10% (v/v) (YAMADA *et al.*, 1985; MESSIAS *et al.*, 1994).

**TABELA 9** – CONTROLES UTILIZADOS NOS EXPERIMENTOS COM O SISTEMA COMPLEMENTO

ENSAIO	RESULTADO ESPERADO	REAGENTES UTILIZADOS*
Ensaio convencional utilizando as frações	-	<p style="text-align: center;"><b>Pré-incubação</b></p> 20 µl - fração teste em diferentes concentrações 50 µl - soro humano (fonte de complemento) <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> 2ª incubação: 50 µl - Solução de eritrócitos
Controle A	% de hemólise = 100% de hemólise provocada pelo complemento	<p style="text-align: center;"><b>Pré-incubação</b></p> 20 µl - tampão 50 µl - soro humano (fonte de complemento) <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> 2ª incubação: 50 µl - Solução de eritrócitos
Controle B	0% de hemólise	<p style="text-align: center;"><b>Pré-incubação</b></p> 20 µl - fração teste em diferentes concentrações 50 µl - tampão <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> 2ª incubação: 50 µl - Solução de eritrócitos
Controle C	Hemólise total das hemácias presentes em solução	<p style="text-align: center;"><b>Pré-incubação</b></p> 70 µl - TritonX-100 a 10% (v/v) <hr style="border-top: 1px dashed black;"/> 2ª incubação: 50 µl - Solução de eritrócitos

FONTE: O autor (2011)

NOTA: \* Soluções diluídas em tampão HC ou HÁ, dependendo do experimento avaliado (via clássica ou via alternativa, respectivamente)

### 5.7.5 Avaliação da via alternativa

Alíquotas de 50  $\mu\text{l}$  de MHS diluída 1:10 em HC (diluição determinada pela titulação, correspondente a 50% de lise) foram incubadas em tubos do tipo *ependorf*, com 50  $\mu\text{l}$  das soluções-teste a serem testadas em concentrações de 1,6  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  a 833  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (triplicata para cada concentração), (MESSIAS *et al.*, 1994). Após 0, 15, 30 e 60 min de incubação prévia a 37°C, foram adicionados 50  $\mu\text{l}$  da suspensão de eritrócitos de coelho 1,5% (v/v) em tampão HA. Os tubos foram incubados durante 30 min, a 37°C, centrifugados por 5 min a 1440 x g e o sobrenadante transferido para placas de 96 poços (fundo chato) para posterior leitura a 405 nm.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos nos ensaios biológicos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão ( $M \pm dp$ ), submetidos à análise multifatorial de variância ANOVA, teste de Tukey e teste Student's t, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância  $p \leq 0,05$  (VIEIRA, 1991).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1 RENDIMENTOS E ANÁLISES QUÍMICAS DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa* POR DIFERENTES METODOLOGIAS (EXTRAÇÃO LABORATORIAL SEQUENCIAL E DECOCÇÕES)

Ao final dos experimentos, foram obtidas dezessete diferentes frações (TABELA 10). Em relação às extrações aquosas, três frações foram provenientes das extrações laboratoriais sequenciais, e doze das decocções. As outras duas frações restantes (AERT-YPF e EERT) foram obtidas posteriormente, através das técnicas descritas nos itens 5.1.4 e 5.4.1, respectivamente.

**TABELA 10** – FRAÇÕES DE *Uncaria tomentosa* OBTIDAS APÓS OS DIFERENTES TIPOS DE EXTRAÇÕES

Origem	Procedimento	Fração	Sigla	Precipitação etanólica
Material cedido pela Herbarium	Extrações laboratoriais sequenciais	1ª Extração aquosa a temperatura ambiente	1AERT	sim (precipitado)
		2ª Extração aquosa a temperatura ambiente	2AERT	sim (precipitado)
		Extração aquosa a quente	AEHOT	sim (precipitado)
Material obtido do comércio	Decocções	Decocção de 5 min a 5%	D5a	Não
		Decocção de 10 min a 5%	D10a	Não
		Decocção de 15 min a 5%	D15a	Não
		Decocção de 5 min a 0,35%	D5b	Não
		Decocção de 10 min a 0,35%	D10b	Não
		Decocção de 15 min a 0,35%	D15b	Não
		Precipitado da decocção de 5 min a 5%	EP-D5a	sim
		Precipitado da decocção de 5 min a 5%	EP-D10a	sim
		Precipitado da decocção de 5 min a 5%	EP-D15a	sim
		Sobrenadante da decocção de 5 min a 5%	S-D5a	sim
		Sobrenadante da decocção de 5 min a 5%	S-D10a	sim
		Sobrenadante da decocção de 5 min a 5%	S-D15a	sim
Frações 1AERT e 2AERT	Precipitação seletiva de AGPs com Yariv	Fração precipitada com Yariv	AERT-YPF	-
Material cedido pela Herbarium	Extração etanólica a 60%	Extração etanólica a temperatura ambiente	EERT	-

FONTE: O autor (2011)

As frações 1AERT, 2AERT e AEHOT, obtidas através das extrações aquosas laboratoriais apresentaram rendimentos de 0,5; 0,6 e 0,1%,

respectivamente, em relação ao material inicial bruto (TABELA 11). Como essas extrações foram sequenciais, o rendimento total relativo foi de 1,1%. Já o rendimento das frações provenientes da decocção foi, em média, doze vezes maior. O tempo de decocção (5, 10 ou 15 min) e a quantidade de material utilizada para o preparo (**A** ou **B**, FIGURA 9) não implicaram em aumento ou diminuição do rendimento, que ficou em torno de 5%. O menor rendimento apresentado pelas extrações laboratoriais, principalmente em relação às frações 1AERT e 2AERT, pode ser explicado pelo fato de terem sido realizadas em temperatura ambiente, e não a quente, como no caso dos decoctos. Sabe-se que, quanto maior a temperatura, menor o tempo de extração para carboidratos (HO; CACACE; MAZZA, 2007). Entretanto, temperaturas de extração elevadas podem levar à degradação de determinados tipos de carboidratos, além de possibilitar uma maior extração de outros compostos paralelamente, como proteínas e pigmentos (no caso de material vegetal), diminuindo a pureza dos polissacarídeos brutos extraídos (HO; CACACE; MAZZA, 2007; WU *et al.*, 2007).

### 6.1.1 Dosagens colorimétricas

As frações 1AERT, 2AERT e AEHOT e aquelas provenientes das decocções: D10a, EP-D10a e S-D10a, foram analisadas quanto ao teor de carboidrato total, proteína, fenol e amido. Os resultados estão apresentados na TABELA 11.

**TABELA 11** – RENDIMENTO E ANÁLISE QUÍMICA DAS DOSAGENS COLORIMÉTRICAS DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE *Uncaria tomentosa* OBTIDAS POR EXTRAÇÃO LABORATORIAL SEQUENCIAL E DECOCCÃO

	1AERT	2AERT	AEHOT	D10a	EP-D10a	S-D10
<b>Carboidrato Total (%)<sup>a</sup></b>	28	11	82	45	47	43
<b>Proteína (%)<sup>b</sup></b>	5	2	4	7	11	7
<b>Fenol (%)<sup>c</sup></b>	42	16	17	86	80	89
<b>Amido (%)<sup>d</sup></b>	3	nd	30	13	36	nd
<b>Rendimento (%)<sup>e</sup></b>	0,5	0,6	0,1	4,3	26	66

FONTE: O autor (2011)

NOTA: <sup>a</sup> Determinado pelo microensaio fenol-ácido sulfúrico FOX; ROBBIT (1991); <sup>b</sup> Determinado de acordo com BRADFORD (1976); <sup>c</sup> Determinado através de microensaio utilizando reagente de Folin-Ciocalteu, adaptado de MORAIS *et al.* (2009); <sup>d</sup> Determinado através do microensaio adaptado de CHRASTIL (1987), onde os valores são calculados em relação à percentagem de carboidrato total; <sup>e</sup> Peso seco, calculado em relação ao peso inicial do material bruto; nd – não determinado.

Em relação às frações 1AERT, 2AERT e AEHOT, observou-se uma redução no teor de carboidrato total na medida em que se realizou a extração sequencial à temperatura ambiente, porém, houve um elevado aumento quando a extração foi feita a 60°C. Já nos decoctos, esse teor foi semelhante, em torno de 45%, indicando que, possivelmente devido à alta temperatura (em torno de 100°C), os carboidratos presentes foram extraídos nos primeiros minutos de extração, já que o tempo não influenciou significativamente no resultado. Considerando o conteúdo de carboidrato total, a fração AEHOT foi a que apresentou maior rendimento em relação às outras frações. Esse resultado era esperado, devido às condições de extração dessa fração: um tempo maior e temperatura elevada aumentam o potencial de extração de carboidratos, como citado anteriormente (HO; CACACE; MAZZA, 2007; WU *et al.*, 2007)

Em relação aos outros componentes dosados, todas as frações apresentaram um baixo teor de proteínas, inferior a 11%.

A percentagem de fenol total foi maior nos decoctos, em torno de 85%. Já nas amostras provenientes da extração laboratorial, a maior parte dos fenóis foi extraída na primeira fração (42%), e nas extrações seguintes, a quantidade extraída se manteve em torno de 16%. Essa maior percentagem de fenóis totais extraída em altas temperaturas (90-100°C) em relação à temperaturas mais baixas (20-40°C) já foi relatada em extrações de *Phyllanthus amarus* (LIM; MURTIJAYA, 2007) e no decocto de roibos (*Aspalathus linearis*) (JOUBERT, 1990). Esse aumento pode ser explicado pelo fato de que altas temperaturas podem romper determinados componentes celulares das plantas, resultando na liberação de compostos fenólicos presentes nas paredes celulares, ou ligados a ela (LIM; MURTIJAYA, 2007); pelo aumento da solubilidade de alguns fenóis (JOUBERT, 1990; LIM; MURTIJAYA, 2007) ou pela hidrólise simples de taninos em fenóis simples (LIM; MURTIJAYA, 2007). Já a amostra AEHOT, mesmo sendo extraída em temperatura mais elevada do que as AERTs, apresentou um menor conteúdo de fenóis, provavelmente devido ao fato de a extração ter sido sequencial. Portanto, pode-se concluir que a decocção é a melhor metodologia para a obtenção dos fenóis.

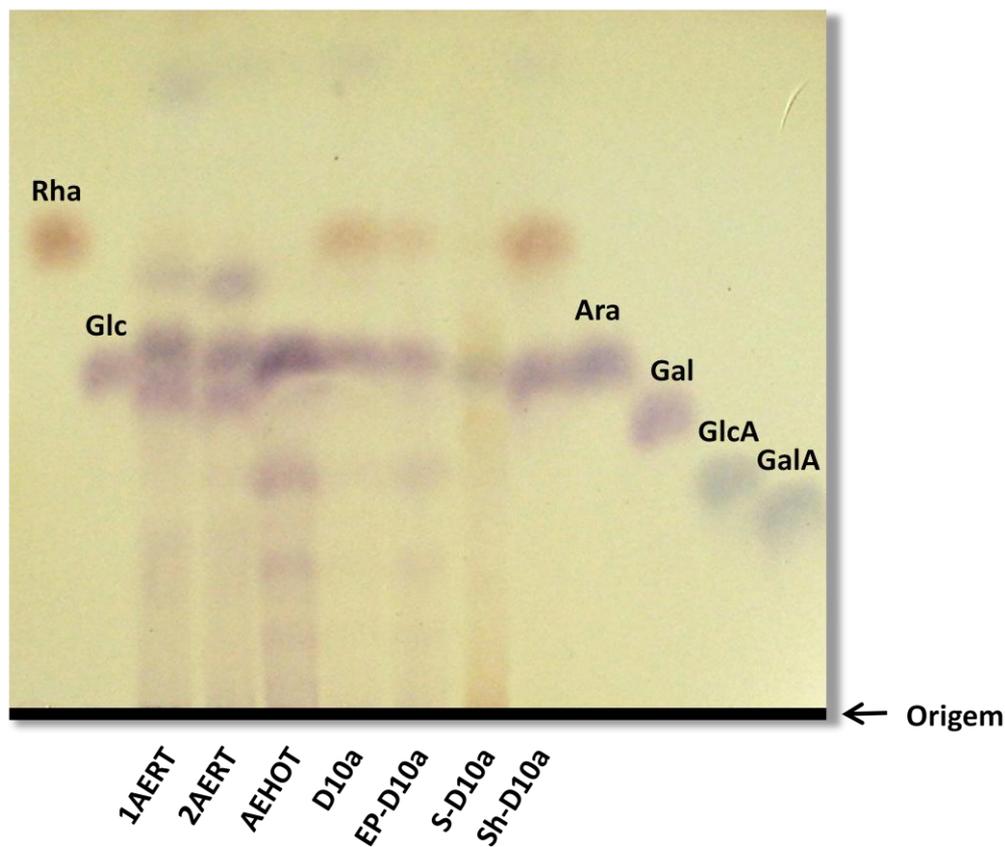
Por fim, a quantidade de amilose foi maior nas amostras extraídas com H<sub>2</sub>O quente (AEHOT e decoctos), e ainda maior quando submetidas à precipitação etanólica de polímeros (AEHOT e EP-D10a). Esse resultado confere com as

propriedades do amido, o qual apresenta maior solubilidade em água a temperaturas elevadas (SINGH *et al.*, 2003; TAN; LI; TAN, 2009).

#### 6.1.2 Determinação da composição monossacarídica neutra e ácida

Como destacado anteriormente, não há relatos na literatura científica de estudos focando os carboidratos presentes na *U. tomentosa*. Entretanto, essa análise é válida devido a estudos prévios realizados no nosso laboratório por OKUMURA (2009), que demonstrou a presença desses compostos em extratos aquosos dessa planta.

No presente trabalho, a composição monossacarídica das frações foi analisada tanto por cromatografia em camada delgada (CCD), quanto por cromatografia gasosa (CG). A análise em CCD (FIGURA 11) foi realizada, principalmente, para verificar os açúcares ácidos que não seriam detectados por GC (na forma de acetato de alditóis). As amostras 1AERT e 2AERT apresentaram um perfil semelhante, sendo a arabinose e a galactose os monossacarídeos mais abundantes. Já na amostra AEHOT a glucose foi o monossacarídeo mais encontrado. Em relação aos decoctos, os monossacarídeos presentes em maior quantidade foram glucose e arabinose. O perfil da amostra EP-D10a foi semelhante ao perfil da amostra AEHOT. Apesar das frações AEHOT e EP-D10a apresentarem uma banda aparentemente com o mesmo tempo de retenção que o ácido glucurônico, pode-se concluir que não se trata desse monossacarídeo, visto que a coloração dessas bandas é lilás, enquanto a do ácido glucurônico é azul. Assim, com o intuito de confirmar a ausência ou presença de monossacarídeos ácidos nas frações em estudo, optou-se pela dosagem colorimétrica de ácidos urônicos, uma vez que esses tipos de monossacarídeos poderiam estar presentes em quantidades incapazes de serem detectadas através de CCD, nas condições experimentais utilizadas.



**FIGURA 11** – PERFIL MONOSSACARÍDICO OBTIDO EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa*  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: As amostras testadas foram previamente hidrolisadas com TFA 2,5M por 8h a 100°C. A corrida cromatográfica ascendente foi realizada utilizando como fase móvel uma mistura de acetato de etila:n-propanol:ácido acético:água (4:2:2:1 v/v). A visualização dos açúcares foi possível após borrifamento com solução de orcinol 0,5% (m/v) em etanol/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e aquecimento a 100°C.

Os monossacarídeos neutros de todas as amostras foram também quantificados por GC como acetatos de alditóis (TABELA 12). A glucose foi o componente majoritário de todas as frações. Além da glucose, os decoctos apresentaram quantidades significativas de ramnose, e as frações 1AERT e 2AERT de arabinose e galactose, confirmando os resultados obtidos através da CCD. O fato da amostra AEHOT ter apresentado essencialmente glucose em sua composição, confirma o resultado obtido para a dosagem de amido (TABELA 11) nessa fração.

**TABELA 12** – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA E RENDIMENTO DAS FRAÇÕES AQUOSAS DE *Uncaria tomentosa*

Fração	Composição Monossacarídica <sup>a</sup> (%)								Rendimento <sup>c</sup> (%)
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc	Ácidos Urônicos <sup>b</sup>	
D5a	31	tr	5	2	4	2	54	Nd	3,7
D10a	28	tr	4	2	3	3	56	6	4,3
D15a	30	tr	6	3	6	3	50	Nd	3,3
D5b	39	tr	7	2	3	2	45	Nd	5,6
D10b	41	tr	5	2	2	2	48	Nd	7,2
D15b	31	tr	7	4	4	3	51	Nd	6,0
EP-D5a	17		3	2	4	5	69	Nd	29
EP-D10a	16		3	2	4	5	66	5	26
EP-D15a	18	tr	4	5	5	6	62	Nd	37
S-D5a	43	tr	7	1	4	1	42	Nd	65
S-D10a	38	tr	6	1	6	2	44	0	66
S-D15a	36	tr	8	2	8	2	41	Nd	55
1AERT	8	tr	11	3	2	23	26	26	0,5
2AERT	3	tr	7	5	2	11	48	25	0,6
AEHOT	Tr	tr	2	tr	tr	3	85	10	0,1

FONTE: O autor (2011)

NOTA: <sup>a</sup> Monossacarídeos neutros analisados por GC, na forma de acetatos de alditóis (ALBERSHEIM, 1967); <sup>b</sup> Determinado pelo microensaio adaptado de FILIZETTI-COZZI; CARPITA (1991), onde os valores são calculados em relação à percentagem de carboidrato total; <sup>c</sup> Peso seco, calculado em relação ao peso inicial do material bruto; tr – traços (<0,5%).

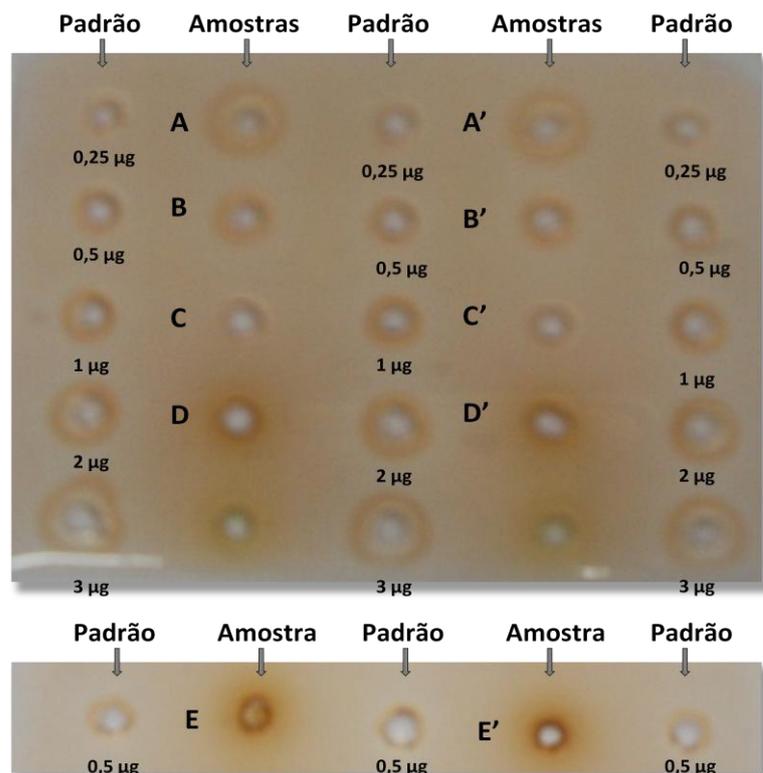
O teor de monossacarídeos ácidos das frações foi determinado por dosagem colorimétrica (FILIZETTI-COZZI; CARPITA, 1991). Enquanto as amostras 1AERT e 2AERT apresentaram o maior conteúdo de ácido urônico, em média 25% em relação ao conteúdo de carboidrato total, nas demais amostras a percentagem encontrada desse tipo de monossacarídeo não ultrapassou os 10%. Esse resultado provavelmente está mais relacionado ao tempo de extração do que com a temperatura. A solubilização da amostra em H<sub>2</sub>O a altas temperaturas extrai mais carboidratos ácidos do que em baixas temperaturas (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010). Nesse caso, a fração AEHOT e os decoctos deveriam apresentar maior quantidade desses compostos. Entretanto, o tempo de extração também é um fator determinante para a otimização do processo, visto que estudos já demonstraram que tempos de extração superiores a 60 min resultaram em maior obtenção de carboidratos ácidos (KULKARNI; VIJAYANAND, 2010). Além disso, o fato da

extração ter sido sequencial para se obter a fração AEHOT, acarretou a diminuição da quantidade desses compostos.

Analisando em conjunto os dados obtidos para 1AERT e 2AERT, é possível sugerir a presença de polissacarídeos ácidos (pectinas), arabinogalactanas e glucanas (exceto amido) nessas frações.

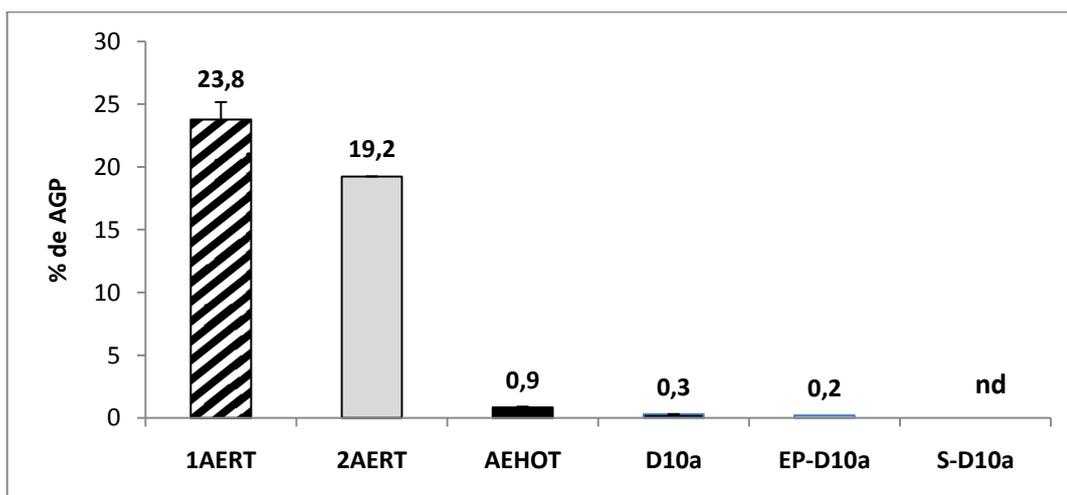
### 6.1.3 Dosagem de AGPs

A difusão radial em gel de agarose na presença de  $\beta$ -GlcY (FIGURA 12) foi utilizada para a determinação do conteúdo de AGPs nas diferentes frações. Ao analisar a FIGURA 12, é possível verificar o halo indicativo da presença de AGP em todas as amostras: 1AERT (FIGURA 12-A/A'), 2AERT (FIGURA 12-B/B'), AEHOT (FIGURA 12-C/C'), D10a (FIGURA-12 D/D') e EP-D10a (FIGURA-12 E/E'). O diâmetro do halo é proporcional à concentração de AGPs nas frações, comparando-se com os halos do padrão, a goma arábica. Os resultados obtidos, expressos em percentagens de AGP em relação ao conteúdo de carboidrato total, estão apresentados na FIGURA 13. As amostras 1AERT e 2AERT apresentaram uma alta percentagem de AGP, aproximadamente 24 e 19%, respectivamente, enquanto as amostras AEHOT, D10a e EP-D10a, apresentaram menos de 1% de AGP.



**FIGURA 12** – GEL DE AGAROSE COM O REAGENTE  $\beta$ -GlcY PARA A DETECÇÃO DE AGPs DAS FRAÇÕES: **A/A'** - AMOSTRA 1AERT (10 mg/ml). **B/B'** – 2AERT (10 mg/ml). **C** – AEHOT (10 mg/ml). **D/D'** – D10a (60 mg/ml). **E/E'** – EP-D10a (60 mg/ml).

NOTA: O padrão utilizado foi a Goma Arábica (Sigma-Aldrich Chem Co.). Os valores são referentes a  $\mu$ g de AGP em 5  $\mu$ l de padrão, de acordo com o método descrito por VAN-HOLST & CLARKE (1985).  
 FONTE: O autor (2011)



**FIGURA 13** – PERCENTAGEM DE AGP EM RELAÇÃO AO CONTEÚDO DE CARBOIDRATO TOTAL DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa*

FONTE: O autor (2011)

NOTA: De acordo com o método descrito por VAN-HOLST & CLARKE (1985); nd - percentagem de AGP não determinada

#### 6.1.4 Obtenção e caracterização química da fração AERT-YPF

O reagente Yariv  $\beta$ -Glucosil ( $\beta$ -GlcY) foi usado para precipitar seletivamente as AGPs da fração 1AERT, em razão da alta percentagem desse polímero encontrada nessa amostra, originando uma nova fração, a AERT-YPF. Entretanto, o rendimento observado foi pequeno, em torno de 0,25%. A baixa capacidade de precipitação de AGPs pode ter ocorrido em função da alta presença de compostos fenólicos na amostra 1AERT (45%), como observado na TABELA 11. Esses compostos, por possuírem estruturas semelhantes ao reagente de Yariv (NOTHNAGEL, 1997), podem inibir a interação entre o  $\beta$ -GlcY e as AGPs (JERMYN, 1978).

Através da análise da composição monossacarídica da fração AERT-YPF (TABELA 13), foi observada a presença de quatro monossacarídeos: arabinose (39%), galactose (24%), ramnose (7%) e glucose (28%). Em relação à 1AERT que lhe deu origem, a fração AERT-YPF apresentou um aumento na percentagem de arabinose e uma diminuição na percentagem de galactose. Entretanto, ambos os monossacarídeos continuaram presentes em elevadas quantidades, os quais são típicos de AGPs (CLARKE *et al.*, 1979; FINCHER; STONE, 1983; SHOWALTER, 2001). A presença de ramnose também é comum em AGPs, as quais podem estar localizadas nas extremidades das cadeias laterais (NOTHNAGEL, 1997; SERPE; NOTHNAGEL, 1999; NOTHNAGEL; BACIC; CLARKE, 2000). THUDE (2006) isolaram uma AGP de *Echinacea purpurea* que também possuía carboidratos neutros como Ara, Gal, Glc e Rha em sua composição. Entretanto, a quantidade de glucose (6,9%) encontrada foi menor do que a da AGP isolada nesse trabalho. Essa alta quantidade de glucose na fração AERT-YPF poderia ser proveniente do reagente  $\beta$ -GlcY, que não tenha sido completamente extraído da amostra após sua utilização para a precipitação das AGPs. No entanto, observa-se grande quantidade de glucose já na fração 1AERT, ou seja, antes do reagente ter sido adicionado. Logo, é provável que essa glucose esteja ligada diretamente às AGPs. Sabe-se que as AGPs possuem a capacidade de se ligarem especificamente a certos tipos de glucanas  $\beta$ -ligadas presentes em paredes celulares de plantas (CARPITA; GIBEAUT, 1993). As AGPs podem, ainda, interagir com fenóis glicosilados, uma vez que apresentam certos tipos de fenóis, semelhantes ao  $\beta$ -GlcY, como ligantes

naturais (NOTHNAGEL, 1997). Portanto, essa glucose poderia ser oriunda dessas moléculas.

**TABELA 13 – COMPOSIÇÃO MONOSSACARÍDICA DA FRAÇÃO AERT-YPF**

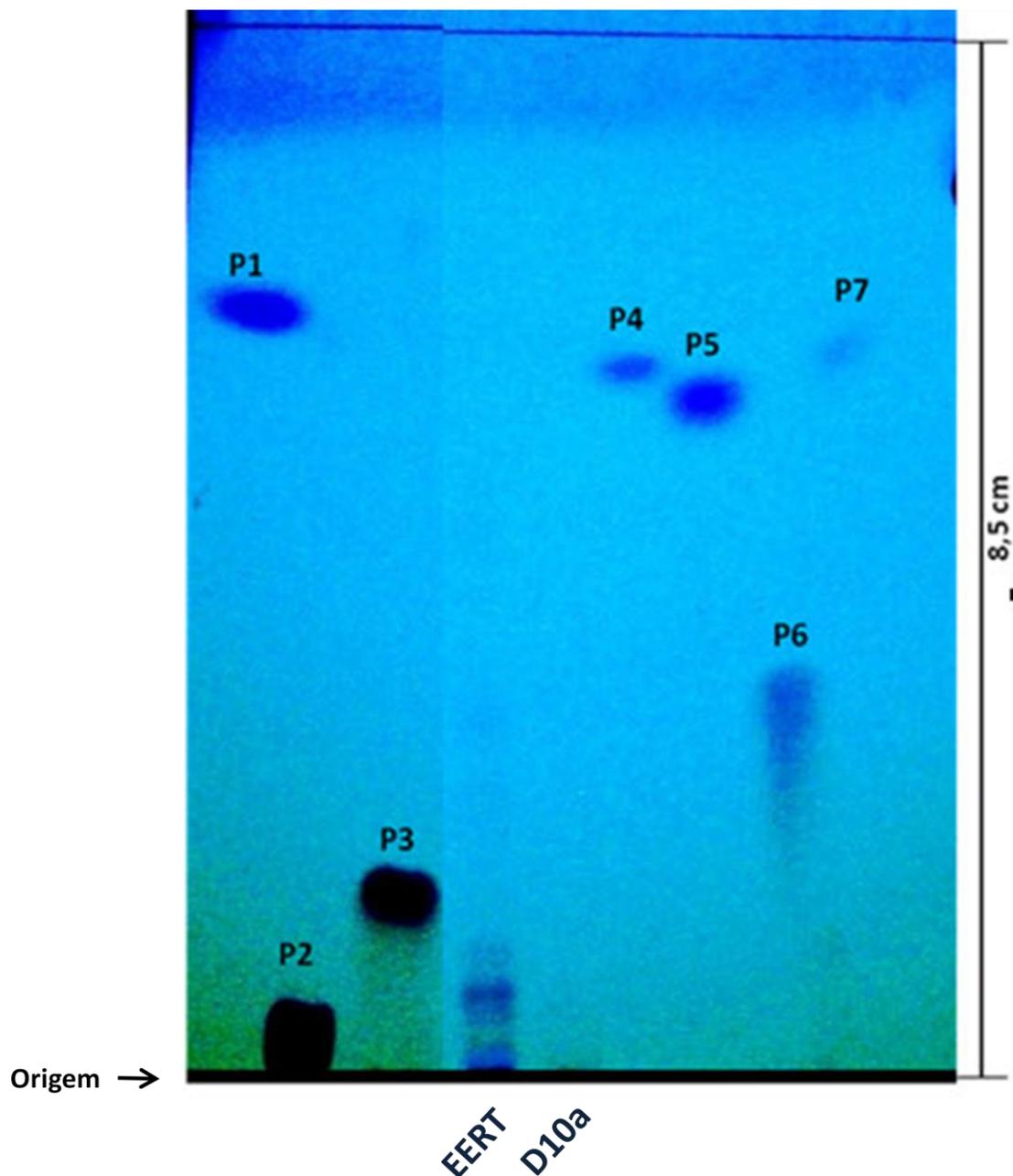
Fração	Composição Monossacarídica* (%)						
	Rha	Fuc	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
1AERT	11	tr	14	4	3	31	35
AERT-YPF	7	tr	39	tr	tr	24	28

FONTE: O autor (2011)

NOTA: \* Monossacarídeos neutros analisados por GLC, na forma de acetatos de alditóis

#### 6.1.5 Determinação da presença de metabólitos especiais

A presença de metabólitos especiais (ou secundários) nas frações EERT (proveniente da extração etanólica da amostra cedida pela Herbarium) e D10a foi analisada através da CCD (FIGURA 14). O extrato etanólico EERT foi preparado exclusivamente para essa análise, uma vez que a amostra 1AERT, que seria a versão aquosa da amostra EERT, não apresentou bandas referentes a metabólitos secundários, quando analisada sob luz UV (resultado não mostrado). A fração EERT apresentou em sua composição de ácidos fenólicos, o ácido clorogênico e ácido caféico. GONÇALVES e colaboradores (2005), foram capazes de detectar ácido caféico em extratos aquosos de *U. tomentosa*, além de ácido protocatéquico por cromatografia líquida de alta resolução. Já o decocto não apresentou bandas aparentes para estes metabólitos. Este resultado pode estar diretamente ligado ao fato da fração D10a ter sido obtida através de um material fibroso, durante um tempo curto de decocção, enquanto que a amostra analisada por GONÇALVES e colaboradores foi proveniente de uma extração de 40 min de um material pulverizado, com maior superfície de contato.



**FIGURA 14** – PERFIL DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS OBTIDO EM CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA (CCD) DAS FRAÇÕES AQUOSAS EERT E D10a DE *Uncaria tomentosa*  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Para a corrida cromatográfica ascendente as amostras EERT e D10a foram solubilizadas em H<sub>2</sub>O destilada. Como fase móvel foi utilizada uma mistura de clorofórmio:metanol:ácido acético (90:10:1 v/v). As bandas referentes aos metabólitos especiais foram visualizadas sob luz UV (254 nm). Padrões utilizados: ácido cinâmico (P1), ácido clorogênico (P2), ácido gálico (P3), ácido siríngico (P4), ácido vanílico (P5) e ácido sirúlico (P6).

### 6.1.6 Dosagem de alcalóides

O conteúdo de alcalóides das amostras 1AERT, AEHOT e D10a foi analisado em CLAE, utilizando a mitrafilina como padrão (dados não mostrados). Na amostra 1AERT, o teor de mitrafilina encontrado foi de 0,01%. Entretanto, esse valor não pode ser considerado pelo fato de o sinal presente no cromatograma possuir baixa intensidade, podendo até mesmo ser atribuído à própria variação da linha de base. Nas demais amostras, os picos referentes à mitrafilina não foram observados.

Portanto, nem as amostras provenientes da extração sequencial, nem as amostras obtidas por decocção apresentaram quantidades detectáveis de alcalóides em sua composição. SHENG e colaboradores já haviam obtido extrações aquosas de *U. tomentosa* sem quantidades significativas de alcalóides (<0,05%) (SHENG *et al.*, 2005). Esses resultados eram esperados, uma vez que, geralmente, os alcalóides são melhor extraídos em soluções alcoólicas (ANISZEWSKI, 2007) do que em soluções aquosas.

### 6.1.7 Análises de espectroscopia de RMN-<sup>13</sup>C das frações 1AERT e D10a

As frações 1AERT, AEHOT e D10a foram analisadas por RMN-<sup>13</sup>C. Os sinais foram assinalados baseando-se em dados de RMN-<sup>13</sup>C obtidos da literatura específica, considerando a composição monossacarídica e as dosagens colorimétricas de cada amostra.

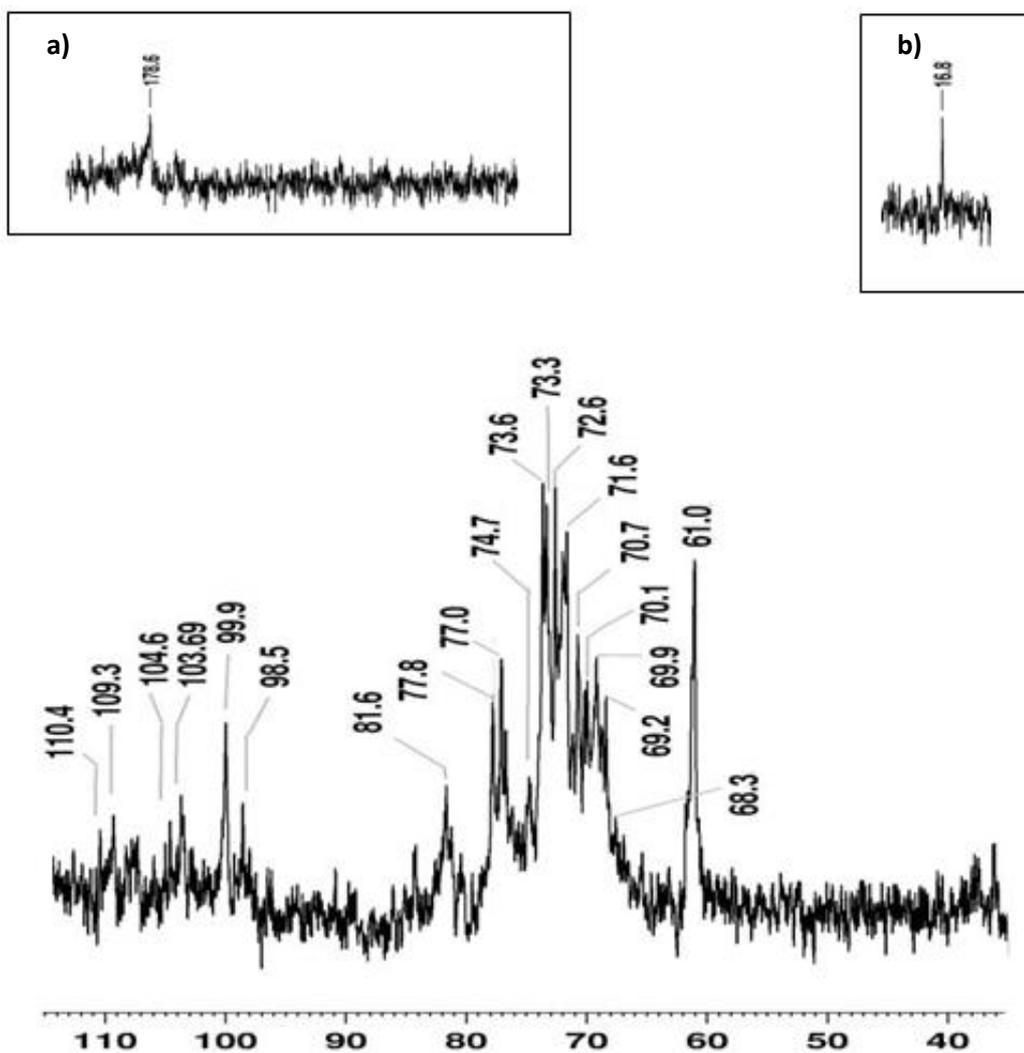
Analisando o espectro de RMN-<sup>13</sup>C da fração 1AERT (FIGURA 15), na região de campo mais baixo foi obtido o sinal em  $\delta$  178,7 assinalado para o C-6 de ácido urônico (-COOH) (MENESTRINA *et al.*, 1998). Este resultado, somado ao assinalamento em  $\delta$  99,9 para o C-1 de  $\alpha$ -GalAp, corrobora com o teor de açúcares ácidos encontrado para essa amostra (35%) (TABELA 11). Além disso, também na região de C-1 foram obtidos outros sinais em  $\delta$  109,3 > 110,4 assinalados para  $\alpha$ -Araf; em  $\delta$  103,7 > 104,6 assinalados para  $\beta$ -Galp; e em  $\delta$  98,6 > 100,0 para  $\alpha$ -Glc (GORIN; MAZUREK, 1975; MENESTRINA *et al.*, 1998). Os sinais em  $\delta$  103,7 > 104,6 também poderiam ser assinalados para o C-1 de  $\beta$ -glucurônico (MENESTRINA *et al.*, 1998). Caso seja esse o ácido urônico presente nessa fração, os sinais estariam sobrepostos aos sinais assinalados para o C-1 de  $\beta$ -Galp,

entretanto, caso se trate de um  $\alpha$ -galacturônico, os sinais do C-1 poderiam estar sobrespostos aos sinais de C-1 de  $\alpha$ -Glc ( $\delta$  98,6 > 100,0).

Na região de C-2 a C-5, o sinal obtido em  $\delta$  81,7 é característico de C-3 de unidades de galactose  $\beta$ -ligadas (MENESTRINA *et al.*, 1998), as quais são características de arabinogalactanas do tipo II [Galactana  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3) substituída em O-6 por Galp e Ara], que constituem a porção glicídica das AGPs (FINCHER; STONE; CLARKE, 1983). Esse sinal, juntamente com os dados obtidos através da difusão radial (FIGURA 12), confirma a presença de AGPs na amostra 1AERT. Finalmente, em região de campo mais alto, foram assinalados dois sinais em  $\delta$  61,0 e  $\delta$  16,9 para C-6 livre de Glc ou Gal e C-6 de Rha, respectivamente.

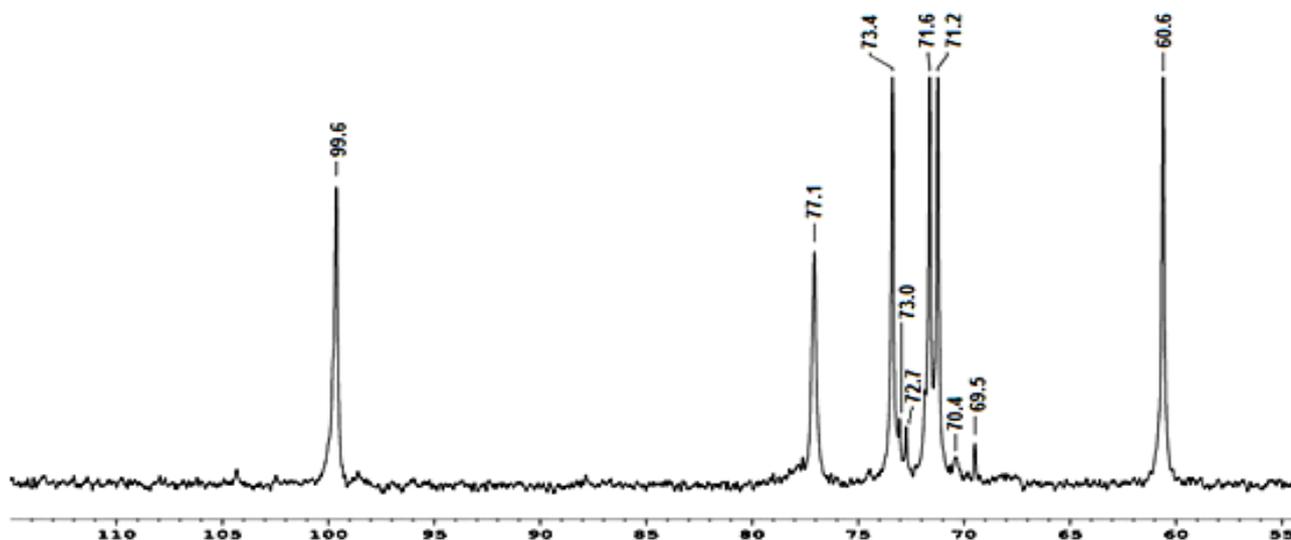
O espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  obtido para a fração AEHOT (FIGURA 16) é característico de uma  $\alpha$ -glucana (CHOI; KIM; PARK, 1999). Na região de C-1, foi obtido o sinal em  $\delta$  99,6 assinalado para  $\alpha$ -Glc. O sinal em  $\delta$  77,1 pode ser atribuído ao C-4 substituído e os sinais em  $\delta$  73,4; 71,6 e 71,2 correspondem a região de carbono não substituído (C-2, C-3 e C-5). Em campo mais alto, foi assinalado o sinal em  $\delta$  60,6 para o C-6 livre de Glc. Além disso, o sinal em  $\delta$  69,5 pode ser atribuído ao C-6 de unidades de Glc substituídas. Este resultado está de acordo com a composição monossacarídica obtida para essa fração, onde 85% dos monossacarídeos encontrados são glucose (TABELA 12) e com o alto teor de amilose [glucana linear  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4)] encontrado através da dosagem colorimétrica (TABELA 11).

No espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  da fração D10a (FIGURA 17), a região de C-1 apresentou os sinais em  $\delta$  100,6 > 101,1 e em 100,0 que foram assinalados para  $\alpha$ -Rha e  $\alpha$ -Glc, respectivamente. Na região de campo mais alto, os sinais em  $\delta$  60,9 e em 16,5 > 16,9 foram assinalados para o C-6 de Glc e C-6 de Rha, respectivamente. Além disso, sinais de polifenóis (taninos) foram observados em  $\delta$  143,9; 131,3; 40,6 e 37,7. (SOUZA *et al.*, 2008)



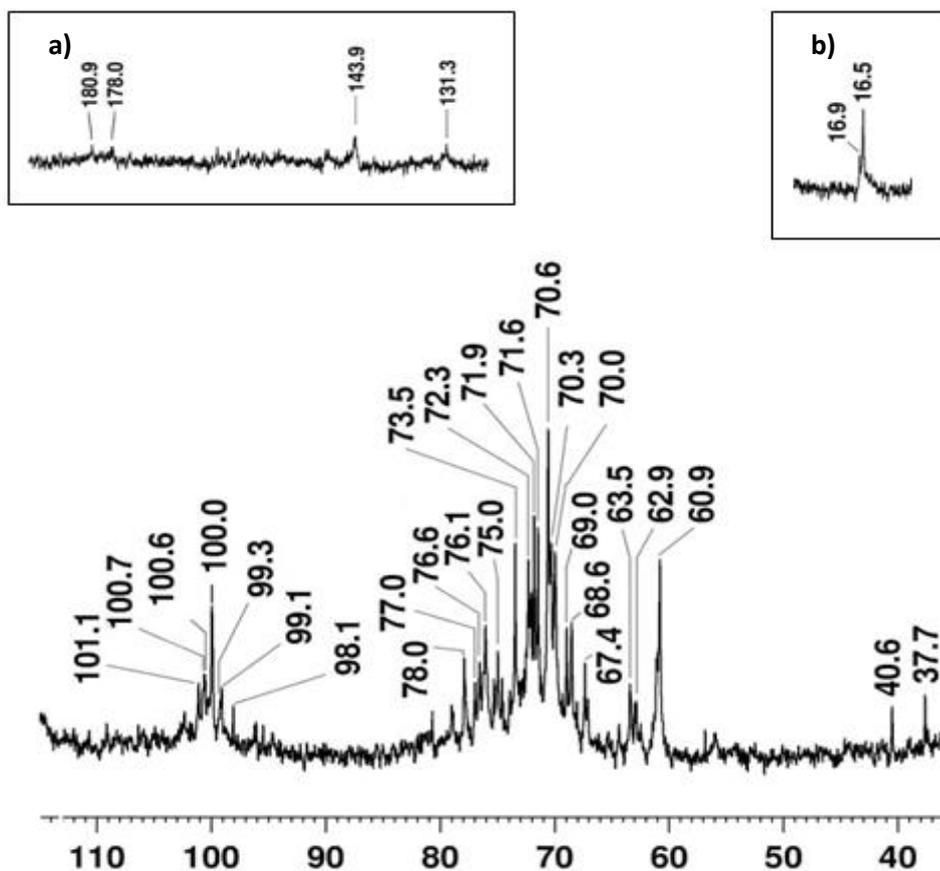
**FIGURA 15** – ESPECTRO PARCIAL DE RMN- $^{13}\text{C}$  (REGIÃO 115 A 45 PPM) DA FRAÇÃO 1AERT EM  $\text{D}_2\text{O}$ , A  $70^\circ\text{C}$   
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Valores numéricos em  $\delta$  (PPM). Insert: a) Região 190 - 125 ppm; b) 25 a 10 ppm



**FIGURA 16** – ESPECTRO PARCIAL DE RMN- $^{13}\text{C}$  (REGIÃO 115 A 55 PPM) DA FRAÇÃO AEHOT EM  $\text{D}_2\text{O}$ , A  $70^\circ\text{C}$   
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Valores numéricos em  $\delta$  (PPM).



**FIGURA 17** – ESPECTRO PARCIAL DE RMN- $^{13}\text{C}$  (REGIÃO 115 A 45 PPM) DA FRAÇÃO D10a EM  $\text{D}_2\text{O}$ , A  $70^\circ\text{C}$   
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Valores numéricos em  $\delta$  (PPM). Insert: a) Região 190 - 125 ppm; b) 25 a 10 ppm

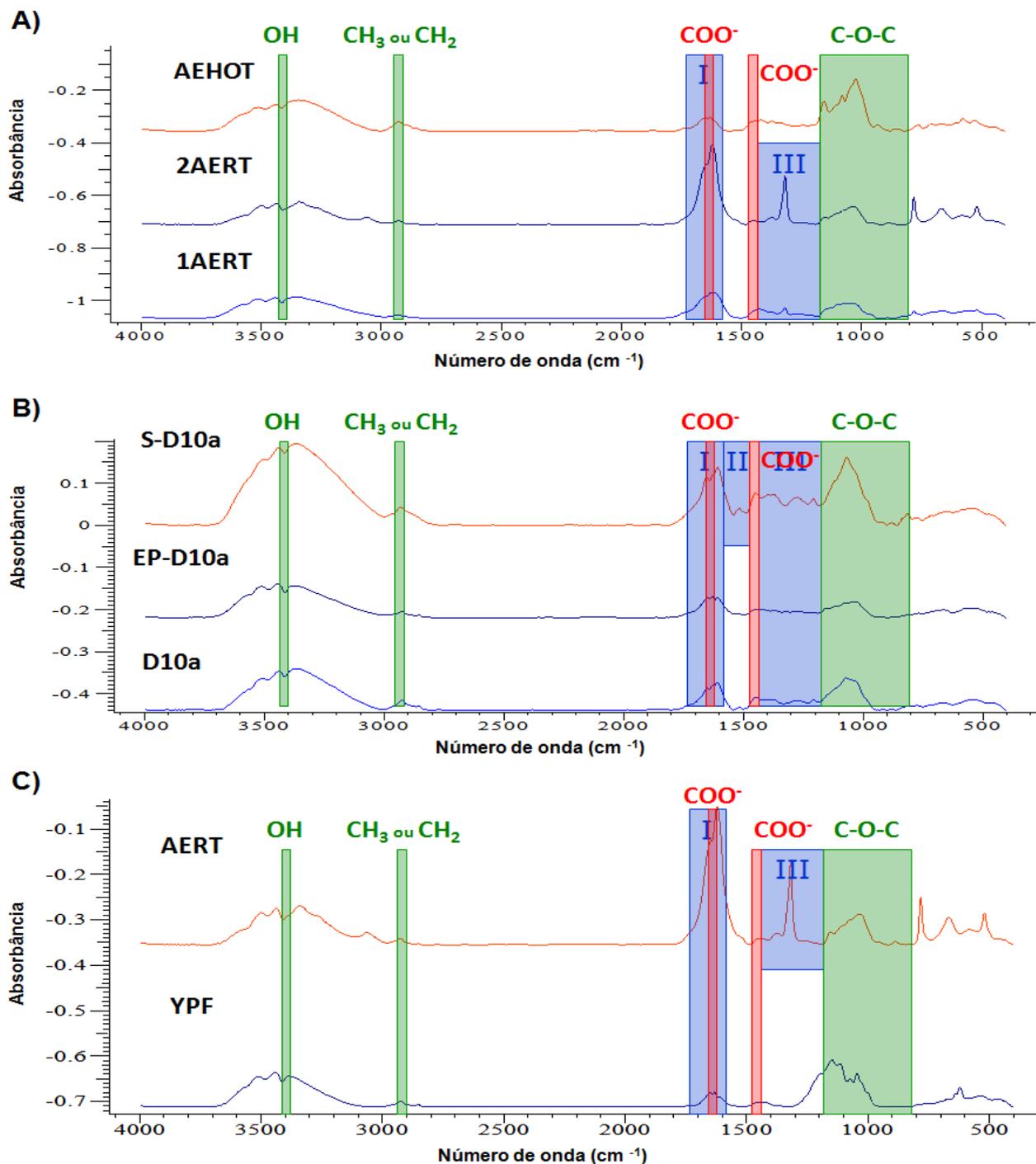
### 6.1.8 Análises dos espectros de infravermelho

A espectroscopia do infravermelho é uma ferramenta rápida e sensível que tem sido utilizada na elucidação de estruturas, propriedades físicas e interações de carboidratos (KACURAKOVÁ; WILSON, 2001). O princípio do método baseia-se na variação dos estados de energia vibracional das moléculas, que são específicos para cada grupo funcional (CAMPBELL; WHITE, 1989; KACURÁCOVÁ *et al.*, 2002; WOLKERS *et al.*, 2004). Embora cada molécula apresente um espectro de infravermelho diferente, determinados grupos de átomos dão origem a bandas que ocorrem mais ou menos na mesma frequência, independentemente da estrutura molecular. Através da presença dessas bandas características de grupos funcionais é possível a identificação de estruturas, através da simples análise dos espectros e consulta da literatura (ŠANDULA *et al.*, 1999).

Neste trabalho, todas as atribuições de bandas para os espectros de infravermelho fundamentam-se em obras de referência da área de espectrometria (FILIPPOV, 1992; MARRY *et al.*, 2000; KACURÁKOVÁ *et al.*, 2002; MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001; MANRIQUE; LAJOLO, 2002; ZHOU *et al.*, 2009).

Ao analisar os espectros de infravermelho (FT-IR) das frações de *U. tomentosa*, foi dada ênfase às bandas relativas aos grupos funcionais característicos de polissacarídeos, proteínas e ácidos urônicos. Os resultados estão apresentados na FIGURA 18.

Polissacarídeos (em verde)		Proteínas (em azul)		Ácidos urônicos (em vermelho)	
OH	3400 $\text{cm}^{-1}$	Amida I	1720 – 1600 $\text{cm}^{-1}$	C=O:- no grupo carboxil metil-esterificado; - no grupo carboxílico protonado (COOH)	1750 $\text{cm}^{-1}$
CH <sub>3</sub> ou CH <sub>2</sub>	2934 $\text{cm}^{-1}$	Amida II	1600 – 1500 $\text{cm}^{-1}$	Grupo carboxílico desprotonado (COO <sup>-</sup> )	1620 $\text{cm}^{-1}$
Carboidratos (C-O-C)	1200-800 $\text{cm}^{-1}$	Amida III	1450 – 1200 $\text{cm}^{-1}$		1420 $\text{cm}^{-1}$



**FIGURA 18 – ESPECTROS DE FT-IR (REGIÃO DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa***  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr

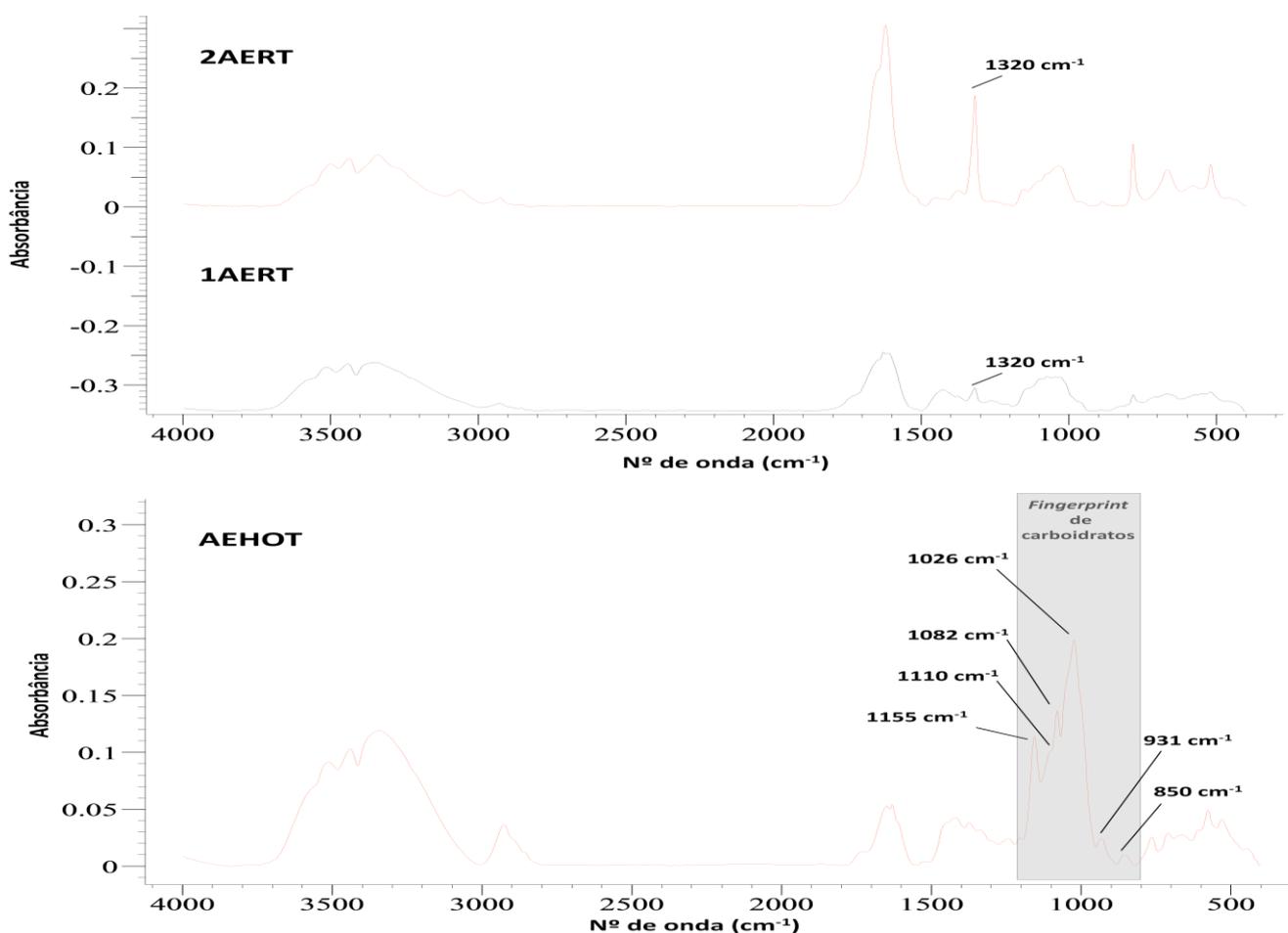
Os polissacarídeos apresentam bandas características referentes aos grupos OH, em  $3400\text{ cm}^{-1}$ ,  $\text{CH}_3$  ou  $\text{CH}_2$  em aproximadamente  $2934\text{ cm}^{-1}$  e a carboidratos (C-OH e C-O-C) (ZHOU *et al.*, 2009), na região de  $1200\text{--}800\text{ cm}^{-1}$ , a qual é denominada de “*fingerprint*”, onde a posição e a intensidade das bandas são específicas para cada polissacarídeo, permitindo sua possível identificação (FILIPPOV, 1992). Os espectros de todas as frações analisadas seja as provenientes das extrações laboratoriais (FIGURA 18-A), da decocção (FIGURA 18-B) ou da precipitação seletiva com o reagente de Yariv (FIGURA 18-C), apresentaram bandas nessas regiões.

As bandas características de proteínas são as de amidas primárias entre  $1720$  e  $1600\text{ cm}^{-1}$ , amidas secundárias entre  $1600$  e  $1500\text{ cm}^{-1}$  e amidas terciárias entre  $1450$  e  $1200\text{ cm}^{-1}$  (ZHOU *et al.*, 2009). Nenhuma das frações apresentou bandas na região de amidas secundárias, com exceção da S-D10a. As frações AEHOT e AERT-YPF apresentaram somente bandas relativas a amidas primárias, enquanto que as demais amostras apresentaram tanto bandas na região de amidas primárias quanto das terciárias. Resultado semelhante foi obtido por ZHOU e colaboradores em 2009, que analisou por FT-IR as AGPs extraídas da planta *Camellia sinensis*.

Os ácidos urônicos são caracterizados pela função carboxílica, que pode gerar três diferentes picos de absorvância. A banda em torno de  $1750\text{ cm}^{-1}$  é atribuída a vibrações de estiramento do C=O no grupos carboxil metil-esterificado ou ácido carboxílico protonado (-COOH) (MARIQUE; LAJOLO, 2002). Dois picos em aproximadamente  $1620$  e  $1420\text{ cm}^{-1}$  são atribuídos a absorvância da função carboxílica desprotonada ( $\text{COO}^-$ ). (MANRIQUE; LAJOLO, 2002; MARRY *et al.*, 2000; MONSOOR; KALAPATHY; PROCTOR, 2001). Todas as frações apresentaram somente as duas bandas referentes à função carboxílica desprotonada. Entretanto, de acordo com resultado da dosagem de ácidos urônicos (TABELA 12), a amostra S-D10a não apresentou quantidade detectável desse tipo de monossacarídeo, enquanto que as amostras 1AERT e 2AERT foram as que apresentaram maior percentagem. Levando esses dados em consideração, é provável que o pico referente aos ácidos urônicos pode ser aquele em  $1320\text{ cm}^{-1}$  em vez de  $1420\text{ cm}^{-1}$ , já que este pico está em evidência apenas nas duas amostras ricas em ácidos urônicos (FIGURA 19-A).

Entretanto, bandas características de compostos fenólicos também foram identificadas nas frações analisadas. Esses compostos apresentam bandas evidentes relacionadas a vibrações do tipo “wag” da ligação C–H entre 800 e 920  $\text{cm}^{-1}$ , além de uma banda característica relacionada ao grupamento C–C–O em 1260–1180  $\text{cm}^{-1}$  (SCHULZ; BARANSKA, 2007). Nos espectros obtidos no presente estudo, o pico referente aos compostos fenólicos foi observado em 1200  $\text{cm}^{-1}$  para todas as amostras.

Por fim, pode-se destacar o espectro da amostra AEHOT (FIGURA 19-B), a qual apresentou um espectro típico de amido (amilose), com picos característicos de absorção em 1155, 1110, 1082, 1026 (maior), 931 e 850  $\text{cm}^{-1}$  (KACURÁKOVÁ *et al.*, 2002). Este último resultado confirma aquele encontrado através da RMN- $^{13}\text{C}$  para essa amostra.



**FIGURA 19 – ESPECTROS DE FT-IR (REGIÃO DE 4000 A 400  $\text{cm}^{-1}$ ) DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS 1AERT, 2AERT E AEHOT DE *Uncaria tomentosa***  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Amostras anidras analisadas em pastilhas de KBr

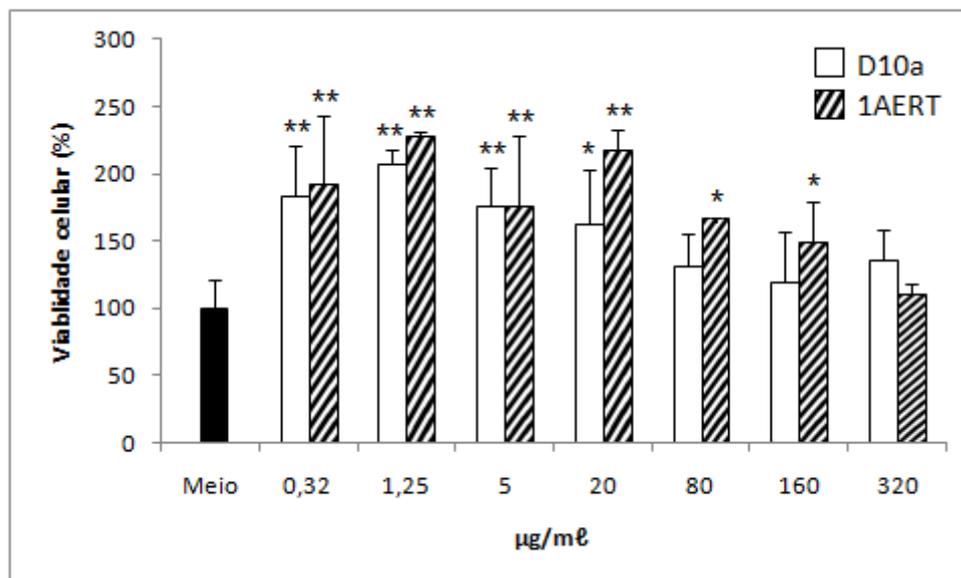
## 6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS FRAÇÕES OBTIDAS A PARTIR DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa*

Como citado anteriormente, diversos polissacarídeos derivados de plantas apresentam uma variedade de efeitos farmacológicos benéficos através da modulação da função imune de macrófagos. Esses polissacarídeos se ligam de forma específica a receptores localizados na superfície celular dos macrófagos, incluindo CD14, CR3, receptores *Toll-like*, receptor *scavenger* e *dectina-1*. Como resultado dessa ativação, os macrófagos, além das alterações morfológicas, secretam ROIs, NO e uma variedade de citocinas (SHEPETKIN; QUINN, 2006).

A fim de avaliar se os polissacarídeos presentes em extratos da planta *U. tomentosa* também são capazes de atuarem como modificadores da resposta biológica (BRM), as frações 1AERT e D10a foram avaliadas quanto à capacidade de indução da produção de NO, da retenção de lisossomos e da indução da produção das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  e de alterações morfológicas em macrófagos peritoneais de camundongos albinos suíços. Essas frações foram escolhidas para serem avaliadas nos experimentos biológicos levando em consideração a quantidade de amostra disponível, bem como a extração aquosa da qual foram provenientes (1AERT oriunda da extração laboratorial sequencial realizado com o material cedido pela Herbarium, o qual é comercializado como fitoterápico por essa empresa; e D10a, proveniente da decocção utilizando o material obtido no comércio [pág.52]).

### 6.2.1 Efeito das frações 1AERT e D10a na viabilidade celular dos macrófagos

Para certificar que as amostras 1AERT e D10a não diminuiriam a viabilidade dos macrófagos utilizados nos experimentos, foi realizado inicialmente o ensaio do MTT, e os resultados estão apresentados na FIGURA 20.



**FIGURA 20** – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A VIABILIDADE CELULAR DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Viabilidade celular determinada pelo teste do MTT. Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 48h na ausência (meio) e presença da fração (D10a ou 1AERT), nas concentrações indicadas. Após a incubação, o MTT foi removido e adicionou-se DMSO. A absorbância foi medida em 550 nm. 100% de viabilidade corresponde à viabilidade determinada para as células incubadas em meio MEM. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. \* Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) somente em relação ao teste Student's t ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa do meio MEM em relação aos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Analisando os dados obtidos, pode-se observar que nenhuma das frações testadas alterou negativamente a viabilidade dos macrófagos durante 48h de incubação.

Entretanto, nas concentrações mais baixas, ambas as frações apresentaram formação de cristais de formazan em quantidade acima da cultura controle. Outros polissacarídeos apresentaram resultados semelhantes, como descrito por ROSARIO (2010), que testou a atividade imunomoduladora de xiloglucanas extraídas de *C. langsdorffii*, *H. courbaril* e *T. indica* em macrófagos peritoneais de camundongos. Como macrófagos de culturas primárias não são capazes de se dividir e se multiplicar, esse aumento da viabilidade não está relacionado a um aumento no número de células em cultura, e sim com a maior capacidade apresentada por macrófagos ativados, quando comparados com macrófagos quiescentes, em produzir mais formazan a partir de sais de NBT, e em expressar em maior proporção

a enzima iNOS, a qual também está envolvida na redução do MTT (POZZOLINI *et al.*, 2003).

#### 6.2.2 Produção de NO pelas culturas de macrófagos na presença e ausência das frações de *U. tomentosa*

O NO é considerado a principal molécula efetora produzida por macrófagos, e está envolvido na regulação da apoptose e na defesa contra microorganismos e células tumorais (BRUNE, 2003). A óxido nítrico sintase (NOS) é a enzima responsável pela síntese do NO. A indução da sua isoforma II ou óxido nítrico sintase induzida (iNOS), por citocinas e lipopolissacarídeos, é responsável pelas propriedades citotóxicas do NO (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002)

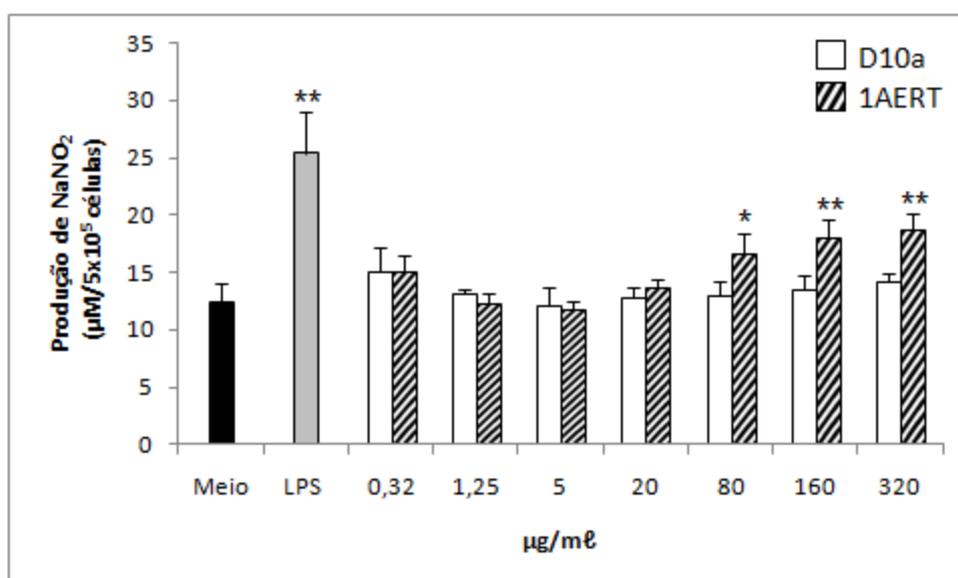
A expressão da iNOS é o resultado de uma resposta inflamatória localizada ou difusa resultante de uma infecção ou dano tecidual. Assim, onde a resposta inflamatória é parte de uma resposta adaptativa, por exemplo, no caso de uma infecção ou sepse, a expressão de iNOS é benéfica; quando a expressão da iNOS é parte da inflamação anormal (não adaptativa), como em uma doença autoimune, a expressão de iNOS pode ser nociva (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Como citado anteriormente, os extratos de *U. tomentosa* são muito utilizados na medicina tradicional no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (TAYLOR, 2002). SANDOVAL-CHACÓN e colaboradores (1998) relacionaram essa atividade anti-inflamatória de extratos aquosos de *U. tomentosa* contendo alcalóides oxindólicos com sua capacidade de suprimir, *in vitro*, em 60% a liberação de NO ocasionada por LPS em macrófagos da linhagem RAW 264.7, através da inibição da iNOS. Um estudo semelhante demonstrou que a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos, *in vitro*, também foi diminuída, em 62%, quando essas células foram tratadas com LPS e extratos hidroetanólicos de *U. tomentosa* a 70% (FAZIO *et al.*, 2008)

Entretanto, no presente trabalho a produção de NO foi avaliada de forma diferente dos trabalhos acima citados. Os macrófagos peritoneais de camundongos foram tratados somente com os extratos aquosos de *U. tomentosa*, D10a e 1AERT, sem adição ou estimulação prévia de LPS. Portanto, os resultados obtidos são referentes aos efeitos sobre a produção de NO ocasionados exclusivamente pelos

extratos, e não às interferências causadas pelos extratos na produção de NO desencadeada por LPS.

Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 21. A fração D10a não alterou a produção de NO, enquanto a fração 1AERT aumentou a produção dessa molécula em 45% e 50% nas concentrações de 160 e 320  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ , respectivamente, em relação ao controle negativo (células crescidas somente na presença de meio de cultura). O controle positivo (células crescidas na presença de LPS) aumentou a produção de NO em 105%.



**FIGURA 21** – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 48h na ausência (meio) e presença da fração (D10a ou 1AERT), nas concentrações indicadas. O Meio MEM foi utilizado como controle negativo e o LPS (50  $\text{ng}/\text{m}\ell$ ) como controle positivo. O NO produzido foi quantificado no sobrenadante como nitrito ( $\text{NaNO}_2$ ) pelo método de Griess. A absorbância foi medida em 546 nm. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. \* Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) somente em relação ao teste Student's t ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa do meio MEM em relação aos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Resultados semelhantes aos obtidos para a D10a foram relatados no mesmo trabalho citado anteriormente, realizado por SANDOVAL-CHACÓN e colaboradores (1998). Além de avaliar o efeito dos extratos de *U. tomentosa* na produção de NO induzida por LPS, eles também avaliaram a ação direta desses

extratos na produção de NO (na ausência de LPS), onde não observaram nem diminuição, nem aumento da produção dessa molécula.

Apesar da semelhança entre os efeitos causados entre a fração D10a e os extratos utilizados pelos autores acima citados, existe diferenças em relação à composição química, já que a fração D10a não apresenta alcalóides oxindólicos. Entretanto, essa diferença não parece ter efeito significativo nos resultados, visto que, anos mais tarde, o mesmo autor demonstrou que as atividades anti-inflamatórias e antioxidativas apresentadas pelos extratos de *U. tomentosa* eram independentes de seu conteúdo de alcalóides (SANDOVAL *et al.*, 2000).

Já o aumento na produção de NO induzido pela fração 1AERT poderia ser relacionado à diferença na composição química entre a 1AERT e D10a, visto que a fração proveniente da extração laboratorial sequencial apresenta maior quantidade de AGP em relação ao decocto, bem como um maior conteúdo de ácidos urônicos. Às AGPs é atribuída atividade imunoestimulante, entre outros motivos, pelo fato de serem capazes de induzir a produção de NO, como demonstrados em estudos, nos quais as AGPs extraídas de *Baptisia tinctoria* e *Echinacea pallida* (CLASSEN *et al.*, 2006) e extratos de *Juniperus scopulorum* contendo arabinogalactanas tipo II (SHEPETKIN *et al.*, 2005) se mostraram capazes de estimular eficientemente, *in vitro*, a produção de NO por macrófagos de camundongos.

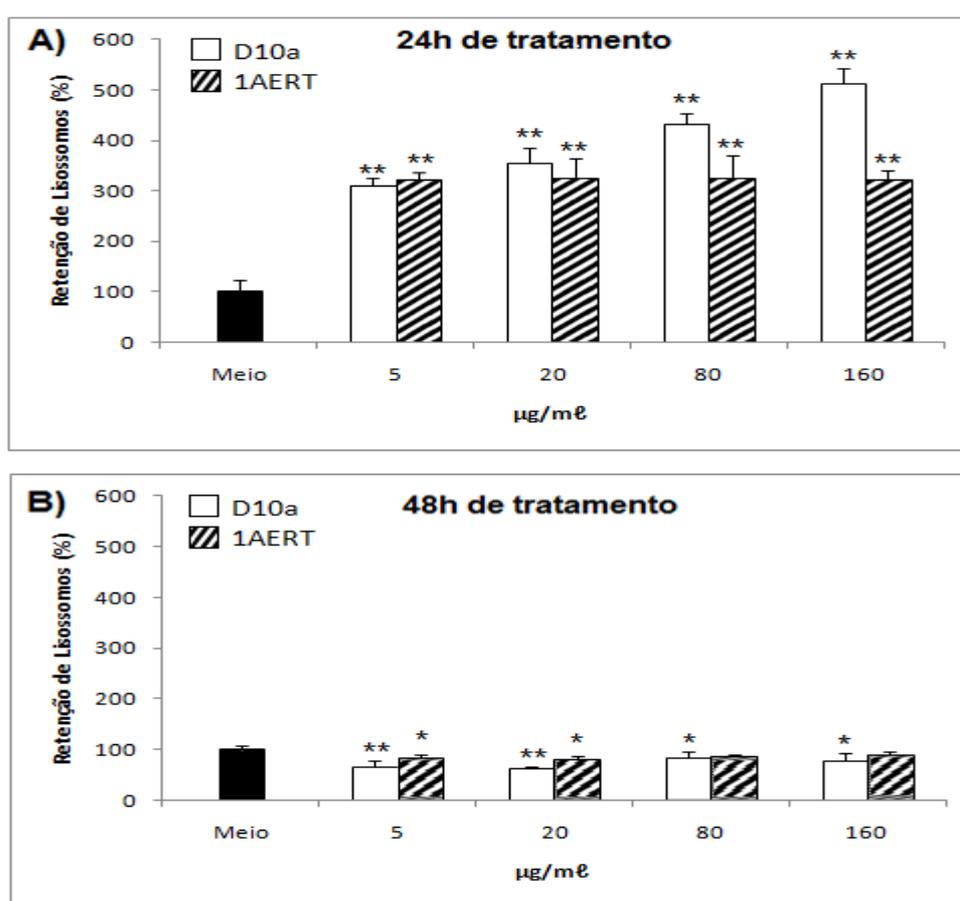
### 6.2.3 Retenção de lisossomos

O ensaio com vermelho neutro original foi desenvolvido como um ensaio de citotoxicidade *in vitro* para cultura de células de mamíferos, e posteriormente adaptado para estudos de ecotoxicidade em células de peixes em cultura. O princípio do método é baseado na captação e vinculação de vermelho neutro, um corante catiônico, na matriz lisossomal de células viáveis após incubação das mesmas com agentes tóxicos (SVENDSEN *et al.*, 2004).

Entretanto, em estudos com células fagocíticas, a captação do corante é relacionada com a capacidade fagocítica dessas células (CHATURVEDI *et al.*, 1979; CHATURVEDI; GULATI; MATHUR, 1982; STOIKA *et al.*, 2002). O corante vermelho neutro é capturado pelas hidrolases, as quais constituem um importante grupo de enzimas responsáveis pela digestão de partículas fagocitadas (CHATURVEDI *et al.*,

1979). Portanto, a captação do vermelho neutro está relacionada à taxa de fagocitose, e a indução de um aumento dessa taxa, por um determinado agente, está diretamente relacionada a uma atividade imunoestimulante.

O efeito das amostras D10a e 1AERT sobre a fagocitose de macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliada através dessa captação e retenção do corante vermelho neutro nos lisossomos. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 22.



**FIGURA 22 – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa* APÓS 24h (A) E 48h (B) DE TRATAMENTO SOBRE A CAPACIDADE DE RETENÇÃO DE LISOSSOMOS DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Retenção de lisossomos avaliada através do teste do vermelho neutro descrito por PIPE *et al.* (1995). Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h ou 48h, na ausência (meio) e presença da fração (D10a ou 1AERT) nas concentrações indicadas. Após incubação, o vermelho neutro foi removido e adicionou-se solução de lise (ácido acético glacial:etanol 50%:água destilada v:v). A absorvância foi medida em 550 nm. O valor obtido para o meio foi considerado como retenção de lisossomos basal. Os resultados estão expressos como médias de quadruplicatas. Estes experimentos foram repetidos duas vezes em dias alternados. \* Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) somente em relação ao teste Student's t ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa do meio MEM em relação aos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

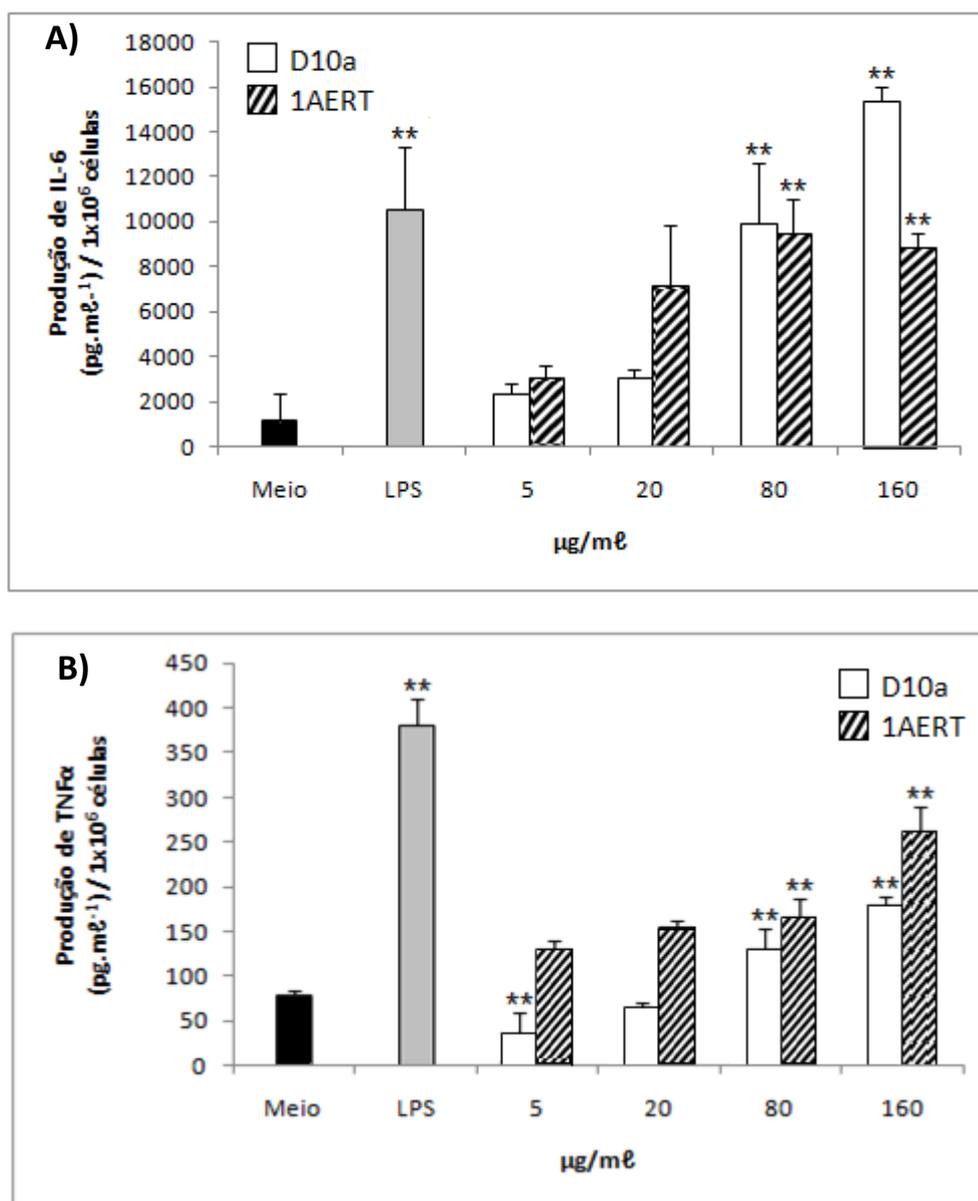
Os macrófagos tratados durante 24h com ambas as frações foram capazes de captar e reter em seus lisossomos uma quantidade maior do corante vermelho neutro quando comparados com os macrófagos não tratados (controle negativo). O tratamento com a fração D10a foi dose-dependente e se mostrou mais eficaz como imunoestimulante, causando um aumento de 413% na taxa de fagocitose na maior concentração (160  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ). A fração 1AERT também apresentou atividade imunoestimulante, porém não dose-dependente nas concentrações testadas, induzindo um aumento de, em média, 223% na taxa de fagocitose.

Entretanto, os macrófagos tratados durante 48h com a fração D10a apresentaram uma diminuição significativa na taxa de fagocitose nas concentrações mais baixas (5 e 20  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ). Já os tratamentos de 48h com 80 e 160  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  de D10a, e com as quatro concentrações testadas de 1AERT não alterou significativamente a captura e retenção do corante vermelho neutro pelos macrófagos.

Relacionando os dados obtidos após 24h e 48h de tratamento, os extratos aquosos de *U. tomentosa* parecem estimular a fagocitose rapidamente, ou seja, sem necessitar de um longo tempo de contato com as células. Além disso, essa ativação não permanece constante, mas vai decaindo ao longo do tempo. Para conclusões mais precisas, seria necessário realizar o mesmo teste com tempos de tratamentos inferiores a 24h e superiores a 48h. Essa conclusão pode ser sustentada pelo fato de estudos semelhantes avaliarem a fagocitose de macrófagos expostos a tratamentos de apenas 1h de duração com diferentes moléculas-teste (CHATURVEDI; GULATI; MATHUR, 1982).

#### 6.2.4 Dosagem de citocinas

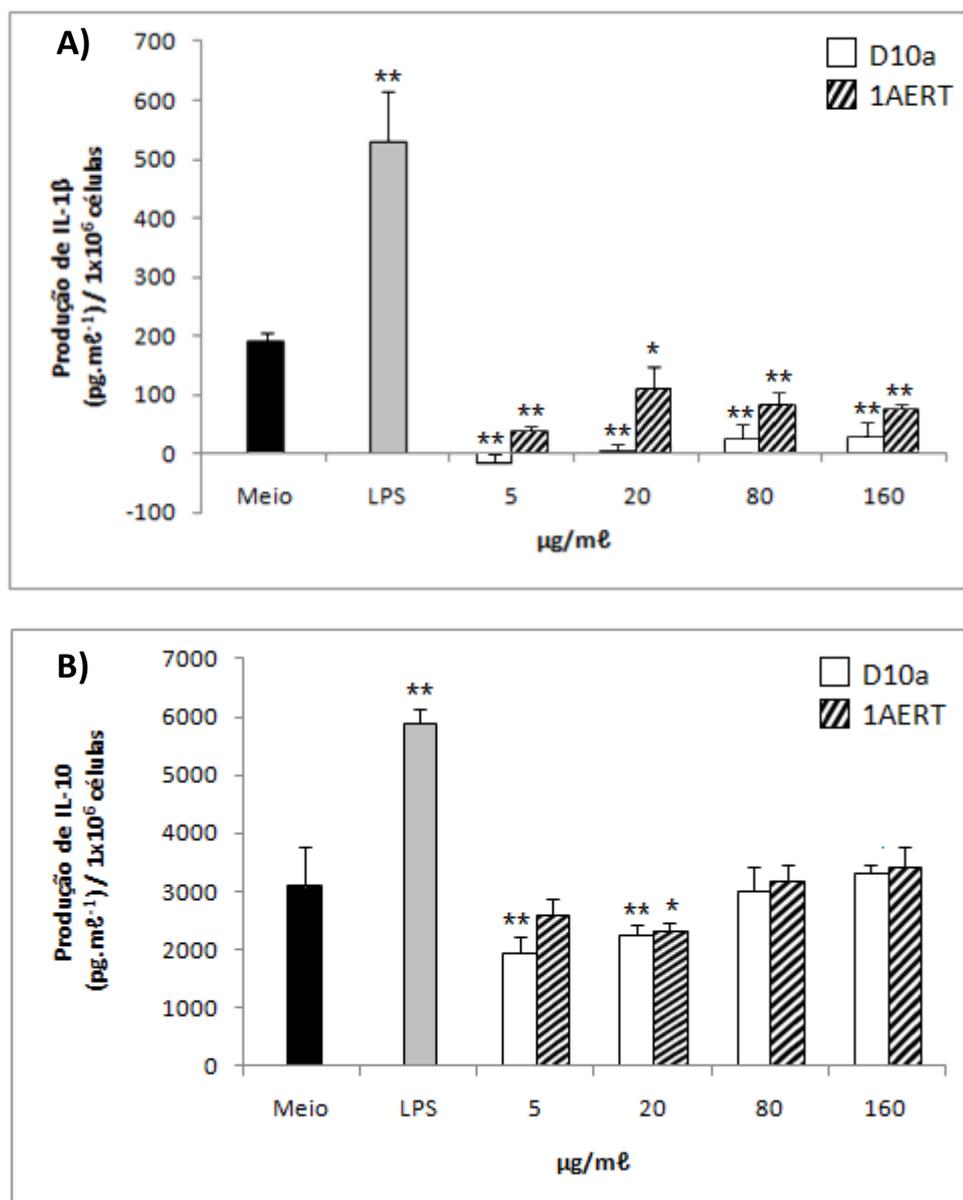
As citocinas IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10, produzidas e liberadas no sobrenadante por macrófagos peritoneais de camundongos após tratamento de 24h com as frações 1AERT e D10a, foram mensuradas através de Kits de ELISA, e os resultados estão apresentados nas FIGURAS 23 e 24.



**FIGURA 23 – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-6 (A) E TNF-ALFA (B) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

FONTES: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h na ausência (meio) e presença da fração (D10a ou 1AERT), nas concentrações indicadas. O Meio MEM foi utilizado como controle negativo e o LPS (50 ng/mL) como controle positivo. O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, as quantidades de IL-6 e TNF- $\alpha$  produzidas. Os resultados estão expressos como médias de quadruplicatas. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. \* Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) somente em relação ao teste Student's t ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa do meio MEM em relação aos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).



**FIGURA 24** – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A PRODUÇÃO DE IL-1 BETA (A) E IL-10 (B) POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS

FONTES: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h na ausência (meio) e presença da fração (D10a ou 1AERT), nas concentrações indicadas. O Meio MEM foi utilizado como controle negativo e o LPS (50 ng/mL) como controle positivo. O sobrenadante foi coletado e utilizado para mensurar, através de kit de ELISA, as quantidades de IL-1 $\beta$  e IL-10 produzidas. Os resultados estão expressos como médias de quadruplicatas. Este experimento foi repetido duas vezes em dias alternados. \* Diferença significativa do meio MEM (controle negativo) somente em relação ao teste Student's t ( $p \leq 0,05$ ). \*\* Diferença significativa do meio MEM em relação aos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Na FIGURA 23-A está demonstrado o efeito das frações D10a e 1AERT na produção de IL-6. Ambas as amostras promoveram um aumento significativo na produção dessa interleucina a partir da concentração de 80 µg/ml. No caso da D10a, esse aumento parece ser dose dependente, e a quantidade de IL-6 produzida na concentração de 160 µg/ml chega a ser 13 vezes maior que a do controle negativo (meio) e até maior que a do controle positivo (lipopolissacarídeo bacteriano, LPS). Já o aumento na produção de IL-6 induzido pela 1AERT parece ser dose dependente nas concentrações menores, tendo seu ápice na concentração de 80 µg/ml em 725% em relação ao controle negativo. Estatisticamente, essa proporção de aumento é equivalente a do controle positivo.

A indução da produção de TNF-α está ilustrada na FIGURA 23-B. Tanto a D10a quanto a 1AERT promoveram aumento dose-dependente dessa citocina, sendo a fração proveniente da extração laboratorial mais eficiente nesse aspecto. Na maior concentração (160 µg/ml), a 1AERT promoveu um aumento de 230% em relação ao controle negativo contra 136% induzidos pela D10a. Entretanto, em ambos os casos, esse aumento foi menor do que o controle positivo, que aumentou a produção de TNF-α em 381%.

Em relação a IL-1β (FIGURA 24-A), ambas as frações promoveram diminuição da produção dessa interleucina, enquanto o controle positivo provocou aumento de aproximadamente 180%. Estatisticamente, essa diminuição não foi dose-dependente para as duas frações. A fração D-10a chegou a inibir 100% da produção nas menores concentrações (5 e 20 µg/ml) e em torno de 85% nas maiores concentrações (80 e 160 µg/ml). A fração 1AERT provocou em média, 60% de inibição da produção de IL-1β.

Na FIGURA 24-B estão apresentados os efeitos causados pelas frações D10a e 1AERT na produção de IL-10. A fração D10a inibiu, em média, 30% da produção dessa interleucina nas menores concentrações (5 e 20 µg/ml) em relação ao controle negativo, e não provocou efeito algum nas maiores concentrações. A 1AERT não foi capaz de alterar significativamente a produção de IL-10 em nenhuma concentração.

A TABELA 14 apresenta um resumo do efeito das frações D10a e 1AERT na produção das quatro citocinas citadas acima.

**TABELA 14 – ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS SOBRE O EFEITO DAS FRAÇÕES D10a E 1AERT NA PRODUÇÃO DAS CITOCINAS IL-6, TNF-ALFA, IL-1 BETA E IL-10 POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS**

Amostra Citocina	Percentagem de aumento (+) ou diminuição (-) da produção em relação ao controle negativo								
	D10a				1AERT				LPS (C+)
	5 µg/ml	20 µg/ml	80 µg/ml	160 µg/ml	5 µg/ml	20 µg/ml	80 µg/ml	160 µg/ml	50 ng/ml
IL-6	=	=	+762%	+1233%	=	=	+725%	+664%	+814%
TNF-α	-55%	=	+65%	+125%	=	=	+110	+230%	+381%
IL-1β	-100%	-97%	-86%	-85%	-80%	=	-57%	-61%	+180%
IL-10	-37%	-27%	=	=	=	=	=	=	+90%

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os valores representam a percentagem de aumento (+) ou inibição (-) da produção das citocinas e LPS em relação ao controle negativo (Meio MEM). O sinal (=) representa os valores cuja diferença em relação ao grupo controle não foi significativa através dos testes Student's t ( $p \leq 0,05$ ) e Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

As primeiras células a responder às infecções ou traumas são geralmente as células teciduais da linhagem monocítica, tais como os macrófagos residentes, as células dendríticas ou células da microglia cerebral (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). O estímulo clássico para a produção de citocinas pelas células é a endotoxina bacteriana (LPS), apesar de muitos outros componentes de patógenos também serem capazes de ativar similarmente os receptores *Toll-like* (TLR) na superfície celular (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997; TAKEUSHI *et al.*, 1999). Esses receptores disparam uma cascata de sinais intracelulares envolvendo a ativação de NF-κB, e resultando na transcrição de citocinas iniciais tais como IL-1, IL-6 e TNF-α. A IL-1 e o TNF-α são pró-inflamatórias e capazes de ativar vias similares às que o LPS ativa (SHALABY *et al.*, 1989; MAY; GHOSH, 1998). Durante o processo inflamatório, as citocinas IL-1β ou TNF-α, são inicialmente liberadas de macrófagos ativados, e em seguida induzem a secreção de IL-6 por uma variedade de tipos celulares (KUNDIG *et al.*, 1993).

A IL-1 e o TNF-α podem ainda ativar vias inflamatórias adicionais, incluindo aquelas que levam à produção de NO e eicosanóides (HOPKINS, 1990; BUSSE; MULSCH, 1990), indução de moléculas de adesão celular, particularmente no endotélio, e também induzir uma produção adicional de citocinas, incluindo, além da IL-6, IL-8 e fatores de estimulação de colônias (CSFs) (CLARK; KAMEN, 1987; VANDEKERCKHOVE *et al.*, 1991; SHANLEY; WARNER; WARD, 1995; DAYER,

1997).

Em relação aos resultados obtidos no presente estudo, ambas as frações D10a e 1AERT apresentaram aumento na produção de TNF- $\alpha$  e forte inibição da IL-1 $\beta$ . Essa inibição pode estar relacionada com a atividade anti-inflamatória relatada para os extratos de *U. tomentosa*. Como citado anteriormente, uma das doenças tratadas na medicina tradicional com o decocto dessa planta pelos nativos é a artrite reumatóide (AR). Estudos mostram que no processo inflamatório da AR, a IL-1 e TNF- $\alpha$  são as citocinas pivôs para o desencadeamento da doença (HOPKINS, 2003; BURGER *et al.*, 2006).

A inibição da IL-1 $\beta$  observada no presente estudo pode estar relacionada aos receptores específicos para essa interleucina. A resposta celular à ativação por IL-1 é mediada pelos receptores de IL-1 tipo I (IL-1 RI), o receptor funcional de sinalização (SIMS *et al.*, 1993). Adicionalmente, receptores celulares para IL-1 e TNF- $\alpha$  existem em formas solúveis após serem clivados da superfície celular, sendo capazes de se ligarem à citocina, neutralizando-a. Por exemplo, o receptor de IL-1 tipo II (IL-1 RII) não é uma molécula sinalizadora e é descrito como uma “armadilha” alvo de IL-1. O IL-1 RII, ao ser liberado da superfície celular como uma molécula solúvel (IL-1 sRII), é capaz de capturar a IL-1 e inibir a ligação entre essa interleucina e seu receptor IL-1 RI (COLOTTA *et al.*, 1994; SYMONS; YOUNG; DUFF, 1995).

Além disso, enquanto a produção de IL-1 pode ser diminuída ou ter seus efeitos limitados também pelas chamadas citocinas anti-inflamatórias, *in vitro*, os efeitos inflamatórios da IL-1 são inibidos e podem ser totalmente abolidos somente por um poderoso inibidor específico da IL-1, o qual é um antagonista para essa interleucina, o IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra) (DINARELLO, 1996). O IL-1Ra é uma proteína da família das interleucinas, também induzido durante as respostas inflamatórias (HOPKINS, 2003), e foi originalmente descrito como uma molécula secretada por monócitos e macrófagos, que modula uma variedade de respostas imunes e inflamatórias relacionadas a IL-1 (KONDERA-ANASZ *et al.*, 2005). O IL-1 Ra compete com a IL-1 na ligação ao IL-1 RI, sem provocar transdução de sinal e ativação celular (AREND *et al.*, 1998). Essas informações sugerem um importante papel do IL-1 RII, sua forma solúvel IL-1 sRII e do IL-1 Ra na regulação da atividade biológica da IL-1 nos sítios inflamatórios.

Portanto, uma hipótese para explicar a inibição da IL-1 $\beta$  no presente estudo poderia ser que os macrófagos tratados com os extratos aquosos de *U. tomentosa*, liberaram também grande quantidade desses inibidores da IL-1 $\beta$ , visto que antagonistas e receptores solúveis de citocinas são geralmente liberados concomitantemente com suas respectivas citocinas agonistas, e que, para a IL-1 Ra inibir efetivamente as IL-1 $\alpha$  ou  $\beta$ , ela precisa estar em excesso, em concentrações aproximadamente 100 vezes superiores (HOPKINS, 2003). Porém, para confirmar se a hipótese é verdadeira, seria necessária a dosagem desses receptores, que poderia ser feita através de ELISA, como realizado por HOLCBERG e colaboradores (2008).

Além da atividade anti-inflamatória, os extratos de *U. tomentosa* também apresentaram atividade imunoestimulante verificada principalmente pelo aumento na produção de IL-6. A maior produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos tratados com D10a e 1AERT nas concentrações mais altas pode também estar relacionada a essa atividade. Como citado anteriormente, é necessária a presença de TNF- $\alpha$  que possa estimular a liberação de IL-6, para que essa última citocina, por sua vez, seja capaz de promover suas funções imunoestimulantes.

Ao contrário da IL-1 e do TNF- $\alpha$ , a IL-6 desempenha um papel mínimo na indução do catabolismo tecidual, de mediadores inflamatórios ou de outras citocinas inflamatórias nos tecidos. Além disso, enquanto a IL-1 e o TNF- $\alpha$  desempenham um papel localizado nos tecidos onde são liberadas, a IL-6 é recrutada para entrar na circulação e mediar importantes efeitos sistêmicos. Um deles seria ativado pela IL-6 para regular a inflamação. Estudos sugerem que a IL-6 desempenha um papel na mediação de *feedback* negativo em respostas inflamatórias (HOPKINS, 2003).

Adicionalmente, algumas citocinas, como por exemplo, a IL-10, apresentam atividade anti-inflamatória e são capazes de regular negativamente a expressão de citocinas inflamatórias (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; FIORENTINO *et al.*, 1991). Entretanto, no presente estudo, as inibições das citocinas inflamatórias da IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  não parecem terem sido ocasionadas pela IL-10, uma vez que as frações testadas não induziram aumento na produção de IL-10. Provavelmente, os extratos aquosos de *U. tomentosa* induzem a inibição das citocinas inflamatórias através de outros meios que não a liberação de IL-10. Essa inibição poderia estar relacionada à liberação de receptores antagonistas e receptores solúveis capazes de inativar as citocinas inflamatórias, como discutido anteriormente.

Analisando em conjunto os resultados obtidos em relação à liberação de citocinas pelos macrófagos após tratamento com as frações D10a e 1AERT, estes correspondem com as atividades anti-inflamatórias e imunoestimulantes descritas para os extratos aquosos de *U. tomentosa*.

Outros estudos relacionando extratos de *U. tomentosa* com a produção de interleucinas pelas células do sistema imune já foram realizados. LEMAIRE e colaboradores (1999) demonstraram que extratos aquosos contendo 6 mg/g de alcalóides oxindólicos, nas concentrações de 25 a 100 µg/ml, foram capazes de aumentar, *in vitro*, em aproximadamente 10 vezes a produção de IL-1 e IL-6 por macrófagos alveolares de ratos. Além disso, os mesmos extratos potencializaram o efeito do LPS em cerca de 5 e 2 vezes na produção de IL-1 e IL-6, respectivamente, em macrófagos previamente tratados com esse lipopolissacarídeo.

Em outro estudo, realizado por ALLEN-HALL e colaboradores (2007), extratos alcoólicos de *U. tomentosa* contendo alcalóides promoveram um aumento da produção de IL-1 $\beta$  por células THP<sub>1</sub> (linha celular da leucemia humana aguda monocítica), mas não alteraram a produção de TNF- $\alpha$ . Os extratos alcoólicos, quando adicionados às células THP<sub>1</sub> juntamente com LPS, foram capazes de potencializar o efeito do lipopolissacarídeo na produção de IL-1  $\beta$  em 2,4 vezes e de inibir em 5,5 vezes a produção de TNF- $\alpha$ .

Em ambos os casos, a capacidade de aumentar a produção da IL-1 difere dos resultados encontrados no presente estudo. Isso pode estar relacionado ao fato de que os extratos testados apresentavam quantidades significativas de alcalóides, enquanto que as frações D10a e 1AERT não apresentam esses compostos.

Em relação à produção de TNF- $\alpha$ , SANDOVAL e colaboradores (2002) já haviam demonstrado que sua produção, dependente de LPS, pode ser inibida por extratos aquosos de *U. tomentosa*. Contudo, nem esse estudo, nem aqueles realizados por LEMAIRE *et al.* (1999) e ALLEN-HALL *et al.* (2007) podem ser diretamente relacionados com o presente trabalho quanto a produção de TNF- $\alpha$ , uma vez que, novamente, as metodologias utilizadas não foram equivalentes. Enquanto nos trabalhos referenciados foi avaliado o efeito dos extratos de *U. tomentosa* sobre a produção de TNF- $\alpha$  dependente de LPS, neste trabalho foi analisado o efeito dos extratos sobre a produção de TNF- $\alpha$  independente de um estímulo prévio pelo LPS. Como já discutido, essa diferença de abordagem

metodológica gera resultados com interpretações distintas, que não podem ser diretamente comparados entre si.

Estudos semelhantes foram também realizados com AGPs. Um exemplo foi o trabalho de CLASSEN e colaboradores (2006) que obtiveram resultados parecidos com os obtidos para as frações 1AERT e D10a em relação a produção de citocinas e NO. No referido estudo, os autores avaliaram a influência de três diferentes AGPs na produção de NO e de IL-6 por macrófagos alveolares de camundongos. Somente as AGPs extraídas de raízes de *Baptisia tinctoria* e *Echinacea pallida* estimularam efetivamente a produção, enquanto as AGPs de culturas celulares de *Echinacea purpurea* tiveram efeitos mínimos na estimulação desses compostos. Os autores concluíram, ao relacionar a estrutura das AGPs testadas com a atividade apresentada, que a presença de arabinoses parece ser importante para essa função, especialmente as Ara(f) ligadas na posição 5.

Outro estudo, já citado anteriormente, envolvendo arabinogalactanas do tipo II foi realizado por SHEPETKIN e colaboradores (2005). Cinco frações extraídas de sementes e folhas de *Juniperus scopulorum* foram capazes de estimular efetivamente a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos. As frações que apresentavam a maior massa molecular estimularam, ainda, na concentração de 200 µg/ml, a produção de IL-6, TNF-α e IL-12, além da citocina anti-inflamatória IL-10.

Para uma melhor interpretação dos resultados obtidos em relação aos efeitos das amostras D10a e 1AERT sobre produção das citocinas TNF-α, IL-1β, IL-6 e do NO, e de como a combinação dessas moléculas afetam a atividade biológica, é necessário também considerar os mecanismos envolvidos nesse processo a nível molecular.

A expressão gênica em células eucarióticas é regida por fatores de transcrição nuclear. Estes fatores são proteínas que interagem com elementos reguladores do DNA e podem acelerar ou retardar a taxa transcripcional. A ação desses fatores está sujeita a regulação por vias de transdução de sinal. Como citado anteriormente, a produção e liberação das citocinas estão envolvidas com o fator nuclear NF-κB.

O NF-κB é um fator de transcrição formado por subunidades, as quais incluem a p50, p65, p52, Rel B e cRel (ZHANG; WARREN; SHOEMAKER, 2007; ORTIZ-LAZARENO *et al.*, 2008). Ele é mantido em um estado inativo pela ligação à

subunidade inibidora I $\kappa$ B, que o mantém retido no citoplasma. A ativação do NF- $\kappa$ B é iniciada pela fosforilação do I $\kappa$ B, que desencadeia a completa degradação do inibidor (TRAENKNER; WILK; BAEUERLE, 1994). O NF- $\kappa$ B ativado é então translocado para dentro do núcleo onde pode se ligar às regiões promotoras de vários genes alvos.

A ativação do NF- $\kappa$ B é desencadeada por diferentes estimuladores, como por exemplo, LPS, peptídeos muramil, vírus, irradiação UV, ROIs, além das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (BAEUERLE, 1991; BAEUERLE; HENKEL, 1994). O NF- $\kappa$ B inicia a transcrição de diversos genes, incluindo aqueles do interferon- $\beta$ , do fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF), do fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), da IL-2, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , de moléculas de adesão celular, de algumas proteínas de fase aguda e da iNOS (BAEUERLE; HENKEL, 1994). As citocinas derivadas de macrófagos ativados (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) promovem a expressão da iNOS em diversos sistemas celulares.

Diversos estudos sugerem que as atividades associadas com os extratos de *U. tomentosa* estão relacionadas com seus efeitos sobre o NF- $\kappa$ B. Por exemplo, SANDOVAL-CHÁCON e colaboradores (1998) relacionaram a inibição na produção de TNF- $\alpha$  e do NO dependentes de LPS por extratos aquosos de *U. tomentosa* com sua capacidade de inibição do NF- $\kappa$ B. Nesse estudo, após o tratamento de macrófagos da linhagem RAW 264.7 com LPS e/ou extratos aquosos de *U. tomentosa* por 2h, os extratos de proteínas nucleares foram analisados através de um ensaio de desvio de mobilidade eletroforética. Outros pesquisadores demonstraram esse mesmo efeito com extratos hidroalcoolicos (AGUILAR *et al.* 2002; FAZIO *et al.*, 2008), enquanto AKESSON e colaboradores (2003) também demonstraram que extratos aquosos de *U. tomentosa* inibiram a ativação de NF- $\kappa$ B. Entretanto, esse extrato aquoso foi filtrado para retirar os compostos com alta massa molecular (>10.000 Da), como é o caso dos polissacarídeos.

Outros estudos sugerem que os mecanismos de ação dos extratos de *U. tomentosa* são mais complexos do que somente inibir o NF- $\kappa$ B. Após uma simples inibição desse fator, seria esperada a inibição da expressão de ambos TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Entretanto, ALLEN-HALL e colaboradores (2007) observaram diferenças na expressão dessas duas citocinas, assim como os resultados obtidos no presente estudo, onde as frações induziram a expressão de TNF- $\alpha$  e inibiram a de IL-1 $\beta$ . ALLEN-HALL *et al.* (2007) sugeriram que os extratos de *U. tomentosa* alterariam

“algum elemento desconhecido” capaz de distinguir entre a expressão entre TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

Em 2010, os mesmo autores comprovaram que a planta *U. tomentosa* é o primeiro composto que pode regular de forma diferente a expressão dessas duas citocinas. Nesse estudo, células THP<sub>1</sub> foram tratadas com extratos alcoólicos de *U. tomentosa* contendo alcalóides na presença e ausência de LPS. A expressão de NF- $\kappa$ B nas células tratadas somente com os extratos não foi alterada, enquanto nas células tratadas com LPS juntamente com os extratos, a expressão de alguns componentes específicos desse fator foi diminuída. Além disso, os extratos perderam a capacidade de inibir a expressão de TNF- $\alpha$  dependente de LPS quando foram adicionados às células juntamente com determinadas drogas. Essas drogas mascaram os sinais de localização nuclear das subunidades de NF- $\kappa$ B, prevenindo a ativação do NF- $\kappa$ B. Já expressão de IL-1 $\beta$ , nessas mesmas condições, permaneceu inalterada (ALLEN-HALL *et al.*, 2007).

Esses resultados podem explicar a diferença na expressão de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  provocada pelos extratos D10a e 1AERT. Em relação a IL-1 $\beta$ , há duas alternativas em relação a regulação do NF- $\kappa$ B. Como essa interleucina foi inibida, a ativação das subunidades do NF- $\kappa$ B relacionadas com a liberação de IL-1 $\beta$  também podem ter sido inibidas. Nesse caso, essa inibição teria sido ocasionada por um fator desconhecido que não a IL-10, como demonstrado pelos resultados obtidos nesse estudo. Outra possibilidade seria a não alteração da ativação do NF- $\kappa$ B pelos extratos D10a e 1AERT, como no experimento realizado com as células não tratadas com LPS no estudo de ALLEN-HALL (2010). Como discutido anteriormente, a inibição da IL-1 $\beta$  basal pode ter sido ocasionada pela liberação de receptores antagonistas e receptores solúveis capazes de inativar as citocinas inflamatórias.

Como citado anteriormente, possivelmente essa diferença entre as duas frações pode ser ocasionada pelas diferenças na composição química. A fração D10a apresenta maior quantidade de fenóis em relação à 1AERT e também apresentou maior inibição da produção de IL-1 $\beta$ . Alguns estudos já demonstraram os efeitos de determinados compostos fenólicos sobre a atividade da IL-1 $\beta$ . MAO e colaboradores (2000) observaram que diferentes oligômeros de procianidinas, um tipo de polifenol, extraídos do cacau (*Theobroma cacao*) foram capazes de modular a síntese de IL-1 $\beta$ , em células mononucleares do sangue periférico, tanto em nível transcripcional quanto de secreção de proteínas. Esse efeito parece estar

relacionado com o tamanho das moléculas, uma vez que as menores moléculas (monômeros-tetrâmeros) inibiram eficientemente a expressão e secreção de IL-1 $\beta$ , enquanto um efeito contrário foi induzido pelas maiores moléculas (pentâmeros-decâmeros).

Além de modularem a síntese de IL-1 $\beta$ , os fenóis podem interferir também na atividade dessa interleucina sobre o NF- $\kappa$ B. KIM e colaboradores (2004) demonstraram que uma epicatequina comercial, um tipo de flavonóide, reduziu a produção de nitrito e a expressão da iNOS (tanto do mRNA quanto da proteína) induzidas por IL-1 $\beta$  em células RINm5F (linha celular da insulinoma de ratos) e de ilhotas pancreáticas de ratos. A ação da epicatequina parece estar associada com a inibição da ativação do NF- $\kappa$ B, uma vez que previne a degradação do inibidor do NF- $\kappa$ B, a proteína I $\kappa$ B, o que impede a translocação do fator ao núcleo da célula para desempenhar sua função. Portanto, os fenóis presentes nos extratos de *U. tomentosa* poderiam ser responsáveis pela redução da produção de IL-1 $\beta$  observada nesse estudo.

Em relação ao TNF- $\alpha$ , as frações provavelmente ativaram as subunidades do NF- $\kappa$ B envolvidos com a expressão do TNF- $\alpha$ , o que foi crucial para a posterior liberação de IL-6 relacionada com as atividades imunoestimulantes demonstradas pelos extratos, visto que esse último fator também é regulado pelo NF- $\kappa$ B, que necessita ser ativado previamente por TNF- $\alpha$ .

Entretanto, neste trabalho, ambas as frações foram capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6, embora somente a fração 1AERT tenha induzido a produção de NO. Tanto o TNF- $\alpha$  quanto a IL-1 $\beta$  são responsáveis pela ativação de NF- $\kappa$ B, que por sua vez, ativa a expressão de iNOS. Como a IL-1 $\beta$  foi inibida eficientemente pelas frações, o NO produzido deveria ser induzido pela presença do TNF- $\alpha$ . Contudo, aparentemente, o TNF- $\alpha$  não foi capaz de induzir a produção da iNOS na fração D10a.

Possivelmente, algum composto presente na fração 1AERT poderia estar agindo nessa capacidade em permitir a ativação da iNOS através do NF- $\kappa$ B. Esse composto poderia ser a AGP, uma vez que estudos demonstraram que essas moléculas são capazes de ativar o NF- $\kappa$ B.

XIE e colaboradores (2007) demonstraram que frações extraídas de *Opuntia polyacantha* contendo arabinogalactanas tipo II foram capazes de induzir a produção de TNF- $\alpha$ , ROIs e NO e de ativar o NF- $\kappa$ B em macrófagos de camundongos da

linhagem J774.A1. SCHEPETKIN e colaboradores relataram o mesmo efeito em macrófagos de humanos e de camundongos. Nesse estudo, arabinogalactanas tipo II extraídas de *Tanacetum vulgare L.* induziram a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, ROIs e NO através da ativação de NF- $\kappa$ B.

Esses resultados sugerem que os compostos presentes nos extratos aquosos de *U. tomentosa* atuam em sinergismo para regular as funções anti-inflamatórias sem deprimir a atividade imunoestimulante. De acordo com SHEPETKIN *et al.* (2005), vários compostos imunomoduladores podem estar concomitantemente presentes em extratos de plantas, com funções de inibição ou estimulação. Esse é o caso das frações testadas no presente trabalho, uma vez que apresentam fenóis, AGPs, além de outros compostos que podem não terem sido detectados, atuando em conjunto. Como esperado, o decocto (D10a) de *U. tomentosa* apresentou as atividades imunoestimulantes e anti-inflamatórias descritas para essa planta. Já a fração 1AERT, mesmo contendo quantidade elevada de AGP (além de ácidos urônicos) e menor quantidade de fenóis em relação ao decocto, foi capaz de manter as atividades apresentadas pela fração D10a, e adicionalmente induziu a produção de NO por macrófagos peritoneais. Estes resultados fornecem mais uma evidência de que as AGPs presentes nos extratos aquosos de *U. tomentosa* poderiam ser responsáveis pela regulação da atividade imunomoduladora apresentada por essa planta.

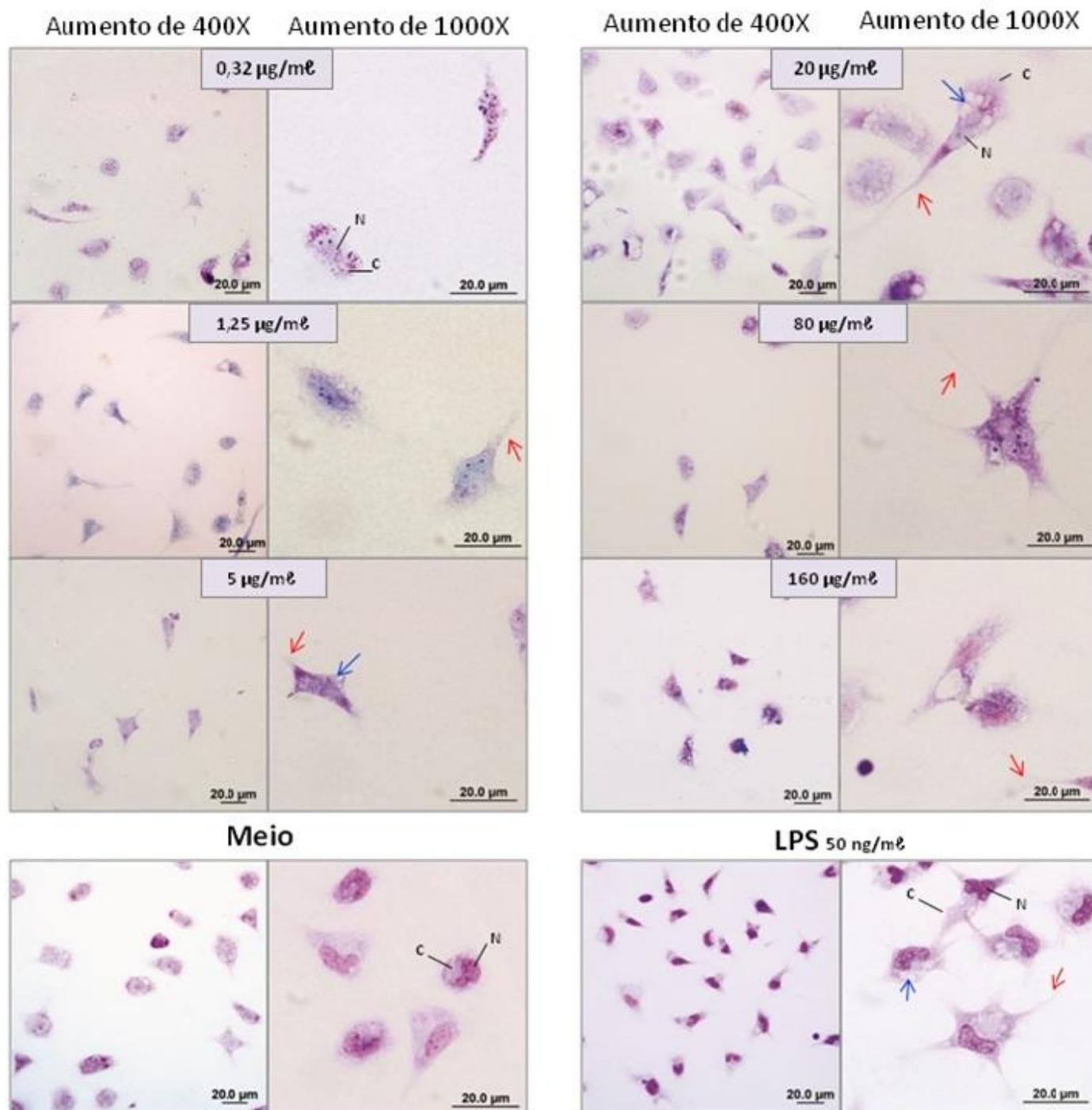
#### 6.2.5 Análises morfológicas

As frações D10a e 1AERT também foram avaliadas quanto à capacidade de causar alterações morfológicas típicas de ativação em macrófagos peritoneais de camundongos. As lamínulas contendo os macrófagos aderidos, tratados durante 24h com as frações, foram fixadas com solução de Bouin recém preparada, desidratadas com acetona e coradas com Giemsa e observadas em microscópio óptico de luz. As fotomicrografias estão apresentadas nas FIGURAS 25 e 26.

As análises morfológicas demonstraram que ambas as frações foram capazes de ativar as células tratadas, as quais apresentaram morfologia celular típica de macrófagos ativados, com aumento nas projeções de membranas e maior número de vacúolos. Visualmente, a partir da concentração de 20  $\mu$ g/ml, os

macrófagos tratados com a fração D10a (FIGURA 25) apresentaram projeções celulares mais extensas e mais numerosas em comparação com as células controle (tratadas somente com meio). Já as células tratadas com a fração 1AERT apresentaram as mesmas alterações morfológicas já a partir da concentração de 1,25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e essas alterações parecem ser dose-dependentes, pois as alterações morfológicas foram mais evidentes com o aumento das concentrações (FIGURA 26). Esses resultados, juntamente com aqueles apresentados para a produção de NO, citocinas e retenção de lisossomos, confirmam a atividade imunoestimulante das frações D10a e 1AERT.

## D10a

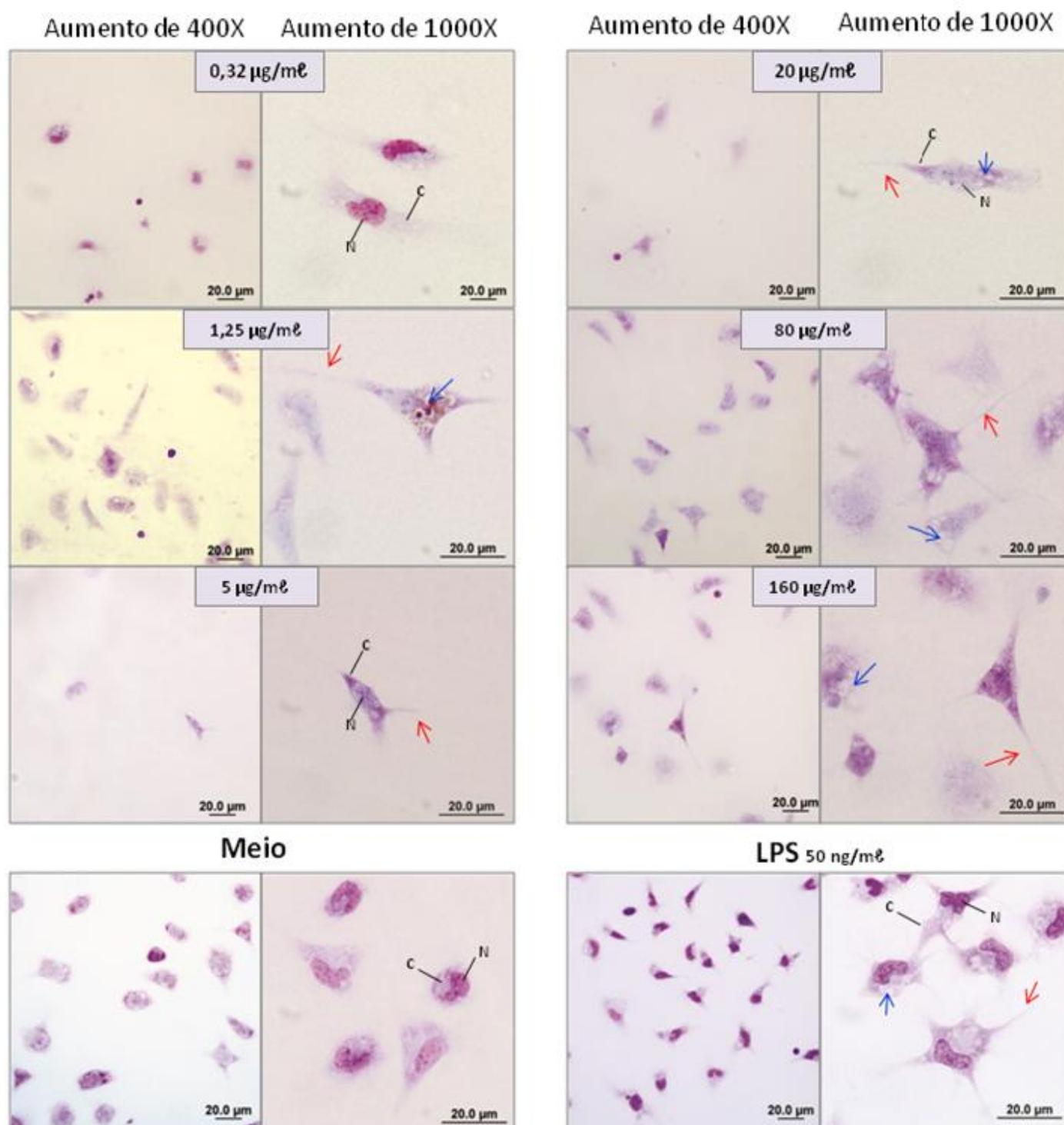


**FIGURA 25 – EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A AMOSTRA D10a DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS**

FONTA: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h na ausência (meio) e presença da amostra D10a, nas concentrações indicadas. O LPS foi utilizado como controle positivo. As setas vermelhas apontam as projeções citoplasmáticas e as setas azuis os vacúolos. N – núcleo. C- citoplasma. As lamínulas foram fixadas com solução de Bouin e os macrófagos aderidos às lamínulas foram corados com Giemsa as fotomicrografias foram obtidas através de microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

## 1AERT



**FIGURA 26 – EFEITO DO TRATAMENTO DE 24h COM A AMOSTRA 1AERT DE *Uncaria tomentosa* SOBRE A MORFOLOGIA DE MACRÓFAGOS PERITONIAIS DE CAMUNDONGOS**

FONTA: O autor (2011)

NOTA: Meio MEM suplementado com 5% de soro fetal bovino. Os macrófagos aderentes foram incubados por 24h na ausência (meio) e presença da amostra 1AERT, nas concentrações indicadas. O LPS foi utilizado como controle positivo. As setas vermelhas apontam as projeções citoplasmáticas e as setas azuis os vacúolos. N – núcleo. C- citoplasma. As lamínulas foram fixadas com solução de Bouin e os macrófagos aderidos às lamínulas foram corados com Giemsa as fotomicrografias foram obtidas através de microscópio Olympus, modelo BX 30 com câmera de captura Olympus, modelo DP071 acoplada (Tokyo - Japão).

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FIXADORA DO SISTEMA COMPLEMENTO DOS EXTRATOS AQUOSOS DE *Uncaria tomentosa*

O sistema complemento liga a imunidade inata à humoral aumentando a produção de anticorpos e a memória imunológica através da lise direta de células estranhas ao organismo pelo complexo de ataque à membrana. A ativação desse sistema gera vários fragmentos do complemento (C3b) os quais são capazes de se ligarem a receptores específicos (CR1, CR3) em macrófagos, promovendo a eliminação de patógenos, corpos apoptóticos e complexos imunes (DUTTA; DAS, 2011).

Tanto a inibição quanto a ativação do sistema complemento representam atividades importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos. Componentes de cápsulas bacterianas (por exemplo, o LPS) são ativadores da via clássica e da via alternativa do complemento. Já polissacarídeos sulfatados, como a heparina, dextran sulfato ou fucanas são inibidores de ambas as vias (ALBAN *et al.*, 2002). Além disso, diversos polissacarídeos de plantas foram descritos como moduladores do sistema complemento tanto da via clássica quanto da via alternativa, principalmente polissacarídeos ácidos, além de heteroglicanas ramificadas, como por exemplo, as glucuronoarabinoxilanas (YAMADA *et al.*, 1986; YAMADA, 1994; SHIN; KWON; YANG, 1992; SAMUELSEN *et al.*, 1999; MICHAELSEN *et al.*, 2000).

Para avaliar a atividade desses polissacarídeos, muitos desses estudos utilizaram o ensaio hemolítico, também conhecido como teste de fixação do complemento. O teste de fixação do complemento quando realizado de maneira convencional, com incubação prévia, não permite distinguir se os compostos testados promovem uma inibição ou ativação do complemento, uma vez que em ambos os casos observa-se uma redução da percentagem de hemólise aparente, principalmente em relação à via clássica do sistema complemento.

Devido a isso, no presente estudo, as frações D10a e 1AERT, além da heparina bovina, como controle positivo de inibição, foram avaliadas quanto a sua capacidade de modulação tanto da via clássica quanto da via alternativa do sistema complemento, através do ensaio hemolítico descrito por YAMADA e colaboradores (1985a), com modificações sugeridas por ALBAN e colaboradores (2002). A partir dos resultados obtidos com essas modificações, é possível inferir e muitas vezes

diferenciar se as frações testadas atuam como compostos inibidores ou ativadores do complemento.

O método se baseia na hemólise de eritrócitos causada pelo sistema complemento. Quando os eritrócitos são lisados, liberam a hemoglobina em solução, gerando a coloração vermelha característica que permite a visualização da hemólise induzida pelo complemento. Para avaliar a interação de um composto qualquer com o complemento, é necessária a incubação prévia entre o composto-teste e o sistema complemento (no caso, soro humano), antes da adição dos eritrócitos. Como abordado anteriormente, se o composto interage com o complemento, seja inibindo ou ativando-o, haverá uma diminuição na quantidade de complemento disponível para posteriormente, ser ativado pelos eritrócitos que serão adicionados. O resultado será uma inibição da hemólise aparente.

A estratégia inicial para avaliar a interação de compostos naturais com o sistema complemento é através do ensaio hemolítico do complemento para a via clássica (EHC-VC) com pré-incubação de 30 min (EHC-VC-30). Assim, as frações foram inicialmente avaliadas nesse ensaio e, como mostrado na FIGURA 27-B, todas as frações testadas foram capazes de inibir a hemólise de forma dose-dependente. Os valores de  $ICH_{50}$  calculados correspondem à concentração final das frações-teste ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) capazes de reduzir a atividade hemolítica da mistura de soro humano (MHS) em 50%. Quanto menor o  $ICH_{50}$ , mais potente é o composto em inibir a hemólise.

Os valores de  $ICH_{50}$  para a heparina foi de  $32 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  e para a fração 1AERT foi de  $25 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ . Para a fração D10a, obteve-se valores de  $ICH_{50}$  de  $3 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  e de  $22 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ . Exceto pelo valor de  $3 \mu\text{g}/\text{m}\ell$  da fração D10a, as frações testadas apresentaram uma atividade semelhante no EHC-VC-30 em relação a inibição da hemólise.

O segundo  $ICH_{50}$  de  $22 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ , apresentado também pela D10a, correspondente ao pico observado no gráfico, é algo atípico para o ensaio de hemólise do complemento. Como o ensaio da via clássica envolve eritrócitos sensibilizados com hemolisina (antígeno e anticorpo), este pico pode estar relacionado a uma concentração ótima capaz de gerar alguma interação antígeno-anticorpo envolvendo os componentes presentes no extrato D10a. A interação entre um anticorpo (Ac) e um antígeno (Ag) solúvel, em uma solução aquosa, forma uma rede de ligações não-covalentes, que se desenvolve eventualmente em um

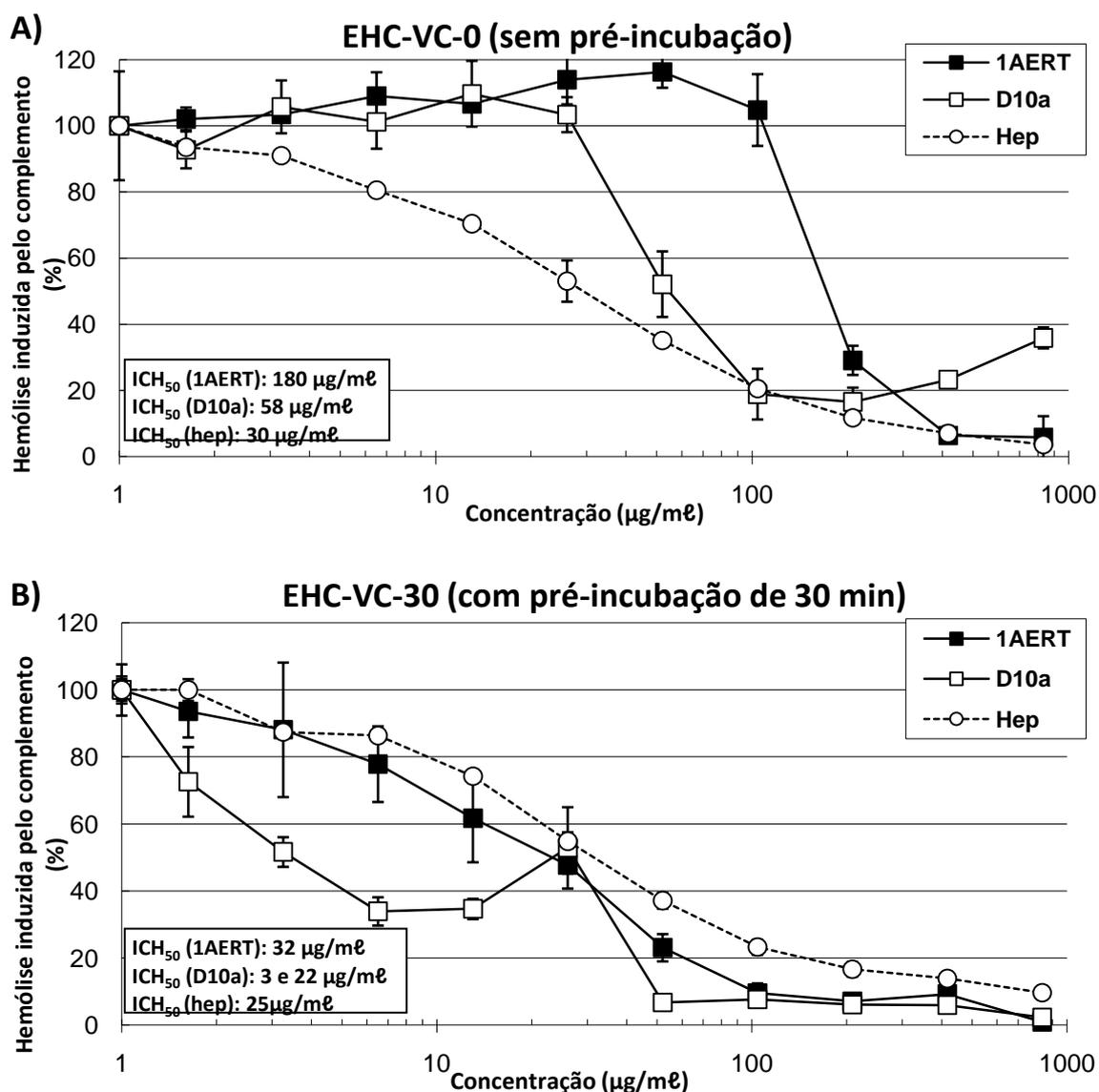
precipitado visível. Entretanto, essa rede só se forma nas concentrações corretas, determinadas de zona de equivalência. Esses imunocomplexos são dissociados caso a concentração de Ac ou de Ag diminua ou aumente (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000). Possivelmente, algum componente presente nos extratos de D10a possa também estar interagindo de alguma forma com essa rede, ou induzindo sua formação e, dessa forma, precipitando-a, o que geraria um aumento no valor da absorvância.

ALBAN *et al.* (2002), avaliou a interação de uma AGP isolada do suco das partes aéreas de *Echinacea purpurea* L. Moench com o sistema complemento. Em um ensaio semelhante, a AGP apresentou um  $ICH_{50}$  de 37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , valor maior que o da heparina ( $ICH_{50} = 23 \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Comparando esses dados com os obtidos no presente trabalho, pode-se dizer que as frações de *U. tomentosa* apresentaram atividade semelhante a fração obtida de *E. purpurea* em relação a redução da hemólise induzida pela via clássica do sistema complemento.

O ensaio de fixação do complemento foi também realizado sem incubação prévia (EHC-VC) como mostrado na FIGURA 27-A. Este ensaio corresponde a modificação do método sugerida por ALBAN *et al.* (2002), para avaliar se a redução da hemólise se deve a uma inibição ou a uma ativação. A inibição acontece quando um composto impede a ativação do complemento se ligando aos eritrócitos sensibilizados, como é o caso da heparina (EDENS; LINHARDT; WEILER, 1993). Já um composto ativador dispara a cascata do complemento. Para que seja possível a visualização da ativação do complemento por um composto, e para se ter certeza de que essa ativação foi causada pelo composto a ser testado e não pelos eritrócitos, a pré-incubação é necessária, pois é nesse período que o composto dispara a cascata do complemento, consumindo o complemento presente em solução, o que resulta na redução da hemólise dos eritrócitos adicionados posteriormente. Essa ativação leva um tempo para ser realizada, ao contrário da inibição, que para ocorrer, basta apenas que o composto entre em contato com os eritrócitos.

Além disso, devido ao curto tempo de meia-vida dos fatores do complemento, depois de 30 min de incubação, naturalmente, resta uma menor quantidade de complemento para ser ativada pelos eritrócitos sensibilizados. Assim, tanto a inibição quanto a ativação apresentam resultados semelhantes após o EHC-VC com pré-incubação. Baseando-se nisso, o EHC-VC desenvolvido sem essa pré-

incubação permite distinguir entre os dois métodos aparentes de inibição da hemólise.



**FIGURA 27 – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa*, E DA HEPARINA NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA CLÁSSICA. (A) SEM PRÉ-INCUBAÇÃO. (B) COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS**  
 FONTE: O autor (2011)

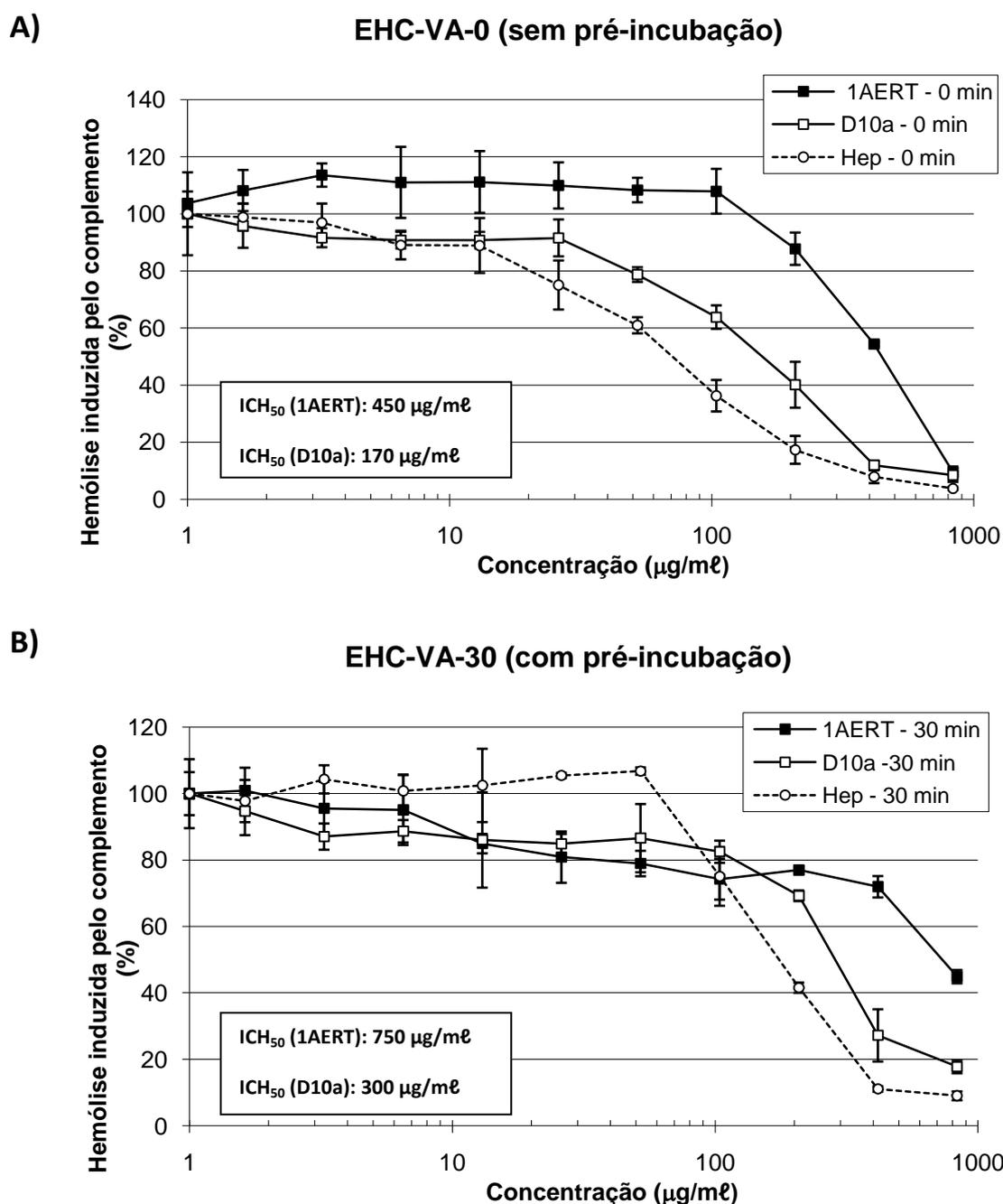
NOTA: Ensaio hemolítico do complemento utilizando suspensão de eritrócitos de carneiro a 1,2%, sensibilizadas por 30 min a 37°C com hemolisina (1:1500 v/v). As concentrações finais de D10a, 1AERT e hemolisina testadas foram 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833 µg.ml<sup>-1</sup>. As frações-teste foram ou não pré-incubadas a 37°C por 30 min com a MHS (fonte de complemento). Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos de carneiro, e as soluções foram novamente incubadas por 30 min a 37°C. Todas as soluções utilizadas no experimento foram diluídas em HC. 100% de hemólise corresponde à atividade hemolítica do complemento na ausência de fração-teste, medida após a pré-incubação. Os valores de ICH<sub>50</sub> correspondem à concentração final das frações-teste [µg/ml] capazes de reduzir a atividade hemolítica da MHS em 50%. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas. Este experimento foi repetido pelo menos uma vez em um dia diferente. Hep – heparina.

A curva de inibição da hemólise apresentada pela heparina (FIGURA 27-A) foi semelhante nos dois ensaios, com e sem pré-incubação; apresentando assim  $ICH_{50}$  muito semelhantes de 25 e 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Este resultado confirma que a heparina atua como inibidor da via clássica do sistema complemento, como também verificado por outros autores (EDENS; LINHARDT; WEILER, 1993; ALBAN *et al.*, 2002).

Entretanto, as curvas apresentadas pelas frações D10a e 1AERT foram diferentes nos dois ensaios, com e sem pré-incubação. No ensaio sem pré-incubação, os valores de  $ICH_{50}$  para a fração D10a foi de 58  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , maior que para o ensaio com pré-incubação. A fração 1AERT apresentou um valor de  $ICH_{50}$  de 180  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , o qual também foi maior que no ensaio com pré-incubação. Portanto, tanto a fração D10a como a 1AERT reduziram a hemólise induzida pelo complemento com mais eficácia somente após a pré-incubação, o que indica que essas amostras, através da via clássica, são capazes de ativar o sistema complemento, e não de inibi-lo, como a heparina. Resultados semelhantes também foram obtidos para a AGP de *E. purpurea* testada por ALBAN *et al.* (2002).

Para o ensaio hemolítico do complemento através da via alternativa (EHC-VA), as amostras também foram testadas com e sem incubação prévia. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 28.

Nos ensaios relacionados à via alternativa, todas as amostras testadas apresentaram capacidade de modulação da atividade do complemento. Entretanto, como também observado por ALBAN *et al.* (2002), todas foram menos ativas no ensaio da via alternativa com pré-incubação de 30 min (EHC-VA-30) (FIGURA 28-B) do que no da via clássica (EHC-VC-30) (FIGURA 28-B). Entretanto, essa atividade menor aparente observada nos experimentos da via alternativa pode estar relacionada com a maior quantidade de complemento adicionada nesses ensaios, já que a diluição utilizada da MHS foi menor (1:10 v/v contra 1:32 v/v na via clássica).



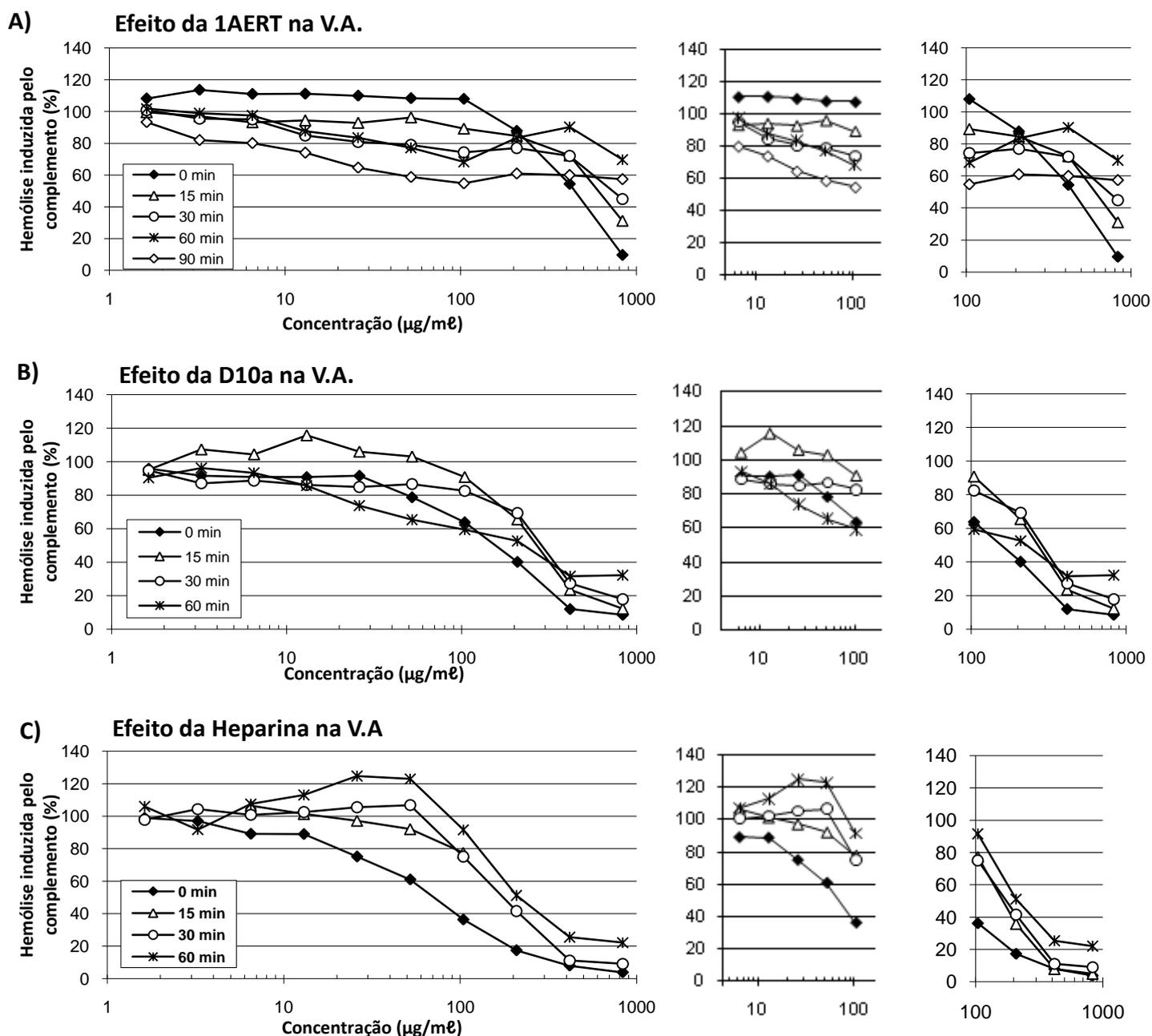
**FIGURA 28** – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT E D10a DE *Uncaria tomentosa*, E DA HEPARINA NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA ALTERNATIVA. (A) SEM PRÉ-INCUBAÇÃO. (B) COM PRÉ-INCUBAÇÃO DE 30 MINUTOS DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Ensaio hemolítico do complemento utilizando suspensão de eritrócitos de coelho a 2,4%. As concentrações finais de D10a, 1AERT e heparina testadas foram 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As frações-teste foram ou não pré-incubadas a 37°C por 30 min com a MHS (fonte de complemento). Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos de coelho, e as soluções foram novamente incubadas por 30 min a 37°C. Todas as soluções utilizadas no experimento foram diluídas em HA. 100% de hemólise corresponde à atividade hemolítica do complemento na ausência de fração-teste, medida após a pré-incubação. Os valores de  $\text{ICH}_{50}$  correspondem à concentração final das frações-teste [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] capazes de reduzir a atividade hemolítica da MHS em 50%. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas. Este experimento foi repetido pelo menos uma vez em um dia diferente. Hep – heparina.

Um fator que poderia estar influenciando os resultados obtidos para a via alternativa seria a solubilidade. Algumas moléculas tornam-se menos solúveis no tampão utilizado na via alternativa com o aumento do tempo de incubação (YAMADA *et al.*, 1985b). Assim as amostras seriam mais ativas sem pré-incubação, e quanto maior o tempo de incubação, menor a solubilidade das amostras, o que refletiria em menor atividade, principalmente nas menores concentrações, considerando também que nos experimentos da via alternativa, o soro está menos diluído.

Considerando os valores de  $ICH_{50}$ , a heparina ( $ICH_{50}=180 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) foi mais eficiente em reduzir a hemólise do que as frações D10a ( $ICH_{50}=300 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) e 1AERT ( $ICH_{50}=750 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ). Comparando esses valores com aqueles obtidos no EHC-VA-0 (FIGURA 28-A), ou seja, sem pré-incubação, o  $ICH_{50}$  da heparina ( $75 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) foi 2,4 vezes menor enquanto os das frações D10a e 1AERT foram aproximadamente 1,7 vezes menores ( $170$  e  $450 \mu\text{g}/\text{m}\ell$ , respectivamente). Portanto, em relação à via alternativa, ao contrário da via clássica, as amostras foram mais efetivas em reduzir a hemólise nos ensaios sem pré-incubação.

Os resultados obtidos para os experimentos da via alternativa foram diferentes daqueles obtidos para a AGP de *E. purpurea* por ALBAN *et al.* (2002), que verificaram valores de  $ICH_{50}$  menores a medida que se aumentava o tempo de incubação; e semelhantes ao observado para a heparina, para a qual o  $ICH_{50}$  aparentemente acrescia com o aumento do tempo de incubação. Através dessa comparação, seria possível concluir que as frações D10a e 1AERT agiriam inibindo o complemento na via alternativa, enquanto o ativariam na via clássica. Entretanto, para resultados mais conclusivos, foi realizado um estudo cinético da via alternativa, como descrito por ALBAN *et al.* (2002), variando os tempos de pré-incubação de 0 a 60 min para a heparina e D10a e de 0 a 90 min para a 1AERT. Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 29 e 30.



**FIGURA 29 – EFEITO DAS FRAÇÕES 1AERT (A) E D10a (B) DE *Uncaria tomentosa*, E DA HEPARINA (C) NA HEMÓLISE INDUZIDA PELO SISTEMA COMPLEMENTO NA VIA ALTERNATIVA, COM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO (0 A 90 MINUTOS) DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS**  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: Ensaio hemolítico do complemento utilizando suspensão de eritrócitos de coelho a 2,4%. As concentrações finais de D10a, 1AERT e hemolisina testadas foram 1,6; 3,2; 6,5; 13; 26; 52; 104; 208; 416 e 833  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . As frações-teste foram ou não pré-incubadas a 37°C em diferentes tempos com a MHS (fonte de complemento). Em seguida, adicionou-se a suspensão de eritrócitos de coelho, e as soluções foram novamente incubadas por 30 min a 37°C. Todas as soluções utilizadas no experimento foram diluídas em HA. 100% de hemólise corresponde à atividade hemolítica do complemento na ausência de fração-teste, medida após os respectivos tempos de pré-incubação. Os resultados estão expressos como médias de triplicatas. Este experimento foi repetido pelo menos uma vez em um dia diferente. Hep – heparina. À direita, detalhes para concentrações de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e de 100 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Como observado anteriormente, as três frações testadas apresentaram valores maiores de  $ICH_{50}$  com o aumento do tempo de pré-incubação. Entretanto, analisando os gráficos por partes, observa-se que em alguns casos, a curva comporta-se de maneira diferente dependendo da concentração testada. Assim, para uma melhor visualização, o gráfico foi dividido em duas partes: uma abrangendo as concentrações de 10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , e a outra, de 100 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Esse comportamento inesperado da curva de hemólise pode ser observado analisando o efeito da fração 1AERT sobre o EHC-VA (FIGURA 29-A). Nas menores concentrações (10 a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), a medida que o tempo de incubação aumenta, a fração se apresenta cada vez mais efetiva, de forma dose-dependente, na inibição da hemólise. Entretanto, nas concentrações acima de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , essa capacidade na redução da hemólise não é mantida, mas pelo contrário, é revertida, ficando cada vez menor a medida que o tempo de pré-incubação aumenta. Nesse caso, os valores de  $ICH_{50}$  apresentados correspondentes ao gráfico total (FIGURA 30), os quais ficam maiores com o aumento do tempo de incubação, devem ser considerados com cautela durante a interpretação da atividade, já que não são aplicáveis a toda extensão da curva.

Essa variação na atividade, ao longo da curva de inibição da hemólise, também é observada para a fração D10a (FIGURA 29-B). Aparentemente, assim como a fração 1AERT, a medida que o tempo de pré-incubação aumenta, a fração D10a parece inibir a hemólise nas menores concentrações, porém perde essa capacidade nas maiores concentrações. Entretanto, mesmo dividindo o gráfico em duas partes diferentes, os resultados obtidos para as menores concentrações não são regulares, uma vez que no  $t=15$  a fração D10a chega a aumentar a hemólise.

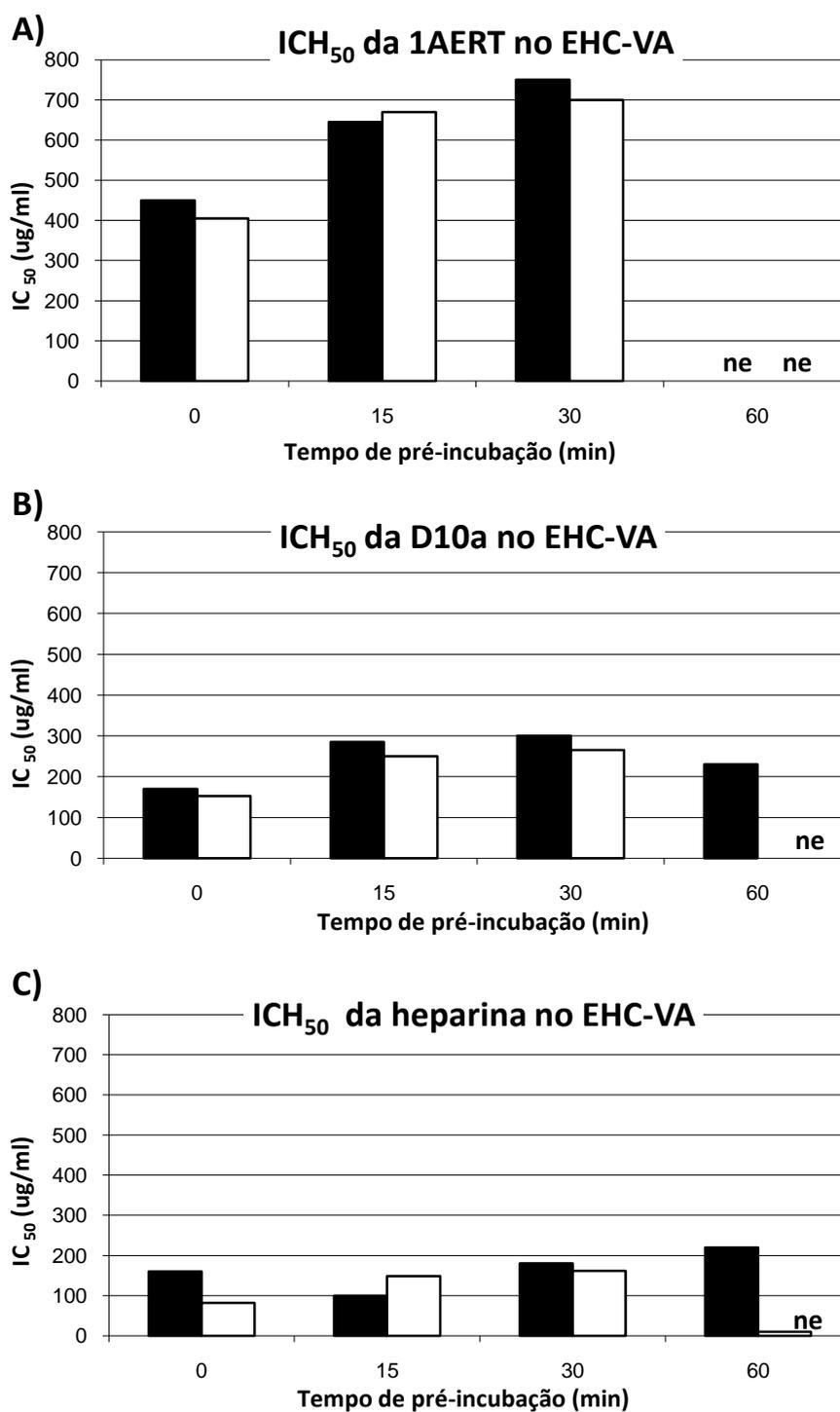
Já as curvas de inibição de hemólise obtidas para a heparina (FIGURA 29-C) mantêm o mesmo padrão nas duas partes do gráfico. Tanto nas menores, quanto nas maiores concentrações, a heparina mostrou menor capacidade de inibir a hemólise com o aumento do tempo de pré-incubação.

Para a correta interpretação dos resultados obtidos para o estudo cinético do EHC-VA, é necessário levar em consideração as diferenças existentes entre a ativação das vias clássica e alternativa do sistema complemento, que culminam em resultados distintos para os dois tipos de ensaio.

Como citado anteriormente, em fluidos biológicos, a via alternativa é autoativada, sem a presença de anticorpos, de forma contínua e em níveis basais

pela clivagem espontânea de C3 (FEARON, 1981; THURMAN; HOLERS, 2006). O C3b proveniente dessa clivagem é altamente capaz de amplificar a cascata de ativação da via alternativa em determinadas situações, como por exemplo, na presença de compostos ativadores dessa via (ALBAN *et al.*, 2002). No ensaio hemolítico, durante a pré-incubação do soro sem nenhum composto (controle), essa clivagem basal naturalmente vai liberando o ativador C3b em solução, que por sua vez, sozinho, vai lentamente disparando a cascata da via alternativa, o que resulta num consequente consumo do complemento disponível. Quanto maior o tempo de pré-incubação, menor a quantidade de complemento restante, e menor a hemólise observada após a adição dos eritrócitos. No caso de uma pré-incubação do soro com um composto ativador da via alternativa, o consumo do complemento será ainda maior, visto que o C3b amplifica a cascata de ativação do complemento desencadeada por um ativador qualquer. O resultado seria uma inibição ainda maior da hemólise. Já na presença de um inibidor durante a pré-incubação, essa ativação natural em cascata que ocorreria no controle seria prevenida, e em partes, o consumo do complemento seria menor. Assim, na somatória final, a hemólise seria mais acentuada, devido à maior quantidade de complemento disponível, mesmo que parte dele esteja inibida.

Levando essas informações em consideração, o resultado observado para a heparina corresponderia à atividade esperada para um inibidor da via alternativa no ensaio hemolítico do complemento, e foi semelhante ao observado por ALBAN *et al.* (2002). Como a heparina conserva a atividade original do complemento, os valores corretos de  $ICH_{50}$  foram também calculados baseados no valor de 100% de hemólise relacionado ao  $t=0$  (FIGURA 30). Após 15 min de incubação em diante, pode-se observar que o valor de  $ICH_{50}$  se mantém praticamente igual, indicando que a inibição da cascata de ativação do complemento ocorre independente do tempo de incubação. Esse efeito também foi observado para a fração D10a. Já para a fração 1AERT, os valores de  $ICH_{50}$  calculados nessas condições continuaram se elevando com o aumento do tempo de pré-incubação, o que indica que essa fração realmente perdeu a capacidade de modular o sistema complemento através da via alternativa com o aumento do tempo de pré-incubação, em concentrações mais elevadas.



**FIGURA 30 – VALORES DE ICH<sub>50</sub> DAS FRAÇÕES 1AERT (A) E D10a (B) DE *Uncaria tomentosa*, E DA HEPARINA (C) OBTIDOS ATRAVÉS DO ENSAIO CINÉTICO DA EHC-VA COM DIFERENTES TEMPOS DE PRÉ-INCUBAÇÃO DAS FRAÇÕES-TESTE COM A MHS**

FONTE: O autor (2011)

NOTA: Os valores de ICH<sub>50</sub> correspondem à concentração final das frações-teste [ $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ] capazes de reduzir a atividade hemolítica da MHS em 50%. As colunas pretas representam os valores de ICH<sub>50</sub> calculados em relação ao controle 100% de hemólise mensurado após cada respectivo tempo de pré-incubação. As colunas brancas representam os valores de ICH<sub>50</sub> calculados em relação ao controle 100% de hemólise do t=0, correspondente à atividade hemolítica original da MHS. ne - não estabelecido

Portanto, como observado, os extratos aquosos de *U. tomentosa* apresentaram tanto inibição, quanto ativação do complemento através da via alternativa, dependendo da concentração testada. Esse resultado inesperado pode estar relacionado ao fato de a D10a e da 1AERT tratarem-se de extratos brutos, ao contrário da heparina, e da AGP de *E. purpurea* testada por ALBAN *et al.* (2002), que são frações purificadas. Em extratos, geralmente vários compostos estão presentes atuando em sinergismo, alguns podendo apresentar a capacidade de ativação do sistema complemento, e outros, de inibição. Somando-se os efeitos, a atividade que prevalece depende de dois fatores: da concentração e da potência do composto com a qual está relacionada. Assim, no caso da D10a e da 1AERT, nas menores concentrações, alguns compostos presentes nesses extratos, possivelmente, estariam ativando a via alternativa do complemento. Com o aumento da concentração, a quantidade de compostos inibidores presentes nos extratos aumenta, tornando-o capazes de inibir com eficiência essa ativação.

Os compostos encontrados nas frações 1AERT e D10a poderiam estar atuando de forma contraditória, porém, em sinergismo. Neste caso, seriam os polissacarídeos glicoconjugados (entre eles as AGPs) e os compostos fenólicos, como observado através das análises químicas, as moléculas que apresentariam as maiores atividades sobre o sistema complemento.

Em relação aos polissacarídeos, além de ALBAN *et al.* (2002), outros autores demonstraram a capacidade de arabinogalactanas tipo II, como as AGPs, em modular a atividade do sistema complemento (YAMADA *et al.*, 1985b; DIALLO *et al.*, 2001). Estudos moleculares (ODENTHAL *et al.*, 2000) revelaram que as AGPs se ligam ao componente C1q do complemento, assim como outros ativadores da via clássica, por exemplo, os imunocomplexos e LPS. Dessa forma, a AGP induz a clivagem do C3, o que pode levar à ativação tanto da via clássica quanto da via alternativa. Finalmente, a AGP induz a formação do MAC, que é o produto final da ativação do complemento, responsável pela lise celular. Assim, a presença das AGPs nos extratos de *U. tomentosa* poderiam contribuir com os efeitos imunoestimulantes apresentados por essa planta na via clássica principalmente, e em determinadas concentrações na via alternativa.

Entretanto, a ativação do complemento por ambas as vias geram os mediadores inflamatórios (C3a e C5a) que podem atuar acentuando a inflamação.

Assim, uma inibição do complemento estaria relacionada com uma atividade anti-inflamatória. Alguns estudos demonstram que determinados compostos fenólicos, como os flavonóides, são inibidores do sistema complemento (MOREIRA *et al.*, 2007; ZHANG, CHEN, 2008; MACHADO *et al.*, 2008). Como as frações também apresentam fenóis, pode-se supor que esses compostos seriam responsáveis pela inibição da via alternativa observada nos ensaios hemolíticos, e que esse resultado corrobora com a atividade anti-inflamatória descrita para a *U. tomentosa*.

A TABELA 15 resume de forma geral a atividade de modulação da via clássica e da via alternativa das frações avaliadas no presente estudo. Os resultados estão expressos em percentagem de redução da hemólise induzida pelo sistema complemento.

**TABELA 15** – ANÁLISE COMPARATIVA DOS RESULTADOS OBTIDOS SOBRE O EFEITO DAS FRAÇÕES D10a E 1AERT DE *U. tomentosa* NA MODULAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO ATRAVÉS DAS VIAS CLÁSSICA E ALTERNATIVA

Fração Testada	Ensaio	Redução da hemólise induzida pelo complemento (%)		
		Concentração ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ ) <sup>a</sup>		
		1	100	850
D10a	EHC-VC-0	9	100	100
	EHC-VC-30	30	100	100
	EHC-VA-0	4	36	91
	EHC-VA-30	5	17	82
1AERT	EHC-VC-0	8	5	100
	EHC-VC-30	10	100	100
	EHC-VA-0	0	0	90
	EHC-VA-30	0	26	55
Heparina	EHC-VC-0	7	84	100
	EHC-VC-30	0	87	100
	EHC-VA-0	1	64	96
	EHC-VA-30	2	25	90

FONTE: O autor (2011)

NOTA: <sup>a</sup> Concentrações aproximadas.

Em relação à via clássica, como observado anteriormente, todas as frações analisadas apresentaram uma ação muito mais pronunciada através dessa via de ativação. Com o aumento do tempo de pré-incubação, no geral, as frações D10 e 1AERT apresentaram uma maior atividade, o que as caracterizam como ativadoras

da via clássica do complemento. Já a atividade apresentada pela heparina não foi alterada com o aumento do tempo de pré-incubação, o que indica que essa molécula age inibindo o complemento nessa via.

No EHC-VC-30, todas as frações apresentaram atividade semelhante. Já no EHC-VC-0, a fração D10a, em comparação à fração 1AERT, foi mais eficiente em modular o sistema complemento, apresentando uma atividade intermediária entre a heparina e a fração 1AERT. Esse resultado sugere que, apesar de ser ativadora, essa fração também é capaz de inibir em partes o sistema complemento através da via clássica. Esse resultado também pode estar relacionado ao sinergismo discutido anteriormente, visto que essa fração apresenta um maior conteúdo de fenóis em relação à 1AERT, os quais são inibidores do complemento.

Em relação à via alternativa, ao analisar o resultado geral (sem a divisão dos gráficos) e ao comparar a atividade das frações, observa-se que todas as frações apresentaram capacidade de modulação do sistema complemento de forma dose-dependente através dessa via. Entretanto, com o aumento do tempo de pré-incubação, a atividade apresentada pelas frações foi menor.

A fração 1AERT se mostrou menos capaz de modular o sistema complemento através da via alternativa que a fração D10a e a heparina. Esse resultado pode estar relacionado com a percentagem de ácidos urônicos presente nas frações. A 1AERT é composta por 26% de açúcares ácidos, enquanto a D10a, por apenas 6%. Alguns estudos demonstraram que os açúcares ácidos presentes interferem na modulação da via alternativa do complemento. YAMADA e colaboradores (1985b) avaliaram a atividade sobre o sistema complemento por ambas as vias de diferentes polissacarídeos extraídos de plantas. Os polissacarídeos mais ramificados foram os que apresentaram maior atividade através da via clássica. Entre os compostos ativos, apenas a paniculatana, um polissacarídeo ácido, extraído da fruta seca de *Zizyphus jujuba*, apresentou baixa atividade através da via alternativa. Estruturalmente, a paniculatana contém grandes quantidades de ácido metil-glucurônico, ácido glucurônico e ácido galacturônico em terminais não-redutores e em suas cadeias laterais.

SAMUELSEN e colaboradores (2007) também observaram que a quantidade de açúcares neutros presentes nas cadeias laterais de pectinas são importantes para a bioatividade apresentada por essas moléculas. Os autores demonstraram que a atividade de pectinas de *Brassica oleracea* está relacionada com a quantidade

de unidades de galactose  $\beta$ -(1,6)- e  $\beta$ -(1,3,6)- ligadas e ao baixo teor de ácido galacturônico  $\alpha$ -(1,4)-ligado.

Em outro estudo realizado por KIYOHARA e colaboradores (1988), o qual relacionou a estrutura química de quatro polissacarídeos pécticos extraídos das raízes de *Angelica acutiloba* Kitagawa com a capacidade de modulação do sistema complemento, demonstrou que as regiões compostas por açúcares neutros eram responsáveis tanto pela modulação da via clássica quanto da alternativa, enquanto que as regiões compostas por tanto por açúcares neutros e ácidos galacturônicos eram capazes de modular o sistema complemento somente através da via clássica. Os autores sugeriram que as regiões de poligalacturananas desses polissacarídeos eram responsáveis pela supressão da modulação do complemento através da via alternativa.

Entretanto, não só a característica dos açúcares presentes (neutro ou ácido) é capaz de interferir nessa atividade, mas também determinadas unidades de carboidratos presentes nos polissacarídeos, como observado em um estudo semelhante com outro polissacarídeo péctico, também extraído das raízes de *Angelica acutiloba* Kitagawa (KIYOHARA; JONG-CHOL; YAMADA, 1989). Esse polissacarídeo consiste de uma arabinogalactana de estrutura complexa, denominada de AGIIb-1, composta por quatro diferentes unidades de carboidratos: uma arabinogalactana neutra (N-I), duas arabinogalactanas ácidas (A-I e A-II) e uma arabinana neutra (N-II). O polissacarídeo total (AGIIb-1) apresentou capacidade de modulação do sistema complemento principalmente pela via clássica. Quando suas subunidades foram avaliadas separadamente, a N-I apresentou uma alta atividade de modulação do sistema complemento através da via clássica, superior ao polissacarídeo total; as subunidades A-I e A-II apresentaram uma atividade moderada, semelhante ao AGIIb-1; enquanto a subunidade N-II não apresentou uma atividade significativa. A eliminação das cadeias laterais compostas por Araf aumentou consideravelmente a capacidade de modulação do sistema complemento através da via clássica e também da via alternativa do polissacarídeo total AGIIb-1 e da sua subunidade N-I; além de aumentar a reatividade dessas duas subunidades com o reagente  $\beta$ -glucosil-Yariv, o que indica que esses polissacarídeos são compostos por AGPs. Através desses resultados, os autores concluíram que a atividade da AGIIb-1 é expressa através das cadeias laterais neutras, principalmente, pela unidade (1 $\rightarrow$ 3,6)- $\beta$ -D-galactana presente em N-I, e que a

unidade de arabinana (N-II), formada somente de Ara, não contribui em nada com essa atividade.

Portanto, para resultados mais conclusivos em relação à atividade das frações sobre o sistema complemento através da via alternativa, estudos adicionais devem ser realizados levando em consideração a estrutura química das moléculas presentes. Além disso, estudos de ativação através da via das lectinas poderiam enriquecer os resultados obtidos para as frações de *U. tomentosa*.

#### 6.4 LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (LPS)

A endotoxina bacteriana (LPS) é conhecida como potente imunomoduladora e frequentemente encontrada como um contaminante em preparações biológicas (SHEPETKIN *et al.*, 2005). Por isso, em ensaios biológicos, muitas medidas são tomadas para a prevenção de uma possível contaminação das amostras com LPS, a fim de se evitar que os resultados observados possam estar relacionados com a presença do contaminante, e não com a atividade dos compostos testados.

No presente estudo, todas as amostras utilizadas nos ensaios biológicos com macrófagos foram previamente filtradas em membranas com poros de 0,22 µm, e a partir de então, toda a manipulação foi realizada com materiais estéreis, em ambiente também estéril (capela de fluxo laminar do tipo vertical II).

A ausência de contaminação por LPS das amostras utilizadas nesses ensaios pode ser observada pela análise dos resultados obtidos. Todos os ensaios foram realizados no mesmo dia, com as mesmas amostras. Nos casos dos testes de produção de IL-1β e IL-10, fica clara a diferença entre o efeito causado pelo LPS (50 ng) utilizado como controle positivo e as amostras D10a e 1AERT.

A ausência de LPS pode ser comprovada, ainda, pelos resultados obtidos no ensaio de produção de NO. As duas frações testadas foram manipuladas nas mesmas condições desde a extração, e ainda assim, apresentaram resultados diferentes, sendo que a 1AERT foi capaz de estimular a produção, e a D10a não. Seria improvável que a contaminação por LPS estivesse restrita apenas à fração 1AERT.

Já as amostras utilizadas nos ensaios hemolíticos do complemento não foram manipuladas em ambientes estéreis. Entretanto, as amostras foram preparadas no mesmo dia em que os ensaios foram realizados.

O lipopolissacarídeo bacteriano é capaz de ativar o complemento por ambas as vias, clássica e alternativa. O LPS é composto pelo lipídeo A, por um polissacarídeo central e uma cadeia lateral de açúcar, o antígeno O. O lipídeo A é responsável por ativar a via clássica e as unidades polissacarídicas, a via alternativa (YAMADA *et al.*, 1985b).

No entanto, é pouco provável que os resultados obtidos nos EHC estejam relacionados com a contaminação por LPS, uma vez que as frações 1AERT e D10a foram eficientes em modular o sistema complemento apenas por uma das vias de ativação. Além disso, na via alternativa, a fração 1AERT se mostrou menos efetiva com o aumento da concentração, o que não aconteceria caso esse efeito fosse causado pelo LPS. De qualquer forma, SAMUELSEN e colaboradores (2007) demonstraram que uma possível contaminação com LPS não interfere nesse ensaio, utilizando LPS de *E. coli* e *N. meningitidis* nas concentrações de 3 a 750 µg/ml.

## 6.5 DISCUSSÃO FINAL

Com o interesse em utilizar a medicina complementar para amenizar as doenças inflamatórias e melhorar o estado imunológico geral, novas plantas medicinais em diferentes partes do mundo passaram a ser investigadas (BUDZINSKI *et al.*, 2000).

A *Uncaria tomentosa*, comumente conhecida como unha-de-gato, é uma planta medicinal tradicionalmente utilizada pelos nativos Asháninka, que povoavam a amazônia peruana (ALLEN-HALL *et al.*, 2007). Devido à grande consideração com a qual a unha-de-gato era empregada pelos curandeiros tradicionais dessa região, os peruanos utilizam há décadas a decocção de cascas dessa plantas para tratar doenças inflamatórias, tais como artrite, úlceras gástricas entre outras, além de câncer (AKESSON *et al.*, 2003; HEITZMAN *et al.*, 2005). Um interesse científico considerável na *U. tomentosa* foi gerado, entre outros motivos, pela demonstração de sua potente ação imunoestimulante (EBERLIN; SANTOS; QUEIROZ, 2005). Devido ao grande interesse tanto pela população quanto no meio científico, os

extratos medicinais dessa planta passaram a ser comercializados e sua utilização está generalizada em toda a América (ALLEN-HALL *et al.*, 2007).

Os principais componentes químicos presentes na *U. tomentosa* já estudados são metabólitos especiais, tais como alcalóides, compostos fenólicos e terpenóides (WAGNER; KREUTZKAMP; JURCIC, 1985; AQUINO *et al.*, 1989, 1990; LAUS; BROSSNER; KEPLINGER, 1997). Entretanto, não há trabalhos publicados a respeito dos carboidratos encontrados em extratos dessa planta, cuja presença, especificamente, de arabinogalactana-proteínas, já foi quantificada em um trabalho prévio realizado em nosso laboratório por OKUMURA (2009).

Diferentes tipos de polissacarídeos isolados de plantas medicinais foram descritos por apresentar atividades de modulação do sistema complemento, como por exemplo, arabinanas, arabinogalactanas, ramnogalactanas e ramnogalacturonanas (YAMADA, KIYOHARA, 1999), além de também demonstrarem capacidade de modular a atividade de macrófagos, linfócitos T e células *natural killer* (PAULSEN, 2001).

Os polissacarídeos derivados de plantas se ligam a uma variedade de receptores presentes em superfícies celulares de macrófagos. Esses receptores são os mesmos envolvidos no reconhecimento de polissacarídeos microbianos, o que sugere que vias de sinalização similares são induzidas tanto por polissacarídeos de plantas quanto de microorganismos. De fato, a cadeia principal de polissacarídeos da parede celular de corinebactérias, micobactérias e nocardia é formada por uma arabinogalactana (DAFFE; McNAIL; BRENNAN, 1993; KACEM *et al.*, 2004). Portanto, é plausível que a resposta de macrófagos à arabinogalactanas vegetais parcialmente mimetiza a resposta inata de macrófagos à arabinogalactanas bacterianas e que, possivelmente, ambas as respostas convergem a um padrão de reconhecimento de moléculas conservado evolutivamente. Essa característica apresentada pelos polissacarídeos vegetais os torna ótimos candidatos a estudos que visam o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos com propriedades moduladoras benéficas para sistema imunológico. Além disso, a maioria dos polissacarídeos derivados de plantas são relativamente não tóxicos e não causam efeitos colaterais significantes; principais problemas associados ao uso de polissacarídeos bacterianos e compostos sintéticos como imunomoduladores. (SHEPETKIN; QUINN, 2006).

Considerando a relevância da utilização da planta *U. tomentosa* como imunostimulante, aliada ao seu conteúdo de carboidratos, os quais poderiam contribuir com essa atividade, no presente estudo, dois diferentes extratos aquosos de *U. tomentosa* foram avaliados e comparados entre si em relação à composição química e atividade biológica sobre macrófagos peritoneais de camundongos e também sobre o sistema complemento. O extrato D10a, proveniente da decocção, principal forma de utilização popular dessa planta, foi comparado a um extrato rico em AGP, a 1AERT, derivado da extração aquosa da casca pulverizada de *U. tomentosa*, a qual é comercializada em cápsulas como fitoterápico.

As duas frações testadas, mesmo sendo provenientes de extrações aquosas da mesma planta, apresentaram diferenças em relação às atividades biológicas avaliadas. O decocto foi mais potente em inibir a produção de IL-1 $\beta$  e de modular a atividade do sistema complemento pelas vias clássica e alternativa, mas não foi capaz de estimular a produção de NO como a 1AERT. Essas diferenças provavelmente estão relacionadas às diferenças na composição química entre as duas frações, visto que o decocto apresenta uma maior quantidade de compostos fenólicos, enquanto a fração 1AERT, rica em polissacarídeos e glicoconjugados, apresenta maior quantidade de açúcares ácidos e de AGPs.

Como se tratam de extratos, a atividade biológica observada é a somatória da atividade independente de cada um dos compostos presentes, ou mesmo do sinergismo entre as moléculas. Portanto, para avaliar precisamente se a AGP seria também responsável pela atividade imunostimulante relatada para a *U. tomentosa*, um dos objetivos do presente trabalho foi isolar a AGP da fração 1AERT (fração AERT-YPF), caracterizá-la estruturalmente e, assim como realizado para as frações D10a e AERT, avaliar sua atividade biológica. Entretanto, essa avaliação não foi realizada, pois não foi possível obter quantidade suficiente da fração AERT-YPF através da precipitação seletiva com o reagente Yariv  $\beta$ -Glucosil ( $\beta$ -GlcY), apesar da alta quantidade de AGP presente na fração 1AERT. Provavelmente, o baixo rendimento na obtenção da fração YPF-1AERT está relacionado à interação da AGP com várias outras moléculas, como fenóis glicosilados, por exemplo, o que interferiu na sua reatividade com o  $\beta$ -GlcY. Uma alternativa para tentar aumentar o rendimento da fração YPF seria realizar um tratamento prévio para remoção de fenólicos antes do procedimento de precipitação com o reagente  $\beta$ -GlcY.

Outros experimentos adicionais poderiam ser realizados para uma melhor elucidação da contribuição dos componentes presentes nesses extratos na atividade biológica apresentada pela *U. tomentosa*. No presente trabalho, foi focado estudos para a análise das AGPs, entretanto, no caso da fração 1AERT, que apresenta maior conteúdo de componentes glicídicos, incluindo AGP e polissacarídeos ácidos do que D a D10a, poderia também ter sido realizada a separação dessas frações glicídicas através de cromatografia, as quais poderiam ser avaliadas separadamente nos experimentos biológicos.

Além disso, o tratamento dessas frações com enzimas, como as poligalacturonases, que degradam as pectinas, como realizado nos estudos citados anteriormente, realizados por KIYOHARA e colaboradores (1988; 1989) poderia contribuir para uma melhor compreensão da atividade dessas frações, principalmente nos ensaios hemolíticos do sistema complemento através da via alternativa.

Esses estudos que envolvem o fracionamento dos extratos, além da degradação parcial das moléculas de estruturas complexas em fragmentos menores, se tornam ainda mais interessantes quando se leva em consideração que esses extratos são administrados oralmente nos tratamentos em que são utilizados. Obrigatoriamente, esses extratos irão atravessar o trato gastrointestinal antes de executarem qualquer ação biológica no organismo, onde as condições químicas locais poderão afetar as estruturas dos compostos neles presentes. No caso de arabinogalactanas (AG) presentes em infusões e decocções de *Phyllanthus niruri*; submetidas a condições gástricas ácidas e neutras utilizando fluido gástrico humano e soluções aquosas de HCl; tanto os monossacarídeos e oligossacarídeos liberados, assim como os fragmentos maiores, correspondentes às unidades internas das AGs que não foram afetadas pelas condições hidrolíticas, continuaram apresentando a atividade de estimulação da produção de ânion superóxido em macrófagos peritoneais de camundongos, relacionada à molécula total (MELLINGER *et al.*, 2008).

Portanto, apesar de não poder afirmar com certeza quais os compostos que estariam atuando nas atividades biológicas apresentadas pelas frações D10a e 1AERT, ambas apresentaram as atividades anti-inflamatórias e imunoestimulantes descritas para a planta *U. tomentosa*. Entretanto, como as duas frações testadas apresentaram diferenças na composição química, consequentemente apresentaram

também algumas diferenças em determinadas atividades avaliadas. Na maioria dos ensaios biológicos realizados, a fração 1AERT apresentou maior atividade imunoestimulante, enquanto o decocto demonstrou maior capacidade anti-inflamatória, principalmente em relação à produção de NO e modulação do sistema complemento através da via alternativa. Dessa forma, observa-se que a forma de utilização da planta medicinal pode influenciar na atividade biológica encontrada. Além disso, tanto nos decoctos quanto nas cápsulas utilizadas como fitoterápicos, a mistura de moléculas bioativas contribui para a atividade da *U. tomentosa*.

## 7 CONCLUSÕES

- 7.1 Os dois extratos aquosos da planta medicinal *U. tomentosa*, D10a e 1AERT, relacionados às duas principais formas de utilização dessa planta: decocção e cápsulas fitoterápicas, respectivamente, apresentam diferenças quanto a composição química e em relação à atividade biológica exercida sobre macrófagos peritoneais de camundongos e sobre o sistema complemento humano.
- 7.2 Ambos os extratos apresentaram componentes glicídicos, além de compostos fenólicos em sua composição, sendo que a fração obtida através da decocção apresenta maior teor de fenóis quando comparada à fração proveniente da extração aquosa do material comercializado em cápsulas (fitoterápico), que possui maior quantidade de AGPs e de açúcares ácidos.
- 7.3 Nenhum dos extratos aquosos exerceu efeitos citotóxicos em macrófagos peritoneais de camundongos nas concentrações de 0,32-320 µg/ml em 48h de incubação.
- 7.4 Os dois extratos aquosos de *U. tomentosa* podem ser classificados como modificadores da resposta biológica, pois mostram-se capazes de ativar macrófagos peritoneais de camundongos em testes *in vitro*:
- 7.4.1 Somente a fração derivada da cápsula empregada na fitoterapia foi capaz de induzir a produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos em concentrações maiores que 160 µg/ml após 48h de tratamento;
  - 7.4.2 Ambas as frações testadas foram capazes de estimular a fagocitose em macrófagos peritoneais de camundongos em concentrações a partir de 5 µg/ml, apenas em tratamentos com duração de 24h. A atividade apresentada pelo decocto foi dose-dependente e mais eficaz do que a apresentada pela fração relacionada ao fitoterápico;

- 7.4.3 Ambas as frações testadas foram eficientes em inibir a produção de IL-1 $\beta$  e em estimular a produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 por macrófagos peritoneais de camundongos em diferentes intensidades, mas não foram capazes de interferir na produção de IL-10;
- 7.4.4 Ambas as frações testadas foram capazes de modular o sistema complemento, principalmente através da via clássica, onde foram classificadas como ativadoras dessa via. O decoto foi mais eficiente em modular o sistema complemento através dos dois ensaios, com e sem incubação prévia.
- 7.4.5 O decocto demonstrou ainda ser capaz de modular o sistema complemento através da via alternativa, enquanto a fração relacionada ao fitoterápico apresentou apenas uma atividade insignificante.
- 7.5 Os dois extratos aquosos de *U. tomentosa* apresentaram as atividades imunoestimulantes e anti-inflamatórias descritas para essa planta, em diferentes proporções.
- 7.6 A forma de administração da planta medicinal *U. tomentosa*, decocto ou cápsulas fitoterápicas, interfere na atividade biológica.
- 7.7 A mistura de moléculas bioativas encontrada tanto nos decoctos, quanto nas cápsulas utilizadas na fitoterapia, contribui para a atividade da *U. tomentosa*.
- 7.8 Estudos adicionais devem ser realizados para a melhor compreensão das atividades observadas, e para que seja possível atribuir essas atividades aos compostos identificados nos extratos aquosos de *U. tomentosa*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 4 ed. Rio de Janeiro: REVINTER, 2000.

ACTOR, J. K.; DASGUPTA, A. Alternative Herbal Immunomodulators and Drug Interactions. **Journal of Clinical Ligand Assay**, v.26, n.3, p.146-158, 2003.

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). **Journal of Ethnopharmacology**, v.81, p.271-276, 2002.

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

ALBAN, S.; CLASSEN, B.; BRUNNER, G.; BLASCHEK, W. Differentiation between the complement modulating effects of an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* and heparin. **Planta Medica**, v.12, p.1118-1124, 2002.

ALBERSHEIN, P.; NEVINS, D. J., ENGLISH, P. D., KARR, A. A method for the analysis of sugars in plant cell-wall polysaccharides by gas-liquid chromatography. **Carbohydrate Research**, v.5, p.340-345, 1967.

ALDRED, E. M. **Pharmacology: A Handbook for Complementary Healthcare Professionals**. p.147, 2009.

ALLEN-HALL, L.; CANO, P.; ARNASON, J. T.; ROJAS, R.; LOCK, O.; LAFRENIE, R. M. Treatment of THP-1 cells with *Uncaria tomentosa* extracts differentially regulates the expression of IL-1beta and TNF-alfa. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.9, p.312-317, 2007.

ALLEN-HALL, L.; ARNASON, J. T.; CANO, P.; LAFRENIE, R. M. *Uncaria tomentosa* acts as a potent TNF-alfa inhibitor through NF-kappaB. **Journal of Ethnopharmacology**, v.127, n.3, p.685-693, 2010.

ANISZEWSKI, T. **Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role.** Amsterdam: Elsevier Science, p.235, 2007

AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C.; CONTI, C.; STEIN, M. L. Plant metabolites. Structure and in vitro antiviral activity of quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa* and *Guettarda platypoda*. **Journal of Natural Products**, v.52, n.4, p.679-85, 1989.

AQUINO, R.; DE SIMONE, F.; VINCIERI, F. F.; PIZZA, C.; GAĆS-BAITZ, E.. New polyhydroxylated triterpenes from *Uncaria tomentosa*. **Journal of Natural Products**, S.I., v.53, n.3, p.559-564, maio/jun. 1990.

AREND, W. P.; MALYAK, M.; GUTHRIDGE, C. J; GABAY, C. Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. **Annual Review of Immunology**, v.16, p.27-55, 1998.

BABIOR, M. B. The respiratory burst oxidase. **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v.65, p.49-95, 1992.

BAEUERLE, P. A. The inducible transcription activator NF-KB: regulation by distinct protein subunits. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1072, p.63-80, 1991.

BAEUERLE, P. A.; HENKEL, T. Function and activation of NF-KB in the immune system. **Annual Review of Immunology**, v.12, p.141-179, 1994.

BARÃO, S. C.; GIORGIO, S. Imunoestimuladores - potencial para o tratamento de imunodepressões e doenças infecciosas. **Acta Scientiarum**, v.20, n.2, p.235-241, 1998.

BAUGH, J. A.; BUCALA, R. Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease. **Current Opinion in Drug Discovery & Development**, v.4, n.5, p.635-50, 2001.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v.271, p.1424-37, 1996.

BERTOL, G. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. – Rubiaceae. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

BITENCOURT, C. S. Sistema complemento e resposta de produção de anticorpos em ratos hipertireoideos. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

BLOCK, K. I.; MEAD, M. N. Immune system effects of *echinacea*, *ginseng*, and *astragalus*: a review. **Integrative Cancer Therapies**, v.2, n.3, p.247-67, 2003.

BLUMENTHAL, M.; BUSSE, W. R.; GOLDBERG, A.; GRUENWALD, J.; HALL, T.; KLEIN, S.; RIGGINS, C. W.; RISTER, R. S. **The Complete German Commission E Monographs: Therapeutic Guide to Herbal Medicines**. Austin: American Botanical Council, 1998.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; NATHAN, C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **The Journal of Experimental Medicine**, v.174, n.6, p.1549-55, 1991.

BOURGAUD, F.; GRAVOT, A.; MILESI, S.; GONTIER, E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. **Plant Science**, v.161, p.839–851, 2001.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248- 254, 1976.

BRETT, C.; WALDRON, K. **Physiology and biochemistry of plant cell walls**. London: Unwin Hyman, p.194, 1990.

BRUNE B. Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON? **Cell Death & Differentiation**, v.10, p.864-869, 2003.

BUDZINSKI, J. W.; FOSTER, B. C.; VANDENHOEK, S.; ARNASON, J. T. An in vitro evaluation of human cytochrome P450 inhibition by selected commercial herbal extracts and tinctures. **Phytomedicine**, v.7, n.4, p.273-282, 2000.

BURGER, D.; DAYER, J.; PALMER, G.; GABAY, C. Is IL-1 a good therapeutic target in the treatment of arthritis? **Best Practice & Research Clinical Rheumatology**, v.20, n.5, p. 879-896, 2006.

BUSSE, R.; MULSCH, A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. **FEBS Letter**, v.275, p.87-90, 1990.

CABIESES, F. **The saga of cat's claw**. Lima: Via Lactea Editores, 1994.

CAMPBELL, D.; WHITE, J. R. **Polymer Characterization: Physical Techniques**. London: Chapman&Hall, p.50, 1989.

CARPITA, N. C.; GIBEAUT, D. M. Structural models of primary cells walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during the growth. **The Plant Journal**, v.3, n.1, p.1-30, 1993.

CASTEDO, J. P. **Cat's Claw: *Uncaria tomentosa***. Disponível em: <<http://www.ccbolgroup.com/hierbas3E.html#CATS>>. Acesso em: 22 fev. 2010.

CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B.; CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.17, n.6, p.417-423, 2002.

CHATURVEDI, U. C.; GULATI, L.; MATHUR, A. Inhibition of E-rosette formation and phagocytosis by human blood leucocytes after treatment with the dengue virus-induced cytotoxic factor. **Immunology**, v.45, n.4, p.679-685, 1982.

CHATURVEDI, U. C.; MATHUR, A.; TANDON, P.; NATU, S. M.; RAJ-VANSHI, S.; TANDON, H. O. Variable effect on peripheral blood leucocytes during JE virus infection of man. **Clinical & Experimental Immunology**, v.38, p.492-498, 1979.

CHOI, E. J.; KIM, C. H.; PARK J. K. Synthesis and characterization of starch-g-polycaprolactone copolymer. **Macromolecules**, v.32, p.7402-7408, 1999.

CHRASIL, J. Improved colorimetric determination of amylose in starches of flowers. **Carbohydrate Research**, v. 159, p.154-158, 1987.

CLARK, S. C.; KAMEN, R. The human hematopoietic-stimulating factors. **Science**, v.236, p.1229-1237, 1987.

CLARKE, A. E.; ANDERSON, R. L.; STONE, B. A. Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins. **Phytochemistry**, v.18, p.521-540, 1979.

CLASSEN, B.; BLASCHEK, W. An arabinogalactan-protein from cell culture of *Malva sylvestris*. **Planta Medica**, v. 68, n.3, p. 232-236, 2002.

CLASSEN, B.; THUDE, S.; BLASCHEK, W.; WACK, M. BODINET, C. Immunomodulatory effects of arabinogalactan-proteins from *Baptisia* and *Echinacea*. **Phytomedicine**, v.13, p.688-694, 2006.

CLASSEN, B.; WITTHOHN, K.; BLASCHEK, W. Characterization of an arabinogalactan-protein isolated from pressed juice of *Echinacea purpurea* by precipitation with the [beta]-glucosyl Yariv reagent. **Carbohydrate Research**, v.327, p.497-504, 2000.

CLEMENT-KRUZEL, S., HWANG, S. A.; KRUZEL, M. C.; DASGUPTA, A.; ACTOR, J. K. Immune modulation of macrophage pro-inflammatory response by goldenseal and *Astragalus* extracts. **Journal of Medicinal Food**, v.11, n.3, p.493-498, 2008.

COLOTTA, F.; DOWER, S. K.; SIMS, J. E.; MANTOVANI, A. The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. **Immunology Today**, v.15, n.12, p.562-566, 1994.

COMCIÊNCIA. Campinas: SPBC / Labjor, 1999. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/fito/fito3.htm>>. Acesso em: 15/03/2010.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed. New York: The New York Botanical Garden Press, p.555, 1988 (*in* POLLITO, 2004).

DAFFE, M.; MCNEIL, M.; BRENNAN, P. J. Major structural features of the cell wall arabinogalactans of *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, and *Nocardia* spp. **Carbohydrate Research**, v.249, p.383-98, 1993.

DAVILA, A. M.; STEINDEL, M.; GRISARD, E. C. Tropical diseases, pathogens and vectors biodiversity in developing countries: need for development of genomics and bioinformatics approaches. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1026, p.41-46, 2004.

DAYER, J. M. Regulation of IL-1/TNF, their natural inhibitors, and other cytokines in chronic inflammation. **Immunologist**, v.5, p.192-196, 1997.

DE WAAL MALEFYT, R. D.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C. G.; DEVRIES, J. E. Interleukin-10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.174, p.1209-1220, 1991.

DIALLO, D.; PAULSEN, B. S.LILJEBACK, T. H. A.; MICHAELSEN, T. E. Polysaccharides from the roots of *Entada Africana Guill. et Perr.*, Mimosaceae, with complement fixing activity. **Journal of ethnopharmacology**, v.74, p.159-171, 2001.

DINARELLO, C. A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v.87, n.6, p.2095-147, 1996.

DUBOIS, M., GILLES, K. A., HAMILTON, J. K., REBERS, P. A., SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Analytical Biochemistry**, v. 28, p. 350-356,1956.

DUTTA, R.; DAS, N. Immunomodulation of serum complement (C3) and macrophages by synthetic pyrethroid fenvalerate: In vitro study. **Toxicology**, v.285, p.126-132, 2011.

EBERLIN, S.; SANTOS, L. M. B.; QUEIROZ, M. L. *Uncaria tomentosa* extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. **International Immunopharmacology**, v.5, p. 1235-1246, 2005.

EDENS, R. E.; LINHARDT, R. J.; WEILER, J. M. Heparin is not just an anticoagulant anymore: Six and one half decades of studies on the ability of heparin to regulate complement activity. **Complement Profiles**, v.1, p.96-120, 1993.

ELE-EKOUNA, J.; PAU-ROBLOT C., COURTOIS, B.; COURTOIS, J. Chemical characterization of pectin from green tea (*Camellia sinensis*). **Carbohydrate Polymers**, v.83, n.3, p.1232-1239, 2011.

FAZIO, A. L.; BALLÉN, D.; CESARI, I. M.; ABAD, M. J.; ARSENAK, M.; TAYLOR, P. An ethanolic extract of *Uncaria tomentosa* reduces inflammation and B16-BL6 melanoma growth in C57BL/6 mice. **Boletín Americano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v.7, n.4, p.217-224, 2008.

FARNSWORTH, N. R. **NAPRALERT database**. Chicago: University of Illinois at Chicago, 2002.

FEARON, D.T Complement as a mediator of inflammation. **Clinics in Immunology and Allergy**, v.1, n.2, 1981.

FILIPPOV, M. P. Practical infrared spectroscopy of pectic substances. **Food Hydrocolloids**, v.6, n.1, p.115-142, 1992.

FILIZETTI-COZZI, T. M. C. C.; CARPITA, N. C. Measurement of uronic acids without interference from neutral sugars. **Analytical Biochemistry**, v.197, p.157-160, 1991.

FINCHER, G. B.; STONE, B. A.; CLARKE, A. E. Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis, and function. **Annual Review of Plant Physiology**, v.34, p.47-70, 1983.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; OGARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **Journal of Immunology**, v.147, p.3815-3822, 1991.

FOX, J. D.; ROBYT, J. F. Miniaturization of three carbohydrate analysis using a microsample plate reader. **Analytical Biochemistry**, v.195, n.1, p.93-96, 1991.

FU, G. M.; PANG, H.; WONG, Y. H. Naturally occurring phenylethanoid glycosides: potential leads for new therapeutics. **Current Medicinal Chemistry**, v.15, p.2592-2613, 2008.

GANE, A. M.; CRAIK, D.; MUNRO, S. L. A.; HOWLETT, G. J.; CLARKE, A. E.; BACIC, A. Structural analysis of the carbohydrate moiety of arabinogalactan-proteins from stigmas and styles of *Nicotiana glauca*. **Carbohydrate Research**, v.277, p.67-85, 1995.

GANZERA, M.; MUHAMMAD, I.; KHAN, R. A.; KHAN, I. A. Improved method for the determination of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa* by high performance liquid chromatography. **Planta Medica**, v.67, n.5, p.447-450, 2001.

GAO, Q. P.; KIYOHARA, H.; CYONG, J.C.; YAMADA, H. Characterisation of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng*. **Carbohydrate Research**, v.181, p.175, 1988.

GAO, Q. P.; KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Further structural studies of anti-complementary acidic heteroglycans from the leaves of *Panax ginseng*. **Carbohydrate Research**, v.196, p.111, 1990.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Kuby Immunology**. 4ed. New York: W. H. Freeman, 2000.

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

GORIN, P. A. J.; MAZUREK, M. Further studies on the assignment of signals in C-13 magnetic resonance spectra of aldoses and derived methyl glycosides **Canadian Journal of Chemistry**, vol. 53, p.1212-1223, 1975.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v.126, n.1, p.131-138, 1982.

GUIDES, Herbal. Cat's claw. Disponível em:  
<<http://www.herbalguides.com/guides/cats-claw>>. Acesso em: 22 fev. 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals reactive species and toxicology**. New York: Oxford University Press, 1999.

HANSEL, R.; KELLER, K.; RIMPLER, H.; SCHNEIDER, G. **Hagers handbook of pharmaceutical practice**. 5 ed. Berlin: Springer Verlag, v.4, p.1040-1062, 1992.

HAWRYLOWICZ, C. M.; LEE, T. H. **Asthma**: basic mechanisms and clinical management. 3 ed. Mishawaka: Bookseller & Payment, 1998.

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

HERBS, Psychoactive. **Cat's Claw: *Uncaria tomentosa*** Disponível em:  
<<http://psychoativeherbs.com/catalog/index.php?cPath=160>>. Acesso em: 22 fev. 2010.

HERNDON, C. N.; UITERLOO, M.; UREMARU, A.; PLOTKIN, M. K.; EMANUELS-SMITH, G.; JITAN, J. Disease concepts and treatment by tribal healers of an Amazonian forest culture. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.5, n.27, 2009.

HO, C. H. L.; CACACE, J. E.; MAZZA, G. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. **Food Science Technology**, v.40, n.9, p.1637–1647, 2007.

HOLCBERG, G.; AMASH, A.; SAPIR, O.; SHEINER, E.; LEVY, S.; MYATT, L.; HULEIHEL, M. Perfusion with Lipopolysaccharide Differently Affects the Secretion of Interleukin-1 Beta and Interleukin-1 Receptor Antagonist by Term and Preterm Human Placentae. **Placenta**, v.29, n. 7, p.593-601, 2008.

HOPKINS, S. J. Cytokines and eicosanoids in rheumatic diseases. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.49, p.207-211, 1990.

HOPKINS, S. J. The pathophysiological role of cytokines. **Legal Medicine**, v.5, p.S45–S57, 2003.

HOUGHTON, P. J.; RAMAN, A. **Laboratory Handbook for the fractionation of natural extracts**. Londres: Chapman & Hall, 1998.

HUBERT; M. T.; MARTHA, J. M.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation-reduction reactions in innate immunity. **Free Radical Biology Medicine**, v.36, n.2, p.233-247, 2004.

ÍNDICE terapêutico fitoterápico: **ITF**. 1 ed. Petrópolis, RJ: EPUB, 2008.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 5 ed. p.8:31-8:34, 8:44, 8:45, 9:18, 2003.

JERMYN, M. A. Isolation from the flowers of *Dryandra praemorsa* of a flavonol glycoside that reacts with beta-lectins [ornamental plants]. **Australian Journal of Plant Physiology**, v.5, p.697-705, 1978.

JONG, W.; MELNYK, M; LOZANO, L. A.; ROSALES, M.; GARCIA, M. **Uña de gato: fate and future of Peruvian forest resource**. Jakarta, Indonesia: CIFOR, 1999.

JORNAL da ciência. Disponível em:

<<http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=26802>>. Acesso em: Mar. 2010.

JOUBERT, E. Effect of batch extraction conditions on extraction of polyphenols from rooibos tea (*Aspalathus linearis*). **International Journal of Food Science and Technology**, v.25, n.3, p.339–343, 1990.

KACEM, R.; DE SOUSA-D'AURIA, C.; TROPIS, M.; CHAMI, M.; GOUNON, P.; LEBLON, G.; HOUSSIN, C.; DAFFÉ, M. Importance of mycoloyltransferases on the physiology of *Corynebacterium glutamicum*. **Microbiology**, v.150, p.73- 84, 2004.

KACURÁKOVÁ, M.; SMITH, A.C.; GIDLEY, M.J.; WILSON, R.H. Molecular interactions in bacterial cellulose composites studied by 1D FT-IR and dynamic 2D FT-IR spectroscopy. **Carbohydrate Research**, v.337, p.1147-1153, 2002.

KACURÁKOVÁ, M.; WILSON, R. H. Developments in mid-infrared FT-IR spectroscopy of selected carbohydrates. **Carbohydrate Polymers**, v.44, p.291–303, 2001.

KEPLINGER, K. Cytostatic, crontceptive and antiinflammatory agents from *Uncaria tomentosa* (Willd) DC. **Patent Cooperation Treaty, International Application**, WO 8201,130, 1982.

KIM, M. J.; RYU, G. R.; KANG, J. H.; SIM, S. S.; MIN, D. S.; RHIE, D. J.; YOON, S. H.; HAHN, S. J.; JEONG, I. K.; HONG, K. J.; KIM, M. S., JO, Y. H. Inhibitory effects of epicatechin on interleukin-1b-induced inducible nitric oxide synthase expression in RINm5F cells and rat pancreatic islets by down-regulation of NF-kB activation. **Biochemical Pharmacology**, v.68, p.1775-1785, 2004.

KIYOHARA, H.; CYONG, J. C.; YAMADA, H. Structure and anti-complementary activity of pectic polysaccharides isolated from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Carbohydrate Research**, v.182, n.2, p.259-275, 1988.

KIYOHARA, H.; YAMADA, H. Structure of an anti-complementary arabinogalactan from the root of *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Carbohydrate Research**, v.31, n.193, p.173-192, 1989.

KIYOHARA, H.; CYONG, J. C.; YAMADA, H. Relationship between structure and activity of the "ramified" region in anti-complementary pectic polysaccharides from *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Carbohydrate Research**, v.193, p.201-214, 1989.

KLEIN, J. **Immunology**. Boston: Blackweel scientific publication, p.188-226, 1990.

KONDERA-ANASZ, K.; SIKORA, J.; MIELCZAREK-PALACZ, A.; JON´CA, M. Concentrations of interleukin (IL)-1a, IL-1 soluble receptor type II (IL-1 sRII) and IL-1 receptor antagonist (IL-1 Ra) in the peritoneal fluid and serum of infertile women with endometriosis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v.123, p.198-203, 2005.

KRAUS, J.; FRANZ, G. Immunomodulating effects of polysaccharides from medicinal plants. **Advances in Experimental Medicinal and Biology**, v.319, p.299–308, 1992.

KULKARNI, S. G.; VIJAYANAND, P. Effect of extraction conditions on the quality characteristics of pectin from passion fruit peel (*Passiflora edulis f. flavicarpa* L.). **Food Science and Technology**, v.43, n.7, p.1026-1031, 2010.

KUNDIG, T. M.; SCHORLE, H.; BACHMANN, M. F.; HENGARTNER, H.; ZINKERNAGEL, R. M.; HORAK, I. Immune responses in interleukin-2-deficient mice. **Science**, v.262, p.1059-1061, 1993.

LAMM, S.; SHENG, Y.; PERO, R. W. Persistent response to pneumococcal vaccine in individuals supplemented with a novel water soluble extract of *Uncaria tomentosa*, C-Med-100R. **Phytochemistry**, v.8, p.267–282, 2001.

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

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

LAUS, G. Advances in Chhemestry and Bioactivity of the Genus *Uncaria*. **Phytotherapy Research**, v.18, p.259-274, 2004.

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

LIM, Y. Y.; MURTIJAYA, J. Antioxidant properties of *Phyllanthus amarus* extracts as affected by different drying methods. **Food Science and Technology**, v.40, n.9, p.1664–1669, 2007.

LORENZI, H.; ABREU, MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2 ed. São Paulo: Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2008.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v.15, p.323-50, 1997.

MAJEWSKA-SAWKA, A.; NOTHNAGEL, E. A. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. **Plant Physiology**, v.122, p.3-9, 2000.

MANRIQUE, G. D.; LAJOLO, F. M. FT-IR spectroscopy as a tool for measuring degree of methyl esterification in pectins isolated from ripening papaya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v.25, p.99–107, 2002.

MAO, T. K.; POWELL, J.; WATER, J. V.; KEEN, C. L.; SCHMITZ, H. H.; HAMMERSTONE, J. F.; GERSHWIN, M. E. The effect of cocoa procyanidins on the transcription and secretion of interleukin 1 $\beta$  in peripheral blood mononuclear cells. **Life Sciences**, v.66, n.15, p. 1377-1386, 2000.

MARQUES, O. C. P. Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas orais de *Uncaria tomentosa* com actividade antioxidante. Trabalho de Dissertação de Mestrado, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.

MARRY, M.; MCCANN, M.; KOLPAK, F.; WHITE, A. R.; STACEY, N.; ROBERTS, K. Extraction of pectic polysaccharides from sugarbeet cell walls. **Journal of the Sciences of Food and Agriculture**, v.80, p.17–18, 2000.

MATSUDA, T.; SUEMATSU, S.; KAWANO, M.; YOSHIZAKI, K.; TANG, B.; TANABE, O.; NAKAJIMA, T.; AKIRA, S.; HIRANO, T.; KISHIMOTO, T. IL-6/BSF2 in normal and abnormal regulation of immune responses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.557, p.466-476, discussão p.476-477, 1989.

MAY, M. J.; GHOSH, S. Signal transduction through NF-kB. **Immunology Today**, v.19, p.80-88, 1998.

MEAGER, A. Measurement of cytokines by bioassays: theory and application. **Methods**, v.38, p.237–252, 2006.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A. J. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature**, v.388, p.394-397, 1997.

MELLINGER, C. G.; CIPRIANI, T. R.; NOLETO, G. R.; CARBONERO, E. R.; OLIVEIRA, M. B. M.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Chemical and immunological modifications of an arabinogalactan present in tea preparations of *Phyllanthus niruri* after treatment with gastric fluid. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.43, p.115-120, 2008.

MENESTRINA, J. M.; IACOMINI, M.; JONES, C. GORIN, P. A. Similarity of monosaccharide, oligosaccharide and polysaccharide structures in gum exudates of *Anacardium occidentale*. **Phytochemistry**, v.47, n.5, p.715-721, 1998.

MENESTRINA, J. M.; CARNEIRO LEÃO, A. M. A.; STUELP, P. M.; MACHADO, M. J.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. Partial characterization and anti-tumoral activity of the polysaccharide from cashew gum. In: SBBq, 25., 1996, Caxambu. **Anais da XXIXª Reunião Anual da SBBq**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 1996. p. 116.

MESSIAS, I. T.; REIS, A.; ALMEIDA, P. T.; MAUFF, G. Genetic variability of the MHC class III complement proteins C2, BF, C4A and C4B in southern Brazil. **Experimental and Clinical Immunogenetics**, v.11, n.4, p192-196, 1994.

MICHAELSEN, T. E.; GILJE, A.; SAMUELSEN, A. B.; HOGASEN, K.; PAUSEL, B. S. Interaction between human complement and a pectin type polysaccharide fraction, PMII, from the leaves of *Plantago major* L. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.52, p.483-490, 2000.

MICHEL, T.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Molecular biological analysis of nitric oxide synthase. **Methods in Nitric Oxide Research**, p.161-75, 1995.

MOLLNES, T. E.; KIRSCHFINK, M. Strategies of therapeutic complement inhibition. **Molecular Immunology**, v.43, p.107-121, 2006.

MONSOOR, M. A.; KALAPATHY, U.; PROCTOR, A. Determination of polygalacturonic acid content in pectin extracts by diffuse reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. **Food Chemistry**, v.74, p.233-238, 2001.

MOREIRA, M. R.; KANASHIRO, A., KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C. M.; AZZOLINI, A. E. C. S.; CURTI, C.; OLIVEIRA, C. A.; T.-DO AMARAL, A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, v.81, n.4, p.317-326, 2007.

NOTHNAGEL, B. A.; BACIC, A.; CLARKE, A. E. **Cell and Developmental Biology of Arabinogalactan-Proteins**. Netherlands/New York: Kluwer Academic Publishers, p.11–23, 2000.

NOTHNAGEL, E. A. Proteoglycans and related components in plant cells. **International Review of Cytology**, v.174, p.195-291, 1997.

NUTRITION, Raintree. **Cat's claw pictures**. Disponível em: <<http://www.rain-tree.com/Plant-Images/cats-claw-pic.htm>>. Acesso em: 22 fev. 2010.

ODENTHAL, K. P.; SCHWARZ, T.; WITTHOHN, K.; LOOS, M. **Bioassay-guided identification of immunomodulating constituents in Echinacin®**. Zürich: International Congress and 48th Annual Meeting of the society for Medicinal Plant Research, p.4B/16, 2000.

OKUMURA L. **Arabinogalactanas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

ORTIZ-LAZARENO, P. C.; HERNANDEZ-FLORES, G.; DOMINGUEZ-RODRIGUEZ, J. R.; LERMA-DIAZ, J. M.; JAVE-SUAREZ, L. F.; AGUILAR-LEMARROY, A.; GOMEZ-CONTRERAS, P. C.; SCOTT-ALGARA, D.; BRAVO-CUELLAR, A. MG132 proteasome inhibitor modulates proinflammatory cytokines production and expression of their receptors in U937 cells: involvement of nuclear factor-kappaB and activator protein-1. **Immunology**, v.124, p.534-541, 2008.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**. 4.ed. London: Churchill Livingstone, p.430, 1973.

PAULSEN, B. S. Plant Polysaccharides with Immunostimulatory Activities. **Current Organic Chemistry**, v.5, n.9, p.939-950, 2001.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como Cultivar Células**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PETERS, W. S.; HAGEMANN, W.; THOMOS, D. A. What makes plants different? Principles of extracellular matrix function in soft plant tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology (Part A)**, v.125, p.151-167, 2000.

PHILLIPS, H. J. Dye exclusion test for cell viability. In: KRUSE, Jr. P. F.; PATTERSON, Jr. M. K. (Eds.). **Tissue culture: methods and application**. New York: Academic Press, p.406-408, 1973.

PIPE, R. K.; COLES, J. A.; FARLEY, S. R. Assays for Measuring Immune Response in the Mussel *Mytilus Edulis*. **Fish Immunology**, n.4, p.93-100, 1995.

POZZOLINI, M.; SCARFI, S.; BENATTI, H.; GIOVINE, M. Interference in MTT cell viability assay in activated macrophage cell line. **Analytical Biochemistry**, v.313, p.338-341, 2003.

QU, H.; RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Recent developments in low molecular weight complement inhibitors. **Molecular Immunology**, v.47, p.185-195, 2009.

REILLEY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, R. M.; SVESSON, C. K. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. **Biochemical Pharmacology**, v.55, p.803-810, 1998.

REINHARD, K. H. *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC – cat's claw, uña de gato or Katzenkralle, **Zeitschrift für Phytotherapie**, v.18, p.112-121, 1997.

REVILLA, J. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis**. 2 ed. Manaus: SEBRAE/AM, 2000.

RICKLIN, D.; LAMBRIS, J. D. Complement-targeted therapeutics. **Nature Biotechnology**, v.25, p.1265–1275, 2007.

RIZZI, R.; RE, F.; BIANCHI, A.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; BIANCHI, L.; STIVALA, L. A. Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.38, n.1, p.63-77, 1993.

ROSARIO, M. M. T. **Caracterização de xiloglucanas nativas e modificadas e efeitos sobre vias de ativação em macrófagos peritoniais de camundongos**. Trabalho de Tese de Doutorado em Ciências Bioquímicas – Setor de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

RUMYANTSEVA, N. Y. Arabinogalactan Proteins: Involvement in Plant Growth and Morphogenesis. **Biochemistry**, v.70, n.10, p.1073-1085, 2005.

SAMUELSEN, A. B. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. – a review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.71, p.1-21, 2000.

SAMUELSEN, A. B.; DJAHROMI, J. M.; PAULSEN, B.S.; WOLD, J. K. KNUTSEN, S. H. Structural features and anti-complementary activity of some heteroxylyan polysaccharide fractions from the seeds of *Plantago major* L. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.133-143, 1999.

SAMUELSEN, A. B.; WESTERENG, B.; YOUSIF, O.; HOLTEKJØLEN, A. K.; MICHAELSEN, T. E.; KNUTSEN, S.H. Structural features and complement-fixing activity of pectin from three *Brassica oleracea* varieties: white cabbage, kale, and red kale. **Biomacromolecules**, v.8, n.2, p.644-649, 2007.

SANDOVAL, M.; CHARBONNET, R.; OKUHAMA, N. N.; ROBERTS, J.; KRENOVA, Z.; TRENTACOSTI, A. M.; MILLER, M. J. S. Cat's claw inhibits TNF $\alpha$  production and scavenges free radicals: role in cytoprotection. **Free Radical Biology and Medicine**, v.1, p.71–78, 2000.

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. Antiinflammatory actions of cat's claw: the role of NF-kappaB. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.12, p.1279–128, 1998.

ŠANDULA, J.; KOGAN, G.; KACURÁKOVÁ, M.; MACHOVA, E. Microbial (1→3)- $\beta$ -D-glucans, their preparation, physico-chemical characterization and immunomodulatory activity. **Carbohydrate Polymers**, v.38, p.247-253, 1999.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M. M.; ALBÁN, J.; GALÁN DE MERA, A.; VICENTE ORELLANA, J. A.; POZUELO, J. M. Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v.57, p.183–187, 1997.

SCHEPETKIN, I. A.; FAULKNER, C. L.; NELSON-OVERTON, L. K.; WILEY, J. A.; QUINN, M. T. Macrophage immunomodulatory activity of polysaccharides isolated from *Juniperus scopolorum*. **International Immunopharmacology**, v.5, n.13-14, p.1783-1799, 2005.

SCHEPETKIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v.6, n.3, p.317-333, 2006.

SCHIRATO, G. V.; MONTEIRO, F. M. F.; SILVA, F. O.; FILHO, J. L. L.; LEÃO, A. M. A. C.; PORTO, A. L. F. O polissacarídeo do *Anacardium occidentale* L. na fase inflamatória do processo cicatricial de lesões cutâneas. **Ciência Rural**, v.36, n.1, p.149-154.

SCHULZ, H.; BARANSKA, M. Identification and quantification of valuable plant substances by IR and Raman spectroscopy. **Vibrational Spectroscopy**, v.43, p.13-25, 2007.

SEIFERT, G. J.; ROBERTS, K. The Biology of Arabinogalactan Proteins. **Annual Review of Plant Biology**. v.58, n.13, p.7-61, 2007.

SERPE, M. D.; NOTHNAGEL, E. A. Arabinogalactan-proteins in the multiple domains of the plant cell surface. **Advances in Botanical Research**, v.30, p.207-289, 1999.

SERPE, M. D.; NOTHNAGEL, E. A. Heterogeneity of arabinogalactan-proteins on the plasma membrane of Rose cells. **Plant Physiology**, v.112, p.1261-1271, 1996.

SHALABY, M. R.; WAAGE, A.; AARDEN, L.; ESPEVIK, T. Endotoxin, tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin 1 induce interleukin 6 production in vivo. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v.53, p.488-498, 1989.

SHANLEY, T. P.; WARNER, R. L.; WARD, P. A. The role of cytokines and adhesion molecules in the development of inflammatory injury. **Molecular Medicine Today**, v.1, p.40-45, 1995.

SHENG, Y.; AKESSON, C.; HOLMGREN, K.; BRYNGELSSON, C.; GIAMAPA, V.; PERO, R. W. An active ingredient of Cat's Claw water extracts identification and efficacy of quinic acid. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.577-584, 2005.

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

SHENG, Y.; PERO, R. W.; AMIRI, A.; BRYNGELSSON, C. Induction of apoptosis and inhibition of proliferation in human tumor cells treated with extracts of *Uncaria tomentosa*. **Anticancer Research**, v.18, p.3363-3366, 1998.

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

SHIN, K. S.; KWON, K. S.; YANG, H. C. Screening and characteristics of anti-complementary polysaccharides from Chinese medicinal herbs. **Han'guk Nonghwa Hakhoechi**, v.35, p.42-50, 1992.

SHOWALTER, A. M. Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.58, p.1399-1417, 2001.

SIMS, J. E.; GAYLE, M. A.; SLACK, J. L.; ALDERSON, M. R.; BIRD, T. A.; GIRI, J. G.; COLLOTA, F.; FE, F.; MANTOVANI, A.; SHANEBECK, K.; GRABSTEIN, K. H.; DOWER, S. K. Interleukin 1 signalling occurs exclusively via the type I receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.90, n.15, p.6155-6159, 1993.

SINGH, N.; SINGH, J.; KAUR, L.; SODHI, N. S.; GILL, B. S. Morphological, thermal and rheological properties of starches from different botanical sources. **Food Chemistry**, v.81, n.2, p.219–231, 2003.

SOUZA, L. M.; CIPRIANI, T. R.; IACOMINI, M.; GORIN, P. A. J. SASSAKI, G. L. HPLC/ESI-MS and NMR analysis of flavonoids and tannins in bioactive extract from leaves of *Maytenus ilicifolia*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, p.59-67, 2008.

SPELMAN, K.; BURNES, J.; NICHOLS, D.; WINTERS, N.; OTTERSBERG, S.; TENBORG, M. Modulation of cytokine expression by traditional medicines: a review of herbal immunomodulators. **Alternative Medicine Review**, v.11, p.128–50, 2006.

STEINBERG, P. N. Una de Gato: una hierba prodigiosa de la selva humeda Peruana. [Cat's Claw: an herb from the Peruvian Amazon]. **Sidahora**, p. 35-36, 1995.

STEVAN, F. R., MENESTRINA, J. M., ABUD, A. P. R., VEIGA, S., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M. B. M., Biological activities of polysaccharides from cashew gum and palm gum against HeLa cells. In: SBBq, 30., 2001, Caxambu. **Anais da XXIX<sup>a</sup> Reunião Anual da SBBq**, 2001.

STEVAN, F. R., MENESTRINA, J. M., VEIGA, S., IACOMINI, M., OLIVEIRA, M. B. M., Biological activities of polysaccharides from gum *A. occidentale* exsudate against Hela cells. In: SBBq, 29., 2000, Caxambu. **Anais da XXIXª Reunião Anual da SBBq**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2000. P. 111.

STOIKA, R. S.; LUTSIK, M. D.; BARSKA, M. L.; TSYRULNYK, A. A.; KASHCHAK, N. I. In vitro studies of activation of phagocytic cells by bioactive peptides. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v53, n.4, p.675-688, 2002.

SUFFREDINI, I. B; SADER, H. S; GONÇALVES, A. G; REIS, A. O; GALES, A. C; VARELLA, A. D; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, n.3, p.379-384, 2004.

SVENDSEN, C.; SPURGEON, D.J.; HANKARD, P. K.; WEEKS, J. M. A review of lysosomal membrane stability measured by neutral red retention: is it a workable earthworm biomarker? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.57, p.20-29, 2004.

SYMONS, J. A.; YOUNG, P. R.; DUFF, G. W. Soluble type II interleukin 1 (IL-1) receptor binds and blocks processing of IL-1 beta precursor and loses affinity for IL-1 receptor antagonist. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.92, p.1714-1718, 1995.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4 ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2006.

TAKEUCHI, O.; HOSHINO, K.; KAWAI, T.; SANJO, H.; TAKADA, H.; OGAWA, T.; TAKEDA K.; AKIRA, S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. **Immunity**, v.11, p.443-451, 1999.

TAN, H.; LI, Z.; TAN, B. Starch noodles: History, classification, materials, processing, structure, nutrition, quality evaluating and improving. **Food Research International**, v.42, n.5-6, p.551-576, 2009.

TAYLOR, L. Technical data report for Cat's Claw (*Uncaria tomentosa*). **Sage Press Inc.**, p.38, 2002.

TEPPNER, H.; KEPLINGER, K.; WETSCHING, W. Karyosytematics of *Uncaria tomentosa* and *U. guianensis* (Rubiaceae – Cinchonaceae). **Phyton**, Horn, Austria, v.24, p.125–134, 1984.

THIEL, S.; VORUP-JENSEN, T.; STOVER, C.M.; SCHWAEBLE, W.; LAURSEN, S.B.; POULSEN, KK.; WILLIS, A. C.; EGGLETON, P.; HANSEN, S.; HOLMSKOV, U.; REID, K. B.; JENSENIUS, J. C. A second serine protease-associated with mannan-binding lectin that activates complement. **Nature**, v.386, p.506-10, 1997.

THUDE, S.; CLASSEN, B.; BLASCHEK, W.; BARZ, D.; THUDE, H. Binding studies an arabinogalactan-protein from *Echinacea purpurea* to leucocytes. **Phytomedicine**, v. 13, p. 425-427, 2006.

THURMAN, J. M.; HOLERS, V.M. Alternative complement pathway in human disease. **The Journal of Immunology**, v.176, p.1305-1310, 2006.

TRAENKNER, B. M.; WILK, S.; BAEUERLE, P. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-KB and stabilizes a newly phosphorylated form of IKB-a that is still bound to NF-KB. **The EMBO Journal**, v.13, p.5433-5441, 1994.

VAN HOLST, G. J.; CLARKE, A. E. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. **Analytical Biochemistry**, v.148, n.2, p.446-50, 1985.

VANDEKERCKHOVE, F.; OPDENAKKER, G.; VANRANST, M.; LENAERTS, J. P.; PUT, W.; BILLIAU, A.; VAN DAMME, J. Bradykinin induces interleukin-6 and synergizes with interleukin-1. **Lymphokine Cytokine Research**, v.10, p.285-289, 1991.

VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. Rio de Janeiro: Ed. Campus. p.141-156, 1981.

XIE, G.; SCHEPETKIN I. A.; QUINN M. T. Immunomodulatory activity of acidic polysaccharides isolated from *Tanacetum vulgare*. L. **International Immunopharmacology**, v.7, n.13, p.1639-1650, 2007.

WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B.; JURCIC, K. The alkaloids of *Uncaria tomentosa* and their phagocytosis-stimulating action. **Planta Medica**, v.5, p.419–423, 1985.

WAGNER, H.; STUPPNER, H.; SCHAFER, W.; ZANK, M. A. Immunologically active polysaccharides of *Echinacea purpurea* cell cultures. **Phytochemistry**, v.27, p.119-126, 1988.

**WHO**: Monographs on selected medicinal plants. Geneva, World Health Organization, v.3, 2007.

WOLKERS, W. F.; OLIVER, A. E; TABLIN, F.; CROWE, J. H. A Fourier-transform infrared spectroscopy study of sugar glasses. **Carbohydrate Research**, v.339, p.1077-1085, 2004.

WU, Y.; CUI, S. W.; TANG, J.; GU, X. Optimization of extraction process of crude polysaccharides from boat-fruited sterculia seeds by response surface methodology. **Food Chemistry**, v.105, n.4, p.1599–1605, 2007.

YAMADA, H. Pectic polysaccharides from Chinese herbs: structure and biological activity. **Carbohydrate Polymers**, v.25, p.269-276, 1994.

YAMADA, H.; KIYOHARA, H. **Immunomodulatory Agents from Plants**. H. Wagner. Basel: Birkhäuser Verlag, p.161, 1999.

YAMADA, H.; KIYOHARA, H.; CYONG, J. C.; OTSUKA, Y. Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba*-IV. Characterization of an anti-complementary arabingalactan from the roots of *Angelica acutiloba* Kitagawa. **Molecular Immunology**, v.22, p.295-304, 1985(a).

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J. C.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; GONDA, R. Relationship between chemical structure and activating potencies of complement by an acidic polysaccharide, *Plantago*-mucilage A, from the seed of *Plantago asiatica*. **Carbohydrate Research**, v.156, p.137-145, 1986.

YAMADA, H.; NAGAI, T.; CYONG, J.; OTSUKA, Y.; TOMODA, M.; SHIMIZU, N.; SHIMADA, K.. Relationship between chemical structure and anti-complementary activity of plant polysaccharides. **Carbohydrate Research**, v.144, p.101–111, 1985(b).

YARIV, J.; RAPPORT, M. M.; GRAF, L. The interaction of glycosides and saccharides with antibody to the corresponding phenylazo glycosides. **Biochemical Journal**, v.85, p.383, 1962.

YARIV, L.; LIS, H.; KATCHALSKI, E. Precipitation of arabic acid and some seed polysaccharides by glycosylphenylazo dyes. **Biochemical Journal**, v.105, p.1-2, 1967.

YAZAKI, K. ABC Transporters involved in the transport of plant secondary metabolites. **FEBS Letters**, v.580, n.4, p.1183-1191, 2006.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; CECINEL FILHO, V. Pharmaceutics and phytotherapics: the need for development of the industry of phytopharmaceutics and phytotherapics in Brazil. **Químioica Nova**, vol.24, n.1, 2001.

ZHANG, J.; WARREN, M. A.; SHOEMAKER, S. F.; IP, M. M. NFkappaB1/p50 is not required for tumor necrosis factor-stimulated growth of primary mammary epithelial cells: implications for NFkappaB2/p52 and RelB. **Endocrinology**, v.148, p.268-278, 2007.

ZHANG, T.; CHEN, D. Anticomplementary principles of a Chinese multiherb remedy for the treatment and prevention of SARS. **Journal of Ethnopharmacology**, v.117, p.351-361, 2008.

ZHOU, X. L.; SUN, P. N.; BUCHELI, P.; HUANG, T. H.; WANG, D. FT-IR methodology for quality control of arabinogalactan protein (AGP) extracted from green tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.57, n.12, p.5121-5128, 2009.