



Pesquisa de compostos tóxicos numa formulação à base de plantas

Marisa Marques Manso



Mestrado em Química Forense

Departamento de Química, FCTUC
Faculdade de Farmácia

2010-2012



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Aos meus pais,

António Júlio

e

Maria

**Pesquisa de compostos tóxicos numa formulação à
base de plantas**

Marisa Marques Manso

**Dissertação apresentada para provas de Mestrado
em Química Forense**

Orientadora: Dr^a Maria da Graça Campos

Co-Orientadora: Dr^a Elisa Serra

Julho de 2012

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Este foi um ano difícil, ao fim do qual não teria chegado sem a ajuda inestimável de algumas pessoas. Em primeiro lugar, mais que quaisquer outros, agradeço à Dr^a Graça Campos e à Dr^a Elisa Serra, minhas orientadoras e mentoras através de todo o processo investigativo e de produção desta Tese, que foram incansáveis e inabaláveis no seu apoio e estímulo, compreensivas para além do que os agradecimentos podem reflectir. O meu Muito Obrigada a ambas!

À Joana deixo um bem haja pelo apoio e troca de ideias ao longo deste ano. Ao Miguel digo que o equilíbrio entre admoestações, incentivos e conselhos foi perfeito e obrigada pelo material de consulta. Foi inestimável. A Doris sempre presente e a encorajar, permitiu-me momentos de distracção e encorajamento indispensáveis.

No Laboratório de Orgânica do Departamento de Química, a ajuda do Albertino, da Bruna, do Nelson e do Walter foi primordial. No Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, o mesmo pode ser dito do Gustavo e da Célia. Desejo deixar um agradecimento especial a esta pela sua ajuda e disponibilidade na realização dos testes preliminares de viabilidade celular, que foram uma mais valia para o trabalho desenvolvido.

Os meus pais foram uma presença constante e invisível, fornecendo os pilares em que me apoiar, um ombro onde chorar os maus resultados, um ouvido onde desabafar as mágoas, um abraço para felicitar os resultados animadores. Todo o meu amor.

Por fim, mas não menos importante, a cooperação entre Departamento de Química e a Faculdade de Farmácia foi o factor determinante que permitiu a conclusão do trabalho.

Todos os que não foram mencionados sabem que não foram esquecidos, sempre apreciados e amados pelo que são e o que fazem – ou não fariam parte da minha vida, do meu círculo de amizades e do meu coração.

Resumo

As formulações à base de plantas, muito utilizadas nas medicinas tradicionais de diversos países, são produzidas recorrendo a diferentes partes de plantas com propriedades medicinais. A complexidade química das plantas utilizadas é transposta para o produto acabado, havendo possibilidade de interacção com outras formulações ou com medicamentos. Um estudo da composição química dos produtos acabados é uma necessidade, de modo a prevenir esta interacção, particularmente quando se fala em tratamentos médicos. O objectivo deste trabalho foi o estudo de uma formulação à base de plantas recomendada na medicina tradicional chinesa para sono inquieto, estados de ansiedade e nervosismo. Para esse efeito, procedeu-se à extracção e análise dos componentes da formulação por HPLC-DAD assim como ao isolamento de alguns desses componentes por TLC preparativa para posterior identificação por RMN ^1H e infravermelho. Os resultados destes procedimentos e as conclusões que se retiraram são o alvo da presente dissertação.

Abstract

Herbal formulations, commonly used in traditional medicine in various countries, are produced resorting to different parts of plants with medicinal properties. The chemical complexity of the plants is reflected in the finished product, which may interact with other formulations or medicines. A study on the chemical composition of the finished products is a necessity in order to prevent these interactions, particularly concerning medical treatments. The objective of this work was the study of an herbal formulation recommended in traditional Chinese medicine for sleep disorders, anxiety and nervousness. Thus, the formulation's constituents were extracted and analysed by HPLC-DAD, and some of those constituents were isolated by preparative TLC for identification through ^1H NMR and infrared spectroscopy. The results and conclusions of this work are described in this dissertation.

Abreviaturas

2D - Bidimensional

δ - Desvio químico

λ - Comprimento de onda

μ - Micra

$\tilde{\nu}$ - Número de onda

Al-A, Al-B, Al-C - Fracções obtidas por cromatografia preparativa utilizando eluentes característicos para alcalóides

Ala - Alanina

BBR - Berberina (padrão)

BC - Fórmula An Shen Wan adquirida na Ben Cao Lda

BH - Fórmula An Shen Wan adquirida na Botica Homeopática

DAD - *Diode array detector*, detector de fotodíodos

DMSO - Dimetilsulfóxido

Fen - Fenilalanina

Glic - Glicose

HPLC - *High performance liquid chromatography* - Cromatografia líquida de alta eficiência

IV - Infravermelho

LPS - Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*

MT - Medicina Tradicional

MTC - Medicina Tradicional Chinesa

MTT - Brometo de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

OMS - Organização Mundial de Saúde

ppm - Partes por milhão

PS - *Polygala senega*

Qct - Quercetina

RMN - Ressonância magnética nuclear

RMN ¹H - Ressonância magnética nuclear protónica

Rf - Factor de retenção

S1 - Sistema de eluentes 1, propanol-ácido fórmico-água (90:1:9)

S2 - Sistema de eluentes 2, butanol-acetona-ácido acético glaciado-água (35:35:10:20)

S3 - Sistema de eluentes 3, acetato de etilo-ácido fórmico-ácido acético glaciado-água (100:11:11:27)

TAC - Tomografia axial computadorizada

TLC - *Thin layer chromatography* - Cromatografia em camada fina

TMS - Tetrametilsilano, Si(CH₃)₄

Tr - Tempo de retenção

UV - Ultravioleta

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	v
Abreviaturas	vii
Índice	ix
Lista de Figuras	xi
Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Geral.....	2
1.2. A Medicina Tradicional no Mundo	3
1.3. Segurança em Medicina Tradicional.....	4
1.4. Produtos à base de plantas na MTC.....	8
1.5. Objectivo do Trabalho	10
1.6. A formulação em estudo.....	11
1.7. Generalidades sobre os compostos encontrados nas plantas em estudo	33
1.7.1. Alcalóides.....	33
1.7.2. Compostos fenólicos	35
1.8. Técnicas de análise usuais para os constituintes em estudo.....	37
1.8.1. Cromatografia	38
1.8.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC.....	39
1.8.1.2. Cromatografia em camada fina, TLC.....	44
1.8.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, RMN	47
1.8.3. Espectroscopia de Infravermelho, IV.....	51
Capítulo 2. Resultados e Discussão	53
2.1. Estudo da formulação por HPLC-DAD.....	54
2.2. TLC de <i>screening</i>	61
2.3. Cromatografia (TLC) Preparativa.....	66
2.4. Resultados obtidos por RMN ¹ H	69
2.6. Outros testes de pesquisa de toxicidade.....	77
2.6.1. Pesquisa geral de alcalóides e específica de berberina.....	77

2.6.2. Testes de Viabilidade Celular.....	78
Capítulo 3. Conclusões.....	83
Capítulo 4. Experimental	87
4.1. Materiais	88
4.1.1. Amostras e preparação dos extractos.....	88
4.1.2. Reagentes.....	88
4.1.3. Equipamentos	89
4.1.4. Material.....	90
4.2. Metodologias.....	91
Bibliografia.....	97

Lista de Figuras

Figura 1 - <i>Coptis chinensis</i> . 1. Planta completa com flores; 2. Sépala; 3. Pétala; 4. Fruto	15
Figura 2 - Raiz de Huang Lian.....	15
Figura 3 - <i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch. 1. Planta inteira; 2. Raiz.	18
Figura 4 - <i>Salvia miltiorrhiza</i> : flor (esquerda) e raiz (direita).....	20
Figura 5 - <i>Panax ginseng</i> : flor (esquerda) e raiz (direita)	23
Figura 6 - <i>Juncus effuses</i> : flor (esquerda) e medula do caule (direita)	25
Figura 7 - <i>Nelumbo nucifera</i> . 1. Flor; 2. Corte da raiz; 3. Semente	26
Figura 8 - <i>Polygala tenuifolia</i> Willd. 1. Planta completa; 2. Raiz; 3. Vista lateral da flor	28
Figura 9 - <i>Ziziphus jujubae</i> : ramo com fruto (esquerda) e fruto seco (direita).....	30
Figura 10 - <i>Platyclusus orientalis</i> (L.) Franch. 1. Ramo com fruto; 2. Folha; 3. Fruto; 4. Semente.	32
Figura 11 - Exemplo de esquema geral para extracção e purificação de alcalóides.....	34
Figura 12 - Estrutura base dos alcalóides berberina, coptisina, dauricina, neferina, etc.....	35
Figura 13 - Da esquerda para a direita: ácido siquímico, ácido cinâmico, ácido benzóico.....	36
Figura 14 - da esquerda para a direita: 1,2 - benzopirona, piranocumarina e psoraleno (exemplo de furanocumarina linear	37
Figura 15 - Diferentes estruturas de flavonóides. da esquerda para a direita: flavona, isoflavona e catequina.....	37
Figura 16 - Aparelho de HPLC-DAD do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.....	40
Figura 17 - Exemplo de um cromatograma	43
Figura 18 - Separação de picos melhorada devido a alteração na razão metanol/água (3% para situação A e 7% para situação B)	44
Figura 19 - Espectro RMN ¹ H do etanol.....	48
Figura 20 - Orientação dos núcleos de hidrogénio na ausência (esquerda) e na presença (direita) de um campo magnético exterior, H ₀	49
Figura 21 - Desdobramento dos picos e triângulo de Pascal	50
Figura 22 - Representação esquemática de um espectroscópio de RMN.....	51
Figura 23 - Modos vibracionais das ligações moleculares.....	52

Figura 24 - Análise preliminar da amostra BH1: extracção com etanol 80% do conteúdo de 10 cápsulas (5,03307g). A - Perfil cromatográfico completo, obtido com o sobrenadante, centrifugado e microfiltrado. B - Ampliação para AU 0,2	55
Figura 25 - Análise preliminar da BH1: hidrólise da mucilagem da amostra. A - Perfil cromatográfico completo, obtido com a solução centrifugada e microfiltrada. B - Ampliação para AU 0,15	56
Figura 26 - Espectros UV obtidos por DAD da hidrólise da mucilagem da amostra BH1.....	57
Figura 27 - Perfil cromatográfico da amostra BH1 em solução 9% de acetato de chumbo obtido por HPLC-DAD.....	58
Figura 28 - Perfil cromatográfico da amostra BH3 obtido por HPLC-DAD	59
Figura 29 - Espectros UV obtidos por DAD da amostra BH3	59
Figura 30 - Espectro UV da berberina padrão obtido por DAD. Em cima apresenta-se a representação 2D do perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD.	60
Figura 31 - TLC para pesquisa de alcalóides sem revelador. A - sob a luz UV de 254 nm; B - sob a luz UV de 366 nm; C - com reagente de Dragendorff à luz natural.	62
Figura 32 - TLC comparativa das amostras BH1 e BC, juntamente com extracto de <i>Polygala senega</i> (PS) e padrão de berberina (BBR). Eluição com eluente S1. A. Visualização a 366 nm. B. Visualização a 254 nm; C. Visualização à luz natural.....	63
Figura 33 - TLC para pesquisa de aminoácidos, obtido após aplicação do revelador ninidrina e de aquecimento. 1. L-Metionina; 2. DL-Alanina; 3. L-Prolina; 4. L-Citrulina; 5. L-Hidroxiprolina; 6. L-Fenilalanina	64
Figura 34 - TLC preparativa da BH1 utilizando o eluente S2 para separação de aminoácidos, com aplicação de revelador ninidrina do lado esquerdo. Aplicada amostra BH1 e padrões de alanina (Ala) e de fenilalanina (Fen).....	65
Figura 35 - TLC para pesquisa de flavonóides da amostra BH1 e do padrão de quercetina (Qct). A - visualização a 254 nm; B - Visualização a 366 nm.....	66
Figura 36 - TLC preparativa de BH1: eluição com etanol-amoniaco (20:1), observada sob lâmpada UV com $\lambda = 254$ nm (A) e $\lambda = 366$ nm (B)	68
Figura 37 - TLC preparativa da amostra BH1 e do padrão de berberina (BBR) usando o sistema de eluentes S1. (Visualização a $\lambda = 366$ nm)	68
Figura 38 - Espectros de RMN ^1H dos extractos AL-A e AL-B em clorofórmio deuterado.....	70
Figura 39 - Espectro RMN ^1H do extracto AL-C obtido em clorofórmio deuterado	71
Figura 40 - Espectro de RMN ^1H do extracto AL-B em metanol deuterado	72

Figura 41 - Espectro RMN ¹ H do padrão de berberina em metanol deuterado, ampliação entre δ 3,1 e 5,1 ppm. Em sobreposição, à esquerda, o mesmo espectro segundo base de dados de referência.....	73
Figura 42 - Perfil IV do padrão de cloreto de berberina	74
Figura 43 - Perfis IV das fracções AL-A (em cima) e AL-B (em baixo).....	75
Figura 44 - Perfil IV da fracção AL-C	76
Figura 45 - Teste de detecção da berberina. A. Solução padrão; B. Solução padrão acidificada com HCl concentrado e com 5 gotas de solução 0,1 mol/dm ³ de KClO ₃	78
Figura 46 - Esquema representativo de distribuição da amostra para testes de viabilidade celular. 1 e 2 - Poços de controlo, macrófagos em substrato puro; 3 e 4 - Aplicação de 30 μ L de E ₁ , solução correspondente a 1 dose diária de BH3; 5 e 6 - Aplicação de 30 μ L de E ₂ , solução correspondente a 2 doses diárias de BH3.	79
Figura 47 - Resultado do teste de citotoxicidade da formulação BH3 em macrófagos.....	80
Figura 48 - Ensaio preliminares de actividade anti-inflamatória. A1-A4 - Células de controlo; B1-B4 - Controlo de reagente; C1 e C2 - Teste da solução E ₁ ; C3 e C4 - Teste da solução E ₂	81

Capítulo 1. Introdução

1.1. Geral

Desde tempos imemoriais que o Homem procura soluções para os seus problemas diários. Fome, doença, frio, abrigo e segurança foram os primeiros problemas a requerer atenção. Cedo se apercebeu de que alguns produtos tinham efeitos no organismo, uns nocivos, outros agradáveis, outros ainda benéficos. Plantas, partes de animais e minerais foram desde cedo utilizados para tentar melhorar a qualidade de vida das pessoas. Entre eles, as plantas ocuparam desde sempre uma posição de destaque. A Medicina Ocidental há muito que identificou plantas que nos ajudam a combater doenças e no último século conseguiu identificar, dentro dessas plantas, os compostos que realmente actuam no organismo. A evolução da Química permitiu que muitos desses compostos fossem sintetizados em laboratório, ao invés de extraídos das plantas de origem, a partir de outros mais comuns ou mais económicos. No entanto, em regiões do globo com menor acesso a estes medicamentos como o Oriente (China, Tailândia, Japão), África Negra (África do Sul, Angola, Kalahari) ou América Central e América do Sul, entre outras, é comum o uso de extractos de plantas ou misturas de extractos para tratar desde as mais simples dores de cabeça a infecções renais ou problemas cardíacos. Parece não haver nada que estes medicamentos naturais à base de plantas não curem, desde males físicos a males da alma. Usados por curandeiros tribais e por médicos e farmacêuticos, as virtudes destes “remédios” são inegáveis.

Hoje em dia, com o acesso global a vários produtos, tem-se verificado uma mistura cada vez maior do consumo de vários tipos de medicamentos, incluindo formulações que são administradas em Medicina Tradicional Chinesa. Atendendo a que muitas dessas formulações contêm extractos de plantas com graus de toxicidade apreciável e que são vendidas no Ocidente sem controlo efectivo, importa que se façam ensaios de pesquisa de moléculas activas que possam colocar em risco a Saúde Pública.

1.2. A Medicina Tradicional no Mundo

Durante as últimas décadas, a Medicina Tradicional (MT) começou a ganhar relevo em todo o Mundo. Usada como principal sistema de saúde dos pobres nos países em desenvolvimento, passou a ser usada como um complemento ao sistema de saúde em vigor nos países mais desenvolvidos, ou mesmo como um seu substituto.

Um estudo realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS)^[1] indica que 70-80% da população mundial utiliza estes medicamentos não convencionais à base de extractos de plantas.

A MT é vasta e possui uma longa história, sendo difícil de definir. Segundo a OMS trata-se do somatório do conhecimento, competências e práticas baseados nas teorias, crenças e experiências que são intrínsecos de diferentes culturas, quer sejam ou não explicáveis, usados para a manutenção da saúde, assim como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de patologias físicas e psíquicas^[1].

As práticas relacionadas com a MT variam grandemente de país para país uma vez que são influenciadas por factores como a cultura, as crenças, a história, acções pessoais e filosofia desse povo^[1]. No entanto, a sua utilização nos dias actuais não é assim tão simples de explicar. Em muitos países em desenvolvimento, o acesso a medicamentos e a serviços médicos certificados é difícil, quer pela sua falta quer pela escassez de recursos económicos da população.

As práticas curativas evoluíram ao longo dos séculos, dando origem à Medicina e práticas medicinais actuais, assim como ao fabrico de produtos para curar. A partir de observações empíricas e da prática da tentativa-e-erro, surgiram ideias e teorias sobre as doenças e o que as poderia combater. Com o nascer do método científico e o aparecimento da Química como ciência, os primeiros medicamentos foram sendo criados e aperfeiçoados até chegar aos medicamentos actuais, tal como os conhecemos hoje.

A China é uma referência a nível mundial no que se refere à Medicina não Ocidental. A sua MT, cujos conhecimentos foram passados de geração em geração desde há

milénios, foi uma das primeiras a surgir e é uma das poucas que se mantém ainda em utilização e com cada vez mais seguidores. Desde a acupunctura às massagens Shiatsu, da quiroprática aos preparados de plantas medicinais, à medida que o tempo passa mais países aderem aos tratamentos da Medicina Tradicional Chinesa (MTC)^[2]. A desconfiança gradualmente maior dos povos ocidentais face à Medicina Ocidental deve-se à falta de resultados ou ao facto de não os induzir de forma suficientemente rápida. Outros ainda receiam os efeitos secundários dos medicamentos farmacêuticos que a Medicina convencional prescreve, alguns dos quais tão poderosos quanto a doença que os tornou necessários ou ainda, tendo-os tomado, desenvolveram resistência aos seus efeitos, o que os torna inúteis. De notar que os efeitos nocivos de muitos destes medicamentos são cumulativos e podem actuar sobre o sistema nervoso central, o fígado ou os rins, todos partes importantes do corpo humano.

Estes factores tornam os medicamentos à base de plantas existentes na Medicina Tradicional cada vez mais apelativos, pois, no imaginário das pessoas, o que é natural não pode causar tanto dano como o que é sintético. Esta ideia, tantas vezes incorrecta demonstra com pequena margem para dúvidas que há na população geral uma declarada falta de conhecimentos nesta área científica. Esta falha leva à tomada de decisões tão importantes e frequentemente vitais baseadas apenas no diz-que-disse. Graves consequências podem advir da aplicação de técnicas e/ou produtos inadequados para a doença de que sofrem, pior por vezes do que nada fazer. Outro motivo que leva ao aumento da popularidade e utilização das medicinas tradicionais noutros países que não os de origem é mais prosaico e está relacionado com as vagas de migração que se verificam entre países^[1].

1.3. Segurança em Medicina Tradicional

Em geral, a população preocupa-se com a sua saúde e com as consequências que os medicamentos ingeridos podem trazer. É esse um dos motivos para o aumento da popularidade dos produtos da medicina tradicional nos países desenvolvidos: como

referido atrás, "o que é natural é bom" é a ideia generalizada. O que a maioria não sabe é que o controlo de qualidade nestes produtos é reduzido em grande parte dos casos. Os medicamentos tradicionais continuam a ser produzidos segundo as mesmas técnicas milenares, com poucas concessões mesmo às mais básicas técnicas de saneamento na sua produção. O profissionalismo por parte dos prestadores destes serviços nem sempre é o desejável e a contaminação dos produtos naturais é sempre uma possibilidade real. A eficácia e segurança dos medicamentos nem sempre estão comprovadas, sendo esta uma das preocupações de organizações de saúde pública e de governos. Juntando a estes o facto de vários desses produtos serem comercializados internacionalmente, torna-se importante um apertado controlo de qualidade sobre todas as fases de produção e distribuição. Devido à globalização da utilização da MT, cuidados em termos de segurança impõem-se. Alguns são simples e poderiam evitar muitos problemas, como reacções alérgicas a alguns dos componentes presentes nos preparados. Trata-se da verificação botânica: uma lista completa e correcta das plantas presentes na mistura. Alguns produtos comercializados em diversos países possuem esta informação, mas são poucas as empresas exportadoras que realmente fazem a identificação de forma inequívoca. Em muitos casos, em que a identificação das plantas existe, apenas o nome chinês está presente. Uma sugestão da OMS e de outros organismos é a de que os rótulos contenham as designações das plantas de acordo com a taxonomia latina, sinónimos e nomes comuns, assim como as partes das plantas que foram utilizadas^[1].

Tal como acontece em tantas outras regiões do Mundo, a União Europeia instituiu, no seu território, todo um conjunto de regras com vista a uniformizar procedimentos em todos os Estados-Membros e a proteger os seus cidadãos. Como tal, existem regras para a comercialização de produtos medicinais, constantes na Directiva 2001/83/EC^[3] entre outras. Segundo esta norma europeia, "Produto Medicinal" é todo o produto que se destina ao diagnóstico, tratamento ou modificação de sintomas.

Tanto os medicamentos prescritos pela MTC como os produtos homeopáticos são regulados por esta norma, tal como os fármacos com ou sem receita médica que a

Medicina Ocidental prescreve. No entanto, a Directiva só é seguida até certo ponto. Muito embora os estudos da eficácia sejam requeridos; apesar de ser necessário apresentar relatórios contendo procedimentos e controlos de qualidade, listas de matérias-primas e excipientes; independentemente de ser necessário indicar no rótulo a composição e a dosagem; não obstante todas estas normas e regulamentos (que podem ser consultadas em maior detalhe na Directiva 2001/83/EC), é possível ocorrerem erros e enganos, acidentes e atalhos na produção dos produtos utilizados na MTC. Há várias formas de tais passos serem dados, percorrendo um caminho que conduz à ineficácia no melhor dos casos ou à morte no pior^[4]:

- utilização de matérias-primas alternativas – embora especialistas não concordem e a Química corrobore essa posição, responsáveis pela colheita/recolha das plantas e outros materiais necessários para a produção de um medicamento podem optar por outro pertencente à mesma Família (mas cuja composição química pode ser radicalmente diferente);

- utilização de matérias-primas mal-identificadas – erros no acto de identificação das plantas colhidas podem conduzir a problemas devido a diferentes composições químicas das plantas, tal como na situação anterior;

- utilização de matérias-primas contaminadas – ocorrem situações em que os campos são contaminados pela utilização de pesticidas nocivos absorvidos pela planta ou por metais pesados de diversas fontes;

- má preparação dos materiais – diversas plantas devem ser pré-preparadas antes de poderem ser utilizadas nos medicamentos, de modo a eliminar toxicidade ou a potenciar os efeitos benéficos pretendidos. A falha neste passo pode significar a existência da toxicidade no medicamento.

O estabelecimento de regras e de padrões de qualidade nas Medicinas Tradicionais e nos seus produtos é assim um desafio que os governos e investigadores estão a tentar ultrapassar. A OMS desenvolveu e emitiu uma série de linhas orientadoras técnicas para ajudar a estabelecer padrões de pesquisa e avaliação dos produtos da medicina tradicional, como resultado de um esforço iniciado em 1997. O principal foco destas

orientações é a segurança e eficácia dos produtos^[1].

Os registos históricos de utilização da MT atestam, em certa medida, a sua eficácia. Uma prolongada história de utilização sem efeitos secundários adversos é, para muitos, prova suficiente da eficácia e segurança dos produtos. De notar no entanto que a relação entre MT e reacções adversas pode não ser completamente conhecida, pois muitas vezes os consumidores não associam uma coisa com a outra por desconhecerem que determinado produto possa ser tóxico. Outras tantas vezes não denunciam o aparecimento dessas reacções por falta de tempo, falta de conhecimentos, falta de vontade ou falta de disponibilidade financeira. Esta é uma falha grave, uma vez que é a partir da informação sobre casos adversos que se pode concluir sobre a validade e segurança de um tratamento.

Um estudo histórico da utilização da Fitoterapia demonstra que, excepto em casos de sobredosagem ou de preparação inadequada dos materiais, estes produtos são geralmente seguros - com a ressalva expressa atrás^[5]. No entanto, em muitos países a sua utilização não é ainda reconhecida. Existem, na literatura e em execução, diversos estudos científicos, em vários países, que visam caracterizar os medicamentos utilizados na medicina tradicional, em termos de eficácia e de segurança. Destes estudos já surgiu que alguns dos compostos presentes nos preparados são cancerígenos, outros tóxicos e outros ainda teratogénicos. Apesar disso, mais estudos são necessários e a qualidade da pesquisa precisa de ser melhorada. Por exemplo, devido à abordagem holística com que a MTC encara o ser humano e o seu estado de saúde (física e mental), a avaliação da eficácia da MTC pode ser bastante diferente da que se faz para a Medicina Ocidental - os métodos usados nesta podem não ser adequados para aquela.

1.4. Produtos à base de plantas na MTC

A MTC continua a fazer um extenso uso da Fitoterapia na sua prática normal dado que até há poucas décadas era a fonte de moléculas activas usadas nos tratamentos e que deram origem a vários medicamentos. A sua popularidade aumentou de tal forma nas últimas décadas que se torna urgente analisar melhor o que consta dos produtos usados. A Fitoterapia engloba os tratamentos várias patologias do ser humano, incluindo a restauração da saúde assim como a prevenção das doenças. Para esse efeito, faz uso das diversas partes das plantas, aéreas ou subterrâneas, quer no seu estado natural ou preparadas de alguma forma. Podem ser usadas ainda outras partes derivadas da planta, como resinas, gomas, sumos ou óleos.

A MT em algumas culturas aborda a saúde humana de uma forma holística, ou seja, globalizante. Ao contrário da Medicina Ocidental, a MTC pode não se limitar a tratar sintomas. Um traço comum às várias Medicinas Tradicionais, como a Chinesa ou a Ayurvédica, consiste na procura das causas dos desequilíbrios que assolam o indivíduo, tratando todo o corpo e não apenas a parte afectada. Uma consequência desta abordagem é uma maior complexidade dos preparados utilizados, pois serão compostos de diferentes plantas destinadas a tratar diferentes problemas. Mas a complexidade destes preparados não se fica por aqui. Em alguns casos, como algumas farmácias, o medicamento é preparado especificamente para a pessoa que o pede, de acordo com as suas necessidades – ou seja, um medicamento destinado a tratar um mesmo mal pode ter n formas de preparação, com diferentes concentrações dos diversos componentes. Pode ocorrer também alteração da fórmula de base, quando uma das plantas a utilizar é demasiado dispendiosa ou está em falta, fazendo-se uso de uma outra análoga. Começa então a ficar clara a raiz da complexidade do estudo dos produtos à base de plantas. No entanto, em países em que este tipo de prescrição é frequente, a manipulação nas farmácias e/ou nas ervanárias é prática corrente, como, por exemplo, na China e na Índia.

Outra característica curiosa da Fitoterapia em MTC é a forma como as plantas medicinais são conjugadas de modo a interagirem. É um facto pouco conhecido que, na MT em geral, e na MTC em particular, se utilizam plantas e outros compostos que,

por si sós, são tóxicos em maior ou menor escala. Nos milhares de anos em que a MTC tem sido colocada ao serviço da saúde, esses compostos foram organizados como sendo de Toxicidade Elevada, Toxicidade Alta, Toxicidade Moderada e Toxicidade Baixa ou inexistente. Apesar da reconhecida toxicidade das plantas a sua utilização no tratamento de doenças é possível uma vez que os mesmos compostos que em certas doses (específicas para cada um) são tóxicos, em pequenas quantidades têm propriedades benéficas^[5]. Tudo tem dois lados: ganhos e perdas, vantagens e desvantagens, benefícios e riscos. As plantas não são excepção. Nas diversas actividades humanas, desde a Agricultura à Medicina, o Homem sempre fez uso das plantas tóxicas. Um exemplo disso é a utilização das plantas como insecticidas nas plantações agrícolas ou a sua utilização como microbicida. No entanto, diversos estudos clínicos determinaram que as mesmas substâncias que tornam a planta tóxica também têm actividade terapêutica^[5].

Estudos realizados em diversos países (Estados Unidos da América, Alemanha, Itália, China, etc.) referem que existem centenas de plantas tóxicas no mundo. Divididas em mais de cem Famílias, a sua distribuição pelo mundo não é uniforme mas existem em todo o planeta. À medida que a utilização de produtos à base de plantas se foi alastrando, os estudos das mesmas deixou de ser uma conveniência para se tratar de uma necessidade, com profundidade científica. Tendo-se estendido para lá da simples Botânica, grandes avanços foram feitos em termos de química, farmacologia, clínica e cultivo das plantas^[6]. No entanto, estes estudos estão longe de estar terminados ou de ser conclusivos.

Os preparados à base de plantas podem ser de dois tipos: simples (produzidos a partir de uma única planta) ou complexos (produzidos a partir de uma mistura de plantas), sendo que na sua maioria são complexos, constituídos, em média, por 8 ou mais plantas diferentes, como acontece na MTC. O objectivo destas misturas é a potenciação dos efeitos benéficos daquela que é a planta principal (que contém o composto activo) e a minimização ou anulação dos seus efeitos tóxicos. A forma de preparação altera também os compostos presentes na planta fresca, diminuindo, em princípio, a sua toxicidade: por exemplo, a planta Acónito só pode ser utilizada se for

primeiro sujeita a tratamento. O extracto receberá um nome consoante o tratamento que recebe, sendo possível encontrar-se a forma não tratada (*shengfuzi*), a forma fervida (*nifuzi*), ou outros que se obtêm a partir desta por alternância entre tratamento com cloreto de sódio, secagem, fervuras e mesmo aplicação de vapores de enxofre, dependendo do objectivo a atingir. No mínimo, as raízes de Acónito necessitam de 30 minutos de fervura antes de poderem ser utilizadas^[7].

1.5. Objectivo do Trabalho

De tudo o exposto anteriormente, surge uma preocupação no que se refere à segurança dos consumidores. O estudo do risco e da toxicidade dos produtos à base de plantas da MTC é uma necessidade e está a ser realizado já em diversos países. Em Portugal não há, à data, qualquer trabalho publicado nesse sentido, o que cria um vazio que deve ser preenchido com a maior brevidade.

Para este efeito salientam-se diferentes formulações à base de plantas, referenciadas pelo número de fórmula ou pelo seu nome chinês, e que possuem na sua constituição plantas que são tóxicas – ou pelo menos plantas que contêm constituintes tóxicos. Com o objectivo de acalmar o espírito, tonificar e harmonizar, estimular ou limpar, cada uma delas tem efeito especificamente sobre um órgão ou conjunto de órgãos, actuando sobre os respectivos meridianos de acordo com a ideologia da MTC^[8]. Numa primeira abordagem às formulações da MTC, achou-se conveniente estudar fórmulas que pudessem ser de alguma forma utilizadas no tratamento da toxicod dependência. Diversos estudos demonstram que, entre outros, há alterações nos processos neurológicos do toxicod dependente, que se traduzem em alterações comportamentais e emocionais^{[9][10]}. De entre as diversas fórmulas disponíveis, foi seleccionada uma que possui uma planta de toxicidade reconhecida. Trata-se da fórmula **F137 – An Shen Wan** cuja constituição é apresentada na Tabela 1, doravante referida como F137.

1.6. A formulação em estudo

Tal como qualquer outra estrutura existente na Natureza, são muitos os compostos que constituem o material vegetal utilizado nas formulações à base de plantas e/ou outros produtos naturais. Vários estudos referem que, para se obter o máximo proveito de uma planta aquando do processo de extracção, é necessário atender à altura em que a planta é colhida^[11]. O ciclo vital das plantas faz com que, em diferentes alturas do ano, certos compostos estejam presentes em maior ou menor quantidade. Também diferentes partes da planta possuem diferentes constituintes ou diferentes percentagens do mesmo constituinte, dependendo da sua função. A tradição, em muitos casos corroborada pela ciência, estabeleceu alturas próprias para a colheita das plantas usadas na MT^[12]. Excluindo os típicos compostos existentes em todos os organismos vivos em maior ou menor percentagem (material genético, proteínas, hidratos de carbono), entre os constituintes mais comuns encontramos os compostos fenólicos (que se dividem em ácidos fenólicos, compostos cumarínicos, flavonóides, taninos e compostos quinónicos), os alcalóides, os saponóides e os terpenóides, entre outros^[13].

1.6.1. Amostra F137 – An Shen Wan

A fórmula F137 é composta por 10-12* extractos diferentes (Tabela 1), segundo informação recolhida junto da Universidade de Medicina Tradicional Chinesa^[14]

Tabela 1 - Composição da F137 segundo a literatura e presente nas amostras adquiridas **

Nome Latino do Fármaco	Nome Chinês	Origem (Nome Latino da Planta)	Nome Comum Português (quando aplicável)	Parte utilizada	Percentagem		
					Recomendada	Amostras BH 1, 2 e 3	Amostra BC
Rizhoma Coptidis	Huang Lian	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	-	Raiz	6,8%	8,32	7,1
Plastrum geoclemys reev.	Gui Ban	<i>Chinemys reevesii</i>	Tartaruga de água doce	Carapaça	11,4%	-	-
Radix Rehmanniae recens	Sheng di huang	<i>Rehmannia glutinosa</i> Libosch	-	Raiz	11,4%	13,93	11,9
Radix Salvia miltiorrhizae	Dan Shen	<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Sálvia	Raiz	9,1%	11,12	9,5
Sclerotium Poriae Paradicis	Fu Shen	<i>Poria cocos</i>	Tipo de cogumelo	Camada exterior	6,8%	-	-
Radix Ginseng	Ren Shen	<i>Panax ginseng</i> ou <i>Panax quinquefolium</i>	Ginseng	Raiz	3,4%	4,16	3,5
Medulla Junci	Deng Xian Cao	<i>Juncus effuses</i> L.	Junco	Medula do caule	6,8%	8,32	7,1
Semen Nelumbinis	Lian Zi	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn.	Lótus	Semente	6,8%	8,32	7,1
Radix Polygalae	Yuan Zhi	<i>Polygala tenuifolia</i> Willd.	Polígala	Raiz	3,4%	4,16	3,5
Semen Ziziphi spinosae	Suan Zao Ren	<i>Ziziphus jujuba</i> Mill. Var spinosa (Bunge Hu ex H.F. Chou)	Tâmara chinesa	Semente	9,1%	11,12	9,5

Semen Biotae orientalis	Bai Zi Ren	<i>Thuja orientalis</i> ou <i>Biota orientalis</i> (L.) Endl	-	Semente	9,1%	11,12	9,5
Os Draconis	Long Gu	-	Osso fossilizado	Todo	15,9%	-	-
Concha Ostrae	Mu Li	<i>Ostrea gigas</i> Thunberg, <i>Ostrea talienwahnensis</i> Crosse ou <i>Ostrea rivularis</i> Gould	Ostra	Todo	-	19,43	16,7

* A diferença entre valores refere-se ao número de extractos recomendados pela Universidade de Medicina Tradicional Chinesa (12) e os presentes nas formulações adquiridas para estudo (10). Trata-se de outro exemplo da necessidade de se fazer cumprir a regulamentação referente aos produtos à base de plantas prescritos pelas medicinas tradicionais.

** A ordem pela qual os extractos foram apresentados é a constante no rótulo das amostras BH.

Este preparado é utilizado quando se pretende uma fórmula Harmonizante, tratando especificamente casos de sono perturbado por sonhos constantes, estados de ansiedade e inquietação, stress, nervosismo, palpitações, e tendo especial actividade sobre o coração.

Conforme se pode verificar pela análise da Tabela 1, nem todos os extractos que se combinam para preparar a fórmula são derivados de plantas. *Gui Ban*, *Concha Ostrae* e *Os Draconis* são derivados animais, respectivamente da carapaça da tartaruga de água doce, da concha de ostra e de ossos fossilizados. Pouca informação foi possível encontrar sobre estes extractos e os seus constituintes, o que teria sido interessante do ponto de vista de perceber de que forma podem contribuir para o tratamento. De acordo com algumas pesquisas informais realizadas, o objectivo destes constituintes é o de fornecerem cálcio ao preparado, e nenhum deles é, tanto quanto se sabe, tóxico, pelo que não são objecto deste projecto e a troca destes componentes torna-se irrelevante para a investigação. O mesmo é válido para o *Fu Shen*, que é preparado a partir de um cogumelo, sendo constituído principalmente por polissacarídeos e proteínas.

De notar ainda que as percentagens de cada planta utilizada para a produção da fórmula F137 (amostras adquiridas no mercado em 2011/2012) são ligeiramente diferentes das recomendadas^[14], e diferentes entre si, sendo a variação maior a de *Rehmannia recens*, com 2,53% a mais em relação ao recomendado pela Universidade de MTC em Portugal.

Das plantas que compõem esta fórmula, apenas a *Coptis chinensis* tem toxicidade reconhecida. A *Salvia miltiorrhiza* não tem toxicidade conhecida mas a sua parente *Salvia officinalis* sim. No âmbito deste estudo do controlo de qualidade das fórmulas utilizadas em MTC, foi decidido prosseguir com a análise das amostras de modo a procurar os constituintes típicos daquela planta ou seus derivados, assim como a identificar outros compostos presentes no produto acabado.

Rizhoma Coptidis - Huang Lian - Raiz de Coptis chinensis

Sendo uma das plantas mais utilizadas na MTC apesar da sua toxicidade, o *Huang lian* consiste no extracto retirado da raiz de uma planta de folha perene, sem caule, com uma altura que varia entre os 20 e os 50 cm (**Figura 1**). A raiz, parte da planta mais utilizada, tem cerca de 5 a 6 cm de comprimento, cor amarela acastanhada no exterior e amarela alaranjada no interior, sendo a parte central do corte transversal mais escura (**Figura 2**). O *Huang lian* tem um odor ténue, quando mastigado tinge a saliva de amarelo e o seu sabor é muito amargo, devido à forte presença de alcalóides na sua composição química.

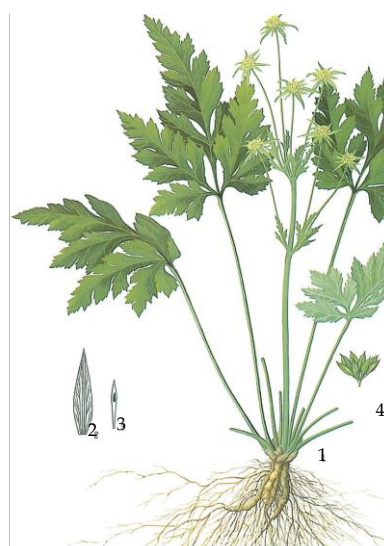


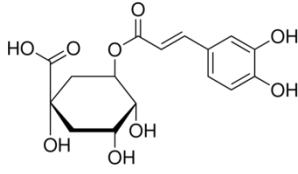
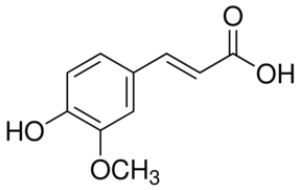
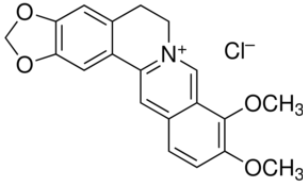
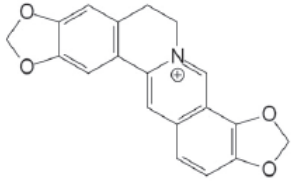
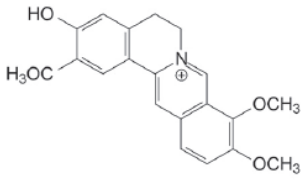
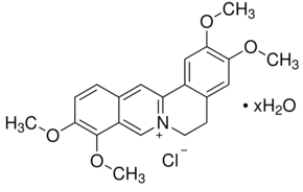
Figura 1 - *Coptis chinensis*. 1. Planta completa com flores; 2. Sépala; 3. Pétala; 4. Fruto^[8]



Figura 2 - Raiz de Huang Lian

Na **Tabela 2** podem encontrar-se alguns dos constituintes principais do *Huang lian* assim como as suas estruturas^{[15][16][17]}:

Tabela 2 - Constituintes principais da *Coptis chinensis*

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Ácido clorogénico</p> 	<p>Ácido ferúlico</p> 	<p>Berberina</p> 
<p>Coptisina</p> 	<p>Jatrorrizina</p> 	<p>Palmatina</p> 

Os constituintes mais abundantes, de estruturas moleculares semelhantes, pertencem à família dos alcalóides, possuindo diferentes graus de toxicidade.

A berberina, constituinte principal do *Huang lian*, está presente em diversas espécies vegetais e tem uma cor amarela e forte natureza fluorescente na gama de radiações ultravioleta (UV), podendo surgir em qualquer parte da planta^[18].

Dentro das quantidades recomendadas, considera-se o *Huang lian* perfeitamente seguro, mas pode tornar-se tóxico se essa dosagem for excedida. Existem estudos realizados^{[19][20]} para a toxicidade da berberina, quer através de administração oral, intravenosa ou intraperitoneal. Alguns envolvem testes animais (ratos e ratas), outros recorrem a células humanas - a berberina está a despertar o interesse da comunidade científica devido aos seus efeitos biológicos. Apesar da sua toxicidade, e precisamente devido aos efeitos que exerce no organismo, novos estudos começam a

surgir para possíveis aplicações em práticas anti-tumorais ou no tratamento da doença de Parkinson. Por exemplo, no que se refere esta última, a Fundação Michael J. Fox atribuiu recentemente uma bolsa a investigadores da Universidade de Coimbra de modo a aprofundar estudos relativos à actividade mitocondrial exibida pela berberina^[21].

Alguns dos sintomas devidos a reacções tóxicas incluem irritação cutânea, choque anafiláctico, tonturas, náuseas, ansiedade, dificuldade de respiração, arritmia, danos hepáticos, entre outros. Entre as patologias para as quais é tradicionalmente recomendado encontram-se a diarreia, gastroenterite, conjuntivite e outras. Foi também estudado para o tratamento da malária^[20]. Estes estudos também apontam para a possibilidade de interacções medicamentosas devido aos seus diversos efeitos biológicos.

Radix Rehmannia recens - Sheng di Huang - Raízes de *Rehmannia glutinosa* L. recentes

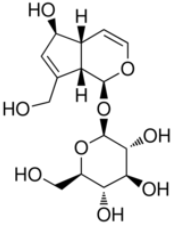
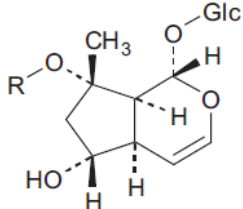
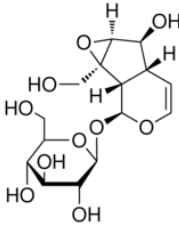
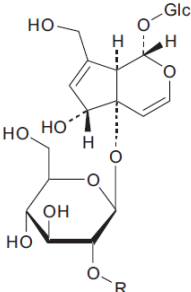
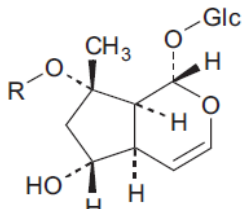
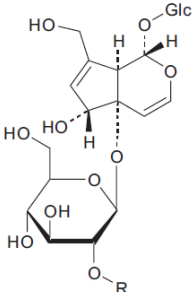
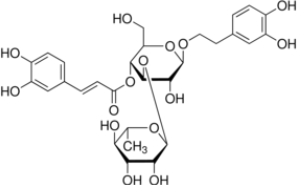
Trata-se de uma planta perene com cerca de 10 a 40 cm de altura, com raiz tuberosa alaranjada com diâmetro entre 3 e 6 cm, a qual pode ser utilizada fresca, seca ou com tratamento adequado, dependendo do fim a que se destina (**Figura 3**).

Tendo uma estrutura iridóide, os principais constituintes da raiz de *Rehmannia glutinosa* L. (**Tabela 3**^{[17][22]}) são, provavelmente, os responsáveis pela coloração amarela típica da raiz tuberosa - isto porque o verbascosídeo, também parte integrante da raiz, como derivado de ácido fenólico, não deverá apresentar coloração, sendo o mesmo válido para os polissacarídeos.



Figura 3 - *Rehmannia glutinosa* Libosch. 1. Planta inteira; 2. Raiz^[8].

Tabela 3 - Constituintes principais da *Rehmannia glutinosa* L.

Nome e Estrutura química	Nome e Estrutura química	Nome e Estrutura química
<p>Aucubina</p> 	<p>Ajugol (R = H)</p> 	<p>Catalpol</p> 
<p>Melitosídeo (R = H)</p> 	<p>Rehmanniosídeos* (R = Glic)</p> 	<p>Rehmanniosídeo D* (R = Glic)</p> 
<p>Verbascosídeo</p> 	<p>Diversos polissacarídeos</p>	

*Existem outros rehmanniosídeos, de estrutura base similar a estas mas possuindo outros radicais em locais diversos.

Radix Salvia miltiorrhizae - Dan Shen - Raiz de Salvia miltiorrhiza

O *Dan shen* é preparado a partir da raiz e rizomas de uma planta de folha perene que pode atingir uma altura entre 20 e 50 cm (**Figura 4**).

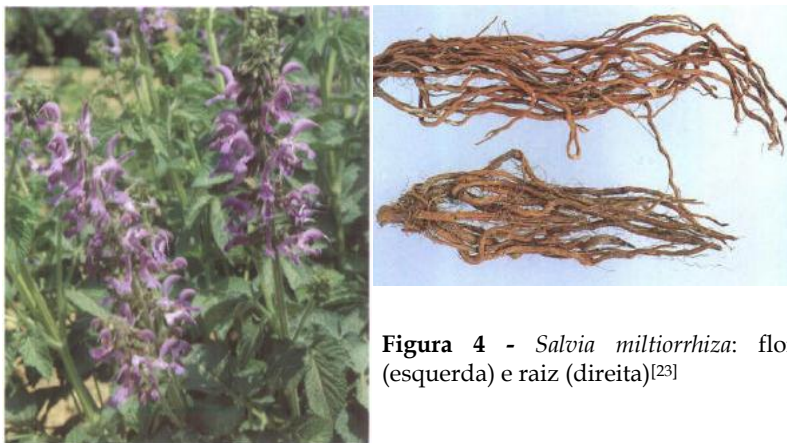
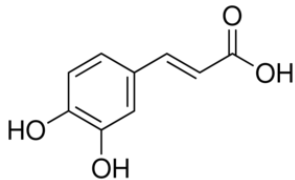
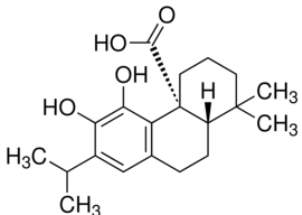
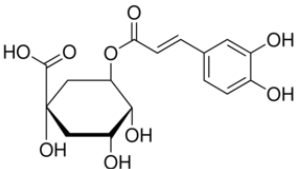
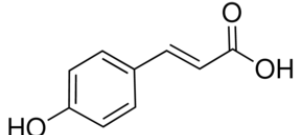
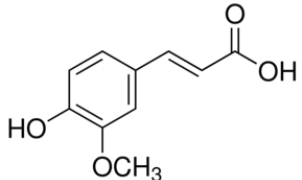
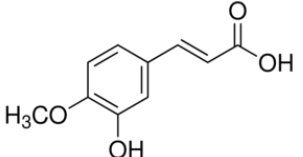
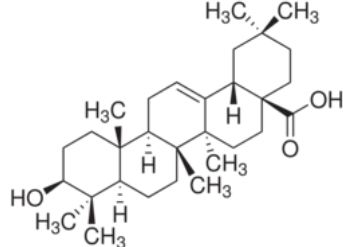
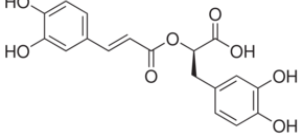
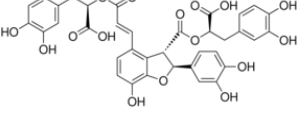
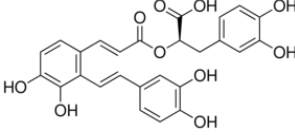
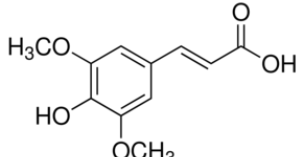
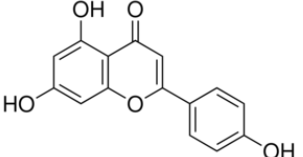
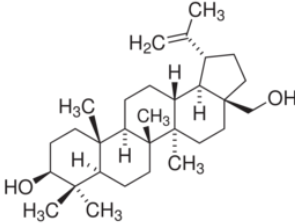
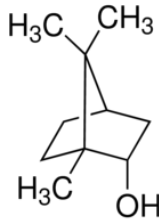
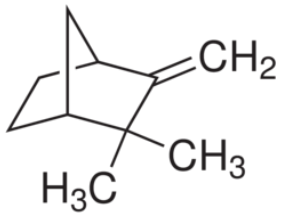
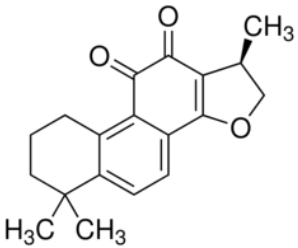
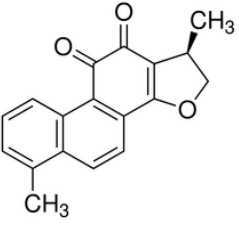
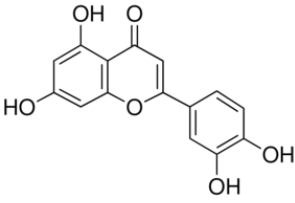
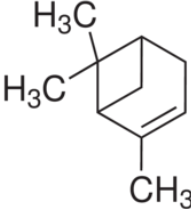
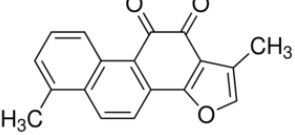
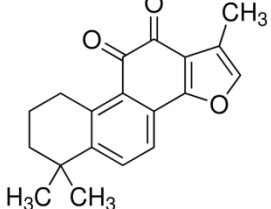
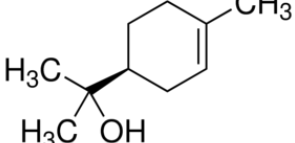


Figura 4 - *Salvia miltiorrhiza*: flor (esquerda) e raiz (direita)^[23]

Tem sido amplamente utilizada em MTC, sozinha ou em misturas com outras plantas, para o tratamento de doenças relacionadas com o coração, pois apresenta poucos efeitos secundários. Outras indicações terapêuticas incluem cancro, hepatite e doença renal crónica. Os seus constituintes bioactivos (**Tabela 4**), embora não sejam os únicos presentes na planta, podem ser divididos em duas categorias principais: as tanshinonas lipofílicas e os ácidos fenólicos hidrofílicos^{[12][17]}.

Tabela 4 - Constituintes principais da *Salvia miltiorrhiza*

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Ácido cafeico</p> 	<p>Ácido carnósico</p> 	<p>Ácido clorogénico</p> 
<p>Ácido p-coumárico</p> 	<p>Ácido ferúlico</p> 	<p>Ácido isoferúlico</p> 
<p>Ácido oleanólico</p> 	<p>Ácido rosmarínico</p> 	<p>Ácido salvianólico A</p> 
<p>Ácido salvianólico B</p> 	<p>Ácido sinápico</p> 	<p>Apigenina</p> 
<p>Betulina</p> 	<p>Borneol</p> 	<p>Canfeno</p> 

<p>Criptotanshinona</p> 	<p>Dihidrotanshinona</p> 	<p>Luteolina</p> 
<p>α e β-pineno</p> 	<p>Tanshinona I</p> 	<p>Tanshinona IIA</p> 
<p>α-terpineol</p> 		

O *Dan shen* é uma das plantas mais utilizadas na MTC, sendo a sua produção com qualidade um motivo de preocupação. As espécies *S. officinalis* e *S. przewalskii* M., pela sua semelhança em termos químicos, podem ser utilizadas como substitutas mas alguns constituintes são diferentes assim como a sua concentração^{[24][25]}. Estas diferenças podem parecer pequenas mas quando ocorre sobredosagem ou interação com outras plantas ou com medicamentos, as consequências podem ser graves.

Radix Ginseng - Ren Shen - Panax ginseng

O *Ren shen*, obtido a partir da secagem da raiz da planta *Panax ginseng* (**Figura 5**), foi utilizado na MTC como remédio universal durante centenas de anos, sendo as suas propriedades curativas quase míticas de acordo com antigos textos. O próprio termo “panaceia” deriva do nome desta planta.

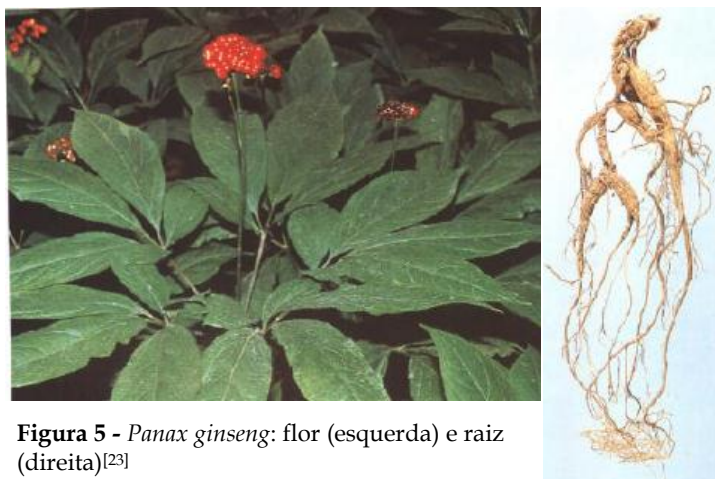
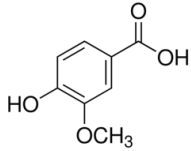
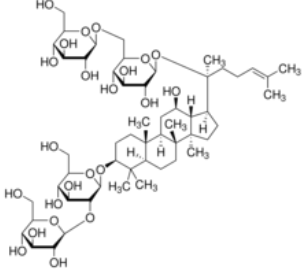
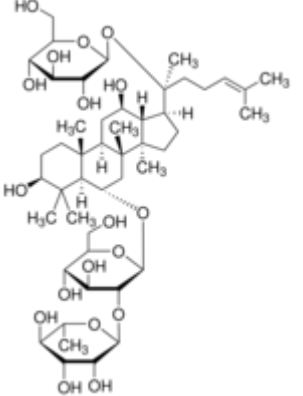
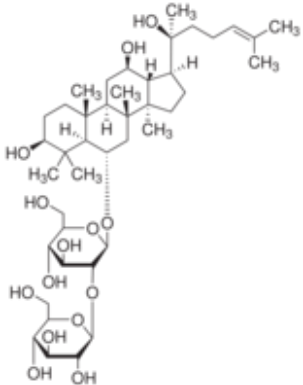
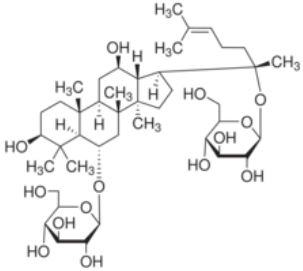


Figura 5 - *Panax ginseng*: flor (esquerda) e raiz (direita)^[23]

Embora a experiência da MTC derive principalmente da observação empírica de resultados e na utilização de costumes tradicionais, estudos mais recentes confirmaram que são vários os compostos químicos presentes na constituição do *Ren shen* que possuem actividade biológica. Esta actividade faz-se sentir tanto no sistema nervoso central como nos sistemas endócrino, cardiovascular e imunitário^{[9][26]}. Os principais responsáveis pela bioactividade do *Ren shen* são os denominados ginsenosídeos, conhecendo-se mais de 30, saponinas de estrutura-base muito semelhante constituída por quatro anéis fundidos com radicais oses em diversas posições. Na **Tabela 5** podem consultar-se alguns dos compostos principais do *Ren shen*^{[17][25]}.

Tabela 5 – Constituintes principais do *Panax ginseng*

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Ácido vanílico</p> 	<p>Ginsenoside Rb₁</p> 	<p>Ginsenoside Re</p> 
<p>Ginsenoside Rf</p> 	<p>Ginsenoside Rg₁</p> 	

Medulla Junci – Deng Xian Cao – Medula de Juncus effuses L.

Deng xian cao refere-se à medula do caule da planta *Juncus effuses* (Figura 6), uma planta que cresce principalmente em ambientes húmidos e que pode alcançar uma altura de 1,5 m. É utilizada no tratamento de inquietação insónia, dificuldade em urinar acompanhada de dor e em casos de ulceração da boca ou língua.



Figura 6 - *Juncus effuses*: flor (esquerda) e medula do caule (direita) [23]

Pouca informação fidedigna se conseguiu encontrar a respeito da constituição química desta planta. Estudos envolvendo diversas espécies da mesma família referem a presença de flavonóides e fenantrenos [27]. Sobre esta espécie vegetal, foi possível encontrar um artigo em chinês, cujo *abstract* refere a presença dos flavonóides luteolina, eriodictiol, 2', 5', 5, 7 - tetrahidroxiflavona e glucoluteolina, dos compostos aromáticos p-hidroxibenzoato de metilo e ácido vanílico, do ácido hexadecanóico e do alceno n-tetradecano[28]. No entanto, sem ter acesso ao estudo ou a outros, e não podendo confirmar esta informação, entendeu-se não colocar a tabela indicativa dos constituintes deste fármaco.

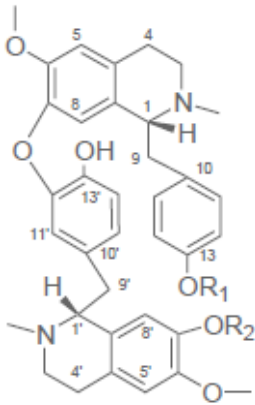
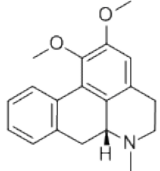
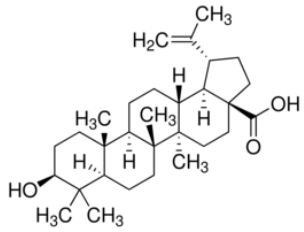
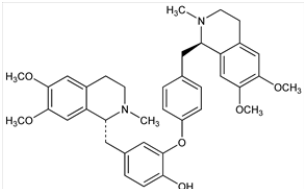
Semen Nelumbinis - Lian Zi - Nelumbo nucifera

O *Lian zi* é preparado a partir da semente da planta *Nelumbo nucifera* (**Figura 7**), uma planta aquática utilizada em diversos países do Oriente pelas suas propriedades medicinais mas também como fonte de alimentação já que quase todas as suas partes são comestíveis^[29]. É recomendado como diurético, antipirético, anti-inflamatório, entre outros. Os seus principais constituintes químicos bioativos são alcalóides, cuja estrutura pode ser consultada na **Tabela 6**^{[17][29][30]}:



Figura 7 - *Nelumbo nucifera*. 1. Flor; 2. Corte da raiz; 3. Semente^[8]

Tabela 6 - Constituintes principais da *Nelumbo nucifera*

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Liensinina</p> <p>$R_1 = H$</p> <p>$R_2 = CH_3$</p> <p>Isoliensinina</p> <p>$R_1 = CH_3$</p> <p>$R_2 = H$</p> <p>Neferina</p> <p>$R_1 = CH_3$</p> <p>$R_2 = CH_3$</p> 	<p>Nuciferina</p> 
	<p>Ácido betulínico</p> 
	<p>Dauricina</p> 

Os compostos liensinina, isoliensinina e neferina possuem estruturas-base semelhantes, diferindo apenas nos dois radicais indicados. Também a dauricina possui uma estrutura muito semelhante a estes compostos.

Radix Polygalae – Yuan Zhi – Raiz de Polygala tenuifolia Willd.

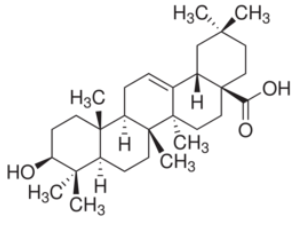
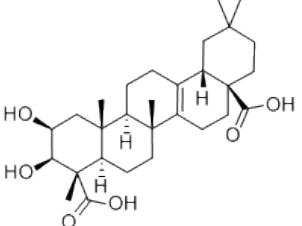
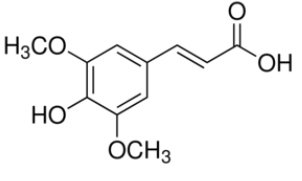
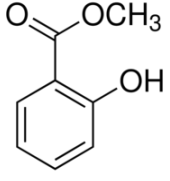
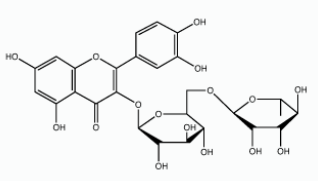
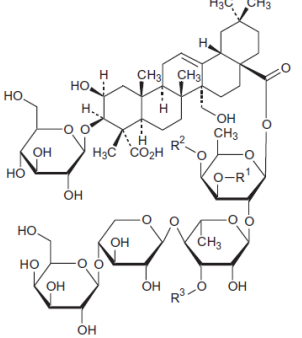
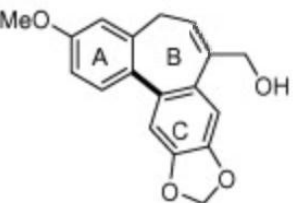
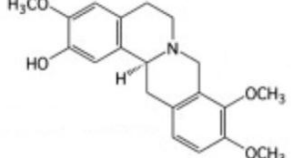
O *Yuan zhi* é preparado a partir das raízes da planta *Polygala tenuifolia* Willd. (**Figura 8**), perene, que cresce até aos 25 a 40 cm de altura. Possui um cheiro característico que lhe é conferido pelo composto salicilato de metilo, presente numa concentração que varia entre os 0,1 e os 0,3% (**Tabela 7**). Os restantes compostos principais possuidores de bioactividade pertencem à família das saponinas, contendo uma estrutura base semelhante característica dos compostos desta planta, tendo recebido o nome geral de seneginas^[31].



Figura 8 - *Polygala tenuifolia* Willd.
1. Planta completa; 2. Raiz; 3. Vista lateral da flor^[8] (adaptado)

É utilizada para o tratamento de insónias ou sono inquieto, esquecimento, palpitações, como expectorante, sedativo ou laxante^{[23][32]}. Devido aos efeitos sedativos e anti-psicóticos que apresenta, foi estudada a sua influência sobre o comportamento de indivíduos dependentes de cocaína^[10]. Também é uma das plantas mais utilizadas na MTC para o tratamento de doenças relacionadas com a memória: problemas de memória simples ou a doença de Alzheimer^[33]. Em termos da sua composição química, como referido, predominam as saponinas, embora também se encontrem alguns ácidos fenólicos e outros compostos^{[17][31][34]}:

Tabela 7 - Constituintes principais da *Polygala tenuifolia* Willd.

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Ácido oleanólico</p> 	<p>Ácido poligálico</p> 	<p>Ácido sinápico</p> 
<p>Metilsalicilato</p> 	<p>Rutina</p> 	<p>Saponinas triterpénicas (Seneginas)</p> 
<p>Tenuifolina</p> 	<p>Tetrahydro- columbamina</p> 	

Semen Zizyphy spinosae - *Suan Zao Ren* - Semente de *Ziziphus jujubae* Mill. var *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F. Chou

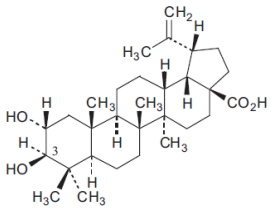
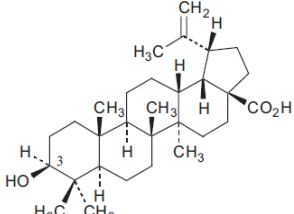
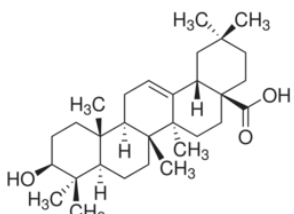
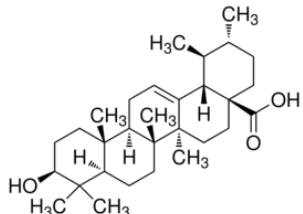
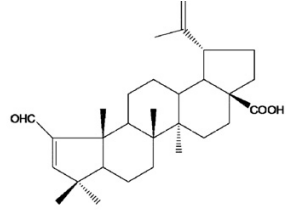
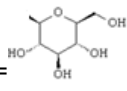
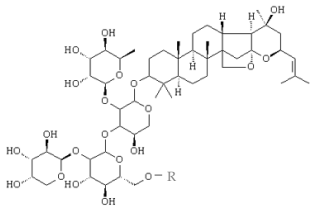
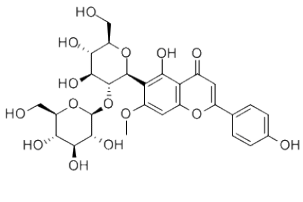
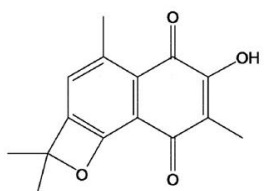
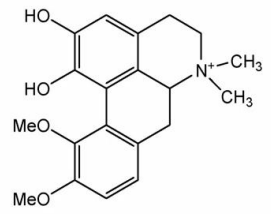
O *Suan zao ren* obtém-se a partir da secagem da semente do fruto da planta *Ziziphus jujubae* Mill. var *spinosa* (Bunge) Hu ex H.F. Chou (**Figura 9**), uma planta espinhosa comum na China.



Figura 9 - *Ziziphus jujubae*: ramo com fruto (esquerda) e fruto seco (direita)^[23] (adaptado)

A sua utilização é recomendada em situações de sono perturbado, ansiedade ou excesso de transpiração devido a debilidade^{[23][36]} embora haja registos da utilização das diferentes partes da planta no tratamento de doenças como distúrbios digestivos, problemas hepáticos, infecções cutâneas, cancro e imunitários, entre outras^{[36][37]}. O fruto foi, inclusivamente, utilizado para atenuar os efeitos tóxicos de plantas da Família Euphorbia^[36]. Na sua constituição química predominam os triterpenos e as saponinas triterpénicas (**Tabela 8**)^{[17][22][35][36][37]} :

Tabela 8 - Constituintes principais da semente de *Ziziphus jujubae*

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Ácido alfitólico</p> 	<p>Ácido betulínico</p> 	<p>Ácido heptadecanóico</p> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_2\text{COOH}$
<p>Ácido láurico</p> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH}_2\text{COOH}$	<p>Ácido oleanólico</p> 	<p>Ácido palmitoleico</p> $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_2\text{CH}=\text{CHCH}_2(\text{CH}_2)_5\text{CH}_2\text{COOH}$
<p>Ácido ursólico</p> 	<p>Ácido ziziberanólico</p> 	<p>Jubosídeo A e B</p> <p>A: R = </p> <p>B: R = H</p> 
<p>Spinosina</p> 	<p>Ziziberanona</p> 	<p>Zizifusina</p> 

Semen *Biotae orientalis* – Bai Zi Ren – Semente de *Biota orientalis*

O Bai zi ren é obtido a partir da semente o arbusto *Platyclusus orientalis* (L.) Franch. (**Figura 10**), também conhecida como *Biota orientalis* ou *Thuja orientalis* (L). É frequentemente utilizada no tratamento de distúrbios do sono e da memória, no tratamento da obstipação ou como anti-inflamatório^{[23][38]}.

Sendo a maior parte dos estudos realizada no âmbito das propriedades dos constituintes das folhas, sobre a constituição da semente só foi possível determinar que os principais compostos presentes pertencem aos terpenos. Assumindo que alguns dos compostos possam ser comuns a folhas e sementes, os principais constituintes possuidores de bioactividade podem ser consultados na **Tabela 9**^{[39][40]}.

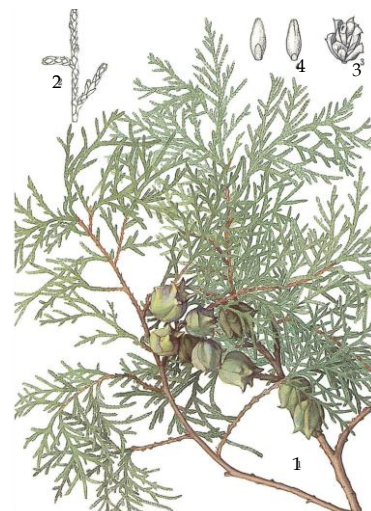


Figura 10 - *Platyclusus orientalis* (L.) Franch. 1. Ramo com fruto; 2. Folha; 3. Fruto; 4. Semente. ^[8] (adaptado)

Tabela 9 - Constituintes principais da folha de *Platyclusus orientalis* (L.)

Nome e Estrutura Molecular	Nome e Estrutura Molecular
<p>Quercetrina</p>	<p>Quercetina</p>
<p>Rutina</p>	<p>Amentoflavona</p>

1.7. Generalidades sobre os compostos encontrados nas plantas em estudo

Como foi possível verificar atrás, os constituintes bioactivos que prevalecem nas plantas utilizadas na produção da fórmula em estudo são essencialmente alcalóides, compostos fenólicos e polifenólicos.

Tanto uns como outros podem servir de marcadores químicos das plantas, sendo que os primeiros são normalmente os mais activos e também, por isso, os mais tóxicos.

1.7.1. Alcalóides

Dos compostos presentes no reino vegetal hoje reconhecidos como tendo bioactividade, os alcalóides ocupam uma posição privilegiada entre os constituintes das plantas. Com estruturas variadas, são actualmente conhecidos mais de 5000 alcalóides diferentes, podendo ser definidos como sendo compostos orgânicos heterocíclicos naturais contendo um ou mais átomos de azoto^[41]. O par de electrões não-ligantes do(s) azoto(s) confere propriedades alcalinas à molécula e, conjuntamente com a sua estrutura tridimensional, é responsável pela sua bioactividade^[42]. Em regra, os alcalóides têm efeitos nefastos no organismo, ou seja, são dotados de toxicidade média a elevada, podendo vários deles ser reconhecidos pelo seu sabor amargo quando provados.

Como referido, os alcalóides têm propriedades alcalinas, com um carácter hidrofóbico acentuado, pelo que são solúveis em solventes orgânicos apolares (acetato de etilo, éter, benzeno, etc.) mas não em água ou soluções aquosas^[13]. Usando uma solução ácida ou uma solução aquosa acidificada, promove-se a formação de sais que são solúveis em água ou em soluções aquosas mas que são insolúveis nos solventes orgânicos. Como tal, a sua extracção e purificação a partir do material vegetal tem estas características bem presentes: usando solventes orgânicos obtêm-se os alcalóides naturais, usando soluções aquosas acidificadas obtêm-se os

sais dos alcalóides. Quando se acrescenta uma base à solução contendo os sais de alcalóides, é possível revertê-los à forma natural, solúvel em solventes apolares (Figura 11).

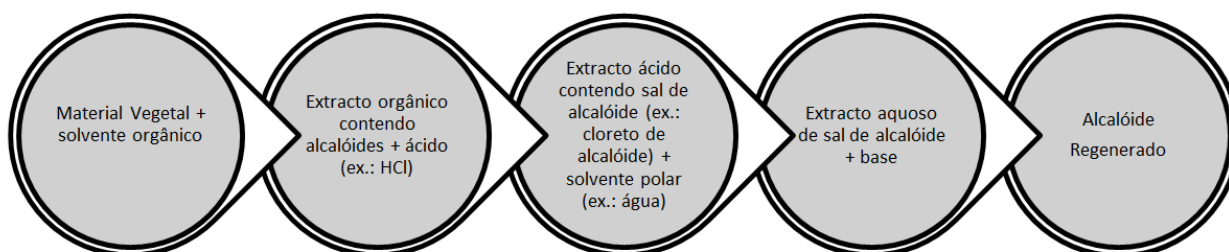


Figura 11 - Exemplo de esquema geral para extração e purificação de alcalóides

O conhecimento deste comportamento permite elaborar um processo de extração e purificação dos alcalóides, através da acidificação ou alcalinização da solução contendo o constituinte a extrair/isolar. Quando se parte do material vegetal original (fresco ou seco), é comum realizar a extração a partir do material vegetal usando um solvente ácido (ou solução aquosa acidificada) em primeiro lugar pois, na sua origem, os alcalóides tendem a ser encontrados nos vacúolos das células, sendo portanto necessário romper a parede celular vegetal, tarefa que o ácido facilita. Proceder a aquecimento durante o processo extractivo também ajuda a aumentar o rendimento e rapidez da extração.

Os alcalóides podem ser identificados recorrendo a reagentes gerais, com os quais têm reacções de precipitação:

- Reagentes iodados - ex.: R. Mayer (tetraiodomercurato de potássio); R. Bouchardat (iodo em solução de iodeto de potássio); R. Dragendorff (iodeto de potássio e bismuto); etc.

- Reagentes com poliácidos minerais complexos - ex.: ácido cloroplátinico, ácido fosfomolibdico, ácido silicotúngstico, etc.

- Reagentes nitrados - ex.: ácido pícrico, ácido picronólico, etc.

Apesar de a caracterização dos alcalóides ser bastante diversificada, no caso da formulação em estudo existem duas estruturas base, os que possuem núcleos

isoquinoleína e os que têm núcleos terpênicos (alcalóides diterpênicos, triterpênicos e esteróides) [13].

Nas plantas *Coptis chinensis* e *Nelumbo nucifera* encontram-se alcalóides derivados da isoquinoleína (**Figura 12**), considerados os mais abundantes na natureza, podendo a sua estrutura sofrer grandes variações no esqueleto básico.

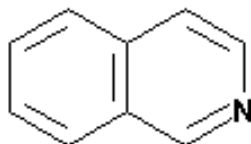


Figura 12 - Estrutura base dos alcalóides berberina, coptisina, dauricina, neferina, etc.

De acordo com estas variações, este grupo de alcalóides é dividido em diversos subgrupos, sendo o que mais interessa no âmbito da presente dissertação o subgrupo com estrutura protoberberina, ao qual pertence a berberina, composto de toxicidade reconhecida.

1.7.2. Compostos fenólicos

Muitos compostos químicos podem ser classificados como compostos fenólicos quando se atenta apenas à existência de um anel benzênico e um ou mais hidroxilos. Para se poder distinguir os compostos fenólicos dos restantes que se classificam dentro de outros grupos (por exemplo, alcalóides), foi proposto que compostos fenólicos são todos aqueles que, não sendo azotados, possuem um ou mais ciclos aromáticos e que se podem obter principalmente pela via do ácido siquímico ou pela via do acetato [13].

- via do ácido siquímico - partindo do ácido siquímico (**Figura 13**), num primeiro passo originam-se ácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), de seguida obtêm-se ácidos cinâmicos por desaminação e mais tarde os seus derivados mais complexos.

- via do acetato - inicialmente formam-se ácidos policetometilênicos de comprimento variável que, por ciclização (reacção de Claisen ou condensação aldónica), originam

compostos fenólicos.

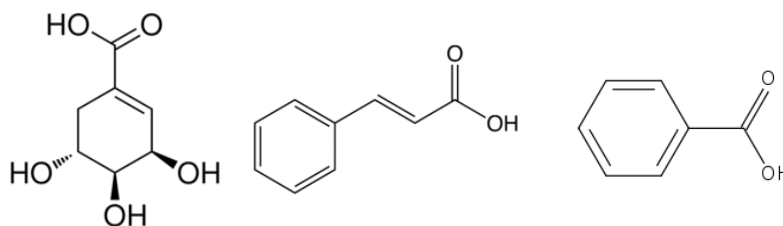


Figura 13 - Da esquerda para a direita: ácido siquímico, ácido cinâmico, ácido benzóico.

Alguns compostos fenólicos são corados, podendo ser detectados à luz natural. Para a detecção e identificação de outros é necessário recorrer à luz ultravioleta ou a reveladores específicos. Entre estes encontram-se os reagentes contendo cloreto de ferro, a vanilina e o NP/PEG (ácido difenilbórico/polietilenoglicol).

Do ponto de vista farmacológico, os compostos fenólicos de maior interesse são os ácidos fenólicos, as cumarinas, os flavonóides, os taninos e os compostos quinónicos. Considerando os compostos presentes nas plantas mencionadas, os mais relevantes são os ácidos fenólicos, as cumarinas e os flavonóides.

Os ácidos fenólicos provenientes das plantas são, geralmente, derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico, eles próprios também normalmente presentes na constituição das plantas. Por exemplo, na *Salvia miltiorrhiza* pode-se encontrar o ácido ferúlico e o isoferúlico, na *Polygala tenuifolia* encontra-se o ácido sinápico e na *Coptis chinensis* encontra-se o ácido clorogénico.

Cumarinas é o nome genérico dado ao grupo de compostos fenólicos derivados do 5,6-benzo-2-pirona (α -cromona) por substituições no anel benzénico. Estas substituições podem ser simples (R_1 , R_2 e R_3 substituídos por OH, OCH₃, CH₃) ou envolvendo radicais mais complexos, como é o caso das furanocumarinas ou das piranocumarinas (**Figura 14**).

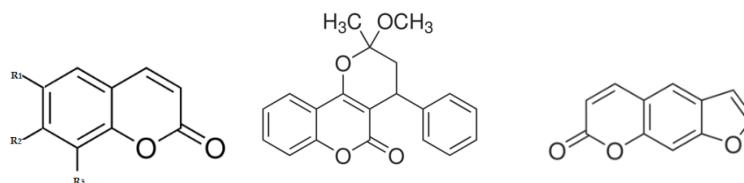


Figura 14 - da esquerda para a direita: 5,6 - benzo-2-pirona, pironocumarina e psoraleno (exemplo de furanocumarina linear)

Os flavonóides têm por base a estrutura da 2-fenil-benzopirona (flavona), podendo apresentar-se na forma genina (aglicona), glicosídica ou na forma de derivado metilado.

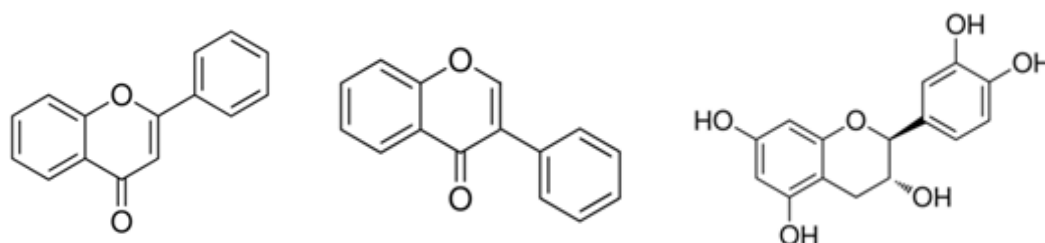


Figura 15 - Diferentes estruturas de flavonóides. da esquerda para a direita: flavona, isoflavona e catequina

Os flavonóides são divididos em diferentes grupos dependendo da apresentação do anel do meio: a posição do substituinte benzênico origina os flavonóides (posição 2) ou os isoflavonóides (posição 3) e a ausência do grupo carboxilo origina as catequinas (**Figura 15**).

1.8. Técnicas de análise usuais para os constituintes em estudo

O avanço da Química e da instrumentação por ela utilizada permitiu o desenvolvimento de diversas técnicas analíticas. A escolha é grande, sendo imperativa a necessidade de critérios para a selecção da técnica mais adequada, alguns dos quais dependentes do tipo de amostra (volátil ou não volátil, peso molecular baixo ou elevado, orgânica ou inorgânica, por exemplo), outros do tipo de técnica que se pretende (destrutiva ou não destrutiva, qualitativa ou quantitativa, por

exemplo). Todos estes critérios, entre outros, são imprescindíveis para a selecção de uma técnica de análise adequada. Estas vão depender não só do tipo de situação mas também da amostra a analisar: raízes, folhas, flores, sementes, caules ou cascas.

Com base na literatura consultada, para as plantas que se pretende estudar, as técnicas cromatográficas são as mais utilizadas, acopladas a equipamentos de diferentes técnicas consoante o âmbito do estudo. Na grande maioria dos casos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) é a técnica de eleição, conduzindo a resultados fiáveis e reprodutíveis, variando no entanto os detectores consoante tipo de constituintes que existem nas amostras, que, no caso das plantas que se encontram presentes na formulação em estudo não são maioritariamente voláteis. Caso contrário, a cromatografia em fase gasosa seria a técnica seleccionada.

Para se obterem dados complementares, foram seleccionadas várias técnicas espectroscópicas, já que são uma ajuda inestimável no estudo de compostos orgânicos: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infravermelhos (IV) e espectroscopia de ultravioleta (UV). De um modo geral, a espectroscopia estuda a interacção entre a matéria e radiação incidente, quer seja medindo a radiação absorvida ou a emitida em condições controladas. Aspectos como frequência ou intensidade da radiação absorvida/emitada fornecem dados potencialmente importantes no que se refere à estrutura tridimensional do composto estudado, presença de grupos funcionais específicos ou elementos que estão presentes.

1.8.1. Cromatografia

A cromatografia é uma técnica muito versátil que pode ser usada para separar ou para identificar os componentes de misturas homogéneas, inicialmente utilizada com compostos corados, de onde lhe vem o nome (Chromos = cor). Como técnica de análise de amostras de interesse, a cromatografia teve o seu desenvolvimento em

meados da década de 60 do século XX, muito embora já fosse conhecida desde o virar desse século.

A cromatografia pode ser definida como um processo de separação de dois ou mais componentes através da sua distribuição entre duas fases, uma fase estacionária e uma fase móvel. Esta distribuição acontece à medida que a mistura é forçada a passar através da fase estacionária, ficando os seus constituintes nela adsorvidos. A adsorção ocorre devido a interacções entre as moléculas da mistura e as partículas da fase estacionária, que podem ser de natureza polar, devidas a campos eléctricos permanentes ou induzidos ou devidas a forças de van der Waals^[44].

Existem diversas técnicas cromatográficas, desde as mais económicas e simples às mais dispendiosas que requerem instrumentos sofisticados, embora todas se apoiem nos princípios expostos atrás. As técnicas cromatográficas são classificadas de acordo com os tipos de fase móvel e de fase estacionária utilizados assim como da forma como se apresentam^[44].

1.8.1.1. Cromatografia líquida de alta eficiência, HPLC

A cromatografia líquida de alta eficiência é uma das vertentes da cromatografia em que a fase estacionária é um sólido polar, geralmente sílica ou alumina, e a fase móvel é líquida. O sistema pode ser visualizado na **Figura 16**, onde a amostra é injectada a alta pressão no aparelho juntamente com a fase móvel. Dentro do aparelho, o conjunto amostra+fase móvel atravessa uma coluna de dimensões seleccionadas cuidadosamente cujo enchimento também é escolhido pelo utilizador (material e dimensões das suas partículas). À medida que atravessa a coluna, ocorre a separação dos constituintes da amostra, sendo que cada um dos constituintes origina um sinal no detector que o envia para um computador provido de software adequado, que o traduz num cromatograma. Os resíduos da amostra e da fase móvel saem normalmente do detector para um recipiente apropriado.

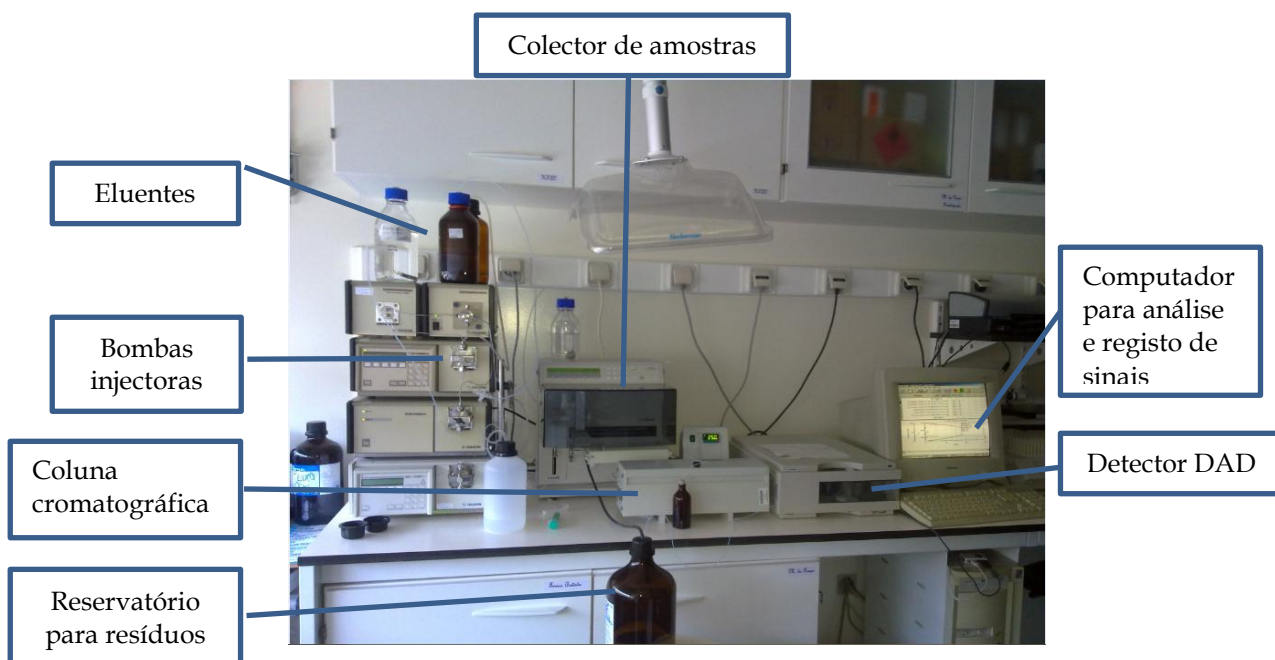


Figura 16 - Aparelho de HPLC-DAD do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Uma grande vantagem do HPLC em relação a outras técnicas é o facto de aceitar analitos de qualquer peso molecular ou qualquer polaridade. Ao funcionar sob pressão, é possível analisar moléculas até 200 vezes mais pequenas do que na cromatografia líquida clássica. Outra grande vantagem do HPLC reside no facto de ser económico: usam-se quantidades de eluente muito mais pequenas, o que permite a utilização de solventes tóxicos, raros ou dispendiosos, assim como a utilização de fases estacionárias dispendiosas.

A afinidade verificada entre os componentes de uma amostra as fases móvel e estacionária relacionam-se com as polaridades relativas dos compostos. É então de se prever que, quanto maior a afinidade entre moléculas, mais interagem, e mais tempo demoram a atravessar a coluna cromatográfica, separando-se dos compostos que, tendo menos afinidade, menos interagem com a fase estacionária, saindo mais rapidamente da coluna. À medida que a amostra atravessa a coluna, esta separação torna-se mais visível já que os efeitos da interacção são cumulativos. Em condições optimizadas, a separação dos componentes da amostra é eficiente e cada um abandona a coluna isolado dos demais, em diferentes tempos que são registados pelo detector. Surge assim o conceito de tempo de retenção de um composto, medido desde o momento em que a amostra é injectada na coluna até que o composto é

detectado no detector. Sendo a separação dos compostos de uma amostra resultado da sua interacção com a fase estacionária, e podendo-se alterar diversas condições do sistema, os tempos de retenção serão condicionados a alguns factores, entre os quais:

- Fluxo do eluente – a pressão regulada no sistema é função do fluxo do eluente, forçando a amostra a atravessar a coluna mais depressa ou mais lentamente.

- A natureza da fase estacionária – tanto em termos do material utilizado como em termos do tamanho das suas partículas, estes dois factores influenciam a probabilidade e grau de interacção entre os compostos a analisar e a fase estacionária (partículas mais pequenas implicam uma área de superfície maior, ou seja, maior área para interacção).

- A composição exacta do eluente – o eluente também interage com a fase estacionária, podendo interferir nos resultados. A uma cromatografia em que o eluente (geralmente uma mistura de dois solventes) se mantém sempre constante dá-se o nome de isocrática. No entanto, é comum fazer variar as percentagens de cada um dos eluentes ao longo da eluição, para que a separação de compostos mais ou menos polares se torne mais eficiente, tomando o nome de eluição por gradiente.

- A composição exacta do solvente – também o solvente usado na extracção ou dissolução da amostra a analisar interage com a fase estacionária, podendo originar sinais que se confundem com os dos analitos. Na generalidade dos casos, costuma preparar-se a amostra a analisar na mistura eluente, embora nem sempre assim aconteça.

- A temperatura da coluna – a temperatura influencia o estado de agitação das partículas, potenciando ou inibindo a sua interacção; pode inclusivamente ocorrer degradação dos compostos.

Para cada conjunto de condições estabelecidas para a análise (pressão, fluxo, temperatura, fase estacionária, solvente), o tempo de retenção de cada composto é uma constante e independente da quantidade presente na amostra. Obviamente que, para se determinar este tempo, é necessária a utilização de uma solução-padrão, tratada da mesma forma que a amostra mas contendo apenas o composto puro.

O detector é uma parte importante da técnica de HPLC uma vez que permite verificar que diferentes compostos saíram da coluna em diferentes momentos em vez de uma única substância ou de uma mistura não separada.

É comum acoplar outro instrumento de análise ao HPLC de modo a maximizar resultados. Espectrometria de massa, espectroscopia de ultravioleta/visível (UV/Visível), *Diode Array* (DAD, detector de díodos), espectroscopia de fluorescência, entre outros, são os mais utilizados. Com estas técnicas hifenadas, é possível recolher mais dados para além do mero tempo de retenção (por exemplo, informações sobre a sua estrutura, grupos funcionais ou peso molecular) que contribuem para a identificação do composto detectado. Uma vez que uma boa parte dos compostos orgânicos absorve radiação na gama ultravioleta e visível em comprimentos de onda específicos e bem conhecidos, técnicas que fazem uso desta gama de radiações são uma boa escolha. Podendo-se medir a quantidade de luz absorvida num dado comprimento de onda ao atravessar a amostra, esta informação permite não só ajudar a identificar o composto presente como também calcular a sua concentração.

Quando se utilizam técnicas hifenadas, as técnicas devem ser trabalhadas em conjunto, uma em função da outra. O solvente utilizado para dissolver a amostra, em geral, também absorve na gama UV/Visível, pelo que um dos cuidados a ter é o de escolher um solvente que absorva em comprimentos de onda diferentes daqueles em que os componentes da amostra absorvem. Assim, o solvente seleccionado para uma dada análise deve obedecer a algumas condições, as mais importantes das quais:

- Deve dissolver completamente a amostra;
- Não deve reagir com os componentes da amostra;
- Deve ter um elevado grau de pureza para a realização de análises de alta sensibilidade, de modo a minimizar a possibilidade de interferentes;
- Deve ser compatível com o detector escolhido (estado físico e peso molecular).

Estes factores podem complicar a escolha do solvente já que por vezes é difícil

encontrar um que cumpra todas as condições para uma dada análise. Também o eluente é importante na análise de uma amostra por técnicas cromatográficas. A selecção do eluente depende da polaridade dos componentes da amostra, devendo-se utilizar eluentes que tenham polaridade semelhante à dos componentes. Uma vez que também existe interacção entre a fase estacionária e a fase móvel, é contraproducente utilizar eluentes mais polares que a amostra, na medida em que, neste caso, não haverá separação. Por outro lado, numa mistura nem sempre a polaridade é uma constante entre os seus constituintes, podendo estar presentes compostos pouco polares ou mesmo apolares. Deste modo, é costume proceder-se a uma mistura de eluentes, sendo os mais comuns a água, o metanol e o acetonitrilo, com diferentes gradientes consoante a amostra a analisar.

O cromatograma é a representação gráfica da cromatografia. Dele podem ser retiradas várias informações preliminares relativamente à amostra inicial. Entre elas, encontram-se:

- Complexidade da amostra - verifica-se pelo número de picos visíveis no gráfico;
- Informação qualitativa - a composição da amostra pode ser inferida a partir da posição relativa dos picos através da comparação com padrões;
- Quantidades relativas dos componentes - através da comparação da área de cada pico.

A leitura de um cromatograma pode fornecer informações mais precisas, necessárias para a identificação dos constituintes da amostra analisada. Por exemplo, o tempo de retenção de cada um é lido no eixo horizontal do cromatograma (**Figura 17**), onde se encontra o tempo decorrido.

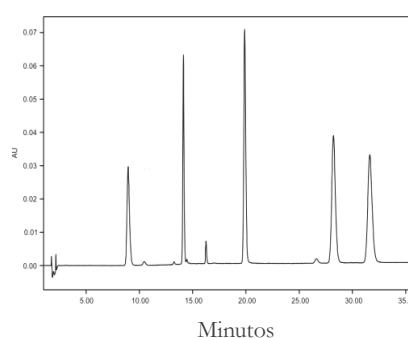


Figura 17 - Exemplo de um cromatograma

A forma como os picos se apresentam é um factor que pode dificultar a identificação dos compostos químicos detectados. Alterando várias condições (gradiente dos eluentes, pH, comprimento da coluna, ...) é possível melhorar a separação destes compostos e aumentar a definição de cada pico (**Figura 18**).

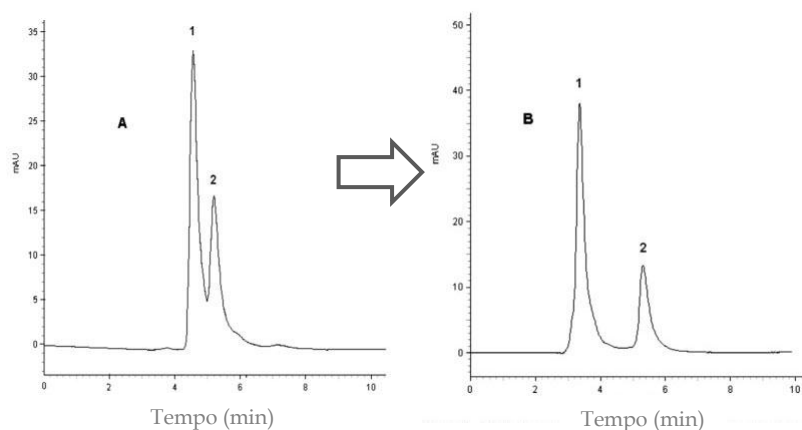


Figura 18 - Separação de picos melhorada devido a alteração na razão metanol/água (3% para situação A e 7% para situação B) [46]

No âmbito das análises desenvolvidas neste trabalho, foi decidido aliar a cromatografia líquida de alta eficiência à espectroscopia de ultravioleta/visível, utilizando um detector DAD, conjugando a boa capacidade de separação do HPLC com a versatilidade do detector de díodos. Este procedimento permite obter mais informações do que as fornecidas apenas pelo HPLC pois ambos os aparelhos são colocados em série, primeiro o HPLC onde a separação dos compostos químicos é efectuada e a seguir o DAD, onde cada um dos compostos separados é analisado para se obter o respectivo espectro UV/Visível.

Uma parte significativa dos constituintes das plantas que integram a formulação em estudo têm características que, teoricamente, fazem prever a possibilidade de, numa forma transversal, serem detectados por UV, o que levou à selecção deste sistema.

1.8.1.2. Cromatografia em camada fina, TLC

Tal como acontece no HPLC, a cromatografia em camada fina (TLC, *Thin Layer Chromatography*) consiste de uma fase móvel líquida e de uma fase estacionária sólida, que pode ser gel de sílica, alumina ou celulose. Esta fase estacionária é aplicada numa camada fina homogénea sobre uma base sólida (vidro ou alumínio, geralmente), de espessura entre 0,5 e 2 mm, podendo ser adquiridas comercialmente ou preparadas manualmente. As placas com base de alumínio (comerciais) são mais

práticas pois são mais leves, e portanto mais manejáveis, além de poderem ser cortadas para permitir rentabilizar a sua utilização. A amostra a analisar é aplicada no estado líquido usando pipetas, micropipetas ou capilares, em traços ou em pontos a cerca de 2 cm de uma das extremidades da placa, sendo o excesso de solvente evaporado antes da eluição. É igualmente recomendado deixar uma margem de 1 a 2 cm das extremidades laterais para se minimizarem os riscos de eluição desigual. A aplicação de 5 a 10 μ de amostra é geralmente suficiente. Quando é necessário utilizar uma maior quantidade de amostra, aplicam-se camadas sucessivas no mesmo local, com secagem entre cada aplicação de modo a limitar a área de aplicação: quanto mais pequena esta for, melhor será a separação. É comum o uso de um secador de cabelo para esta secagem, embora existam equipamentos próprios para permitir a aplicação de amostras em série, que incluem suporte para as placas e aplicador assim como sistema de secagem^[46]. No entanto, para a utilização mais corriqueira da técnica, estes equipamentos são desnecessários. A quantidade de amostra aplicada também pode ser aumentada utilizando placas de maior espessura, já que aquela aumenta aproximadamente com a raiz quadrada da espessura da placa^[47].

Uma das vantagens desta técnica é a possibilidade de se analisarem diversas amostras ao mesmo tempo, no intervalo necessário para se analisar apenas uma. Tal procedimento implica apenas o cuidado de se separarem as amostras aplicadas cerca de 1mm e de se escolher um eluente que seja adequado para todas. Outra vantagem é a possibilidade de se escolherem diferentes métodos de detecção simultâneos ou sucessivos depois de terminada a eluição, utilizados no mesmo local ou em locais alternativos (mobilidade do cromatograma). A desvantagem é a necessidade de vigilância, para que a placa seja retirada da câmara antes o eluente atingir o topo da placa, de modo a se poderem determinar correctamente as posições de cada composto na placa.

Esta técnica é adequada especialmente para a separação e isolamento de compostos de baixa volatilidade. A placa contendo a amostra a eluir é colocada verticalmente dentro de uma câmara na qual foi adicionado o eluente. A câmara deve ser hermética depois de fechada já que frequentemente se utilizam eluentes voláteis e, quando se tem uma mistura de eluentes de diferentes volatilidades, a proporção relativa em que

estes se encontram pode ser determinante na separação. Quando colocada a placa na câmara, o ponto de aplicação da amostra deve estar acima do nível do eluente. À medida que este atravessa a placa, vai arrastando os componentes da mistura com diferentes velocidades, separando-os. Quando o eluente tiver subido até uma distância máxima de 0,5 cm do topo da placa, retira-se a placa da câmara e marca-se o local, chamado de frente do solvente. Deixa-se evaporar o eluente com a placa na horizontal e observa-se o cromatograma obtido. Alguns compostos são corados e visíveis à luz natural, pelo que a sua detecção é fácil, mas a maioria necessita de técnicas de detecção diferentes. Diversos compostos possuem fluorescência no UV pelo que os laboratórios estão frequentemente equipados com lâmpadas de UV sob as quais se observa a placa e se marcam as posições dos compostos. Outros reagem de forma específica com reagentes seleccionados, sendo necessário impregnar a placa com esses reagentes de modo a revelar a sua presença^[46].

A TLC é geralmente utilizada como técnica qualitativa com um de dois objectivos: verificar a pureza de uma amostra ou identificar compostos presentes numa amostra. Relativamente ao primeiro, utilizando um eluente adequado é possível observar a separação da amostra em várias manchas diferentes - 1 mancha geralmente significa pureza, 2 ou mais significa mistura de substâncias. Para identificação de compostos aplica-se na mesma placa um padrão - manchas na mesma posição relativa corresponderão provavelmente ao mesmo composto.

Alternativamente, pode-se medir as distâncias percorridas pelo composto e pelo eluente, obtendo-se o factor de retenção, R_f , do composto, valor constante para o mesmo sistema eluente/fase estacionária.

Convém referir que estes dados não são conclusivos já que diversos compostos podem apresentar idênticos valores de R_f , pelo que se pode considerar que a TLC sugere a identificação de compostos, não a fornece em definitivo. Para isso, são necessárias outras técnicas mais adequadas.

No entanto, a TLC também pode ser utilizada quantitativamente. Existem diversas formas de discernir a quantidade de composto isolado de uma amostra através da análise da placa depois de eluída. A cromatografia preparativa pretende exactamente

isolar compostos presentes em amostras para o seu posterior estudo e quantificação. Para tal, são necessárias quantidades maiores do que para efeitos unicamente qualitativos, pelo que se aplicam maiores quantidades de amostra, num traço a toda a largura da placa (excluindo as margens de segurança laterais). Terminada a eluição e seco o eluente, marcam-se as bandas correspondentes aos componentes isolados, sendo a fase estacionária raspada nos locais marcados. Os compostos isolados são assim separados dos restantes e recuperados recorrendo a solventes adequados, com agitação ou usando um banho de ultra-sons. Etanol ou acetona são geralmente os mais utilizados, não se devendo utilizar metanol ou água caso se tenha recorrido a placas de sílica, pois esta é solúvel nestes dois solventes. De seguida, filtra-se a solução para retirar a fase estacionária e evapora-se o solvente para recuperar o composto isolado.

1.8.2. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear, RMN

No início do século XX, as experiências de Stern e Gerlach e de Pauli mostraram a existência de uma relação entre o comportamento dos núcleos atômicos e campos magnéticos, permitindo a posterior determinação de momentos magnéticos nucleares. A aplicação de campos magnéticos a feixes de moléculas de hidrogénio gasoso, H_2 , em simultâneo com radiação na gama das radiofrequências resultou na absorção de energia em frequências bem definidas, originando um desvio do feixe. A este fenómeno deu-se o nome de ressonância magnética, tendo sido testado ao longo dos anos seguintes com diferentes materiais e nos estados líquido e sólido. Em meados do século XX, utilizando etanol como amostra, Packard e os seus colegas obtiveram três sinais em vez de apenas um, como habitual. Estes sinais, de diferentes intensidades na proporção 3:2:1 (**Figura 19**), foram correctamente atribuídos a cada grupo de átomos de hidrogénio presentes na molécula de etanol (CH_3CH_2OH), tendo esta descoberta aberto novas perspectivas no que se referia ao estudo das estruturas moleculares e técnicas de identificação de substâncias^[48].

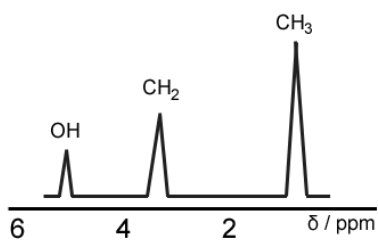


Figura 19 - Espectro RMN ^1H do etanol

Ao desvio registado deu-se o nome de desvio químico. Os avanços na técnica conduziram à análise de amostras mais diluídas ou mais complexas assim como ao estudo de outros núcleos que não o hidrogénio. Mais tarde, surgiu o seu desenvolvimento para aplicação noutras áreas, incluindo a determinação de propriedades de radicais e de complexos dos metais de transição *d* [49] e o estudo e visualização do interior do corpo humano sem necessidade de cirurgia (tal como a tomografia axial computadorizada, TAC, mas aplicando radiação muito menos nociva que os raios X desta).

A ressonância magnética nuclear é, pois, uma técnica de análise não destrutiva que se apoia na absorção selectiva de energia na zona de radiofrequências por amostras inseridas num campo magnético de modo a investigar a estrutura molecular ao redor de núcleos individuais. Para que a técnica possa ser utilizada, é necessário que a amostra contenha núcleos possuidores de momentos magnéticos, o que não acontece em todos os elementos químicos. Os mais utilizados em RMN, tanto devido à sua abundância como aos seus núcleos, são o hidrogénio, ^1H , o flúor, ^{19}F , o azoto, ^{14}N , e o fósforo, ^{31}P . O carbono-12, tão abundante nos compostos orgânicos, não possui um núcleo magnético, pelo que o estudo destes compostos não é perturbado por sinais concorrentes. No entanto, o seu isótopo carbono-13 (^{13}C) já possui as características necessárias, o que abre todo um leque de possibilidades no que se refere à cinética de reacções ou processos de metabolismo utilizando-o como marcador. Geralmente, o comportamento magnético necessário para a aplicação da ressonância é observado em núcleos compostos por um número ímpar de prótons ou um número ímpar de neutrões[42].

Os núcleos atómicos no seu estado natural não têm qualquer orientação definida preferencial mas, quando sujeitos a um campo magnético exterior H_0 , tendem a

orientar-se segundo a direcção deste, como acontece com imans imersos em campos magnéticos (**Figura 20**). Esta orientação pode ter o mesmo sentido que o campo (estado energético mais baixo e favorável, designado estado α) ou o sentido oposto (estado de energia mais elevada, designado de β). A transição entre o estado α e o estado β requer energia, que é específica de cada tipo de núcleo (H, P, F) já que cada um tem um momento magnético diferente.

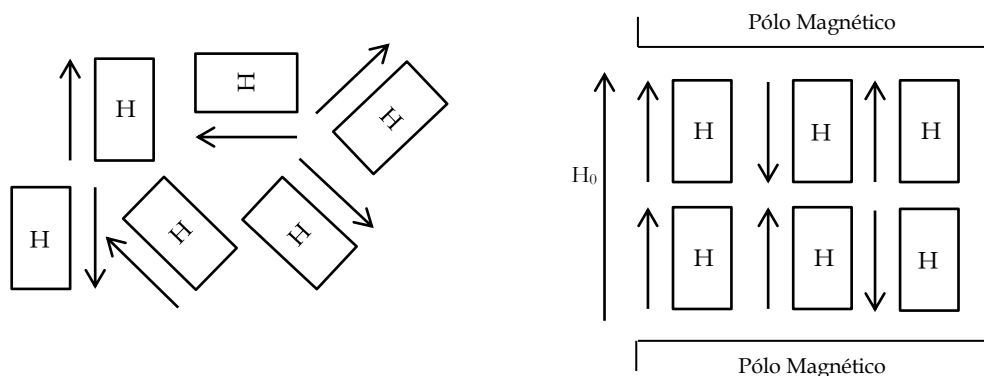


Figura 20 - Orientação dos núcleos de hidrogénio na ausência (esquerda) e na presença (direita) de um campo magnético exterior, H_0 [42] (adaptado)

A espectroscopia de RMN que utiliza os núcleos de hidrogénio tem o nome comum de RMN protónico. Protões em ambientes químicos diferentes na molécula (diferentes vizinhanças) comportam-se de maneira diferente perante a aplicação do mesmo campo magnético já que os núcleos vizinhos e a distribuição electrónica influenciam o campo magnético total envolvendo o protão em questão (campo local). Isto leva a que tenham que absorver mais ou menos energia para efectuar a reorientação, consoante a sua vizinhança. Surge deste modo o conceito de “blindagem” ou “protecção” magnética (ou o seu oposto, “desblindagem” ou “desprotecção”). Átomos electronegativos (oxigénio, halogenetos) e grupos aromáticos tendem a desproteger os protões vizinhos, o que faz com que originem sinais para desvios químicos maiores, enquanto que núcleos mais protegidos, afastados destes grupos, originam sinais em desvios químicos menores^[48].

A existência de núcleos da mesma espécie química colocados em ambientes químicos iguais traduz-se num aumento da intensidade da radiação absorvida, que é proporcional ao número de núcleos a absorver. Outro aspecto importante da espectroscopia de RMN consiste na multiplicidade dos sinais obtidos. Estes podem

ser simples (singuletos) ou aparecer desdobrados em dois (dubletos), 3 (tripletos), 4 (quadrupletos/quartetos) ou mais (multipletos) picos. Este desdobramento deve-se à interacção entre os núcleos adjacentes quimicamente diferentes e o que origina o sinal, sendo o número de picos igual ao número de núcleos no grupo vizinho acrescido de 1 (Regra $n+1$) [48]. A intensidade relativa dos picos num sinal pode ser determinada com base no triângulo de Pascal (**Figura 21**):

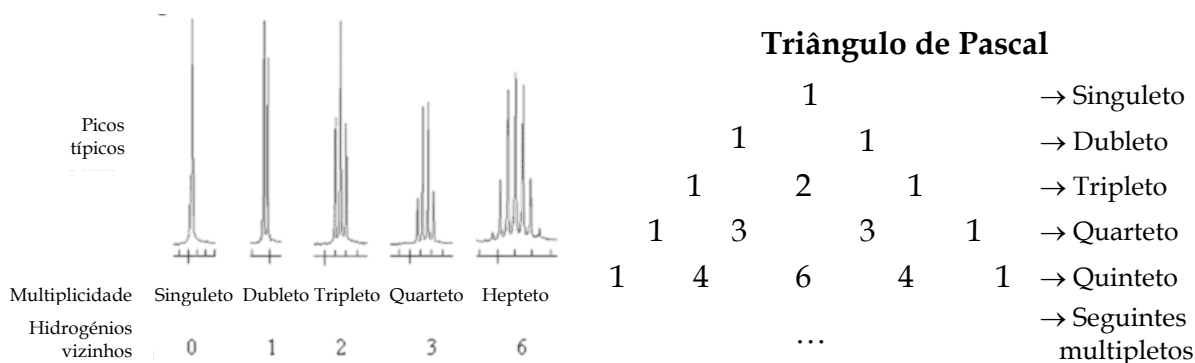


Figura 21 - Desdobramento dos picos e triângulo de Pascal

As posições dos sinais são medidas em relação a um sinal de referência, geralmente o tetrametilsilano (TMS), $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$, e expressas em partes por milhão (ppm) ou desvio (δ). O TMS é utilizado como padrão de referência por ser quimicamente inerte, miscível com a maior parte das amostras estudadas, apresentar um único sinal estreito e absorver em frequências geralmente afastadas daquelas em que a maior parte das amostras apresentam sinais.

Em resumo, o número de sinais obtidos indica o número de átomos em ambientes diferentes e a área de cada sinal indica o número relativo de átomos em situação idêntica.

No que se refere à instrumentação necessária para se proceder a uma análise por espectroscopia de RMN, um espectrómetro de RMN necessita de uma fonte de radiação electromagnética, um íman ou sistema equivalente para aplicação de um campo magnético intenso e uniforme à amostra e um sistema de detecção e registo dos resultados, sendo possível observar um esquema de funcionamento na **Figura 22**. Independentemente de outros componentes que se possam introduzir de modo a melhorar, tornar mais sensível ou mais rápido o espectro obtido, estes são os

essenciais de um espectrómetro de RMN. Por exemplo, a radiofrequência aplicada pode ser de variação contínua (variação suave e contínua das frequências emitidas) ou pulsada (impulsos de radiação de frequência bem definida), ou a introdução de técnicas de análise matemática de dados baseadas em transformadas de Fourier.

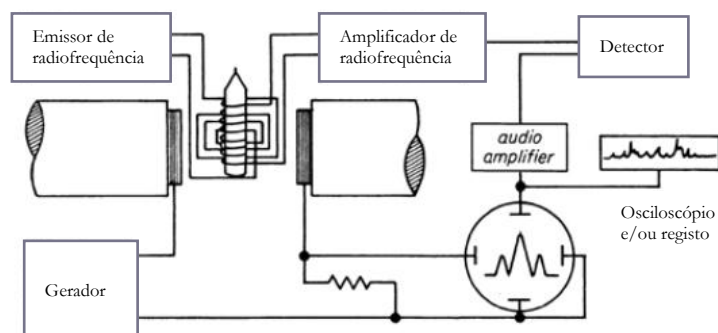


Figura 22 - Representação esquemática de um espectrómetro de RMN [50] (adaptado)

1.8.3. Espectroscopia de Infravermelho, IV

A Espectroscopia de Infravermelho estuda a relação entre a absorção de radiação em frequências bem definidas e a estrutura molecular. Neste caso, o que se estuda são conjuntos de átomos dentro da molécula, ou seja, grupos funcionais. Mais concretamente, a espectroscopia de infravermelho baseia-se na absorção de radiação na região do infravermelho, a qual é utilizada pela molécula para a excitação dos seus diferentes modos vibracionais das ligações intramoleculares (**Figura 23**). Um espectro de infravermelho pode vir traçado em função do comprimento de onda, λ , da radiação absorvida ou do seu complementar, o número de onda, $\tilde{\nu}$, (com $\tilde{\nu} = 1/\lambda$) expresso em cm^{-1} .

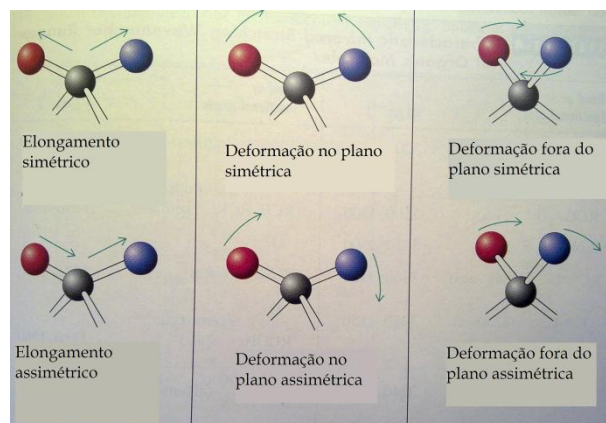


Figura 23 - Modos vibracionais das ligações moleculares^[42] (adaptado)

O que permite o estudo de uma amostra é o facto de os diferentes grupos funcionais absorverem radiação em frequências de onda característicos, podendo a totalidade do espectro obtido ser utilizada como uma impressão digital de um composto. De facto, a região localizada a $\tilde{\nu}$ menores que 1000 cm^{-1} é geralmente denominada de zona de impressão digital, única para cada composto.

Capítulo 2. Resultados e Discussão

2.1. Estudo da formulação por HPLC-DAD

A formulação em estudo contém várias plantas as quais, por sua vez, possuem diversos constituintes principais cada uma. Na bibliografia consultada não estava claro qual deles seria o maioritário em cada uma, de modo a poder ser utilizado como marcador. Também a ausência do conhecimento dos processos extractivos que foram utilizados na produção da formulação condicionou a previsão de resultados.

Estes produtos da MTC aparecem no mercado ocidental sem dossier de introdução no mercado, o que torna muito difícil a pesquisa dos constituintes activos.

Neste caso, e embora o *screening* inicial por TLC dos diferentes tipos de estruturas (fenóis e flavonóides, alcalóides e ácidos aminados) tenha sido feito após as primeiras análises por HPLC-DAD, pretendia-se no início, perceber se existiam alguns compostos marcadores a partir do seu espectro UV. No entanto, dado o desconhecimento das concentrações relativas de cada um deles no composto geral, não foi possível prever quais seriam os componentes principais a procurar.

Assim, iniciou-se o estudo da amostra BH1 por HPLC-DAD seguido por TLC. Os resultados preliminares obtidos com esta amostra podem ver-se nos perfis cromatográficos apresentados na **Figura 24**. Esta amostra, preparada em meio hidroalcoólico e sujeita a ultra-sons, desenvolveu a formação de mucilagem, pelo que a fase analisada corresponde ao sobrenadante obtido por decantação.

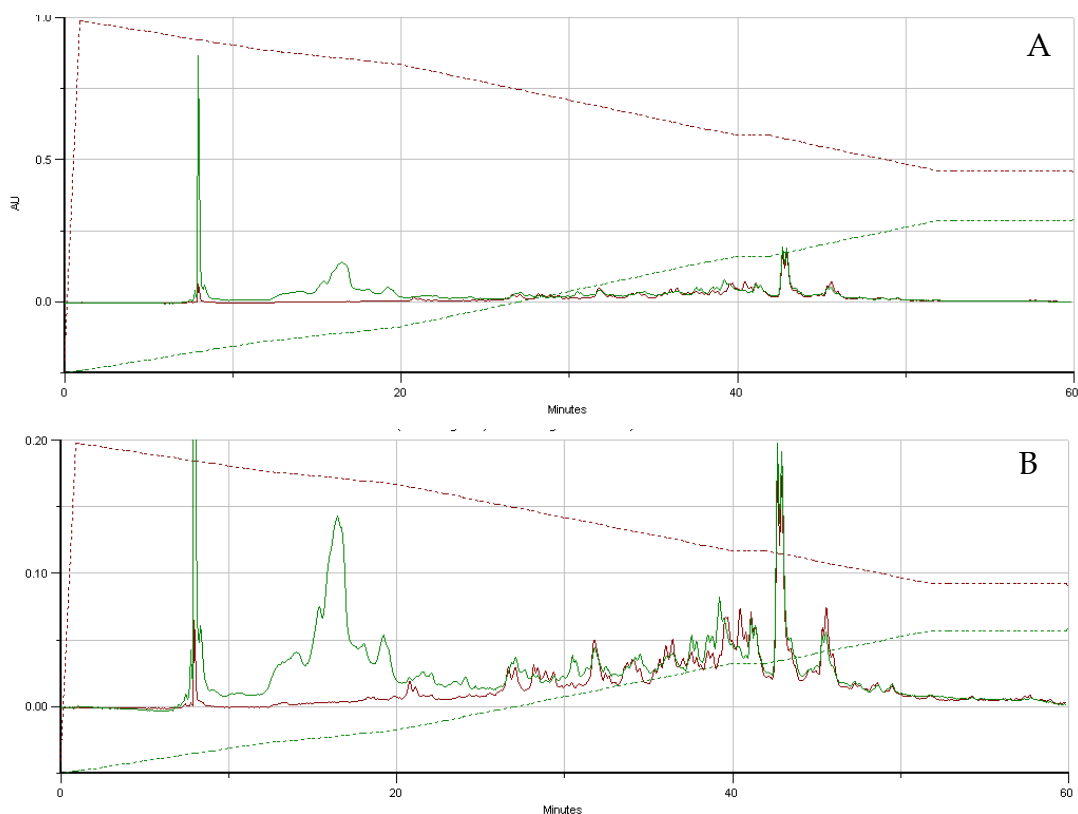


Figura 24 - Análise preliminar da amostra BH1: extração com etanol 80% do conteúdo de 10 cápsulas (5,03307g). A - Perfil cromatográfico completo, obtido com o sobrenadante, centrifugado e microfiltrado. B - Ampliação para AU 0,2

A análise dos espectros UV obtidos nesta análise por DAD não permitiu tirar qualquer conclusão sobre a identificação dos compostos solúveis em etanol que fazem parte da formulação, já que vários deles não apresentaram absorção no UV.

Procedeu-se também à hidrólise da mucilagem para posterior análise. Para isso, adicionou-se a esta uma solução de HCl 10%, seguida de aquecimento em banho-maria durante 1 hora^{[51](adaptado)}, tendo-se verificado a solubilização da mucilagem,. Na **Figura 25** pode ver-se o perfil cromatográfico obtido com a solução ácida.

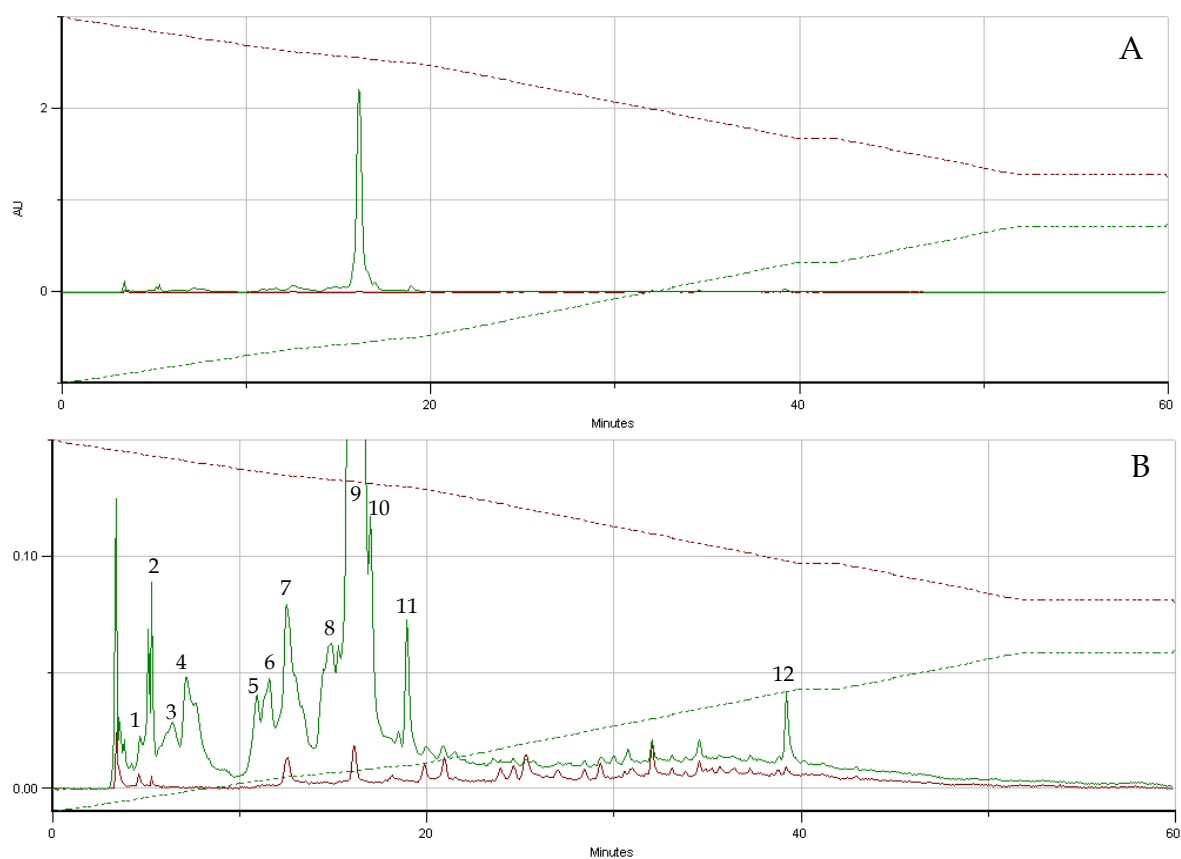
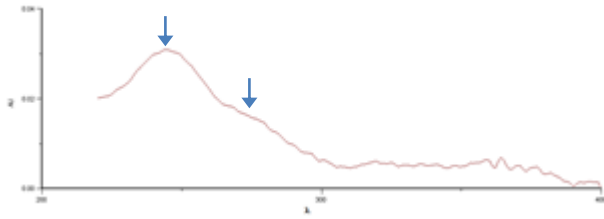
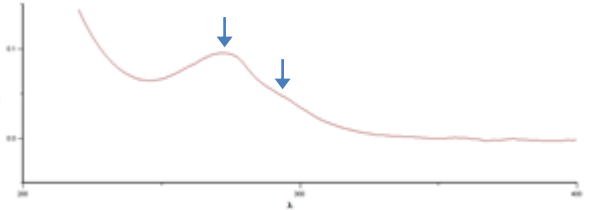


Figura 25 - Análise preliminar da BH1: hidrólise da mucilagem da amostra. **A** - Perfil cromatográfico completo, obtido com a solução centrifugada e microfiltrada. **B** - Ampliação para AU 0,15

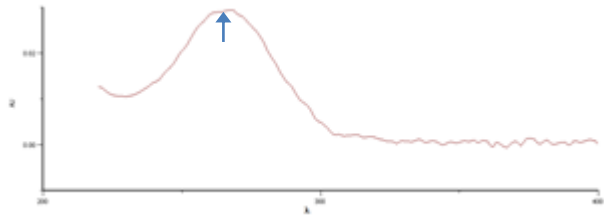
Embora os sinais gerados tenham uma intensidade reduzida, os espectros UV mostraram-se mais promissores no que se refere à interpretação e identificação. Na **Figura 26** apresentam-se os espectros UV obtidos, que, maioritariamente podem pertencer a compostos fenólicos devido à sua localização (polaridade) no cromatograma e à zona de absorção no UV. No entanto, os alcalóides, assim como alguns aminoácidos, também absorvem entre λ_{\max} 250 e 280 nm, pelo que os extractos inteiros das amostras foram sujeitos a uma análise de *screening* para vários destes constituintes, usando vários sistemas de TLC e correspondentes reveladores (dados apresentados mais à frente).



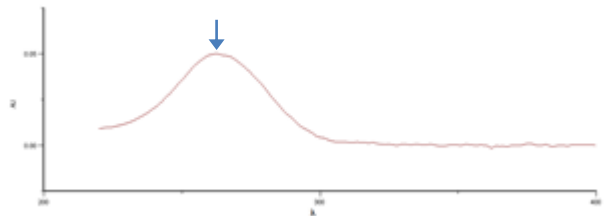
Espectro UV pico 1 - $T_R = 4,54$ minutos; $\lambda_{max} = 244,6$ nm; $\lambda_{sh} = 274,1$ nm



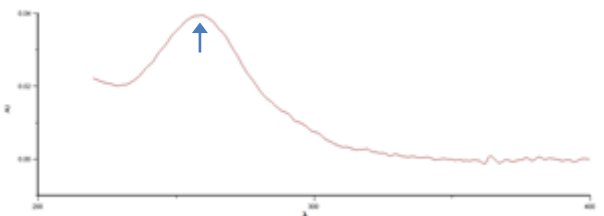
Espectro UV pico 2 - $T_R = 5,25$ minutos; $\lambda_{max} = 272,3$ nm; $\lambda_{sh} = 293,6$ nm



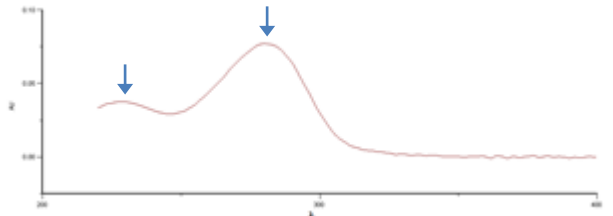
Espectro UV pico 3 - $T_R = 6,34$ minutos; $\lambda_{max} = 266,6$ nm



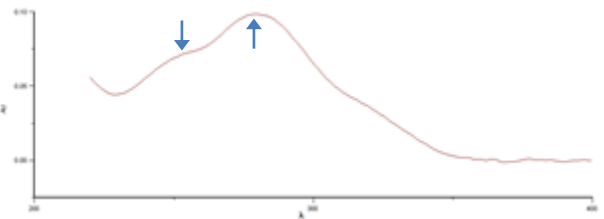
Espectro UV pico 4 - $T_R = 7,16$ minutos; $\lambda_{max} = 262,4$ nm



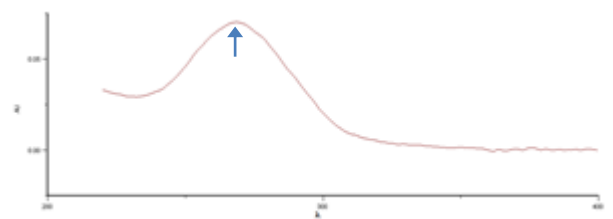
Espectro UV pico 5 - $T_R = 10,87$ minutos; $\lambda_{max} = 258,6$ nm



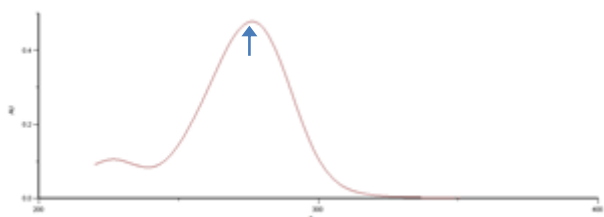
Espectro UV pico 6 - $T_R = 11,49$ minutos; $\lambda_{max} = 280,6$ nm; $\lambda_{sh} = 229,1$ nm



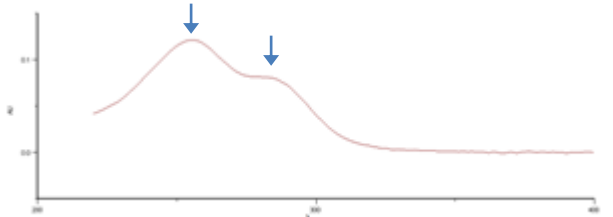
Espectro UV pico 7 - $T_R = 12,56$ minutos; $\lambda_{max} = 279,4$ nm; $\lambda_{sh} = 253,6$ nm



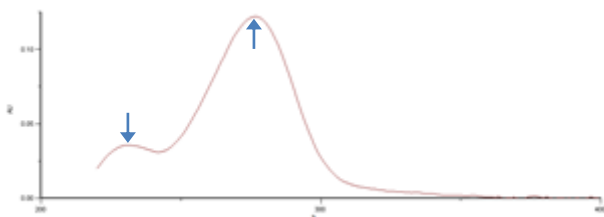
Espectro UV pico 8 - $T_R = 14,02$ minutos; $\lambda_{max} = 268,7$ nm



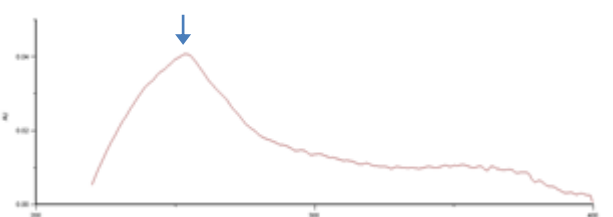
Espectro UV pico 9 - $T_R = 15,77$ minutos; $\lambda_{max} = 276$ nm



Espectro UV pico 10 - $T_R = 16,96$ minutos; $\lambda_{max} = 255,3$ nm; $\lambda_{sh} = 284,2$ nm



Espectro UV pico 11 - $T_R = 18,91$ minutos; $\lambda_{max} = 276,4$ nm; $\lambda_{sh} = 231,2$ nm



Espectro UV pico 12 - $T_R = 39,27$ minutos; $\lambda_{max} = 253,6$ nm

Figura 26 - Espectros UV obtidos por DAD da hidrólise da mucilagem da amostra BH1

De modo a reduzir a interferência da mucilagem na solução extractiva, adicionou-se uma solução de acetato de chumbo a 9% à amostra. Porém, em vez de precipitação da mucilagem, houve uma dissolução da mesma. O extracto assim obtido foi filtrado e a análise por HPLC-DAD está representada na **Figura 27**.

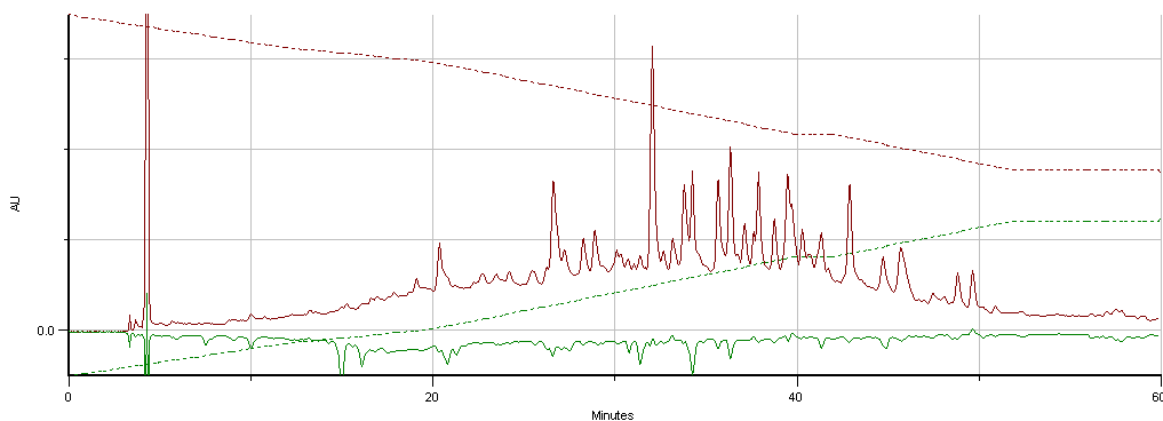


Figura 1 - Perfil cromatográfico da amostra BH1 em solução 9% de acetato de chumbo obtido por HPLC-DAD

De modo a simplificar o processo de análise, tendo em consideração os resultados obtidos, decidiu-se não separar as fases alcoólica e ácida no processo de solubilização/extracção da amostra.

A preocupação com a possibilidade de degradação do extracto levou a que este fosse novamente analisado alguns meses depois, de modo a comparar o novo cromatograma obtido com o inicial. Verificou-se que, apesar de haver algumas diferenças, principalmente no que se refere à intensidade dos sinais apresentados, os tempos de retenção dos picos observados e os respectivos espectros UV não mostraram alterações em relação à análise preliminar. Deste modo, assume-se que o extracto obtido é estável durante um período mínimo de 6 meses desde que mantido a uma temperatura constante.

A formulação F137 também estava disponível em gotas e a análise por HPLC-DAD desta amostra (BH3), realizada por injeção directa sem diluição ou concentração pode ser vista na **Figura 28**.

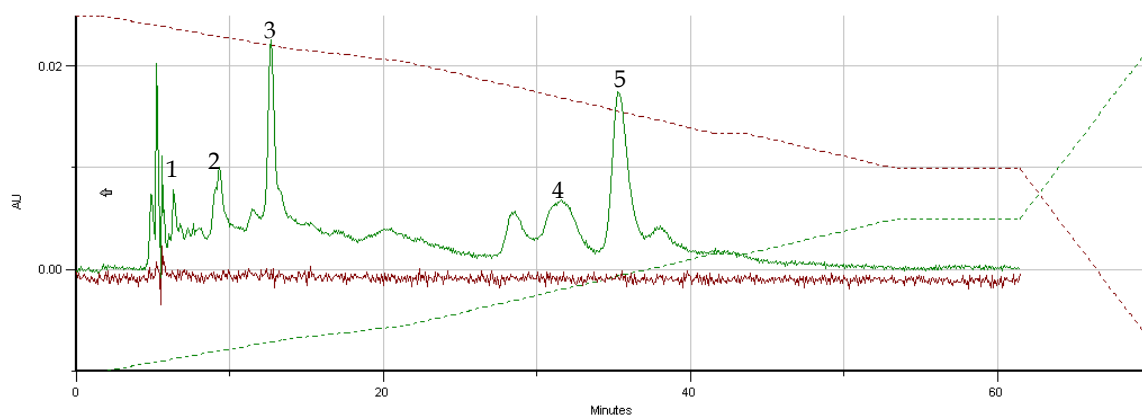
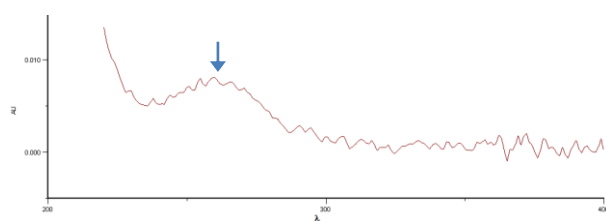
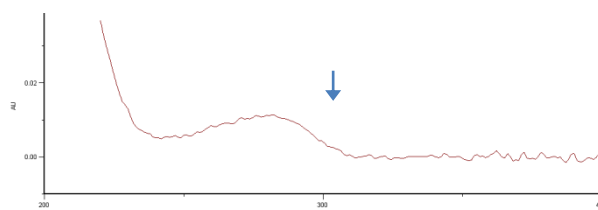


Figura 28 - Perfil cromatográfico da amostra BH3 obtido por HPLC-DAD

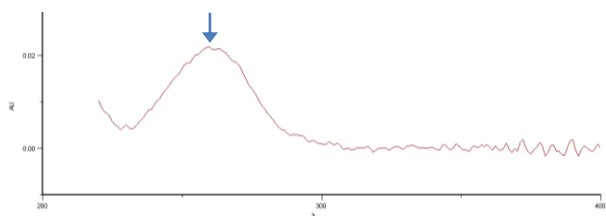
Os espectros UV dos picos mais relevantes apresentam-se na **Figura 29**. São muito similares entre si, com absorções dentro da mesma gama de λ_{\max} verificada com a análise do conteúdo das cápsulas.



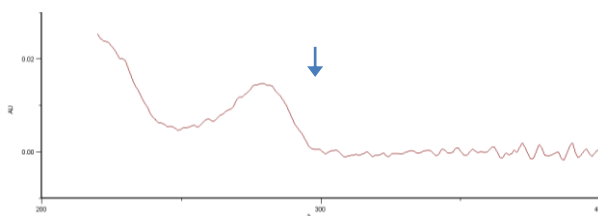
Espectro UV pico 1 - $T_R = 6,38$ minutos; $\lambda_{\max} = 260$ nm



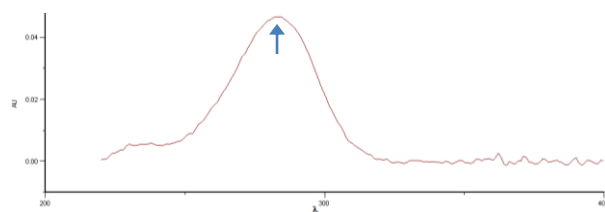
Espectro UV pico 2 - $T_R = 9,08$ minutos; $\lambda_{\max} = 282$ nm



Espectro UV pico 3 - $T_R = 12,75$ minutos; $\lambda_{\max} = 260$ nm



Espectro UV pico 4 - $T_R = 31,44$ minutos; $\lambda_{\max} = 279$ nm



Espectro UV pico 5 - $T_R = 35,48$ minutos; $\lambda_{\max} = 283$ nm

Figura 29 - Espectros UV obtidos por DAD da amostra BH3

No entanto, o perfil cromatográfico revelou uma concentração muito inferior, o que condicionou mais uma vez a interpretação dos resultados.

Foi também analisada a berberina padrão e os resultados obtidos encontram-se na

Figura 30, não tendo sido possível identificar nada que se assemelhasse nos perfis cromatográficos apresentados anteriormente.

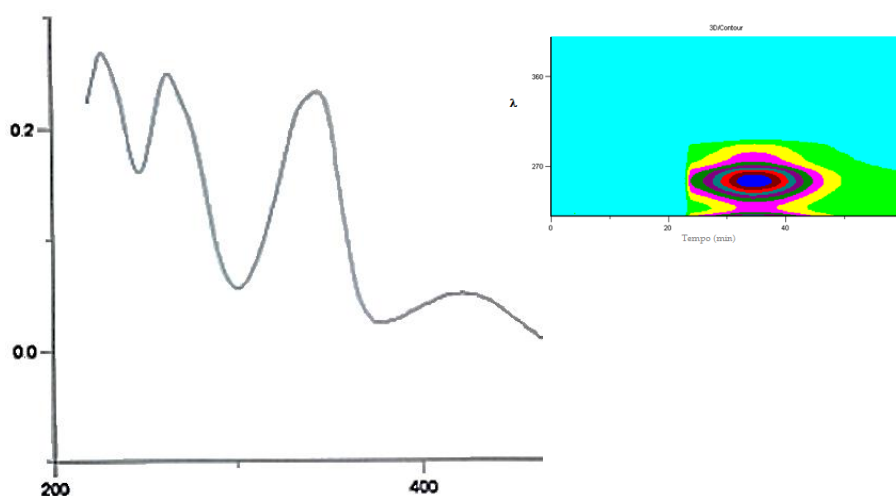


Figura 30 - Espectro UV da berberina padrão obtido por DAD. Em cima apresenta-se a representação 2D do perfil cromatográfico obtido por HPLC-DAD.

Conforme foi indicado na Introdução, as diversas plantas que integram esta formulação possuem compostos fenólicos e polifenólicos na sua constituição. Porém, estes não foram encontrados com o método que foi desenvolvido para os detectar e identificar^[52]. O facto de não haver informação sobre as percentagens relativas destes constituintes nas partes das plantas usadas na preparação também limita a hipótese teórica do que previsivelmente se poderia esperar dos resultados. Outra limitação transversal a todo o trabalho desenvolvido foi o facto de não se dispôr das matérias primas originais nem mesmo a possibilidade de fazer uma comparação com outras que, não sendo provenientes dos ingredientes que deram origem ao produto acabado, fossem da mesma espécie. Isto porque a aquisição das mesmas não foi possível dado que não existem fornecedores locais e alguns dos internacionais não fornecerem para Portugal.

Dada a impossibilidade de cruzar a informação dos possíveis marcadores da amostra com os dados obtidos por HPLC-DAD, tal como tinha sido previsto inicialmente, após análise cuidada das plantas abordadas na Tabela 1 e respectivos constituintes, procedeu-se a um *screening* de aminoácidos, alcalóides, ácidos fenólicos e flavonóides por TLC analítica, recorrendo a reagentes específicos para a família de compostos em causa.

2.2. TLC de *screening*

O *screening* por TLC seguiu a metodologia preconizada por Wagner^[53], tendo-se testado alguns eluentes, nomeadamente o Sistema 1 (S1), composto por propanol - ácido fórmico - água (90:1:9) indicado para a separação de alcalóides, o Sistema 2 (S2), composto por butanol - acetona - ácido acético glacial - água (35:35:10:20), para a separação de aminoácidos em amostras contendo extractos vegetais, e o Sistema 3 (S3), composto por acetato de etilo - ácido fórmico - ácido acético glacial - água (100:11:11:27), para a separação de compostos fenólicos e flavonóides.

Numa primeira abordagem, utilizaram-se placas de TLC com 10 cm de altura e largura suficiente para a análise da amostra e do(s) padrão(ões) correspondente(s) a cada um dos grupos químicos em estudo.

Utilizando S1, com a aplicação da amostra (BH1) num traço de 1 cm de lado, assim como um traço de padrão de berberina semelhante (BBR), observaram-se claramente 3 bandas em tons de amarelo sob a lâmpada de UV a 366 nm e uma outra banda detectável tanto a 366 nm (azul) como a 254 nm (preto) (**Figura 31 A/B**). Por comparação de R_fs, verificou-se que a banda correspondente ao composto (dos que se separaram da linha de aplicação) mais polar da amostra poderá ser derivado da berberina. Por observação da linha de aplicação da amostra foi possível verificar que existem componentes da amostra que não foram arrastados pelo eluente já que esta continuou a apresentar fluorescência no ultravioleta e no visível.

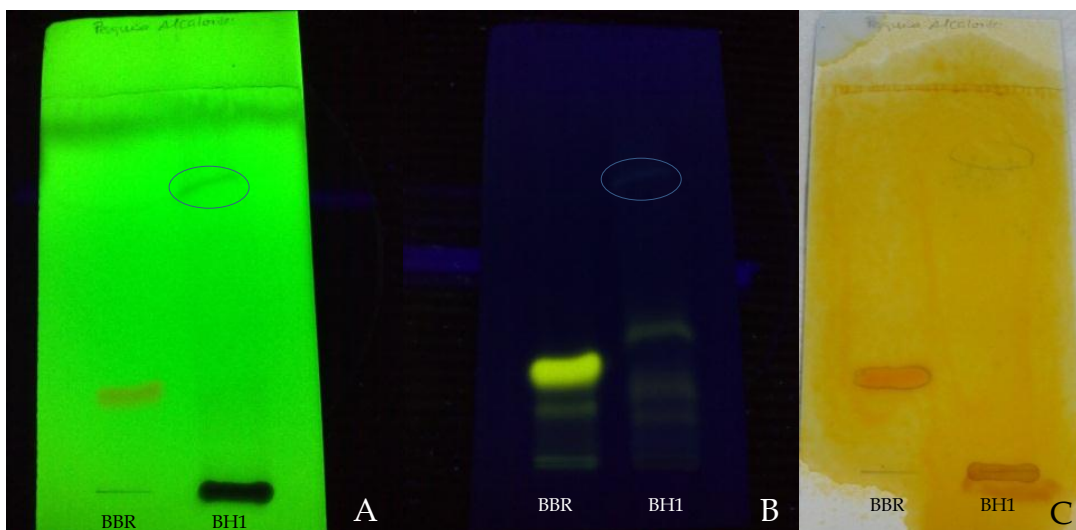


Figura 31 - TLC para pesquisa de alcalóides sem revelador. **A** - sob a luz UV de 254 nm; **B** - sob a luz UV de 366 nm; **C** - com reagente de Dragendorff à luz natural.

O reagente de Dragendorff, não sendo específico para alcalóides, é frequentemente utilizado em testes de detecção destes, embora também reaja com compostos azotados heterocíclicos e aminas quaternárias^[53]. A aplicação deste reagente na placa, embora reagisse com o padrão de berberina, visualizado em castanho alaranjado, não resultou em nenhuma mancha na zona de desenvolvimento da amostra, mas sim na linha de aplicação (**Figura 31 C**).

Utilizando ainda o S1, procedeu-se à eluição das amostras BH1 e BC, juntamente com o padrão de berberina. Aplicou-se também na mesma placa de teste uma amostra de *Polygala senega*, espécie vegetal similar à *Polygala tenuifolia* que faz parte da constituição de ambas as formulações em estudo e única planta disponível para análise. O eluente utilizado, embora não seja específico para os saponósidos, é muito próximo^[51] e a adaptação feita permite, numa TLC única, pesquisar alcalóides e saponósidos. O cromatograma resultante pode ser observado na **Figura 32**, onde é possível verificar a diferença de concentração dos constituintes nas duas amostras. Apesar da amostra BH1, teoricamente, se encontrar mais concentrada, foi a BC que apresentou maior intensidade de fluorescência correspondente a uma maior quantidade de compostos. Mesmo não sendo técnica de eleição para quantificar, não deixa de apresentar um resultado relevante.

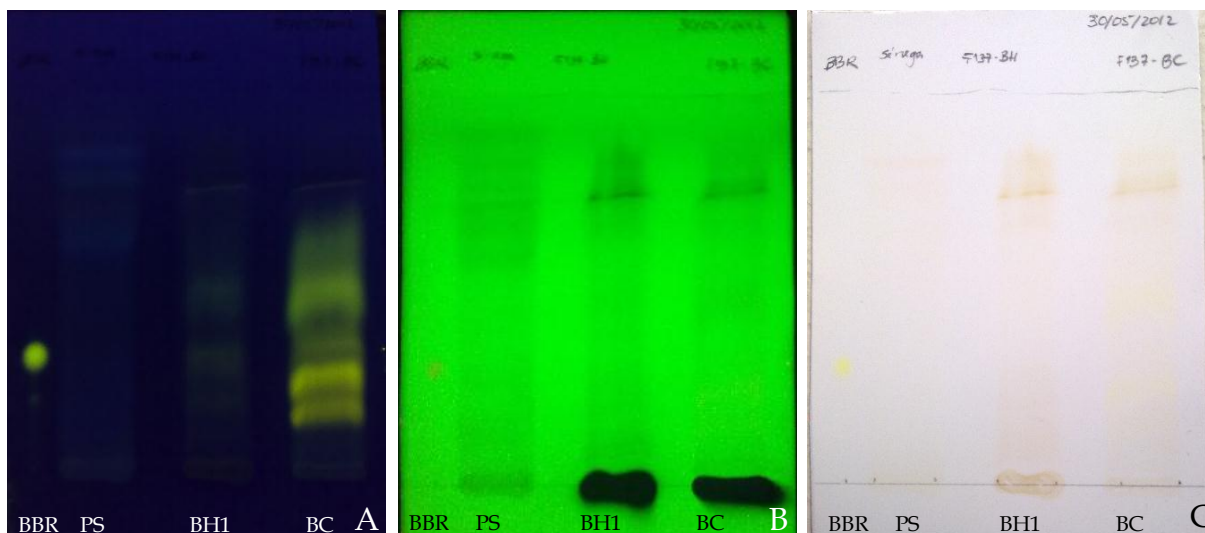


Figura 32 - TLC comparativa das amostras BH1 e BC, juntamente com extracto de *Polygala senega* (PS) e padrão de berberina (BBR). Eluição com eluente S1. **A.** Visualização a 366 nm. **B.** Visualização a 254 nm; **C.** Visualização à luz natural.

A ausência de controlo sobre estes produtos leva a que este tipo de situações possa ocorrer e condiciona o uso seguro das mesmas.

Utilizando o S2, aplicou-se numa placa de teste a amostra num traço com 1 cm de lado, assim como os padrões de 6 aminoácidos seleccionados (**Tabela 10**) com base na informação disponível na literatura, indicando que estes aminoácidos estariam presentes na constituição de algumas das plantas utilizadas na elaboração da formulação em estudo.

Tabela 10 - Padrões de aminoácidos analisados por TLC usando S2 como eluente

Mancha	Aminoácido aplicado
1	L-Metionina
2	DL-Alanina
3	L- Prolina
4	L-Citrulina
5	L-Hidroxi prolina
6	L-Fenilalanina

Após aplicação uniforme do revelador ninidrina^[53], procedeu-se ao aquecimento da placa. Verificou-se que os aminoácidos padrão apareciam em tons avermelhados excepto a prolina, que ficou amarelada, o que é consistente com o teste de identificação destes compostos^[25]. Foi também possível constatar a presença de 2 manchas na amostra, uma alaranjada e outra avermelhada nas posições aproximadas dos padrões de DL-alanina e de L-fenilalanina (**Figura 33**).

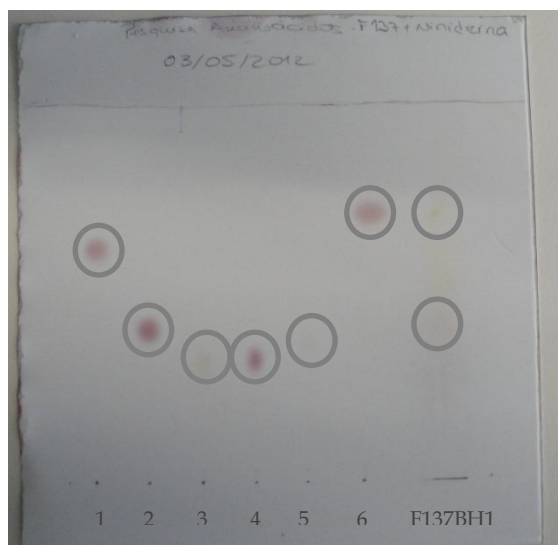


Figura 33 - TLC para pesquisa de aminoácidos, obtido após aplicação do revelador ninidrina e de aquecimento. 1. L-Metionina; 2. DL-Alanina; 3. L-Prolina; 4. L-Citrulina; 5. L-Hidroxiprolina; 6. L-Fenilalanina

Estas observações foram feitas à luz natural. Utilizando luz UV, quer no comprimento de onda de 254 nm quer no de 366 nm, não foi possível visualizar as manchas mencionadas atrás, o que aponta para compostos sem fluorescência no UV e, portanto, compostos diferentes dos que tinham sido detectados utilizando o sistema de eluentes S1 (para alcalóides).

Numa tentativa de poder utilizar esta metodologia, que serviu para a detecção de aminoácidos, de forma a isolar as substâncias encontradas, aplicou-se a amostra numa placa de TLC (20x20 cm) juntamente com os padrões de DL-alanina e L-fenilalanina, procedendo-se à sua eluição. Após secagem do eluente, revelou-se a placa desenvolvida, deixando apenas exposta uma parte, correspondente à zona de aplicação dos padrões e a uma extremidade da zona de aplicação da amostra, e aqueceu-se tal como na placa de teste, após o que se verificou que as posições relativas dos compostos revelados não eram exactamente concordantes com as dos

padrões (**Figura 34**), ou seja, os R_fs estavam ligeiramente diferentes.

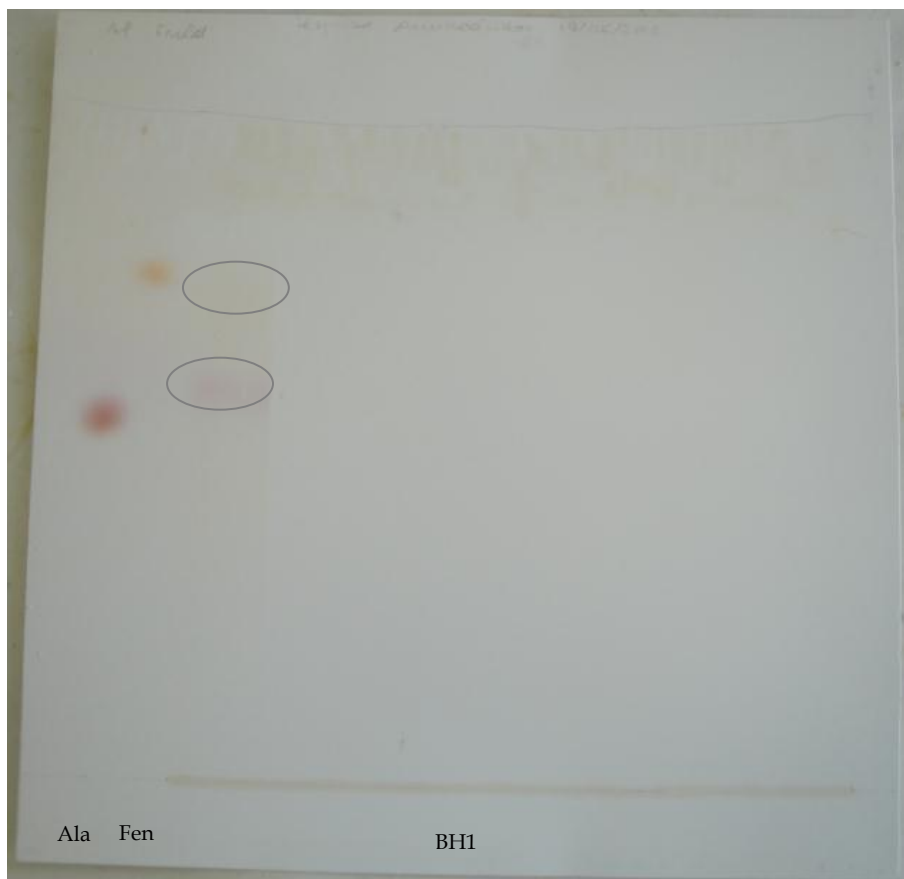


Figura 34 - TLC preparativa da BH1 utilizando o eluente S2 para separação de aminoácidos, com aplicação de revelador ninidrina do lado esquerdo. Aplicada amostra BH1 e padrões de alanina (Ala) e de fenilalanina (Fen).

Atendendo à pequena quantidade de composto isolado em cada placa e ao tempo necessário para a eluição de cada uma (5 a 7 horas, dependendo da temperatura ambiente), o dispêndio de tempo e recursos foi considerado como não compensatório, uma vez que o objectivo do trabalho era pesquisar constituintes tóxicos e estas substâncias não integram este grupo, assumindo que estas manchas corresponderiam a aminoácidos ou seus derivados.

O TLC de screening de flavonóides, utilizando S3, foi efectuado de forma semelhante aos anteriores, ou seja, aplicação da amostra BH1 num traço com cerca de 1 cm de lado e um padrão flavonóide, neste caso quercetina. O cromatograma obtido pode ser observado na **Figura 35**. É possível observar-se a mancha obtida pelo padrão de quercetina (preta quando visualizada a 254 nm e amarelo-esverdeado a 366 nm) e três manchas separadas da amostra. Tanto no que se refere à coloração apresentada a 366 nm como no que se refere às posições relativas ocupadas, parece tratar-se dos

mesmos constituintes que se observaram com o sistema de eluentes S1.

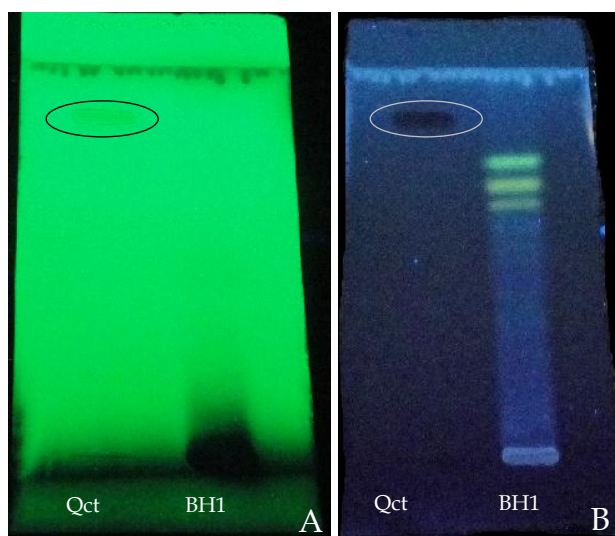


Figura 35 - TLC para pesquisa de flavonóides da amostra BH1 e do padrão de quercetina (Qct). **A** - visualização a 254 nm; **B** - Visualização a 366 nm

2.3. Cromatografia (TLC) Preparativa

Os principais constituintes da planta em maior quantidade na formulação, *Rehmannia glutinosa* L., pertencem à família dos iridóides. No entanto, atendendo a que, do conjunto de constituintes mencionados anteriormente do qual estes fazem parte, apenas os alcalóides teriam uma componente tóxica mais problemática, procedeu-se à separação por cromatografia preparativa apenas de alcalóides.

Para esse efeito, testaram-se diversos sistemas de eluentes, com diferentes graus de polaridade (**Tabela 11**), de onde se concluiu que o mais eficiente na separação era o sistema etanol - amoníaco (20:1).

Tabela 11 - Estudo de eluentes para TLC preparativa

Eluente	Resultado	Eluente	Resultado
Tolueno - acetato de etilo - dietilamina 70:20:10	1 mancha isolada das restantes, arrastadas ao longo da placa	Acetato de etilo - metanol 90:10	Mancha arrastada, sem isolamento de compostos
Ciclo-hexano - clorofórmio - ácido acético glacial 45:45:10	Sem qualquer separação	Diclorometano - metanol 90:10	Mancha arrastada, sem isolamento de compostos
Etanol - clorofórmio 1:1	Mancha arrastada ao longo da placa, com um composto quase isolado	Acetonitrilo - metanol 4:1	Mancha arrastada, na qual se distinguem 2 compostos
Metanol - amoníaco 20:1	1 mancha isolada perto da linha de solvente e 1 mancha perto da linha de aplicação da amostra	Etanol - amoníaco 20:1	2 manchas isoladas das restantes
Éter - trietilamina 80:2	Não há separação	Acetonitrilo - etanol 4:1	1 mancha isolada das restantes

Utilizando este sistema de eluentes, realizaram-se algumas eluições com placas de TLC preparadas manualmente. Dos resultados obtidos com as primeiras placas, concluiu-se que a secagem no ponto de aplicação tinha que ser mais extensa que o esperado, devido ao elevado conteúdo de água da amostra em estudo - **Figura 36**.

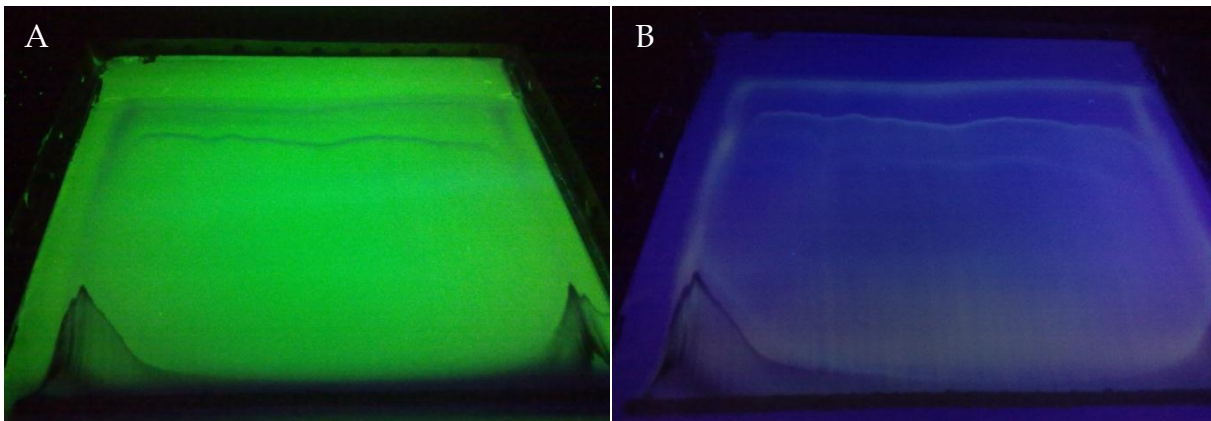


Figura 36 - TLC preparativa de BH1: eluição com etanol-amoniaco (20:1), observada sob lâmpada UV com $\lambda = 254$ nm (A) e $\lambda = 366$ nm (B)

A insuficiente secagem do ponto de aplicação da amostra originou o arrastamento dos compostos, dificultando a sua separação, havendo em alguns pontos sobreposição de bandas.

Ao proceder à eluição do extracto de BH1, usando o sistema de eluentes S1, verificou-se que a mancha perto do topo desaparece (Figura 31A/B), talvez obscurecida pela mancha que o eluente deixa na placa (**Figura 37**). As restantes foram identificadas como AL-A, AL-B e AL-C sob a lâmpada UV de 366 nm, tendo-se marcado as zonas correspondentes a cada banda e retiradas da placa para erlenmeyers separados.

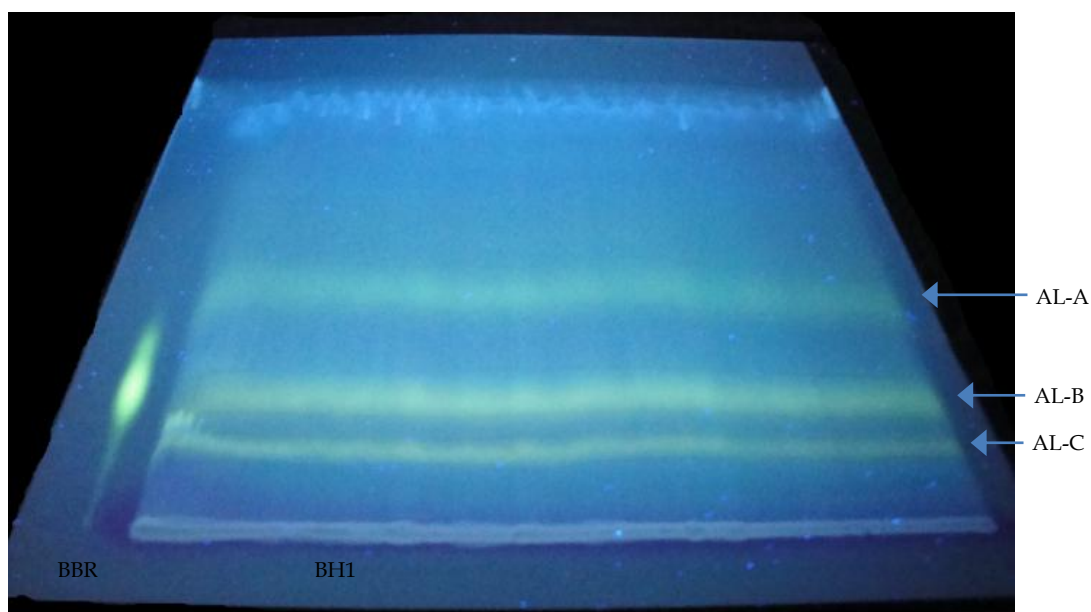


Figura 37 - TLC preparativa da amostra BH1 e do padrão de berberina (BBR) usando o sistema de eluentes S1. (Visualização a $\lambda = 366$ nm)

Os compostos foram retirados da sílica com etanol 50%, sendo o erlenmeyer colocado num banho de ultra-sons durante 1 hora. De seguida, cada extracto alcoólico foi filtrado com funil de placa porosa e o solvente foi evaporado. Verificou-se que, por ser utilizado etanol 50%, o resíduo continha ainda muita sílica misturada. A adição de clorofórmio ao balão contendo o resíduo permitiu a separação da sílica por filtração.

Com a posterior evaporação do solvente, foi possível obter extractos puros para se analisarem por RMN ^1H , IV e HPLC-DAD, depois de confirmada a solubilidade em metanol e dimetilsulfóxido (DMSO).

Os três compostos isolados foram ainda analisados por HPLC-DAD, não originando qualquer sinal no cromatograma. Tal pode ter sucedido por haver muito pouca quantidade (menos de 5 mg de cada constituinte isolado) ou por se tratar de compostos cujas propriedades não lhes permitem ser separados cromatograficamente segundo a metodologia utilizada ou ainda ter ficado alguma quantidade adsorvida na sílica.

2.4. Resultados obtidos por RMN ^1H

Os extractos AL-A, AL-B e AL-C obtidos por TLC preparativa foram analisados por RMN ^1H em clorofórmio deuterado, tendo-se obtido os espectros constantes nas **Figuras 38 e 39**.

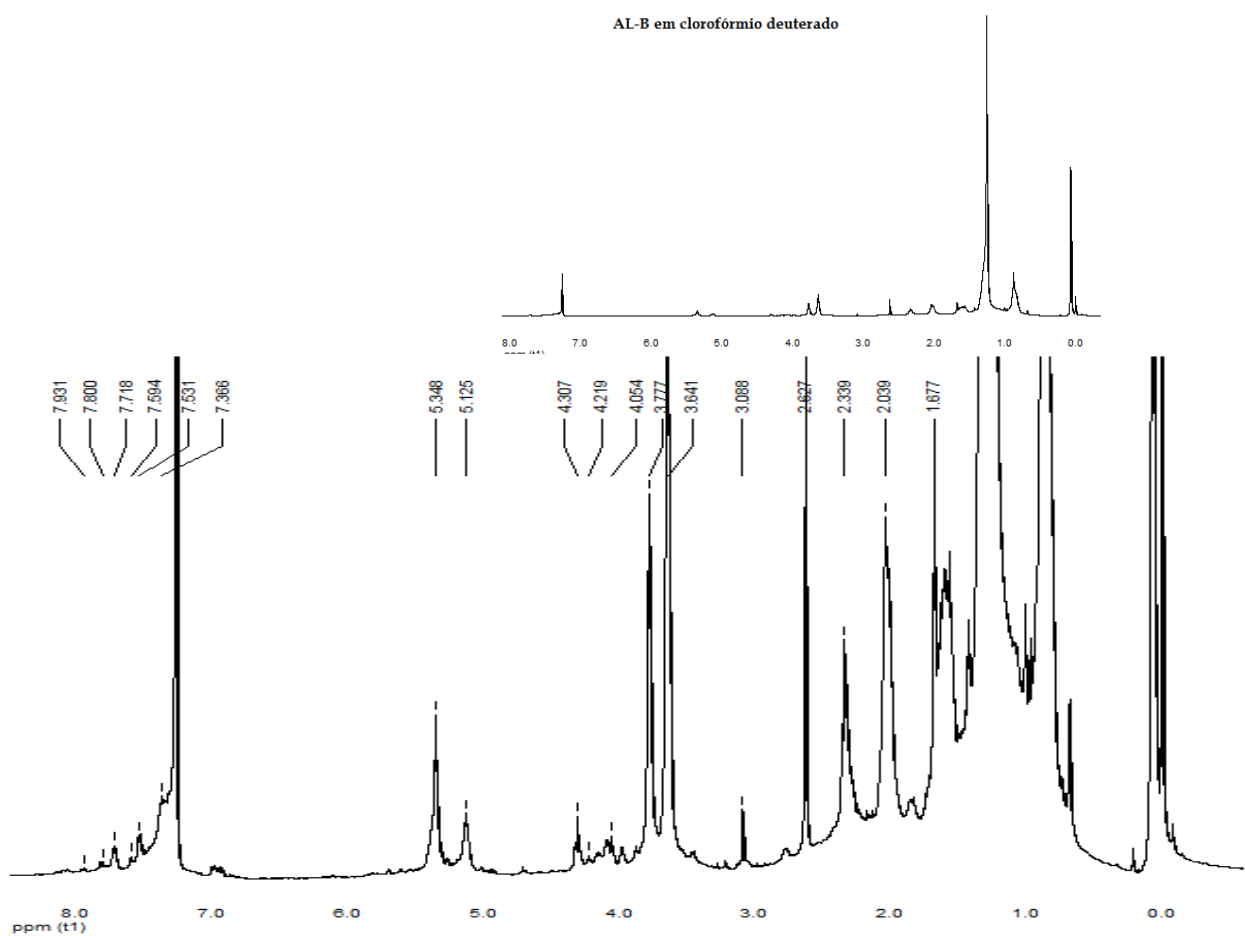
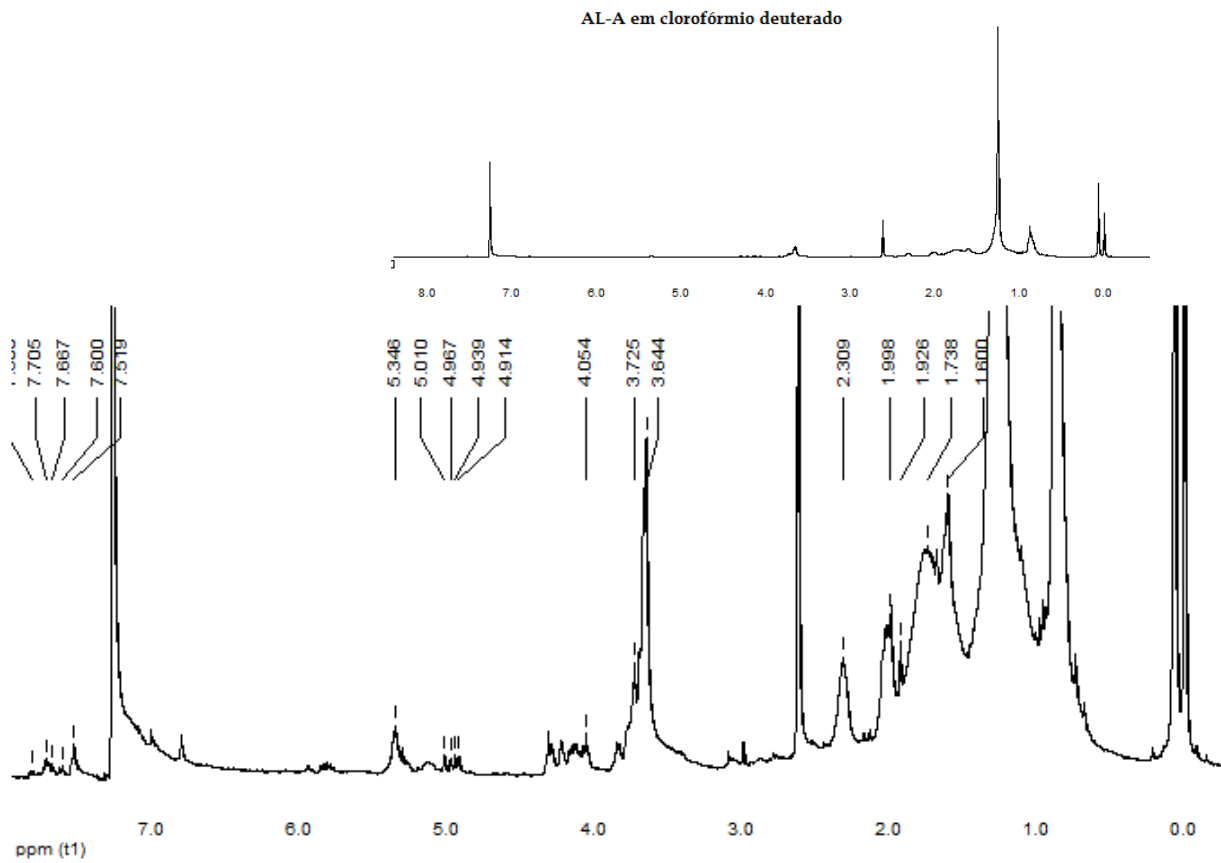


Figura 38 - Espectros de RMN ^1H dos extractos AL-A e AL-B em cloróformio deuterado

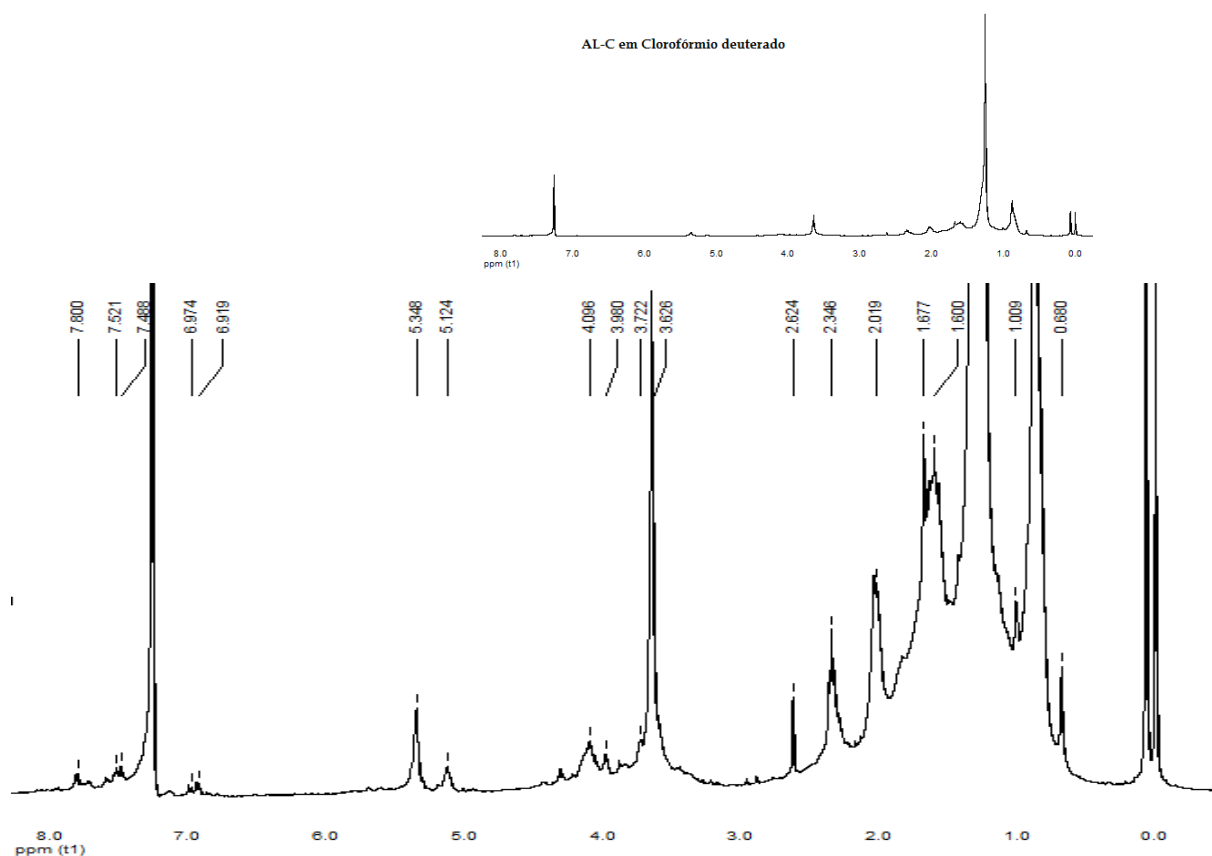


Figura 39 - Espectro RMN ^1H do extracto AL-C obtido em clorofórmio deuterado

Através da comparação dos três espectros em clorofórmio, verifica-se que possuem perfis idênticos, sem diferenças significativas entre si. A maioria dos sinais com intensidades e áreas consideráveis surge entre $\delta = 0,8$ ppm e $\delta = 2,5$ ppm, o que corresponde geralmente a sinais gerados por protões alquílicos. Na região entre $\delta=3$ ppm e $\delta = 4$ ppm surgem também alguns sinais, geralmente atribuídos a protões vinílicos ou junto a um heteroátomo (por exemplo, numa estrutura $\text{CH}_2 - \text{N}$).

A região geralmente associada a protões aromáticos, com $\delta > 7$ ppm, também apresenta alguns sinais. No entanto, a sua intensidade/área é tão reduzida que pode ser atribuída a contaminantes nas fracções isoladas.

Por uma questão de confirmação de resultados, foi decidido analisar novamente o extracto AL-B em metanol deuterado, para se salvaguardar o caso de a solubilização dos compostos em clorofórmio não ser total. A selecção do extracto AL-B prendeu-se exclusivamente com o facto de ser o que se encontrava em maior quantidade. O espectro obtido pode ser analisado na **Figura 40**, de onde, por comparação com a

Figura 38, se pode afirmar que os resultados são idênticos, sem diferenças significativas.

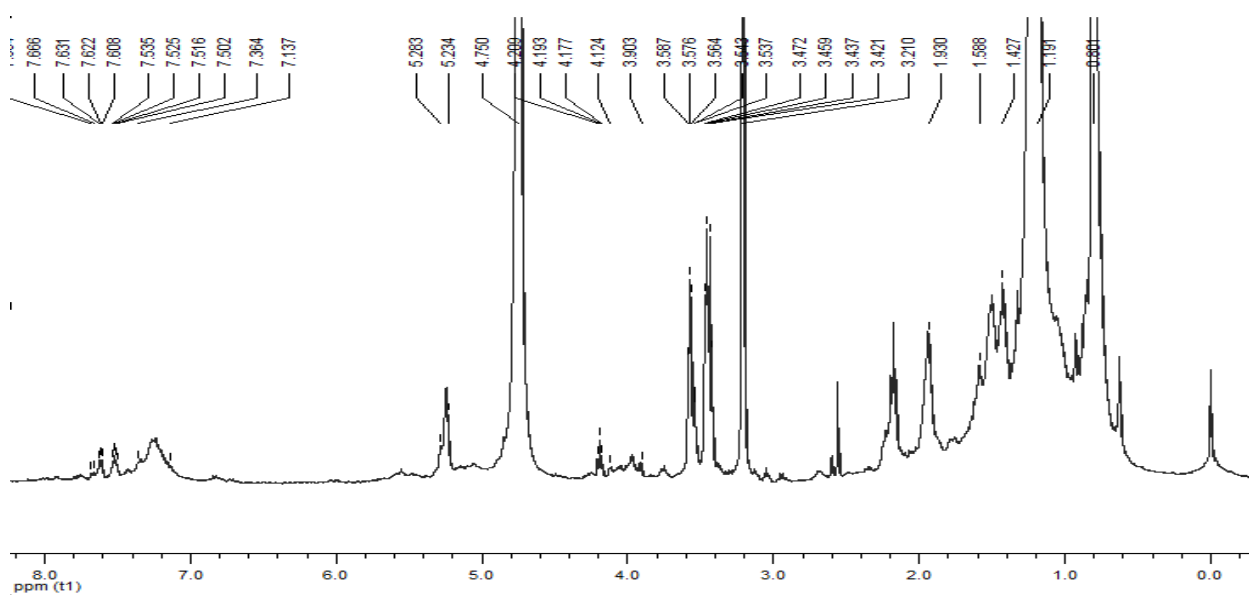


Figura 40 - Espectro de RMN ^1H do extracto AL-B em metanol deuterado

A única diferença que se observa entre espectros diz respeito a um ligeiro desvio dos sinais para campo mais baixo no espectro, devendo-se isto à mudança de solvente.

Para efeitos comparativos, procedeu-se também à análise do padrão de berberina. Os espectros obtidos para o padrão, em metanol deuterado e em DMSO deuterado, corresponderam ao esperado, apresentando-se de acordo com o que consta numa base de dados de referência^[54] (**Figura 41**).

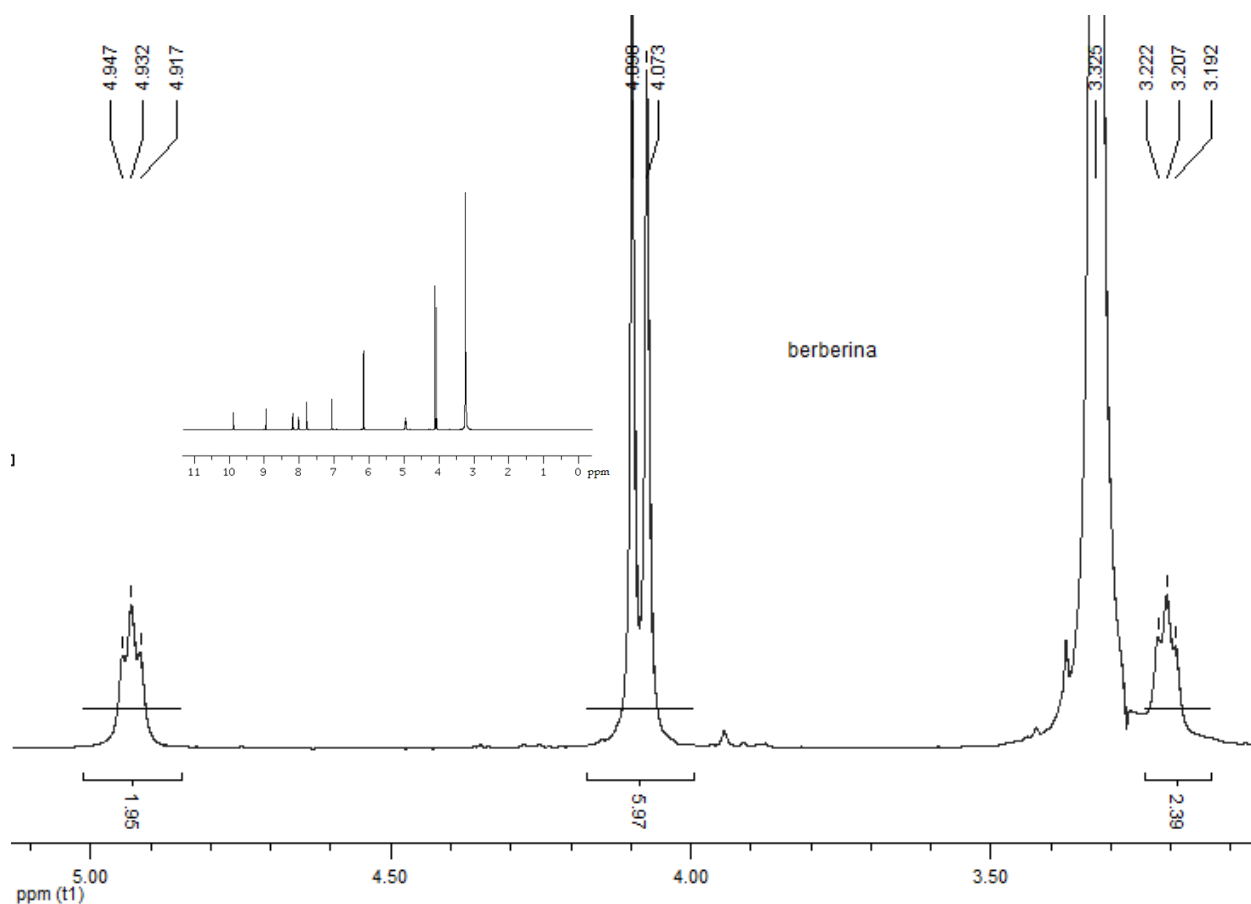


Figura 41 - Espectro RMN ^1H do padrão de berberina em metanol deuterado, ampliação entre δ 3,1 e 5,1 ppm. Em sobreposição, à esquerda, o mesmo espectro segundo base de dados de referência^[54].

A informação obtida por RMN ^1H , comparativamente ao espectro de referência da berberina, não permite, portanto, proceder à identificação de qualquer dos compostos isolados AL-A, AL-B e AL-C, sendo possível apenas dizer que se trata de compostos semelhantes em estrutura, não permitindo a garantia se são ou não alcalóides.

2.5. Resultados obtidos por Infravermelho

De modo a completar o estudo dos constituintes isolados da formulação BH1, procedeu-se a análises por IV. Por uma questão de comparação, iniciou-se o procedimento pela análise do padrão de berberina, preparando uma pastilha de KBr com uma pequena amostra de padrão. O espectro obtido, visível na **Figura 42**, não mostra diferenças relativamente ao constante em bases de dados^[54].

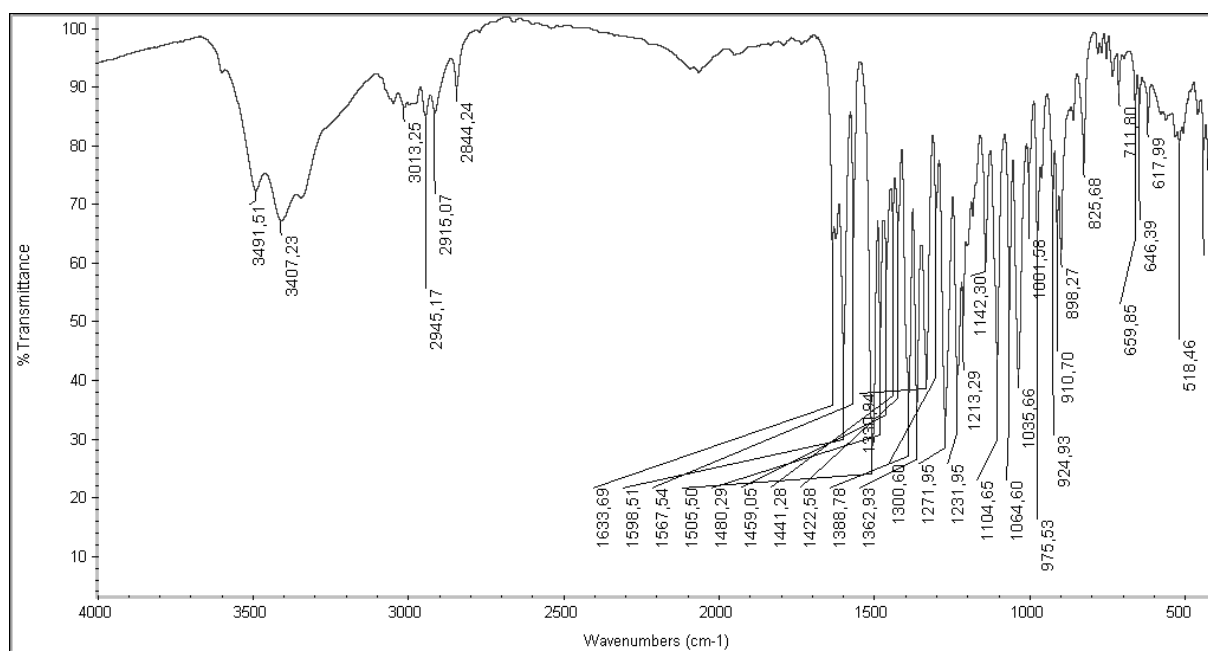


Figura 42 - Perfil IV do padrão de cloreto de berberina

Os constituintes isolados correspondentes às frações AL-A, AL-B e AL-C foram também analisados por IV. Para tal, preparou-se uma pastilha de KBr para cada um deles, na qual se colocou uma gota da solução clorofórmica onde o composto se encontrava dissolvido. Depois de evaporado o solvente, traçou-se o espectro IV de cada composto, sendo possível a sua análise nas **Figuras 43 e 44**.

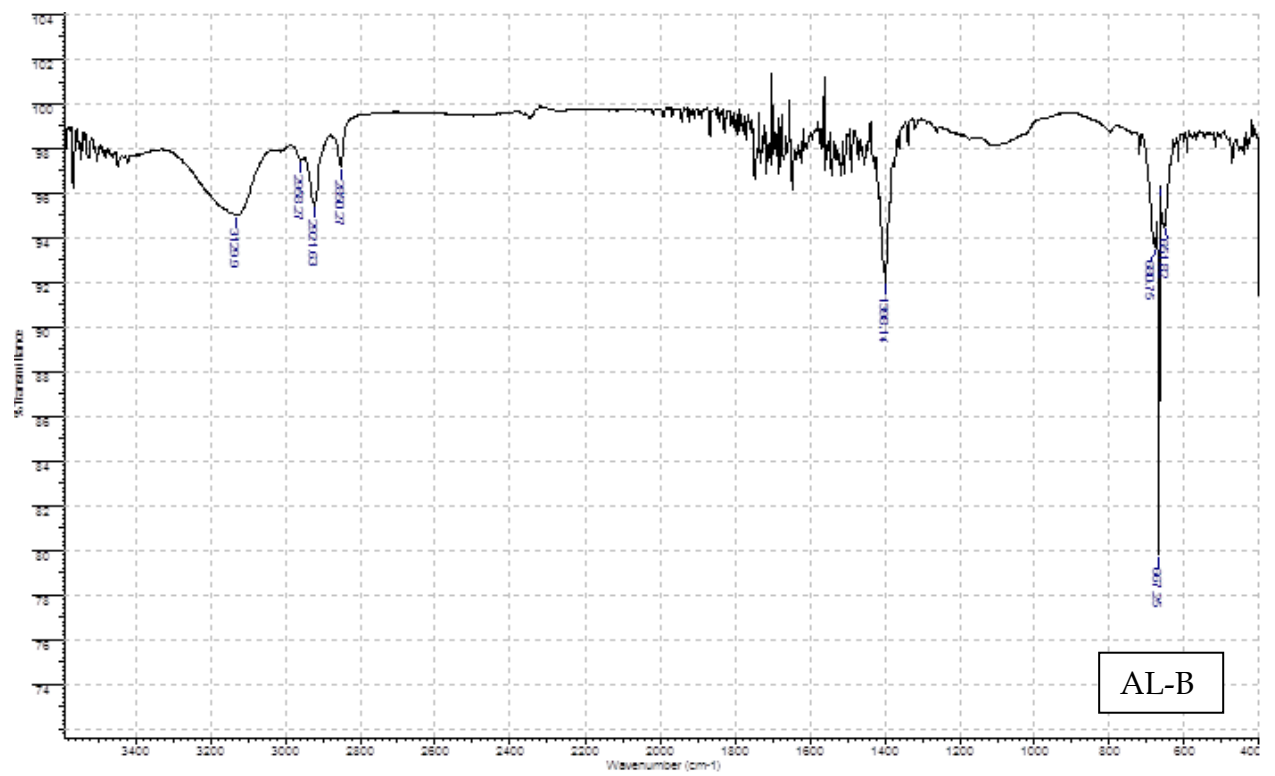
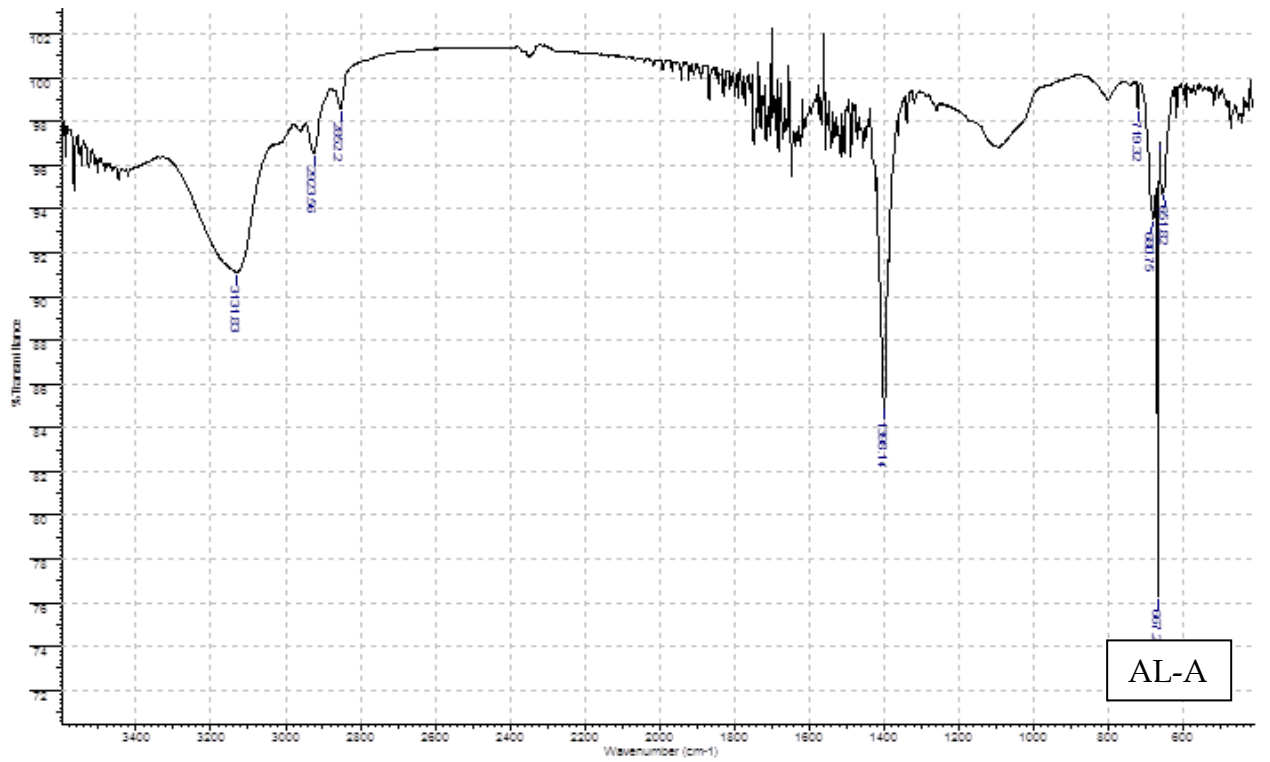


Figura 43 - Perfis IV das fracções AL-A (em cima) e AL-B (em baixo)

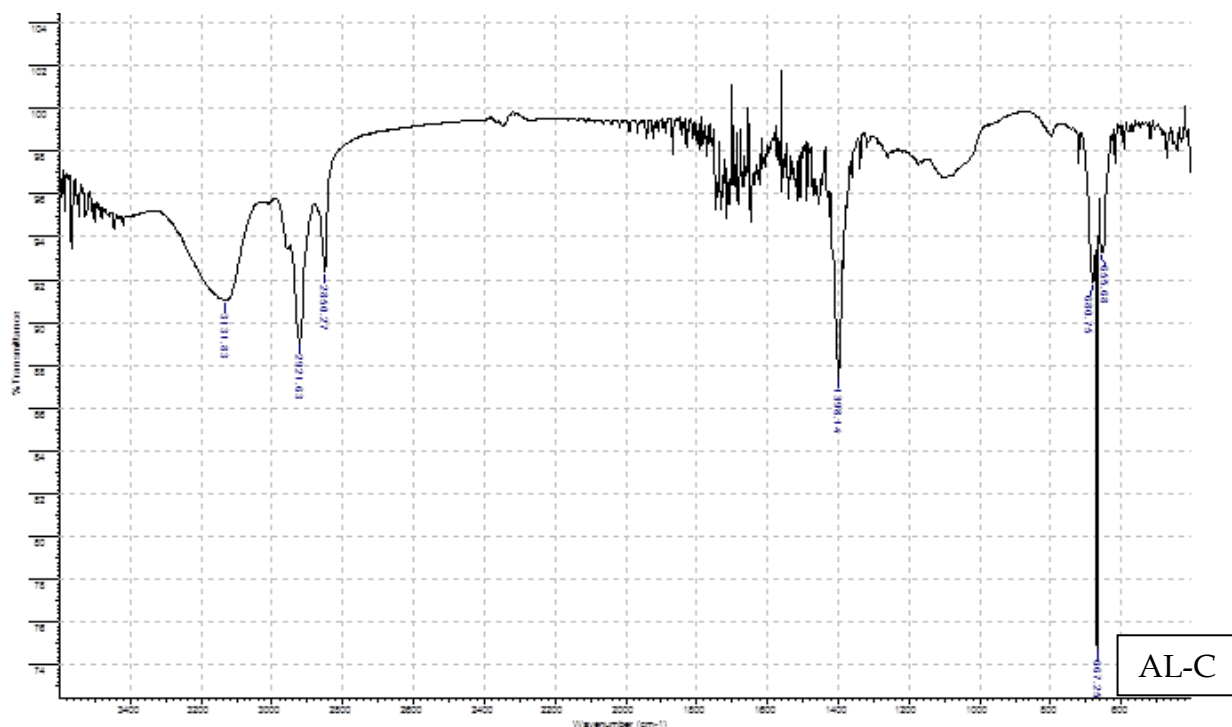


Figura 44 - Perfil IV da fracção AL-C

Por análise destes espectros, mais uma vez se tornou evidente que os três compostos isolados são estruturalmente semelhantes. Também se torna patente que, apesar de isolados utilizando um solvente apropriado para moléculas da família dos alcalóides, estes compostos não são alcalóides. Em nenhum dos três está presente vibração correspondente à ligação $C = N$ característica dos alcalóides, que se costuma observar a cerca de $1500\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$ como um pico estreito de grande intensidade.

Os compostos isolados apresentavam uma ligeira tonalidade amarelada à luz visível e de diferentes tons de amarelo no UV, o que levou a pensar, numa primeira fase, que seriam derivados da berberina. As evidências obtidas por RMN ^1H e IV mostraram o contrário, porém a coloração levou a que se colocasse a hipótese de possuírem estruturas similares às dos constituintes iridóides da planta *Rehmannia glutinosa* L. (Tabela 3), os quais também são extraíveis com etanol. Devido às quantidades diminutas que foi possível isolar, não se proporcionou a confirmação pelas metodologias que foram desenvolvidas.

2.6. Outros testes de pesquisa de toxicidade

2.6.1. Pesquisa geral de alcalóides e específica de berberina

As amostras também foram sujeitas a testes específicos de identificação de substâncias, nomeadamente os testes de detecção de alcalóides em geral e o de identificação da berberina em particular.

Os testes gerais de detecção de alcalóides foram realizados com os reagentes de Bertrand, de Mayer e de Bouchardat. As amostras a testar foram aquecidas e filtradas, tendo-se adicionado três gotas de reagente de forma pausada. Para cada um dos testes e cada uma das amostras o resultado foi negativo, não se verificando a formação de precipitado ou de turvação da solução que indicia a presença de alcalóides^[51]. Tal pode significar ausência de alcalóides na amostra, presença em quantidades muito pequenas ou o precipitado pode ter solubilizado imediatamente após a sua formação, não tendo sido detectado.

Para a detecção específica de berberina, seguiu-se o procedimento recomendado na literatura^[51], dissolvendo-se o conteúdo de uma cápsula das amostras BH1 e BC numa solução diluída de ácido clorídrico com agitação. Após filtração, adicionaram-se algumas gotas de ácido clorídrico concentrado à solução resultante, seguidas de algumas gotas de solução aquosa de clorato de potássio (KClO_3) $0,1 \text{ mol/dm}^3$. No caso da amostra BH3, adicionou-se apenas o ácido clorídrico concentrado e a solução de KClO_3 . Não se observando quaisquer alterações significativas, repetiram-se os testes aumentando as concentrações das soluções de F137 para 5 cápsulas num dos ensaios e de KClO_3 para $0,5 \text{ mol/dm}^3$ noutra. Segundo a literatura, na presença de berberina, a solução assume um tom avermelhado, que não se verificou em nenhuma das amostras. Ao realizar o mesmo teste numa solução metanólica de padrão de cloreto de berberina, observou-se a alteração da cor da solução do amarelo característico da berberina para uma cor acobreada, como poderá ser visualizado na **Figura 45**. De notar que esta é uma reacção relativamente lenta, só se tendo observado a mudança de cor ao fim de aproximadamente 2 horas.

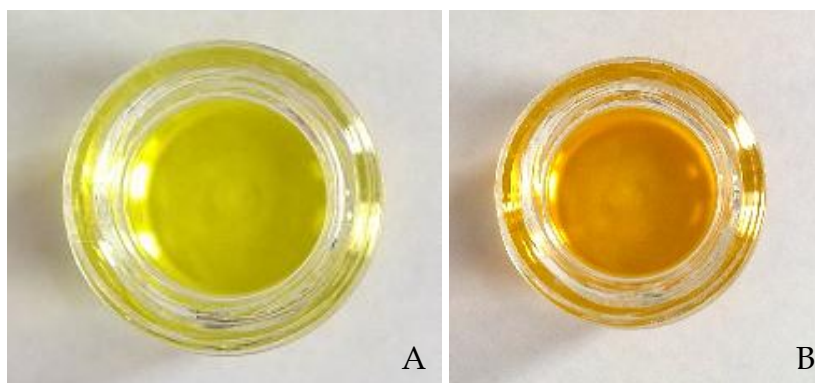


Figura 45 - Teste de detecção da berberina. **A.** Solução padrão; **B.** Solução padrão acidificada com HCl concentrado e com 5 gotas de solução $0,1 \text{ mol/dm}^3$ de KClO_3 .

É necessário referir que, tendo em conta que as amostras em estudo formam soluções coradas, de cor castanha, tanto mais escura quanto mais concentrada for a solução, testes de detecção que impliquem mudanças de cor são extremamente difíceis de interpretar. As soluções foram observadas em contra-luz e comparadas com soluções de idêntica concentração sem adição de KClO_3 de modo a melhor se verificar a possibilidade de mudança de cor.

2.6.2. Testes de Viabilidade Celular

Testes *screening* de viabilidade celular foram realizados com o intuito de perceber se, mesmo não tendo encontrado na formulação em estudo os constituintes tóxicos que estavam descritos na bibliografia, estes poderiam ou não estar nos extractos e induzir toxicidade. Isto porque as quantidades relativas de cada um dos constituintes nos diversos fármacos não vem detalhada na literatura. Essa foi mais uma das razões que limitou bastante a determinação dos níveis de detecção para as variadas estruturas e as possíveis metodologias a aplicar.

Este teste de citotoxicidade aplicado ao conteúdo total da amostra, uma vez que foram usadas as gotas e não o fármaco em pó que vinha nas cápsulas, permitiu uma análise global de todos os constituintes, uma vez que não se procedeu a nenhuma extracção ou filtração.

Os testes foram divididos em duas partes - a primeira consistiu na verificação de

citotoxicidade da formulação em estudo e a segunda na verificação de actividade anti-inflamatória - e realizados em macrófagos mantidos e cultivados a 37° C em ambiente húmido (95%) com teor de CO₂ de 5%.

A amostra utilizada foi a BH3, a qual, segundo a posologia recomendada no rótulo, deve ser diluída em água, 50 gotas para um copo de água, duas vezes ao dia. Tendo-se estabelecido que 50 gotas equivalem a 1,3 mL, e assumindo que um copo de água seriam 100 mL (valor arbitrário, já que depende do consumidor e que normalmente corresponde a meio copo), prepararam-se duas soluções de teste. A primeira, E₁, corresponde a 1 dose de BH3 segundo os parâmetros indicados, e a segunda, E₂, corresponde a 2 doses de BH3, ou seja, a quantidade ingerida num dia.

O meio celular foi preparado de antecedência em substrato próprio utilizando placas de cultura adequadas. Reservando as duas primeiras para controlo, contendo 600 µL de substrato, aplicaram-se 570 µL de substrato e 30 µL de E₁ e de E₂ nos poços contendo as células a testar, de acordo com o esquema apresentado na **Figura 46**.

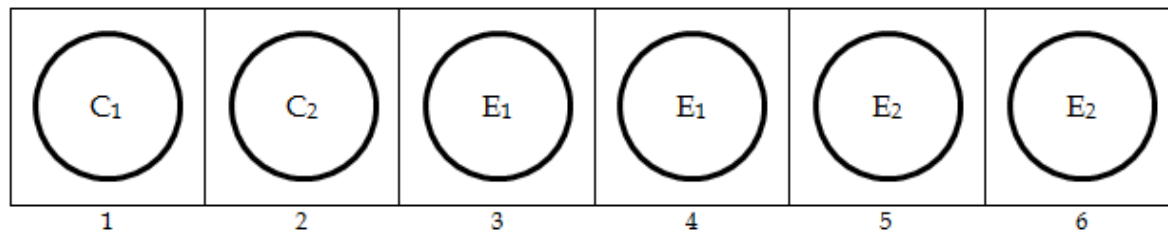


Figura 2 - Esquema representativo de distribuição da amostra para testes de viabilidade celular. 1 e 2 - Poços de controlo, macrófagos em substrato puro; 3 e 4 - Aplicação de 30 µL de E₁, solução correspondente a 1 dose diária de BH3; 5 e 6 - Aplicação de 30 µL de E₂, solução correspondente a 2 doses diárias de BH3.

Cada ensaio foi duplicado para prevenir erros que pudessem ocorrer.

Após 24 horas, a placa foi retirada da câmara de incubação e cada poço foi observado ao microscópio. Foi possível verificar a ocorrência de morte celular nos poços 3 a 6, contendo BH3. Depois desta confirmação visual, retiraram-se 170 µL de sobrenadante de cada poço para outra placa de cultura que se reservou para posterior utilização. Adicionaram-se 43 µL de MTT (5 mg/mL) a cada poço e, colocando a placa de cultura a incubadora, aguardaram-se 15 minutos. A formação de cristais azuis de formazan é proporcional à capacidade de metabolização das

células, sendo esta diminuída em casos de citotoxicidade.

Retirou-se o sobrenadante e adicionaram-se 300 μ L de isopropanol ácido (0,04 N) a cada poço de modo a solubilizar os cristais e homogeneizar-se o seu conteúdo.

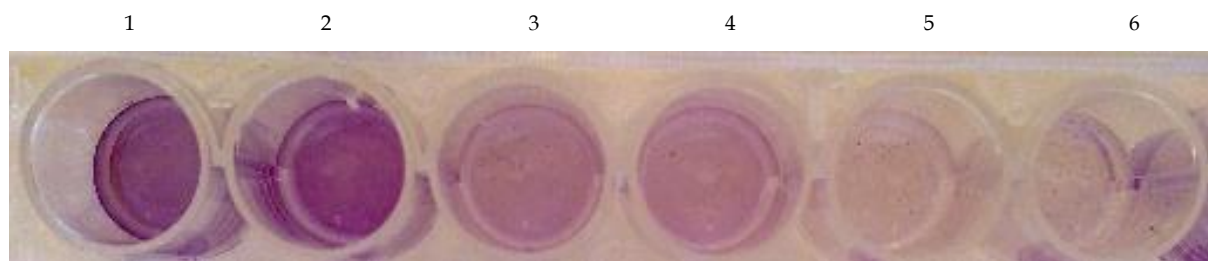


Figura 47 - Resultado do teste de citotoxicidade da formulação BH3 em macrófagos.

Na **Figura 47** é possível visualizar-se as soluções obtidas por solubilização dos cristais. Por comparação com as células de controlo (poços 1 e 2), verificou-se que existe muito menos formação de cristais por parte das células colocadas em contacto com a amostras BH3, o que significa uma diminuição da sua capacidade de metabolização. Foi ainda possível verificar-se que nos poços onde foi aplicada a solução E₂ (poços 5 e 6) houve menor produção de cristais que naqueles onde se aplicou E₁ (poços 3 e 4).

Analisando por espectrometria os poços, obtiveram-se os valores de absorvância de cada poço, medidos a 570 nm, os quais comprovaram as observações visuais.

Uma conclusão que se pode retirar destes ensaios é que a formulação pode tornar-se perigosa se a dose recomendada for excedida. No entanto, como referido anteriormente, estes resultados são apenas preliminares. Não há confirmação de resultados por repetição de ensaios nem estudos de como a concentração da solução poderá influenciar, ou não, a viabilidade celular. Também convém mencionar que a amostra testada apresenta-se na forma de gotas que devem ser diluídas em água e ingeridas. No estômago, a acção do suco gástrico pode influenciar o efeito dos constituintes da formulação, algo que não foi testado.

A segunda parte dos testes de viabilidade, a actividade anti-inflamatória, foi

realizada em simultâneo, nos mesmos moldes que a de citotoxicidade, medindo a quantidade de nitritos produzida no sobrenadante reservado. A cada poço foram adicionados 170 μ L de reagente de Griess e deixou-se a reagir durante 30 minutos ao abrigo da luz. Após este tempo, observou-se a placa e mediram-se as absorvâncias. O resultado pode ser observado na **Figura 48**.

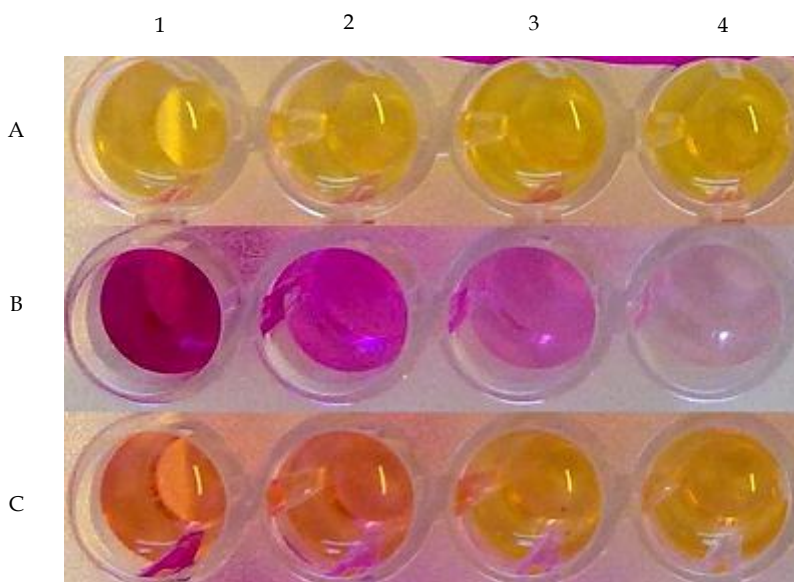


Figura 48 - Ensaio preliminar de actividade anti-inflamatória. **A1-A4** - Células de controlo; **B1-B4** - Controlo de reagente; **C1 e C2** - Teste da solução E₁; **C3 e C4** - Teste da solução E₂.

Tendo em consideração apenas os resultados obtidos por este teste, a conclusão que se poderia retirar é que a formulação apresenta actividade anti-inflamatória, o que é consistente com a informação obtida na literatura para algumas das plantas utilizadas na sua produção. No entanto, trata-se de um falso positivo, já que o teste de citotoxicidade indicou que as células se encontravam comprometidas, assim como a observação inicial das células ao microscópio revelou a ocorrência de morte celular.

Face aos resultados obtidos, e embora estes não sejam conclusivos, a formulação em gotas poderá apresentar bastante bioactividade mas também toxicidade.

Capítulo 3. Conclusões

As plantas incluídas na formulação em estudo são organismos complexos que têm, na sua composição química, moléculas de diferentes estruturas e tamanhos, abrangendo as lineares, ramificadas, cíclicas e heterocíclicas, com diferentes propriedades físico-químicas, algumas das quais apresentando bioactividade comprovada, outras não. Nas formulações à base de plantas, entre as quais se incluem as da MTC, o grau de complexidade é reforçado pelo facto de serem utilizadas diversas plantas diferentes, além de partes animais, minerais e fungos. Mesmo considerando a possibilidade de se encontrarem constituintes comuns em algumas destas, esta multiplicidade de moléculas torna-as difíceis estudar por uma única técnica, como se pôde verificar ao longo desta investigação.

Estas formulações são apresentadas ao consumidor como possuindo propriedades curativas que, na maior parte dos casos não está comprovada cientificamente. O que é indiscutível é que alguns dos constituintes de algumas das plantas apresentam bioactividade, de onde também pode decorrer toxicidade. No entanto, dependendo do processo de produção da formulação, podem ocorrer transformações que alteram as propriedades das moléculas, influenciando a eficácia da formulação. Também de referir que, havendo bioactividade, a possibilidade de interferência com outras formulações é uma realidade, tanto mais grave quando ocorre por uso concomitante com medicamentos alopáticos. Sem estudos mais completos da composição química destas formulações, e sem se informar o médico de tudo o que se está a tomar, o doente pode contrariar um tratamento, tornando-o ineficaz ou potenciando os seus efeitos secundários.

Do estudo feito sobre a formulação *An Shen Wan* concluiu-se que, embora os principais constituintes bioactivos das plantas envolvidas na sua produção fossem maioritariamente alcalóides, flavonóides e compostos fenólicos, a sua presença não foi definitivamente detectada pelos testes gerais de detecção gerais para esses grupos de compostos. O isolamento de três constituintes por TLC preparativa e o seu estudo por HPLC-DAD, RMN ¹H e IV não permitiu a sua identificação inequívoca, permitindo apenas excluí-los das famílias de compostos supracitadas. De igual modo foi impossível aferir a presença de um alcalóide específico dotado de toxicidade reconhecida, a berberina, quer pelas técnicas mencionadas quer por testes de

detecção apropriados, assim como de outros alcalóides que poderiam estar presentes na formulação.

Tal pode ter sucedido por estes constituintes se encontrarem em percentagens muito pequenas na amostra, sendo necessário aumentar bastante as quantidades analisadas de modo a se poder detectar a sua presença ou mesmo quantificá-la. Como mencionado anteriormente, podem também ter ocorrido alterações estruturais durante o processo de produção do extracto e o produto acabado não corresponder correctamente às matérias-primas originais.

Constituintes como vários ácidos fenólicos e flavonóides que vêm citados na literatura em vários dos fármacos incluídos na formulação não foram encontrados, o que limitou o seu uso como marcadores.

De tudo o que foi possível encontrar salientam-se os três compostos amarelos isolados que teoricamente, numa primeira fase, se pensou serem derivados da berberina, o que não se veio a confirmar. Não sendo constituintes da *Rizhoma Coptidis*, uma outra hipótese poderia ser tratar-se de constituintes da *Radix Rehmanniae*, dado que é amarela e, sendo o principal fármaco da formulação, os seus iridóides tinham probabilidade de estar na mesma proporção no produto final. A falta de dados relativos à sua análise não permitiu a confirmação desta suspeita.

No que concerne ao ensaio de citotoxicidade positiva, veio alertar que os vários constituintes que integram estes fármacos, e que também têm potencial tóxico, podem ter uma acção sinérgica neste sentido e não ser detectados em quantidades baixas.

No que respeita à questão do controlo de qualidade, verificou-se a alteração das percentagens de cada planta na formulação dependendo do fornecedor. Tendo em consideração o carácter holístico da MTC e a forma como esta encara a relação entre plantas medicinais no processo de cura, assim como a possibilidade de interacções com medicamentos, a variação das percentagens de cada planta na formulação pressupõe uma alteração na concentração de constituintes, podendo conduzir a diferentes efeitos no organismo. Como tal, um controlo mais apertado no que se

refere ao cumprimento da legislação que regula estas formulações seria desejável, no interesse da saúde pública.

Capítulo 4. Experimental

4.1. Materiais

4.1.1. Amostras e preparação dos extractos

A fórmula F137, *An Shen Wan*, foi adquirida por 2 fornecedores diferentes:

- Loja Botica Homeopática de Coimbra, amostras BH1, BH2 e BH3 apresentando-se as duas primeiras na forma de cápsulas (60 cápsulas por frasco) de 500 mg cada, ambas pertencendo ao mesmo lote, 201003-1 com validade Mar/2013, e a última na forma de gotas, pertencendo ao lote 11L06/B410231219 com validade 11/2013;
- Empresa BenCao, Lda (Cascais), amostra BC (adquirida online) apresentava-se sob a forma de cápsulas (125 cápsulas por frasco) de 300 mg cada, pertencendo ao lote 120207 e com validade 11/11/2014 .

Os extractos das cápsulas (amostras BH1, BH2 e BC) foram preparados da mesma forma, a qual consistiu na junção, num balão de erlenmeyer, de 5 mL de etanol 80% ao conteúdo de uma cápsula após a sua pesagem, seguida de banho de ultra-sons durante 15 minutos. Ao fim desse tempo, foram adicionados 15 mL de ácido clorídrico 10% à mistura etanólica e o erlenmeyer foi colocado em banho-maria durante um período de 1 hora à temperatura de 65° C. Depois de arrefecida, a mistura foi colocada num balão volumétrico e o volume final foi aferido em 20 mL.

A amostra BH3 foi utilizada sem tratamento uma vez que se tratava de uma formulação líquida.

4.1.2. Reagentes

O padrão de berberina (cloreto de berberina) foi adquirido através da Sigma-Aldrich, pertencendo ao lote 011M1364V;

O acetonitrilo de grau HPLC foi adquirido através da Merck;

Os diferentes solventes utilizados na preparação e análise das soluções estudadas, etanol, metanol, propanol, ácido fórmico, ácido acético glacial, ácido clorídrico, amónia, acetato de etilo, acetonitrilo, de grau analítico, foram adquiridos a diversas empresas;

Os solventes deuterados clorofórmio, DMSO e metanol foram adquiridos à empresa Euriso-top;

Os padrões de aminoácidos e flavonóides utilizados foram adquiridos a diversas empresas, assim como as matérias-primas necessárias para a preparação dos reveladores utilizados em TLC (vanilina, Dragendorff e NP/PEG).

4.1.3. Equipamentos

As balanças utilizadas para a pesagem do conteúdo das cápsulas foram uma Precisa Gravimetrics AG 320 XR 405A no Departamento de Química e uma Mettler AE240 na Faculdade de Farmácia.

As análises por HPLC-DAD foram realizadas num sistema Gilson com detector de fotodíodos DAD 170 variável em varrimentos entre os comprimentos de onda 200 e 800 nm, munido de duas bombas e um auto-injector; separação realizada em coluna Jones Chromatography Model 7956 C18 ODS2 (diâmetro de 5 μ m, 250 x 4,5 mm), estando este sistema ligado a um computador equipado com *software* Unipoint LC versão 5.11 da Gilson, Inc para a leitura e interpretação dos dados obtidos.

A centrifuga utilizada antes da microfiltração dos extractos foi uma Sigma Laborzenfugen 3K10.

Foram utilizados três evaporadores rotativos: um Heidolph VV 2002 com bomba de vácuo KNF Neuberger Laboport e um Butchi Rotavapor r-210 com bomba de vácuo Butchi Vacuum pump V700 no Departamento de Química e um Butchi Waterbath

B480 com bomba de vácuo Butchi vacuum pump V700 e Butchi vacuum controller V-850 na Faculdade de Farmácia.

A visualização à luz UV dos diversos TLCs realizados foi efectuada recorrendo a uma lâmpada UV LAMAG com $\lambda = 254$ nm e $\lambda = 366$ nm.

Os banhos de ultra-sons realizaram-se utilizando o modelo Bandelin Sonorex RK 100H no Departamento de Química e o modelo Bandelin Sonorex digitec na Faculdade de Farmácia.

Os espectros de RMN ¹H foram obtidos através do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Centro de Química de Coimbra utilizando um espectrómetro de RMN 9.4 Tesla Bruker Avance III de 400 MHz.

Os espectros de IV foram obtidos no Departamento de Química utilizando um espectrómetro de infravermelho Thermo Scientific Nicolet 6700 FT-IR ligado a um computador com software de recolha e análise de dados Omnic 8.

4.1.4. Material

O material utilizado para as diversas operações e testes efectuados incluiu:

- Aparelho de microfiltração (com filtros Millipore de 0,22 μ m)
- Secador de cabelo
- Placas de aquecimento
- Banho-maria
- Copos de vidro e erlenmeyers de diversos tamanhos
- Balões volumétricos de diversos tamanhos
- Balões de fundo redondo
- Espátulas
- Pipetas graduadas

- Câmaras de cromatografia
- Placas de alumínio para TLC de sílica gel 60 F254 da Merck
- Sílica gel 60 HF254 para placa preparativa da Merck, dimensões 90% < 55µm
- Placas de vidro para TLC preparativa de 20x20 cm
- Suportes universais, garras, argolas e nozes
- Vidros de relógio
- Pipetas de pasteur
- Micropipetas
- Capilares e microcapilares
- Tubos de RMN
- Frascos de amostras
- Vaporizadores

4.2. Metodologias

HPLC-DAD (para pesquisa e identificação de ácidos fenólicos e polifenólicos)

Solução de F137 cápsulas ou gotas

Preparação da amostra: após o processo de extracção geral das amostras (4.1) foi necessário tratar a solução em estudo de modo a que pudesse ser analisada por HPLC-DAD. Para tal, transferiu-se 1 mL de solução-mãe para um Eppendorf® e centrifugou-se durante 5 minutos a 4500 rpm. Retiraram-se 200 µL de sobrenadante que foram microfiltrados, sendo a solução filtrada transferida para um vial. Este foi selado e identificado e inserido no tabuleiro de amostras do aparelho de HPLC-DAD para a análise.

Condições de análise:

- Temperatura: 25°C
- Fluxo: 0,8 mL/min

- Volume de Injecção: 100µL
- Comprimentos de onda DAD: 200 a 400 nm
- Eluentes: A = Acetonitrilo; B = Água acidificada com ácido *orto*-fosfórico, pH 2,3, microfiltrada e desgaseificada
 - Gradiente de eluição: Início com 100% de eluente A, diminuindo até 91% durante os primeiros 12 minutos, até 87% nos oito minutos seguintes e até 67% nos dez minutos seguintes. Concentração de A constante a 67% durante dois minutos e reduzida para 57% nos dez minutos subsequentes, a qual é mantida até final da eluição, perfazendo um total de 60 minutos.
 - No intervalo entre amostras, a coluna é lavada com 100% de eluente B e retomado o equilíbrio a 100% do solvente A.

TLC preparativa

Preparou-se de antemão o sistema de eluentes para a cromatografia, constituído pela mistura propanol - ácido fórmico - água (90:1:9), sendo colocada na câmara cromatográfica a quantidade suficiente para atingir uma profundidade de cerca de 1,5 cm. Para melhores resultados, deve-se deixar a câmara a estabilizar algumas horas, preferencialmente durante 1 dia.

Utilizando um capilar adequado, aplicou-se a amostra numa linha recta na base da placa de sílica para TLC, a cerca de 2 cm de distância do fundo da placa, aplicando aquecimento suave constante. A aplicação de amostra foi repetida tantas vezes quantas possível (até ter sido usada, pelo menos, cerca de 0,5 mL de solução), tendo a placa sido bem seca entre repetições.

Após a aplicação da amostra, a placa foi minuciosamente seca e colocada na câmara de cromatografia. Deixou-se eluir cada placa até cerca de 2 cm do topo, retirando-se de seguida e secando-se o eluente.

Cada placa foi observada à luz natural e sob lâmpada de ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm, de modo a marcar as bandas detectáveis a este

comprimento de onda, correspondentes a constituintes separados.

A sílica correspondente a cada banda separada foi raspada para diferentes suportes (erlenmeyer ou copo de vidro).

Devem eluir-se tantas placas quantas as necessárias para se obter uma quantidade suficiente de cada extracto isolado, sendo aconselhado um mínimo de 10 placas.

Adicionaram-se pequenos volumes de etanol 50% à sílica retirada das placas e colocaram-se os erlenmeyers no banho de ultra-sons durante 1 hora.

Para a filtração do extracto, utilizou-se um filtro de placa porosa munido de um pouco de celite para evitar problemas com as reduzidas dimensões da sílica. Para minimizar as perdas de composto na placa e na celite, fizeram-se várias passagens de solvente, sendo este recolhido e acrescentado à solução filtrada.

A solução resultante de cada fracção isolada foi transferida para um balão de fundo redondo diferente e, por intermédio de um evaporador rotativo, evaporou-se o solvente com aquecimento suave, tendo-se obtido um resíduo sólido em cada balão.

A cada extracto obtido, adicionou-se clorofórmio de modo a excluir quaisquer vestígios de sílica dissolvidos durante o processo de extracção. A solução obtida foi novamente filtrada, procedendo como anteriormente e evaporando-se o solvente no evaporador rotativo.

Os extractos assim isolados e purificados foram reservados para as diferentes análises espectroscópicas.

RMN

Para cada extracto isolado seguiu-se o mesmo procedimento, o qual consistiu na secagem cuidadosa do resíduo sólido, incluindo a aplicação de um sopro de azoto, N₂, para assegurar a secagem total e a evaporação de qualquer água que possa estar presente.

Adicionou-se clorofórmio deuterado ao resíduo e, após alguns segundos no banho de ultra-sons para garantir a total dissolução do mesmo, transferiu-se a solução para um tubo de RMN utilizando uma pipeta de Pasteur nova de cada vez. O tubo, depois de selado e identificado, foi entregue no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear para análise por RMN protónico.

Para se obterem os espectros em metanol e DMSO deuterados, transferiu-se a fracção clorofórmica para um balão de fundo redondo e, após evaporação do solvente, repetiram-se os passos anteriores para cada solvente deuterado.

IV

Foi preparada uma pastilha de KBr para cada uma das amostras a analisar, pesando-se cerca de 200 mg de KBr armazenado numa estufa a 100° C. Este foi pulverizado em almofariz de ágata conservado permanentemente num excicador com sílica anidra.

Para os extractos isolados, adicionou-se uma gota de solução de extracto dissolvido em clorofórmio à pastilha de KBr e deixou-se secar o solvente. Para o padrão, foi adicionada uma pequena quantidade de amostra ao KBr ao preparar a pastilha. A quantidade de amostra sólida colocada em cada pastilha foi na ordem dos poucos miligramas (menos de 5) pois, tratando-se de compostos corados, corre-se o risco de se obterem bandas de absorção sem definição - a pastilha deve ficar transparente ou translúcida.

Cada pastilha foi colocada no espectrómetro de IV após a recolha de amostra atmosférica e analisada.

Viabilidade Celular

Os testes de viabilidade celular foram realizados em macrófagos, mantidos em placas de cultura em estufas à temperatura de 37°C em atmosfera rica em humidade (95%) e em dióxido de carbono (5%). Reservaram-se dois poços de células aderentes

para controle e aplicaram-se 0,6 μL de LPS para cada poço da placa.

Prepararam-se duas soluções de teste da amostra BH3 dissolvendo 1,3 mL (solução E1) e 2,6 mL (solução E2) em 100 mL de água.

Adicionaram-se 30 μL de cada solução de teste às células e deixou-se a estabilizar durante 24h. Após este período, retiraram-se 170 μL de sobrenadante para uma placa ELISA e adicionaram-se 170 μL de reagente de Griess a cada poço, deixando-se reagir durante 30 minutos ao abrigo da luz. Finalmente, observou-se a placa à luz natural e mediram-se as absorvâncias a 550 nm.

Aos restantes 430 μL de sobrenadante na placa original adicionaram-se 43 μL de MTT (5 mg/mL) preparado em PBS, deixando-se reagir durante 15 minutos na estufa. Observou-se a produção de cristais azuis de formazan. Recolheu-se o sobrenadante e adicionaram-se 300 μL de isopropanol ácido (0,04 N) de modo a solubilizar os cristais e obter uma melhor leitura de absorvâncias a 570 nm.

Bibliografia

- [1] World Health Organization (2000). *General guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Geneva
- [2] Chan, K. (2003) Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. *Chemosphere*, 52, 1361-1371
- [3] Directiva 2001/83/EU do Parlamento Europeu e do Conselho de 6 de Novembro de 2001 sobre o código Comunitário relacionado com produtos medicinais para uso humano, *Official Journal of the European Communities* em 28/11/2001
- [4] Jordan, Scott A.; Cunningham, David G.; Marles, Robin J. (2010). Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 243, 198-216
- [5] Wong, Siu-kay; Tsui, Shu-ki; Kwan, Sik-yiu (2002) Analysis of proprietary Chinese medicines for the presence of toxic ingredients by LC/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 161-170
- [6] Xu, Yun; Su, Chunjiang; Zheng, Yuanchang (2007) Toxic plant resources in Panxi area. *Wuhan University of Natural Sciences*, 12, (4), 762-768
- [7] Singhuber, Judith; Zhu, Ming; Prinz, Sonja; Kopp, Brigitte (2009) Aconitum in Traditional Chinese Medicine – A valuable drug or an unpredictable risk? *Journal of Ethnopharmacology*, 126, 18-30
- [8] Wu, Jing-Nuan (2005) *An Illustrated Chinese Materia Medica*, Oxford University Press, New York

- [9] Nah, Seong-Yeol; Bhatia, Kamal S.; Lyles, Johnnie; Elinwood, Everett H.; Lee, Tong H. (2009) Effects of ginseng saponin on acute cocaine-induced alterations in evoked dopamine release and uptake in rat brain nucleus accumbens. *Brain Research*, 1248, 184-190
- [10] Shin, Eun-Joo; Oh, Ki-Wan; Kim, Kee-Won; Kwon, Yong Soo; Jhoo, Jin Hyeong; Jhoo, Wang-Kee; Cha, Joo-Young; Lim, Yong Wwang, Kim, In Soon; Kim, Hyoung-Chun (2004) Attenuation of cocaine induced conditioned place preference by *Polygala tenuifolia* root extract. *Life Sciences*, 75, 2751-2764
- [11] Liang, Yi-Zeng; Xie, Peishan; Chan, Kelvin (2004) Quality control of herbal medicines. *Journal of Chromatography B*, 812, 53-70
- [12] He, Chun-e; Wei, Jianhe; Jin, Yue; Chen, Shilin (2010) Bioactive components of the roots of *Salvia miltiorrhizae*: Changes related to harvest time and germplasm line. *Industrial Crops and Products*, 32 (3), 313-317
- [13] Cunha, A. Proença (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
- [14] Choy, Pedro (2000) *Fitoterapia tradicional chinesa. Curso de acupunctura e fitoterapia tradicional chinesa*, Associação portuguesa de acupunctura e disciplinas associadas
- [15] Li, ChiaYing; Tsai, Sung-I.; Damu, Amooru G.; Wu, Tian-Shung (2009) A rapid and simple determination of protoberberine alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by ¹H NMR and its application for quality control of commercial prescriptions, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49, 1272-1276
- [16] World Health Organization (1999). *WHO monographs on selected medicinal plants* (Vol 1) Geneva

- [17] Catálogo Phyproof, Reference substances, Phytolab, 2008/2009
- [18] Philogène, B.J.R.; Arnason, J.T.; Towers, G.H.N.; Abramowski, Z.; Campos, F.; Champagne, D.; McLachlan, D. (1984) Berberine: a naturally occurring phototoxic alkaloid. *Journal of chemical ecology*, 10 (1) 115-123
- [19] Kheir, Michael M.; Wang, Yugang; Hua, Lei; Hu, Jun; Li, Lele; Lei, Fan; Du, Lijun (2010) Acute toxicity of berberine and its correlation with the blood concentration in mice. *Food and Chemical Toxicity*, 48, 1105-1110
- [20] Ma, Bing-Liang; Ma, Yue-Ming; Shi, Rong; Wang, Tian-Ming; Zhang, Ning; Wang, Chang Hong; Yang, Yang (2010) Identification of toxic constituents in *Rizhoma Coptidis*. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 357-364
- [21] Anónimo (2012) *Fundação do ator Michael J. Fox financia investigação inovadora da UC sobre a doença de Parkinson*. Retirado em 21 de Junho de 2012 de <http://www.uc.pt/fctuc/noticias/n20120228n01>
- [22] World Health Organization (2007) *WHO monographs on selected medicinal plants*. (Vol 3), Geneva
- [23] Pharmacopoeia Commission of the Ministry of Public Health (1996) *A coloured atlas of the chinese materia medica specified in Pharmacopoeia of the People's Republic of China (1995 Edition)*, Guangdong Science & Technology Press, P. R. China
- [24] Cheng, Hai-Ting; Li, Xiao-li; Li, Xiao-rong; Li, Yu-hang; Wang, Li-juan; Xue, Ming (2012) Simultaneous quantification of selected compounds from *Salvia* herbs by HPLC method and their application. *Food Chemistry*, 130 (4), 1031-1035
- [25] World Health Organization (2010) *WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)*, Geneva

- [26] Attele, Anoja S.; Wu, Ji An; Yuan, Chun-Su (1999) Ginseng pharmacology, multiple constituents and multiple actions. *Biochemical Pharmacology*, 58, 1685-1693
- [27] Abdel-Razik, Ayman, F.; Elshamy, Abdel-Samid; Nassar, Mahmoud I. El-Kousy, Salah M.; Hamdy, Hanaa (2009) Chemical constituents and hepatoprotective activity of *Juncus subulatus*. *Revista Latinoamericana de Química*, 37 (1), 70-84
- [28] Shan, C.Y.; Ye, Y.H.; Jiang, H.F.; Zhang J. (2008) Study on chemical constituents isolated from *Juncus effuses*. *Zhong Yao Cai*, 31 (3), 374-376
- [29] Rai, Sujay; Wahile, Atul; Mukherjee, Kakali; Saha, Bishnu Pada; Mukherjee, Pulok K. (2006) Antioxidant activity of *Nelumbo nucifera* (sacred lotus) seeds. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 322-327
- [30] Mukherjee, Debajyoti; Khatua, Tarak Nath; Venkatesh, P.; Saha, B.P.; Mukherjee, Pulok K. (2010) Immunomodulatory potential of rhizome and seed extracts of *Nelumbo nucifera* Gaertn. *Journal of Ethnopharmacology*, 128, 490-494
- [31] World Health Organization (2003) *WHO monographs on selected medicinal plants* (Vol 2), Geneva
- [32] Jiang, Yong; Tu, Peng-Fei (2002) Xanthone O-glycosides from *polygala tenuifolia*. *Phytochemistry*, 60, 813-816
- [33] Wu, Tzong-Yuan; Chen, Chip-Ping; Jinn, Tzyy-Rong (2011) Traditional Chinese medicines and Alzheimer's disease. *Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology*, 50 (2), 131-135
- [34] Liu, P.; Hu, Y.; Guo, D.-H.; Wang, D.-X.; Tu, H.-H.; Ma, L.; Xie, T.-T; Kong, L.-Y. (2010) Potential antidepressant properties of *Radix Polygalae* (Yuan Zhi).

- [35] Zhao, J.; Li, S.P.; Yang, F.Q.; Li, P.; Wang, Y.T. (2006) Simultaneous determination of saponins and fatty acids in *Ziziphus jujuba* (Suanzaoren) by high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection and pressurized liquid extraction. *Journal of Chromatography A*, 1108, 188-194
- [36] Yu, L.; Jiang, B.P.; Luo, D.; Shen, X.C.; Guo, S.; Duan, J.A.; Tang, Y.P. (2012) Bioactive components in the fruits of *Ziziphus jujube* Mill. against the inflammatory irritant action of Euphorbia plants. *Phytomedicine*, 19, 239-244
- [37] Liu, Jingjing; Chen, Bo; Yao, Shouzhuo (2007) Simultaneous analysis and identification of main bioactive constituents in extract of *Zizyphus jujube* var. *sapinosa* (*Zizyphi spinosi* semen) by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Talanta*, 71, 668-675
- [38] Howes, Melanie-Jayne R.; Houghton, Peter J. (2003) Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 75, 513–527
- [39] Lu, Yan-hua; Liu, Zhi-yong; Wang, Zheng-tao; Wei, Dong-zhi (2006) Quality evaluation of *Platyclusus orientalis* (L.) Franco through simultaneous determination of four bioactive flavonoids by high-performance liquid chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1186–1190
- [40] Zhu, Ji Xiao; Wang, Ying; Kong, Ling Dong ; Yang, Cheng; Zhang, Xin (2004) Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *Journal of Ethnopharmacology*, 93 133–140
- [41] Ameri, Angela (1998) The effects of aconitum alkaloids on the central nervous

system, *Progress in Neurobiology*, 56, 211-235

[42] Volhardt, K. Peter C; Schore, Neil C. (1999) *Organic Chemistry – Structure and function* (3rd edition), W.H. Freeman and Company, New York

[43] Sun, Hong-Xiang; Xie, Yong; Ye, Yi-Ping (2009) Advances in saponin-based adjuvants, *Vaccine*, 27, 1787–1796

[44] Simpson, C.F. (1979) *Practical High Performance Liquid Chromatography*. Heyden & Son, London

[45] Ramos, Yalexmi; Hernández, Carlos; Fernandez, Lidia Asela; Bataller, Mayra; Veliz, Eliet, Small, Renny (2011) Optimization of a HPLC procedure for simultaneous determination of cisplatin and the complex cis, cis, trans-diaminedihydroxoplatinum (IV) in aqueous solutions. *Química Nova*, 34 (8), 1450-1454

[46] Heftmann, Erich (1961) *Chromatography*, Reinhold Publishing Corporation, New York

[47] Poole, Colin (2003) *The essence of chromatography*, Elsevier

[48] Gil, Victor M.S; Geraldles, Carlos F.G.C. (1987) *Ressonância Magnética Nuclear, Fundamentos, Métodos e Aplicações*, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

[49] Atkins, P. (1999) *Físico-Química* (Vol 2), (6a ed.) LTC – Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro

[50] Imagem retirada em 12 de Junho de 2012 de http://www.pharmacopeia.cn/v29240/usp29nf24s0_c761.html

[51] Costa, Aloísio Fernandes (2000) *Farmacognosia – Farmacognosia experimental*, 3a

ed. (Vol III). Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa

[52] Campos, Maria da Graça; Markham, Kenneth R. (2004) *Structure information from HPLC and on-line measured absorption spectra: flavones, flavonols and phenolic acids*. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra

[53] Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E.M. (1984) *Plant drug analysis, a thin layer chromatography atlas*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg

[54] Informação retirada da base de dados Spectral database for organic compounds SDBS em 21 de Junho de 2012 de http://riodb01.ibase.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/cre_index.cgi?lang=eng