



• U

C

•

ASPECTOS FORENSES DO USO DE FÁRMACOS COMO SUPLEMENTOS ALIMENTARES NO TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA
Caso da Fórmula de Medicina Tradicional Chinesa Kang Ai Ling

2017



Andreia Cristina Diogo Santos

ASPECTOS FORENSES DO USO DE FÁRMACOS COMO SUPLEMENTOS ALIMENTARES
NO TRATAMENTO DO CANCRO DA MAMA

Caso da Fórmula de Medicina Tradicional Chinesa Kang Ai Ling

Mestrado em Química Forense

Departamento de Química

FCTUC

Julho de 2017

• U



C •

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Andreia Cristina Diogo Santos

**ASPECTOS FORENSES DO USO DE FÁRMACOS COMO
SUPLEMENTOS ALIMENTARES NO TRATAMENTO DO
CANCRO DA MAMA**

Caso da Fórmula de Medicina Tradicional Chinesa Kang Ai Ling

Dissertação apresentada para provas de Mestrado em Química Forense

Orientadores:

Prof^o Dr. Abílio Sobral (FCTUC)

Prof^a Dra. Maria Graça Campos (FFUC)

Junho 2017

Universidade de Coimbra

Agradecimentos

Ao finalizar esta dissertação sinto o dever e a necessidade de expressar os meus mais sinceros agradecimentos a todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram com o seu apoio e incentivo para que conseguisse alcançar o final desta etapa na minha formação. Deste modo agradeço:

Ao Professor Doutor Abílio Sobral, orientador do estágio, pela boa disposição, por toda a disponibilidade, compreensão, incentivo e auxílio oferecido ao longo deste longo ano. Novamente um muito obrigado!

À Professora Doutora Maria Graça Campos, coorientadora do estágio e autora do tema, pela oportunidade de realizar a minha tese na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, pela boa disposição, incentivo e pelo apoio durante a realização da dissertação.

À Professora Doutora Filomena Botelho pela oportunidade de trabalho e pela amável receção no Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

À Doutora Mafalda Laranjo pelo apoio incondicional durante todo o trabalho realizado no Instituto de Biofísica.

À aluna de mestrado Beatriz Serambeque e ao aluno de doutoramento António Aguiar pela enorme ajuda no Instituto de Biofísica e Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, respetivamente. Estou eternamente agradecida por partilharem os vossos conhecimentos, vocês fizeram o difícil parecer fácil e mesmo ocupados ajudaram sempre que podiam. Um eterno obrigado!

À Professora Doutora Maria Ermelinda Eusébio, pela disponibilidade e apoio ao longo destes dois anos de mestrado, enquanto coordenadora do curso.

Aos meus pais e irmão que foram uma ajuda incondicional. Agradeço o seu apoio, incentivo e conselhos prestados ao longo do meu percurso universitário.

À minha colega de estágio e aluna do mesmo mestrado, Ana Pinheiro, pela companhia e toda a ajuda prestada.

Ao Doutor Pedro Sidónio pela disponibilidade e apoio no ICP-MS.

Ao Mestre João Casalta Lopes pela ajuda prestada no tratamento dos dados estatísticos.

Por fim, mas não menos importante, a cooperação entre o Departamento de Química, a Faculdade de Farmácia e ao Instituto de Biofísica da Faculdade de Medicina, foram um fator determinante e permitiu a realização deste trabalho.

Índice

Agradecimentos.....	II
Abreviaturas	VII
Resumo	X
Abstract.....	XI
I. Introdução	1
1. Ciências Forenses	2
1.1. Ciências Forenses em Portugal.....	2
1.2. Química Forense.....	4
2. Suplementos Alimentares	4
2.1. Definição e Regulamentação.....	4
2.2. Controlo de Qualidade	6
2.3. Eficácia e Segurança.....	7
3. Cancro	8
3.1.1. Cancro da Mama	8
3.1.2. Tratamento.....	9
3.1.3. Quimioterapia.....	10
3.2. Cancro segundo a Medicina Tradicional Chinesa	11
3.2.1. Medicina Tradicional Chinesa.....	12
3.2.2. Tratamento.....	13
4. Fitoterapia Chinesa.....	14
4.1. Propriedades das Plantas	15
4.2. Fórmula Fitoterapêutica	15
5. Kang Ai Ling (F3088, nome comercial em Portugal).....	16
5.1. Plantas e suas Características.....	18
5.1.1. Semen Coicis - Yi Yi Ren	18
5.1.2. Flos Chrysanthemi - Jú Huã.....	20
5.1.3. Herba Ecliptae - Han Lian Cao.....	22
5.1.4. Spica Prunellae - Xia Ku Cao	23
5.1.5. Rhizoma Coptidis – Huang Lian.....	25
5.1.6. Cortex Phellodendri – Huang Bai.....	27
5.1.7. Radix Paeoniae Alba – Bai Shao Yao	29
5.1.8. Radix Lithospermi – Zi Cao.....	30

5.1.9.	Frutus Xanthii – Cang Er Zi.....	32
6.	Bibliometria.....	33
7.	Técnicas Instrumentais de Análise.....	37
7.1.	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	37
7.1.1.	Detetor Diodo-Array (DAD).....	38
7.1.2.	Espectrometria de Massa (MS).....	38
7.2.	Espectroscopia com plasma induzido acoplado a MS (ICP-MS)	39
7.3.	Espectroscopia de UV-Vis	39
II.	Problemática e Objetivos.....	41
1.	Problemática	41
2.	Objetivos	42
III.	Materiais e Métodos	43
1.	Reagentes, Materiais e Equipamentos	43
2.	Estudo preliminar do Kang Ai Ling	44
3.	Estudos Físico-químicos.....	45
3.1.	Condições de Análise	45
4.	Estudos de Citotoxicidade.....	46
4.1.	Linhas celulares	47
4.2.	Avaliação da Atividade Metabólica (MTT)	49
4.3.	Avaliação da Viabilidade Celular.....	49
4.4.	Ensaio Preliminar da Berberina.....	50
4.5.	Análise Estatística.....	50
IV.	Resultados	52
1.	Testes preliminares à fórmula Kang Ai Ling.....	52
2.	TLC's de Screening.....	52
3.	Testes Físico-químicos.....	53
4.	Viabilidade	63
V.	Discussão	71
VI.	Conclusões.....	75
VII.	Referências Bibliográficas.....	76
VIII.	Anexos.....	83

Índice de Figuras

FIGURA 1: CRESCIMENTO DE CÉLULAS CANCERÍGENAS.....	8
FIGURA 2: CAIXA E FRASCOS DO PRODUTO DE MTC. A - FRASCOS; B - TRASEIRA DA EMBALAGEM.	17
FIGURA 3: PLANTA E SEMENTES DE YI YI REN.....	18
FIGURA 4: FLOR SECA DE CHRYSANTHEMUM MORIFOLIUM RAMAT E RESPECTIVA PLANTA AO NATURAL.....	20
FIGURA 5: PLANTA ECLIPTA PROSTRATA L. SECA E AO NATURAL.	22
FIGURA 6: PLANTA PRUNELLA VULGARIS E RESPECTIVAS ESPIGAS APÓS SECAGEM.....	23
FIGURA 7: PLANTA RHIZOMA COPTIDIS E O SEU RIZOMA.....	25
FIGURA 8: PLANTA CORTEX PHELLODENDRI E RESPECTIVA CASCA (CÓRTEX).	27
FIGURA 9: PLANTA RADIX PAEONIAE ALBA.....	29
FIGURA 10: PLANTA RADIX LITHOSPERNI.....	30
FIGURA 11: FRUTUS DA PLANTA XANTHII.....	32
FIGURA 12: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS AO LONGO DO ANO DE 1995 E 2016.....	34
FIGURA 13: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS EM 35 PAÍSES.	35
FIGURA 14: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS AO LONGO DO ANO DE 1995 A 2016 NA CHINA.	36
FIGURA 15: REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO DE ARTIGOS PUBLICADOS AO LONGO DO ANO DE 1995 A 2016 NOS EUA.....	36
FIGURA 16: ESQUEMA DE OBTENÇÃO DE MASSAS PARA CÁLCULOS DE RENDIMENTO.	44
FIGURA 17: LINHAS CELULARES. A - MCF7 (LARCO ET AL., 2001); B - HCC1806.....	47
FIGURA 18: ESPETROS DE UV/VIS PARA A SOL. TER., FASE AQUOSA E FASE ORGÂNICA.....	54
FIGURA 19: ESPETRO DE UV/VIS DA BERBERINA.....	54
FIGURA 20: RETA DE CALIBRAÇÃO ORIGINADA PELO PROGRAMA QTEGRA PARA O ARSÊNIO.	55
FIGURA 21: CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O KANG AI LING.	57
FIGURA 22: ESPETROS UV DOS RESPECTIVOS PICOS DO CROMATOGRAMA (250NM): 1 – RT: 4.37 λ_{MAX} : 247, 300, 322NM; 2 – RT: 4.55 λ_{MAX} : 287, 322NM; 3 – RT: 4.97 λ_{MAX} : 223, 270, 303NM; 4 – RT: 5.29 λ_{MAX} : 231, 277NM; 5 – RT: 5.51 λ_{MAX} : 246, 297, 322NM; 6 – RT: 11.16 λ_{MAX} : 225, 270, 340, 425NM; 7 – RT: 11.80 λ_{MAX} : 270, 355, 460NM; 8 – RT: 12.53 λ_{MAX} : 236, 263NM; 9 – RT: 18.55 λ_{MAX} : 230, 272, 344, 425NM; 10 – RT: 20.20 λ_{MAX} : 230, 272, 344, 425NM.....	58
FIGURA 23: CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O F3088.	59
FIGURA 24: ESPETROS UV DOS RESPECTIVOS PICOS DO CROMATOGRAMA: A – RT: 25.71 λ_{MAX} : 296, 324NM; B – RT: 27.68 λ_{MAX} : 295, 324NM; C – RT: 30.18 λ_{MAX} : 270NM; D – RT: 31.31 λ_{MAX} : 263NM; E – RT: 32.30 λ_{MAX} : 273, 281, 325NM; F – RT: 34.12 λ_{MAX} : 296, 325NM; G – RT: 35.94 λ_{MAX} : 289, 321NM; H – RT: 37.30 λ_{MAX} : 273NM.	59
FIGURA 25: ESPETROS DE MASSA PARA O COMPOSTO F3088.....	61
FIGURA 26: ESPETRO DE MASSA PARA A BERBERINA E RESPECTIVA ESTRUTURA E MASSA MOLECULAR*.....	61
FIGURA 27: RETA DE CALIBRAÇÃO PARA A BERBERINA.....	62
FIGURA 28: CURVAS DE DOSE-RESPOSTA DA LINHA CELULAR HCC1806 APÓS TRATAMENTO DURANTE 24, 48 E 72 HORAS COM F3088. OS RESULTADOS APRESENTADOS CORRESPONDEM À MÉDIA E AO DESVIO PADRÃO DE 14 ENSAIOS.....	64
FIGURA 29: CONTEÚDO PROTEICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA O KANG AI LING, APÓS 48H DE INCUBAÇÃO.....	65
FIGURA 30: ATIVIDADE METABÓLICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA A BERBERINA E PARA O KANG AI LING.....	66
FIGURA 31: CONTEÚDO PROTEICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA A BERBERINA E PARA O KANG AI LING.	66
FIGURA 32: CURVAS DE DOSE-RESPOSTA DA LINHA CELULAR MCF7 APÓS TRATAMENTO DURANTE 24, 48 E 72 HORAS COM F3088. OS RESULTADOS APRESENTADOS CORRESPONDEM À MÉDIA E AO DESVIO PADRÃO DE 14 ENSAIOS.....	67
FIGURA 33: CONTEÚDO PROTEICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA O KANG AI LING, APÓS 48H DE INCUBAÇÃO.....	68
FIGURA 34: ATIVIDADE METABÓLICA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA A BERBERINA E PARA O KANG AI LING.....	69
FIGURA 35: CONTEÚDO PROTEICO EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO PARA A BERBERINA E PARA O KANG AI LING.	69
FIGURA 36: CURVAS DE CALIBRAÇÃO DOS METAIS ANALISADOS POR ICP-MS.....	84

Índice de Tabelas

TABELA 1: COMBINAÇÕES MEDICAMENTOSAS FOCADAS PARA O CANCRO DA MAMA UTILIZADAS EM QUIMIOTERAPIA.....	10
TABELA 2: ALGUMAS DAS PRINCIPAIS CORRESPONDÊNCIAS DOS 5 ELEMENTOS.....	12
TABELA 3: FÓRMULAS FITOTERAPÊUTICAS E SUAS FUNÇÕES ASSOCIADAS.....	14
TABELA 4: CONSTITUINTES DA FÓRMULA F3088.....	17
TABELA 5: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DO YI YI REN E RESPETIVAS ESTRUTURAS MOLECULARES.....	19
TABELA 6: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DO JÚ HUÃ E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	21
TABELA 7: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DO HAN LIAN CAO E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	22
TABELA 8: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DA XIA KU CAO E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	24
TABELA 9: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DA HUANG LIAN E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	26
TABELA 10: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DA HUANG LIAN E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	28
TABELA 11: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DE BAI SHAO YAO E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	29
TABELA 12: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DE ZI CAO E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	31
TABELA 13: ALGUNS DOS CONSTITUINTES DE CANG ER ZI E RESPETIVAS ESTRUTURAS.....	32
TABELA 14: MASSAS OBTIDAS APÓS SECAGEM.....	52
TABELA 15: VALORES DAS CONCENTRAÇÕES FINAIS.....	56
TABELA 16: LIMITES DE CONCENTRAÇÕES DOS METAIS SEGUNDO A OMS.....	56
TABELA 17: ÁREAS E CONCENTRAÇÃO DE BERBERINA PARA CADA FRASCO DE F3088.....	62

Abreviaturas

ADN – Ácido Desoxirribonucleico

Art. – Artigo

ASAE – Autoridade de Segurança Alimentar e Económica

C.S.I. – Investigação Criminal (do inglês *Crime Scene Investigation*)

CPP – Código do Processo Penal

DAD – Detetor de conjunto de díodos (do inglês *Diode Array Detector*)

DL₅₀ – Dose Letal 50

DMEM – do inglês *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DRG – Reagente Dragendorff

ESI – *Eletrospray*

EUA – Estados Unidos da América

F.A. – Fase Aquosa

FC – Fitoterapia Chinesa

F.O. – Fase Orgânica

GC – Cromatografia Gasosa (do inglês *Gas Chromatography*)

HIV/SIDA – Vírus de imunodeficiência/ Síndrome de Imunodeficiência Adquirida

HMPC – Comité dos Produtos Medicinais Herbóreos.

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão (do inglês *High Performance Liquid Chromatography*)

I.N.M.L.C.F. – Instituto Nacional de Medicinal Legal e Ciências Forenses

ICP – Espectrometria com plasma acoplado induzido (do inglês *Induced Coupled Plasma*)

INFARMED - Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento

IPO – Instituto Português de Oncologia

IR – Infravermelho (do inglês *Infrared*)

ISO – Organização Internacional de Padronização (do inglês *International Standardization Organization*)

L.P.C. – Laboratório de Polícia Científica

LoD – Limite de deteção (do inglês *Limit of Detection*)

MS – Espectrometria de Massa (do inglês *Mass Spectrometry*)

MTC – Medicina Tradicional Chinesa

MTCA – Medicina Tradicional, Complementar e Alternativa

NP/PEG – do inglês *Natural Products Reagent*
OIPM – Observatório de Interação Planta – Medicamento
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Solução de tampão salino de fosfato (do inglês, *phosphate buffer saline*)
P.J. – Polícia Judiciária
RE – Recetor de Estrogénio
RF – Radiofrequência
RP – Recetor de Progesterona
SEM/RDX – Microscopia eletrónica de varrimento com difração de raios X
SRB – Sulforrodamina B
ST – Solução Terapêutica
TCA – Ácido Trocloroacético
TCM – Traditional Chinese Medicine
TLC – Cromatografia de camada fina (do inglês *Thin Layer Chromatography*)
TN – Triplo Negativo
UP – Ultrapura
UV/Vis – Ultravioleta/ Visível

Unidades

% - percentagem
°C – Celsius
µg/ml – micrograma por mililitro
µL - microlitro
µm – micrómetro
cm – centímetro
cm² – centímetro quadrado
g/kg – grama por kilograma
h – horas
K – Kelvin
m/L – miligrama por litro
mAU – mili unidades de absorvância
mg/ml – miligrama por mililitro
MHz – MegaHertz

min – minutos

ml/min – mililitro por minuto

nm – nanómetro

ppm/ ppb/ ppt – partes por milhão/ bilião/ trilião

m/z – Razão Massa/Carga

Resumo

O aumento da popularidade das terapias não convencionais faz delas, na atualidade, um problema a considerar em termos de saúde pública e ciências forenses. Entre elas encontra-se a Medicina Tradicional Chinesa que tem sido praticada ao longo de milhares de anos na China e que vai começando a estar representada em Portugal. Afirma tratar a causa da doença em vez de aliviar os seus sintomas. No entanto, com base na crença de que a MTC é natural, segura e de baixo custo, consumidores de todo o mundo têm vindo a desembolsar cada vez mais dinheiro nesta forma de terapia.

Os casos mais graves relatados envolvem a associação destes produtos à quimioterapia em doentes oncológicos. Entre os produtos relatados, o Kang Ai Ling, ou associação deste com outros produtos usados neste tipo de terapias, foi um dos apresentados como causa de efeitos adversos em diversos doentes.

A necessidade de perceber o impacto do consumo destes produtos por doentes oncológicos levou ao início deste estudo. Os objetivos eram por um lado saber se os lotes eram similares e caracterizar o mais possível o produto quanto ao seu conteúdo e fazer ensaios preliminares à presença de metais tóxicos e ao estudo dos efeitos do Kang Ai Ling em células tumorais.

Os resultados foram bastante promissores. O Kang Ai Ling é maioritariamente composto por ácidos fenólicos e alcaloides, sendo o maioritário a berberina. No entanto não foi detetada a sua presença em quantidades nocivas para o ser humano. Ensaios preliminares à presença de metais tóxicos, embora inconclusivos, demonstram a necessidade de mais estudos devido à presença de chumbo em concentrações nocivas. No que diz respeito aos resultados dos testes celulares, este composto não revelou ação proliferativa, nem ação tóxica deixando a dúvida em relação à sua eficácia enquanto auxiliar no tratamento do cancro, para as duas linhas celulares estudadas.

Em conclusão, o consumo deste tipo de produtos é cada vez maior, mas, nos últimos tempos, já são muitos os estudos a refutar a eficácia dos mesmos. Com este estudo espera-se abrir mais uma discussão sobre tudo o que rodeia o mercado dos produtos de Medicina Tradicional Chinesa, refutando a ideia de que o que é natural é seguro.

Abstract

The increasing popularity of non-conventional therapies now makes them a problem to be considered in terms of public health and forensic science. Among them is Traditional Chinese Medicine that has been practiced for thousands of years in China and is beginning to be represented in Portugal. It claims to treat the cause of the disease instead of alleviating its symptoms. However, based on the belief that TCM is natural, safe, and inexpensive, consumers around the world have been spending more and more money on this form of therapy.

The most serious cases reported involve the association of these products with chemotherapy in cancer patients. Among the products reported, Kang Ai Ling, or its association with other products used in this type of therapy, was one of the presented as cause of adverse effects in several patients.

The need to understand the impact of consumption of these products by cancer patients led to the beginning of this study. The objectives were on one hand to know if the batches were similar and to characterize the product as much as possible on its content and to make preliminary tests for the presence of toxic metals and to study the effects of Kang Ai Ling on cancer cells.

The results were quite promising. Kang Ai Ling is mainly composed of phenolic acids and alkaloids, the majority being berberine. However, its presence has not been detected in amounts harmful to man. Preliminary tests for the presence of toxic metals, although inconclusive, demonstrate the need for further studies due to the presence of lead in harmful concentrations. Regarding the results of the cellular tests, this compound did not reveal a proliferative action nor a toxic action leaving doubt as to its efficacy as an aid in the treatment of cancer for the two cell lines studied.

In conclusion, the consumption of this type of products is increasing, but, in recent times, there are already many studies to refute their effectiveness. With this study we hope to open another discussion about everything that surrounds the market of Traditional Chinese Medicine products, refuting the idea that what is natural is safe.

I. Introdução

Ao longo do tempo, as Ciências da Saúde têm vindo a evoluir com um corpo de conhecimentos, definidos através do método científico e da pesquisa. No entanto, atualmente, tem aumentado o número de países que recorrem a Terapias não Convencionais que se baseiam em conceitos de Medicina Tradicional de outros países. Estas têm-se afirmado como uma alternativa ou complemento à Medicina Convencional como forma de ampliar o espectro das condutas terapêuticas e das práticas de promoção da saúde coletiva para a grande maioria na população ocidental, dando uma contribuição extremamente significativa para a melhoria das condições de vida da população. É com base nesse objetivo que se torna cada vez mais comum e vem crescendo, gradualmente, o quadro de doenças tratadas com Acupuntura, Fitoterapia e outras práticas físicas e meditativas (Ribeiro, R. L. M., 2010; São Paulo, 2002).

A Medicina Tradicional, Complementar e Alternativa (MTCA) inclui terapias medicinais como a Fitoterapia, a Homeopatia, a Acupuntura, a Medicina Antroposófica, a Naturopatia e a Medicina Tradicional Chinesa (que será especialmente abordada neste estudo). Também são considerados tratamentos corporais, incluindo a Osteopatia, a Quiropraxia e o Shiatsu. Trata-se de um conceito amplo e diferenciado que suscita um vasto leque de reações entre as pessoas, desde entusiasmo e abertura até ceticismo e criticismo (Moreira e Gonçalves, 2011). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a Medicina Tradicional abrange a soma total dos conhecimentos, habilidades e práticas baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas de diferentes culturas, explicáveis ou não, utilizadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhoria ou tratamento de doenças físicas e mentais (WHO, 2000).

O aumento da popularidade destas terapias não convencionais faz delas, na atualidade, um problema a considerar em termos de saúde pública e com o qual, responsáveis pelas políticas, profissionais de saúde e o público em geral se debatem frequentemente sobre a sua segurança, eficácia, qualidade, disponibilidade, preservação e desenvolvimento (Moreira e Gonçalves, 2011). Isto deve-se ao facto de os consumidores recorrerem aos produtos e práticas da MTCA na suposição de que "natural significa seguro", o que não é necessariamente verdadeiro (WHO, 2013).

1. Ciências Forenses

Nos primórdios da civilização humana a violência praticada por um indivíduo contra outro era encarada como um ato proscrito pelo senso comum da tribo. Nesse ato, a tribo identificava uma ameaça e questionava o criminoso. A sua detenção dependia de provas de que o mesmo cometeu o crime sendo essas provas baseadas em relatos de outros membros da tribo. Mas relatos de um único indivíduo suscitavam dúvidas quanto à veracidade do mesmo. Percebeu-se então que havia a necessidade de corroborar esses relatos com provas físicas. Isto despertou então para a importância da prova material e da necessidade do exame técnico ou forense (Calazans e Calazans, 2005).

A ciência forense é uma área interdisciplinar que envolve física, biologia, química, matemática e várias outras ciências e tem como principal objetivo dar suporte às investigações relativas à justiça civil e criminal em que o foco principal do profissional forense é confirmar a autoria ou descartar o envolvimento do(s) suspeito(s). Este ramo da ciência começou a emergir como uma disciplina distinta no final de 1800. Coincidentemente, este era também um momento em que a ficção policial, liderada por Sherlock Holmes, capturava a imaginação popular. Como qualquer bom escritor de ficção científica, Sir Arthur Conan Doyle previu corretamente muitos desenvolvimentos na ciência forense vários anos antes de serem realmente usados. Como a ciência forense evoluiu para uma parte aceita da ciência e da aplicação da lei, também se tornou num precursor da mais comum das ficções. Desde séries escritas por Patricia Cornwell e Kathy Reichs, a filmes como o “Silêncio dos Inocentes” (1991) e “O Colecionador de Ossos” (1999), e ainda inúmeras séries, sendo a mais famosa, o C.S.I. (*Crime Scene Investigation*). A popularidade surpreendente da série acendeu o fascínio popular com ciência forense e, como resultado, cresceu o número de jovens interessados em carreiras no ramo das ciências forenses (Bell, 2008; Sebastiany *et al.*, 2013).

1.1. Ciências Forenses em Portugal

Em Portugal, as ciências forenses encontram-se a um nível muito bom de desenvolvimento. São muitos os especialistas que são reconhecidos internacionalmente e a Polícia Judiciária (P.J.) é considerada por muitos a melhor do mundo com as suas características. Dentro dos nomes marcados pela excelência nas mais diversas áreas destacam-se o Professor Doutor Duarte Nuno Vieira que é atualmente Presidente do Conselho Europeu de Medicina Legal, Presidente do Conselho Forense Consultivo do

Procurador do Tribunal Penal Internacional, Presidente da Rede Ibero-Americana de Instituições de Medicina Legal e Ciências Forenses, Presidente da Associação Portuguesa de Avaliação do Dano Corporal e Vice-Presidente da Confederação Europeia de Especialistas em Avaliação e Reparação do Dano Corporal, e ainda os Professores Doutores J. Pinto da Costa, a Doutora Eugénia Cunha (Antropóloga) e o Doutor Álvaro Lopes (Doutorado em Toxicologia).

A P.J., tal como a conhecemos nos nossos dias, surgiu em 1945, com o Decreto-Lei n.º 35 042, de 20 de outubro de 1945, em cujo 1.º artigo se definia a sua competência como a de “efetuar a investigação dos crimes e descobrir os seus agentes”. Face às exigências e desafios do proposto, surge em 1957, por intermédio do Decreto-Lei n.º 41 306, de 2 de outubro, o Laboratório de Polícia Científica (L.P.C.), sediado em Lisboa, vindo a ser inaugurada a sua delegação no Porto apenas em 1984, de forma a cobrir a região norte do país. Atualmente o L.P.C. conta com oito áreas técnico-científicas. Dividem-se estas pelos campos da Biologia, Química, Física, Toxicologia, Balística, análise de Documentos, Escrita Manual e Criminalística, sendo este trabalho desenvolvido sob o escrutínio de uma outra área laboratorial exclusivamente vocacionada para o controlo de qualidade (Gerson De Lemos Duarte, 2009).

Mais tarde foi inaugurado em Portugal o Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses (I.N.M.L.C.F.). Este realiza autópsias médico-legais, exames e perícias em pessoas para descrição e avaliação dos danos provocados no corpo ou na saúde, no âmbito do direito penal, civil e do trabalho, perícias e exames laboratoriais químicos e toxicológicos, perícias e exames laboratoriais bacteriológicos de hematologia forense e dos demais vestígios orgânicos, nomeadamente os exames de investigação biológica da filiação, perícias e exames psiquiátricos e psicológicos, para efeito de avaliação da imputabilidade jurídico-penal, de estados de perigosidade, da capacidade de exercício de direitos, e de perturbações pós-traumáticas de índole psíquica e psicológica e ainda perícias e exames de anatomia patológica forense. Para tal, o I.N.M.L.C.F. dispõe de quatro serviços: Serviço de Clínica e Patologia Forenses, Química e Toxicologia Forenses, Genética e Biologia Forenses e também Serviço de Tecnologias Forenses e Criminalística. ¹

¹ Fonte: Website do Instituto de Medicina Legal e Ciências Forenses

1.2. Química Forense

A química forense é uma das áreas das ciências forenses que aplica princípios e técnicas de química, em especial química analítica, a situações em que o sistema jurídico está ou pode vir a estar envolvido. A química forense muitas vezes sobrepõe-se com outras áreas forenses como é o exemplo da toxicologia forense. Em certos casos, dependendo do tamanho e organização do laboratório, a seção de química pode ser responsável pela análise de drogas e toxicologia, incluindo testes de álcool no sangue. Outras áreas de química forense incluem análise de evidências de incêndio e de detritos de fogo, explosivos, tintas, fibras, resíduos de pólvora e outros tipos de vestígios.

A química forense emprega um grande arsenal de instrumentação química sofisticada, incluindo cromatografia gasosa/espectrometria de massa (GC/MS), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), infravermelho (IR), espectrometria de ultravioleta e visível (UV/VIS) e microscópios eletrônicos de varrimento acoplado com difração de raios X (SEM/XRD). No entanto, grande parte do trabalho ainda depende de técnicas químicas tradicionais, tais como testes de cor (Bell, 2008).

2. Suplementos Alimentares

2.1. Definição e Regulamentação

De acordo com o Decreto-Lei no 136/2003 de 28 de Junho, consideram-se suplementos alimentares os géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias, nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, puras ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades de medidas de quantidade reduzida.

Os suplementos alimentares podem dividir-se em quatro tipos, nomeadamente:

- suplementos que contêm só vitaminas e minerais;
- suplementos que contêm vitaminas, minerais e outros princípios ativos não botânicos;
- suplementos que contêm plantas e ingredientes ativos não herbóreos, inclusive vitaminas e minerais;

- suplementos que contêm só plantas (Sergeira, 2009).

Este Decreto-Lei refere ainda que, os suplementos alimentares devem conter no rótulo a denominação de “suplemento alimentar” e a designação das categorias de substâncias que caracterizam o produto ou uma referência específica à sua natureza, sendo a quantidade de cada nutriente baseada na análise do produto, realizada pelo fabricante e apresentada sob a forma numérica e sob a forma de percentagem, relativamente à dose diária recomendada para adultos, constante no Regulamento (CE) n.º 1169/2011 de 25 de Outubro e à dose diária recomendada para lactentes e crianças de pouca idade, mencionada no Decreto-Lei n.º 217/2008 de 11 de Novembro. O rótulo também deve mencionar a dose diária recomendada do produto e uma advertência relativa aos possíveis riscos para a saúde, decorrentes da ingestão de quantidades superiores à dose diária indicada, e apresentar a menção obrigatória de que o produto deve ser mantido fora do alcance de crianças, assim como a indicação de que os suplementos alimentares não devem ser utilizados como substitutos de um regime alimentar variado devendo apenas servir para manter a homeostasia (Falcato, 2014).

Na União Europeia existe uma entidade reguladora dos suplementos alimentares comum aos diferentes países da Europa que se designa por *European Safety Authority* (EFSA) e, no que diz respeito às plantas que são medicinais existe na Agência Europeia do Medicamento (sede ainda em Londres, mas que será deslocada para outro país da Europa em breve devido ao BREXIT) um Comité de Produtos Medicinais à base de plantas (HMPC), constituído por peritos científicos, através da diretiva (2004/24/EC). Este grupo estabelece a harmonização das legislações associadas a estes produtos e valida as monografias das plantas medicinais (algumas de uso tradicional) nos vários estados membros da União Europeia baseando-se em recursos científicos existentes sobre avaliação, supervisão e farmacovigilância de produtos medicinais.

Em Portugal, existe comercializada uma grande variedade de produtos a base de plantas, fabricados no país ou importados, designados dietéticos, que não são abrangidos pela legislação aplicável aos medicamentos à base de plantas através da intervenção da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), não estando, portanto, garantida a sua qualidade, segurança e eficácia terapêutica apesar de continuarem a possuir reações adversas ou interações com medicamentos. Caso um operador económico pretenda introduzir um novo suplemento no nosso mercado (ou alterar um já existente) ou

ainda importar suplementos alimentares, deverá dirigir-se a Direção de Serviços de Normalização e Segurança Alimentar do Gabinete de Planeamento e Políticas do Ministério da Agricultura e notificar a Direção Geral de Alimentação e Veterinária. O Decreto-Lei no 296/2007, de 22 de agosto, designou este Gabinete como organismo competente para o envio dos rótulos de suplementos, antes da sua entrada no mercado, estando atribuída a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) - a missão de fiscalização, avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar (Sergeira, 2009).

2.2. Controlo de Qualidade

A qualidade de produtos à base de plantas é determinada através da identidade, pureza, conteúdo, propriedades químicas, físicas e biológicas e também pelo processo de fabrico. O tipo de preparação, propriedades sensoriais, constantes físicas, mistura, conteúdo de cinzas, resíduos de solventes e adulterações devem ser verificadas para provar a identidade e a pureza do material da planta. Devem ainda ser verificadas possíveis contaminações microbiológicas e material estranho tal como metais pesados (chumbo (Pb), o cádmio (Cd), o mercúrio (Hg) e o arsénio (As)), sendo que a contaminação pelo ambiente com materiais pesados, pesticidas e herbicidas, contaminação biológica com micotoxinas ou microrganismos e adição de substâncias ilegais são também aspetos a considerar.

As causas da grande variabilidade de matérias-primas presentes englobam o ambiente envolvente da planta, possíveis diferenças no processo e nas condições de fabrico, engano na identificação da matéria-prima ou adulteração com outras plantas.

A nível do controlo de qualidade é muito importante padronizar a concentração dos compostos ativos, que sendo muitas vezes metabolitos secundários, têm uma concentração muito variável com a espécie e com as condições ambientais. Os constituintes ativos são os mais difíceis de verificar num processo de controlo de qualidade, uma vez que existem muitas plantas cujos constituintes não são ainda todos conhecidos. Nos casos em que a planta em si não contém nenhum constituinte ativo ou que não seja conhecido, determina-se a percentagem de matéria solúvel extraída e compara-se com os valores da Farmacopeia, acaso exista uma monografia da mesma (Abrantes, 2014; Sergeira, 2009).

2.3. Eficácia e Segurança

Um dos maiores mitos que envolvem os suplementos alimentares de origem vegetal é a sua segurança por serem derivados de produtos naturais. Na verdade, os compostos ativos que conferem ação farmacológica às substâncias vegetais, são compostos químicos que têm implicações no funcionamento natural do organismo. O aliciamento dos potenciais compradores é feito recorrendo à falsa informação de que os produtos naturais não são químicos e que por isso não apresentam riscos.

É necessário considerar também a hipótese da presença de contaminantes nas matérias-primas e as interações possíveis entre as substâncias vegetais e medicamentos que um indivíduo estiver a tomar. As interações com os medicamentos podem ser de origem farmacocinética ou farmacodinâmica, podendo alterar de forma considerável a ação esperada do fármaco; alterações estas que podem resultar na ineficácia do medicamento ou na sua toxicidade. Infelizmente o aumento do número de relatos de casos em que ocorreram interações entre plantas e medicamentos tem acompanhado o recente crescimento do consumo de produtos naturais. Apesar de o número de acidentes reportados ter vindo a crescer, a população em geral e mesmo alguns profissionais de saúde têm tido alguma resistência em assumir as plantas medicinais como fontes de compostos químicos com bioatividade no nosso organismo e que, por isso mesmo, podem mudar funções neste e até alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica de medicamentos que cada indivíduo possa estar a tomar conjuntamente. Este cenário representa um grave problema de saúde pública, e leva à necessidade da intervenção farmacêutica e forense, com o intuito de detetar interações planta-medicamento, estudar o potencial que dada planta apresenta para interagir com medicamento(s) e avaliar ações benéficas ou nocivas sobre o organismo.

Em Portugal existe o Observatório de Interações Planta-Medicamento (OIPM/FFUC), sediado na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra que estuda e divulga as interações entre medicamentos e plantas mais frequentes e preocupantes que ocorrem no país, para que se possa prevenir a sua ocorrência e promover ganhos na saúde e redução das despesas. O OIPM mantém uma lista de casos relatados e uma base de dados relativos às interações planta-medicamento atualizada. (Abrantes, 2014; Campos, Costa e Falcão, 2012)

3. Cancro

O cancro é uma das doenças mais frequentes nas sociedades ocidentais. Apesar dos avanços científicos relacionados com a genética e a imunologia que oferecem novas e promissoras possibilidades no domínio da prevenção, do diagnóstico precoce e do tratamento, tem-se verificado, na Europa, um aumento da incidência do cancro. Estimativas da OMS apontam para um aumento exponencial das doenças oncológicas a nível mundial, nas próximas duas décadas, duplicando de 10 para 20 milhões o número de novos casos que serão anualmente diagnosticados (Coelho, 2008).

A definição de cancro, preconizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) consiste num processo de crescimento descontrolado caracterizado pela disseminação de células, que pode afetar qualquer parte do organismo. Este crescimento muitas vezes implica a invasão do tecido envolvente, e posterior desenvolvimento de metástases (Figura 1) (Pereira, 2015).

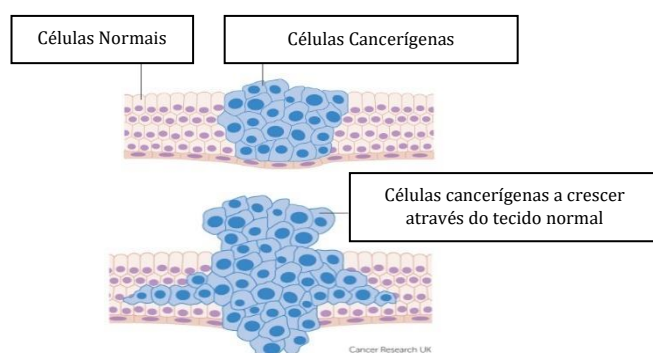


Figura 1: Crescimento de Células Cancerígenas.

Adaptado de: "What Is Cancer", Cancer Research UK (2014). Disponível em: <http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/what-is-cancer>. [acedido a: 30-Nov-2016]

Atualmente, entre as terapêuticas disponíveis destacam-se cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia que de um modo geral, apresentam melhor resultado quando o diagnóstico é precoce (Pereira, 2015).

3.1.1. Cancro da Mama

O cancro da mama é um dos tumores malignos mais frequentes, sendo o segundo mais comum no mundo. Este tipo de cancro tem uma incidência muito mais elevada no sexo feminino, com aproximadamente 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012. As taxas de incidência variam quase quatro vezes em todas as regiões do mundo, com taxas que variam de 27 por 100.000 na África Central e Ásia Oriental a 92 por 100.000 na América do Norte.

Em Portugal, o cancro da mama, é a quinta causa de morte por cancro, com 522 mil mortes no ano no ano de 2012 (Coelho, 2008; Globocan, 2012).

O cancro da mama pode ter origem nos ductos ou nos lóbulos mamários e pode ser invasivo ou não invasivo. Invasivo significa que as células cancerígenas invadem a membrana basal e adquirem potencial de disseminação para outros órgãos, formando metástases. As células de um cancro *in situ*, não ultrapassam a membrana basal do epitélio e estão confinadas a uma área bem delimitada. No cancro da mama podem ser de dois tipos: carcinoma ductal *in situ*, ou carcinoma lobular *in situ*. No entanto, as características histopatológicas não são suficientes para caracterizar um tumor. Os tumores podem também ser classificados segundo o grau de diferenciação/desdiferenciação das células, segundo o estágio, que usa a classificação TMN (baseando-se no tamanho do tumor (T), invasão dos gânglios linfáticos (N) e grau de metastização (M)), a expressão de recetores, como os de estrogénio (RE), os de progesterona (RP) e os do fator de crescimento epitelial humano - 2 (HER-2), e segundo outras características genéticas, como mutações em genes de supressão tumoral.

Com base na expressão dos recetores estratificam-se 3 tipos de cancro: os que expressam recetores hormonais, nomeadamente, RE e RP, os que sobreexpressam HER-2 e os que não expressam nenhum destes marcados e se designam comumente por triplos negativos (TN). Geralmente, os cancros da mama que expressam recetores têm um prognóstico mais favorável do que os que sobreexpressam HER-2 ou aqueles que são TN (Kathryn, Sireesha V e Stanley, 2012; Santos, 2013).

3.1.2. Tratamento

O cancro é uma doença complexa e desafiadora que é tratada de muitas maneiras diferentes, dependendo do tipo de cancro da mama (Dockham *et al.*, 2014). Os tratamentos podem ser utilizados tanto no contexto neoadjuvante, adjuvante ou paliativo.

A maioria dos tratamentos anticancerígenos depende de agentes que danificam o ADN (Ácido Desoxirribonucleico) e a maquinaria responsável por manter a integridade cromossómica, como fármacos e radiação ionizante.

Dependendo dos casos existem tratamentos como cirurgia, radioterapia, terapêutica sistémica, hormonoterapia (Pereira, 2015; Ribeiro, J. I., 2014).

3.1.3. Quimioterapia

A quimioterapia é uma das modalidades terapêuticas mais utilizadas no tratamento do cancro que engloba uma grande variedade de fármacos. O objetivo da quimioterapia é parar o crescimento e a proliferação de células tumorais diretamente, tornando-os incapazes de se duplicar ou iniciar artificialmente o processo normal de morte celular chamado "apoptose" (American Brain Tumour Association, 2016).

Os esquemas citostáticos disponíveis são os seguintes:

- ∞ Capecitabina;
- ∞ Gemcitabina;
- ∞ Vinorelbina (oral e I.V);
- ∞ Taxanos (Paclitaxel e Docetaxel);
- ∞ 5- FU (bólus ou contínuo);
- ∞ Metotrexato (oral e I.V);
- ∞ Mitoxantrona Platinas (Cisplatina e Carboplatina);
- ∞ Antraciclinas (Epirrubicina, Doxorrubicina ou Doxorrubicina lipossómica).

Na Tabela 1 é possível observar algumas das combinações dos fármacos referidos para o tratamento do cancro da mama (Gerson De Lemos Duarte, 2009).

Tabela 1: Combinações medicamentosas focadas para o cancro da mama utilizadas em Quimioterapia.

Retirado de: "Quimioterapia e Efeitos Colaterais", Komen for the cure (2009). Disponível em: https://ww5.komen.org/uploadedFiles/Content_Binaries/translate/Chemotherapy%20and%20Side%20Effects-portuguese.pdf [acedido a: 17-Jan-2017]

Medicamento Combinações	Nomes dos Medicamentos
CMF:	ciclofosfamida (Cytosan), metotrexato (Reumatrex) e 5-fluoronacil (Adrucil)
CAF (FAC):	ciclofosfamida (Cytosan), doxorrubicina (Adriamicina) e 5-fluoronacil (Adrucil)
AC:	doxorrubicina (Adriamicina) e ciclofosfamida (Cytosan),
TAC:	docetaxel (Taxotere), doxorrubiicina (Adriamicina) e ciclofosfamida (Cytosan)
AC --> T:	doxorrubicina (Adriamicina) e ciclofosfamida (Cytosan), seguido por paclitaxel (Taxol) ou Docetaxel (Taxotere)
CT:	Docetaxel (Taxotere) e ciclofosfamida (Cytosan),

Quimioterapia Neoadjuvante

Nos carcinomas da mama localmente avançados e inflamatório, o uso da quimioterapia primária ou neoadjuvante mostrou induzir a regressão tumoral e facilitar o controle locoregional para posterior cirurgia e/ou radioterapia.

Quimioterapia Adjuvante

A finalidade deste tipo de quimioterapia é prevenir a recorrência pela persistência de células tumorais. Assim, em associação com uma adequada terapêutica local, a quimioterapia adjuvante melhora o prognóstico do cancro da mama prevenindo recorrências à distância.

Quimioterapia Paliativa

Apesar das modificações que têm sido feitas na quimioterapia adjuvante no cancro inicial da mama, ainda cerca de 20% dos doentes vêm a desenvolver metástases.

A terapêutica paliativa tem como finalidade maximizar a qualidade de vida, prevenir e controlar os sintomas e prolongar a sobrevivência.

A duração do tratamento dependerá da resposta, da toxicidade e tolerância (Abraúl, Raimundo e Frutuoso, 2011).

3.2. Cancro segundo a Medicina Tradicional Chinesa

Há milhares de anos, os chineses acreditavam que o cancro era causado por inflamação e por veneno no sangue. Quando qualquer um dos cinco órgãos vitais do corpo não funcionava adequadamente, o sangue nesse órgão tornava-se veneno. Portanto, quando um cancro é formado em qualquer parte do corpo, possivelmente haverá algo de errado com um ou mais dos órgãos vitais.

De acordo com a definição chinesa antiga, existem diferenças entre tumor e cancro. Um tumor é um crescimento localizado dentro do corpo, que não pode ser visto de fora, enquanto que um cancro é um crescimento que se forma por baixo da pele e se desenvolve acima da mesma, sendo o seu tamanho aproximadamente 2.54cm ou mais de diâmetro (Wan, 1936).

De acordo com a Medicina Tradicional Chinesa (MTC), o cancro é causado por um *Zheng Qui* deficiente, desordem do *Yin-Yang*, desarmonia do *Zang Qui*, invasão de toxinas malignas ou toxinas geradas autonomamente levando a estagnação *Qui*, estase (estado no qual o fluxo normal de um líquido corporal para) de sangue, fleuma (muco secretado pelas membranas

mucosas) congelada, toxinas de calor, acumulação de nós e formação de inchaços e nódulos ao longo de um período de tempo.

3.2.1. Medicina Tradicional Chinesa

A MTC caracteriza-se como sistema médico único e completo que deriva de uma tradição viva que se tem estendido ao longo de milhares de anos. Ao longo desses anos, a MTC desenvolveu um conjunto de sistemas de cuidados de saúde práticos e avançados, universais, completos e sistemáticos, caracterizados nomeadamente pela simplicidade, acessibilidade, segurança e eficácia. Esta é uma medicina bem estruturada e assente numa base teórica sólida e coerente e fornece uma estrutura integral para compreender, interpretar e organizar intervenções no processo saúde-doença humana.

Ao longo da sua longa história, esta medicina alternativa, nas suas várias formas, tem sido a principal forma de cuidados de saúde na China e muitos outros países da Ásia (Jia, 2005; Lozano, 2014; Silva, 1994). O sistema teórico da MTC consiste em conceitos como o *Qui* ou *Ch'i* (energia/força vital), o *Yin* e *Yang* (inter-relação entre os opostos – Yin negativo, Yang positivo) e a Teoria dos Cinco Elementos (5 categorias do mundo natural: madeira, fogo, terra, metal e água) (Torres, 2011). Esta última categoria foi aplicada no campo médico, observando o corpo em termos de sua estrutura e explicando as conexões orgânicas entre as partes e o corpo e também a ligação entre todo o corpo e o ambiente externo (Shi e Zhang, 2012). Esta teoria pode ser aplicada em muitos níveis - a cor, o som, o gosto, as emoções, bem como ao sistema de órgãos em MTC onde é usada principalmente para explicar as propriedades das vísceras do corpo humano, as suas relações mútuas e as suas alterações patológicas (Tabela 2).

Tabela 2: Algumas das principais correspondências dos 5 elementos.

Retirado de: “Teoria dos Cinco Elementos Wu Xing”. Disponível em:

http://flordeameixeira.com/init/teoria/cinco_elementos/ (acedido a 29/11/2016)

	Madeira	Fogo	Terra	Metal	Água
Estações	Primavera	Verão	Nenhuma *	Outono	Inverno
Sabores	Ácido	Amargo	Doce	Picante	Salgado
Transformações	Germinação	Crescimento	Transformação	Colheita	Estocar
Cores	Verde	Vermelho	Amarelo	Branco	Preto
Sabores	Azedo	Amargo	Doce	Picante	Salgado
Estados	Vento	Calor	Umidade	Secura	Frio
Sistemas Yin (Zang)	Fígado (Gan)	Coração (Xin)	Baço (Pi)	Pulmão (Fei)	Rim (Shen)
Sistemas Yang (Fu)	Vesícula Biliar (Dan)	Intestino Delgado (Xiaochang)	Estômago (Wei)	Intestino Grosso (Dachang)	Bexiga (Panguang)
Órgãos dos Sentidos	Olhos	Língua	Boca	Nariz	Ouvidos
Tecidos	Tendões	Vasos	Músculos	Pele	Ossos
Emoções	Fúria	Alegria	Preocupação	Tristeza	Medo
Direções	Leste	Sul	Centro	Oeste	Norte
Notas Musicais	jue2 角 (mi)	zhi3 徵 (sol)	gong1 宫 (dó)	shang1 商 (ré)	yu3 羽 (lá)

3.2.2. Tratamento

Os tratamentos usados na MTC para tratar a doença combinam plantas medicinais, acupuntura, dieta, e terapia *Qui Gong*. Estes podem estimular o *Zheng Qui*, melhorar a condição corporal, aliviar os sintomas e estabilizar a condição. Além disso, estas técnicas, segundo a MTC, têm efeitos colaterais mínimos e podem ser amplamente utilizadas. A MTC postula que alguns dos doentes com cancro melhoram após a quimioterapia e radioterapia, e conseguem observar uma diminuição no tamanho dos tumores, mas a sua vida não é prolongada. No entanto, doentes que incorporam tratamentos de MTC como parte da terapia não notam diminuição significativa no tamanho do tumor, mas são capazes de manter a sua qualidade de vida, de modo a sustentar a capacidade de trabalhar e prolongar a vida. Ao mesmo tempo, os tratamentos de MTC podem moderar e reduzir os efeitos colaterais tóxicos dos produtos farmacêuticos ocidentais, auxiliar na remoção e eliminação de células cancerígenas residuais após a cirurgia, fortalecer a eficácia de fármacos e prevenir a recorrência e disseminação do cancro. No entanto, grandes cancros ou tumores, neoplasias malignas e cancros de rápido desenvolvimento não estão indicados para tratamentos com a MTC (Liu, Tseng e Yang, 2005).

Um exemplo dos métodos de tratamento do cancro em MTC é a fitoterapia chinesa. Esta é selecionada e deve agir em *Tan - Huo - Feng - Wei - Shen - Bu Qi - Wei Qi* visando os seguintes princípios terapêuticos:

- Eliminar as *TAN* - eliminar as acumulações, ou seja, combater as mucosidades;
- Clarificar o *HUO* (Calor);
- Parar o *FENG* (Vento) - ou seja parar a metastização e disseminação tumoral;
- Nutrir *Zheng Qui*;
- Aumentar a *Wei Qui* (Imunidade);
- Equilibrar o *SHEN* - equilibrar as emoções.

Para este efeito são selecionadas um conjunto de fórmulas fitoterapêuticas associadas cujos exemplos se encontram na Tabela 3 (Choy, 2011).

Tabela 3: Fórmulas Fitoterapêuticas e suas funções associadas.

Retirado de: P. Choy, «Medicina Chinesa e Tratamento do Cancro», J. Tradit. Chinese Med., vol. 20, n. 2008, pp. 3–4, 2008.

Fórmula	Número Comercial Associado	Função
<i>Yun Zhi</i>	F3015	Tonificar o <i>Zheng Qi</i> ; <i>Wei Qi</i> ; <i>Jing Qi</i>
<i>Ling Zhi Wan</i>	F3018	
<i>Dong Chong Wan</i>	F3019	
<i>Yun Zhi</i>	F3015	Pílula para viver mil anos
<i>Kang Ai Ling</i>	F3088	Tratar <i>TAN</i> , Nódulos, Quistos e Tumores
<i>Ling Zhi Wan</i>	F3018	
<i>Dong Chong Wan</i>	F3019	
<i>Ban Xia Hou Po Tang</i>	F52	
<i>Dang Gui Long Hui</i>	F66C	Tratar a patologia de <i>Xue</i> , Leucemia, Trombocitemia, Trombocitopenia, Anemia, Linfoma, Síndrome mielodisplásico e outras neoplasias da medula óssea.

4. Fitoterapia Chinesa

Desde os tempos pré-históricos, os seres humanos têm usado produtos naturais, como plantas, animais, microrganismos e organismos marinhos, em medicamentos para aliviar e tratar doenças. De acordo com registros fósseis, o uso humano de plantas como medicamentos pode ter pelo menos 60.000 anos. (Yuan *et al.*, 2016)

Tal como para a Fitoterapia em qualquer parte do mundo a Fitoterapia Chinesa (FC) traduz-se no uso de plantas medicinais pelo seu valor terapêutico ou médico. Apresenta-se como o maior ramo terapêutico da MTC e inclui um agregado de ramos de alçada farmacêutica - desde a Fitoterapia, Farmacologia e Tecnologia Farmacêutica - que conduzem à elaboração do medicamento (Chillemi e Chillemi, 2013; Ximenes, 2014). O desenvolvimento da FC tem sido um processo histórico que flui e floresce com a cultura chinesa há mais de quatro mil anos. Mais de 6.000 substâncias foram utilizadas e, os seus efeitos documentados e pesquisados nos últimos quatro milénios (Wu, 2005). A Teoria da FC é baseada na teoria do *Yin-Yang* e das Cinco Fases (*Wu Xing*), que são a base da MTC. Assim, cada planta está intimamente relacionada aos órgãos *Zang-Fu* e sistemas de canais meridianos. Esta estrutura única da teoria forma o núcleo da MTC (Wu, 2005).

4.1. Propriedades das Plantas

A Medicina Chinesa é uma ciência fundada sobre a experiência empírica acumulada e divide as plantas de acordo com as suas propriedades e ações. Segundo as suas propriedades térmicas, as plantas podem ser classificadas como quentes, mornas, frescas e frias, podendo ainda falar-se em neutra; segundo o sabor as plantas são divididas em azedo (ácido), amargo, doce, picante e salgado (Chou Li 770-476 a.C.); segundo as direções, as plantas podem ter características ascendentes, descendentes, circulantes (flutuantes) ou de submersão (Li Tung 1180-1251 d.C) (Escola de Medicina Oriental e Terapêuticas, 2007).

Shin Nong (3000 a.C.), acreditava que todas as coisas na terra estavam incluídas em cinco elementos naturais: água, fogo, vegetação, minerais e terra. Portanto as plantas medicinais de cor vermelha e sabor amargo são classificadas sob o elemento fogo, e influenciam o coração e o intestino delgado, ervas de cor amarela e sabor doce pertencem ao elemento terra. Estes retardam a circulação fazendo com que os efeitos dos remédios curativos permaneçam nos órgãos vitais, ervas de cor branca e gosto picante pertencem ao elemento metal e faz com que o calor natural do corpo atinja as extremidades e a pele, ervas de cor esverdeada e gosto amargo pertencem ao elemento madeira e têm o poder de contrair o ar no sangue, e ajudar o fígado e a vesícula biliar (Wan, 1936).

4.2. Fórmula Fitoterapêutica

Para fazer uma fórmula fitoterapêutica chinesa, é necessário conhecer-se as capacidades energéticas, curativas e sinérgicas das ervas, ou seja, a interação de uma planta com as outras (Escola de Medicina Oriental e Terapêuticas, 2007). Estas fórmulas consistem em quatro ervas com diferentes objetivos, e dividem-se nos intens que de seguida se enumeram.

Chefe/Imperador ou Zhu Jun (主君)

O chefe é o principal componente da fórmula e atua diretamente no tratamento do sintoma principal. Pode ser constituído por um componente isolado ou por uma combinação de componentes. Tem a capacidade de entrar nos meridianos onde se manifestam as principais alterações patológicas.

Adjunto/Ministro ou Fu Chen (辅臣)

A função do adjunto é amplificar e melhorar o efeito do Chefe, tratando o sintoma principal. Serve ainda como o principal componente para tratar o sintoma secundário coexistente. Tal como no caso do Chefe, pode ser constituído por um componente ou por uma

combinação de vários componentes de acordo com as necessidades de tratamento do sintoma principal e secundário.

Assistente ou Zuo (佐)

Assistente auxiliar - Tal como o adjunto amplifica e melhora os efeitos do Chefe ou Adjunto, ou trata os sintomas secundários.

Assistente corretivo - Pode moderar ou eliminar a toxicidade (ou efeitos secundários) causados pelo Chefe ou Adjunto.

Assistente estratégico - O assistente pode ainda ter a função oposta à do Chefe, que auxilia o efeito terapêutico, modulando-o. Corresponde a uma estratégia clínica utilizada em casos de patologias complexas.

A importância da função de assistente é devida ao âmbito da sua ação, sendo por isso, normalmente, constituída por vários componentes ou combinações que atuam como diferentes assistentes na fórmula.

Enviado/Embaixador/Mensageiro ou Shi (使)

O enviado é utilizado para orientar o resto da fórmula para o meridiano, ou região do corpo, adequados, onde reside a principal alteração patológica, permitindo à ação focalizar-se nesta região específica. O enviado harmoniza e integra a ação dos restantes componentes da fórmula, de modo a equilibrar a ação, temperatura, velocidade e direção da fórmula.

Cada fórmula fitoterapêutica pode compreender seis ou mais plantas cada uma com seu objetivo, conforme o que foi descrito (Ximenes, 2014).

5. *Kang Ai Ling* (F3088, nome comercial em Portugal)

A fórmula *Kang Ai Ling*, cuja tradução é “Fórmula miraculosa para resistir ao cancro”, é uma fórmula moderna, que conjuga os conceitos científicos da etiopatogenia da doença oncológica, com os conceitos tradicionais energéticos da medicina chinesa. Foi concebida para tratar e prevenir a doença oncológica, em qualquer das suas fases evolutivas. Da sua composição fazem parte uma série de plantas medicinais chinesas, destinadas a produzir um forte efeito anticancerígeno, fortalecer e tonificar o organismo (corpo e mente) e antagonizar os efeitos adversos da quimioterapia e radioterapia. Na sua composição estão presentes 9 plantas (Tabela 4).

Tabela 4: Constituintes da fórmula F3088.

Retirado de: P. Choy, O cancro. Abordagem da Medicina Chinesa., J. Tradit. Chinese Med., n. 31, pp. 3-13, 2011.

Nome Latino da planta	Nome Chinês	Família	Porcentagem em na fórmula (%)	Hierarquia	Sabor	Natureza	Tropismo
Sémen Coicis	Yi Yi Ren	Gramíneas	25	1º Imperador	Doce	Quase fria	Pulmão, Baço e Estômago
Flos Chrysanthemi	Jú Huã	Compositae	15	2º Imperador	Picante	Fria	Pulmão e Fígado
Herba Ecliptae	Han Lian Cao	Compositae	12	-	Doce e Azedo	Fria	Rins e Fígado
Spica Prunellae	Xia Ku Cao	Labiaceae	10	Ministro	Picante e Amargo	Fresca	Fígado e Vesícula Biliar
Rhizoma Coptidis	Huang Lian	Ranunculaceae	10	Embaixador	Amargo	Muito fria	Coração, Intestino Grosso e Estômago
Cortex Phellodendri	Huang Bai	Rutaceae	10	-	Amargo	Fria	Rim, Bexiga e Intestino Grosso
Radix Paeoniae Alba	Bai Shao Yao	Ranunculaceae	9	Assistente	Amargo e Ácido	Morna	Fígado e Baço
Radix Lithospermi	Zi Cao	Lithospermi	6	-	Doce	Fria	Coração e Fígado
Fructus Xanthii	Cang Er Zi	Compositae	3	-	Amargo	Quente	Pulmões

O produto comercial F3088 é vendido em dois frascos de 50ml cada (Figura 2A) e apresenta-se na forma de extrato líquido, cuja posologia se encontra descrita tanto no frasco como na embalagem (Figura 2B), como sendo 50 gotas diluídas em água 2 vezes ao dia. Segundo o Decreto-Lei 136/2003 de 28 de junho, acima descrito, este produto cumpre todos os requisitos que um suplemento alimentar deve apresentar, no entanto contém plantas tóxicas que dele não deveriam fazer parte.

**Figura 2:** Caixa e frascos do produto de MTC. A - Frascos; B - Traseira da embalagem.

5.1. Plantas e suas Características

5.1.1. Semen Coicis - Yi Yi Ren



Figura 3: Planta e sementes de Yi Yi Ren.

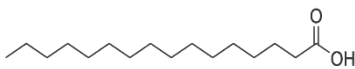
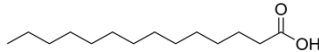
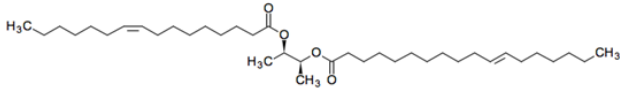
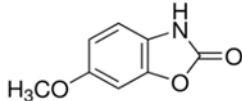
Retirado de: "Alibaba" (1999). Disponível em: https://www.alibaba.com/product-detail/Coix-lacryma-jobi-Semen-coicis-Coix_1988040524.html [acedido a: 08-Jan-2017]

Yi Yi Ren é constituído pela semente seca amadurecida da planta *Coix lacryma-jobi L.* (Figura 3).

Esta planta tem sido utilizada em MTC como agente sedativo, analgésico e antipirético, facilita na resolução da humidade e fortalece o baço. Pode ainda ser utilizada em casos de presença de edemas, diarreias, corrimento urinário doloroso e calor húmido. Trata tanto a raiz como as manifestações destes distúrbios. (Bensky, Clavey e Stöger, 2004; Wu, 2005)

Os constituintes maioritariamente conhecidos são ácidos gordos e ésteres, entre os quais, o ácido palmítico, o palmitato de etilo, o ácido esteárico, o ácido cis-8-octadecenóico, o ácido mirístico, o ácido oleico, o ácido linoleico, e o metacrilato de metilo; óleos voláteis, entre os quais, o hexanal, o ácido hexanóico, o 2-etil-3-hidroxi-hexilbutirato, a γ -nonalactona, o ácido nonanóico e o ácido octanóico; polissacáridos, entre os quais, o coixan A, B, C, os polissacáridos CA-1, CA-2; triterpenos, entre os quais, o cis-feroilestigmastenol, o trans-feroilestigmastenol, o cisferoilcampestenol, o trans-feroilcampestenol e o beta-sitosterol e ainda outros constituintes como o coixol, o coixenolide, o 4-cetopinoresinol, aminoácidos, proteínas, α -monooleína, eritro- / treo-C-siringilglicerol e alcaloides. Na Tabela 5 estão representadas as estruturas químicas dos quatro constituintes principais, nomeadamente, o ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), o ácido mirístico (ou tetradecanóico - $CH_3(CH_2)_{12}COOH$), o coixol ($C_8H_7NO_3$) e o coixenolide ($C_{38}H_{70}O_4$) (Bensky *et al.*, 2004; Norton, 2012).

Tabela 5: Alguns dos constituintes do Yi Yi Ren e respectivas estruturas moleculares.

Nome e Estrutura molecular	
<p>Ácido Palmítico</p> 	<p>Ácido Mirístico</p> 
<p>Coixenolide</p> 	<p>Coixol</p> 

O Yi Yi Ren pode provocar toxicidade variável dependendo do consumidor e do modo de consumo. Segundo Chen², em ratos injetados hipodermicamente com óleo da semente de Yi Yi Ren, a dose letal foi de 5-10 mg/kg, enquanto em coelhos, a dose letal foi de 1-1,5 g/kg. Quando administrados por gavagem com coixol 0,5 kg durante um mês, não foi encontrada qualquer alteração patológica. A longo prazo a decoção de sementes de coix dentro da dose sugerida mostrou não ter reações adversas, nem em doses mais elevadas (acima de 30g) nem com alimentos consumidos em ambas as cobaias.

Algumas das ações farmacológicas incluem reduzir a inflamação, parar a dor, reduzir a febre, regular o açúcar no sangue e pressão sanguínea, aliviar o músculo contraído, aumentar a imunidade. É também utilizado como anticancerígeno, regulador do movimento respiratório e indutor de ovulação (Shen-Nong, 2005a).

² Chen, Pian, Clinical Application of Tonifying Herbs, Second Military Medical University Press, 2008.

5.1.2. Flos Chrysanthemi - Jú Huã



Figura 4: Flor seca de *Chrysanthemum morifolium* Ramat e respetiva planta ao natural.

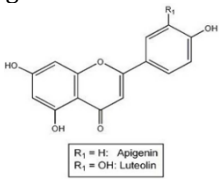
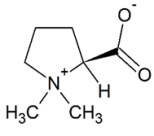
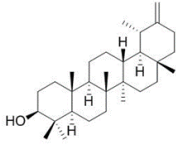
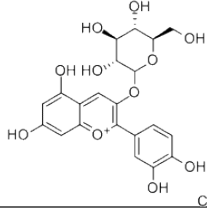
Retirado de: “AnaWalls” (2014) Disponível em: <http://pt.anawalls.com/flores-imagens-papeis-de-parede-crisantemos-abelha-vetor-fundos-amarelos-material-polinizadas/>. “Flos Chrysanthemi Indici” (2011). Disponível em: <https://tcmwiki.com/wiki/flos-chrysanthemi-indici> [acedido a: 08-Jan-2017]

Jú Huã é a flor da *Chrysanthemum morifolium* Ramat. Em português esta planta é denominada por crisântemo, existindo mais de 100 espécies diferentes e podendo possuir diferentes formas e cores (Figura 4) (Li e Wei, 2002).

Em MTC esta planta é utilizada para dissipar o calor do vento, acalmar o fígado e iluminar os olhos, e ainda aliviar a toxicidade. É geralmente indicada para o tipo de vento-calor da constipação comum, olhos vermelhos doridos e inchados devido ao calor do vento, dor de cabeça e tonturas devido à hiperatividade ascendente do fígado yang (Li e Wei, 2002).

Os seus constituintes maioritariamente conhecidos são a crisantemina, a adenina, a colina, a strachidrina, a acacetina, aminoácidos, flavonas como a apigenina, a acacetina, a luteolina-7-glucósido, a cosmosina, a quercetina, a luteolina, a diosmetina e a acacetina-7-O-glucósido, sesquiterpenos, entre os quais, o crisantediol A e os crisantediacetatos B-C e triterpenos, entre os quais, o taraxasterol, o faradiol, o (24S)-25-metoxicicloartano-3 β , o 24-diol, o 22 α -metoxifaradiol, o faradiol α -epóxido e o maniladiol e pequenas quantidades de vitamina B1. Toda a planta contém óleos voláteis. Na Tabela 6 estão dispostas as estruturas químicas de alguns dos constituintes descritos (Li e Wei, 2002; Shen-Nong, 2005b).

Tabela 6: Alguns dos constituintes do Jú Huã e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
Flavonas: Apigenina e Luteolina  $R_1 = \text{H}$: Apigenin $R_1 = \text{OH}$: Luteolin	Strachidina 
Terpeno: Taraxasterol 	Crisantemina 

Como ações farmacológicas, decocções de Jú Huã mostraram potencial de ampliação das artérias coronárias e aumento de fluxo sanguíneo. Tantas as decocções como os óleos voláteis da planta apresentaram efeito inibitório em bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β -hemolíticos*, *Corynebacterium diphtheriae* e *Shigella shigae*. As preparações de Ju Hua têm ainda uma função tranquilizante e podem melhorar o fornecimento de oxigénio (Li e Wei, 2002).

Embora Jú Huã tenha um nível muito baixo de toxicidade, a sua decocção concentrada ou comprimidos do seu extrato podem causar dor no abdómen superior e diarreia em alguns doentes. O uso persistente de grandes quantidades de Jú Huã pode afetar as funções gastrointestinais. Foram relatados casos em que Hang Jú Huã (a variedade de Jú Huã que cresce em Hangzhou) provocou dermatite de contato (Li e Wei, 2002).

5.1.3. Herba Ecliptae - Han Lian Cao



Figura 5: Planta *Eclipta prostrata* L. seca e ao natural.

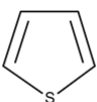
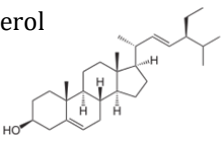
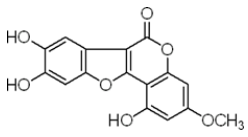
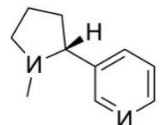
Retirado de: "Pharmacological Findings of *Ecliptae* Herba." (2016). Disponível em: <https://www.mdidea.com/products/new/new09107.html>.
 "Herba *Ecliptae*" (2011). Disponível em: <https://tcmwiki.com/wiki/herba-ecliptae> [acedido a: 08-Jan-2017]

O Han Lian Cao é constituído pelas partes aéreas secas da planta *Eclipta prostrata* L., representada na Figura 5.

Esta planta, em MTC é utilizada porque enriquece e suplementa o fígado e os rins, refresca o sangue e para o sangramento. É indicada para tonturas, dentes soltos e envelhecimento prematuro devido à deficiência de yin do fígado e rins, tosse de sangue, hemorragia nasal, sangue nas fezes, sangramento uterino e corrimento vaginal.

O Han Lian Cao contém compostos de tiofeno (incluindo A-tertienilo, A-tertilenolmetanol e alfa-formil-alfa-tertioenilo), estigmasterol, wedelolactona, saponinas, nicotina, tanino, vitamina A, ecliptina, proteínas e flavonas (Tabela 7) (Li e Wei, 2002).

Tabela 7: Alguns dos constituintes do Han Lian Cao e respetivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
Tiofeno	
Estigmasterol	
Wedelolactona	
Nicotina	

Em relação às ações farmacológicas, de acordo com (Li e Wei, 2002), o pó de Han Lian Cao ajuda a parar o sangramento. Esta planta tem uma função desintoxicante o que permite uma proteção hepática. Tem também funções de fortalecimento da função imune. Uma tintura de Han Lian Cao mostrou ainda um certo efeito inibitório sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Shingella flexneri* in vitro. Segundo (ChineseHerbsHealing, 2016), para além dos efeitos anteriormente mencionados, o Han Lian Cao melhora a função imune não específica

do corpo humano, elimina os radicais livres de oxigénio para inibir a 5-lipoxigenase, demonstra ser um bom antioxidante, promove o crescimento do cabelo e escurece-o e apresenta efeitos antimicrobianos, sedativos, analgésicos, estípticos e anticancerígenos.

Os efeitos toxicológicos foram observados após administração por via intraperitoneal em ratos, mostrando uma dose máxima tolerada de 1 g/kg. A partir dos testes efetuados foi possível constatar que a planta pode ser consumida com segurança, embora contraindicada em doentes com diarreia aguda ou crónica, com distúrbios no baço, nem em mulheres a amamentar (MDidea, 2016a).

5.1.4. Spica Prunellae - Xia Ku Cao



Figura 6: Planta *Prunella vulgaris* e respetivas espigas após secagem.

Retirado de: "Prunella Vulgaris L. Extract." (2010). Disponível em: http://shangyangerun.en.ec21.com/Prunella_Vulgaris_L_Extract_Spica--4649025_4812873.html [acedido a:

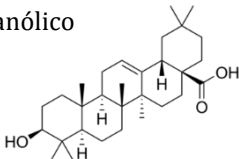
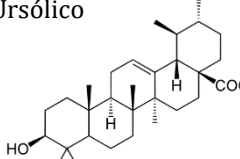
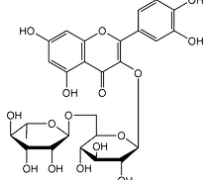
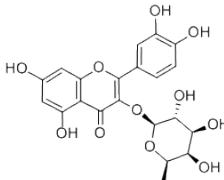
O Xia Ku Cao é constituído pela espiga da planta *Prunella vulgaris* L., representada na Figura 6.

A Prunellae é uma planta herbácea amplamente conhecida na cultura popular chinesa com usos em MTC bastante variados devido às suas propriedades de limpeza e desintoxicação de calor. É usada para tratar baixa visão, estagnação sanguínea e edema, conjuntivite aguda, tuberculose linfática e escrófula, mastite aguda e hiperplasia da glândula mamária, tireomegalia e hipertensão. Para além destas aplicações, acredita-se que as espigas de Prunellae (*Spica Prunellae*) possuem atividade anticancerígena, uma vez que, na de MTC, a acumulação de calor e humidade tóxica é um importante fator gerador de tumores. De facto, a Spica Prunellae tem sido usada há muito tempo como um componente importante em várias fórmulas de MTC para o tratamento clínico de vários tipos de cancro (Lin *et al.*, 2013).

No que trata à química da planta, esta contém triterpenos, flavonoides, cumarinas e glicósidos de esterol. Os compostos triterpénicos incluem ácido ursólico, ácido betulínico, ácido 2 α , 3 α -dihidroxi-urs-12-en-28-óico, 2 α , 3 α , 24-trihidroxi-urs-12,20(30)-dien-28-óico, ácido 2 α , 3 α , 24-trihidroxiolean-12-en-28-óico, ácido 2 α , 3 α , 24-trihidroxiolean-11,13(18)-

dien-28-óico. Os flavonoides que se encontram na planta incluem a delphinidina, a cianidina, a luteolina, a homo-orientina (iso-orientina) e o cinarósido. Contém ainda um ácido fenólico, o ácido rosmanérico (derivado do ácido cafeico), também presente no alecrim, que contém atividade antiviral e anti-inflamatória. *Rosmarinus officinalis L.* contém ainda cumarinas como a umbeliferona, a esculetina e a escopoletina. Quanto aos glicósidos esteróides, estão incluídos o β -sitosterol- β -D-glucósido, o estigmasterol- β -D-glucósido, o estigmasterol-7-en-3 β -D-glucósido e o espinasterol- β -D-glucósido, são encontrados também monoterpenos como a *d*-cânfora e a *d*-fenchona. As estruturas dos principais constituintes estão presentes na Tabela 8 (Li e Wei, 2002).

Tabela 8: Alguns dos constituintes da Xia Ku Cao e respetivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
<p>Ácido Oleanólico</p> 	<p>Ácido Ursólico</p> 
<p>Rutina</p> 	<p>Hiperósideo</p> 

Investigações e preparações desta planta permitiram comprovar efeitos terapêuticos ao nível da diminuição da pressão arterial e redução de níveis de açúcar no sangue. Em testes *in vitro*, uma decocção de Xia Ku Cao demonstrou efeito inibitório do vírus Herpes simplex de tipo I (Li e Wei, 2002). Para além destes efeitos terapêuticos comprovados, têm sido relatados que os extratos de *Spica Prunellae* podem inibir o crescimento de muitas células tumorais, mas o mecanismo preciso da sua atividade antitumoral ainda permanece pouco clara. Um estudo realizado por (Zheng *et al.*, 2011) “Extrato de *Spica Prunellae* promove apoptose mitocondrial-dependente em linhas celulares tumorais do colón”, concluiu que o extrato etanólico de *Spica Prunellae* inibe o crescimento e induz a apoptose através da via mitocondrial na linha celular HT-29 derivada do cancro colo-rectal. Estes resultados sugerem que *Spica Prunellae* poderá ser um potencial agente terapêutico novo para o tratamento de cancro colo-rectal e entre outros.

Em relação à toxicidade, experiências realizadas em ratos mostram que numa quantidade de 10 g/kg a planta não é tóxica. Ainda, ao realizar testes de toxicidade subaguda em ratos e cães, foi possível observar que a planta não afeta os hemogramas, nem prejudica as funções do fígado, rim ou outros órgãos internos vitais (MDidea, 2016b).

5.1.5. Rhizoma Coptidis – Huang Lian



Figura 7: Planta Rhizoma Coptidis e o seu rizoma.

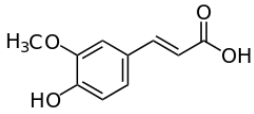
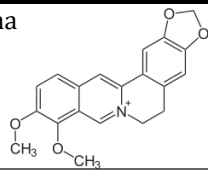
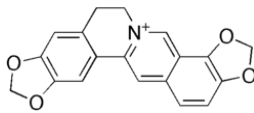
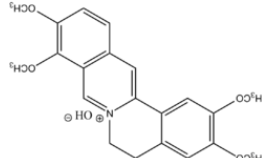
Retirado de: "Alibaba." (1999). Disponível em: https://www.alibaba.com/product-detail/Dried-Golden-thread-Chinese-goldthread-Rhizoma_753901158.html [acedido a: 11-Jan-2017]

Coptidis é o rizoma seco de *Coptis chinensis Franch*, *Coptis deltoides C.Y. Cheng e Hsiao*, *Coptis japonica Makino*, ou outras espécies contendo berberina do mesmo género (Figura 7) (World Health Organization, 1999).

Os usos descritos nas Farmacopeias e sistemas tradicionais de medicina traduzem-se em gestão de diarreias bacterianas. O fármaco é também utilizado no tratamento de conjuntivite aguda, gastroenterite, furúnculos e leishmaniose cutânea e visceral (dor oriental). Usos em tratamentos de artrite, queimaduras, diabetes, dismenorreia, dor de dentes, malária, gota e doença renal são também descritos ainda que sem qualquer suporte clínico ou experimental (World Health Organization, 1999).

Os principais constituintes presentes na planta são a berberina e alcaloides protoberberinos relacionados. O rizoma produz 6,71-13,78% de alcaloides sendo que 50-80% é berberina e pequenas quantidades de coptisina, de palmatina, de worenine, de jatrorrizina, de magnoflorina, de epiberberina, de berberistina, de oxiberberina e de columbamine. A raiz e as folhas de *Coptis* também contêm a maioria destes alcaloides. Contém ainda, ácido ferúlico também isolado do rizoma (World Health Organization, 1999; Zhu, 1998). Na Tabela 9 estão representadas as estruturas químicas dos principais constituintes.

Tabela 9: Alguns dos constituintes da Huang Lian e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
<p>Ácido Ferúlico</p> 	<p>Berberina</p> 
<p>Coptisina</p> 	<p>Palmatina</p> 

Inúmeros estudos apoiam a atividade antimicrobiana de *Rhizoma Coptidis*. Estudos *in vitro* demonstraram que o fármaco em bruto e o seu composto ativo, a berberina, têm um espectro semelhante de ação antibacteriana. Ambos inibem o crescimento *in vitro* de *Estafilococos*, *Streptococos*, *Pneumococos*, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis* e *Bacillus dysenteriae*, ao contrário da *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Shigella sonnei*, nas quais não foi observado esse mesmo efeito inibitório. A berberina era também ativa *in vitro* na *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* e *Trichomonas vaginalis* (World Health Organization, 1999).

Dentro das quantidades recomendadas, considera-se o Huang Lian perfeitamente seguro, mas pode tornar-se tóxico se essa dose for excedida (Manso, 2012). Estudos indicam que a DL₅₀ para injeção intraperitoneal de uma suspensão aquosa a 10% de Huang Lian é de 730 mg/ml em ratinhos e que a dose letal mínima da injeção intravenosa de berberina em ratos, ratinhos, porquinhos da Índia e coelhos situa-se na gama de 27,5-250 mg/kg. Ao administrar por gavagem, extratos metanólicos de Huang Lian a ratos durante 11 semanas, observou-se que os mesmos não provocavam quaisquer alterações no peso corporal, na ingestão de alimentos ou no peso dos órgãos (Li e Wei, 2002).

5.1.6. Cortex Phellodendri – Huang Bai



Figura 8: Planta Cortex Phellodendri e respetiva casca (córteX).

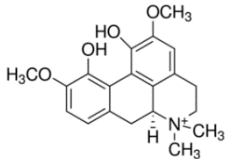
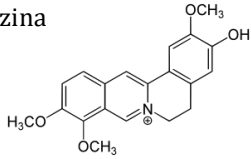
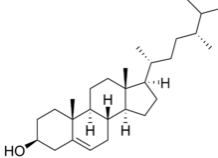
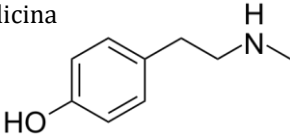
Retirado de: "Phellodendron amurense: Plant Description and Origin Narrative." (2016). Disponível em: <https://www.mdidea.com/products/proper/proper06902.html> [acedido a: 11-Jan-2017]

Cortex Phellodendri consiste na casca seca de *Phellodendron amurense* Rupr. ou *Phellodendron chinense* Schneid apresentada na Figura 8 (Zhu, 1998).

Farmacopeias e outros documentos definem os usos bem estabelecidos desta planta por administração oral para tratar dor abdominal, diarreia e gastroenterite a tratamento de infeções do trato urinário. Embora não tenham sido relatados estudos clínicos que avaliem a segurança e a eficácia do fármaco em bruto, foram realizados estudos clínicos que avaliaram os efeitos da berberina, o principal constituinte químico do fármaco em bruto, no tratamento da diarreia bacteriana induzida, do tracoma ocular e leishmaniose cutânea, tendo demonstrado eficácia. Existem ainda usos descritos na medicina tradicional que incluem tratamento de queimaduras, tosse, febre, icterícia, malária e feridas na pele (World Health Organization, 2009).

Os alcaloides de isoquinolina são os principais constituintes químicos da casca de *Ph. chinense* e *Ph. amurense*. A casca de *Ph. amurense* contém 0,6-2,5% de berberina e pequenas quantidades de palmatina, de magnoflorine, de phellodendrina, de jatrorrizina, de candicina e de menispermine. O teor de alcaloides na planta aumenta com os anos de crescimento. Da casca foram ainda isolados campesterol, β -sitosterol e 7-dehidrostigmasterol. As estruturas dos principais constituintes da planta estão representados na Tabela 10 (Zhu, 1998).

Tabela 10: Alguns dos constituintes da Huang Lian e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
<p>Magnoflorine</p> 	<p>Jatrorrizina</p> 
<p>Campesterol</p> 	<p>Candicina</p> 

Os efeitos terapêuticos são bastante semelhantes aos da planta Huang Lian. Uma decocção de Huang Bai demonstrou atividade inibitória de vários microrganismos *in vitro* incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Streptococcus pneumoniae* e *Corynebacterium diphtheriae* e ainda do vírus influenza. Apresentou ainda efeitos de diminuição da pressão arterial e, quando usado em pequenas doses, estimula a função coronária, sendo que, em grandes doses a mesma é inibida (Li e Wei, 2002).

Estudos de toxicidade em ratinhos indicaram uma DL₅₀ para a berberina de 329 mg/kg. Uma dose oral da mesma, 2,75 g/kg, administrada a cães originou irritação gastrointestinal grave, diarreia aquosa profusa, salivação, tremores musculares e paralisia. A respiração não foi afetada. A análise *post mortem* aos intestinos do animal mostrou uma contração e inflamação nos mesmos estando também vazios ou contendo muco e líquido aquoso. Uma dose oral de 25,0 mg/kg de sulfato de berberina induziu uma depressão que durou 6-8 horas; 50,0 mg/kg causaram salivação e emese esporádica. Uma dose de 100,0 mg/kg induziu emese persistente e morte de todos os animais 8-10 dias mais tarde (World Health Organization, 2009).

5.1.7. Radix Paeoniae Alba – Bai Shao Yao



Figura 9: Planta Radix Paeoniae alba

Retirado de: "Common Medicinal Uses of White Peony Root ." (2016). Disponível em: <https://www.mdidea.com/products/new/new08307.html> [acedido a: 12-Jan-2017]

Radix Paeoniae é a raiz seca da planta *Paeonia lactiflora* Pallas, representada na Figura 9. É utilizado em MTC como fármaco analgésico, anti-inflamatório e antiespasmódico no tratamento da amenorreia, dismenorreia e dor no peito e no abdômen, sendo também usado para tratar demência, dor de cabeça, vertigem, espasmo dos músculos inferiores da perna, doença hepática e alergias, e como anticoagulante. Existem ainda usos descritos na medicina popular, não suportados por dados experimentais ou clínicos como no tratamento de eczema atópico, furúnculos e feridas, para reduzir febres, induzir esterilidade e tratar queimaduras (World Health Organization, 1999).

A paeoniflorin, um glicósido de monoterpeneo que é o principal constituinte ativo, está presente na gama de 0,05-6,01% (World Health Organization, 1999). Também estão presentes na planta paeonol, paeonina, albiflorina, oxipaeoniflorina, bezoilpaeoniflorina e paeoniflorigenona em menores quantidades. Contém ainda ácido benzóico, β -sitosterol, galhotanino, pedunculagina, 1-O-galoilpedunculagina e eugenina (Zhu, 1998). As estruturas dos principais constituintes da planta estão apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11: Alguns dos constituintes de Bai Shao Yao e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
Paeoniflorina 	Paeonol
Albiflorina 	Ácido benzóico

Estudos mostraram que uma decocção deste fármaco obteve efeitos antiespasmódicos no íleo e no útero quando administrado oralmente a ratinhos, coelhos e porcos da Índia. Efeitos semelhantes foram observados com um extrato de metanol no útero de rato, mas um extrato de etanol teve atividade estimulante uterina em coelhos. Extratos de *Radix Paeoniae* testados *in vitro* relaxaram os músculos lisos em ensaios ao estômago e útero em ratos.

O principal composto ativo da planta, o paeoniflorina tem efeitos sedativos, analgésicos, antipiréticos, anti-inflamatórios e vasodilatadores *in vivo*. A hipnose induzida por hexabarbital foi potenciada enquanto que a retorção induzida por ácido acético foi inibida em ratos após administração intragástrica de paeoniflorina (World Health Organization, 1999). De modo a observar a toxicidade da planta, a raiz foi administrada por gavagem a ratos, tendo-se verificado uma DL_{50} de 81,1 g/kg. Ao administrar paeonol da raiz por gavagem a murganhos, verificou-se que a DL_{50} foi de 3,43 g/kg. Demonstrações clínicas mostram que a decocção de Bai Shao Yao dentro da dose sugerida é segura (Shen-Nong, 2008).

5.1.8. Radix Lithospermi – Zi Cao



Figura 10: Planta Radix Lithospermi.

Retirado de: WU, J.-N. - Chinese Materia Medica. . [S.l.] : Oxford University Press, 2005. ISBN 13-978-0-19-51417-0

O Zi Cao é a raiz seca da planta *Arnebia euchroma* Johnst. *Arnebia guttata* Bunge ou *Lithospermum erythrorhizon* Sieb, representada na Figura 10. As suas funções em MTC incluem remoção do calor do sangue e promoção da circulação sanguínea. Contrapondo a toxicidade e facilitando a erupção, é usada no sarampo com erupção inadequada, feridas, eczema, bolhas e queimaduras.

As raízes das 3 plantas mencionadas anteriormente contêm hidroxinaftoquinonas como principais constituintes. A raiz de *Arnebia euchroma* contém shikonina, dioxishikonina, acetilshikonina entre outros pigmentos de naftaquinona. Foram ainda isolados da raiz componentes como monoterpenil-benzoquinonas tais como a arnebifuranona e a arnebinona, e ainda o arnebinol e a O-dimetilasiiodiplodina. As principais naftaquinonas da

espécie *Lithospermum erythrorhizon* são a shikonina e a alkannina. Desta espécie foram também isoladas a dioxishikonina e os shikofuranos A-E (Zhu, 1998). Na Tabela 12 são apresentadas as estruturas químicas dos principais constituintes.

Tabela 12: Alguns dos constituintes de Zi Cao e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
Shikonina	Arnebifuranona
Alkannina	Naftaquinona

Tanto a decocção de Zi Cao como a shikonina, que o mesmo contém, exibiram um efeito inibitório *in vitro* sobre microrganismos patogénicos como *Staphylococcus aureus*, *Bacteria coli* e *Salmonella typhi*. A shikonina pode ainda inibir os vírus da gripe e da encefalite B. Foi ainda comprovado que decocções de Zi Cao podem diminuir a febre (Li e Wei, 2002).

Os valores de DL₅₀ da shikonina e da acetilshikonina em ratos são 20 e 40 mg/kg, respetivamente, administrados por via intraperitoneal enquanto por via oral os valores de DL₅₀ são >1000 mg/kg. Para a alkannina, a DL₅₀ é de 3 g/kg em ratinhos e >1 g/kg em ratos por administração oral. Em ratinhos alimentados com uma dieta de 1% de alkannina durante 15 semanas não foram observadas reações tóxicas (Zhu, 1998).

5.1.9. Frutus Xanthii – Cang Er Zi



Figura 11: Frutus da planta Xanthii

Retirado de: “AliExpress” (2016). Disponível em: <https://pt.aliexpress.com/w/wholesale-fructus-xanthii.html> [accedido a: 12-Jan-2017]

O Cang Er Zi é a fruta madura seca da planta *Xanthium sibiricum Patr* representada na Figura 11. É usada para tratar problemas nasais, como muco, gripe, febre, dor nas articulações, urticária e prurido (uso externo) (WHO Regional Publications, 1997).

Os principais constituintes desta planta estão presentes no fruto, sendo compostos sesquiterpenos como o xanthanol, isoxanthanol, o xanthumin e o xanthostrumarin e ainda a hidroquinona. Produz também uma grande quantidade de óleos gordos (39%), sendo o ácido linoleico o principal ácido gordo. Foram ainda isolados compostos hipoglicêmicos como o composto glicosídeo AA2 e carboxiatractilosido (Li, X. *et al.*, 2013). Na Tabela 13 são apresentadas as estruturas químicas dos principais constituintes.

Tabela 13: Alguns dos constituintes de Cang Er Zi e respectivas estruturas.

Nome e Estrutura molecular	
<p>Hidroquinona</p>	<p>Ácido Linoleico</p>
<p>Isoxanthanol</p>	<p>Xanthumin</p>

Estudos farmacológicos modernos revelaram que o Fructus Xanthii possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e hipoglicêmicas. Um estudo realizado em 2013 testou a capacidade de Fructus Xanthii para atenuar a esteatose hepática em ratos alimentados com dieta rica em gordura, e que concluiu que a planta tem efetivamente um efeito benéfico na inibição da acumulação de gordura no fígado, melhora a resistência à insulina e eliminação

de glicose, inibe a inflamação e possui uma propriedade repressiva na lipogénese hepática sugerindo uma potencial aplicação de Fructus Xanthi no tratamento de esteatose hepática (Li, X. *et al.*, 2013).

O Cang Er Zi é definido na Farmacopeia chinesa como sendo uma planta tóxica. As manifestações tóxicas do extrato dos frutos em ratos, ratinhos e coelhos foram as mesmas dependendo da via de dosagem. Após 0.5h da administração, por gavagem, de 5g/kg de extrato, os ratinhos aparentaram menor atividade, com respiração irregular, perda de reflexos e poliúria, e finalmente convulsões e morte.

Doentes que ingeriram acima de 100g destes frutos podem queixar-se de mal-estar, dor de cabeça e distúrbios gastrointestinais após 12h. Outros efeitos tóxicos em humanos incluem tonturas, sonolência, coma e convulsões. A DL₅₀ obtida intraperitonealmente do extrato da fruta em ratinhos foi de 0.93 g/kg (Zhu, 1998).

6. Bibliometria

Artigos relacionados com MTC por ano

De acordo com dados bibliométricos obtidos através da *Web of knowledge*³, foi possível observar uma tendência crescente no número de artigos publicados ao longo de 21 anos acerca deste tema, como está apresentado na Figura 12, o que demonstra a importância que está a ser dada à medicina tradicional chinesa. De notar ainda que no ano 2016 houve um decréscimo no número de artigos relativamente aos anos anteriores. Não se sabe o porquê de tal ter acontecido, visto ainda existir muito por explorar nesta área. Outra explicação prender-se-á, possivelmente, com o facto de existirem artigos publicados em 2016 que ainda não estejam disponíveis nesta base de dados. Segundo dados da OMS de 2003⁴, entre 1995 e 2000, o número de médicos que receberam formação especial em MTC duplicou para 10800, o que demonstra novamente que a MTC está bastante presente e continuará a crescer na maioria dos países, o que faz com que haja um grande interesse em compreender o seu funcionamento.

³ Utilizando com *keyword* a frase *traditional chinese medicine* no website <https://apps.webofknowledge.com>

⁴ "Traditional Medicine" (2003). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/2003/fs134/en/>. Acedido a: 23-Jan-2017

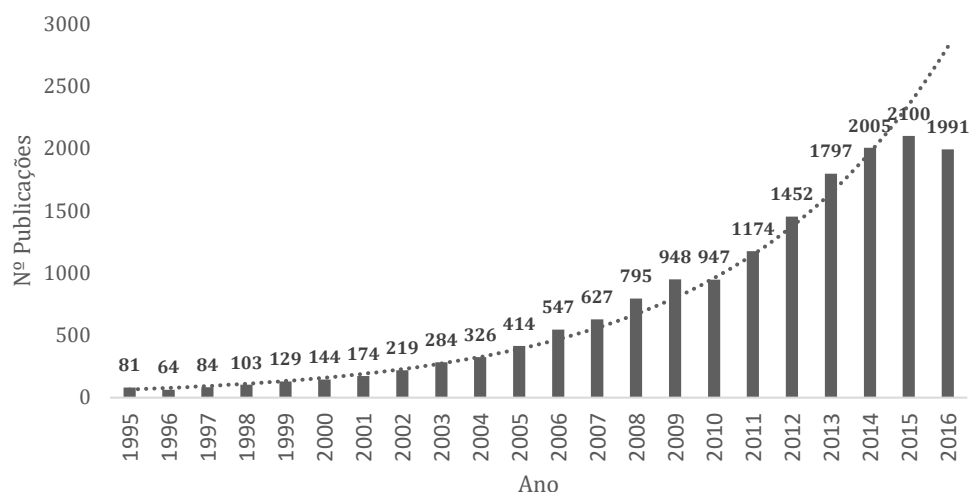


Figura 12: Representação do número de artigos publicados ao longo do ano de 1995 e 2016.

Artigos relacionados com MTC por país

Para avaliar o número de artigos publicados, desta vez por país, procedeu-se do mesmo modo. Observando o gráfico na Figura 13, o país com mais destaque a nível de publicações de artigos sobre MTC é a China com um acréscimo 10 vezes superior ao país seguinte, os Estados Unidos da América (EUA). Pode-se inferir que este valor bastante superior está relacionado com o facto de ser o país de origem das MTC, daí é dada uma maior importância ao seu estudo. Os países seguintes, EUA e Taiwan, apresentam artigos publicados na ordem dos milhares. Os dados apresentados podem ser explicados com dados estatísticos recolhidos pela OMS⁴. Segundo a mesma a MTC tem mantido a sua popularidade em todas as regiões do mundo em desenvolvimento e seu uso está a espalhar-se rapidamente nos países industrializados.

- Na China, as preparações tradicionais à base de plantas representam 30% a 50% do consumo total de medicamentos.
- Na Europa, América do Norte e outras regiões industrializadas, mais de 50% da população utilizou medicinas complementares ou alternativas pelo menos uma vez.
- Em São Francisco, Londres e África do Sul, 75% das pessoas que vivem com HIV/SIDA usam MTC.
- 70% da população no Canadá usou medicina complementar pelo menos uma vez.
- Na Alemanha, 90% da população usou pelo menos um produto natural na sua vida.

- Nos Estados Unidos, 158 milhões da população adulta usam medicamentos complementares e, de acordo com a Comissão de Medicamentos Alternativos e Complementares dos EUA, foram gastos \$17 bilhões de dólares americanos em produtos tradicionais no ano de 2000.
- No Reino Unido, as despesas anuais com medicina alternativa são de \$230 milhões de dólares americanos.

Em Portugal, existem ainda apenas 35 artigos publicados, número este que quando comparado com o país vizinho, Espanha, é ligeiramente inferior. Já quando comparado com um país com um PIB semelhante, a Grécia, o número de publicações diminui consideravelmente. Em relação à Espanha, poderá inferir-se que, sendo um país com uma população maior e mais recursos, será normal o número de publicações ser superior, já em relação à Grécia, certamente não estará relacionado com o número populacional, mas talvez com os recursos económicos do país.

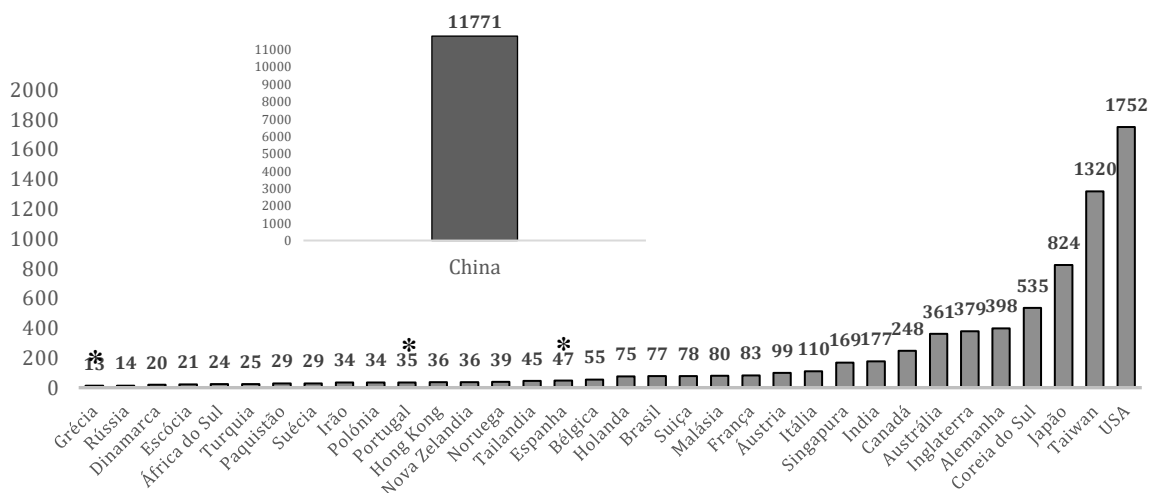


Figura 13: Representação do número de artigos publicados em 35 países.

Artigos relacionados com MTC por ano na China e EUA

De modo a avaliar a existência de tendências anuais para ambos os países, China (Figura 14) e EUA (Figura 15), observou-se o número de artigos publicados por ano de casa país.

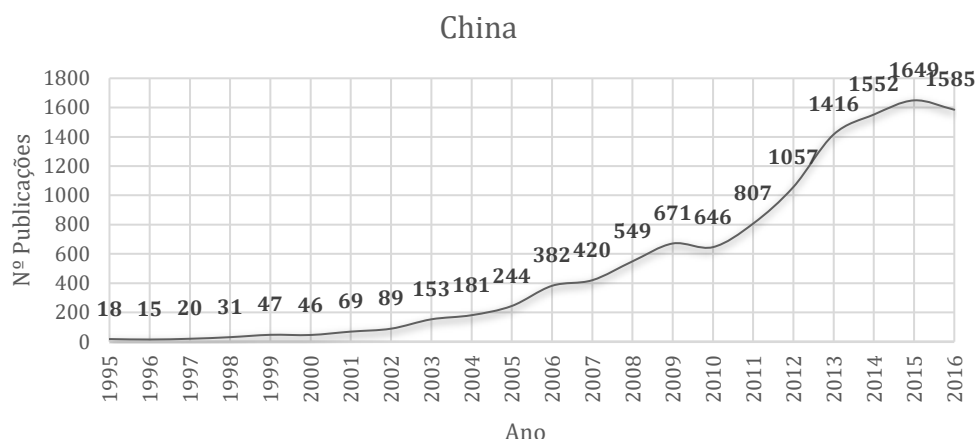


Figura 14: Representação do número de artigos publicados ao longo do ano de 1995 a 2016 na China.

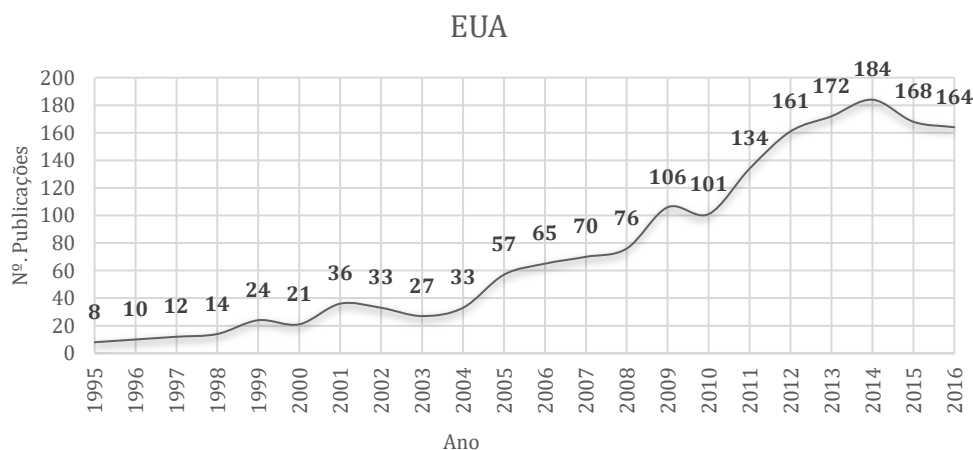


Figura 15: Representação do número de artigos publicados ao longo do ano de 1995 a 2016 nos EUA.

Em relação à China, como era esperado, notou-se uma tendência crescente de publicações, apenas com pequenas oscilações, mas nos EUA, apesar do crescimento notório, observou-se uma maior quantidade de oscilações no número de publicações. Não foi possível encontrar razões para tal, portanto apenas se pode inferir que possivelmente o interesse nesta medicina alternativa apenas se torna importante perante algum possível acontecimento, ou que passou a ser desnecessária a investigação quando já existem inúmeros artigos por parte de outros países, como é o exemplo da China.

7. Técnicas Instrumentais de Análise

7.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

A cromatografia é um método de separação de componentes de uma mistura em que a separação depende da distribuição das diferentes moléculas entre duas fases: uma fase estacionária e uma fase móvel. Os métodos cromatográficos classificam-se de acordo com a natureza das fases estacionária e móvel, dos seus estados físicos e dos mecanismos de separação. (Pais, 2011)

A cromatografia líquida de alta eficiência (ou pressão), ou HPLC, iniciou-se na década dos anos 60. É muitas vezes usada em aplicações forenses como, por exemplo, na análise de drogas, em toxicologia, na análise de explosivos, tintas, fibras e plásticos, sendo uma ferramenta chave na análise de vários materiais de natureza desconhecida (Pais, 2011). Esta é uma extensão da cromatografia líquida clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas e com empacotamento de partículas de tamanhos muito reduzidos, que constituem a fase estacionária permitindo uma elevada eficiência na separação. A fase móvel circula sob alta pressão, ao longo da coluna, com um fluxo controlado permitindo análises mais rápidas (Pimenta, 2013).

A combinação de uma fase estacionária adequada com a fase móvel permite a separação de uma mistura e, assim, a análise dos componentes da mistura. O HPLC é caracterizado pela utilização de partículas muito pequenas de fase estacionária que são fixas numa coluna como já mencionado anteriormente. Em HPLC existem dois tipos de colunas distintas: de fase normal e de fase reversa. Nas colunas de fase normal, os analitos que são relativamente mais polares são retidos pela fase estacionária polar durante mais tempo do que os analitos que são relativamente menos polares. Por conseguinte, o componente menos polar irá eluir em primeiro lugar. Nas colunas de fase reversa, os analitos que são relativamente menos polares são retidos pela fase estacionária não polar durante mais tempo do que os analitos que são relativamente mais polares. Por conseguinte, o componente mais polar irá eluir em primeiro lugar (McPolin, 2009).

Os detetores tradicionais para cromatografia líquida incluem detetores de índice de refração, eletroquímicos, fluorescência e UV-Vis. Alguns destes geram dados bidimensionais, isto é, dados que representam a intensidade do sinal em função do tempo. Outros, incluindo detetores UV-Vis de fluorescência e DAD, geram dados tridimensionais. Os dados tridimensionais incluem não apenas a intensidade do sinal, mas também dados espectrais

para cada ponto no tempo. Os espectrómetros de massa também geram dados tridimensionais. Além da intensidade do sinal, geram também dados espectrais de massa que podem fornecer informações valiosas sobre o peso molecular, estrutura, identidade, quantidade e pureza de uma amostra. Os dados espectrais de massa acrescentam especificidade o que aumenta a confiança nos resultados de análises por HPLC. Para a maioria dos compostos, um espectrómetro de massa é mais sensível e muito mais específico do que todos os outros detetores (AgilentTechnologies, 2001). Para este estudo foram utilizados 2 detetores, DAD e MS. No MS, como fonte de iões utilizou-se *Electrospray* (ESI) com *Ion Trap* como analisador de massa.

7.1.1. Detetor Diodo-Array (DAD)

O DAD é um detetor que permite obter a leitura de absorvâncias precisas fazendo o varrimento de um intervalo de comprimentos de onda, por exemplo de 290 a 700nm, enquanto um pico de um dado composto está a passar na célula de fluxo. Assim, com este detetor é possível obter informação qualitativa para um dado pico (espectro UV) além de uma simples identificação pelo tempo de retenção que posteriormente é comparado com os obtidos com padrões puros. Outra vantagem deste detetor deve-se ao facto de permitir medir a absorvância a vários comprimentos de onda que são seleccionados de forma a corresponder à maior sensibilidade de medição para um dado composto (Paula, 2012).

7.1.2. Espectrometria de Massa (MS)

Fonte de Ionização por *Electrospray* (ESI) – Esta fonte de iões gera iões de analito em solução antes de o analito atingir o espectrómetro de massa. O eluente é nebulizado para uma câmara à pressão atmosférica na presença de um campo electroestático forte e de um gás de secagem aquecido. O campo electroestático provoca uma dissociação adicional das moléculas do analito. O gás de secagem aquecido faz com que o solvente nas gotículas se evapore. À medida que as gotículas encolhem, a concentração de carga nas gotículas aumenta. Eventualmente, a força repulsiva entre iões com cargas semelhantes excede as forças coesivas sendo então ejetados na fase gasosa. Estes iões são atraídos e passam através de um orifício de amostragem capilar para o analisador de massa. O ESI é especialmente útil para analisar biomoléculas grandes tais como proteínas, péptidos e oligonucleótidos, mas também pode analisar moléculas menores como benzodiazepinas e aminoácidos.

Deteção de iões pelo mecanismo Ion Trap - Consiste num elétrodo de anel circular mais duas tampas de extremidade que em conjunto formam uma câmara. Os iões que entram na câmara são "aprisionados" por campos eletromagnéticos. Pode ser aplicado ainda outro campo para ejetar seletivamente iões da armadilha. O *Ion Trap* tem a vantagem de ser capaz de realizar múltiplas fases de espectrometria de massa sem analisadores de massa adicionais (AgilentTechnologies, 2001).

7.2. Espectroscopia com plasma induzido acoplado a MS (ICP-MS)

O ICP-MS é uma técnica analítica muito sensível com uma elevada gama linear dinâmica e uma poderosa ferramenta para analisar vestígios de metais em todo o tipo de amostras. Permite analisar todos os elementos desde o Lítio ao Urânio e pode ser aplicada a sólidos, líquidos e gases (Philips, 2013). Com as suas capacidades multi-elementares, uma boa precisão e exatidão, uma elevada sensibilidade e um amplo espectro dinâmico desde baixo ppt a ppm o ICP-MS foi estabelecido como um método poderoso e amplamente utilizado na análise elementar de catiões metálicos e na análise de isótopos (Birbaum, 2011).

7.3. Espectroscopia de UV-Vis

A absorção de radiação eletromagnética da região do ultravioleta (UV) (100-400 nm) e visível (Vis) (400-800 nm) por parte de moléculas, átomos ou iões está associada a transições eletrónicas. Estas ocorrem quando, por interação da radiação eletromagnética com o meio absorvente, um eletrão é promovido dum estado eletrónico de baixa energia para outro de energia mais elevada. A quantidade de luz absorvida quando um feixe de radiação monocromática atravessa o meio absorvente depende da concentração, do coeficiente de absorção molar da espécie absorvente e do percurso ótico da radiação de acordo com a equação:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Onde A é a absorvância, b é o percurso ótico, C a concentração em solução e ϵ o coeficiente de absorção molar (Pina, 1994).

O estudo da sua variação com a concentração permite a determinação quantitativa de um grande número de substâncias químicas e biológicas, o estudo cinético de reações lentas em

solução e a determinação de curvas de titulação. Por outro lado, a compilação de espectros de absorção (representação gráfica do coeficiente de absorção molar em função do comprimento de onda) sob a forma de bases de dados é usada para identificação e verificação do grau de pureza de compostos, cálculo da diferença de energia entre estados eletrónicos e do momento dipolar da transição (Martinho, 1994).

II. Problemática e Objetivos

1. Problemática

A MTC tem muitos efeitos benéficos e tem sido praticada ao longo de milhares de anos. Afirma tratar a causa de uma doença em vez de aliviar os seus sintomas. Com base na crença de que a MTC é natural, segura e de baixo custo, consumidores de todo o mundo têm vindo a desembolsar cada vez mais dinheiro nesta forma de terapia. O aumento do consumo e relatos de reações adversas atraíram a atenção de muitas agências reguladoras sendo que os pedidos de pesquisas científicas sobre os seus riscos e benefícios tem aumentado (Siow *et al.*, 2005).

A consistência na composição e na atividade biológica são requisitos essenciais para o uso seguro e eficaz de agentes terapêuticos. A qualidade é o determinante crítico da segurança e eficácia dos medicamentos botânicos; no entanto, as preparações botânicas raramente atendem aos padrões de qualidade. A fonte ou origem e qualidade das plantas medicinais chinesas têm um impacto direto sobre a eficácia da MTC. Estas são muito complexas e, frequentemente, as diferenças nas espécies, áreas de cultivo, e os tempos de colheita podem levar a variações na qualidade das mesmas.

Uma das principais limitações para as indústrias que desenvolvem novos produtos à base de plantas é a variabilidade de lote para lote na composição do produto e componentes bioativos. A variação na composição do produto e nos componentes bioativos compromete a segurança e a eficácia do produto à base de plantas. A qualidade do produto e a identificação da bioatividade tornaram-se uma questão crítica para a investigação e desenvolvimento destes produtos. Se a concentração do componente bioativo dentro do extrato à base de plantas varia de lote para, é impossível esperar resultados confiáveis e consistentes. Além disso, se a composição do produto à base de plantas final é variável, então há uma forte possibilidade de que o paciente pode ser subdosado ou sobredosado com o componente bioativo.

Outro problema associado com estes produtos é o armazenamento, sendo este feito em condições indesejáveis ao longo dos anos podendo sofrer contaminações ou adulteração, o que por sua vez afeta negativamente a eficácia e, por vezes, amplia a toxicidade. Ainda, foram encontradas em diversos produtos botânicos contaminações por metais pesados como mercúrio, arsénio e chumbo, o que demonstra que realmente existe uma enorme

problemática envolta nos produtos usados em MTC, tornando toda a indústria um problema de saúde pública. (Patwardhan *et al.*, 2005; Siow *et al.*, 2005)

2. Objetivos

Face ao exposto anteriormente, é possível observar que existem preocupações quanto à qualidade e eficácia dos produtos à base de plantas. A presença de efeitos adversos aquando da toma dos produtos implica uma urgência de estudos de risco e toxicidade destes produtos.

Foram detetados diversos doentes oncológicos que tomaram Kang Ai Ling – entre outros produtos para o mesmo efeito – e que apresentaram efeitos adversos, ao interagir com a quimioterapia. Poderão ainda existir casos não reportados, em que os doentes ingerem estes produtos sem informar os médicos. O facto de não haver qualquer controlo permite que haja acesso facilitado a este tipo de produtos, sendo que muitos deles não sabem o que os mesmos podem fazer, apenas “ouvirem falar”, e “se é natural é bom”. Isto demonstra um enorme problema de saúde pública e daí a importância forense destes estudos.

Foi objetivo deste trabalho de investigação caracterizar a composição do produto de MTC, Kang Ai Ling. Foi ainda objetivo específico detetar a presença de metais pesados neste mesmo composto.

No contexto do cancro da mama, foi também objetivo avaliar a citotoxicidade do Kang Ai Ling em linhas celulares tumorais, HCC1806 e MCF7. A escolha destas linhas deve-se ao facto de várias mulheres com cancro da mama ingerirem esta fórmula.

III. Materiais e Métodos

1. Reagentes, Materiais e Equipamentos

Reagentes

- Acetonitrilo, Riedel-de Haen para análise – pureza: 99,5%
- Ácido Nítrico, *BDH Limited Poole England* sp. gr. 1,42; Assay=69,0-70,5%
- Padrões ICP: *Periodic table mix 1 for ICP, TraceCERT®*, 33 elements, 10 mg/L in nitric acid,

Sigma Aldrich

Meios de Cultura

- *Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI-1640 Medium)*, *HEPES Modification*, com L-glutamina e com *HEPES* na concentração de 25mM, *Sigma Aldrich*

- *Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)*, com glicose na concentração de 4500 mg/L e com L-glutamina, *Sigma Aldrich*;

Padrões TLC

- ✓ Aminoácidos: Triptofano, Tirosina, Cisteína;
- ✓ Alcaloides: Ácido Nicotínico, Berberina;
- ✓ Flavonoides: Rutina, Luteolina, Apigenina, Luteolina-7-Glicósido.
- ✓ Ácido Fenólico: Ácido Cafeico.

As soluções padrão utilizadas em TLC foram preparadas numa concentração de 1% em etanol.

HPLC

As fases móveis utilizadas em HPLC foram preparadas com água ultrapura obtida pelo sistema *Water Purification System – Human Power I*.

O equipamento HPLC/DAD/MS usado foi um cromatógrafo *Thermo Scientific™ UltiMate™ 3000 Standard (SD) HPLC/UHPLC System*, acoplado a um detetor Diode Array, por sua vez ligado em série com um detetor de massa Bruker – Amazon SL. A coluna utilizada foi uma *Hichrom 5 C18* de fase reversa de dimensões 15cm x 4,6mm. 7

Para a detecção dos compostos fenólicos o equipamento HPLC consistia num cromatógrafo Gilson acoplado a um detetor Diode Array. A coluna utilizada foi uma coluna Waters Spherisorb ODS2 (5 µm) column (4.6 µm × 250 mm).

ICP-MS

O equipamento usado foi um ICP *iCAP Q, Thermo Scientific*, acoplado a um detetor de massa.

Material

- Filtros *Minisart RC 15 – RC membrane – Pore Size: 0,20µm*;
- Filtros *Whatman FP 30/0,2 CA-S*;
- Placas de sílica gel *F_{254nm}* para TLC;

2. Estudo preliminar do Kang Ai Ling

A polaridade dos compostos presentes na fórmula foi avaliada através de extração líquido-líquido usando diclorometano como solvente orgânico. A preparação foi realizada de acordo com o esquema apresentado na Figura 16.

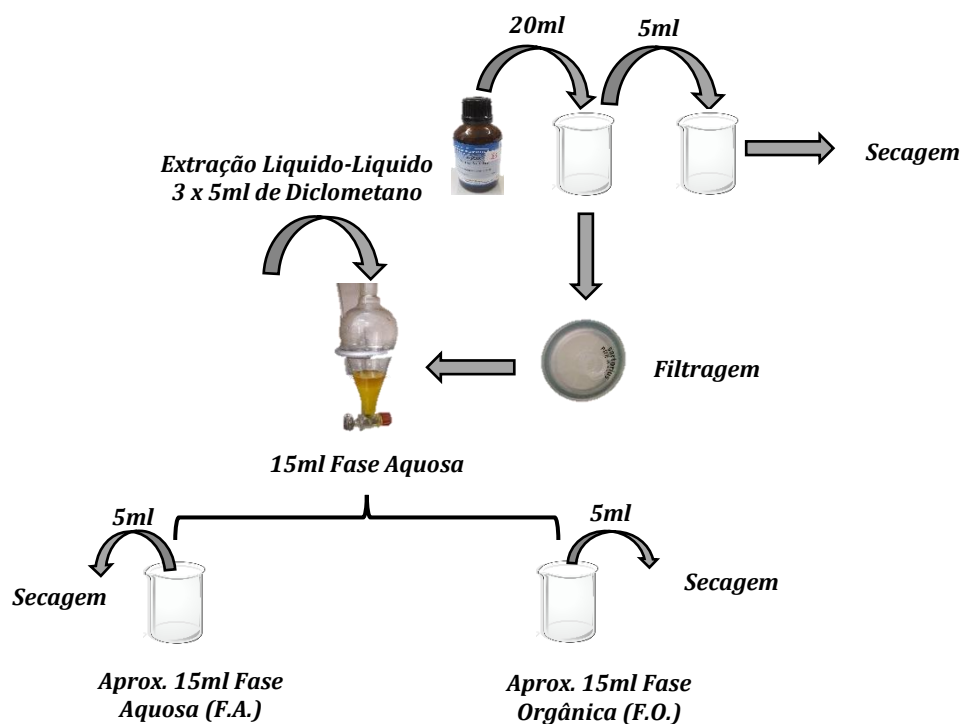


Figura 16: Esquema de obtenção de massas para cálculos de rendimento.

Os 5ml retirados diretamente do frasco foram secos numa placa de aquecimento a uma temperatura de 100°C durante 3 horas, e a fase aquosa (F.A.) foi seca nas mesmas condições durante 1.5 horas. A fase orgânica (F.O.) foi seca com o auxílio do secador Braun Swing 1400 durante 5 minutos.

3. Estudos Físico-químicos

Neste estudo foram analisados três frascos de Kang Ai Ling, os resultados físico-químicos apresentados correspondem ao frasco 1, sendo que, após prévias análises, não foram observadas diferenças significativas entre os frascos (do mesmo lote e de lotes diferentes).

3.1. Condições de Análise

HPLC-DAD-MS

Para análise em HPLC, a amostra foi diluída de acordo com a posologia apresentada no frasco, 50 gotas diluídas num copo de água. Partindo do suposto de que um “copo” contém aproximadamente 200ml, diluiu-se então essas mesmas 50 gotas (2,5ml) em 200ml de água UP, diluição essa denominada por solução terapêutica (ST).

Neste estudo foram feitas duas análises em dois HPLC-DAD diferentes e com dois programas distintos. Para o programa de deteção de alcaloides a fase móvel A foi constituída por 75% de água com 0,1% de ácido fórmico e a fase móvel B, constituída por 25% de acetonitrilo, sendo o pH das fases móveis de 3,06. A eluição foi realizada em modo isocrático com a duração de 40 minutos a um fluxo de 0,5 ml/min e com um volume de injeção de 20 µl a uma temperatura de 30°C. A aquisição dos espectros UV dos componentes utilizados foi realizada entre os 250 e 400 nm, sendo os espectros impressos a 250 nm. Os cromatogramas apresentados foram adquiridos no *software Chromeleon*®.

Para a separação dos compostos fenólicos fez-se com uma coluna estabilizada a 25°C e um gradiente de água tridestilada, acidificada com ácido *orto*-fosfórico (pH 2.6) (A) e acetonitrilo (B) com um fluxo de 0,8 ml/minuto: T=0 B=0%; T=12 B=9%; T=20 B=13%; T=40 B=33%; T=42 B=33%; T=52 B=43%; T=60 B=43%. A aquisição do espectro UV dos componentes analisados, foi realizada entre 220 e 600 nm. Os cromatogramas foram impressos a λ_{\max} de 260 e de 340 nm.

Estudo Preliminar de ICP-MS

Para o estudo em ICP foi necessária uma digestão ácida do produto e prévias diluições de modo a atingir concentrações na ordem dos ppb. Diluiu-se então 1 ml de Kang Ai Ling em 0,5 ml de HNO₃, procedendo-se do mesmo modo para os restantes tubos (5 tubos de ensaio sendo 3 amostras com respetivos duplicados). Os tubos foram a aquecer a 50°C durante

aproximadamente 40 minutos, sendo posteriormente filtradas as amostras (filtros de 0,45µm). Foram feitas duas diluições, 1:500 (1ml de amostra em 500ml de água UP), seguida de uma nova diluição de 1:5.

Os padrões foram feitos a concentrações de 250, 150, 100 e 50ppb. O branco consistiu em água UP com 2% de HNO₃.

Os elementos analisados foram, o arsénio (As), o bário (Ba), o bismuto (Bi), o chumbo (Pb), o céσιο (Cs), o tálio (Tl) e o crómio (Cr). Apesar de o padrão conter mais elementos, os apresentados foram escolhidos de acordo com o grau de toxicidade no ser humano, e ainda, para evitar interferências que poderiam comprometer os resultados.

Todos os resultados apresentados foram adquiridos no *software Qtegra*[®].

Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Para os TLC's de *screening*, foram utilizadas placas de TLC de sílica gel F_{254nm} 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. Todos os padrões foram preparados a 1%, 1mg/100ml de etanol.

As fases móveis e os desenvolventes utilizados neste estudo dependeram dos grupos químicos em análise. Para os flavonoides a fase móvel correspondeu a Acetato de Etilo: Ácido Fórmico: Ácido Acético Glacial: Água numa percentagem de 10:1,1:1,1:2,7, respetivamente. O método de revelação foi através de luz UV e do reagente NP/PEG (*Natural Products Reagent*).

Para os aminoácidos a fase móvel correspondeu a n-butanol: Acetona: Ácido Acético: Água na percentagem de 3,5:3,5:1:2, respetivamente. O revelador foi o Reagente de Ninidrina.

Em relação aos alcaloides, foram feitos dois screenings, um deles foi em conjunto com os flavonoides, e, portanto, o eluente utilizado foi o mesmo, enquanto que o outro foi em conjunto com o Ácido Nicotínico, usando o eluente para alcaloides, Acetato de Etilo: Metanol: Água na proporção 100:13,5:10. Para este último, o revelador foi o reagente de Dragendorff (DRG).

4. Estudos de Citotoxicidade

Para os estudos de citotoxicidade foi tido em consideração o protocolo de teste descrito na norma ISO 10993-5 - *Biological Evaluation of Medical Devices – Part 5: Tests for in vitro Citotoxicity*.

Para a realização dos testes de citotoxicidade, o produto, Kang Ai Ling, foi previamente filtrado de modo a garantir a esterilidade e eliminar eventuais materiais não solubilizados que aparentavam depositar no fundo do frasco.

Neste estudo foram realizados testes em duas linhas celulares de cancro da mama, a linha celular MCF7, representativa de um cancro da mama hormonodependente, e a linha celular HCC1806, representativa de um cancro da mama triplo negativo; ambas previamente adquiridas à *American Type Culture Collection* e disponíveis no Instituto de Biofísica da FMUC.

4.1. Linhas celulares

As linhas celulares caracterizam-se por células tumorais que foram recolhidas de doentes para investigação. As linhas de células tumorais provaram ser bastante úteis em investigações laboratoriais e pré-clínicas desde que a primeira foi estabelecida há mais de 50 anos (Kathryn *et al.*, 2012).

Neste estudo irão ser focados dois subtipos de cancro da mama, o triplo negativo, representado pela linha celular HCC1806 e o hormonodependente, representado pela linha celular MCF7.

Na Figura 17 é possível observar as duas linhas celulares em cultura.

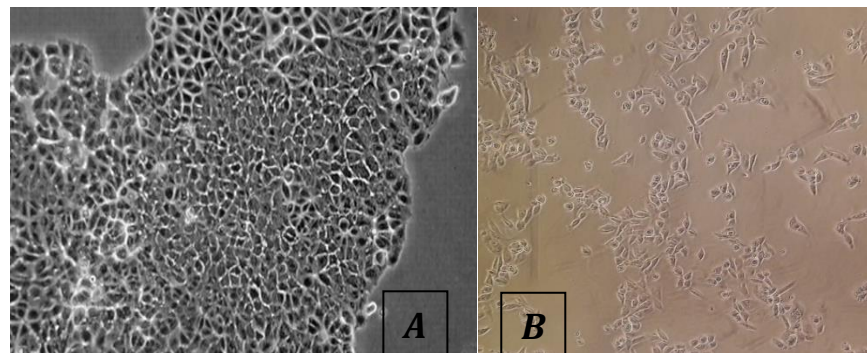


Figura 17: Linhas celulares. A - MCF7 (Larco *et al.*, 2001); B - HCC1806.

O meio de cultura é um componente importante para o crescimento das culturas celulares, que fornece aminoácidos, vitaminas, minerais e carboidratos, permitindo às células a produção de novas proteínas essenciais para o seu crescimento, assim como fornecer a energia necessária para o seu metabolismo (Soares, 2008).

De acordo com as recomendações do fornecedor, utilizou-se o meio de cultura apropriado a cada linha celular. Para a linha celular MCF7, o meio utilizado foi *DMEM* (*Dulbecco's*

Modified Eagle's Medium) suplementado com bicarbonato de sódio na concentração de 4500mg/L e com soro fetal na concentração de 5%. Para a linha celular HCC1806, o meio utilizado foi o *RPMI-1640* suplementado com D-Glucose de modo a obter a concentração final de 25mM, bicarbonato de sódio e soro bovino fetal na concentração de 5%.

As linhas celulares foram mantidas em frascos de cultura com 75cm², numa incubadora Binder® (Binder, Alemanha), numa atmosfera húmida (90%) e 5% de dióxido de carbono (CO₂) a 37°C. O meio de cultura foi renovado a cada dois ou três dias. Quando as culturas atingiram uma confluência de 80% a 90% as células foram dissociadas com recurso à enzima tripsina. Para tal o meio de cultura foi removido e descartado, o frasco de cultura foi lavado com uma solução de tampão salino de fosfato (PBS, do inglês, *phosphate buffer saline*, constituído por 137 mM de NaCl (Sigma, S7653), 2,7 mM de KCl (Sigma, P9333), 10 mM de NaH₂PO₄ (Sigma, S5011), 1,8 mM de KH₂PO₄ (Sigma, P0662) e 5mM de EDTA (Amresco, M101)), e, após descarte do PBS, foi inserido 2ml de tripsina-EDTA (T-4049, Sigma Aldrich®, EUA) e colocou-se novamente o frasco durante uns minutos na incubadora de modo a facilitar o descolar das células. Posteriormente adicionou-se 8ml de meio, e as células foram transferidas para tubos de falcon para posterior contagem.

O número de células das suspensões celulares obtidas foi avaliado através da contagem através do método de exclusão do azul de tripano. Este método baseia-se no princípio de que as células mortas, por terem a membrana celular comprometida, coram de azul e as células viáveis apresentam uma cor branca brilhante (Serambeque, 2015). O procedimento consistiu em pipetar 20 µL de azul tripano (0,02 % em PBS) para um *ependorf* e 20 µL da suspensão celular. Depois de se suspender, transferiu-se a suspensão celular para um hemocítmetro e fez-se a contagem de células dos quatro quadrantes num microscópio invertido (Nikon, Eclipse TS 100, Japão) numa ampliação de 100 vezes.

Após a contagem, o volume das suspensões celulares foi ajustado com meio de cultura, por forma a obter a concentração pretendida para cada estudo. A suspensão celular foi posteriormente distribuída por placas de poços, com um dispensador automático. As placas de experiência são incubadas em atmosfera húmida com 5% de CO₂ a 37 °C durante 24 horas de modo a proporcionar a adesão celular.

4.2. Avaliação da Atividade Metabólica (MTT)

O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) é um sal tetrazólio solúvel em água que forma uma solução amarelada. Este é metabolicamente reduzido em células viáveis para um formazano azul-violeta insolúvel. O número de células metabolicamente ativas correlaciona-se com a intensidade de cor determinada por medição fotométrica após a dissolução do formazano em isopropanol (Soares, 2008).

Para este estudo preparam-se suspensões celulares com 80.000 células/ml que se distribuíram por placas de 48 poços e que se incubaram durante 24h (5% de CO₂, 37°C, >90% de humidade) de forma a permitir a adesão das células.

O composto Kang Ai Ling foi estudado em três tempos de incubação, 24h, 48h e 72h e concentrações variáveis entre 400% a 0,012207%. Em todas as experiências foram realizadas 3 réplicas e foram incluídos poços controlo, não tratados, em todas as placas.

Para a realização do ensaio de MTT, o meio da placa foi descartado e os poços foram lavados com PBS. O PBS foi descartado e nos poços foram introduzidos 100µL de uma solução MTT (0,5 mg/ml; Sigma M2128). A placa foi a incubar num local desprovido de luz a 37 °C. durante 24h. Após as 24h foi possível observar a formação de cristais de formazano. De modo a dissolver os cristais foi adicionado à placa com o MTT, 100 µl de isopropanol em cada poço. Agitou-se a placa até se dissolverem os cristais e subsequentemente foram lidas as respetivas absorvâncias num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT (comprimento de onda de referência 570-620 nm).

4.3. Avaliação da Viabilidade Celular

A Sulforrodamina B (C₂₇H₃₀N₂O₇S₂ - SRB) é um corante brilhante de cor púrpura, com dois grupos sulfónicos, solúvel em água, que, sob condições ácidas, se liga electrostaticamente aos resíduos aminoácidos básicos das proteínas, em células previamente fixadas com Ácido Acético na concentração de 1% preparado em Metanol frio. É um ensaio usado como indicador quantitativo do conteúdo proteico da cultura celular, sendo este conteúdo proporcional à densidade de células. Um aumento ou diminuição do número de células resulta numa alteração proporcional da quantidade do corante incorporado, o que indica o grau de citotoxicidade causada pelo composto em estudo (Soares, 2008).

Para este estudo prepararam-se suspensões celulares com 70.000 células/ml, que se distribuíram por placas de 24 poços e que foram incubadas durante 24h de forma a permitir a adesão das células.

As culturas celulares foram submetidas ao composto Kang Ai Ling nas concentrações de 400, 200, 50, 12,5 e 1,5% durante 48h.

Para a realização do ensaio de SRB descartou-se o meio e lavou-se com PBS, secando em seguida a placa. Adicionou-se 200 µL de Ácido Acético a 1% Metanol (4 °C) em todos os poços, e colocou-se a incubar durante 1 hora a 4°C para facilitar a fixação das células.

Após o período de fixação, descartou-se o Ácido Acético: Metanol ficando as placas a secar à temperatura ambiente durante 15 minutos. Adicionou-se posteriormente 200 µL de solução de SRB (Sigma 69012) e incubou-se à temperatura ambiente (20 a 25 °C) e protegidas da luz, durante 1 hora de modo a permitir a incorporação do corante. Posteriormente descartou-se o SRB e lavou-se a placa de modo a remover os resíduos de SRB e colocou-se em cada poço 200 µL de Tris-NaOH (pH=10), com o intuito de solubilizar o corante ligado.

Terminou-se o ensaio de SRB com a quantificação colorimétrica através da medição da absorvância a 540/690 nm num espectrofotómetro Biotek® Synergy HT.

4.4. Ensaio Preliminar da Berberina

Com o propósito de estudar o efeito da berberina nas células foram também realizados testes preliminares de MTT e SRB com este alcaloide. Para este ensaio, as culturas celulares foram submetidas à berberina nas concentrações de 200, 100 e 50%, durante 48h. As concentrações partiram de uma solução mãe (200%) com uma concentração de 2,5µg/ml, sendo 100% correspondente à concentração equivalente à concentração de 100% de Kang Ai Ling, com uma concentração idêntica de berberina. Em todos os estudos foram incluídos poços controlo.

4.5. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com recurso ao software IBM® SPSS® *Statistics*, versão 20.0 (IBM Corporation, Armonk, New York, EUA). Os resultados das variáveis quantitativas ao longo do texto foram expressos sob a forma de média ± desvio padrão à exceção dos valores de IC₅₀ que foram apresentados com o intervalo de confiança a 95%.

Os resultados obtidos relativamente ao IC₅₀, foram analisados e processados no programa OriginPro (OriginLab Corporation, Northampton, EUA), versão 8.0 e ajustados a uma curva sigmoide. Foram obtidos os intervalos de confiança a 95% para o IC₅₀ a partir dos parâmetros obtidos pelo ajuste da curva (log x₀ e respetivo erro padrão). Os parâmetros que definem as curvas de dose-resposta referentes aos resultados da atividade metabólica foram comparados utilizando o teste ANOVA de um fator.

As comparações para a atividade metabólica e para a viabilidade, foram obtidas segundo o teste t-Student, o teste de *Kruskal-Wallis* e o teste de *Mann-Whitney*.

Todas as comparações múltiplas foram corrigidas segundo o método de *Bonferroni* e foi considerado um valor de significância de 5% para todas as comparações.

IV. Resultados⁵

1. Testes preliminares à fórmula Kang Ai Ling

Os resultados do processo representado na Figura 16 estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14: Massas obtidas após secagem.

	Amostra	Fase Aquosa	Fase Orgânica
Massa (g)	0.3540	0.3337	0.0014

Cálculo de Rendimento da Extração

A partir dos valores apresentados na Tabela 14, podemos calcular o rendimento da extração:

$$R = \frac{mFO}{mAmostra} \times 100 = \frac{0.0014g}{0.3540g} \times 100 = 0.3\%$$

Equação 1: Cálculo de rendimento da extração líquido-líquido

Como é possível observar, o rendimento foi bastante baixo como já era de esperar após observar a massa final obtida. Isto quer dizer que a maioria dos compostos presentes na nossa amostra são polares permanecendo na fase aquosa.

2. TLC's de Screening

Numa primeira abordagem à fórmula foram realizados TLC's de *sreening*. A formulação em estudo contém diversas plantas que por sua vez possuem inúmeros constituintes principais. A partir da bibliografia consultada não foi possível saber ao certo as características físico-químicas desta fórmula, sendo que também não estavam claros quais os compostos maioritários de cada planta presente na composição apresentada, condicionando assim a previsão de resultados pela falta de meios comparativos.

Estes testes preliminares vão permitir identificar diferentes tipos de estruturas (flavonoides, alcaloides e aminoácidos) presentes no Kang Ai Ling.

⁵ Os resultados apresentados neste capítulo, com exceção dos estudos nas linhas celulares, foram obtidos em coautoria com a licenciada Ana Pinheiro.

Teste de Detecção de Alcaloides

Ao realizar o teste para os alcaloides, foi testada a presença de dois alcaloides específicos, a berberina e o ácido nicotínico. O que mais se esperava encontrar seria a berberina, pois segundo a fórmula à base de plantas apresentada, a berberina está presente em duas das plantas como componente principal.

Os resultados demonstraram uma banda semelhante à berberina, mas com uma coloração mais fraca, podendo revelar a sua presença, mas numa concentração mais baixa que a do padrão. Em relação ao ácido nicotínico, apenas foi possível observar a sua presença quando observado à luz UV, que, quando comparado com a amostra em estudo, não se encontra presente.

Teste de Detecção de Flavonoides

Na deteção de flavonoides, foram usados como padrões quatro flavonoides, rutina (R), luteolina (L), apigenina (Ap), luteolina-7-glucosido (L7G) e ainda o ácido fenólico, ácido cafeico (AC).

Os resultados revelaram que os flavonoides em estudo, que faziam parte dos constituintes descritos na bibliografia correspondentes às plantas que supostamente constituem este extrato, não estavam presentes na amostra.

Teste de Detecção de Aminoácidos

Para além da análise a alcaloides e flavonoides, foi também realizado um *screening* à presença de aminoácidos, sendo os seleccionados o Triptofano, a Tirosina e a Cisteína.

Tal como nos flavonoides, não foram detetados na amostra a presença dos aminoácidos testados. No caso da tirosina, não é possível detetar manchas nas diferentes fontes de luz, não sendo possível assim tirar conclusões relativas à sua presença na amostra.

3. Testes Físico-químicos

Espetroscopia de Ultravioleta/Visível (UV/Vis)

Antes de executar as análises de HPLC-DAD, foi feito um estudo dos espectros de absorção da fórmula. Na Figura 18 observam-se os comprimentos de onda da ST e respetiva fase orgânica e fase aquosa resultantes de uma extração líquido-líquido (procedimento semelhante ao descrito no Capítulo III, ponto 2.).

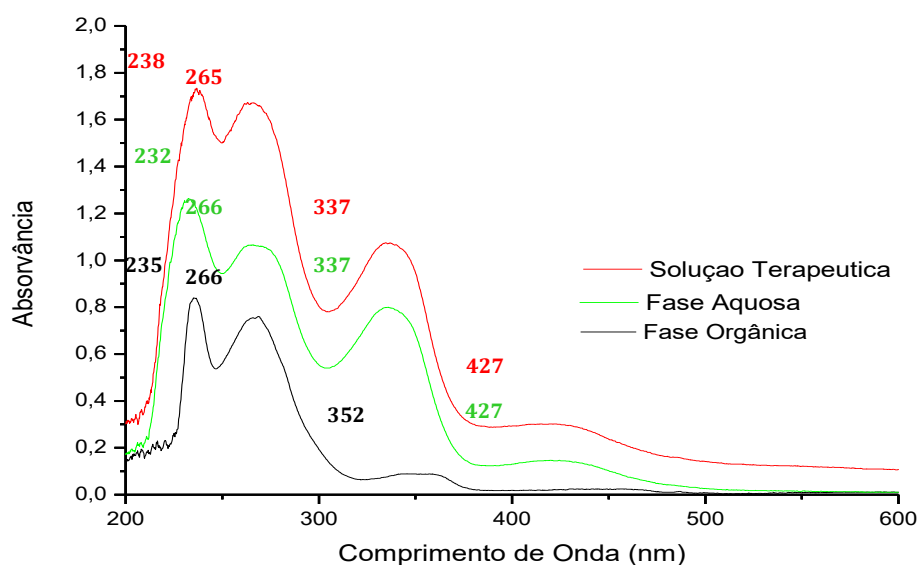


Figura 18: Espectros de UV/Vis para a Sol. Ter., Fase Aquosa e Fase Orgânica.

Após o *sreening* inicial por TLC, foi detetada uma possível presença de berberina. Com base nessa descoberta foi feito um espectro de absorção da mesma, para mais tarde detetar a sua presença no produto por HPLC-DAD. Os resultados estão apresentados na Figura 19.

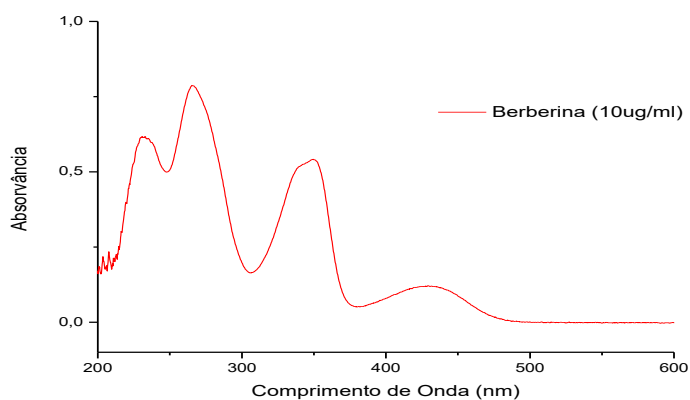


Figura 19: Espectro de UV/Vis da Berberina.

É de notar, no espectro correspondente à berberina, que o mesmo se assemelha ao espectro do extrato inteiro em estudo e que supostamente contém vários constituintes correspondentes às diferentes plantas que o constituem.

Estudos Preliminares de ICP-MS

Como referido na problemática, na maioria das vezes a produção destes tipo de produtos não tem grande controlo e por vezes encontra-se contaminado com as mais diversas coisas.

Um dos tipos de contaminação é a provocada por cátions metálicos. No seguimento desse problema, procurou-se fazer um estudo preliminar por ICP-MS com o intuito de identificar a presença de metais tóxicos. Foram então analisados o As, Cr, Cd, Bi, Cs, Ba, Tl e Pb.

Foram analisados os 3 frascos de Kang Ai Ling, com 1 réplica por frasco, de modo a identificar possíveis diferenças entre frascos e entre lotes. Para cada elemento, o software ajustou a reta de calibração apresentando a equação da reta como é apresentado na Figura 20 um exemplo para o As.

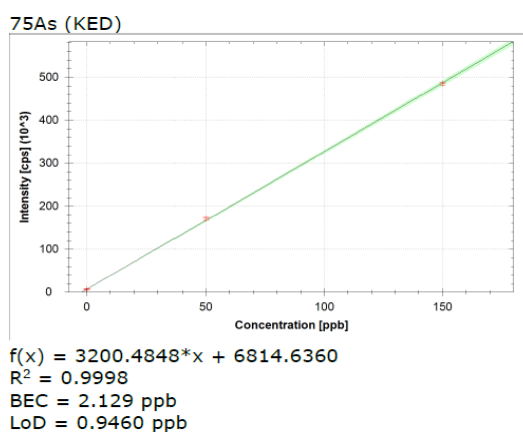


Figura 20: Reta de calibração originada pelo programa Qtegra para o Arsénio.

No caso do As, foi obtida uma reta com um coeficiente de correlação (R^2) de 0.99, calculado também para as restantes retas (ver Anexos). É ainda apresentado o valor BEC que corresponde ao valor de pureza da água UP utilizada, e o LoD, correspondente ao limite de deteção do aparelho. A partir da equação da reta foram então interpolados os valores das concentrações, que após multiplicados pelo fator de diluição (2500x), permitiu ter uma visão geral da concentração de metais presentes em casa amostra. Os resultados podem ser observados na Tabela 15. De notar que as amostras 2 e 3 correspondem ao mesmo lote, sendo de frascos diferentes, e a amostra 1 pertence a um lote diferente.

Tabela 15: Valores das concentrações finais.

	Concentração (ppm) ± Desvio Padrão					
	1.1	1.2	2.1	2.2	3.1	3.2
Cr	< LoD ^{*/**}	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD	< LoD
As	< LoD	< LoD	1,7 ± 0,2	< LoD	< LoD	< LoD
Cd	0,967 ± 0,006	0,015 ± 0,004	7,9 ± 0,1	0,15 ± 0,02	0,486 ± 0,003	0,107 ± 0,003
Cs	0,029 ± 0,003	0,006 ± 0,003	0,029 ± 0,001	0,02 ± 0,00	0,012 ± 0,001	0,003 ± 0,000
Ba	18,4 ± 0,1	1,99 ± 0,05	31 ± 1	16,7 ± 0,1	15,24 ± 0,09	1,57 ± 0,04
Tl	0,02 ± 0,00	0,005 ± 0,000	0,008 ± 0,000	0,003 ± 0,000	0,01 ± 0,00	0,002 ± 0,001
Pb	2,06 ± 0,04	1,22 ± 0,04	57,9 ± 0,7	20,0 ± 0,4	20,2 ± 0,3	0,265 ± 0,008
Bi	0,02 ± 0,00	< LoD	0,013 ± 0,001	< LoD	0,002 ± 0,001	< LoD

*Limites de detecção do aparelho, sem ter em conta o fator de diluição das amostras, sendo possível, em alguns casos, serem detetados caso o fator de diluição seja inferior. ** LoD=médias das intensidades do branco +3X DP do branco

Ao analisar a Tabela 15 é de notar as discrepâncias entre as réplicas das amostras. Os valores são demasiado díspares entre eles o que não nos permite tirar resultados conclusivos em relação à presença de metais. Existe a possibilidade, no entanto, de afirmar que, apesar destas discrepâncias, na sua maioria, os metais podem ser efetivamente detetados, apesar de não ser possível a sua quantificação. Ainda assim, sendo este um estudo preliminar, não podemos deixar de discutir e confrontar os valores. Deste modo procurou-se saber quais as concentrações limite de metais permitidas para produtos de saúde à base de plantas. Segundo a OMS, os limites de metais tóxicos nestes produtos medicinais estão presentes na Tabela 16.

Tabela 16: Limites de concentrações dos metais segundo a OMS.

	Concentrações (ppm)*
Arsénio	5
Chumbo	10
Cádmio	0,3
Crómio	2

*Fonte: (WHO, 2007)

Ao comparar as tabelas, os valores que mais se sobressaem são os do Pb, que, apesar da diferença entre as concentrações, é de concordar que ambas estão acima do limite descrito pela OMS para este tipo de produtos. Este estudo preliminar permite a abertura de questões que poderão ser respondidas com mais estudos a estas fórmulas de MTC.

HPLC-DAD-MS

Como já referido, a formulação em estudo contém várias plantas, as quais, por sua vez, possuem diversos constituintes principais específicos de cada uma. Embora o *sreening* inicial por TLC dos diferentes tipos de estruturas não ter sido conclusivo, procedeu-se com dois estudos por HPLC-DAD, pretendendo-se assim verificar que tipos de compostos estariam presentes a partir do seu espectro UV e espectrometria de massa.

Na Figura 21 e 22 está apresentado o cromatograma obtido para o Kang Ai Ling e respetivos espectros UV dos vários sinais.

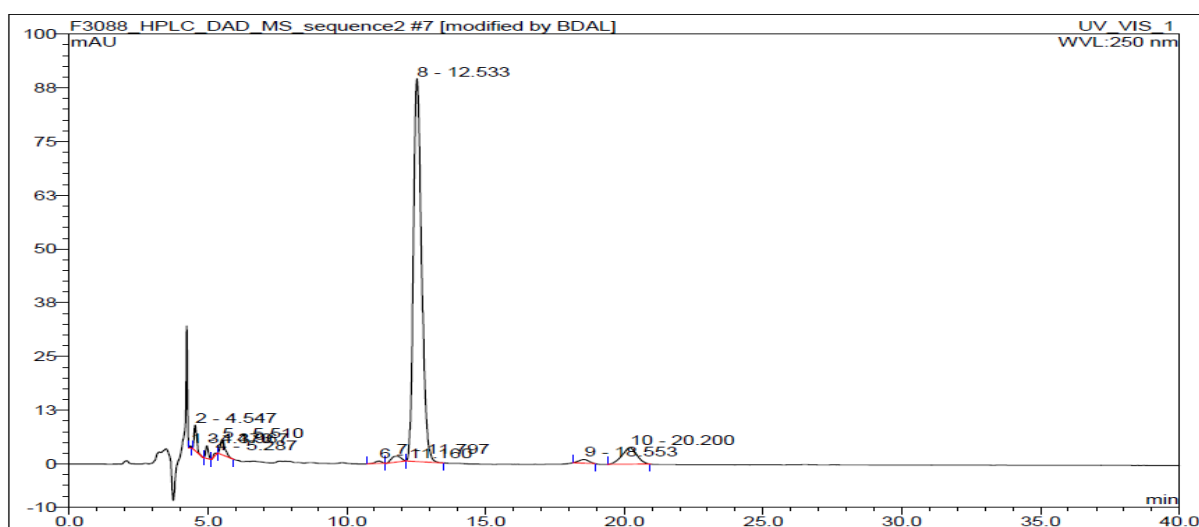


Figura 21: Cromatograma obtido para o Kang Ai Ling.

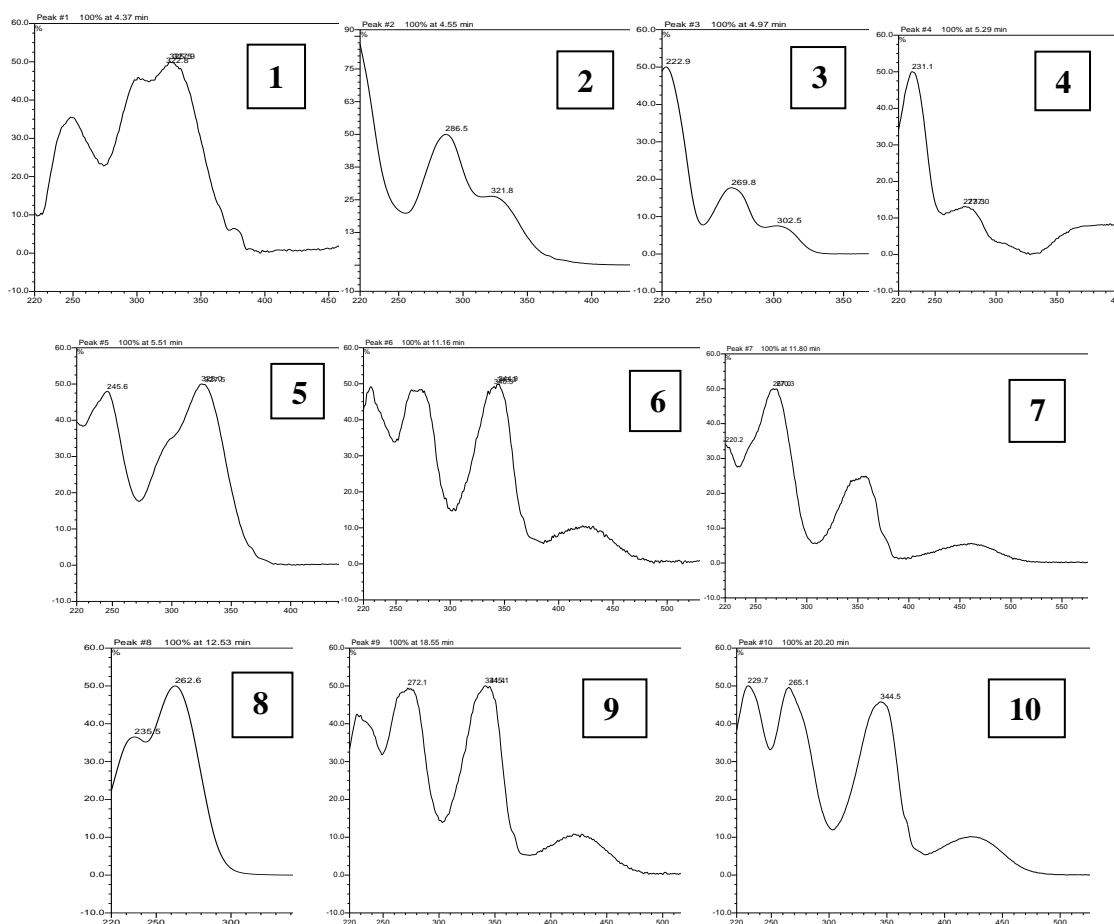


Figura 22: Espetros UV dos respectivos picos do cromatograma (250nm): 1 – RT: 4.37 λ_{\max} : 247, 300, 322nm; 2 – RT: 4.55 λ_{\max} : 287, 322nm; 3 – RT: 4.97 λ_{\max} : 223, 270, 303nm; 4 – RT: 5.29 λ_{\max} : 231, 277nm; 5 – RT: 5.51 λ_{\max} : 246, 297, 322nm; 6 – RT: 11.16 λ_{\max} : 225, 270, 340, 425nm; 7 – RT: 11.80 λ_{\max} : 270, 355, 460nm; 8 – RT: 12.53 λ_{\max} : 236, 263nm; 9 – RT: 18.55 λ_{\max} : 230, 272, 344, 425nm; 10 – RT: 20.20 λ_{\max} : 230, 272, 344, 425nm

É de notar que no cromatograma estão presentes 10 picos/sinais. A partir dos espectros UV/Vis de cada pico é possível observar que, maioritariamente, estão presentes ácidos fenólicos na composição, picos 1 e 5, sendo de notar que os picos 6, 9 e 10 têm espectros semelhantes ao da berberina.

Foi ainda feito outro estudo por HPLC-DAD indicado para a deteção de flavonoides e ácidos fenólicos. Os resultados estão presentes na Figura 23 e 24.

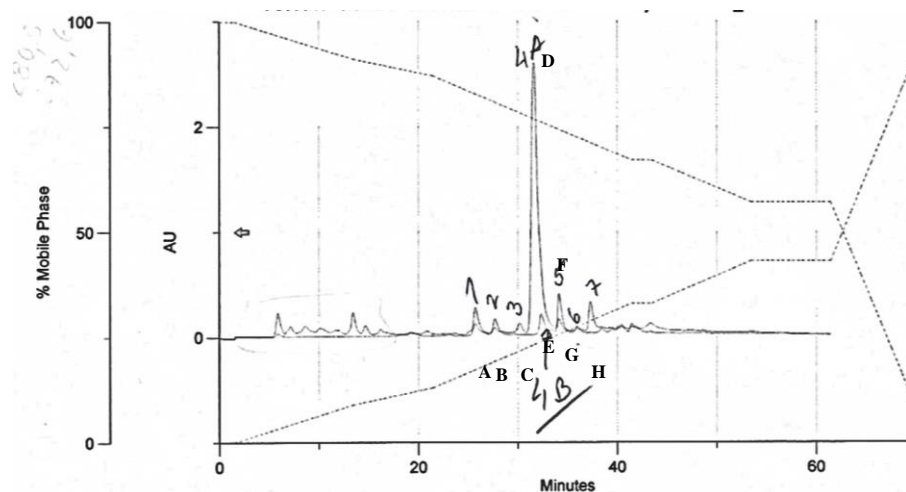


Figura 23: Cromatograma obtido para o F3088.

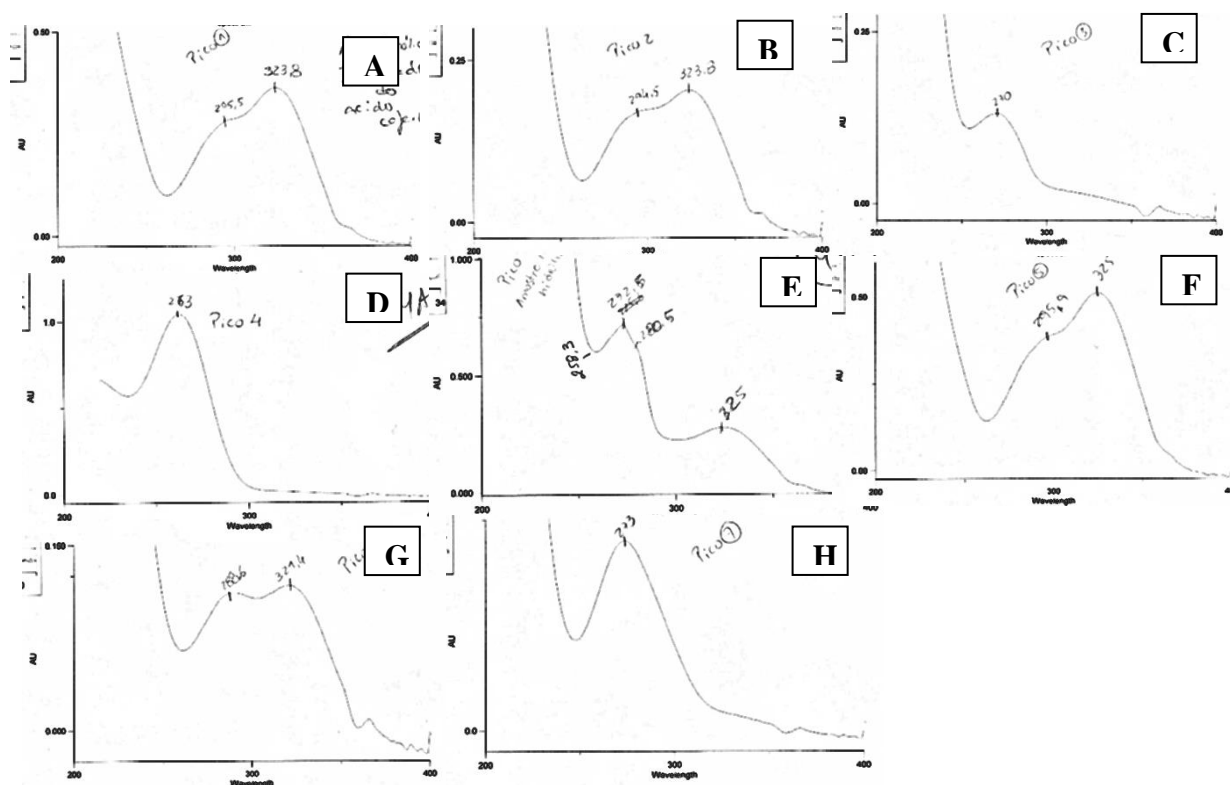
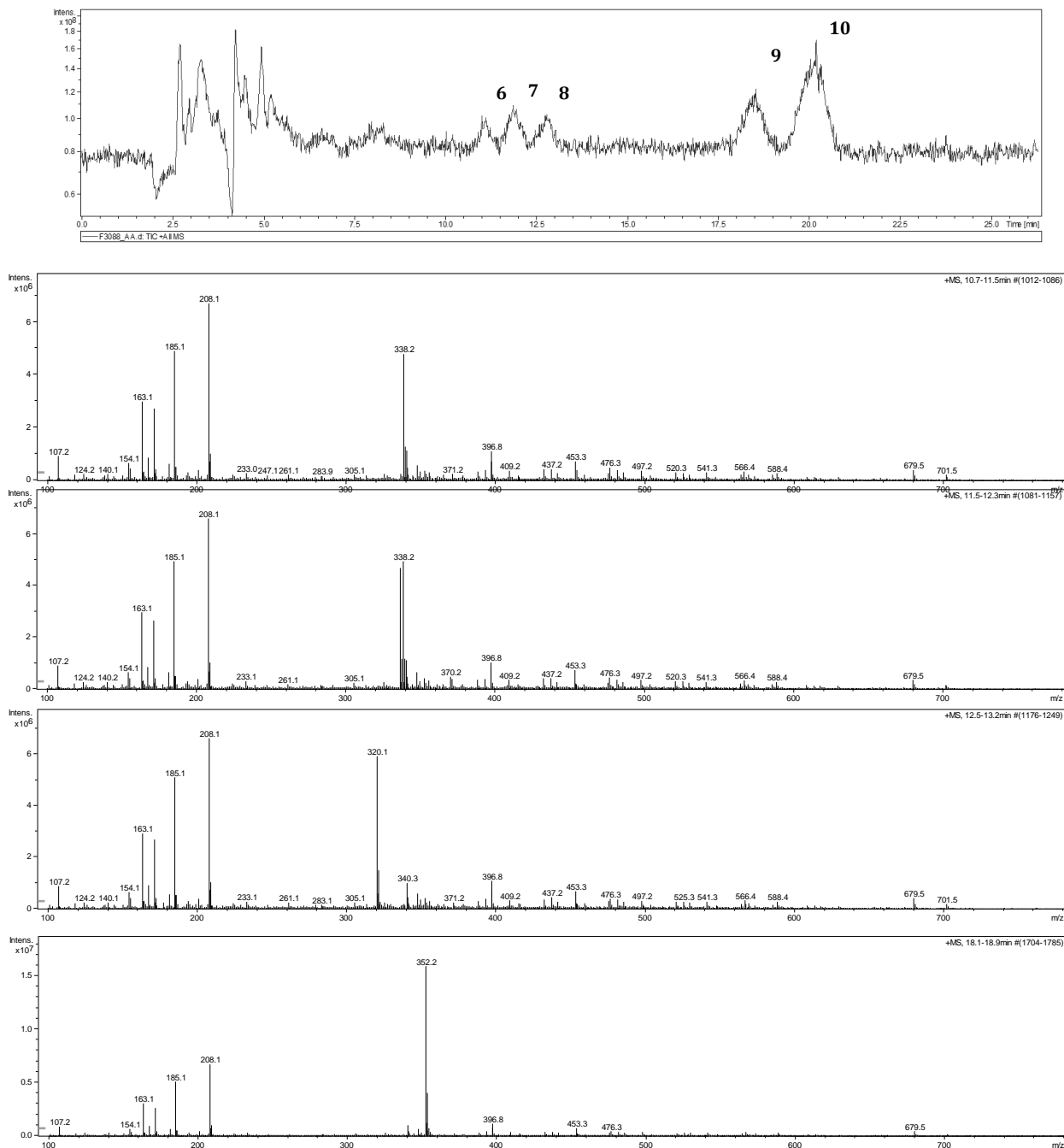


Figura 24: Espectros UV dos respectivos picos do cromatograma: A - RT: 25.71 λ max: 296, 324nm; B - RT: 27.68 λ max: 295, 324nm; C - RT: 30.18 λ max: 270nm; D - RT: 31.31 λ max: 263nm; E - RT: 32.30 λ max: 273, 281, 325nm; F - RT: 34.12 λ max: 296, 325nm; G - RT: 35.94 λ max: 289, 321nm; H - RT: 37.30 λ max: 273nm.

Ao observar os espectros dos picos do segundo cromatograma, também estão presentes maioritariamente ácidos fenólicos, picos A, B F e G, não sendo detetados flavonoides.

No entanto, retornando aos espectros dos picos do primeiro cromatograma, os picos 6, 9 e 10, como já referido, despertam uma certa curiosidade pois assemelham-se ao espectro anteriormente apresentado para a berberina. Foi então feita um estudo por HPLC-MS ao composto e ao padrão de berberina de modo a confirmar se efetivamente existiria berberina no composto. Os resultados estão dispostos na Figura 25 e 26.



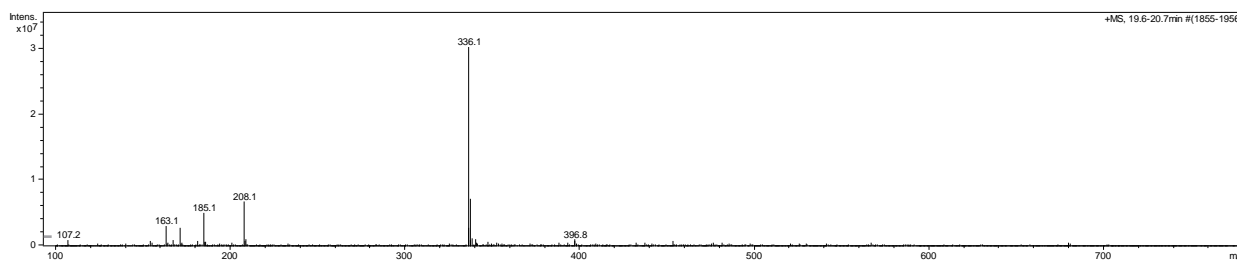


Figura 25: Espectros de Massa para o composto F3088.

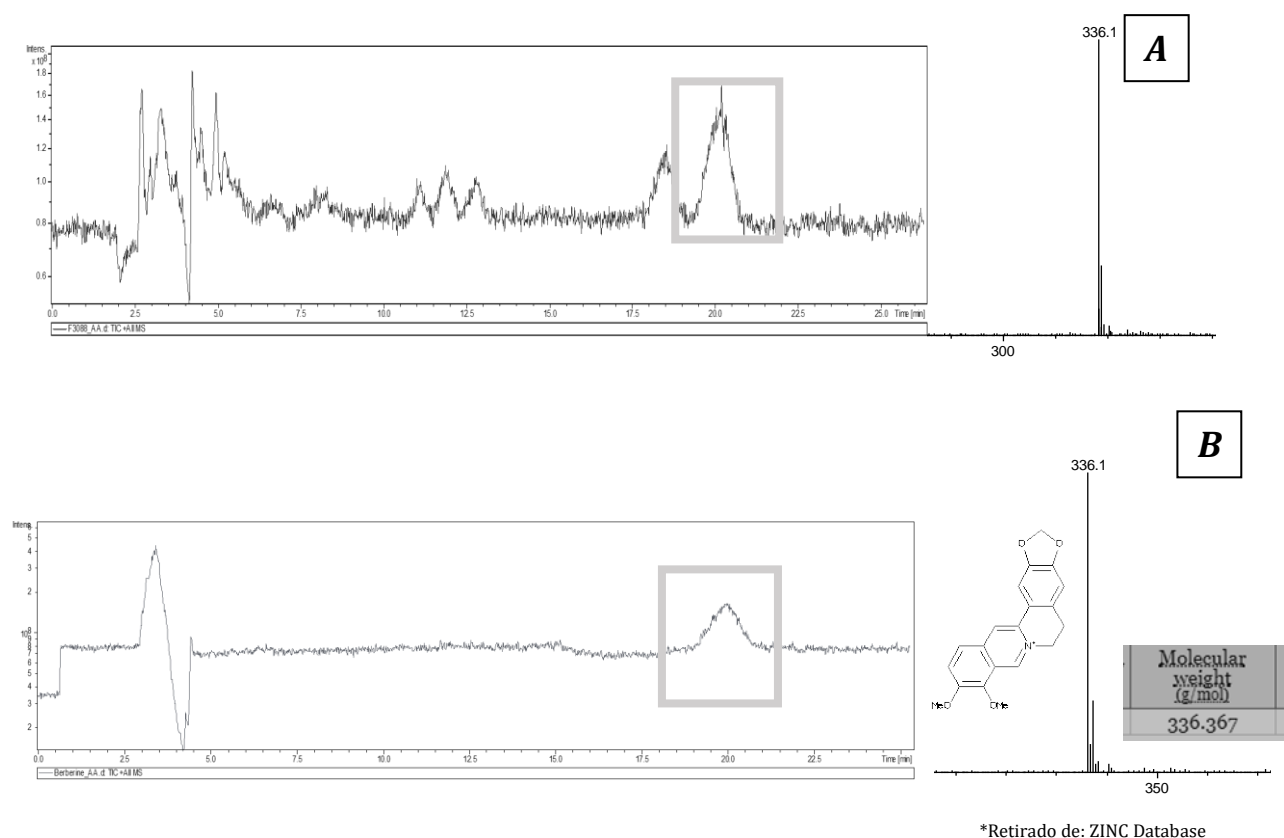


Figura 26: Espectro de massa para a Berberina e respetiva estrutura e massa molecular*.

A partir da espectrometria de massa foi então possível confirmar que o pico 10 corresponde à berberina sendo os picos 6 e 9 derivados da mesma.

De modo a quantificar a berberina presente foi efetuada uma curva de calibração, presente na Figura 27. Para tal foi preparado um padrão de berberina com uma concentração inicial de 0,1mg/ml. Para tal foram preparados cinco padrões a partir da solução mãe de 0,1mg/ml, 10; 7,5; 5; 3; 1 µg/ml.

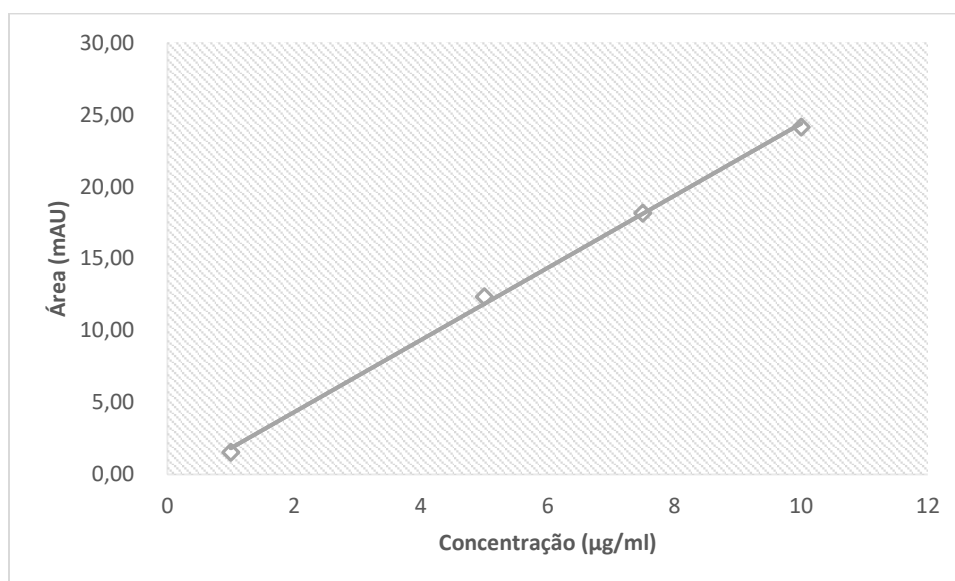


Figura 27: Reta de Calibração para a Berberina.

Após traçada a reta de calibração a equação originada foi:

$$y = 2,506x - 0,6808 \quad R^2 = 0,9986$$

A amostra analisada correspondeu à solução terapêutica (2,5ml de amostra em 200ml de água). Os valores das áreas extrapolados da reta permitiram calcular a concentração de berberina nessa mesma solução. Os resultados encontram-se descritos na Tabela 17.

Tabela 17: Áreas e Concentração de berberina para cada frasco de F3088.

Frasco	Área (mAU)	Concentração (µg/ml)
1	2,6	1,3
2	2,7	1,4
3	2,2	1,2
Média	-	1,3 ± 0,1

Sendo o valor de concentração obtido para a berberina na solução terapêutica, procedeu-se ao cálculo para saber a concentração da mesma num frasco de 50ml, cujo resultado foi de $3 \times 10^{-3}M$.

De acordo com (Coates *et al.*, 2005) a berberina em adultos é bem tolerada até 500mg. Acima disso efeitos adversos têm sido reportados. Uma *overdose* de berberina pode resultar em efeitos depressores do sistema nervoso central, incluindo parálise. Neste caso, por 2,5ml de extrato, existe uma massa de 0,26mg de berberina, o que, de acordo com o descrito

anteriormente é um valor bastante inferior a 500mg, estando, portanto, dentro da dose recomendada para um adulto.

Conforme foi indicado na Introdução, as diversas plantas que integram esta formulação possuem diversos compostos na sua constituição. Porém, os compostos estudados não foram encontrados pelos métodos desenvolvidos para os detetar e identificar. 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 dispor dos padrões e substância vegetal de referência não havendo possibilidade de fazer uma comparação direta.

4. Viabilidade

HCC1806 - MTT

De um modo geral, verificou-se que a linha celular humana de cancro da mama triplo negativo HCC1806 apresentou uma redução da atividade metabólica que foi dependente da concentração de Kang Ai Ling a que foi exposta.

Na Figura 28 está representada a atividade metabólica das células HCC1806 após o tratamento com diferentes concentrações, de 400 a 0,012%, de Kang Ai Ling durante 24, 48 e 72 horas, resultados com os quais foi possível construir curvas dose-resposta.

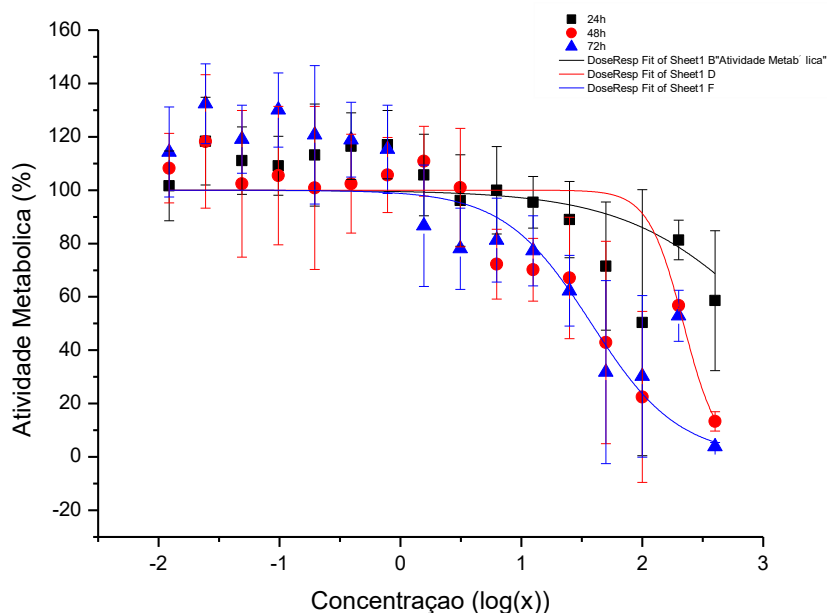


Figura 28: Curvas de dose-resposta da linha celular HCC1806 após tratamento durante 24, 48 e 72 horas com F3088. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de 14 ensaios.

A partir da curva dose-resposta foi possível calcular os valores de IC_{50} assim como os respectivos intervalos de confiança a 95%. Para as 24h o valor de IC_{50} foi superior à concentração estudada ($>400\%$), após 48h de incubação obteve-se o valor de IC_{50} de 219% [208%; 230%], às 72h de incubação, o valor de IC_{50} foi mais baixo, 38% [15%; 97%]. Verificou-se que o IC_{50} obtido após 48h de incubação é significativamente superior ao obtido após 72h ($p < 0,01$), no entanto não se verificaram diferenças significativas na atividade metabólica entre os restantes tempos de incubação.

É ainda de notar que, para esta linha celular, a concentração de 100% (correspondente à posologia indicada para este extrato), o produto teve um efeito superior após 72h de exposição.

HCC1806 - SRB

Na Figura 29 está representado o conteúdo proteico em função da concentração de Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

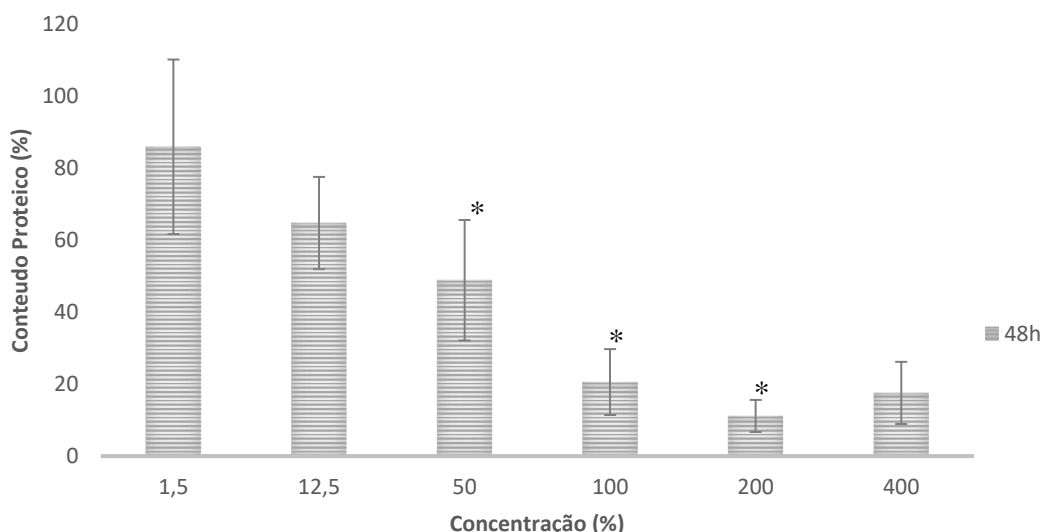


Figura 29: Conteúdo proteico em função da concentração para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

Por comparação com as células dos controlos verificou-se que existe menor conteúdo proteico nos poços das células colocadas em contacto com concentrações superiores de Kang Ai Ling, o que significa uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração.

Para as concentrações de 50, 100 e 200%, a viabilidade das células tratadas com F3088 correspondeu a 49 ± 17 , 21 ± 9 e 11 ± 4 , respetivamente. Verificou-se que a viabilidade obtida para a exposição à concentração de 50% foi significativamente superior à das concentrações de 100% ($p < 0,001$) e de 200% ($p > 0,001$), no entanto, não se verificaram diferenças significativas entre as concentrações de 100% e 200%.

HCC1806 - Berberina

Devido à presença de berberina na composição do Kang Ai Ling, foram feitos estudos celulares preliminares a este alcaloide.

Para esta análise foi considerada como 100% o valor da concentração de berberina presente no produto, calculado após os testes físico-químicos como sendo de $1,25 \mu\text{g/ml}$. A partir dessa concentração, foi selecionada uma concentração superior (200%), considerada a solução mãe, e um inferior (50%).

Na Figura 30 está representada a atividade metabólica em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

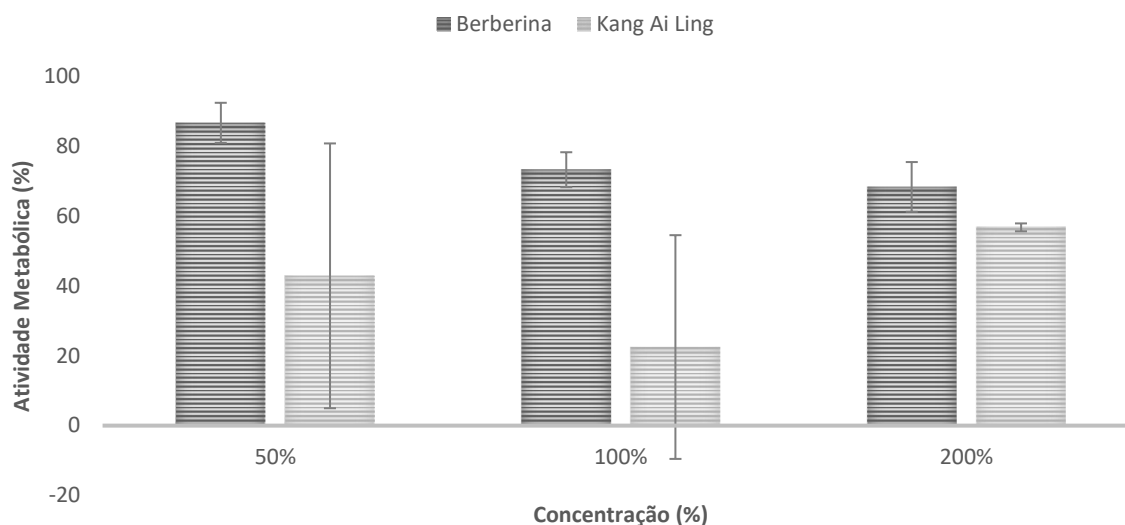


Figura 30: Atividade metabólica em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling.

Os ensaios realizados para avaliar a atividade metabólica celular com berberina foram comparados com os mesmos testes realizados para o Kang Ai Ling.

Para as 48h, o valor da atividade metabólica para as células tratadas com berberina e Kang Ai Ling para as concentrações de 50, 100 e 200% correspondem a 87±6, 73±5 e 68±7, e 43±38, 23±32 e 57±1, respetivamente. Verificou-se que para todas as concentrações o Kang Ai Ling teve um efeito significativamente superior à berberina, com 50% (p=0,02), 100% (p=0,001) e 200% (p=0,01).

Na Figura 31 está representada a viabilidade celular para a berberina e para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

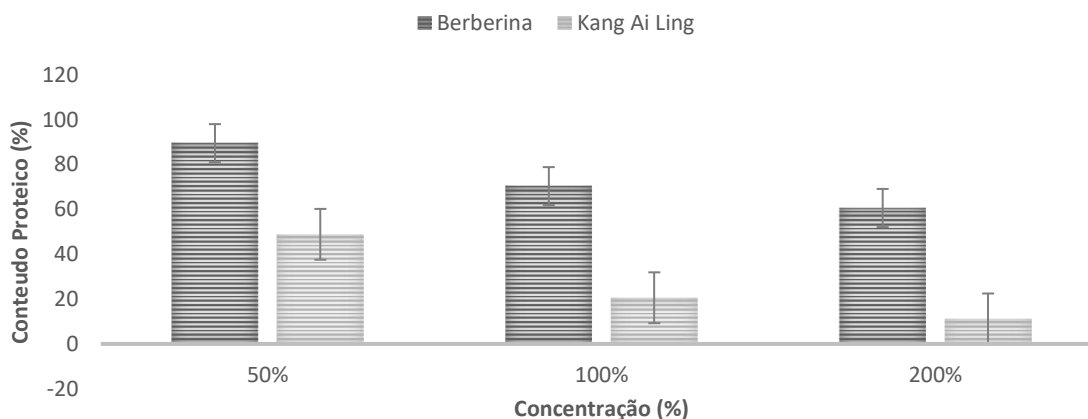


Figura 31: Conteúdo proteico em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling.

Para os estudos de viabilidade celular com a berberina procedeu-se do mesmo modo. Para as 48h, a viabilidade celular para as células tratadas com berberina e Kang Ai Ling para as concentrações de 50, 100 e 200% corresponde a 90 ± 22 , 70 ± 13 e 61 ± 20 e a 49 ± 17 , 21 ± 9 e 11 ± 4 , respetivamente. Verificou-se que para todas as concentrações o produto à base de plantas teve um efeito significativamente superior à berberina, com 50% ($p=0,002$), 100% ($p<0,001$) e 200% ($p=0,001$).

MCF7 - MTT

De um modo geral, tal como acontece na linha celular HCC1806, verificou-se que a linha celular humana de cancro da mama hormonodependente MCF7 apresentou uma redução da atividade metabólica que foi dependente da concentração de Kang Ai Ling a que foi exposta.

Na Figura 32 está representada a atividade metabólica das células HCC1806 após o tratamento com diferentes concentrações, de 400 a 0,012%, de Kang Ai Ling durante 24, 48 e 72 horas, resultados com os quais foi possível construir curvas dose-resposta.

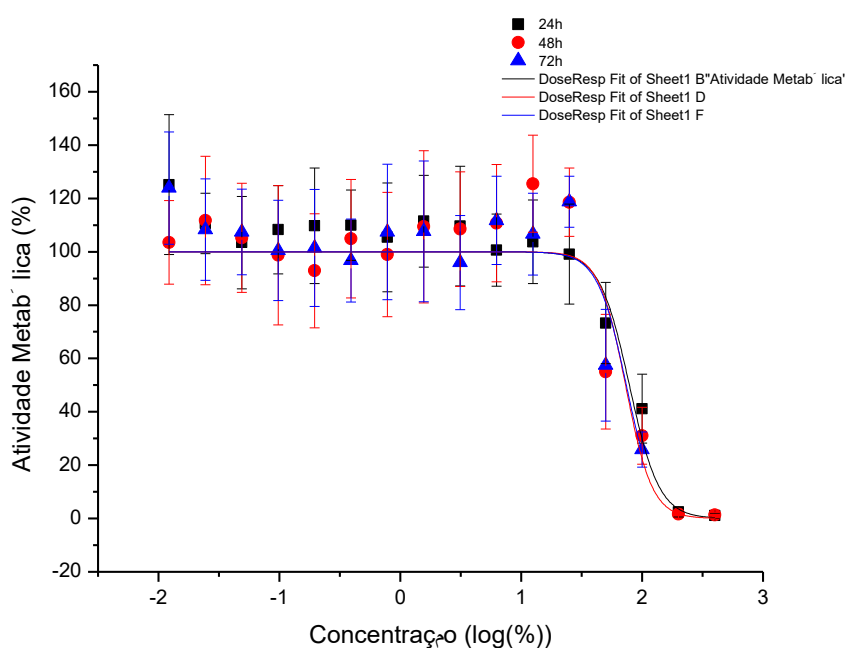


Figura 32: Curvas de dose-resposta da linha celular MCF7 após tratamento durante 24, 48 e 72 horas com F3088. Os resultados apresentados correspondem à média e ao desvio padrão de 14 ensaios.

A partir da curva dose-resposta foi possível calcular os valores de IC_{50} assim como os respetivos intervalos de confiança a 95%. Para as 24h o valor de IC_{50} foi de 78% [61%;101%], após 48h de incubação obteve-se o valor de IC_{50} de 73% [52%; 103%], às 72h de incubação, o valor de IC_{50} foi 74% [53%; 103%]. Não foram verificadas diferenças

significativas na atividade metabólica entre os diferentes tempos de incubação, ao contrário da linha celular HCC1806 em que foi notória uma dependência do tempo de incubação.

Verificou-se que a atividade metabólica das células expostas ao Kang Ai Ling, no caso da concentração de 50%, foi significativamente superior à da concentração de 200% ($p=0,004$).

MCF7 - SRB

Na Figura 33 está representado o conteúdo proteico em função da concentração de Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

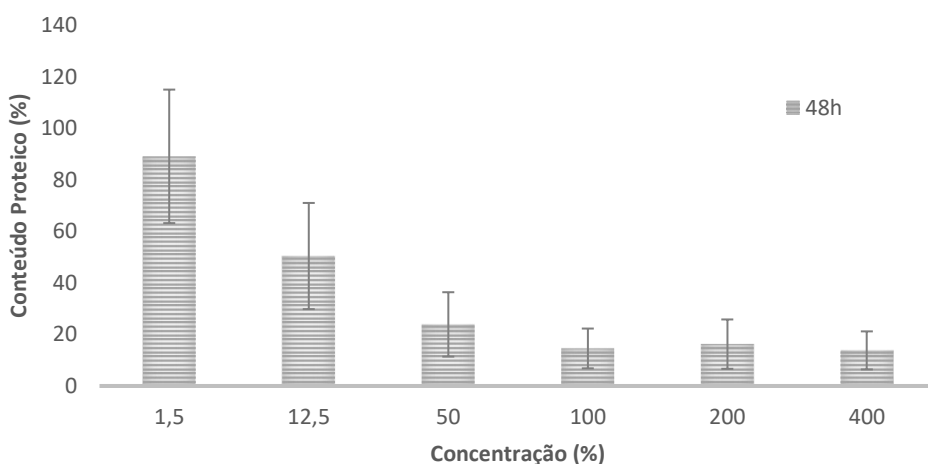


Figura 33: Conteúdo proteico em função da concentração para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

Por comparação com as células dos controlos verificou-se que existe menor conteúdo proteico nos poços das células colocadas em contacto com concentrações superiores de Kang Ai Ling, o que significa uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração.

Para as concentrações de 50, 100 e 200%, a viabilidade das células tratadas com Kang Ai Ling corresponde a 24 ± 12 , 15 ± 7 e 16 ± 10 , respetivamente. Não foram verificadas diferenças significativas na viabilidade entre as concentrações estudadas.

MCF7 – Berberina

Na Figura 34 está representada a atividade metabólica em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

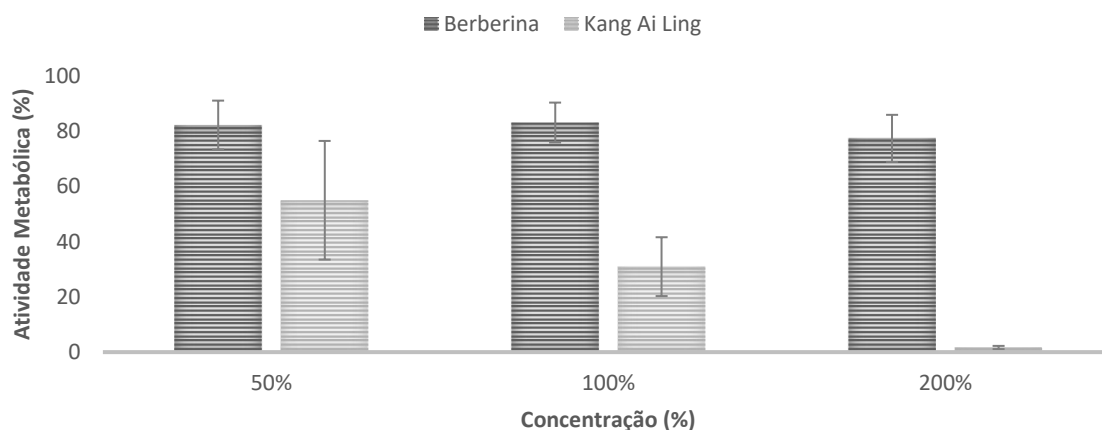


Figura 34: Atividade metabólica em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling.

Os ensaios realizados para avaliar a atividade metabólica celular com berberina foram comparados com os mesmos testes realizados para o Kang Ai Ling. Após 48h de exposição, o valor da atividade metabólica para as células tratadas com berberina e com Kang Ai Ling para as concentrações de 50, 100 e 200 correspondeu a 82±9, 83±7 e 77±9 e a 55±21, 31±11 e 2±1, respetivamente. Verificou-se que para todas as concentrações, o efeito das células expostas ao Kang Ai Ling foi significativamente superior à das expostas à berberina, com 50% ($p=0,006$), 100% ($p<0,001$) e 200% ($p=0,02$).

Na Figura 35 está representada a viabilidade celular para a berberina e para o Kang Ai Ling, após 48h de incubação.

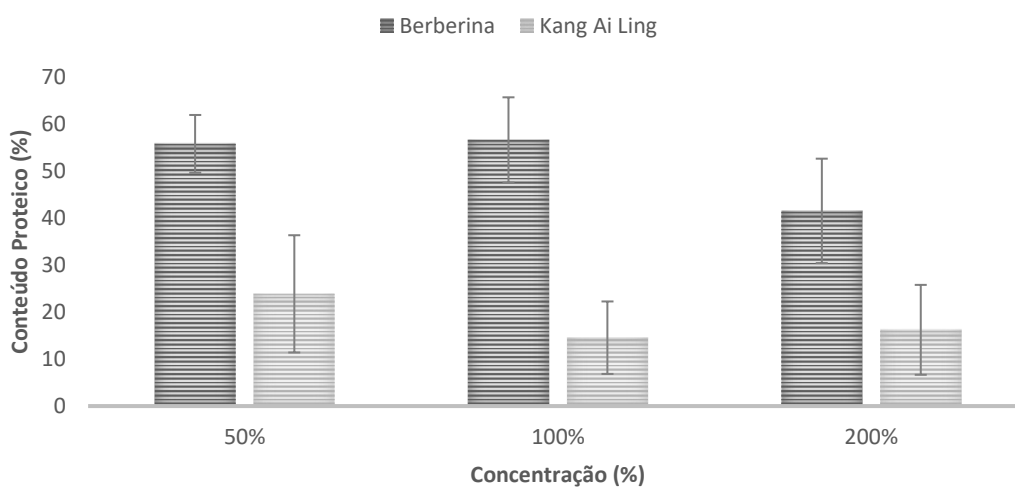


Figura 35: Conteúdo proteico em função da concentração para a berberina e para o Kang Ai Ling.

No que respeita à viabilidade celular, as células tratadas com berberina e com Kang Ai Ling para as concentrações de 50, 100 e 200% apresentaram um valor de 56 ± 6 , 57 ± 9 e 42 ± 11 e a 24 ± 12 , 15 ± 8 e 16 ± 10 , respetivamente. Verificou-se que para todas as concentrações o efeito nas culturas expostas ao Kang Ai Ling foi significativamente superior à das expostas à berberina, com 50% ($p<0,001$), 100% ($p<0,001$) e 200% ($p=0,001$).

MCF7 – HCC1806

Verificou-se que para as 48h, os efeitos citotóxicos na linha celular MCF7 foram significativamente superiores aos efeitos na linha celular HCC1806 ($p=0,00001$).

No caso do tratamento com a concentração de 50% de Kang Ai Ling verificou-se que o efeito na linha celular MCF7 foi significativamente superior ao efeito na linha celular HCC1806 ($p=0,001$).

V. Discussão

O uso de medicamentos à base de plantas e produtos relacionados continuam a assumir um aumento exponencial. As questões relacionadas às reações adversas têm vindo a tornar-se mais vívidas, aumentando a prevalência e deixando de ser discutidas devido a um equívoco prévio de considerar ou classificar os medicamentos à base de plantas como "seguros" porque são derivados de fontes "naturais". A realidade é que "segurança" e "natural" não são sinónimos (Ekor, 2014).

Os medicamentos à base de plantas podem muitas vezes resultar em riscos indiretos para a saúde quando atrasam ou substituem uma forma mais efetiva de tratamento convencional ou quando comprometem a eficácia de medicamentos convencionais. O que é indiscutível é que alguns dos constituintes de algumas das plantas apresentam bioatividade, de onde também pode decorrer toxicidade. 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.

A qualidade é o determinante crítico da segurança e eficácia dos medicamentos botânicos; no entanto, as preparações botânicas raramente atendem aos padrões de qualidade.

Como com outros medicamentos para uso humano, tornou-se obrigatório que os medicamentos à base de plantas estejam regulados para garantir que estejam em conformidade com os padrões de segurança, qualidade e eficácia exigidos (Ekor, 2014; Siow *et al.*, 2005; Smet, 1995).

Este estudo teve como foco a análise de uma fórmula de MTC, presente no mercado com a denominação de Kang Ai Ling. Esta formulação promete tratar o cancro com a constante toma do mesmo. Face ao exposto anteriormente, a análise destes compostos torna-se imprescindível e o que se pretende neste estudo é dar a conhecer a composição deste produto à base de plantas e justificar se é realmente eficaz. Para tal recorreu-se a análises por TLC, HPLC-DAD-MS, ICP-MS, UV/Vis e ainda estudos celulares.

Das análises efetuadas verificou-se que a maioria dos compostos na formulação eram polares, o que faz todo o sentido dado que estamos a analisar um preparado de várias plantas medicinais que foram extraídas por decocção.

Os estudos por HPLC-DAD permitiram uma visão geral do que poderia estar presente no composto. Dos compostos que supostamente passavam para a água apenas foi possível identificar a presença de quatro ácidos fenólicos, sendo que dois poderão corresponder ao ácido ferrúlico e ao rosmanírico. Ainda por HPLC-DAD foi possível detetar a presença de

berberina e os seus derivados ao comparar os espectros UV/Vis resultantes com os efetuados anteriormente no espectrómetro de UV/Vis. A partir dessa informação foi efetuada uma análise por espectrometria de massa que revelou confirmativamente a presença de berberina na composição. A quantificação da berberina permitiu conhecer a sua toxicidade. Segundo a posologia da formulação (2,5ml diluídas em água), um adulto consome em média 0,26mg de berberina, o que, comparando com a bibliografia (Coates *et al.*, 2005), não é um valor preocupante, pois a berberina é um composto bastante tolerado pelo ser humano.

Ficou ainda por determinar o composto maioritário que não corresponde a nada que possivelmente pertença às plantas, dada à sua quantidade tão elevada, ao seu espectro ultravioleta e ao seu peso molecular.

A contaminação ou adulteração de produtos de MTC com metais pesados, como chumbo, mercúrio, cádmio, arsénio ou tálio é motivo de preocupação. O mau controlo de qualidade desses produtos causa riscos para a saúde, pois podem apresentar concentrações inusitadamente altas de ingredientes potentes e venenosos que podem levar à fatalidade se consumidos (Chan, 2003). Numerosos são os relatos publicados de casos de envenenamento por metais pesados associados ao uso de produtos chineses à base de plantas. O chumbo mostrou ser o metal mais frequentemente presente nestes produtos (Au *et al.*, 2000; Wong, Tan e Wee, 1993), sendo que o mercúrio, o cádmio, o arsénio, o cobre e o tálio foram também encontrados (Wong *et al.*, 1993).

Posto isto, surgiu o interesse em fazer um estudo, ainda que preliminar à presença de metais na formulação. Os estudos não foram conclusivos, mas permitiram deixar a dúvida para estudos futuros no que se trata da presença de chumbo em valores superiores aos descritos pela OMS.

O cancro é a segunda principal causa de morte em todo o mundo. Cirurgia, quimioterapia e radioterapia são os principais tratamentos para esta doença, sendo muitas vezes complementado por outras terapias complementares e alternativas. Embora a quimioterapia seja um dos métodos mais extensamente estudados em terapias anticancerígenas, a sua eficácia e segurança continuam uma preocupação primária, pois a toxicidade e outros efeitos colaterais são graves (Tan *et al.*, 2011).

Nos últimos anos, verificou-se que uma série de produtos naturais isolados de plantas chinesas inibem a proliferação, induzem apoptose, reprimem a angiogénese e retardam a

metástase, exibindo potencial anticancerígeno tanto *in vitro* como *in vivo* ainda que com controvérsias associadas (Tan *et al.*, 2011).

Posto isto, foi objetivo do presente estudo a avaliação da resposta citotóxica de um produto à base de plantas, denominado Kang Ai Ling, nas linhas celulares humanas tumorais da mama MCF7 e HCC1806.

A avaliação da citotoxicidade através do ensaio de MTT é possível pois apenas as células metabolicamente ativas conseguem reduzir os sais de tetrazólio que se formam. O princípio do ensaio é que para a maioria das células viáveis a atividade mitocondrial é constante e, conseqüentemente, um aumento ou diminuição do número de células viáveis está linearmente relacionada com a atividade mitocondrial. A atividade mitocondrial das células é refletida pela conversão do sal de tetrazólio MTT em cristais de formazano (Serambeque, 2015).

Os estudos de citotoxicidade realizados com a linha celular HCC1806 revelaram o efeito citotóxico do Kang Ai Ling. Através destes estudos verificou-se que a linha celular humana de cancro da mama triplo negativo HCC1806 apresentou uma redução da atividade metabólica que foi dependente da concentração de Kang Ai Ling a que foi exposta.

Os resultados obtidos através desta técnica permitiram ainda calcular, através de curvas dose-resposta, a concentração correspondente ao valor do IC₅₀ do fitoterapêutico. Os valores de IC₅₀ do Kang Ai Ling obtidos foram de >400%, 219% e 38%, sendo que o produto teve um efeito superior após 72h de exposição.

A técnica de SRB é usada em estudos de proliferação celular. O corante liga-se a aminoácidos básicos de proteínas celulares e a avaliação colorimétrica fornece uma estimativa da massa total de proteína que está relacionada com o número de células (Serambeque, 2015).

Os estudos de viabilidade realizados à linha celular HCC1806 com o Kang Ai Ling comprovou-se que o conteúdo proteico nos poços das células colocadas em contacto com concentrações superiores de Kang Ai Ling foi baixo, significando uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração.

Os estudos de citotoxicidade realizados com a linha celular MCF7 revelaram o efeito citotóxico do Kang Ai Ling. Através destes estudos verificou-se que a linha celular humana hormonodependente de cancro da mama MCF7 apresentou, à semelhança do que acontece

na linha celular HCC1806, uma redução da atividade metabólica que foi dependente da concentração de Kang Ai Ling a que foi exposta.

Em estudos anteriores, (Li, X. K. *et al.*, 2000) avaliaram a inibição do crescimento celular por Huang Lian, uma das plantas presentes na composição em estudo, na linha celular MCF7. Os resultados revelaram que o Huang Lian induziu uma inibição, dependente do tempo e dose, do crescimento celular. (Hu *et al.*, 2002) fizeram um estudo semelhante no qual avaliaram a inibição do crescimento celular por *Ganoderma lucidum*, na linha celular MCF7. Os resultados foram semelhantes e demonstraram que o extrato de alcoólico de *Ganoderma lucidum* inibiu a proliferação de células MCF7 de maneira dependente da dose e do tempo.

Os resultados obtidos através desta do teste de MTT permitiram ainda calcular, através de curvas dose-resposta, a concentração correspondente ao valor do IC₅₀ do fitoterapêutico. Os valores de IC₅₀ do Kang Ai Ling obtidos foram de 78%, 73% e 74%.

Os estudos de viabilidade realizados à linha celular MCF7 com o Kang Ai Ling comprovou-se que o conteúdo proteico nos poços das células colocadas em contacto com concentrações superiores de Kang Ai Ling foi baixo, significando uma diminuição da viabilidade celular dependente da concentração, tal como acontece na linha celular HCC1806.

A berberina é um alcaloide com diversas atividades farmacológicas e é especialmente usado no tratamento gastrointestinal, antibacteriano e anti-inflamatório na China. Foram ainda documentados efeitos anti proliferativos nas células cancerosas tratadas com berberina (Tan *et al.*, 2011).

Sendo a berberina um dos componentes presentes na formulação em estudo, foram realizados estudos de citotoxicidade com ambas as linhas celulares de modo a revelar o efeito citotóxico da berberina.

Estudos anteriores (Patil, Kim e Jayaprakasha, 2010), (Kim *et al.*, 2008) revelaram que a berberina pode ser um potencial agente quimioterapêutico ou quimiopreventivo com base na sua capacidade de induzir a apoptose em células cancerosas com toxicidade relativamente baixa para as células normais. No entanto estudos adicionais com ensaios clínicos e *in vivo* devem ser conduzidos para estabelecer a berberina como um agente seguro para o tratamento do cancro.

Apesar dos positivos resultados dos estudos anteriores, nesta investigação, verificou-se que para as linhas celulares em estudo o efeito terapêutico da berberina, componente integrante do Kang Ai Ling, por si só não é tão eficaz quanto o próprio fitoterapêutico.

VI. Conclusões

De um modo geral, a formulação Kang Ai Ling, apresentou, a partir dos testes físico-químicos, ser constituído maioritariamente por ácidos fenólicos e alcaloides ficando ainda um dos compostos por identificar que não correspondeu a nada que possivelmente pertença às plantas, dada à sua quantidade tão elevada, ao seu espectro ultravioleta e ao seu peso molecular. Um dos alcaloides detetados (sendo os restantes derivados), foi a berberina, alcaloide dotado de toxicidade reconhecida. A sua quantificação revelou que a concentração de berberina consumida não é um valor alarmante, não causando toxicidade ao tomar Kang Ai Ling.

Foi testada também a presença de metais tóxicos por ICP-MS. Os resultados foram inconclusivos padecendo de estudos mais aprofundados, devido à possível presença de chumbo em concentrações acima dos valores padrão apresentados pela OMS.

No contexto dos estudos de citotoxicidade, demonstrou-se que ambas as linhas celulares revelaram maior sensibilidade quando expostas a concentrações superiores à posologia indicada para o Kang Ai Ling. Quanto a concentrações inferiores não foram observados efeitos tóxicos nem efeitos proliferativos, sendo que apenas se pode concluir que este produto não tem qualquer efeito no processo tumoral.

Ainda ao estudar os efeitos citotóxicos da berberina nas linhas celulares, os resultados revelam-se desconcordantes com a bibliografia. No contexto deste trabalho, a berberina não demonstrou ter um efeito anticancerígeno superior, quando comparado com o próprio composto em estudo.

É de notar que este estudo foi feito apenas com exposição celular apenas ao composto, não tendo em conta possíveis exposições a fármacos que poderiam alterar a sua função no corpo humano.

Este estudo permitiu iniciar a exploração de mais um produto utilizado em MTC que nunca tinha sido testado e sobre o qual não existe qualquer tipo de informação. No entanto os resultados obtidos são promissores e encorajam a continuação desta investigação.

VII. Referências Bibliográficas

ABRANTES, M. I. G. Da C. - Eficácia e Segurança de Suplementos Vegetais no Controlo de Peso e Massa Muscular. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz., 2014.

ABRAÚL, E.; RAIMUNDO, D.; FRUTUOSO, C. - Tratamento Médico do Cancro da Mama. Manual de Ginecologia - Volume II. Lisboa : Permanyer Portugal, 2011. ISBN 978-972-733-260-1.

AGILENTTECHNOLOGIES - Basics of LC/MS. U.S.A.

AMERICAN BRAIN TUMOUR ASSOCIATION - Chemotherapy.

AU, A. M. *et al.* - Screening methods for drugs and heavy metals in Chinese Patent Medicines. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. ISSN 00074861 , 65(1), 112–119. doi: 10.1007/s001280000102.

BELL, S. - Encyclopedia Of Forensic Science. Facts On File, Inc, 2008. ISBN 978-0-8160-6799-2.

BENSKY, D.; CLAVEY, S.; STÖGER, E. - Materia Medica. Chinese Herbal Medicine (3rd. ed.) ISBN 978-0939616428.

BIRBAUM, K. A. - Capabilities and Limitations of Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry- Analyses on Engineered and Laser-generated Nanoparticles. Dissertação de Doutoramento. Universidade ETH Zurich, 2011.

CALAZANS, C. H.; CALAZANS, S. M. - Ciência Forense: das Origens à Ciência Forense Computacional[Consult. 2 dez. 2016]. Disponível em truzzi.com.br/blog/wp-content/uploads/2010/07/Monografia_CienciaForense.pdf.

CAMPOS, M. Da G.; COSTA, M. L.; FALCÃO, A. - Intervenção farmacêutica na determinação de interações planta-medicamento. Revista Ordem dos farmacêuticos-Boletim do CIM. , 103, 5–8.

CHAN, K. - Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines. Chemosphere. ISSN 00456535 , 52(9), 1361–1371. doi: 10.1016/S0045-6535(03)00471-5.

- CHILLEMI, S.; CHILLEMI, M. - The Complete Herbal Guide : A Natural Approach to Healing the Body.
- CHINESEHERBSHEALING - Eclipta Alba (Han Lian Cao) [Consult. 6 jan. 2017]. Disponível em <http://www.chineseherbshealing.com/eclipta-alba/>.
- CHOY, P. - O Cancro - Abordagem da Medicina Chinesa. Journal of Tradictonal Medicine. , (31), 3–13.
- COATES, P. M. *et al.* - Encyclopedia of Dietary Supplements. Marcel Dekker, 2005. (1º ed.) ISBN 0-8247-5503-0.
- COELHO, C. M. C. - Mulheres Com Cancro Da Mama Em Tratamento Com Quimioterapia : Contributos Para a Compreensão Da Qualidade De Vida. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, 2008.
- DOCKHAM, B. *et al.* - Frankly Speaking About Cancer: Treatments and Side Effects. [Em linha] (6º ed.) Disponível em <http://www.webmd.com/drugs/2/drug-148393/symbicort-inhl/details/list-sideeffects>. ISBN 888.793.9355.
- EKOR, M. - The growing use of herbal medicines: Issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. Frontiers in Pharmacology. ISSN 16642295 , 4(January), 1–10. doi: 10.3389/fphar.2013.00177.
- ESCOLA DE MEDICINA ORIENTAL E TERAPÊUTICAS - Fitoterapia Chinesa [Consult. 29 nov. 2016]. Disponível em http://www.medicinachinesapt.com/fitoterapia_chinesa.html.
- FALCATO, A. R. Q. - Suplementos alimentares: Consumo nacional estimado de vitaminas e minerais em 2012. Dissertação de Mestrado. Instituto Superior de Agronomia. Universidade de Lisboa., 2014.
- GERSON DE LEMOS DUARTE - O Papel da Ciência Forense na Investigação de Crimes de Homicídio. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2009.
- GLOBOCAN - GLOBOCAN - Breast Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 [Consult. 4 jun. 2017]. Disponível em http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.
- HU, H. *et al.* - Ganoderma lucidum extract induces cell cycle arrest and apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell. International Journal of Cancer. ISSN 0020-7136 , 102(3), 250–

253. doi: 10.1002/ijc.10707.

JIA, Q. - Traditional Chinese Medicine Could Make « Health for One » True. Disponível em <http://www.who.int/intellectualproperty/studies/Jia.pdf>.

KATHRYN, J. C.; SIREESHA V, G.; STANLEY, L. - Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. *Breast Dis.* ISSN 1558-1551 , 32, 35–48. doi: 10.3233/BD-2010-0307.Triple.

KIM, J. Bin *et al.* - Berberine Inhibits Growth of the Breast Cancer Cell Key words. *Planta Med.* , 74(1), 39–42. doi: 10.1055/s-2007-993779.

LARCO, J. E. De *et al.* - Progression and Enhancement of Metastatic Potential after Exposure of Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents *Advances in Brief Progression and Enhancement of Metastatic Potential after Exposure of Tumor Cells to Chemotherapeutic Agents 1.* *Cancer Research.* , 61, 2857–2861.

LI, X. *et al.* - Fructus Xanthii Attenuates Hepatic Steatosis in Rats Fed on High-Fat Diet. *PLoS ONE.* ISSN 19326203 , 8(4), 2–9. doi: 10.1371/journal.pone.0061499.

LI, X. K. *et al.* - Huanglian, A chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Molecular pharmacology.* ISSN 0026-895X , 58(6), 1287–1293.

LI; WEI, W. - *Chinese Materia Medica: Combinations and Applications.* Donna Publishing Ltd, 2002. ISBN 1901149021.

LIN, W. *et al.* - Spica prunellae promotes cancer cell apoptosis, inhibits cell proliferation and tumor angiogenesis in a mouse model of colorectal cancer via suppression of stat3 pathway. *BMC complementary and alternative medicine.* ISSN 1472-6882 , 13(1), 144. doi: 10.1186/1472-6882-13-144.

LIU, C.; TSENG, A.; YANG, S. - *Chinese Herbal Medicine - Modern Applications of Tradicional Formulas.* CRC Press, 2005. ISBN 0-8493-1568-9.

LOZANO, F. - *Basic Theories of Tradicional Chines Medicine.* Disponível em <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4614-5275-1>. ISBN 978-1-4614-5274-4

MANSO, M. M. - *Pesquisa de Compostos Tóxicos numa Formulação à Base de Plantas.* Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2012.

- MARTINHO, J. M. G. - Espectroscopia de Absorção no Ultravioleta e Visível. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. , 52(3), 44–46.
- MCPOLIN, O. - An Introduction to HPLC for Pharmaceutical Analysis. Mourne Training Services, 2009. ISBN 978-0-9561528-0-0.
- MDIDEA - Botanical Info and Medicinal Uses of Ecliptae Herba [Consult. 6 jan. 2017]. a). Disponível em <http://www.mdidea.com/products/new/new091.html>.
- MDIDEA - Botanical Info and Medicinal Uses of Prunella Vulgaris [Consult. 11 jan. 2017]. b). Disponível em www.mdidea.com/products/new/new039.html.
- MOREIRA, M.; GONÇALVES, R. - Medicina tradicional , complementar e alternativa no mundo. O processo de regulamentação em Portugal — o caso da Acupuntura. Instituto Português de Naturologia, 2011.
- NORTON, K. J. - Yi Yi Ren Health Benefits and Side Effects. Disponível em <http://kylenorton.healthblogs.org/2012/10/08/chinese-herbs-in-western-view-yi-yi-ren-semen-coicis-lachryma-jobi-health-benefits-and-side-effects/>.
- PAIS, T. A. - Drug Profiling : O caso da Heroína. Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2011.
- PATIL, J. B.; KIM, J.; JAYAPRAKASHA, G. K. - Berberine induces apoptosis in breast cancer cells (MCF-7) through mitochondrial-dependent pathway. European Journal of Pharmacology. ISSN 00142999 , 645(1–3), 70–78. doi: 10.1016/j.ejphar.2010.07.037.
- PATWARDHAN, B. *et al.* - Ayurveda and traditional Chinese medicine: A comparative overview. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. ISSN 1741427X , 2(4), 465–473. doi: 10.1093/ecam/neh140.
- PAULA, V. M. B. - Caraterização Química e Biológica do Própolis da « Serra de Bornes » por TLC. Dissertação de Mestrado. Instituto Plitécnico de Bragança, 2012.
- PEREIRA, P. Dos S. - Avaliação do Perfil de Referenciação dos Doentes com Neoplasia Oral para o Instituto Português de Oncologia do Porto no Ano de 2013. Dissertação de Mestado. Universidade Fernando Pessoa., 2015.
- PHILIPS, R. - Inductively Coupled Plasma- Mass Spectrometry (ICP-MS).

- PIMENTA, D. M. F. - Determinação de Catecolaminas e dos Metabolitos por HPLC com Detecção Eletroquímica. Dissertação de Mestrado. Instituto Politécnico de Tomar, 2013.
- PINA, F. - Espectrofluorimetria. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química. , 54(3), 88–91.
- RIBEIRO, J. I. - Carcinoma Da Mama : Estado-da-arte. Dissertação de Mestrado. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias., 2014.
- RIBEIRO, R. L. M. - A Escolha Entre Terapias Não Convencionais e Medicina Convencional: Uma Análise Sociológica das Motivações e Preferências dos Doentes. Universidade de Coimbra, 2010.
- SANTOS, G. De J. L. P. Dos - Desenvolvimento de uma nova estratégia terapêutica para cancro da mama , envolvendo a acção combinada de terapia génica e quimioterapia. .Dissertação de Mestrado. Universidade de Coimbra, 2013.
- SÃO PAULO, P. Do M. De - Caderno Temático da Medicina Tradicional Chinesa. Prefeitura do Municipio de São Paulo, 2002.
- SEBASTIANY, A. P. *et al.* - A utilização da ciência forense e da investigação criminal como estratégia didática na compreensão de conceitos científicos. Educacion Quimica. ISSN 0187893X , 24(1), 49–56. doi: 10.1016/S0187-893X(13)73195-1.
- SERAMBEQUE, B. - Avaliação da resposta citotóxica da combinação da terapia fotodinâmica com a doxorrubicina em osteossarcoma in vitro. Relatório de Estágio de Licenciatura. Instituto Politécnico de Coimbra., 2015.
- SERGEIRA, V. De J. - Controlo de Qualidade de Suplementos Alimentares Derivados de Plantas. Dissertação de Mestrado. Universidade Nova de Lisboa., 2009.
- SHEN-NONG - Herbal Glossary - Yi Yi Ren [Consult. 4 jan. 2017]. a]. Disponível em <http://www.shen-nong.com/eng/herbal/yiyiren.html>.
- SHEN-NONG - Herbal Glossary - Ju Hua [Consult. 4 jan. 2017]. b]. Disponível em <http://www.shen-nong.com/eng/herbal/juhua.html>.
- SHEN-NONG - Herbal Glossary - Bao Shao Yao [Consult. 12 jan. 2017]. Disponível em <http://www.shen-nong.com/eng/herbal/baishaoyao.html>.

SHI, L.; ZHANG, C. - Spirituality in Traditional Chinese Medicine. *Pastoral Psychology*. ISSN 00312789 , 61(5-6), 959-974. doi: 10.1007/s11089-012-0480-x.

SILVA, A. R. Da - Fundamentos da Medicina Tradicional Chinesa.

SLOW, Y. *et al.* - Emerging issues in traditional Chinese medicine. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. ISSN 1205-7541 , 83(4), 321-334. doi: 10.1139/y05-029.

SMET, P. A. De - Health risks of herbal remedies. *Drug Safety*. , 13, 1995.

SOARES, R. I. G. - Estudo da acção anti-tumoral do extracto de cipsosina, isolado de *Cynara cardunculus*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Biológica. Universidade do Algarve., 2008.

TAN, W. *et al.* - Anti-cancer natural products isolated from chinese medicinal herbs. *Chinese Medicine*. ISSN 1749-8546 , 6(1), 27. doi: 10.1186/1749-8546-6-27.

TORRES, L. De S. - Fundamentos da medicina tradicional chinesa: elementos para uma comparação com as bases filosóficas da medicina da antiguidade clássica. Dissertação de Mestrado. Universidade da Beira Interior, 2011.

WAN, F. - Herb Lore. (5th. ed.)

WHO - General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine World Health Organization. World Health Organization (WHO). ISSN 01678809 , 1, 1-71. doi: WHO/EDM/TRM/2000.1.

WHO, W. H. O. - WHO Guidelines for Assessing Quality of Herbal Medicines with Reference to Contaminants and Residues. ISBN 978-92-4-159444-8.

WHO, W. H. O. - WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data, 2013. (Vol. 1) ISBN 978-92-4-150609-0.

WHO REGIONAL PUBLICATIONS - Medicinal Plants in China. Medicinal Plants in China ISBN 9290611022.

WONG, M. K.; TAN, P.; WEE, Y. C. - Heavy metals in some Chinese herbal plants. *Biological Trace Element Research*. ISSN 01634984 , 36(2), 135-142. doi: 10.1007/BF02783172.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO monographs on selected medicinal plants Vol.1. Essential Medicines and Health Products Information Portal (Vol. 1) Disponível em

<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js2200e/>.ISBN 9241545178.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO monographs on selected medicinal plants Vol. 4. Essential Medicines and Health Products Information Portal A World Health Organization resource: WHO Press, 2009. (Vol. 4) Disponível em <http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js16713e/>.ISBN 978 92 4 154705 5.

WU, J.-N. - Chinese Materia Medica. Oxford University Press, 2005. ISBN 13-978-0-19-51417-0.

XIMENES, C. S. F. - Medicina Tradicional Chinesa: Fundamentos em Medicina Erval Chinesa e Formulação no Síndrome de Estagnação do Qi. Dissertação de Mestrado. Universidade do Porto, 2014.

YUAN, H. *et al.* - The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*. ISSN 14203049 , 21(5). doi: 10.3390/molecules21050559.

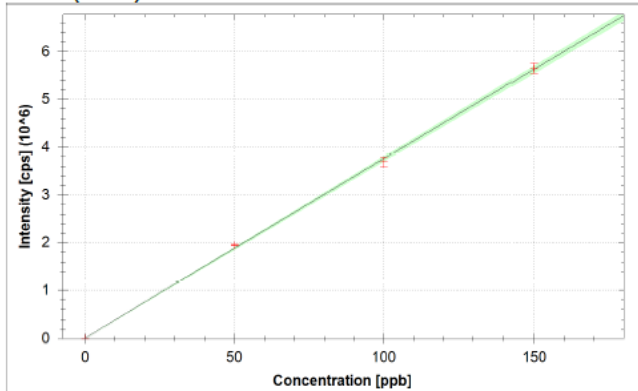
ZHENG, L. *et al.* - Spica Prunellae extract promotes mitochondrion-dependent apoptosis in human colon carcinoma cell line. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. ISSN 1996-0816 , 5(3), 327–335. doi: 10.5897/AJPP10.354.

ZHU, Y.-P. - Chinese Materia Medica: Chemistry, Pharmacology and Applications. Amsterdam: Harwood Academic Publishers. Florida : CRC Press, 1998. ISBN 90 5702 285 0.

VIII. Anexos

I. Curvas calibração metais;

52Cr (KED)

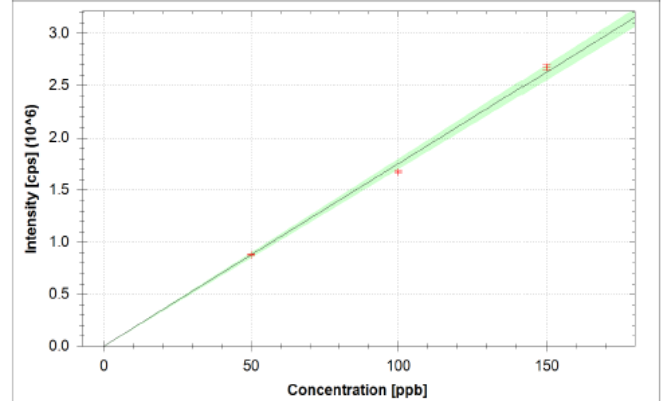


$$f(x) = 37456.3311 * x + 7920.5643$$

$$R^2 = 0.9994$$

BEC = 0.211 ppb
LoD = 0.0580 ppb

111Cd (KED)

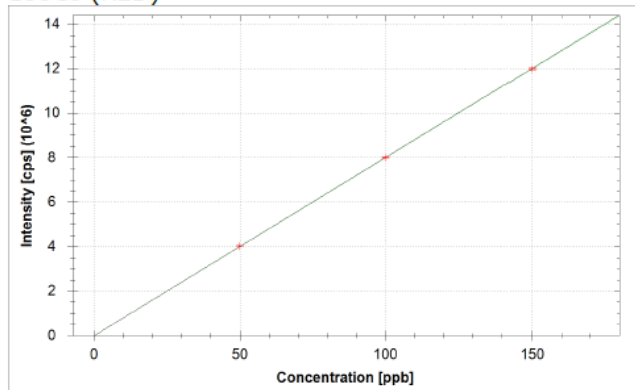


$$f(x) = 17499.2036 * x + 262.6705$$

$$R^2 = 0.9978$$

BEC = 0.015 ppb
LoD = 0.0040 ppb

133Cs (KED)

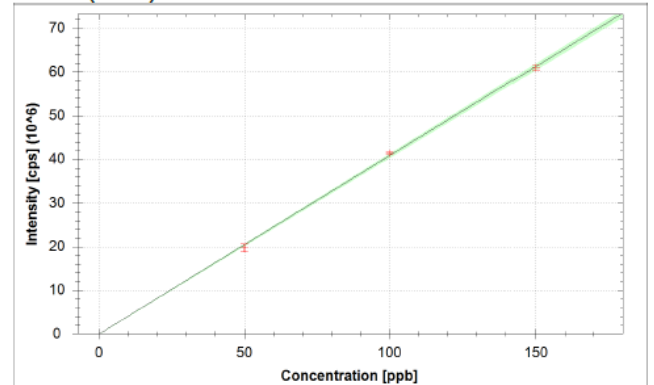


$$f(x) = 79973.9874 * x + 238.0032$$

$$R^2 = 1.0000$$

BEC = 0.003 ppb
LoD = 0.0003 ppb

205Tl (KED)

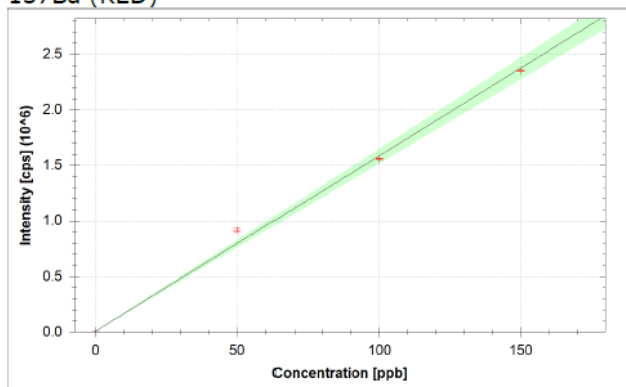


$$f(x) = 408071.4991 * x + 310.6719$$

$$R^2 = 0.9996$$

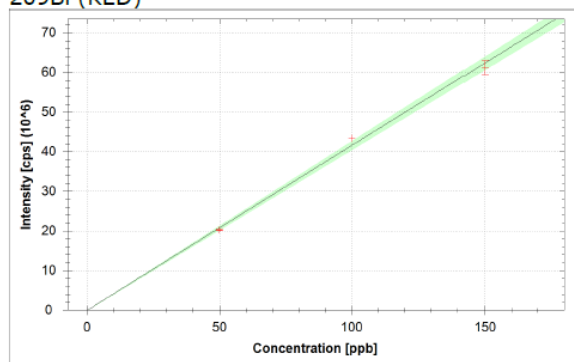
BEC = 0.001 ppb
LoD = 0.0001 ppb

137Ba (KED)



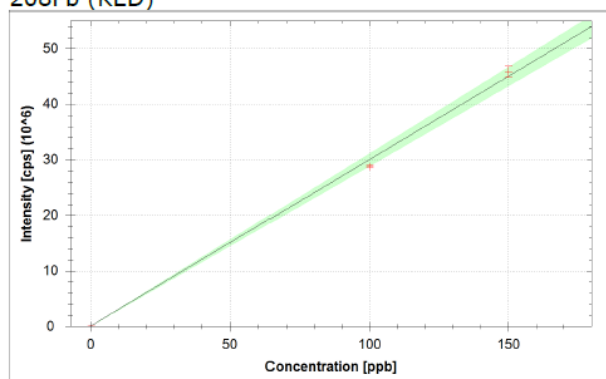
$f(x) = 15770.4928 * x + 7034.6819$
 $R^2 = 0.9946$
 BEC = 0.446 ppb
 LoD = 0.0483 ppb

209Bi (KED)



$f(x) = 415310.4854 * x + 2395.5739$
 $R^2 = 0.9978$
 BEC = 0.006 ppb
 LoD = 0.0009 ppb

208Pb (KED)



$f(x) = 299173.6645 * x + 135244.1739$
 $R^2 = 0.9978$
 BEC = 0.452 ppb
 LoD = 0.0091 ppb

Figura 36: Curvas de Calibração dos metais analisados por ICP-MS.