

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Obtenção de produtos a partir das cascas de *Uncaria tomentosa*
(Willdernow ex Roemer & Schultes) D.C: otimização da extração e secagem
em *spray dryer* utilizando planejamentos experimentais e avaliação da
atividade anti-inflamatória**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Rayssa A. Silva Paiva Reis

Orientador: Prof. Dr. Luís Alexandre Pedro de Freitas

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas em 06/12/2017. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2017

RESUMO

Paiva Reis, Rayssa Aparecida da Silva. **Obtenção de produtos a partir das cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) D.C: otimização da extração, e secagem em *spray dryer* utilizando planejamentos experimentais e avaliação da atividade anti-inflamatória.** Ribeirão Preto, 2017.127p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

A *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC., comumente conhecida como unha de gato ou *cat's claw*, é uma planta endêmica da Amazônia Peruana. Devido às suas propriedades terapêuticas, seus extratos e derivados são comercializados ao redor do mundo. As propriedades medicinais são atribuídas aos glicosídeos do ácido quinóico, polifenóis e especialmente aos alcalóides oxinólicos pentacíclicos. Assim, a mitrafilina é o principal alcalóide presente nos extratos da planta e, portanto, é o marcador químico de suas formulações comerciais. O processo de extração é uma etapa importante na padronização de seus extratos e, considerando a falta de estudos a respeito de sua influência sob o perfil fitoquímico, amostras de casca de unha de gato foram extraídas por meio de maceração dinâmica e extração assistida por micro-ondas. O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos fatores envolvidos no processo extrativo a respeito de sua composição química, atividade anti-inflamatória e antioxidante. Devido ao grande número de fatores de extração a serem avaliados, um planejamento experimental do tipo Placket Burman foi selecionado e os fatores escolhidos nessa etapa foram: porcentagem de planta em solvente, temperatura e tempo de extração. Adicionalmente, através de um planejamento Box Behnken, as condições ótimas de extração foram delineadas na segunda etapa do estudo. O tempo e a porcentagem de planta em solvente foram fatores significantes para a extração assistida por micro-ondas. Entretanto, o conteúdo de mitrafilina nesses extratos foi reduzido – comparativamente ao seu conteúdo total presente nas amostras analisadas - e, portanto, mais estudos são necessários para otimizar o seu rendimento. Além disso, o extrato otimizado foi avaliado quanto à capacidade anti-inflamatória, em um teste de edema de pata induzido por carragenina e apresentou uma capacidade inibitória na concentração de 0,57 mg de mitrafilina/ Kg de rato. Por conseguinte, tais achados confirmaram a sua atividade anti-inflamatória.

Os resultados obtidos a partir da extração por maceração dinâmica sugerem que o alcalóide é facilmente extraído, pois não foi afetado por nenhuma das variáveis experimentais. Adicionalmente, os extratos apresentaram maior conteúdo de mitrafilina – comparativamente aos resultados observados na extração por micro-ondas. Entretanto, devido ao menor tempo empregado na extração assistida por micro-ondas, outros estudos são necessários a fim de otimizar a extração desse alcalóide por esse método. O extrato otimizado sob as condições de maceração dinâmica foi seco em *spray drying* e, utilizando um planejamento de mistura do tipo simplex-centroid, o efeito de diferentes misturas de três adjuvantes foi avaliado: D-manitol, maltodextrina e Aerosil. Embora os extratos secos com Aerosil e maltodextrina tenham prevenido a degradação de mitrafilina – quando comparado ao extrato seco sem excipiente – a secagem resultou em elevada perda no conteúdo de alcalóide e também propriedades farmacotécnicas inadequadas. Tais observações sugerem que, mesmo em condições amenas de secagem, há a degradação do alcalóide. Portanto, tais resultados reforçam a necessidade de avaliações complementares a fim de prevenir a ocorrência de tais eventos.

Palavras chave: 1- Unha de gato 2- Extração assistida por micro-ondas 3-Maceração dinâmica 4- Planejamento de experimentos 5-Mitrafilina.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

Pertencente à família Rubiaceae, o gênero *Uncaria* compreende 34 espécies distribuídas nas regiões tropicais da Ásia, África, América do Sul e Central (RIDS DALE, 1978; HEITZMAN et al., 2005). Dentre essas a *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) D.C. é uma espécie endêmica da América do Sul e Central e possui notoriedade devido aos seus diversos efeitos terapêuticos associados ao consumo do seu chá (KEPLINGER et al., 1999; SANDOVAL et al., 2002). Esse uso popular bem consolidado despertou o interesse científico, originando um crescente número de pesquisas acerca de seu perfil fitoquímico e suas atividades farmacológicas (KOLEVA et al., 2002; HEITZMAN et al., 2005; KAISER et al., 2013a; KAISER et al., 2013 b; ZHANG et al., 2015; LENZI et al., 2013).

Unha de gato, *Uña de gato*, *Saventar*, *Cat's claw*, *Katzenkralle*, dentre outras são denominações populares desta planta que é conhecida principalmente como coadjuvante no tratamento da inflamação e da dor (REINHARD, 1999). Possui também outras atividades como: antioxidante, imunomoduladora (KEPLINGER, 1989; PRADO et al., 2007) contraceptiva, anti hemorrágica, depurativa, neuroativa, diurética (SANDOVAL et al., 2002; HEITZMAN et al., 2005) antitumoral (PRADO et al., 2007). O perfil fitoquímico da espécie é complexo e compreende diversas classes de compostos bioativos como: glicosídeos do ácido quinóico, compostos polifenólicos, alcaloides, ácidos orgânicos, esteróis, triterpenos, etc. Dentre essas substâncias, os alcaloides oxindólicos são a classe química mais estudada e usada como referência na padronização da maior parte das formulações comerciais contendo a planta (REINHARD, 1999, KEPLINGER et al., 1999; FALKIEWICZ e ŁUKASIAK, 2001; SANDOVAL et al., 2002; HEITZMAN et al., 2005).

É inegável o interesse científico e comercial nos produtos derivados da planta. A pesquisa realizada no banco de dados WEB OF SCIENCE, abrangendo o período de 1959-2017, forneceu 291 trabalhos citando a *U. tomentosa*. Além disso, 60 patentes de preparações farmacêuticas e cosméticas contendo a espécie foram depositadas entre 1982-2017 no banco de patentes online DERWENT INNOVATIONS INDEX. Todavia, ainda são escassos os processos tecnológicos direcionados à obtenção de seus extratos padronizados e o uso popular ocorre majoritariamente através de seu extrato aquoso, obtido por infusão de suas cascas e raízes, sem qualquer padronização química ou controle de qualidade.

Nesse contexto, tendo em vista a diversidade de aplicações terapêuticas, a pesquisa e o desenvolvimento de formulações a partir dessa espécie representa um grande avanço para a indústria nacional de fitoterápicos. E, considerando sua importância como terapia complementar na medicina popular do Brasil, em 2009 o Ministério da Saúde incluiu a *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). No ano de 2016, inseriu-a no 1º Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, documento que visa orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). No país, a Indústria Farmacêutica Herbarium é detentora das duas únicas formulações fitoterápicas contendo a planta: comprimidos revestidos contendo o extrato seco de Unha de gato e uma formulação gel-creme usada no tratamento do herpes-simplex, sendo ambas padronizadas no alcaloide oxindólico pentacíclico mitrafilina (Nome fantasia: Imunomax[®]).

Diversos fatores estão envolvidos em um processo produtivo; E o conhecimento de como essas variáveis afetam a resposta de interesse, proporcionam um maior controle da produção. Nesse sentido, o uso de ferramentas estatísticas associadas aos princípios do planejamento experimental permitem, através de um número mínimo de experimentos, obter informações úteis à otimização da produção (NETO, SCARMINIO e BURNS, 2010).

Dentre os motivos que justificam a aplicação dos modelos disponíveis de delineamento de experimentos ou DOE (do inglês, *Design of Experiments*), estão principalmente:

- Redução do tempo e custo operacional;
- Melhoria no rendimento do processo;
- Redução na variabilidade da produção (NETO; SCARMINIO e BURNS, 2010).

Assim, este trabalho utilizou de ferramentas do planejamento experimental para realizar a otimização das condições de extração das cascas secas de *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC e, posteriormente, das condições ideais de secagem dos seus extratos hidroalcoólicos otimizados. Os métodos de extração empregados foram: extração assistida por micro-ondas (EAM) e maceração dinâmica (MD), e a metodologia de secagem foi via *spray drying* (SD).

A primeira etapa deste trabalho consistiu na confecção de um planejamento fatorial fracionado, do tipo Plackett-Burman, para ambos métodos de extração. Esse modelo é

comumente empregado na fase de experimentação, quando não se tem ideia de qual variável experimental possui significância preliminar sobre as respostas avaliadas no sistema em estudo. Após a determinação dos fatores críticos para o processo de extração, um experimento do tipo Box Behnken foi conduzido a fim de otimizar o teor de mitrafilina contido na amostra.

A técnica de extração por maceração dinâmica permitiu a obtenção do produto com maior teor de mitrafilina, sendo esse extrato seco via SD e tendo sido utilizado três diferentes adjuvantes de secagem. As condições a serem empregadas nesses processos foram estabelecidas através de um experimento de mistura e visaram avaliar a influência destes adjuvantes de secagem nas propriedades farmacotécnicas e químicas do extrato seco de *U. tomentosa*. Ademais, a capacidade anti-inflamatória do produto obtido sob as condições experimentais otimizadas na extração por micro-ondas, foi avaliada através do teste de edema de pata induzido por Carragenina 1%.

CAPITULO 6

CONCLUSÃO

O principal objetivo desse trabalho foi obter extratos líquidos e secos de cascas de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) D.C. contendo teor elevado de mitrafilina. À partir de técnicas de planejamento experimental visou-se otimizar as condições de extração por maceração dinâmica e micro-ondas, e comparar os resultados obtidos à partir de cada um desses processos extrativos – sendo o objetivo central, a maximização do conteúdo de mitrafilina dos extratos líquidos e seco.

No início da fase de experimentação, empregando-se um planejamento Plackett Burman realizou-se a triagem das variáveis que tiveram efeito estatisticamente significativo sob as respostas avaliadas. Embora essa classe de experimentos não permita investigar o efeito das interações sob a resposta estudada, proporciona um panorama do comportamento entre variáveis experimentais *versus* variáveis resposta. Para a extração por *maceração dinâmica*, todos os fatores experimentais tiveram efeito significativo sob o *teor de mitrafilina*, sendo o efeito da % P/S inversamente proporcional ao conteúdo desse alcalóide. Por outro lado, o aumento no tempo de extração, juntamente à diminuição da agitação e temperatura do meio extrator conduziram ao aumento do *teor de mitrafilina*. De modo similar, a temperatura demonstrou efeito inversamente proporcional sob a *atividade antioxidante* do extrato; quando o nível máximo dessa variável experimental foi utilizado (60°C) observou-se redução da resposta. Quanto ao *rendimento de sólidos*, a agitação e o tempo de extração foram os únicos fatores capazes de alterar essa variável resposta. Nesse estudo, quanto menor o tempo e a velocidade de agitação, maior foram o rendimento de sólidos nos extratos.

Na extração assistida por micro-ondas, apenas a %P/S e temperatura foram significantes para o *teor de mitrafilina* dos extratos. A temperatura, por outro lado, favoreceu ligeiramente o aumento do teor de alcalóide contido no extrato. O rendimento de sólidos foi alterado significativamente por todas as variáveis experimentais, particularmente o pH ácido do meio extrator foi eficaz no aumento dessa resposta e prejudicial para a *atividade antioxidante* do extrato. A % P/S reduzida também teve efeito semelhante sob o rendimento de sólidos, demonstrando que menores quantidades de planta no solvente extrator favoreceram o processo, possivelmente por prevenirem a saturação do meio. Portanto, na segunda etapa do estudo, os fatores % P/S, temperatura e tempo foram

empregados em ambos os processos extrativos das cascas de *U. tomentosa*, a fim de avaliar seus efeitos isolados e de interação sob o teor de mitrafilina.

Na etapa de otimização, as condições experimentais significantes para a extração assistida por micro-ondas foram o tempo e a % P/S. Nesse processo, o aumento do tempo de extração conduziu às maiores concentrações de alcalóide no extrato, por outro lado, o aumento da % P/S exerceu efeito inverso. Todavia, o rendimento global de extração do alcalóide foi razoável e, portanto, sugere a necessidade de mais estudos a fim de delinear as condições satisfatórias na obtenção de elevados teores de mitrafilina.

Na maceração dinâmica, nenhum dos fatores estudados foi estatisticamente significante para o teor de mitrafilina, tal achado sugere a facilidade dessa metodologia em realizar a extração do alcalóide das cascas da planta. Ademais, o conteúdo de mitrafilina de seus extratos mostrou-se superior ao observado na extração por micro-ondas. Portanto, os resultados demonstraram que os maiores rendimentos de alcalóide foram obtidos através de um método de extração comumente utilizado na rotina laboratorial e industrial. Porém, tendo-se em vista o menor tempo de extração empregado na extração por micro-ondas e, registros bibliográficos a respeito da elevada capacidade extratora do método, fazem-se necessário outras avaliações a fim de delinear as condições mais adequadas à obtenção de extratos com elevado teor de mitrafilina.

A atividade anti-inflamatória dos produtos obtidos à partir da extração por micro-ondas foi testada em edema de pata de rato. Os resultados corroboraram com as descrições da literatura e apontaram o efeito anti-inflamatório dos extratos hidroalcoólicos padronizados no conteúdo de mitrafilina. Além disso, duas soluções padrão de mitrafilina foram testadas frente à capacidade de reduzir o edema, no entanto, nenhuma das concentrações foi capaz de reduzir o edema. Assim, considerando a complexidade química do extrato vegetal e a possibilidade de sinergismo, sugerem-se outros estudos a fim de avaliar o papel das outras substância na resposta anti-inflamatória.

Além disso, tendo-se em vista a importância das formas farmacêuticas sólidas, os extratos derivados da maceração dinâmica foram secos por metodologia *spray drying*. O principal objetivo do estudo foi avaliar o efeito da combinação de três diferentes adjuvantes de secagem (D-manitol, maltodextrina e Aerosil) sob a manutenção do teor de mitrafilina e, sob as propriedades farmacotécnicas do extrato seco. Embora os extratos secos com auxílio de Aerosil e maltodextrina tenham prevenido ligeiramente a degradação

da mitrafilina – comparativamente ao extrato seco sem excipiente - de modo geral, durante o processo houve perda de alcalóide (comparativamente ao teor do extrato líquido). Tal observação sugere que, mesmo sob as condições amenas de secagem via spray drying, há degradação. Portanto, tais resultados reforçam a necessidade de avaliações auxiliares afim de prevenir a ocorrência de tais eventos. Além disso, embora o conteúdo de umidade tenha sido adequado, os fluxos de escoamento foram classificados de fraco - pobre, e deste modo, são fatores limitantes no processo produtivo de formas farmacêuticas sólidas. Assim, tal observação demonstra a necessidade de avaliações a fim de delinear melhores condições de secagem , bem como obter extratos secos com adequadas propriedades farmacoténicas.

Por fim, o método cromatográfico empregado na quantificação de mitrafilina foi adequado pois apresentou linearidade, precisão, exatidão e robustez para os dois tipos de formas farmacêuticas desenvolvidas: extrato líquido e extrato seco. Além disso, o uso dos planejamentos experimentais no desenvolvimento farmacotécnico foram de suma importância para avaliar as variáveis críticas ao processo de extração e secagem dos extratos derivados da casca de *U. tomentosa*.

CAPITULO 7
REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

AGUILAR, J. L., ROJAS, P., MARCELO, A., PLAZA, A., BAUER, R., REININGER, E., MERFORT, **Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae)**. Journal of Ethnopharmacology, v. 81, n. 2, p. 271–276, 2002.

ALUPULUI, ANI; CALINESCU, IOAN; LAVRIC, VASILE. **Ultrasonic vs. microwave extraction intensification of active principles from medicinal plants**. In: **AIDIC conference series**. p. 1-8. 2009.

ANASTAS, Paul T.; WARNER, John C. **Green chemistry: theory and practice**. Oxford university press, 2000.

ANSEL, H. C.; POPOVICH, N. G., ALLEN JR. L. V. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos**. 6.ed. São Paulo: Premier, 568 p. 2000.

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 platyipoda***. Journal of Natural Products, v. 52, n. 4, p. 679-685, 1989.

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

AQUINO, R., DE FEO, V., DE SIMONE, F., PIZZA, C., & CIRINO, G. **Plant metabolites. New compounds and anti-inflammatory activity of *Uncaria tomentosa***. Journal of natural products, v. 54, n. 2, p. 453–459, 1991.

AQUINO, R., DE TOMMASI, N., DE SIMONE, F., & PIZZA, C. **Triterpenes and quinovic acid glycosides from *Uncaria tomentosa***. Phytochemistry, v. 45, n. 5, p. 1035-1040, 1997.

AULTON, MICHAEL E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Artmed, 2008.

AZWANIDA, N. N. **A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation**. *Med Aromat Plants*, v. 4, n. 196, p. 2167-2412.2015.

BEDNAREK, D., LUKASIAK, J., KONDRACKI, M., ZUROWSKA, K., FALKIEWICZ, B., & NIEMCZUK, K. **Analysis of phenotype and functions of peripheral blood leukocytes in cellular immunity of calves treated with *Uncaria tomentosa***. *BULLETIN-VETERINARY INSTITUTE IN PULAWY*, v. 48, n. 3, p. 289-296, 2004.

BERTOL, GUSTAVO. **Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade de matérias-primas e produto contendo *Uncaria Tomentosa* (Willd.) DC.-Rubiaceae**. 2010.

BERTOL, GUSTAVO.; FRANCO, L.; DE OLIVEIRA, B. H. **HPLC analysis of oxindole alkaloids in *Uncaria tomentosa*: Sample preparation and analysis optimisation by factorial design**. *Phytochemical Analysis*, v. 23, n. 2, p. 143–151, 2012.

BOMBARDELLI, EZIO. **Technologies for the processing of medicinal plants**. *The Medicine Plant Industry*, Chapt, v. 7, p. 85-98, 1991.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RE n°. 899, de 29 de maio de 2003. **Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"**. *Diário Oficial da União*. Brasília, 02 jun. 2003a. Seção 1, p. 56-59.

BRASIL ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 166, 24/07/2017 . **Guia para validação de métodos analíticos** - Julho, 2017

CATEN, CARLA S. TEN; RIBEIRO, JOSÉ LUIS DUARTE. **Etapas na otimização experimental de produtos e processos: discussão e estudo de caso**. *Production*, v. 6, n. 1, p. 45-64, 1996.

CCAHUANA-VASQUEZ, R. A., SANTOS, S. S. F. D., KOGA-ITO, C. Y., & JORGE, A. O. C. **Antimicrobial activity of Uncaria tomentosa against oral human pathogens.** Brazilian oral research, v. 21, n. 1, p. 46-50, 2007.

CERRI, R., AQUINO, R., DE SIMONE, F., & PIZZA, C. **NEW QUINOVIC ACID GLYCOSIDES FROM UNCARIA TOMENTOSA.** Journal of Natural Products, v. 51, n. 2, p. 257–261, 1988.

CHANG, C. W., YEH, Y. Y., CHANG, L. C., HSU, M. C., & WU, Y. T **Rapid determination of oxindole alkaloids in cat's claw by HPLC using ionic liquid-based microwave-assisted extraction and silica monolithic column.** Biomedical Chromatography, 2017.

COSTA-MACHADO, ANA RITA DE MELLO. **Obtenção de produtos a partir das folhas de Copaifera langsdorffii Desf.: otimização da extração e secagem em spray dryer utilizando planejamentos experimentais.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2011.

DE MIRANDA, E. M.; DE SOUSA, J. A.; PEREIRA, R. **Subsídios técnicos para o manejo sustentável da unha-de-gato (Uncaria spp.) no Vale do Rio Juruá, AC.** Embrapa Acre-Documentos (INFOTECA-E), 2001.

DÉVÉNYI, D., KÓSZÓ, B., CALVO, A., KEVE, T., & SZÉKELY, E. **Alkaloid Concentration Control in Cat's Claw (Uncaria tomentosa [Willd.] DC) Extracts with Conventional Dynamic Maceration.** 2016.

DIETRICH, F., MARTINS, J. P., KAISER, S., SILVA, R. B. M., ROCKENBACH, L., EDELWEISS, M. I. A., & BATTASTINI, A. M. O. **The quinovic acid glycosides purified fraction from Uncaria tomentosa protects against hemorrhagic cystitis induced by cyclophosphamide in mice.** PloS one, v. 10, n. 7, p. 131-882, 2015.

DI ROSA, M; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. **Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine.** The Journal of pathology, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DUAN, W., JIN, S., ZHAO, G., & SUN, P **Microwave-assisted extraction of anthocyanin from Chinese bayberry and its effects on anthocyanin stability.** Food Science and Technology (Campinas), v. 35, n. 3, p. 524-530, 2015.

FALKIEWICZ, B.; LUKASIAK, J. **Vilcacora [Uncaria tomentosa (Willd.) DC. and Uncaria guianensis (Aublet) Gmell.] – a review of published scientific literature.** Case Report Clinical Practice Rev, v. 2, n. 4, p. 305–316, 2001.

FARMACOPEIA BRASILEIRA, ed 5^a, vol. 2, ANVISA (2010).

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4^a ed. Parte 1-2. São Paulo: Atheneu Editora; 1988-2000.

FRAÇKOWIAK, T., BĄCZEK, T., KALISZAN, R., ŻBIKOWSKA, B., GLEŃSK, M., FECKA, I., & CISOWSKI, W. **Binding of an oxindole alkaloid from Uncaria tomentosa to amyloid protein (A β 1-40).** Zeitschrift für Naturforschung C, v. 61, n. 11-12, p. 821-826, 2006.

GALLO, L., RAMÍREZ-RIGO, M. V., PIÑA, J., PALMA, S., ALLEMANDI, D., & BUCALÁ, V. **Valeriana officinalis dry plant extract for direct compression: preparation and characterization.** Scientia pharmaceutica, v. 80, n. 4, p. 1013-1026, 2012.

GANZLER, K.; SZINAI, I.; SALGO, An. **Effective sample preparation method for extracting biologically active compounds from different matrices by a microwave technique.** Journal of chromatography A, v. 520, p. 257-262, 1990.

GIMÉNEZ, D. G., PRADO, E. G., RODRÍGUEZ, T. S., ARCHE, A. F., & DE LA PUERTA, R. **Cytotoxic Effect of the Pentacyclic Oxindole Alkaloid Mitrephylline Isolated from Uncaria tomentosa Bark on Human Ewing's Sarcoma and Breast Cancer Cell Lines.** Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research, v. 76, p. 133–136, 2010.

GONÇALVES, C.; DINIS, T.; BATISTA, M. T. **Antioxidant properties of proanthocyanidins of Uncaria tomentosa bark decoction: A mechanism for anti-inflammatory activity.**Journal of Phytochemistry, 2005.

HEITZMAN, M. E., NETO, C. C., WINIARZ, E., VAISBERG, A. J., & HAMMOND, G. B. **Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of Uncaria (Rubiaceae).** *Phytochemistry*, v. 66, n. 1, p. 5–29, 2005.

KAISER, S., DIETRICH, F., DE RESENDE, P. E., VERZA, S. G., MORAES, R. C., MORRONE, F. B., & ORTEGA, G. G. **Cats claw oxindole alkaloid isomerization induced by cell incubation and cytotoxic activity against T24 and RT4 human bladder cancer cell lines.** *Planta Medica*, v. 79, n. 15, p. 1413–1420, 2013a.

KAISER, S., VERZA, S. G., MORAES, R. C., PITTOL, V., PEÑALOZA, E. M. C., PAVEI, C., & ORTEGA, G. G. **Extraction optimization of polyphenols, oxindole alkaloids and quinovic acid glycosides from cat's claw bark by Box–Behnken design.** *Industrial Crops and Products*, v. 48, p. 153–161, 2013b.

KAUFMANN, B.; CHRISTEN, P. **Recent extraction techniques for natural products: microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction.** *Phytochemical Analysis*, v. 13, n. 2, p. 105–113, 2002.

KEPLINGER, K.; WAGNER, H.; KREUTZKAMP, B. **Oxindole alkaloids having properties stimulating the immunologic system**, 1989.

KEPLINGER, K.; LAUS, G., WURM, M., DIERICH, M. P., & TEPPNER, H.. **Uncaria tomentosa (Willd.) DC.- ethnomedicinal use and new pharmacological, toxicological and botanical results.** *Journal of ethnopharmacology*, v. 64, n. 1, p. 23-34, 1999.

KLEIN-JUNIOR, L. C.; VANDER HEYDEN, Y.; HENRIQUES, A. T. **Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices.** *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 66–82, 2016.

Koleva, I. I., Van Beek, T. A., Linssen, J. P., Groot, A. D., & Evstatieva, L. N. **Screening of Plant Extracts for Antioxidant Activity: a Comparative Study on Three Testing Methods.** *Phytochemical Analysis*, v. 13, n. 1, p. 8–17, jan. 2002.

KURAS¹, M., PILARSKI, R., NOWAKOWSKA, J., ZOBEL, A., BRZOST, K., ANTOSIEWICZ, J., & GULEWICZ, K. **Effect of Alkaloid-Free and Alkaloid-Rich preparations from Uncaria tomentosa bark on mitotic activity and chromosome morphology evaluated by Allium Test.** Journal of ethnopharmacology, v. 121, n. 1, p. 140-147, 2009.

KYNOCH, S. R.; LLOYD, G. K. **Acute oral toxicity to mice of substance E-2919.** Huntingdon Research Centre, Huntingdon, Cambridgeshire, England. Unpublished, 1975.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, HA; KANIG, JL **Teoria e prática na indústria farmacêutica.** Trad. João F. Pinto et al. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, p. 1357-1439, 2001.

LAUS, GERHARD; BRÖSSNER, DAGMAR; KEPLINGER, KLAUS. **Alkaloids of peruvian Uncaria tomentosa.** Phytochemistry, v. 45, n. 4, p. 855-860, 1997.

LAUS, G. **Advances in chemistry and bioactivity of the genus Uncaria.** Phytotherapy Research, v. 18, n. 4, p. 259–274, abr. 2004.

LENZI, R. M., CAMPESTRINI, L. H., OKUMURA, L. M., BERTOL, G., KAISER, S., ORTEGA, G. G & MAURER, J. B. B **Effects of aqueous fractions of Uncaria tomentosa (Willd.) D.C. on macrophage modulatory activities.** Food Research International, v. 53, n. 2, p. 767–779, 2013.

LIST, Paul Heinz; SCHMIDT, Peter C. **Phytopharmaceutical technology.** CRC Press, 1989.

MANDAL, V.; MOHAN, Y.; HEMALATHA, S. **Microwave Assisted Extraction – An Innovative and Promising Extraction Tool for Medicinal Plant Research.** Pharmacognosy Review, v. 1, n. 1, p. 7–18, 2007.

MANDAL C., SUBHASH & MANDAL, VIVEKANANDA & KUMAR DAS, ANUP. Chapter 6. Classification of Extraction Methods.p. 83-136. 2015.

MARTINS, RODRIGO, FREITAS, LUIS V. D., MONTES ANA C. R. AND FREITAS, LUIS ALEXANDRE P.**The Extraction of bioactives from plants.** In: FREITAS, Luis Alexandre et al. Recent developments in phytomedicine technology. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: Nova Science Pub Inc., cap. 5, p. 94-123. v. 1. 2017

MARTINS, P. M., LANCHOTE, A. D., THORAT, B. N., & FREITAS, L. A **Turbo-extraction of glycosides from Stevia rebaudiana using a fractional factorial design**. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2017.

MILLS, SIMON; BONE, KERRY. **The essential guide to herbal safety**. Elsevier Health Sciences, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Memento Fitoterápico**. 1^a ed. Brasília: 2016.

MORAES, R. C., DALLA LANA, A. J., KAISER, S., CARVALHO, A. R., DE OLIVEIRA, L. F. S., FUENTEFRIA, A. M., & ORTEGA, G. G. **Antifungal activity of Uncaria tomentosa (Willd.) DC against resistant non-albicans Candida isolates**. *Industrial Crops and Products*, v. 69, p. 7-14, 2015.

MONTEIRO, ELAINE CRISTINA ALMEIDA E. C. A., TRINDADE, J. M. D. F., DUARTE, A. L. B. P., & CHAHADE, W. H **Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs)**. *Temas de reumatologia clínica*, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MONTGOMERY, D. **Design and analysis of Experiments**. 5^a ed. Arizona: John Wiley & Sons, INC, 1997.

MONTORO, P., CARBONE, V., DE DIOZ ZUNIGA QUIROZ, J., DE SIMONE, F., & PIZZA, C. **Identification and quantification of components in extracts of Uncaria tomentosa by HPLC-ES/MS**. *Phytochemical Analysis*, v. 15, n. 1, p. 55–64, 2004.

MONTSERRAT-DE LA PAZ, S., DE LA PUERTA, R., FERNANDEZ-ARCHE, A., QUILEZ, A. M., MURIANA, F. J. G., GARCIA-GIMENEZ, M. D., & BERMUDEZ, B **Pharmacological effects of mitraphylline from Uncaria tomentosa in primary human monocytes: skew toward M2 macrophages**. *Journal of ethnopharmacology*, v. 170, p. 128-135, 2015.

MONTSERRAT-DE LA PAZ, S., FERNANDEZ-ARCHE, A., DE LA PUERTA, R., QUILEZ, A. M., MURIANA, F. J., GARCIA-GIMENEZ, M. D., & BERMUDEZ, B. **Mitraphylline inhibits lipopolysaccharide-mediated activation of primary human neutrophils**. *Phytomedicine*, v. 23, n. 2, p. 141–148, 2016.

MUJUMDAR, ARUN S. **Principles, classification, and selection of dryers.** Handbook of industrial drying, p. 4-31, 2006.

MUJUMDAR, ARUN S. (Ed.). **Handbook of industrial drying.** CRC press, 2014.

MUHAMAD IDA IDAYU., NOR DIANA HASSAN, SITI NUR HANA MAMAT, NORAZLINA MOHD NAWI, WAHIDA ABD RASHID, NURAIMI AZLAN TAN. **Extraction Technologies and Solvents of Phytocompounds from Plant Materials: Physico-chemical Characterization and Identification of Ingredients and Bioactive Compounds from Plant extract using Various Instrumentations.** Ingredients Extraction by Physicochemical Methods in Food. 1st Edition. 638 p. 2017.

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

NAVARRO HOYOS, M., SÁNCHEZ-PATÁN, F., MURILLO MASIS, R., MARTÍN-ÁLVAREZ, P. J., ZAMORA RAMIREZ, W., MONAGAS, M. J., & BARTOLOMÉ, B. **Phenolic assesment of *Uncaria tomentosa* L. (cat's claw): Leaves, stem, bark and wood extracts.** *Molecules*, v. 20, n. 12, p. 22703–22717, 2015.

NETO, BENÍCIO BARROS; SCARMINIO, IEDA SPACINO; BRUNS, ROY EDWARD. **Como Fazer Experimentos: Pesquisa e Desenvolvimento na Ciência e na Indústria.** Bookman Editora, 2010.

NETO, J. N., COELHO, T. M., AGUIAR, G. C., CARVALHO, L. R., DE ARAÚJO, A. G. P., GIRÃO, M. J. B., & SCHOR, E. **Experimental endometriosis reduction in rats treated with *Uncaria tomentosa* (cat's claw) extract.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, v. 154, n. 2, p. 205-208, 2011.

NÚÑEZ, C., LOZADA-REQUENA, I., YSMODES, T., ZEGARRA, D., SALDAÑA, F., & AGUILAR, **Imunomodulación de *Uncaria tomentosa* sobre células dendríticas, il-12 y perfil TH1/TH2/TH17 en cáncer de mama.** Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica, v. 32, n. 4, p. 643-651, 2015.

] NUR AQILAH KAMARUDIN, MASTURAH MARKOM AND JALIFAH LATIP ; **Effects of Solvents and Extraction Methods on Herbal Plants *Phyllanthus niruri*, *Orthosiphon stamineus* and *Labisia pumila***. Indian Journal of Science and Technology, Vol 9(21),2016.

PHARMACOPOEIA, British. Her Majesty's Stationery Office Ltd. 2007.

PHARMAKA, Immodal. **Krallendorn® *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC Root Extract: Information for Physicians and Dispensing Chemists**. 1995.

PILARSKI, R., ZIELIŃSKI, H., CIESIOLKA, D., & GULEWICZ, K **Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC**. Journal of Ethnopharmacology, 2006.

PILARSKI, R., POCZEKAJ-KOSTRZEWSKA, M., CIESIOLKA, D., SZYFTER, K., & GULEWICZ, K **Antiproliferative activity of various *Uncaria tomentosa* preparations on HL-60 promyelocytic leukemia cells**. Pharmacological reports, v. 59, n. 5, p. 565, 2007.

PIMENTAA, C. D., SILVAA, M. B., SALOMONA, V. A. P., PENTEADOA, R. B., & GOMESA, F. M. **Aplicação das metodologias Desirability e Simplex para otimização das propriedades mecânicas em arames de aço temperados**. Production, v. 25, n. 3, p. 598-610, 2015.

PISCOYA, J., RODRIGUEZ, Z., BUSTAMANTE, S. A., OKUHAMA, N. N., MILLER, M. J. S., & SANDOVAL, M. **Efficacy and safety of freeze-dried cat's claw in osteoarthritis of the knee: mechanisms of action of the species *Uncaria guianensis***. Inflammation Research, v. 50, n. 9, p. 442-448, 2001.

POLLITO, PERCY AMILCAR ZEVALLOS. **Dendrologia, anatomia do lenho e status de conservação das espécies lenhosas dos gêneros *Cinchona*, *Croton* e *Uncaria* no estado do Acre, Brasil**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.2004.

PORTAL ACTION, 2017. Disponível em:<<http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/62-metodo-de-superficie-de-resposta>>Acesso em: 12/04/2017.

PRADO, E. G., GIMENEZ, M. G., DE LA PUERTA VÁZQUEZ, R., SÁNCHEZ, J. E., & RODRIGUEZ, M. S. **Antiproliferative effects of mitraphylline, a pentacyclic oxindole alkaloid of *Uncaria tomentosa* on human glioma and neuroblastoma cell lines.** *Phytomedicine*, v. 14, n. 4, p. 280–284, 2007.

PRIMA UÑA DE GATO. Allergi research group.2003. Disponível:<www.greeandhealthy.com/admin/images/products/images/UNA11.pdf>. Acesso:12/04/2017.

PRISTA LN, ALVES AC, MORGADO R. **Tecnologia farmacêutica.** Lisboa: Calouste Gulbenkian. 1995.

QUILEZ, A. M., MURIANA, F. J. G., GARCIA-GIMENEZ, M. D., & BERMUDEZ, B. **Pharmacological effects of mitraphylline from *Uncaria tomentosa* in primary human monocytes: Skew toward M2 macrophages.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 170, p. 128–135, 2015.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., FLOWER, R. J., & HENDERSON, G **Farmacologia. In: Farmacologia.** Elsevier, 2011.

REINHARD, K. *Uncaria tomentosa* (Willd.) D.C.: Cat's Claw, Uña de Gato, or Savéntaro. **The Journal of lternative and complementary medicin**, v. 5, n. 2, 1999.

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., & MELO, L. F. **C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods.** *Quimica Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

REVILLA, JUAN. **Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis.** Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2001. 405 p.

RIDSDALE, C. E. **A revision of *Mitragyna* and *Uncaria* (Rubiaceae).** *Blumea*, v. 24, n. 43100, p. 2, 1978.

ROJAS-DURAN, R., GONZÁLEZ-ASPAJO, G., RUIZ-MARTEL, C., BOURDY, G., DOROTEO-ORTEGA, V. H., ALBAN-CASTILLO, J. & DEHARO, E **Anti-inflammatory activity of Mitraphylline isolated from *Uncaria tomentosa* bark.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 143, n. 3, p. 801–804, 2012.

RUNHA, F. P., CORDEIRO, D. S., PEREIRA, C. A. M., VILEGAS, J., & OLIVEIRA, W. P. **Production of dry extracts of medicinal Brazilian plants by spouted bed process: development of the process and evaluation of thermal degradation during the drying operation.** *Food and bioproducts processing*, v. 79, n. 3, p. 160-168, 2001.

SANDOVAL-CHACON, M., THOMPSON, J. H., ZHANG, X. J., LIU, X., MANNICK, E. E., SADOWSKA-KROWICKA, H & MILLER, M. J. S. **Antiinflammatory actions of cat's claw: The role of NF- κ B.** *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, v. 12, n. 12, p. 1279–1289, 1998.

SANDOVAL, M., OKUHAMA, N. N., ZHANG, X. J., CONDEZO, L. A., LAO, J., ANGELES, F. M., & MILLER, M. J. S. **Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content.** *Journal of Phytomedicine*, v. 9, n. 4, p. 325-337, 2002.

SANTA MARIA, A., LOPEZ, A., DIAZ, M. M., ALBAN, J., DE MERA, A. G., ORELLANA, J. V., & POZUELO, J. M. **Evaluation of the toxicity of *Uncaria tomentosa* by bioassays in vitro.** *Journal of Ethnopharmacology*, p. 183–187, 1997.

SANTOS, E. V. M.; SHARAPIN, N. **Extração de matérias-primas vegetais.** SHARAPIN, N. **Fundamentos de tecnologia de Produtos Fitoterápicos.** Cytel, Santafé de Bogotá, p. 27-60, 2000.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. **Inflammatory edema induced by 1, 8-cineole in the hindpaw of rats: a model for screening antiallergic and anti-inflammatory compounds.** *Phytomedicine*, v. 5, n. 2, p. 115-119, 1998.

SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K. M., & YOGA LATHA, L. **Extraction, Isolation and Characterization of Bioactive Compounds from Plants' Extracts.** *African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines*, 8(1), 1–10. 2011.

SENATORE A., CATALDO A., IACCARINO FP., ELBERTI MG ; **Phytochemical and biological study of *Uncaria tomentosa*;** *Jun*;65(6):p.517-20. 1989.

SHENG, Y., ÅKESSON, 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, n. 3, p. 577–584, 2005.

SHENG, Y.; BRYNGELSSON, C.; PERO, R. W. **Enhanced DNA repair, immune function and reduced toxicity of C-MED-100(TM), a novel aqueous extract from *Uncaria tomentosa***. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, n. 2, p. 115–126, 2000.

ŠTĚRBOVÁ, D., MATEJÍČEK, D., VLČEK, J., & KUBÁŇ, V. **Combined microwave-assisted isolation and solid-phase purification procedures prior to the chromatographic determination of phenolic compounds in plant materials**. *Analytica Chimica Acta*, v. 513, n. 2, p. 435–444, 2004.

STUPPNER, H., STURM, S., GEISEN, G., ZILLIAN, U., & KONWALINKA, G. **A differential sensitivity of oxindole alkaloids to normal and leukemic cell lines**. *Planta Medica*, v. 59, n. S 1, p. A583-A583, 1993.

SUPORTE MINITAB. 2017.

Disponível em: <<https://support.minitab.com/pt-br/minitab/18/help-and-how-to/modeling-statistics/doe/supporting-topics/response-surface-designs/response-surface-central-composite-and-box-behnken-designs/>> Acesso:12/03/2017

TEIXEIRA, TIAGO AUGUSTO PAULO. **Utilização de ferramentas estatísticas no desenvolvimento de uma formulação de defensivo agrícola**. Universidade de São Paulo. 2012.

TOPÁR, JÓZSEF. **SPRAY DRYING INVESTIGATIONS ON MEDICINAL PLANT BASED PHARMACEUTICAL PRODUCTS**. *Periodica Polytechnica. Engineering. Mechanical Engineering*, v. 38, n. 2-3, p. 157, 1994.

THOMAZZI, S. M., SILVA, C. B., SILVEIRA, D. C. R., VASCONCELLOS, C. L. C., LIRA, A. F., CAMBUI, E. V. F., & ANTONIOLLI, A. R. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira)**. *Journal of ethnopharmacology*, v. 127, n. 2, p. 451-456, 2010.

TRENTINI, ANNY MARGALY MACIEL. **Topical phytotherapeutic compound for the treatment of herpes based on *Uncaria tomentosa* and extraction process for obtaining a vegetal extract from *Uncaria tomentosa***. U.S. Patent n. 8,394,424, 12 mar. 2013.

TSUKUI, A.; REZENDE, C. M. **Microwave Assisted Extraction and Green Chemistry**. *Revista Virtual de Química*, v. 6, n. 6, 2014.

UGAZ, O. L. DE; CALLO, N. **LA UÑA DE GATO SU ESTUDIO CIENTIFICO.** REVISTA DE QUÍMICA, 1991.

UNITED STATES PHARMACOPEIA (USP). N° 29. Rockville, United States. Pharmacopeial Convention, 2006.

VALENTE, L. M. M. et al. **Unha-de-gato [Uncaria tomentosa (Willd.) DC. e Uncaria guianensis (Aubl.) Gmel.]: um panorama sobre seus aspectos mais relevantes.** 2006.

WHO; **Guidelines on good herbal processing practices (GHPP) for herbal medicines;** 2017.

YAU W, GOH C, KOH H. **Quality control and quality assurance of phytomedicines: key considerations, methods and analytical challenges.** In: Ramzan I (ed) **Phytotherapies: efficacy, safety, and regulation.** Wiley, Hoboken. 2015.

ZHANG, Q., ZHAO, J. J., XU, J., FENG, F., & QU, W. **Medicinal uses, phytochemistry and pharmacology of the genus Uncaria.** Journal of Ethnopharmacology, v. 173, p. 48–80, 2015.

ZEVALLOS, P. P.; LOMBARDI, I.; BERNAL, Y. **Agrotecnología para el cultivo de la uña de gato o bejuco de agua.** In: MARTÍNEZ J. V.; BERNAL, H. J.; CÁCERES, A. Fundamentos de agrotecnología para el cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas. Santafé de Bogotá: Convenio Andrés Bello/Ciencia y Tecnología para el Desarrollo,. p. 463-492. 2000.

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

WIRTH, C.; WAGNER, H. **Pharmacologically active procyanidines from the bark of Uncaria tomentosa.** Phytomedicine, v. 4, n. 3, p. 265–266, 1997.