UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TAYANNE ANDRADE DOS SANTOS

Caracterização química e atividades biológicas in sílico de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.*

JEQUIÉ-BA

NOVEMBRO / 2020

TAYANNE ANDRADE DOS SANTOS

Caracterização química e atividades biológicas in sílico de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre(a) em Química.

Área de concentração: Química Analítica.
Orientador: Prof. Dr Erik Galvão Paranhos da Silva

JEQUIÉ- BA

NOVEMBRO / 2020

S237c Santos, Tayanne Andrade dos.
Caracterização química e atividades biológicas in sílico de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L.*, *Mikania glomerata S.* e *Rhodiola rósea L.*/ Tayanne Andrade dos Santos.- Jequié, 2020.
81f.

(Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva)

1.Cromatografia 2.Análise composicional 3.Triagem Virtual Inversa I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.

CDD – 544.926

Rafaella Câncio Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié

TERMO DE APROVAÇÃO

TAYANNE ANDRADE DOS SANTOS

Caracterização química e atividades biológicas in sílico de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L.*, *Mikania glomerata S.* e *Rhodiola rósea L.*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Química.

COMISSÃO EXAMINADORA

Erik Galvão Paranhos da Silva

Prof. Dr. Erik Galvão Paranhos da Silva
(Universidade Federal da Bahia, UFBA, 2009)
(Orientador)

Luana Novaes Santos

Profa. Dra. Luana Novaes Santos
(Universidade Federal de São Carlos, UFSCAR, 2012)

Djalma Menezes de Oliveira

Prof. Dr. Djalma Menezes de Oliveira
(Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG,2012)

Dissertação aprovada pelo Colegiado do Curso de Pós-graduação em Química em 20 / 11 / 2020

A Jesus pelo seu amor incondicional e por me ensinar a trilhar os caminhos que me levam até ele.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus que permitiu que tudo isso acontecesse, ao longo de minha vida, e não somente nestes anos, mas que em todos os momentos é o maior mestre que alguém pode conhecer.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia-Jequié.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Mestrado, o que contribuiu para a concretização desse trabalho.

Agradeço minha mãe, Analice Andrade da Silva, heroína que me ofertou apoio nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Obrigada a minha irmã que sempre esteve presente nos momentos mais difíceis.

A Laura Maria, minha sobrinha que veio para encher meu coração de alegria

A todos que direta o indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esqueletos de base a partir dos quais os compostos fenólicos de origem vegetal são derivados (30) 20
Figura 2. Estrutura básica dos ácidos fenólicos. A) ácido benzóico e B) ácido cinâmico (2) 21
Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides (2) 21
Figura 4. Estrutura do ácido gálico e do ácido elágico 22
Figura 5. Componentes básicos de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (45) 23
Figura 6. Folhas e frutos do Aesculus hippocastanum L. 25
Figura 7. Distribuição da família Asteraceae pelo mundo [33] 26
Figura 8. Folhas e frutos da Mikania glomerata S. 27
Figura 9. Estrutura química da cumarina. 27
Figura 10. Folhas e frutos do Rhodiola Rosea L. 28
Figura 11. Estruturas químicas do Kaempferol e da Quercetina (104) 42
Figura 12. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Aesculus hippocastanum L. em diferentes comprimentos de onda (nm): 260,272,280,310,330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção. 46
Figura 13. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Mikania glomerata S. em diferentes comprimentos de onda (nm): 330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção 48
Figura 14. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Mikania glomerata S. com comprimento de onda de 310 nm. 49
Figura 15. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no Rhodiola rosea L. em diferentes comprimentos de onda (nm):280,310,330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção. 51
Figura 16. Sobreposição dos picos dos cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no Aesculus hippocastanum L. e na Mikania glomerata S. 52
Figura 17. Os cromatogramas de substâncias fenólicas em diferentes comprimentos de onda (nm):260, 272,280; 310,330; 260 e 360 e seus respectivos tempos de retenção (RTmin) 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais do MIP OES 35
Tabela 2. Estruturas moleculares das substâncias identificadas nos fitoterápicos analisados 36
Tabela 3. Parâmetros para determinação de ácidos fenólicos e flavonóides por CLAE DAD 40
Tabela 4. Marcadores químicos analisados em diferentes comprimentos de onda .. 41
Tabela 5. Concentração de bioativos fenólicos em comprimidos de Rhodiola rosea .(RR), Aesculus hippocastanum L.(AH), e Mikania glomerata S. (MG) em mg kg $^{-1}$. 42
Tabela 6.Comparação das concentrações dos valores encontrados com os valores do material de referência certificado. 54
Tabela 7. Características analíticas para a determinação dos elementos químicos utilizando a técnica de MIP OES (Retirar) 54
Tabela 8. Concentração de Cr, Fe, P, Zn, Cd, nos fitoterápicos Rhodiola rósea L, Aesculus hippocastanum e Mikania glomerata S. 55
Tabela 9. Recomendação diária recomendada para adultos estabelecido pelo ministério de saúde na RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 e pelo FAO/WHO(1997) (133) (134). 55
Tabela 10. Quantidade de alvos moleculares no servidor ChemProt 2.0 58
Tabela 11. Atividades encontradas para os ligantes avaliados 58
Tabela 12. Toxicidade aguda em camundongos predita pelo GUSAR 62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BPF - Boa Práticas de Fabricação.

CG-MS - Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Gas chromatography coupled to mass spectrometry)

CLAE- Cromatografia líquida de alta eficiência (High performance liquid chromatography)

CLAE-DAD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (High performance liquid chromatography with diode array detector).

ESI-MS - Espectrometria de massas com ionização electrospray (Electrospray ionization mass spectrometry)

FAAS - Espectroscopia de absorção atômica com chama (Flame atomic absorption spectroscopy)

FT-IR - Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourie (Fourie transform infrared spectroscopy)

IC- Intervalo de confiança

ICP-OES - Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (Optical emission spectroscopy with inductively coupled plasma)

LC/TIS-MS - Liquid chromatography (LC)/turbo ion spray (TIS)-mass spectrometry (MS)

MIP OES - Espectrometria de emissão óptica com plasma induzido por microondas

OMS - Organização Mundial da Saúde

PIQ - Padrão de Identidade e Qualidade

UPLC - Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas

UV/VIS - Espectroscopia no ultravioleta visível

Caracterização química e atividades biológicas in sílico de medicamentos fitoterápicos a base de Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.

AUTOR: Tayanne Andrade dos Santos

ORIENTADOR: Prof. Dr Erik Galvão Paranhos da Silva

RESUMO

A preocupação com a saúde e com o bem-estar, aliada aos baixos índices de reações adversas e de toxicidade tem como efeito um aumento na procura e consumo de fitoterápicos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo o de realizar a caracterização química e a avaliação das atividades biológicas *in sílico* de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L*. (Castanha da Índia)*, Mikania glomerata S.* (Guaco) *e Rhodiola rósea L*. (Raiz do Ártico). A caracterização química foi realizada através da determinação de compostos fenólicos bioativos pelo CLAE DAD. A análise no CLAE DAD foi realizada a fim de se definir os perfis característicos da composição química de cada amostra. As amostras apresentaram perfis de compostos fenólicos bioativos encontrados diferentes, retratando as diferenças entre os metabólitos encontrados em cada fitoterápico. Foram encontrados para o *Aesculus hippocastanum L*. (ácido elágico, ácido ferúlico, ácido ρ-cumárico, ácido siringico, ácido t- cinâmico, ácido vanílico, quercetina e canferol), para o *Mikania glomerata S. (*ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e canferol) e para o *Rhodiola rosea L.* (ácido clorogênico,catequina ácido ρ-cumárico e canferol). Os tempos de retenção variaram entre 9,763 e 15,724 e todos os picos foram encontrados dentro dos parâmetros dos marcadores pré-estabelecidos. A predição de atividades *in sílico* foi feita através dos métodos de Triagem Virtual Inversa (TVI), utilizando o servidor ChemProt 2. 0.. A partir da predição de atividades *in silico* foram determinados vários alvos potenciais para cada substancia analisada, reforçando a importância desses estudos. Foi realizada ainda análises de toxicidade dos compostos fenólicos encontrados através do servidor GUSAR. As análises de toxicidade aguda demonstraram baixa toxicidade das substâncias analisadas, tendo a catequina o canferol os valores mais baixos de toxicidade dentre os compostos

analisados. Foi efetuada ainda a análise da composição mineral utilizando o MIP OES. Em relação a composição mineral destes fitoterápicos, a maior concentração encontrada foi a de fósforo (281,07 ± 0,12 µg g^{-1}) no *Rhodiola rosea L.* e a menor concentração foi de ferro (8,683±4,485 µg g^{-1}) quantificado na *Mikania glomerata S.* Desta maneira nota-se que os fitoterápicos constituem uma fonte diversificada de compostos com atividades químicas e biológicas variadas, pelo qual ao se conhecerem melhor suas funcionalidades e proteínas alvos podem-se melhorar a sua atuação no organismo e explorar toda a sua funcionalidade biológica.

Palavras-chave: Cromatografia. Análise composicional. Triagem Virtual Inversa.

Chemical characterization and biological activities in silico of herbal medicines based on Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. and Rhodiola rósea L.

AUTHOR: Tayanne Andrade dos Santos

ADVISOR: Prof. Dr Erik Galvão Paranhos da Silva

ABSTRACT

The concern with health and well-being, combined with the lack of time to maintain a healthy diet has the effect of increasing the demand and consumption of herbal medicines. Thus, the present work aimed to perform the chemical characterization and the evaluation of the biological activities *in sílico* of herbal medicines based on *Aesculus hippocastanum L*., *Mikania glomerata S. and Rhodiola rósea L*.. Chemical characterization was carried out through the determination of bioactive phenolic compounds by HPLC-DAD (High Performance Liquid Chromatography - Diodearray Detector). The analysis in the HPLC-DAD was carried out in order to define the characteristic profiles of the chemical composition of each sample. The samples presented profiles of different bioactive phenolic compounds found, portraying the differences between the metabolites found in each herbal medicine. Eellagic acid, ferulic acid, ρ-cumáric acid, syringic acid, cinnamic acid, vanylic acid, quercetin and canferol were found for *Aesculus hippocastanum L*.; for *Mikania glomerata S*., chlorogenic acid, caffeic acid, quercetin and canferol were found, and for *Rhodiola rosea L*., chlorogenic acid, catechin ρ-cumáric acid and canferol were found. The retention times varied between 9.763 and 15.724 and all peaks were found within the parameters of the pre-established markers. The prediction of activities in silico was made using the Inverse Virtual Screening (IVS) methods, using the ChemProt 2.0 server. Based on the prediction of in silico activities, several potential targets were determined for each substance analyzed, reinforcing the importance of these studies. Toxicity analyzes of the phenolic compounds found through the GUSAR server were also carried out. Acute toxicity analyzes showed low toxicity of the analyzed substances, with catechin and canferol having the lowest toxicity values among the analyzed compounds. The mineral composition analysis was also performed using the

MIP OES. Regarding the mineral composition of these herbal medicines, the highest concentration found was phosphorus (281.07 ± 0.12 µg g-1) in Rhodiola rosea L. and the lowest concentration was iron (8.683 ± 4.85 µg g-1) quantified in Mikania glomerata S.. Thus, it is noted that phytotherapics constitute a diversified source of compounds with varied chemical and biological activities, and by better knowing their functionalities and target proteins, it’s possible to improve their performance in the organism and explore all of their biological functionality.

Keywords: Chromatography. Compositional analysis. Inverse Virtual Screening.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO 18

2.1 Fitoterápicos 18

2.2 Controle de qualidade de plantas medicinais 19

2.3 Compostos fenólicos 20

2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE DAD) 23

2.5 Aesculus Hippocastanum L. 24

2.5.1 Fitoquímica 25

2.6 Mikania glomerata S. 26

2.6.1 Fitoquímica 27

2.7 Rhodiola Rosea L. 28

2.7.1 Fitoquímica 28

2.8 Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES) 29

2.9 Triagem Virtual Inversa 30

2.9.1 Método de similaridade 30

2.9.2 Predição de toxicidade aguda das moléculas 31

3 OBJETIVOS 32

3.1 Objetivo geral 32

3.2 Objetivos específicos 32

4 MATERIAIS E MÉTODOS 33

4.1 Amostras 33

4.2 Reagentes e padrões 33

4.2.1 CLAE DAD 33

4.2.2 MIP OES 33

4.3 Preparação do extrato para análise no CLAE DAD 34

4.4 Instrumentos e condições cromatográficas 34

4.5 Método de digestão 35
4.6 Triagem Virtual Inversa 36
4.6.1 Identificação dos alvos moleculares 36
4.6.2 Predição da toxicidade aguda das moléculas 39
5 RESULTADO E DISCUSSÃO 40
5.1 CLAE DAD 40
5.1.1 Desempenho analítico 40
5.1.2 Análises CLAE DAD 41
5.2 Quantificação de minerais 53
5.2.1 Desempenho analítico 53
5.2.2 Determinação da concentração de macro e microelementos nos fitoterápicos estudados 55
5.3 Triagem Virtual Inversa 57
5.4 GUSAR Antitarget/Toxicity Prediction 62
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 64
7 PERSPECTIVA 66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 67

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde a antiguidade para fins terapêuticos. Ao longo dos anos o uso e comercialização de fitoterápicos tem ganhado mais destaque devido ao seu baixo custo e toxicidade, deste modo as políticas públicas em relação ao controle de qualidade e a obtenção de critérios como segurança, eficácia e qualidade têm se intensificado (1).

A busca por estes produtos, vinculada com a necessidade de controle de qualidade mais rigorosos, expandiu as descobertas de algumas propriedades dos componentes produzidos pelas plantas através de seu metabolismo secundário. Dentre os metabólitos secundários podemos citar os compostos fenólicos, cujos estudos têm ganhado grande destaque. Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos no reúno vegetal, formado por um grupo de metabólitos secundários eles possuem propriedades que vão desde atividades anti-inflamatórias, antivirais e antibacterianas, até atividades antitumorais, além de possuírem propriedades antioxidantes (2) (3).

A classificação dos compostos fenólicos pode ser realizada através da diferenciação do número de carbono constituinte com a estrutura da base fenólica, desta forma eles podem ser distinguidos como ácidos fenólicos, cumarinas, flavonóides e taninos, amplamente distribuídos no reino vegetal, conferindo distintas propriedades terapêuticas (4).

Os fitoterápicos, *Aesculus hippocastanum L, Mikania glomerata S. e Rhodiola rosea L.* são conhecidos e utilizados no Brasil, sendo popularmente chamados de “castanha da índia”, “guaco” e “raiz do Ártico”. São utilizados primariamente para o tratamento da insuficiência venosa, doença no trato respiratório e demanda física e/ou mental excessiva (5) (6) (7).

Atualmente o monitoramento da qualidade das formas farmacêuticas orais tem ganhado grande repercussão e embora haja grandes quantidades de testes de qualidade para drogas sintéticas a sua utilização produtos em naturais ainda não é amplamente realizado. Dentre os métodos de análise que podem ser utilizados para a determinação de compostos fenólicos tem ganhado grande destaque o CLAE-DAD, principalmente por possuir alta resolução, seletividade e rapidez de análise (8) (9).

Os fitoterápicos em sua grande maioria são consumidos na forma oral, desta forma o estudo de sua composição mineral tem ganhado destaque, visto a importância de garantir o seu valor nutricional e seus efeitos benéficos a saúde (10) (11).

Desta forma, este estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente os fitoterápicos *Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.* a partir da determinação dos seus metabólitos secundários, utilizando o CLAE DAD. Com posse destes dados utilizou-se a Triagem Virtual Inversa para a predição *in sílico* de alvos biológicos. A predição *in sílico* também foi utilizada para determinar os valores de letalidade média (DL_{50}) dos compostos fenólicos encontrados. Foram avaliados também a composição mineral destes medicamentos empregando o MIP OES.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Fitoterápicos

A fitoterapia resulta do estudo de extratos naturais que podem ser utilizados para o tratamento ou prevenção de enfermidades, auxiliando assim o atendimento médico. O objeto do estudo da fitoterapia são os fitoterápicos, medicamentos extraídos exclusivamente de plantas medicinais. A preparação de medicamentos à base de plantas foi e vem sendo utilizadas por milhares de anos, constituindo-se a partir de uma única erva ou uma combinação de plantas, com o intuito de potencializar e/ou melhorar seu fim terapêutico (12) (13).

Os fitoterápicos foram oficialmente reconhecidos para fins de tratamento em 1958 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), recomendando além do seu uso, estudos referentes aos mesmos, a fim de se ter controle de qualidade nos medicamentos fitoterápicos vendidos (12).

Segundo dados da OMS, 80% da população de países em desenvolvimento utilizam para a atenção primária práticas tradicionais, e desse total, 85% fazem uso de plantas medicinais. Deste modo ao longo dos anos vários países implementaram em seus orçamentos programas de incentivo de estudo das plantas medicinais (14) (15) (16).

Existe um crescimento considerável no uso de fitoterápicos pela população brasileira. No Brasil 20% da população consome 63% de medicamentos alopáticos, sendo que o restante busca fontes alternativas de origem natural, especialmente as plantas. Os motivos referentes a esse aumento estão relacionados aos avanços ocorridos na área científica o que possibilita o desenvolvimento de novos fitoterápicos e ao aumento da procura por terapias alternativas e menos agressivas para a atenção primária (14) (17).

No Brasil o governo federal aprovou em 2006 a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos cujo objetivo primordial é o de “garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional”. Tal Política Nacional parte de uma concordância das políticas públicas nas áreas da saúde, meio ambiente, econômica e do

desenvolvimento social visando promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (18) .

A partir do aumento do consumo e comercialização de fitoterápicos no Brasil se fez necessário a criação de normas reguladoras a fim de registrar os medicamentos fitoterápicos produzidos e consumidos no país. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) descreve na RDC N° 26 de 13 de maio de 2014 as categorias dos medicamentos fitoterápicos e estabelece requisitos mínimos para o registro destes medicamentos (19).

2.2 Controle de qualidade de plantas medicinais

A partir do alto consumo de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil e no mundo se fez necessário a criação de normas e resoluções a fim de se atestar a identidade, qualidade, eficácia e segurança dos fitoterápicos vendidos. Para isso no Brasil a ANVISA estabeleceu o Padrão de Identidade e Qualidade (PIQ) (19).

O PIQ determina um conjunto de atributos que podem ser quantitativas e/ou qualitativas, definindo um teor de qualidade mínimo de determinado produto. Esse teor mínimo se faz necessário para que possam ser avaliados e validados a eficácia e segurança de plantas medicinais e fitoterápicos. Tais parâmetros que não são validados através do uso tradicional, são comprovados através de ensaios clínicos, toxicológicos e farmacológicos, *in vitro* e *in vivo,* a fim de demonstrar fatores como atividade terapêutica, efeitos adversos e toxicidade em seres humanos (20) (21).

A qualidade dos fitoterápicos deve ser realizada como citado anteriormente via parâmetros evidenciáveis e bases científicas. Em procedimentos de análise de qualidade se preconiza o uso de métodos físico-químicos e biológicos a fim de determinar a eficácia e segurança destes materiais. Fica evidenciado que determinados parâmetros podem sofrer alguma variação em decorrência da procedência do material como variação composicional, pureza, características fenotípicas e atividade farmacológica (22) (23).

Vale ressaltar que o controle de qualidade de medicamentos de origem vegetal vai muito além da análise da matéria-prima pronta em si, mas compreende o controle de variáveis desde a colheita até a pós-comercialização(farmacovigilância), a partir do monitoramento contínuo de todas as etapas. Deste modo agências reguladoras determinam que a qualidade de amostra a base de extratos vegetais deve ser avaliada

como um todo. Nesta vertente a metabolômica tem ganhado grande destaque no mapeamento químico de fitocomplexos, cuja prioridade é a identificação de metabólitos secundários que caracteriza distinções entre amostras obtidas em condições distintas. Esse perfil metabólico pode ser utilizado como referência no controle de qualidade de fitoterápicos (12) (24) (13).

2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias que apresentam um ou mais grupos aromáticos, nos quais estão contidos substituintes hidroxilados e/ou seus derivados funcionais. Recentemente tem sido objeto de grande interesse terapêutico e científico, visto que diversos estudos apontam importantes atividades biológicas vinculadas a eles. Dentre os quais podemos citar propriedades antimicrobiana, antitumoral, anti-inflamatória, cicatrizante, vasodilatadora e antialérgico (25) (26) (27) (28) (29).

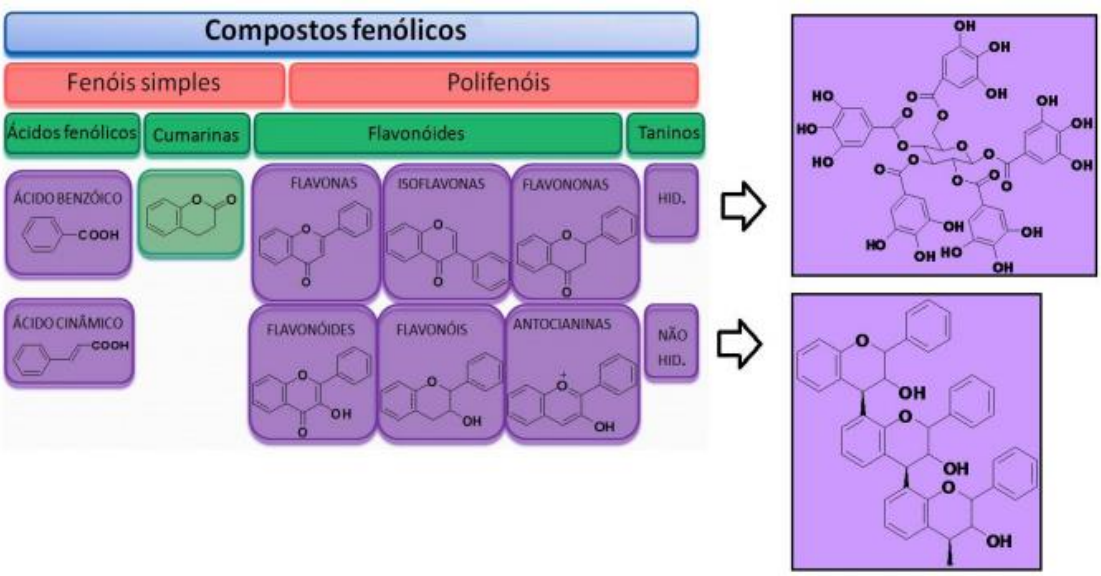


Figura 1. Esqueletos de base a partir dos quais os compostos fenólicos de origem vegetal são derivados *(30)*

O modo como os compostos fenólicos são classificados ainda não está bem elucidado, e uma possível classificação pode ser realizada a partir da diferenciação do número de átomos de carbonos constituintes conjuntamente com a estrutura do esqueleto da base fenólica, distinguindo fenóis simples de polifenóis, como mostra a Figura 1 (30).

A classificação dos fenóis simples advém dos grupos funcionais que eles apresentam, podendo ser distinguidos como ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Os ácidos hidroxibenzóicos, a maior família de ácidos fenólicos,

possui um esqueleto de sete carbonos (C_6-C_1) e se derivam a partir do ácido benzóico. Entre os pertencentes a esta família podemos citar o ácido gálico, vanílico, siríngico e o clorogênico. Já os hidroxicinâmicos possuem nove átomos de carbono(C_6-C_3) com ligação dupla na cadeia lateral, podendo ter configurações *cis* ou *trans*. Fazem parte desta família o ácido ferúlico, cafeico, e ρ-cumárico, presentes principalmente em frutas, bebidas, café e cereais. A Figura 2 mostra a estrutura básica do ácido benzóico e cinâmico (4) (31).

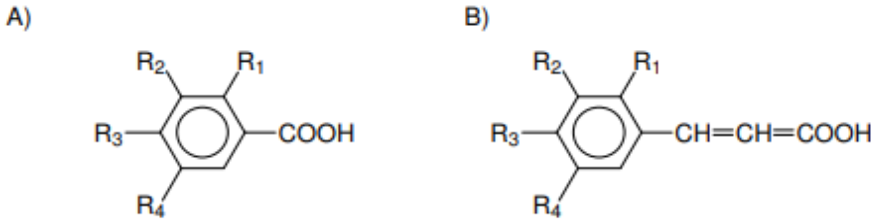


Figura 2. Estrutura básica dos ácidos fenólicos. A) ácido benzóico e B) ácido cinâmico *(2)*

Ao ácido cinâmico e seus derivados são reportados inúmeros efeitos terapêuticos como efeito antioxidante (28), anti-inflamatório (25) e cicatrizante (32). Estudos recentes ainda apontam que o ácido trans-cinâmico aumenta a capacidade de células de exercer a fagocitose e que o ácido ρ-cumárico possui a capacidade de eliminar radicais livre, tendo sido demonstrado também atividade anti-úlcera (33).

Os flavonóides compõem o maior grupo de compostos polifenólicos de origem vegetal, sendo formados por 15 carbonos (C_6 - C_3- C_6). Sua estrutura básica é formada por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por uma ponte de 3 carbonos (Figura 3) (1). A classificação dos flavonóides ocorre através da diferenciação dos níveis de oxidação e no padrão de substituição do anel C, dentre eles podemos citar os flavonóis (quercetina, canferol, miricetina e catequina), flavonas (luteolina e flavona) e flavanonas (flavanona, naringina e hesperetina). Em compostos individuais, dentro de um mesmo grupo, a diferenciação ocorre pela distinção de substituição dos anéis A e B (25) (34) (35) (36).

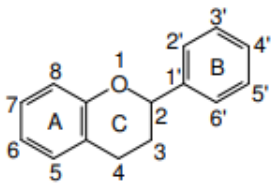
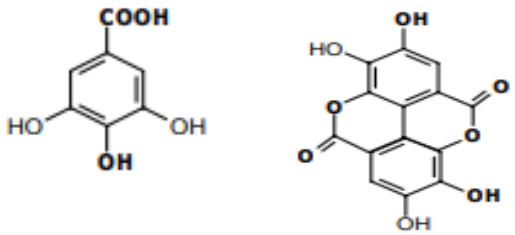


Figura 3. Estrutura básica dos flavonóides *(2)*

As atividades biológicas dos flavonóides são bastantes diversificadas devido entre outros fatores a complexidade de sua estrutura química, bem como da disparidade de suas moléculas. Dentre as atividades biológicas descritas dos flavonóides temos sua proteção para doenças cardíacas e o câncer e atividade antioxidante, que está diretamente relacionada com sua aptidão de doar átomos (hidrogênio, elétrons ou quelatos de cálcio) e eliminar radicais livres (1) (33).

Os taninos são compostos fenólicos que geram grande interesse biológico e econômico, possuem habilidades de formar complexos insolúveis com gelatinas, proteínas e alcaloides. São classificados de acordo com estrutura química e se dividem em dois grupos: hidrolisáveis e condensados. Os taninos hidrolisáveis são ésteres de ácidos elágicos glicolisados e ácidos gálicos (Figura 4), formados a partir do chiquimato, no qual os grupos hidroxila do açúcar são esterificados com ácidos fenólicos. A atividades farmacológica dos taninos vão desde ação bactericida, fungicida e antiviral até propriedades antidiarréica e hemostática essas últimas atribuídas a sua capacidade de complexação com polissacarídeos, íons metálicos e proteínas (37) (38).



Ácido gálico Ácido elágico

Figura 4. Estrutura do ácido gálico e do ácido elágico

Entre as diversas técnicas de separação utilizadas para determinação de compostos fenólicos em fitoterápicos podemos citar: CLAE (39), UPLC (40), ESI-MS (2), CLAE-EM (1) e UV-VIS (41).

Dentre as técnicas acima citadas a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem sido reconhecida como a técnica mais versátil, sendo ela em muito dos casos suficiente, deixando deste modo de ser usado procedimentos mais complexos de preparação de amostra (39) (42).

2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE DAD)

A utilização do CLAE em análises analíticas de compostos fenólicos bioativos tem se destacado como uma das técnicas mais importantes de análise, visto a sua rapidez e eficiência. Esta técnica possui várias vantagens como a facilidade em operar, ser automatizado, possuir alta resolução, alta seletividade e sensibilidade, velocidade, além da possibilidade de acoplamento a diversos detectores (8) (42) (43) (44).

A técnica de CLAE é estabelecida como um método de bases físico-químicas no qual ocorre a separação de componentes de uma mistura, realizada a partir da distribuição entre duas fases, sendo que uma fase permanece estacionária enquanto a outra se move através dela. A representação esquemática de um equipamento é mostrado abaixo (Figura 5), é composto basicamente por um reservatório de solventes, válvulas de controle de entrada, saída, mistura, injeção e descarte, uma bomba de alta pressão, coluna cromatográfica, detector e registro de dados (45) .

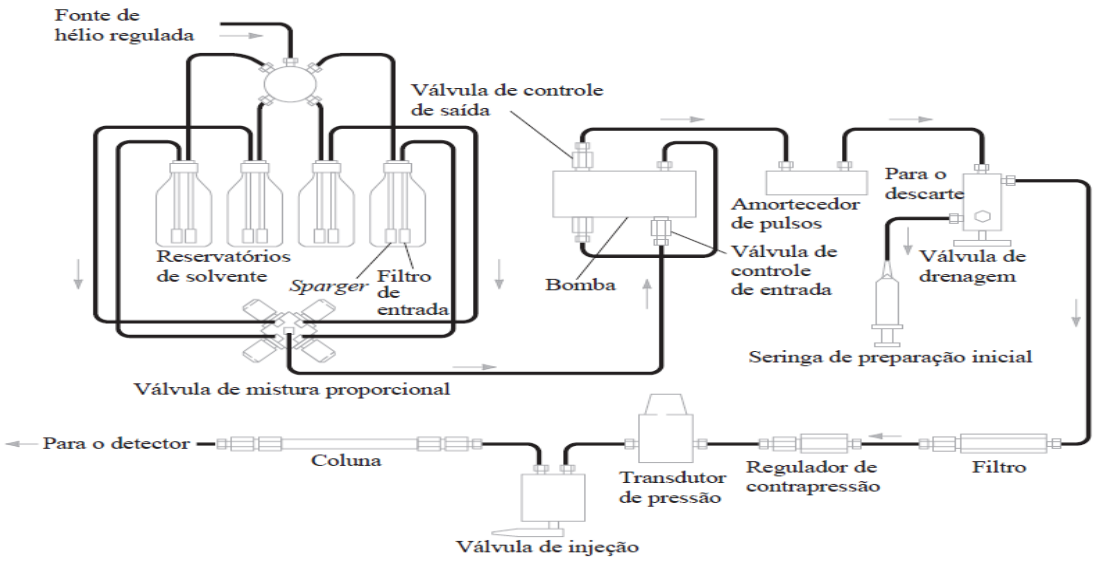


Figura 5. Componentes básicos de um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência *(45)*

Os instrumentos modernos de CLAE, são equipados com um ou mais reservatórios de gás contendo 500 mL, sendo de extrema importância tomar medidas para remover os gases e partículas dissolvidas. O sistema de bombeamento de alta pressão utilizado no equipamento tem a função de transmitir um fluxo reprodutível e constante da fase móvel para a coluna, devendo apresentar resistência a corrosão de uma grande variedade de solventes. Dentre principais exigências de um sistema de

bombeamento temos: operar a pressões de até 6.000 psi(Ib in $^{-2}$); a saída deve ser livre de pulsação; intervalo de vazão entre 0,1 a 10 mLmin^{-1}e reprodutibilidade de vazão de 0,5% ou melhor. O sistema de injeção mais empregado na introdução de amostra é baseado em um sistema com alça de amostragem capaz de fornecer tamanhos de amostra entre 1 e 100µL ou mais (45) (46) (47).

Os detectores mais amplamente utilizados no CLAE são os baseados na absorção de radiação UV/VIS, sendo, portanto, seletivos em moléculas que possuem cromóforos. Os detectores de fotodiodos (DAD – do inglês, *diode array detector*) bastante utilizados em instrumentos mais modernos de análise oferecem um largo espectro UV favorecendo sensibilidade e a confiabilidade a técnica. A técnica CLAE DAD possui vantagens dentre as quais está a de separar individualmente os compostos, acarretando não só em dados de concentração dos compostos fenólicos, mas também em suas quantificações. Em relação as desvantagens podemos citar a coeluição de vários destes compostos e altos limites de quantificação e detecção o que em determinados casos prejudicam a análise de alguns desses compostos fenólicos. Apesar de sua limitação o DAD se mostra uma das técnicas mais promissoras em análises de plantas devido a sua absorção no UV(200-400) o qual ocorre devido a presença de uma ou mais substâncias com uma ou mais ligações duplas ou elétrons desemparelhados (9) (48) (49) (50).

As colunas utilizadas no CLAE são geralmente de aço inoxidável com comprimento de 5 a 25 cm e diâmetro interno de 3 a 5 mm. As colunas são empacotadas a partir de suportes de alta resolução e são reaproveitadas, não sendo necessária sua regeneração, o que diminui a quantidade de resíduos no meio ambiente (45) (49) (51).

2.5 Aesculus Hippocastanum L.

O *Aesculus Hippocastanum L.* ou “castanha da índia” como é popularmente conhecida é nativa da Zona Temperada do Norte, mais especificamente dos Bálcãs, região do Cáucaso (Figura 6). Atualmente por sua fácil adaptação é cultivada ao redor do mundo em parques, jardins e em torno de grandes avenidas metropolitanas. A castanha da índia é uma droga vegetal formada por sementes maduras e dessecadas (52) (53).

Figura 6. Folhas e frutos do *Aesculus hippocastanum L.*

A utilização deste fitoterápico na terapêutica vem ocorrendo desde o século 18 como antifebril, um século depois já havia relatos de sua atividade antiedematogênica. Recentemente estudos apontam a grande eficiência dessa planta no tratamento de insuficiência venosa crônica, edemas pós-operatório, ação vascular e anti-inflamatória (7) (54).

2.5.1 Fitoquímica

A parte utilizada da planta para fins medicinais são as sementes, podendo também em alguns casos serem utilizados as folhas e frutos em concentrações menores. A composição química desta planta é bastante variada sendo encontrado saponinas (principalmente a escina e prosapogenina), flavonóides (principalmente quercetina e canferol), taninos, óleos, dentre outros. Nas folhas, brotos e tegumento das sementes ainda podem ser detectados epicatequinas, e traços de proantocianidinas A_2. As sementes do Aesculus *Hippocastanaceae L.* contêm ainda gomas, proteínas (globulinas, L- triptofano, L-lisina e hipocastaninas), purinas (guanina, adenosina e adenina), açúcares e gorduras (ácidos oleico, linoleico, palmítico e esteárico) antioxidantes cumatinas esculina e fraxina (55) (56) (57) (58).

Os flavonóides também presentes nas sementes do *Aesculus Hippocastanaceae L.* tem como principal função a proteção contra agentes oxidantes. Nesse fitoterápico se encontram em sua maioria da forma de agliconas, flavonóides que não possuem açúcar em sua estrutura, sendo mais abundantes a quercetina e canferol (54).

Outro grupo encontrado é o tanino substâncias fenólicas encontradas em partes do vegetal. A função deste grupo fenólico é a de conceder resistência ao ataque de insetos e fungos e retardar a decomposição de tecidos. Na castanha da índia o

tanino é representado pela proantocianidinas, oligômeros ou polímeros formados a partir da condensação oxidativa de flavonóides (59).

Além desses compostos citados, também são encontrados nas sementes porções de óleos (até 7%) que são formados por ácidos graxos e glicerol. O principal ácido graxo encontrado é o ácido palmítico, ácido saturado formado por cadeia longa de carbonos. São encontrados também o ácido láurico, oleico, esteárico e araquidônico (60).

2.6 Mikania glomerata S.

A *Mikania glomerata Sprengel,* conhecida popularmente por “guaco”, pertence à família Asteraceae. Nativa da flora brasileira, tem ocorrência espontânea nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Bahia, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Espírito Santo, fora do país ela se encontra em todos os continentes, exceto na Antártida (Figura 6). A família da Asteraceae compreende a uma das maiores famílias de angiospermas (25.000 espécies) pertencentes a 1.600 gêneros, representando no total 10% da flora mundial (61) (62) (63) (64).

Figura 7. Distribuição da família Asteraceae pelo mundo [33]

A *Mikania glomerata S.* é uma planta de porte subarbustivo, considerada uma trepadeira volúvel, com ramos estriados, glabros e cilíndricos. Seu caule é cilíndrico lenhoso, com coloração que vai do castanho até o verde claro. As folhas são pecioladas, agudas aviando entre 10 e 15 cm de comprimento, possuindo margens inteiras e sinuosas com bases arredondadas. Tem como habitat as margens dos rios, orlas de matas, terrenos de aluvião, além de boa adaptação ao cultivo doméstico (Figura 8) (65) (66) (67).

Figura 8. Folhas e frutos da *Mikania glomerata S.*

Para fins medicinais o guaco hoje é largamente utilizado como broncodilatador e expectorante em tratamentos de enfermidades no aparelho respiratório, tais como, asma, bronquite, sinusite e tosse (63). São proferidas também a este fitoterápico ações anti-inflamatória (68), antialérgica (69), antibacteriana (68), antifúngica (70) e antiespasmódica (71).

2.6.1 Fitoquímica

A cumarina(1-2-benzopirona) (Figura 7) de acordo com a ANVISA é o marcador químico da *Mikania glomerata S.,* por ser este o constituinte principal. Ao contrário da maioria das cumarinas cuja biossíntese é através do ácido 4-cumárico, a formação da cumarina ocorre através do ácido 2-cumárico. O início da biossíntese ocorre com o cinamato via 2-hidroxilase se transformando em trans-2-coumarato. Ocorre então uma segunda transformação em β-D-glucosyl-2-coumarato via glucosiltransferase, o glicosídeo é então isomerizado ao ácido cis-coumarinico-β-D-glucoside e este em seguida, sofre uma hidrólise enzimática perdendo a glicose, se transformando no ácido cumarínico que se lactoniza (64) (72) (73) (74).

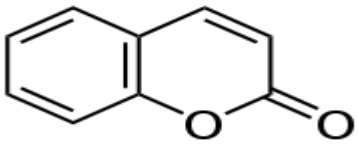


Figura 9. Estrutura química da cumarina.

Além da cumarina, composto majoritário da *Mikania glomerata S.* também são encontrados os sesquiterpenos e diterpenos, estigmasterol, ácido clorogênico, flavonóides, guacosídeos , resinas, taninos e saponinas (75) (76) .

Outros componentes também são encontrados, conhecidos como metabólitos secundários, dentre eles podemos citar o ácido palmítico, fitol, friedelina e

estigmasterol. Óleos essenciais também são relatados principalmente o β-cubebeno e espatulenol (15) (77) (78).

2.7 Rhodiola Rosea L.

Rhodiola rosea L, conhecida popularmente por “roreroot” ou “raiz do Ártico” é uma planta medicinal usada largamente na Europa e Ásia. Pertencente à família Crassulaceae, subfamília sedoideae e gênero *Rhodiola*, cresce em solo arenoso seco em altas altitudes, sua planta pode atingir alturas de 70 centímetros, produzindo flores amarelas que ao serem cortadas exalam cheiro de rosas. Seu uso data os povos indígenas antigos da Síbéria na qual sua utilização era devido a suas propriedades adaptógenas, ou seja, sua capacidade de realizar o estímulo do sistema imunológico(Figura 10) (79) (80) (81).

Figura 10. Folhas e frutos do Rhodiola Rosea L.

O largo uso deste fitoterápico ocorre devido as suas propriedades estimulantes sobre o sistema nervoso central, sendo, portanto, utilizado no tratamento de fadiga, depressão, dores de cabeça, stress, ansiedade e estimulante físico e mental. Estudos ainda apontam seus efeitos sobre funções cognitivas, efeitos endócrinos, anti-inflamatórios, antiarrítmicos, antimutagênicos e antitumorais (5) (82) (83).

2.7.1 Fitoquímica

Análises fitoquímicas das raízes do *Rhodiola rosea L.* despontam a presença de diversos compostos tais como taninos, ácidos fenólicos (clorogênico, gálico e hidroxicinâmico), flavonóides (gossipetina, canferol e herbacetina), glicosídeos feniletanóides(salidrosídeo), glicosídeos fenilpropanoides(rosin, rosavin e rosarin), monoterpenos (rosiridol e rosaridina) , triterpenos (β-sitosterol) , catequinas, além de ácidos orgânicos e outros glicosídeos. As catequinas exibem propriedades antioxidantes e podem proteger o organismo contra os efeitos maléficos dos radicais livres e formas reativas do oxigênio. Os marcadores genéticos da espécie são o

rosiridol e a rosaridina descrito em vários estudo como marcadores essenciais nessa espécie (79) (84) (85) (86).

2.8 Espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES)

Técnicas de espectrometria de emissão atômica têm sido largamente utilizada no campo científico, principalmente quando se deseja realizar determinações multielementares. Esta técnica analítica se baseia na decomposição de uma substância em átomos ou íons que pode ser feita através de uma chama, forno ou plasma. É utilizada na espectroscopia atômica fenômenos que envolvem os elétrons de valência, no qual os elementos podem ser determinados através da emissão, absorção ultravioleta ou radiação visível (45) (87).

A partir da modernização dos equipamentos e da busca de métodos cada vez mais sensíveis e precisos, foram surgindo ao longo dos anos diversos métodos de atomização, dentre eles podemos citar a Espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado, (ICP-OES), a Espectroscopia de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), a Espectroscopia de absorção atômica (FAAS) e a Espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES). As diferenças básicas entre estas técnicas estão na temperatura de atomização e no tipo de espectroscopia realizada (45).

Uma das técnicas que tem ganhado grande atenção nas últimas décadas é a Espectroscopia de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP OES). Seu uso está sendo altamente difundido pincipalmente devido ao seu menor custo agregado, baixos limites de detecção e por realizar análises multielementares. A principal diferença desta técnica para as demais é a utilização do gás nitrogênio em vez do argônio o que reduz significativamente o custo operacional (11) (88).

As propriedades do plasma de nitrogênio se diferenciam das do plasma de argônio, deste modo elas devem ser consideradas ao projetar-se a análise. Dos atributos mais importantes desta diferença temos a temperatura, que é mais baixa, e diferenças significativas na propriedade redox. A temperatura operacional do plasma de nitrogênio é em torno de 7.000 ° C, o que pode provocar a não ionização de alguns dos elementos analisados, não sendo, portanto, a melhor opção as linhas de íons para a análise. No entanto, este não é necessariamente um problema, visto que boa parte dos elementos possuem linhas de átomos livres de interferentes e com intensidade

aceitável para realizarem aferições em faixas altas (µg L^{-1}) e/ou baixas (ng L^{-1}) (11) (89) (90).

O MIP OES, assim como as demais técnicas de espectroscopia atômica possui por objetivo a identificação e quantificação de concentrações em diferentes tipos de materiais, se distinguindo das demais como já citado pelo uso do gás nitrogênio. Este instrumento analítico, no qual se consegue analisar múltiplos elementos de maneira eficaz e rápida, utiliza um conjunto de excitação por micro-ondas a fim de criar um campo magnético axial concentrado em torno de uma tocha convencional. Nesta técnica a intensidade de cada linha emitida será diretamente proporcional com a concentração do elemento em particular (11).

2.9.1 Aplicação do MIP OES na aplicação de fitoterápicos

2.9 Triagem Virtual Inversa

A Triagem Virtual Inversa (TVI), consiste em banco de dados de estruturas proteicas que possuem alguma relevância farmacológica, a partir do qual se baseia *in sílico,* receptores farmacológicos que possuem atuação para determinado ligante de interesse. A utilização da TVI se baseia na procura de substâncias que tenham uma maior probabilidade de se ligarem a alvo específico, se utilizando de servidores nos quais possuem grandes variedades de moléculas em suas bibliotecas. A identificação de alvos prováveis permite que possamos realizar uma previsão da bioatividade da molécula consultada. O objetivo, portanto, da TVI é o de identificar os alvos que são mais prováveis a partir da molécula consultada (91).

Existem vários servidores que podem ser utilizados para a determinação da bioatividade de moléculas a fim de que possa ser previsto alvos proteicos com base no banco de dados. As prováveis bioatividades de uma determinada molécula se baseia em critérios de afinidade molecular, semelhança estrutural ou *fingerprints* (92).

2.9.1 Método de similaridade

Métodos simples para a previsão de alvos são aqueles que se baseiam na semelhança química e no conhecimento da bioatividade de diversas moléculas. Os alvos utilizando este método são preditos através da identificação de proteínas com ligantes conhecidos, os quais possuem semelhança com a molécula estudada. Quando se trata de moléculas pequenas no qual se utiliza o método de similaridade elas são representadas como *fingerprint* químico, no qual consiste em formas nas

quais a estrutura molecular pode ser codificada. A comparação do *fingerprint* de uma molécula com outra é feita através do coeficiente de tanimoto (CT) que quanto mais próximo de 1, mais semelhantes são os dois compostos comparados, sendo consideradas semelhantes quando apresenta coeficiente de tanimoto (CT) maior que 0,85.Diversos servidores possuem essa capacidade de descrever a bioatividade de milhares de moléculas, dentre os quais citamos o ChEMBL e o ChemProt 2.0 (91).

O ChemProt 2.0 é um servidor que parte do pressuposto de que compostos de possuem estruturas parecidas têm também bioatividades semelhantes, codificando a estrutura química através do seus diferentes *fingerprint.* Nele as proteínas que possuem mais de cinco ligantes conhecidos são consideradas (91) (93).

2.9.2 Predição de toxicidade aguda das moléculas

O servidor GUSAR Antitarget/Toxicity Prediction usa como base de dados o Banco de Dados de Toxicidade SYMYX MDL (SYMYX MDL Toxicity Database including RTECS). Neste banco existe cerca de 10.000 estruturas químicas com seus respectivos dados de toxicidade aguda em ratos. Os valores de classes são dispostos entre 1 e 5 para cada via de administração, no qual o valor 1 representa a via mais tóxica e a 5 a menos tóxica. Quando os valores são tidos acima de 5 é dito que a molécula não é tóxica pela via analisada (94).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente e avaliar as atividades biológicas *in sílico* de medicamentos fitoterápicos a base de *Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L*..

3.2 Objetivos específicos

Determinar e classificar a presença do ácido clorogênico; ácido cafeico; ácido elágico; ácido ferúlico; ácido gálico;ácido ρ-cumárico; ácido siríngico; ácido T- cinâmico; ácido vanílico; catequina; quercetina e canferol nos fitoterápicos Aesculus hippocastanum L. , Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.

Determinar as concentrações de minerais em amostras de Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.

Avaliar e predizer *in sílico* novos alvos biológicos para os constituintes químicos identificados no *Aesculus hippocastanum L., Mikania glomerata S. e Rhodiola rósea L.*

Realizar uma predição *in sílico* de valores de letalidade média (DL_{50}) dos compostos fenólicos encontrados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostras

Neste estudo foram coletados de farmácias diferentes de Vitória da Conquista três amostras para estudo, o Fisioton (*Rhodiola rósea L.*) do laboratório Aché, lote (1901603), Varivax (*Aesculus hippocastanum L.*) do laboratório Natulab, lote (41228) e o Xarope de Guaco (*Mikania glomerata S.*) também do laboratório Natulab, lote (22715).

4.2 Reagentes e padrões

4.2.1 CLAE DAD

Os solventes foram adquiridos da empresa Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA), sendo utilizados os ácidos ferúlico, gálico, cafeico, clorogênico, transcinâmico, elagico, p-cumárico e siríngico; quercetina; (+) catequina, canferol, (±) -6-hidroxi-2, 5, 7, ácido 8-tetrametilcromeno 2-carboxico (Trolox) (≥ 99%), todos os solventes (qualidade para CLAE).

O metanol grau CLAE, tungstato de sódio, vanilina e ácido fosfomolíbdico da Merck (Darmstadt, Alemanha). Ácido acético glacial grau de CLAE de JTBaker (Phillipsburg, EUA). Carbonato de sódio e cloreto de alumínio de Êxodo Científica (São Paulo, Brasil). Persulfato de potássio, hidróxido de potássio, etanol, metanol, clorofórmio, acetato de etila, dietilamina, éter etílico, tolueno, ácido fórmico, ácido sulfúrico, ácido clorídrico e ácido fosfórico da Synth (São Paulo, Brasil). Água ultrapura do sistema de purificação Gehaka Master P&D (São Paulo, Brasil).

4.2.2 MIP OES

Todas as soluções foram preparadas com reagentes de grau analítico e água ultrapura. Os experimentos foram realizados utilizando HNO_3 (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e HCl (Cromoline Química Fina, SP, Brasil). As soluções padrão foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg L^{-1} de Al, As, Ba, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P, Pb, S, Sr (Agillent, United States). As soluções foram preparadas a partir de soluções estoque de referência a partir de taxas e diluições adequadas necessárias para preparar a solução de referência de multielementos. As concentrações finais variaram de 0,1 a 5,0 mgL^{-1} para micronutrientes e 5,0 a 150,0 mgL^{-1} para macronutrientes.

4.2.2.1 Materiais

Todos material de laboratório foi descontaminado em solução de HNO3 a 10% (vv^{-1}) banho por 24 horas e enxaguados com água de alta pureza. Posteriormente, todos foram secos sob condições de ar limpo à temperatura ambiente, lacrado com papel filme e armazenados para posterior uso.

4.3 Preparação do extrato para análise no CLAE DAD

Os medicamentos fitoterápicos *Aesculus hippocastanum L*. e *Rhodiola rósea L*. passaram por um processo de retirada do revestimento na qual os comprimidos ficaram imersos em 30 mL de ácido clorídrico concentrado 37% por respectivamente 8 e 10 minutos. Após esse tempo os comprimidos foram retirados da imersão e deixados a temperatura ambiente por 7 horas até serem macerados para posterior pesagem (3).

Amostras de 0,5 g de *Aesculus hippocastanum L*., *Mikania glomerata S*. e *Rhodiola rósea L.* foram pesadas em triplicata e adicionadas a elas 30 mL de metanol e 100 µL de ácido clorídrico concentrado. Os extratos foram dispostos em uma incubadora com agitação por 30 min a 300 rpm, após esse momento estes extratos foram filtrados e concentrados em um rotaevaporador RV 10 a 40° C e 40 mbar. O material derivado foi solubilizado em 1,5 mL de metanol e filtrado em filtro seringa de PTFE (0,45 µm) antes da análise via CLAE DAD (3).

4.4 Instrumentos e condições cromatográficas

A análise cromatográfica foi realizada em um Shimadzu (Shimadzu Scientific Instruments, Japão) sistema de cromatografia líquida, que consiste de uma bomba quaternária de alta pressão (LC-20AD, Shimadzu); vácuo desgaseificador; injector de alta pressão válvula manual (20 µg injecção circular) e um sistema de detecção de arranjo de fotodiodos (PDA) (SPD-20A, Shimadzu). Equipado com uma coluna “Licrhorspher @” RP 18 (Agilent), 5 µ m, 4,6 x 250 mm, controlado por software LC-System.

A separação por cromatografia foi realizada de acordo com metodologia descrita por Santos et al. , 2017 (95), em uma Lichrospher ® Coluna RP 18 (5 µm, 4,6 × 250 mm) da Agilent (Alemanha), a 40°C com solventes analíticos, constituindo uma mistura binária de eluição constituída por metanol (grau CLAE), com (A) 1,0% de ácido acético (vv^{-1}) e (B) (metanol). A análise cromatografica foi realizada por 40 minutos a uma vazão constante de 1,0mL.min^{-1}. O programa de gradiente foi o seguinte: 0-10

min, 100% A; 10 a 20min, 70% A; 20-30 min, 10% A; 30 a 37 min, 70% A e 37 a 40 min, 100% A.

4.5 Método de digestão

A digestão em bloco digestor (DB) ocorreu em um bloco digestor da marca Tecnal modelo TE 007 MP. Foram utilizadas aproximadamente 200 mg de cada amostra e em cada tubo foram adicionados 1mL de 30% (vv $^{-1}$) H_2O_2 e 3,0 mL de 99,5% (vv^{-1}) HNO_3 (3). Todos as experiências foram realizadas em triplicata. O programa de aquecimento foi realizado em quatro etapas sucessivas, os intervalos de tempo empregados foram (10 min, 20 min, 30 min e 2 h, no qual a cada intervalo se aumentava a temperatura em 30°C. A temperatura máxima atingida foi de 120°C e o processo levou 3 horas. Ao finalizar o processo de digestão e subsequente resfriamento as amostras foram diluídas com água até o volume de 50,0mL para detecção de macroelementos e microelementos. Para cada amostra foi preparado um branco e todas foram feitas em triplicada para posterior análise no MIP OES. Os elementos analisados foram: Al, As, Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, P,Pb, Sb, Se, Sn, Sr, V e Zn.

A Tabela 1 apresenta as condições operacionais de análise dos macros e micronutrientes pelo MIP OES.

Tabela 1. Condições operacionais do MIP OES

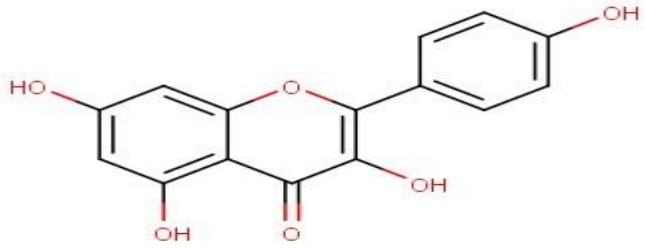
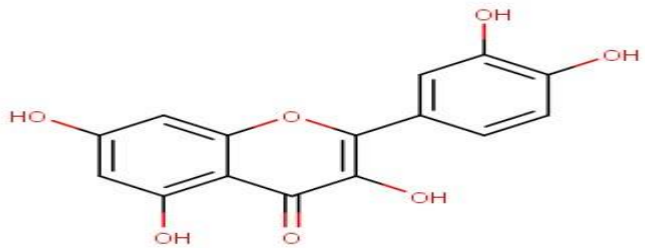
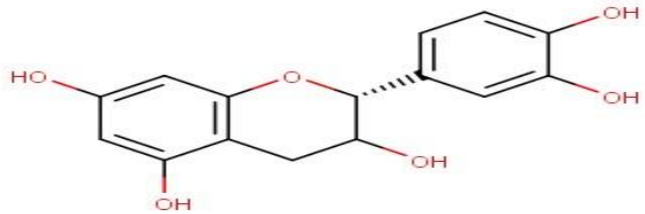
CONDIÇÕES DE ANÁLISE	
Replicatas	3
Pump speed rpm	15
Sample introdution	Manual
Uptake time (s)	15
Rinse time (s)	0
Stabilization time(s)	5
Number of pixels	3
Frequência do micro-ondas (mhz)	2450
Potência do micro-ondas (mhz)	1.0
Nebulizador	Meihar
Câmera de nebulização	Duplo passo ciclônica

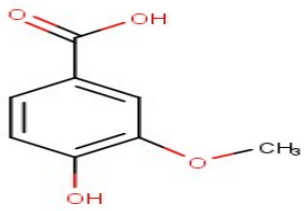
4.6 Triagem Virtual Inversa

4.6.1 Identificação dos alvos moleculares

A Triagem Virtual Inversa foi utilizada a fim de realizar a identificação de outros alvos terapêuticos para as substâncias identificadas nos três fitoterápicos analisados (*Rhodiola rósea L*., Aesculus *hippocastanum L. e Mikania glomerata S.)* por meio do CLAE DAD. A triagem Virtual foi realizada a fim de se obter uma previsão de possíveis atividades dessas moléculas, bem como de sua comparação com atividades já relatadas na literatura. Primeiramente realizou-se a construção das estruturas moleculares encontradas nas três amostras estudadas no programa MarvinSketch versão 20.19, mostrados na Tabela 2.

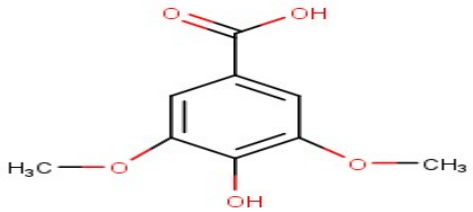
Tabela 2. Estruturas moleculares das substâncias identificadas nos fitoterápicos analisados

FLAVONÓIDES	
	**CANFEROL** **Nome IUPAC**: 3,5,7-trihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl)-4H-chromen-4-One **Peso molecular**: 286,239 **Fórmula:** $C_{15}H_{10}O_6$ **Composição:**C (62.94%), H (3.52%), O (33.54%)
	**QUERCETINA** **Nome IUPAC**: 2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,5,7-trihydroxy-4H-chromen-4-one **Peso molecular**: 302,238 Fórmula: $C_{15}H_{10}O_7$ **Composição:** C (59.61%), H (3.34%), O (37.05%)
	**CATEQUINA** **Nome IUPAC**: (2R,3S)-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol **Peso molecular**: 290,271 **Fórmula:** $C_{15}H_{14}O_6$ **Composição:** C (62.07%), H (4.86%), O (33.07%)
ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICO	



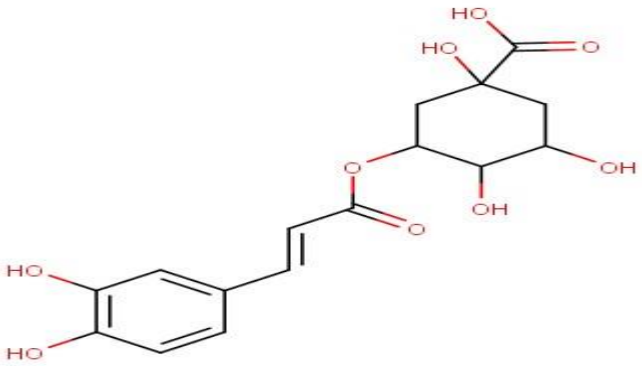
ÁCIDO VANÍLICO

Nome IUPAC: 4-hydroxy-3-methoxybenzoic acid
Peso molecular: 168,148
Fórmula: $C_8H_8O_4$
Composição: C (57.14%), H (4.80%), O (38.06%)



ÁCIDO SIRINGICO

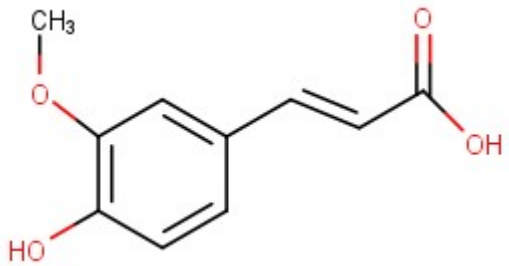
Nome IUPAC: 4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzoic acid
Peso molecular: 198,174
Fórmula: $C_9H_{10}O_5$
Composição: C (54.55%), H (5.09%), O (40.37%)



ÁCIDO CLOROGÊNICO

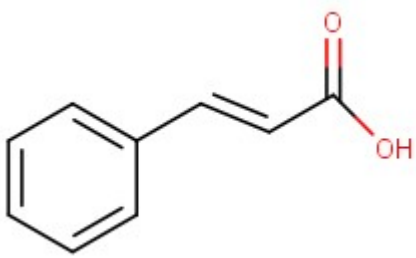
Nome IUPAC: (1S, 3R, 4R, 5R) -3 -{[(2 E) -3- (3,4-dihidroxifenil) prop-2-enoil] oxi} -1,4,5-trihidroxiciclohexanocarboxílico acid
Peso molecular: 354,31
Fórmula: $C_{16}H_{18}O_9$
Composição: C (54.24%), H (5.12%), O (40.64%)

ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS



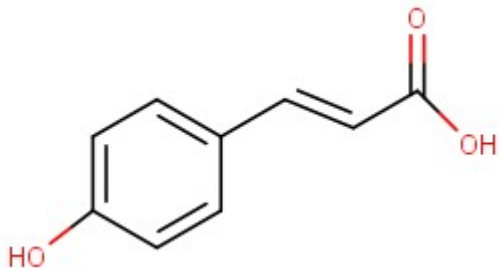
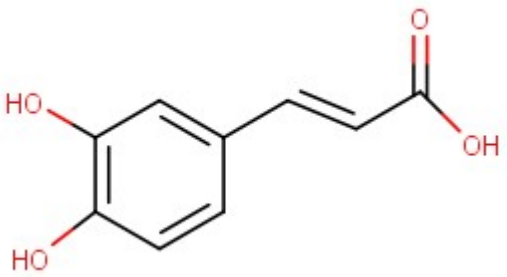
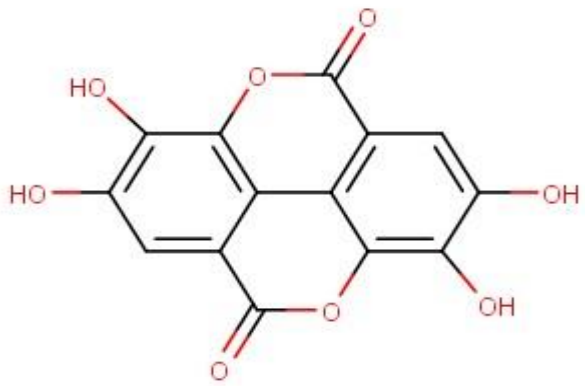
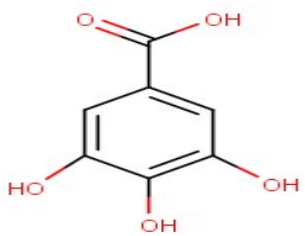
ÁCIDO FERÚLICO

Nome IUPAC: (E)-3-(4-hydroxy-3-methoxy-phenyl)prop-2-enoic acid
Peso molecular: 194,186
Fórmula: $C_{10}H_{10}O_4$
Composição: C (61.85%), H (5.19%), O (32.96%)



ÁCIDO T-CINÂMICO

Nome IUPAC: (E) -3-phenyl-2-propenoic acid
Peso molecular: 148,161
Fórmula: $C_9H_8O_2$
Composição: C (72.96%), H (5.44%), O (21.60%)

	**ÁCIDO P-CUMÁRICO** **Nome IUPAC**: (2 E) -3- (4-hydroxyphenyl) prop-2-enoic acid **Peso molecular**: 164,160 **Fórmula**: $C_9H_8O_3$ **Composição**: C (65.85%), H (4.91%), O (29.24%)
	**ÁCIDO CAFEICO** **Nome IUPAC**: (E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid **Peso molecular:** 180,159 **Fórmula:** $C_9H_8O_4$ **Composição**: C (60.00%), H (4.48%), O (35.52%)
TANINO	
	**ÁCIDO ELÁGICO** **Nome IUPAC**: 2,3,7,8-tetra-hidroxi-cromeno [5,4,3-cde] cromeno-5,10-diona **Peso molecular:** 302,194 **Fórmula:** $C_{14}H_6O_8$ **Composição:** C (55.64%), H (2.00%), O (42.35%)
	**ÁCIDO GÁLICO** **Nome IUPAC**: 3,4,5-trihydroxybenzoic acid **Peso molecular**: 170,120 **Fórmula:** $C_7H_6O_5$ **Composição**: C (49.42%), H (3.56%), O (47.02%)

Em seguida foram obtidos os *Simplified Molecular-Input Line-Entry System (*SMILES) de todos os compostos a partir do banco de dados ChEMBL. Após a obtenção dos SMILES utilizando o servidor ChemProt 2.0 foram selecionadas as estruturas, primeiramente considerando o Coeficiente de Tanimoto (CT), no qual

foram selecionados ligantes entre 1,0 > CT ≥ 0,85. Estruturas acima de 0,85 significam que foram consideradas estruturas similares a molécula consultada, já com estruturas descritas com CT = 1 se considera que a própria molécula de consulta foi testada para aquele alvo. A fim de seleção dos alvos neste servidor também foi considerada a bioatividade de cada molécula. Só foram selecionados os alvos das espécies humanas a fim de comparação e relato destes alvos no organismo humano.

4.6.2 Predição da toxicidade aguda das moléculas

A investigação dos efeitos tóxicos de fitoterápicos são de suma importância, visto que se é possível a partir dessas determinações elucidar aspectos farmacológicos importantes de seus constituintes, garantindo segurança e redução dos riscos à saúde dos pacientes. Testes de toxicidade são realizados com o objetivo de prever e/ou avaliar os efeitos tóxicos que as substâncias podem gerar nos sistemas biológicos, dimensionando assim a toxicidade desses compostos (96).

O teste serve como base para a determinação de doses e protocolos de atendimento acerca da toxicidade aguda e crônica fornecendo dados que servem de parâmetros para a determinação da dose letal média, ou dose letal 50%, conhecida como DL_{50} (97).

O servidor GUSAR Antitarget/Toxicity Prediction foi usado para a predição da toxicidade aguda dos compostos fenólicos encontrados em cada fitoterápico estudado, se baseando na predição *in sílico* da dose letal média (DL_{50} – mg/kg). Os dados foram dispostos em 4 tipos de administração (oral (VO), intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC). Os valores de toxicidade na faixa agudam obtidos foram separados em classes no qual 1 representa alta toxicidade, 5 baixa toxicidade e em valores maiores que 5 a molécula foi considerada não tóxica.

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 CLAE DAD

5.1.1 Desempenho analítico

Os parâmetros utilizados para as determinações de ácidos fenólicos e flavonóides são apresentados na Tabela 3. As curvas analíticas descritas foram geradas por injeções em triplicata contendo todos os analitos em concentrações de 0,1 a 2,5 µg.L^{-1}. O limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados utilizando as recomendações aceitas pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), tendo como base dois tipos de erros, o tipo I (falsos positivos) no qual se aceita uma "hipótese alternativa" (analito presente) e o tipo II (falsos negativos), aceitando a "hipótese nula" (analito ausente) (98) (99).

Tabela 3. Parâmetros para determinação de ácidos fenólicos e flavonóides por CLAE DAD

Fenólicos	Equação de regressão (y = ax + b)	Coeficiente de correlação	Valor experimental F	LD mgL^{-1}	LQ mgL^{-1}
Ácido Elágico	y = 17803x - 2862,7	0,99401	331,11	0,275	0,832
Ácido siríngico	y = 66621x − 1175.1	0,9997	5794	0,066	0,199
Ácido gálico	y = 54239x - 22464	0,9968	464,36	0,254	0,77
Catequina	y = 12726x - 417,86	09994	3722	0,082	0,248
Ácido ferúlico	y = 54238x + 1847.9	0,9998	8142	0,055	0,168
Ácido t-cinâmico	y = 149100x - 634,34	0,9997	6592	0,062	0,187
Ácido ρ-cumárico	y = 162544x + 812.95	0,9997	6692	0,061	0,185
Ácido clorogênico	y = 54804x − 809.04	0,9996	3957	0,071	0,216
Ácido cafeico	y = 106892x − 655.21	0,9997	5873	0,065	0,198
Quercetina	y = 36322x − 3352	0,9983	1176	0,146	0,442
Ácido vanílico	y = 89113x − 1553.1	0,9993	2771	0,095	0,288
canferol	y = 32537x − 1657.3	0,9986	1399	0,134	0,405

Y é a área integrada do pico (mAU) e x é a concentração dos analitos (mgL^{-1}); LD= limite de detecção e LQ = limite de quantificação

Os valores de LD e LQ variaram entre 0,055 e 0,275 (mg L^{-1}) e 0,168 e 0,77(mg L^{-1}) respectivamente, indicando que a metodologia proposta é apropriada para a detecção e quantificação dos 13 compostos fenólicos relatados nas amostras estudadas. Os valores do coeficiente de correlação (R^2) foram superiores a 0,99, indicando que há uma boa relação linear entre as variáveis. O coeficiente de correlação tem sido utilizado usualmente para se mensurar a direção e o grau da relação linear entre duas variáveis quantitativas, no entanto vale destacar que a IUPAC desencoraja o uso do coeficiente de correlação como indicador de linearidade na relação entre concentração e o sinal analítico, sugerindo para testar a linearidade o F experimental (98) (99). Com base nos dados descritos na Tabela 1 foi observado

que os valores de F foram os superiores ao F crítico tabelado (7,71) para valores de *p* de 0,05 (nível de confiança 95%), indicando que há uma relação entre o sinal e a concentração para todos os analitos.

5.1.2 Análises CLAE DAD

As amostras de *Rhodiola rosea L.*, *Aesculus hippocastanum L.* e *Mikania glomerata S.*, foram analisadas utilizando o HPLC-DAD, sendo utilizados padrões de 12 fenólicos bioativos a fim se realizar a extração. Estes bioativos fenólicos foram: ácido clorogênico; ácido cafeico; ácido elágico; ácido ferúlico; ácido gálico; ácido ρ-cumárico; ácido siríngico; ácido t- cinâmico; ácido vanílico; catequina; quercetina e canferol. A Tabela 4 descreve o tempo de retenção (Tr) e o comprimento de onda (nm) dos marcadores químicos analisados. A identificação e análises qualitativas foram realizadas através da comparação com espectros padrão em cada tempo de retenção.

Tabela 4. Marcadores químicos analisados em diferentes comprimentos de onda

	SUBSTÂNCIAS ANALISADAS		
FENÓLICO BIOATIVO	**Abreviatura**	**Nm**	**Tr**
Ácido vanílico	AV	260	11,247
Ácido elágico	AE	260	12,7
Ácido siríngico	AS	272	11,558
Ácido gálico	AG	280	6,539
Catequina	CQ	280	9,921
Ácido ferúlico	AF	280	12,692
Ácido t-cinâmico	AT	280	14,987
Ácido ρ-cumárico	APC	310	12,397
Ácido clorogênico	AC	330	10,538
Ácido cafeico	ACF	330	11,202
Quercetina	QC	360	14,789
Canferol	CA	360	15,687

As concentrações obtidas dos compostos fenólicos para cada fitoterápico estudado são apresentadas na Tabela 5. Nas amostras analisadas foram detectados ao menos 4 fenólicos bioativos. Por se tratar de amostras diferentes obtivemos concentrações e compostos fenólicos distintos entre os fitoterápicos analisados.

5.1.2.1 Aesculus hippocastanum L.

Para o *Aesculus hippocastanum L.* foram encontrados 8 compostos fenólicos, ácido elágico, ácido siringico, ácido ρ-cumárico, ácido t-cinâmico, ácido ferúlico quercetina, canferol, ácido vanílico. As maiores concentrações encontradas foram dos flavonóides quercetina, canferol com 980,43 ± 0,02 e 603,24 0,023 mg kg $^{-1}$

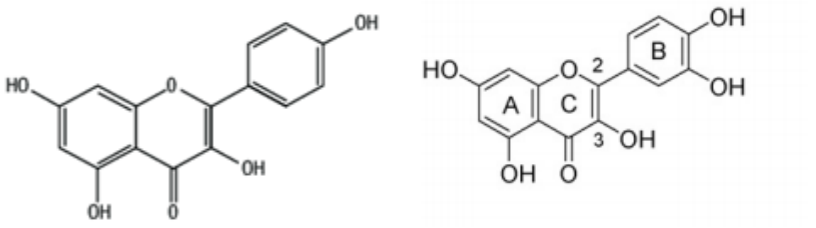
respectivamente. A presença destes flavonóides foi descrita em diversos trabalhos (58) (100), tendo relação direta com a função farmacológica deste fitoterápico.

Tabela 5. Concentração de bioativos fenólicos em comprimidos de Rhodiola rosea .(RR), Aesculus hippocastanum L.(AH), e Mikania glomerata S. (MG) em mg kg $^{-1}$

Amostras	AC	ACF	AE	AF	AG	APC	AS	AT	AV	(+)- CQ	QC	CA
MG	0,54 ± 0,003	0,31 ± 0,01	-	-	-	-	-	-	-	-	1,98 ± 0,48	0,34 ± 0,02
RR	66,49 ± 1,28	-	-	-	-	79,97 ± 0,11	-	-	-	1954,36 ± 15,27	-	161,61 ± 5,90
AH	-	-	99,65 ± 5,35	47,69 ± 7,22	-	17,9 ± 0,08	55,38 ± 9,11	85,78 ± 0,02	39,94 ± 3,61	-	980,43 ± 0,02	603,24± 0,023

ácido clorogênico (AC); ácido cafeico (ACF); ácido elágico(AE); ácido ferúlico (AF); ácido gálico (AG); ácido ρ-cumárico (APC/0; ácido siríngico (AS); ácido t- cinâmico (AT); ácido vanílico (AV); catequina (CQ); quercetina (QC) e canferol (CA) (média ± DP, n=3)

Como já descrito o *Aesculus hippocastanum L*. é amplamente utilizado para o tratamento de sintomas da insuficiência venosa, que é definida como uma anormalidade no funcionamento do sistema venoso do paciente causado por uma inadequação valvular, que pode ou não estar associado a obstrução do fluxo venoso (54). As manifestações clínicas sentidas pelo paciente com insuficiência venosa são principalmente dor, queimação, peso nas pernas, inchaço e formigamentos (101). Estas manifestações estão, não somente, mas também relacionadas com a resposta inflamatória que ocorre no local da lesão através dos macrófagos e neutrófilos. A atividade anti-inflamatória da quercetina e do canferol podem ser atribuidas a inibição das enzimas fosfolipase A_2 (PLA_2), lipo-oxigenase, ciclo-oxigenase, inibição de formação de leucotrienos e inibição da produção de óxido nítrico, através da modulação da enzima Inos (Enzima óxido nítrico sintase induzível) (102).



a) Canferol b) Quercetina

Figura 11. Estruturas químicas do Kaempferol e da Quercetina *(104)*

A atividade supracitada está relacionada com as estruturas químicas destes dois compostos, no qual é possível aferir que a presença de um grupamento hidroxila na posição 3' e 4' do anel B na quercetina (Figura 10b), formando um sistema orto di-

hidroxilado, é responsável por inibir a formação de leucotrienos B_4(LTB_4). Ao observar a estrutura do canferol (Figura 10a) percebe-se que ele não possui o grupamento hidroxila na posição 3' do anel B, tendo 60% menos atividade anti-inflamatória que a quercetina. A dupla ligação vista no anel C nos carbonos 2 e 3 conferem também atividade anti-inflamatória a esses flavonóides, visto que em comparação com outros que não a possuem ocorre a perda de aptidão dessa atividade (103) (104).

Aos flavonóides também competem atividades antioxidantes sendo consequência de suas propriedades de óxido-redução o qual podem desempenhar valioso papel de absorção e neutralização de radicais livres (105) (106). Esta capacidade antioxidante leva a regulação de lipídios, melhoramento da função endotelial, inibição da agregação plaquetária, melhorando assim a defesa antioxidante das células prevenindo a apoptose (107).

Quando se trata de doenças venosas como discorrido acima ocorre uma inadequação valvular o que leva a ulcerações venosas e a formação de varizes. O mecanismo patogênico dessas varizes ainda é desconhecido, no entando supõe-se que o estresse oxidativo seja o principal responsável por estas alterações venosas.Quando há a diminuição do potencial antioxidante e a ocorrência de espécies reativas de oxigênio ocorre a perda de elasticidade da veia e disfunção do endotélio vascular. Estas ocorrências estão associadas a mudanças na estrutura vascular e inflamações associadas a citocinas pró-inflamatórias (107) (108).

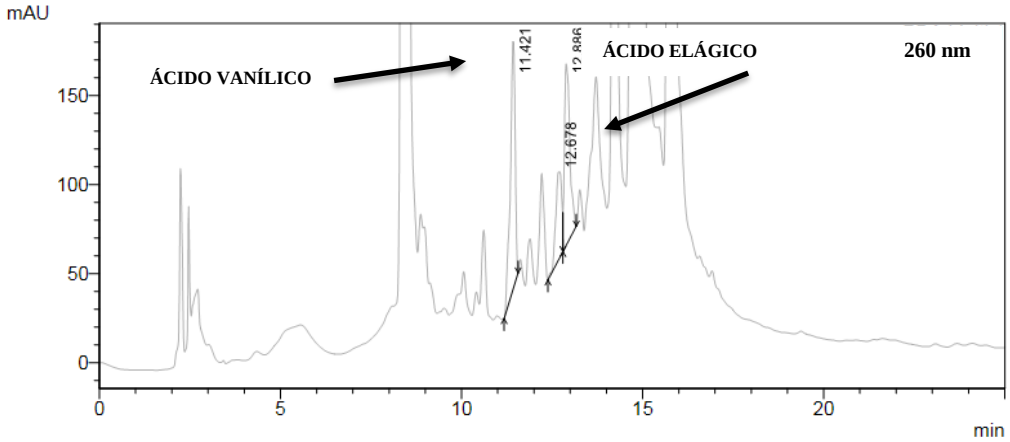
A insuficiência venosa portanto leva a um estase de sangue e consequentemente a uma hipoxia gerando uma cadeia metabolica que ao final levará a uma liberação excessiva de radicais superóxido e outras expécies reativas de oxigênio (109). Os ácidos fenólicos além de outras funções possuem a capacidade de reagir aos radicais livres, a partir da formação de radicais estáveis. Esta formação de radicais estáveis ocorre devido à sua estrutura química que apresenta ao menos um anel aromático com grupos de hidroxilas (110). A análise do *Aesculus hippocastanum L* constatou a presença de 6 ácidos fenólicos, sendo eles o ácido elágico(99,65 ± 5,35 mg kg^{-1}), ácido siringico (55,38 ± 9,11 mg kg^{-1}), ácido ρ-cumárico(17,9 ± 0,08 mg kg^{-1}), ácido t-cinâmico(85,78 ± 0,02 mg kg^{-1}), ácido ferúlico(47,69 ± 5,35 mg kg^{-1}) e o ácido vanílico(39,94 ± 3,61mg kg^{-1}).

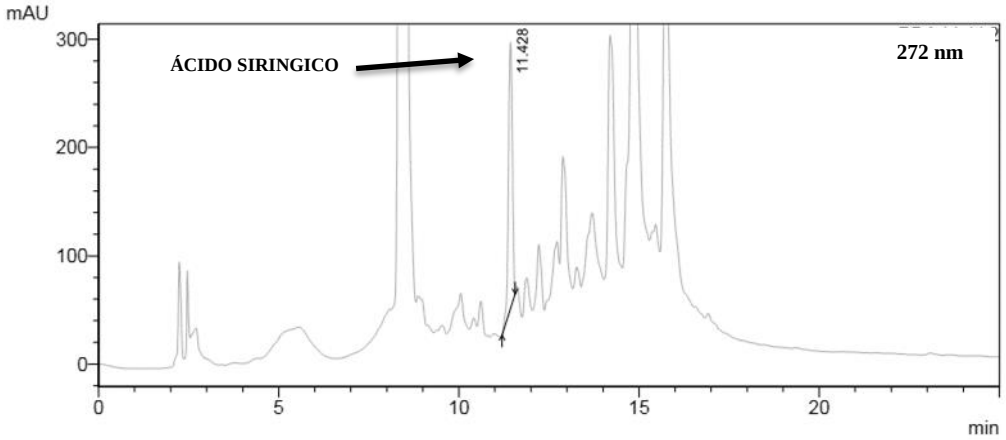
Dentre os hidroxicinâmicos neste fitoterápico encontramos o ácido ρ-cumárico e o ácido ferúlico. Estes compostos possuem atividades antioxidantes mais ativos do

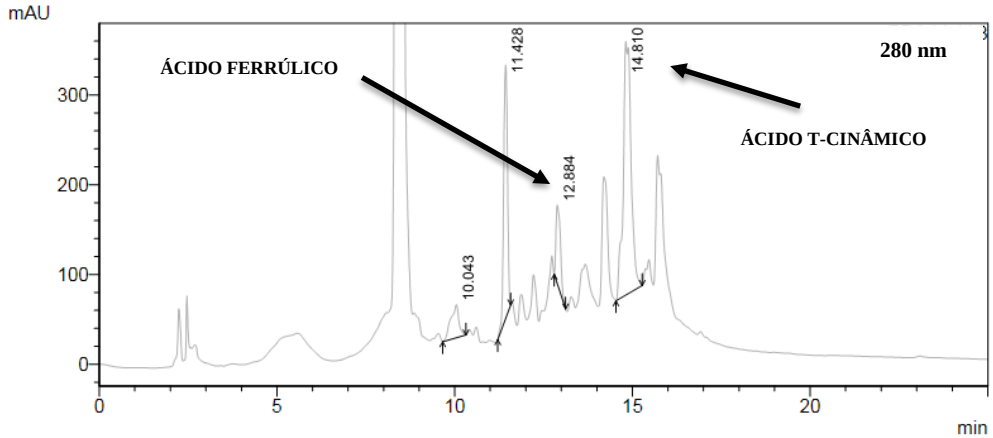
que os hidroxibenzóicos, tais como o ácido siringico, ácido elágico e o ácido vanílico. Essa maior atividade oxidante se deve a dupla ligação que compõe os derivados do ácido cinâmico, cuja participação estabiliza o radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado, característica essa que os hidroxibenzóicos não exibem. Ao ácido ferúlico ainda citamos a existência na posição orto, com o grupo metoxila, de um grupo hidroxila, doador de elétrons, fator este que aumenta a estabilidade do radical fenoxil, aumentando a eficiência deste antioxidante (111) (112) (106).

Os cromatogramas encontrados na amostra AE estão dispostos na Figura 9, no qual são apresentados todos os compostos fenólicos identificados em diferentes comprimentos de onda com seus respectivos tempos de retenção. Para este fitoterápico foram identificados 8 fenólicos bioativos, ácido elágico (Tr = 12,678), ácido siringico (Tr = 11,421), ácido ρ-cumárico (Tr = 12,742), ácido t-cinâmico (Tr = 14,810), ácido ferúlico (Tr = 12,884), quercetina (Tr = 14,811), canferol (Tr = 15,706), ácido vanílico (Tr = 11,421). Os comprimentos de onda analisados foram adquiridos entre 260 e 360 nm. Os fenólicos relatados foram encontrados dentro dos tempos médios de retenção dos marcadores químicos descritos na Tabela 3.

Sá (2018) (3) e Santos (2017) (95) em seus estudos utilizaram o CLAE DAD para determinação de compostos fenólicos bioativos utilizando o CLAE DAD, na determinação respectivamente em capsulas de Goji berries e *Psidium guajava L.* obtendo tempos de retenção que foram de AV (12,4 min.) , AE (11,348 - 13,4 min.), AS (11,72 min.), AF (9,857- 12,9 min.) , AT (15,28 min.), APC (11,48 min.), QC (13,43 min.) e KF (15,74 min.) (95) (3). Os dois autores utilizaram as percentagem no programa gradiente (100,70,10, 70, 100%) e os mesmos solventes, ácido acético e metanol, o que diferenciou os dois foi o tempo no programa do gradiente, no qual Sá (2018) (3) usou aumentos de (5,5,5,3,e 3 min.) (95) totalizando 40 minutos. O maior tempo de análise pode aumentar a eficiência de uma separação, além de influenciar nos valores no tempo de retenção.


mAU
ÁCIDO VANÍLICO
11.421
12.886
12.678
ÁCIDO ELÁGICO
260 nm
150
100
50
0
0
5
10
15
20
min


mAU
ÁCIDO SIRINGICO
11.428
272 nm
300
200
100
0
0
5
10
15
20
min


mAU
ÁCIDO FERRÚLICO
11.428
14.810
280 nm
ÁCIDO T-CINÂMICO
12.884
10.043
300
200
100
0
0
5
10
15
20
min

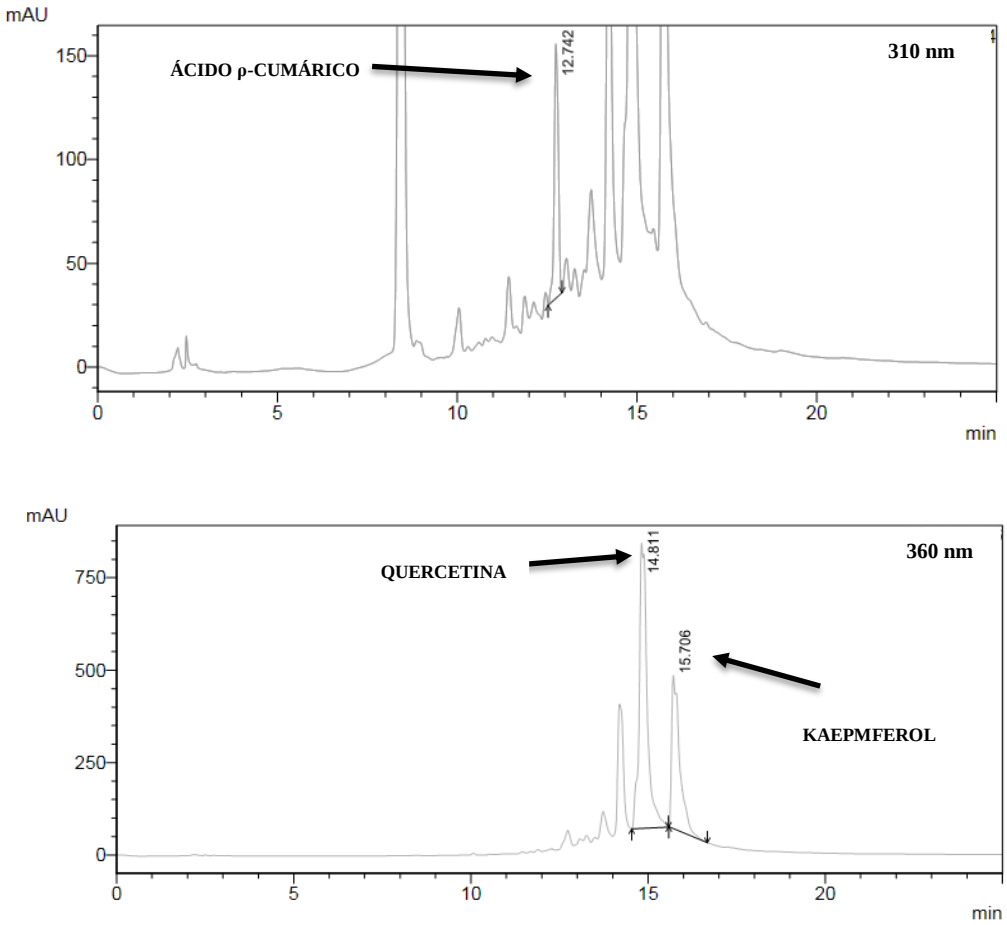


Figura 12. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Aesculus hippocastanum L. em diferentes comprimentos de onda (nm): 260,272,280,310,330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção.

A presença destes compostos fenólicos encontrados neste fitoterápico foram descritos também em diversos outros trabalhos AV (113) , AS (113), AF (113) , AT (15,28 min.), APC (36), QC (100) (113) (114) e KF (100) (113) (114). Dentre os fenólicos bioativos estudados a quercetina e o canferol foram os mais relatados, visto que possuem concentrações altas neste fitoterápico, como descrito na Tabela 3. Ao AT e AF, não foram encontrados estudos que abordavam sua determinação neste fitoterápico.

5.1.2.2 Mikania glomerata S.

Para *Mikania glomerata S*. foram detectados 4 compostos fenólicos ácido clorogênico (0,54 ± 0,003 mg kg $^{-1}$), ácido cafeico (0,31 ± 0,01 mg kg $^{-1}$), quercetina (1,98 ± 0,48 mg kg $^{-1}$) e canferol (0,34 ± 0,02 mg kg $^{-1}$). O ácido clorogênico o qual foi a 2º maior concentração encontrada no MG é produzido em plantas através de uma ligação éster entre o grupo 5-hidroxila do ácido quínico e o grupo carboxila do ácido cafeico. Ao ácido cafeico e ácido clorogênico foram relatados em vários estudos como

atenuantes do risco de doenças crônicas e inflamatórias (68) (115). Ao ácido clorogênico sua atividade anti-inflamatória também é relacionado a sua ação antioxidante (116) (117). Ao notar que a indicação principal do MG é para o tratamento de doenças que acometem as vias aéreas e que essas doenças causam inflamações nos brônquios causados por estímulos irritantes se percebe a atuação do ácido clorogênico e do ácido cafeico no tratamento dessas doenças (63).

Em relação aos flavonóides encontrados tivemos a quercetina, representando o maior teor de composto fenólico encontrado neste fitoterápico e o canferol. Estes dois possuindo efeito antiinflamatório, atuando sobre o músculo liso dos brônquios causando seu relaxamento (102) (118). A atuação destes flavonóides como antiinflamatórios foram descritos quando citados seus efeitos no AH.

Aos flavonóides também foram relatados como já descrito o efeito antioxidante. Diversos estudos apontam para o uso de flavonóides em doenças respiratórias, principalmente da quercetina que foi o composto de maior concentração encontrado no MG (119) (120). Doenças do trato respiratório limitam o fluxo de ar, estando associado a uma resposta inflamatória crônica que ao entrar em contato com substâncias nocivas estimulam os macrófagos alveolares dentro das células epiteliais do pulmão gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (121) (122).

Vários estudos demonstram melhoras significativas nos pacientes em uso de substâncias que contenham quercetina e o canferol, estando elas relacionadas ao aumento do volume expiratório e a diminuição da tosse crônica, catarro e falta de ar. Estes efeitos estão, dentre outros motivos, associados ao fato de inibirem a elastase, enzima liberada pelos neutrófilos durante processos inflamatórios que danificam as membranas celulares causando desconforto respiratório, e efisema pulmonar. Além disso a quercetina possui um efeito protetor nas células regulando as vias de defesa endógenas, além de agir como atenuante as lesões de células epiteliais oxidativas na inflamação pulmonar (120) (121).

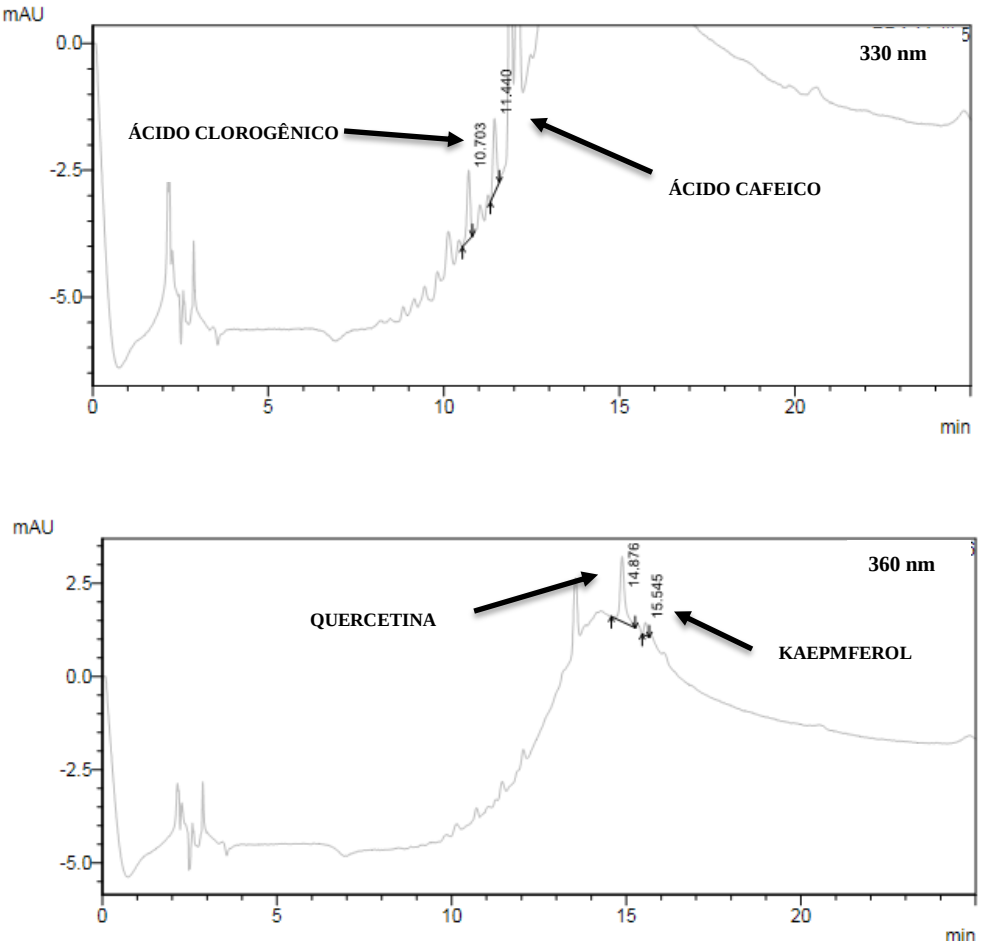


Figura 13. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Mikania glomerata S. em diferentes comprimentos de onda (nm): 330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção

Os cromatogramas encontrados na amostra MG foram dispostos na Figura 10, no qual são apresentados todos os compostos fenólicos identificados em diferentes comprimentos de onda com seus respectivos tempos de retenção. Para este fitoterápico foram identificados 4 fenólicos bioativos, ácido clorogênico (Tr = 10,703 min.), ácido cafeico (Tr = 11,440 min.), quercetina (Tr = 14,876 min.), canferol (Tr = 15,545 min.) .Os comprimentos de onda analisados foram adquiridos entre 330 e 360 nm. Os fenólicos relatados foram encontrados dentro dos tempos médios de retenção dos marcadores químicos descritos na Tabela 3.

Os tempos de retenções encontrados para o nosso analito foram parecidos com os encontrados nos trabalhos de Sá (2018) e Santos (2017), cujos métodos de detecção foram parecidos para o primeiro e semelhantes para o segundo. AC (10,5-10,6 min. min), ACF (11,26 – 11,3 min), QC (13,43 min) e KF (15,74 min).Para estes compostos tivemos uma variação menor entre os dados encontrados e os referenciados em relação aos bioativos fenólicos encontrados no *Aesculus hippocastanum L.* (3) (95).

Diversos estudos retratam a presença desses compostos fenólicos no MG, entre eles Melo(2015) que quantifica ácido clorogênico neste medicamento, Ueno (2018) que descreve a presença da quercetina, Nipomoga (2010) que relata a presença de canferol e Rufatto et al. (2012) que retrata a presença e função do ácido cafeico (62) (123) (124) (125).

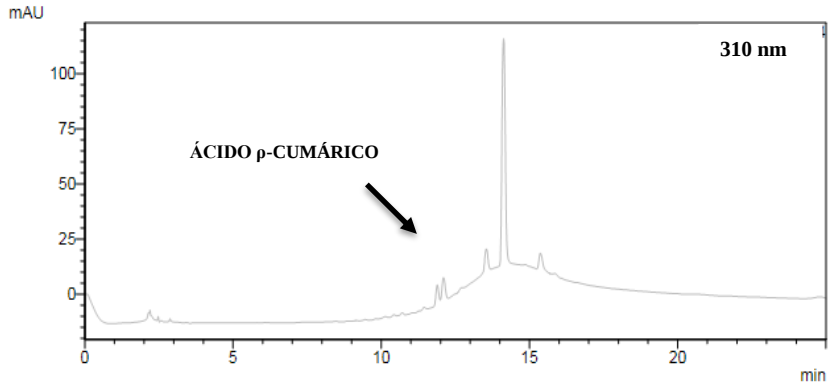


Figura 14. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no fitoterápico Mikania glomerata S. com comprimento de onda de 310 nm.

A *Mikania glomerata S*. como a maioria dos trabalhos apontam, apresenta como marcador químico principal a cumarina. Esta substância é uma alfa-lactona do ácido cumárico responsável por algumas das atividades terapêuticas deste fitoterápico. Como foi possível observar na Tabela 3 não houve a detecção do ácido ρ-cumárico percursor da cumarina na MG, estando sua concentração abaixo do limite de detecção e quantificação que são respectivamente de 0,061 e 0,187 mg kg $^{-1}$. Se observamos a Figura 11 que representa o cromatograma no comprimento de onda de 310 nm, existe um pico discreto no tempo de retenção entre 11,7 e 12,4 cuja retenção é justamente a que deveria aparecer o ácido ρ-cumárico, segundo comparação com os tempos de retenção dos marcadores químicos em estudo. A não presença do ácido ρ-cumárico neste estudo pode ocorrer dentre outros motivos analíticos, por conta deste composto apresentar alta volatilidade e baixa estabilidade, provavelmente pode ter se perdido ou degradado durante a etapa de extração (62) (6).

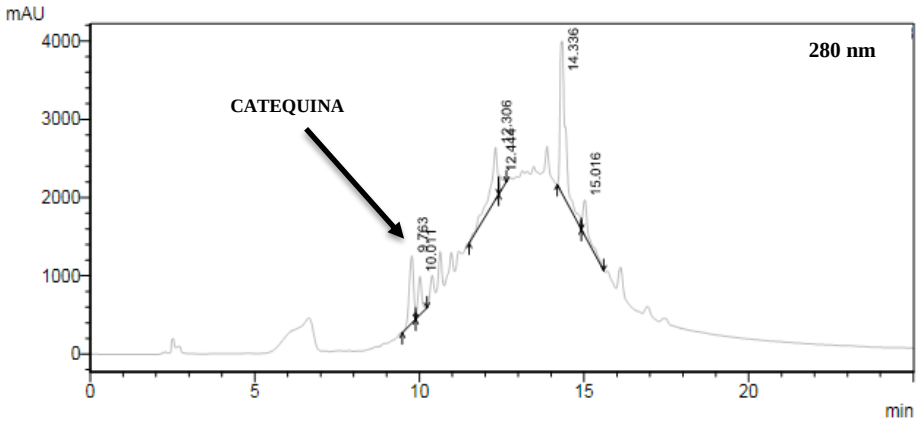
5.1.2.3 Rhodiola rosea L.

No fitoterápico *Rhodiola rosea L*. foram detectados também 4 compostos fenólicos ácido clorogênico (66,49 ± 1,28 mg kg $^{-1}$), ácido ρ-cumárico (79,97 ± 0,11 mg kg $^{-1}$), catequina (1954,36 ± 15,27 mg kg $^{-1}$) e canferol (161,61 ± 5,90 mg kg $^{-1}$).

Ao canferol e a catequina, compostos de maiores concentrações encontradas no RR, são proferidos os efeitos antiinflamatórios e efeitos protetores na sepse ao inibirem vários mediadores pró-inflamatórios, incluindo NO e ciclooxigenase (COX) 2 em macrófagos induzidos por LPS (lipoglicano) molécula responsável por promover resposta inflamatória, febre e vasodilatação (126). A estes flavonóides também são descritas propriedades antioxidantes no qual agem como necrófagos de superóxido, principalmente contra espécies ROS (127).

Ao ácido clorogênico, menor fração encontrada, são relatados seus efeitos antioxidantes, visto que conseguem neutralizar a oxidação de lipídios emulsificados. É sabido que o estresse oxidativo gera um desequilíbrio na produção celular de espécies reativas de oxigênio e que o cérebro consome altas quantidades de oxigênio. Um ambiente com rico teores de lipídios é considerado altamente suscetível ao estresse oxidativo, assim quando se o tem isso, implica em vários transtornos mentais, incluindo estresse emocional, que gera redução de agilidade mental, dos reflexos e da capacidade de realizar atividades (128) (129) (130). O ácido clorogênico portanto age inibindo a oxidação diminuindo tais sintomas que são algumas das indicações do RR.

O ácido ρ-cumárico que teve a terceira maior concentração encontrada se apresenta também com características antioxidantes, característica essa que origina do fato dos derivados do ácido cinâmico possuírem dupla ligação, que auxilia na estabilização do radical por ressonância do elétron desemparelhado (106).



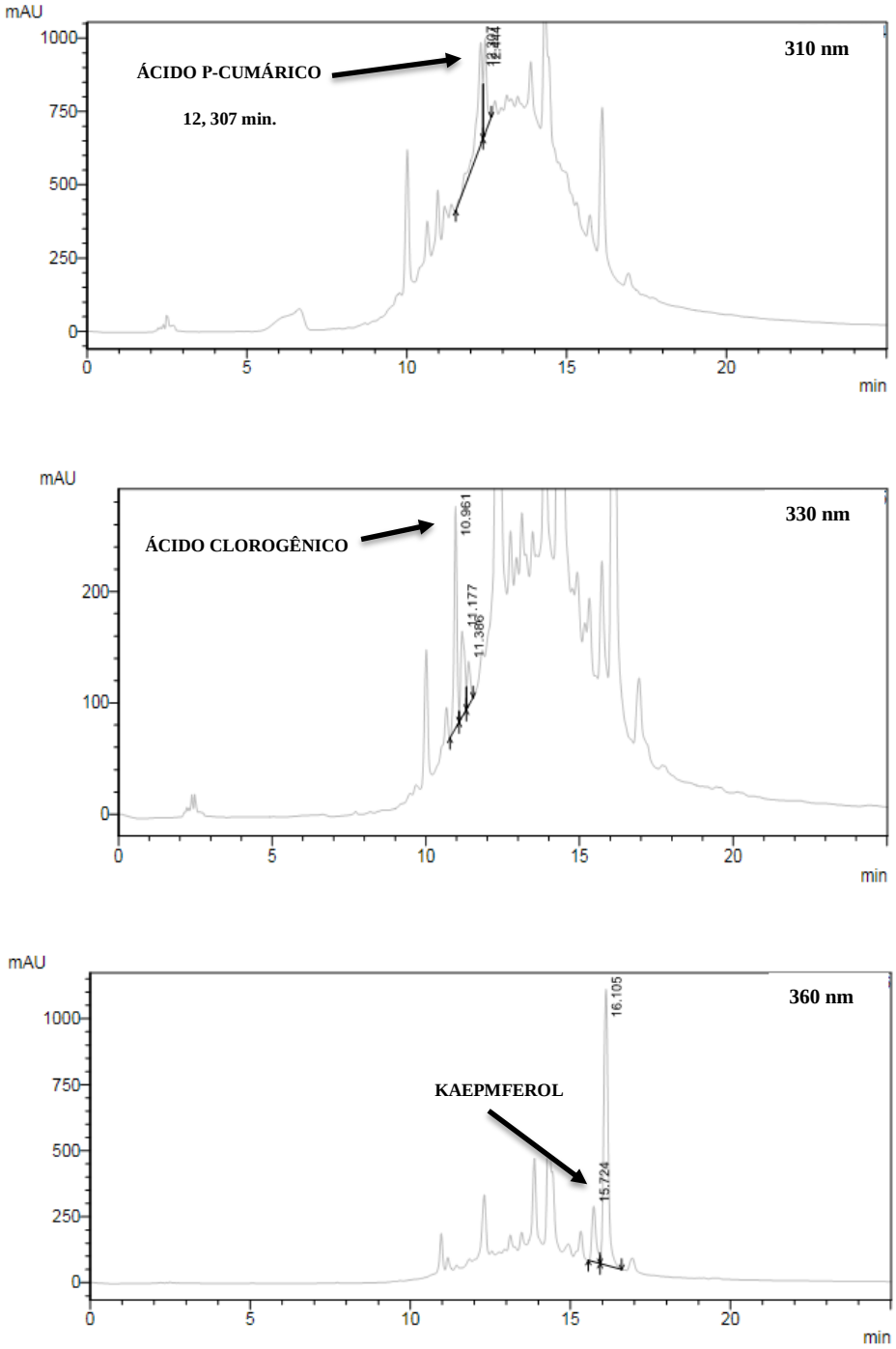


***Figura 15**. Cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no Rhodiola rosea L. em diferentes comprimentos de onda (nm):280,310,330 e 360 e seus respectivos tempos de retenção.*

Os cromatogramas encontrados na amostra RR foram dispostos na Figura 12, no qual são apresentados todos os compostos fenólicos identificados em diferentes comprimentos de onda com seus respectivos tempos de retenção. Para este fitoterápico foram identificados 4 fenólicos bioativos, ácido clorogênico (Tr = 10,961 min.), catequina (Tr = 9,763 min.), ρ-cumárico (Tr = 12,307 min.), canferol (Tr = 15,724 min.). Os comprimentos de onda analisados foram adquiridos entre 280 e 360 nm. Os

fenólicos relatados foram encontrados dentro dos tempos médios de retenção dos marcadores químicos descritos na Tabela 3.

Os tempos de retenções encontrados para o nosso analito foram parecidos com os encontrados nos trabalhos de Sá (2018) e Santos (2017), cujos métodos de detecção foram parecidos para o primeiro e semelhantes para o segundo. AC (10,5-10,6 min. min), APC (11,48 min), CQ (9,86-9,857 min) e KF (15,74 min). Para estes compostos tivemos uma variação menor entre os dados encontrados e os referenciados em relação aos bioativos fenólicos encontrados no *AH e MG* (3) (95).

Dentre os 13 compostos fenólicos estudados, os 4 identificados relatados acima já foram descritos por outros pesquisadores como o AC e CQ, encontrado por Adamczac et al. (2016) e o APC e KF descritos por Sist et al. (2018) (127) (131).

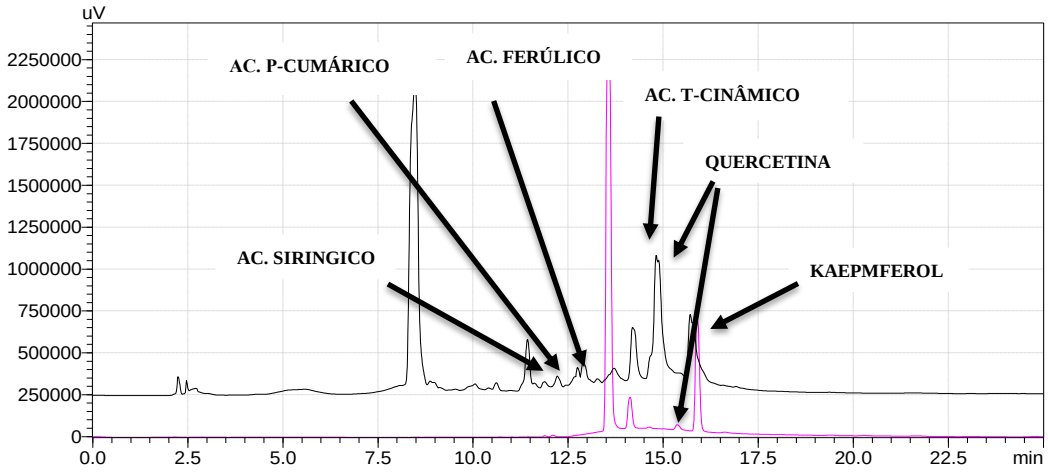


Figura 16. Sobreposição dos picos dos cromatogramas de substâncias fenólicas encontradas no Aesculus hippocastanum L. e na Mikania glomerata S.

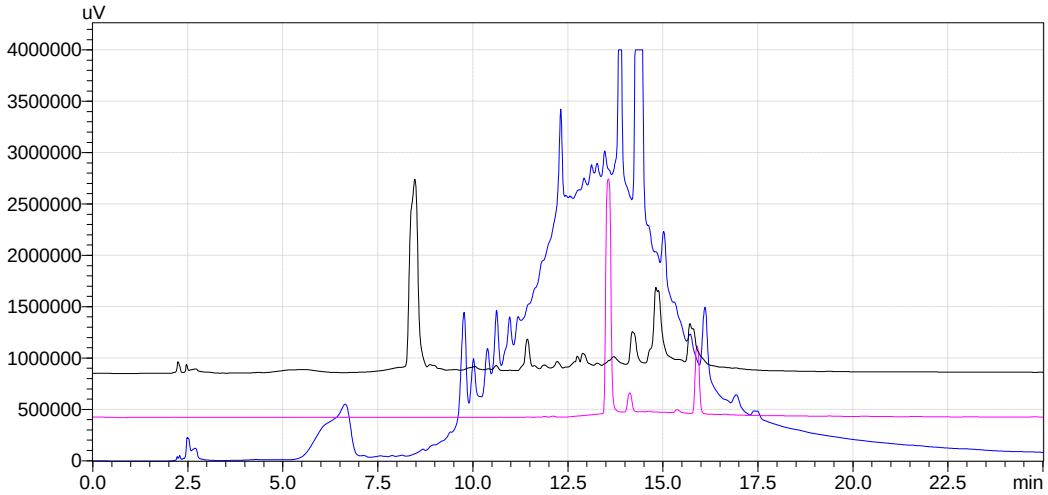


Figura 17. Os cromatogramas de substâncias fenólicas em diferentes comprimentos de onda (nm):260, 272,280; 310,330; 260 e 360 e seus respectivos tempos de retenção (RTmin)

Os cromatogramas foram descritos na Figura 13 e 14 o qual retrata as três amostras cada qual com uma cor específica, preto (*Aesculus hippocastanum L*), rosa (*Mikania glomerata S*.) e azul(*Rhodiola rosea L*.).

Comparando os três fitoterápicos as maiores concentrações de fenólicos bioativos, foram encontrados na *Rhodiola rosea L*.(catequina) e no *Aesculus hippocastanum L*.(quercetina). O único composto fenólico que foi detectados nos três fitoterápicos foi o canferol e o ácido gálico não foi detectado em nenhuma das amostras.

Quando analisamos os compostos com maiores concentrações e comparamos com a classificação dos compostos fenólicos bioativos analisados, verificamos que as maiores concentrações foram encontrados nos flavonóides, em seguida tivemos os hidrocicinâmicos e por ultimo os hidroxibenzóicos. Os flavonóides dentre o grupo de polifenois são os que apresentam maiores concentrações, o que corrobora os dados encontrados (1).

Ao compilarmos os cromatogramas e realizarmos a sobreposição de todos os comprimentos de onda em uma única tabela, alguns picos praticamente não apareceram devido a não distinção correta dos picos e as suas baixar concentrações. As faixas de análises escolhidas se deram tanto por estes compostos fenólicos bioativos serem detectados nestes comprimentos, e isso foi validado através de estudos anteriores, quanto ao fato de que em faixas entre 200 até 220 ocorre muita interferência de absorção do eluente, dependendo é claro do tipo de solvente ou reagente da fase móvel, o que gera uma ocultação das diferenças espectrais entre duas ou mais substâncias.

5.2 Quantificação de minerais

5.2.1 Desempenho analítico

A avaliação da exatidão do método analítico ocorreu a partir da comparação dos valores encontrados com os valores do material de referência certificado da Agência de Agropecuária de Referência CRM - Agro E1001a (Mandarú). Os resultados obtidos evidenciaram boa exatidão no procedimento da digestão e determinação dos elementos Cd, Cr, Fe, P e Zn a partir da utilização do MIP OES. A partir dos resultados descritos na Tabela 6 é possível demonstrar que não houve

diferenças significativas entre os valores certificados e encontrados. O nível de confiança foi de 95%.

***Tabela 6**.Comparação das concentrações dos valores encontrados com os valores do material de referência certificado.*

	Certificação do CRM	
Elementos	**Valor certificado com intervalo mg/kg**	**Valor encontrado mg/kg**
Zn	**8,3 a 11,5**	**9,61**
Cd	**14,8 a 25**	**24,65**
Fe	**78 a 104**	**88**
Cr	**1,64 a 4,96**	**4,3**
P	**0,46 a 0,84**	**0,63 g/kg**

Foram determinadas as concentrações de 18 elementos. Dentre os macro elementos foram determinados o P, S, Mg e Na e entre os microelementos Zn, Cd, Sr, Fe, Ba, Cu, Ni, As, Co, Pb, Mo, Mn, Cr e Al. Dentre os quais 5 (S, Sr, Ba, Ni e No) não puderam ser certificados, pois não eram determinados no CRM-Agro utilizado e 8 (A, Pb, Ca, Mg, Na, Cu, K e Mn) não validados por não de apresentarem no intervalo de confiança estabelecido pelo material certificado.

Tabela 7. Características analíticas para a determinação dos elementos químicos utilizando a técnica de MIP OES (Retirar)

Mineral	**Equação de regressão (y = ax + b)**	**Coeficiente de correlação**	**Valor experimental F**	**LD mgL^{-1}**	**LQ mgL^{-1}**
Cr	y = 29912x - 1144,3	0,997868941	2341,251805	0,07681	0,2560
Cd	y = 11635x - 667,35	0,99844945	3219,663218	0,0262	0,0872
Fe	Y= 7068,6x - 257,24	0,999248507	9307,794879	0,1383	0,0417
P	y = 1016,5x + 171,89	0,972353475	105,5127354	2,809	9,363
Zn	y = 6114,6x + 4422	0,959899279	143,6232442	0,1186	0,3952

Y é a intensidade e x é a concentração dos analitos (mgL^{-1}); LD= limite de detecção e LQ = limite de quantificação

As características analíticas que foram utilizadas como métodos de validação foram as equações de regressão, os coeficientes de regressão (R^2) dos mesmos, o valor experimental F e os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ), calculados a partir de 10 medidas do branco analítico, sendo todos estes dados dispostos na Tabela 5. Os coeficientes de correlação variaram entre 0,9599 e 0,9979, e as curvas que apresentaram melhor linearidade foram as de Cd, Cr e Fe. O LD e o LQ variaram respectivamente entre 0,0768-2,809 mgL^{-1} e 0,0417 - 9,363 mgL^{-1}.

5.2.2 Determinação da concentração de macro e microelementos nos fitoterápicos estudados

Os elementos foram determinados nas amostras de Fisioton (*Rhodiola rósea L.*), Varivax (*Aesculus hippocastanum*) e do Xarope de Guaco (*Mikania glomerata S.*) utilizando o MIP OES. A Tabela 8 apresenta os valores de concentração em µg g-1 dos metais analisados nas amostras.

Tabela 8. Concentração de Cr, Fe, P, Zn, Cd, nos fitoterápicos *Rhodiola rósea L, Aesculus hippocastanum e Mikania glomerata S.*

CONCENTRAÇÃO µg g^{-1}			
Elementos	Fitoterápicos		
	AH	MG	RR
Cr	19,87 ± 5,646	< LQ	19,99 ± 1,312
Fe	71,82 ± 17,22	8,683 ± 4,485	103,5 ± 4,520
P	281,07 ± 0,12	254,26 ± 4,55	205,37 ± 6,95
Zn	61,46 ± 4,902	55,11 ± 6,489	87,81 ± 1,795
Cd	-	-	-

Rhodiola rósea L(RR), Aesculus hippocastanum (AH) e Mikania glomerata S. (MG)

Os resultados apresentados pela Tabela 8 mostram que, entre os metais essenciais, o que apresentou maiores concentrações foi o fósforo (281,07 ± 0,12µg g^{-1}) no *Aesculus hippocastanum L.*. O fósforo também foi identificado no *Rhodiola rósea L*. e na *Mikania glomerata S.* com concentrações de (205,37 ± 6,95µg g^{-1}) e (254,26 ± 4,55µg g^{-1}) respectivamente. O fósforo compreende 1% do peso corporal total, sendo o sexto elemento mais abundante no corpo humano. Esse elemento desempenha um papel fundamental no desenvolvimento do esqueleto, metabolismo mineral e variadas funções celulares no qual envolve o metabolismo intermediário e mecanismos de transferência energética, tendo como recomendação diária como disposto na Tabela 8, 700.000 µg g^{-1} dia (132).

Tabela 9. Recomendação diária recomendada para adultos estabelecido pelo ministério de saúde na RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 e pelo FAO/WHO(1997) *(133) (134)*.

Elementos	Recomendação diária
Cr	35 µg g^{-1}
Fe	14.000 µg g^{-1}
P	700.000 µg g^{-1}
Zn	7.000 µg g^{-1}
Cd	7 µg g^{-1}

O ferro, segundo elemento com maior concentração apresentou concentrações de (103,5 ± 4,520µg g^{-1}) no *Rhodiola rósea L*., (71,82 ± 17,22µg g^{-1}) no *Aesculus hippocastanum L. e* (8,683 ± 4,485µg g^{-1}) na *Mikania glomerata S..*

A concentração diária de ferro referido na Tabela 8 descreve a recomendação diária segundo a RDC nº 269 de 22 de setembro de 2005 de 14.000 µg g^{-1}, evidenciando concentração muito abaixo do valor diário correspondendo a 0,74% para o RR, 0,51% para o AH e 0,062 % para o MG da quantidade diária recomendada para adultos.

As funções do ferro no organismo são descritas através de suas propriedades físico-químicas, principalmente por participar de reações de oxi-redução (135). As funções mais referidas ao ferro são as de atuar como vetor de oxigênio, servir como catalisador da oxidação, conversão de β-caroteno em vitamina A e atuar como constituinte das diástases oxidantes (136).

O zinco apresentou diferenças discretas entres os fitoterápicos analisados, apresentando concentrações de 61,46 µg g^{-1} (AH), 55,11 µg g^{-1} (MG) e 87,81 µg g^{-1} (RR). A recomendação diária deste microelemento diária é de 7.000 µg g^{-1}, estando todos os medicamentos com teores aceitáveis. O zinco apresenta, dentre outras, uma função primordial no sistema imune, podendo influenciar nos processos de fagocitose dos neutrófilos e macrófagos, proliferação de células T e B, produção de citocinas, dentre outros (137). Estudos ainda apontam que sua deficiência aumenta o estresse oxidativo celular, exacerbando eventos pró-inflamatórios e prejudicando os mecanismos na vasculatura (138). A alta presença do zinco no RR pode ser correlacionadas ao fato do zinco auxiliar em melhores funcionalidades cerebrais, o que condiz diretamente com sua funcionalidade. O zinco está presente em grandes concentrações no sistema nervoso central, mais especificamente nas vesículas sinápticas. Apesar da sua função no córtex ainda ser pouco conhecida, já se sabe que este elemento está envolvido com o desenvolvimento cognitivo, sendo essencial na migração neuronal, neurogênese e sinapses (139) (140).

O cromo foi detectado somente em dois fitoterápicos no *Rhodiola rósea L.* (19,99 µg g^{-1}) e no *Aesculus hippocastanum L*. (19,87 µg g^{-1}), com concentrações quase idênticas. A concentração diária de cromo estabelecida é de 35 µg g^{-1}, apresentando os fitoterápicos concentrações dentro da faixa de normalidade. O Cromo é um mineral-traço essencial que não é produzido pelo organismo, devendo, portanto, ser ingerida através de alimentos e/ou insumos. Este mineral atua principalmente no metabolismo de carboidratos, aumentando o estímulo de captação

de aminoácidos e aumentando sua síntese proteica, atuando também sobre a sanidade e no desempenho em humanos (141) (142).

Quando observamos a composição mineral destes fitoterápicos identificamos que a maior concentração encontrada foi a de fósforo (281,07 ± 0,12µg g^{-1}) encontrado no *Aesculus hippocastanum L*. e a menor concentração no ferro (8,683±4,485 µg g^{-1}) quantificado na *Mikania glomerata S.*. Diferenças composicionais podem estar associadas a origem, tipo de planta, estrutura dos vegetais analisadas e até do tipo de cultivo e clima em que foi coletado.

Em relação a comparação dos compostos minerais com outros trabalhos houve uma distinção sutil, tanto nas concentrações encontradas quanto em alguns elementos achados para estes mesmos fitoterápicos. Pojja et al. (2006) descreve em seu estudo que para o RR foram encontrados, cobre, ferro, cálcio, zinco, sódio e potássio em concentrações respectivas de (0,57 ppm), (395 ppm), (3761 ppm), (24,62 ppm), (1143 ppm) e (9316,5 ppm). Dos elementos determinados nesse estudo, tivemos determinação do zinco e ferro também descritos por Pojja et al. (2006) (140). Ao observar a Tabela 7 percebemos diferenciações nas concentrações encontradas, isto se deve tanto a metodologia utilizada de análise que para esse autor foi o AAS, quanto pelo fato da análise ser relizada diretamente com a raíz do *Rhodiola rosea L.* , enquanto o nosso foi feito através do medicamento fitoterápico previamente tratato.

Andrade et al. (2005) (143) retrata em seu estudo, as concentrações de cobre, ferro e zinco em 15 fitoterápicos, descreve concentrações respectivas de (1,75 ± 0,21 mg%), (6,82 ± 0,20 mg%) e (3,48 ± 0,37 mg%) para a MG. Nesse estudo foi utilizado também do AAS, usando 2 gramas de amostras das ervas secas, diferenciando a técnica bem como o modo em que a amostra se encontra (143).

5.3 Triagem Virtual Inversa

As onze substâncias que foram identificadas pelo método HPLD-DAD, ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido elágico, ácido ferúlico, ácido ρ-cumárico, ácido siringico, ácido t- cinâmico, ácido vanílico, catequina, quercetina e canferol foram submetidas aos servidores de triagem virtual inversa.

As técnicas nas quais se baseiam no *fingerprint* se utilizam de métodos simples a fim de prever alvos, se baseando no conhecimento da bioatividade de moléculas semelhantes e com sua semelhança química. Estas semelhanças implicam em

propriedades parecidas, fazendo com que se possa predizer os alvos de determinadas moléculas a partir da identificação de proteínas ligantes conhecidas (91).

Na Tabela 10 é descrito o quantitativo de alvos moleculares encontrados para cada composto fenólico analisado.

Tabela 10. Quantidade de alvos moleculares no servidor ChemProt 2.0

	SERVIDOR
FENÓLICO BIOATIVO	ChemProt 2.0
ÁCIDO VANÍLICO	606
ÁCIDO CAFEICO	505
ÁCIDO CLOROGÊNICO	137
ÁCIDO ELÁGICO	3189
ÁCIDO FERÚLICO	480
ÁCIDO SIRINGICO	1055
ÁCIDO T-CINÂMICO	250
ÁCIDO P-CUMÁRICO	299
CATEQUINA	3422
CANFEROL	8486
QUERCETINA	2856

Para a busca dos principais alvos encontrados foram selecionados no servidor Chemprot 2.0 os alvos que apresentavam CT >0,89 e bioatividade < 3600nM e que fossem encontrados em humanos. Abaixo, na Tabela 11, são apresentados os principais alvos encontrados para cada compostos fenólicos, encontrados a partir da análise no CLAE DAD.

Tabela 11. Atividades encontradas para os ligantes avaliados

Fenólico bioativo	**Alvo**	**CT**	**Ki(nM)**
(+)-catequina	Anidrase carbônica 7	1	450,00
Ac. Vanílico	Anidrase carbônica 1	0,96	2890
	Anidrase carbônica 2	0,96	2400
Ac. Elágico	Anidrase carbônica 1	1	2320
	Anidrase carbônica 2	1	2180
Ac. Siríngico	Anidrase carbônica 2	1	3190
	Anidrase carbônica 5B mitocondrial	1	3540
Ac. Ferúlico	Anidrase carbônica 1	1	2890
	Anidrase carbônica 2	1	2400
Ac. T-cinâmico	Anidrase carbônica 9	0,9	1,5
Ac. ρ-cumárico	Anidrase carbônica 7,9 e 12	0,89	1
Ac. Clorogênico	-	-	-
Ac. Cafeico	Anidrase carbônica 7,9 e 12	0,86	1
	Anidrase carbônica 2	1	1610
Quercetina	Receptor alfa-2C adrenérgico	1	4

canferol	Receptor de adenosina A3	1	3150

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para os onze fenólicos bioativos encontrados nos três fitoterápicos estudados. Observa-se que em alguns compostos fenólicos alvos iguais foram selecionados para diferentes tipos de ácidos, com CT iguais, como foi o caso do ácido elágico e o ácido ferúlico com valores iguais a 1. O ácido vanílico apesar de ter os mesmos alvos dos compostos citados anteriormente, obteve os alvos no Coeficiente Tanino de 0,96.

A anidrase carbônica (AC) foi encontrada em 9 dos 11 fenólicos estudados, diferenciando somente o tipo de anidrase carbônica, que são caracterizados por números após o nome. Os tipos de anidrase são distinguidas a partir do local em que são encontradas. As AC 1,2,7 ficam no citoplasma, as AC 9 e 12 estão associadas à membrana plasmática das células e a 5B não mitocondriais. Dos 2 compostos que tinhas alvos diferentes, citamos a quercetina no qual o alvo foi o Receptor alfa-2C adrenérgico e o canferol cujo alvo foi o Receptor de adenosina A3, os dois com CT = 1.O ácido clorogênico não apresentou nenhum resultado de Ki no ChemProt 2.0, não sendo possível, portanto determinar segundo esse critério a sua similaridade e afinidade com os receptores alvos.

A partir dos resultados obtidos, é possível verificar que há várias proteínas alvo em comum, frente a diferentes moléculas consultadas. Tal fato pode ser explicado por todos serem considerados compostos fenólicos. Suas estruturas possuem ao menos um núcleo em comum com a respectiva molécula consultada, o que leva a apresentarem similaridade e/ou semelhança ao ser consultado no servidor, sendo justamente essa semelhança química que faz com que seja possível a determinação do potencial de atividade sobre os alvos selecionados (91).

A similaridade de alvos encontrados é ainda maior quando comparamos dentre o grupo dos compostos fenólicos, os ácidos fenólicos e os flavonóides. Dentre os ácidos fenólicos, podendo citar o ácido vanílico, siríngico, ferúlico, t-cinâmico, *p*-cumárico e o cafeico, percebemos que todos apresentaram como alvo a anidrase carbônica. Já quando observamos os flavonóides, cita-se a quercetina e canferol, percebemos que foram encontrados alvos moleculares distintos quando comparados aos ácidos fenólicos, se devendo isso a sua diferença estrutural possuindo em vez de um, dois anéis benzênicos em sua base, acarretando diferenças de ligações entre os

compostos e os alvos moleculares em relação aos ácidos fenólicos que possuem apenas um anel benzênico. É claro que pode haver semelhanças de alvo mesmo dentre diferentes subgrupos dos compostos como podemos citar a catequina, que mesmo sendo caracterizada como flavonóide também apresentou como alvo a anidrase carbônica.

A anidrase carbônica 1(AC1) encontrada nos eritrócitos e no trato gastrointestinal foi descrito como alvo em 3 ácidos fenólicos, o ácido vanílico, elágico e o ferúlico com CT de 0,96 para o primeiro e 1 para os outros 2. As constantes de inibição foram respectivamente de 2890, 2320 e 2890 nM novamente. Suas funções básicas são descritas na defesa antirrefluxo, trocas gasosas e transporte de íons. Como processos biológicos, a AC1 regula sinais moleculares no quais a interleucina-12 está presente (144).

A anidrase carbônica 2(AC2) foi determinada como alvo para 5 compostos fenólicos, ácido vanílico, ácido elágico, ácido siríngico, ácido ferúlico e ácido cafeico. O CT variou entre 0,96 e 1, descrevendo boa semelhança entre os compostos analisados e o seu alvo. Os valores de Ki foram respectivamente 2400nM, 2180 nM, 3190 nM, 2400 e 1610 nM. O AC2 é expresso em quase todas as células e dentre suas funções podemos citar a regulação positiva da transmissão sináptica, GABAérgico pelo qual ocorre aumento, ativação ou manutenção dos processos de comunicação de um neurônio a outro através do GABA, aumento do pH intracelular, formação de resposta autoimune e formação de anticorpos (91).

A Anidrase carbônica 5B (AC5B), mitocondrial foi tida como alvo ao ácido siríngico, com CT=1 E Ki de 3540, o mais alto dentre os demais analisados. O local de expressão do AC5B é no pâncreas, rins, glândulas salivares, medula espinhal, coração, músculo esquelético e mucosa gastrintestinal, sendo atuante em reações biosintéticas e na desintoxicação da amônia (144).

A anidrase carbônica 7 encontrada no sistema nervoso central, foi tida como alvo em 3 compostos fenólicos, na catequina, no ácido ρ-cumárico e no ácido cafeico. Os valores de CT foram respectivamente 1, 0,89 e 0,86. As constantes de inibição foram respectivamente de 450, e 1 nM para os demais. Suas funções nos processos biológicos estão na regulação positiva do pH celular e da transmissão sináptica, GABAérgico, mesma função do AC2 e na produção de liquor (144).

A anidrase carbônica 9(AC9) encontrada em parte do sistema nervoso central, fígado, coração, intestino delgado, cólon, rins, bexiga urinária, músculo esquelético e cérebro foi tido como alvo em 3 compostos fenólicos, no ácido transcinâmico, no ácido ρ-cumárico e no ácido cafeico. Os valores de CT foram respectivamente 0,9, 0,89 e 0,86. As constantes de inibição foram respectivamente de 1,5, e 1 nM para os demais. As funções descritas para o AC9 são o de absorção de bicarbonato, modulação da transmissão neuronal e regulação da transcrição do promotor da RNA polimerase II em resposta à hipóxia.

A anidrase carbônica 12 (AC12) foi encontrada como alvo para o ácido ρ-cumárico e para o ácido cafeico, o primeiro com CT=0,89 e o segundo CT=0,86. A AC12 é encontrada em diversos locais como o cólon, rins, próstata, intestino, linfócitos ativos, pulmões, e olhos estando relacionada com a regulação do pH e da homeostase do CO_2 em diferentes tecidos (145).

O alvo identificado na quercetina foi o receptor alfa-2C adrenérgico com CT = 1 e Ki de 4nM. Dentre os processos biológicos que esse alvo está envolvido podemos citar o da regulação positiva da vasoconstrição e de ativação plaquetária. Esta regulação positiva faz com que ocorra um aumento na vasoconstrição, sendo este o estopim para a liberação de mediadores inflamatórios no organismo (146).

No canferol foi identificado o alvo Receptor de adenosina A3 com CT = 1 representando a semelhança da molécula com o alvo e Ki de 3150 nM. No processo biológico o Receptor de adenosina A3 atua na resposta inflamatória, no qual se caracteriza por uma vasodilatação local que gera um extravasamento de plasma e acúmulo de macrófagos e leucócitos (147).

Quando comparamos a atuação dos alvos no organismo com as funções relatadas para os compostos fenólicos estudados, percebemos a importância destas ligações com os alvos no organismo, podendo a maioria de acordo com a comparação de sua atividade com dados da literatura auxiliar na função farmacológica dos fármacos em questão. Podemos citar o Receptor de adenosina A3 que pode atuar na resposta inflamatória do canferol encontrado nos três fitoterápicos encontrados. A anidrase carbônica 7, proteína alvo da catequina que presente no RR regula a transmissão sináptica GABAérgico, que no caso deste fitoterápico auxilia no seu mecanismo de ação ao melhorar a capacidade mental dos pacientes. Citando também o receptor alfa-2C adrenérgico tido como alvo da quercetina foi descrito como

envolvido na regulação da vasoconstrição e na ativação plaquetária o que auxilia na melhora dos pacientes em uso do AC, no qual possuem insuficiência venosa, e em pacientes em uso de MG no qual sofrem de alguma doença no trato respiratório que em sua maioria das vezes gera uma inflamação no músculo liso dos brônquios.

5.4 GUSAR Antitarget/Toxicity Prediction

A toxicidade aguda foi predita pelo servidor GUSAR Antitarget/Toxicity Prediction Esta determinação *in sílico* foi realizada baseada na predição de valores de dose letal média em ratos em 4 vias de administração (oral, intravenosa, intraperitoneal e subcutânea). Os resultados encontrados foram dispostos na Tabela 12, na qual é descrito a dose considerada letal e a classificação de cada compostos fenólicos estudados nas 4 vias de administração.

Tabela 12. Toxicidade aguda em camundongos predita pelo GUSAR

Via de administração	IP	IV	VO	SC
		(+)-Catequina		
DL_{50} (mg/kg)	1229	737,9	2022	1498
Classificação	Classe 5	Não tóxico	Classe 5	Classe 5
		Ac. Vanílico		
DL_{50} (mg/kg)	1731	237,6	1725	1225
Classificação	Não tóxico	Classe 4	Classe 4	Classe 5
		Ac. Elágico		
DL_{50} (mg/kg)	917,2	152,5	1712	1927
Classificação	Classe 5	Classe 4	Classe 4	Classe 5
		Ac. Siríngico		
DL_{50} (mg/kg)	1365	248	1331	1553
Classificação	Não tóxico	Classe 4	Classe 4	Classe 5
		Ac. Ferúlico		
DL_{50} (mg/kg)	682,3	224,4	2754	1058
Classificação	Classe 5	Classe 4	Classe 5	Classe 5
		Ac. T-cinâmico		
DL_{50} (mg/kg)	864,7	363,5	2783	333,9
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Classe 4
		Ac. p-cumárico		
DL_{50} (mg/kg)	692,3	303,2	2181	578,7
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Classe 4
		Ac. Clorogênico		
DL_{50} (mg/kg)	1416	229,3	3927	343,2

Classificação	Não tóxico	Classe 4	Classe 5	Classe 4
		Ac. Cafeico		
DL_{50} (mg/kg)	890,2	361,4	2386	574,7
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Classe 4
		Quercetina		
DL_{50} (mg/kg)	920,3	2089	1892	3550
Classificação	Classe 5	Não tóxico	Classe 4	Não tóxico
		canferol		
DL_{50} (mg/kg)	1163	392,6	2183	5938
Classificação	Classe 5	Classe 5	Classe 5	Não tóxico

oral (VO), intravenosa (IV), intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC)

A dose letal mediana (DL_{50}) é descrita como a dose necessária de uma substância necessária para matar 50% da população teste. Observando os dados, percebe-se que a predição da (+) -catequina e do canferol apresentaram as mais baixas toxicidades agudas de todos os outros compostos analisados, tendo classificação 5 ou ausência de toxicidade nas 4 vias analisadas. Quando analisamos o ácido siríngico, elágico, e vanílico percebemos que os três apresentam classe 4 nas vias intravenosas e via oral. Em um estudo feito por Beserra (2010) no qual foi avaliado a toxicidade do ácido elágico em roedores por via oral, em sua análise com doses de 500 e 1000 mg/kg não houve letalidade nessa via de administração (148).

O ácido clorogênico apresenta classe 4 em duas vias, oral e subcutânea. O ácido ferúlico apresentou classe 4 na via IV e a quercetina na VO, todos os restantes se apresentaram dentro na classe 5. Os ácidos cafeico, *p*-cumárico e cinâmico apresentaram toxicidade aguda baixa em todas as vias analisadas, se apresentando somente na via subcutânea com Classe de 4, estando as demais vias na Classe 5.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de fitoterápicos no Brasil tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e com esse aumento existe uma maior necessidade de controle de qualidade, tanto para as indústrias que os produzem quanto para os órgãos regulamentares de vigilância.

Os tempos de retenção variaram entre 9,763 e 15,724, sendo a catequina separada em menor tempo e o canferol em maior tempo. Os compostos fenólicos encontrados variaram em relação a cada fitoterápico analisado, sendo os flavonóides dentre os metabólitos secundários, o mais prevalente. Foram encontrados para o *Aesculus hippocastanum L*. (ácido elágico, ácido ferúlico, ácido ρ-cumárico, ácido siríngico, ácido t- cinâmico, ácido vanílico, quercetina e canferol), para o *Mikania glomerata S. (*ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e canferol) e para o *Rhodiola rosea L.* (ácido clorogênico, catequina ácido ρ-cumárico e canferol). As concentrações dos compostos bioativos analisados variaram de cada fitoterápico (0,320 e 1.943,36 mg kg $^{-1}$), demonstrando as diferenças entres os metabólitos secundários, o que auxilia em suas caracterizações. Ao comparar os tempos de retenção de compostos fenólicos encontrados em dois ou mais fitoterápicos simultaneamente, percebemos que não houve diferenças significativas, demonstrando a representatividade da técnica. Os resultados, portanto, indicam que estes fitoterápicos são uma grande fonte de polifenois, mais especificamente de flavonóides, sendo assim são grandes fontes de espécies antioxidantes.

Em relação a composição mineral destes fitoterápicos, a maior concentração encontrada foi a de fósforo (281,07 ± 0,12 µg g-1) no Rhodiola rosea L. e a menor concentração foi de ferro (8,683±4,485 µg g-1) quantificado na Mikania glomerata S..

A predição de atividades *in silico* foi realizada em todos os compostos fenólicos identificados nos três fitoterápicos estudados, o que nos permitiu levantar variados alvos potenciais para cada substância analisada, reforçando assim, a importância de se melhorar o estudo das atividades biológicas desses compostos.

Ao realizar análises de toxicidade aguda dos compostos fenólicos encontrados verificou-se a baixa toxicidade das substâncias analisadas, tendo a (+) -catequina o canferol os valores mais baixos de toxicidade entre os compostos analisados.

Nesse sentido, nota-se que os fitoterápicos constituem uma fonte diversificada de compostos com atividades químicas e biológicas variadas, pelo qual ao se conhecer melhor suas funcionalidades e proteínas alvos, pode-se melhorar a sua atuação no organismo e explorar toda a sua funcionalidade biológica.

7 PERSPECTIVA

Algumas perspectivas para este trabalho são a obtenção de uma quantidade maior de compostos fenólicos isolados para estes fitoterápicos, a fim de se realizar uma caracterização mais aprofundada e detalhada. Também a realização de testes para a verificação das atividade antioxidantes in vitro destes compostos, bem como avaliação de mais proteínas alvos o que contribuiria para a avaliação das diversas funcionalidades dos compostos encontrados em cada fitoterápico.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 OLIVEIRA, F. G. S. **Estudo fitoquímico e incorporação do extrato etanólico de hymenaea martiana hayne (fabaceae) em uma formulação fitocosmética. 2019. 191f.** Tese (Doutorado Acadêmico em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. 2019.

2 LIMA, F. O. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais. 2013. 145f.** Tese (Doutorado em Química analítica) - Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria. 2013.

3 SÁ, R. R. E. A. Multielementar/centesimal composition and determination of bioactive phenolics in dried fruits and capsules containing Goji berries (Lycium barbarum L.). **Food Chemistry**, v. 273, p. 15-27, 2018.

4 VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Berlin: Springer, 2007.

5 PANOSSIAN, A. W. G. S. J. Rosenroot (Rhodiola rosea): Traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. **Phytomedicine**, v. 17, p. 481-493, 2010. Disponivel em: <http://intraspec.ca/Panossian2010.pdf>. Acesso em: 16 abril 2020.

6 SILVA, L. S. E. A. Preparation of Dry Extract of Mikania glomerata Sprengel (Guaco) and Determination of Its Coumarin Levels by Spectrophotometry and HPLC-UV. **Molecules**, v. 17, p. 10344-10354, 2012.

7 SIRTORI, C. R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile, 44, 2001. 183-193.

8 LU, Y. E. A. Chemical Fingerprint and Quantitative Analysis of Cirsium setosum by LC. **Chroma**, v. 70, p. 125-131, 2009.

9 WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Plant Medica**, v. 75, p. 719-734, 2009. ISSN 7.

10 HUSSAIN, J. E. A. Assessment of herbal products and their composite medicinal plants through proximate and micronutrients analyses. **Journal of Medicinal** , v. 3, p. 1072-1077, 2009.

11 KARLSSON, S.; SJOBERG, V.; OGAR, A. Comparison of MP AES and ICP-MS for analysis of principal and selected trace elements in nitric acid digests of Sunflower (Helianthus annuus). **Talanta**, p. 18, 2014.

12 LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **J. Chromatogr. B**, v. 8012, p. 53–70, Dec 2004. ISSN 1-2.

13 DONNO, D. E. A. Phytochemical fingerprint and chemometrics for natural food preparation pattern recognition: an innovative technique in food supplement quality control. **Food Sci. Technol.**, v. 53, p. 1071-1083, 2016.

14 BELEZA, J. A. M. **Plantas medicinais e fitoterápicos na atenção primária à saúde: contribuição para profissionais prescritores. 2016. 58f.** Monografia (Especialização em Gestão da Inovação de Medicamentos da Biodiversidade) - – Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos. Rio de Janeiro. 2016.

15 GILBERT B, F. J. A. L. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. **Sépia Editora e Gráfica**, Curitiba:, 2005.

16 RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **J. Ethnopharmacol.**, v. 39, p. 605-613, 2001.

17 MELRO, J. C. L. E. A. Ethnodirigid study of Medicinal plants used by the population assisted by the "Programa de Saúde da Família" (Family Health Program) in Marechal Deodoro - AL, Brazil. **Braz. J. Biol.**, v. 80, p. 410-423, 2020.

18 BRASIL. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos , Brasilia, DF, 2001.

19 ANVISA. Resolução RDC nº 26, 13 de maio de 2014. **Registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.**, Brasília, 13 mai 2014.

20 ALONSO, J. **Fitomedicina:** curso para profissionais da área da saúde. São Paulo: Pharmabooks, 2008.

21 PARACAMPO, N. E. N. P. Fingerprinting e análise multivariada aplicados ao estudo de identidade e qualidade de fitoproduto de ajuru (chrysobalanus icaco linnaeus). **2017. 185f. Dissertação (Doutora em Ciências) - Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, 2017.

22 SIMÕES, C. M. O. E. A. **Plantas da medicina popular do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 1996.

23 MARCOS, A. C. O. Fitoterápico: Perfil fitoquímico, controle e validação da metodologia analítica. **Universidade Federal de Pernambuco**, p. 103, 2005.

24 LIANG, Y.; XIE, P.; CHAN, K. Chromatographic Fingerprinting and Metabolomics for Quality Control of TCM. **Comb. Chem. High Throughput Screen.**, v. 13, p. 943–953, Dec 2010. ISSN 10.

25 SIMÕES, C. M. O. E. A. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5º. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2004.

26 DENISOV, E. T. Oxidation and antioxidants in organic chemistry and biology. **Francis Group**, Boca Raton, p. 981, 2005.

27 HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoides. **Pharmacology: Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

28 ORAK, H. H. E. A. Antioxidant potential and phenolic compounds of some widely consumed Turkish white bean (Phaseolus vulgaris L.) varieties. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 66, n. 4, p. 253-260, 2016.

29 MOURA, D. E. A. Revisão, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

30 FERNANDÉZ, E. F.; ROMERO, M. G.; PARCORBO, A. C. J. Application and potential of capillary electroseparation methods to determine antioxidant phenolic compounds from plant food material. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, n. 53, p. 1130-60, 2010.

31 EL-SEEDII, H. R. E. A. Biosynthesis, natural sources, dietary intake, pharmacokinetic properties, and biological activities of hydroxycinnamic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10877-10895, 2010.

32 PHAN, T. T. E. A. Phenolic compounds of Chromolaena odorata protect cultured skin cells from oxidative damage: implication for cutaneous wound healing. **Biological e Pharmaceutical Bulletin**, v. 24, n. 12, p. 1373-1379, 2001.

33 AQUINO, F. L. T. **Efeito dos ácidos trans-cinânico, p-cumârico e cinamato de metira, sobre a migração de fibroblastos in vitro. 2019.73f.** Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal de Alagoas. Maceió. 2019.

34 HAVSTEEN, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. **Pharmacology: Therapeutics**, v. 96, n. 4, p. 67-202, 2002.

35 PIETTA, P. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 1, p. 1035-1042, 2000.

36 DRIDI, A. **Chemical composition and bioactivity of different botanical parts of Aesculus hippocastanum L. fruits**. 2019. 90f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Tunisia Private University. Bragança. 2019.

37 BRUNETON, J. **Farmacognosia- Fitoquímica Plantas Medicinales**. Espanã: Acíbia, 2001.

38 SANTOS, S. D. C. E. A. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5º. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2003.

39 ANDRÉ, M. F. **Determinação de compostos fenólicos em extrato de carqueja empregando técnicas cromatográficas e eletroforéticas**. 2014. 159f. Tese(Doutorado em Ciências) - INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP. Campinas. 2014.

40 KAPUSTA, I. E. A. Flavonoids in horse chestnut (Aesculus hippocastanum) seeds and powdered waste water byproducts. **J Agric Food Chem**, v. 55, n. 21, p. 8485-8490, 2007.

41 BOGGIA, R. E. A. Feasibility of UV-VIS-Fluorescence spectroscopy combined with pattern recognition techniques to authenticate a new category of plant food supplements. **J Food Sci Technol**, v. 54, n. 8, p. 2422-2432, 2017.

42 SANTOS, A. Desenvolvimento e Validação de Métodos por HPLC-DAD-ELSD para Controle de Qualidade Químico do Látex de Hancornia speciosa Gomes, São Cristovão, p. 1-155, March 2016.

43 TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: A review, v. 690(2), p. 148-161, 2011.

44 WANG, C. E. A. High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 55, p. 95-104, 2015. ISSN 1.

45 SKOOG, D. A. E. A. **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução de Robson Mendes Matos. 9. ed atual. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017.

46 CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia Líquida de alto desempenho:** HPLC. São Paulo: Edgard Blucher, 2003.

47 COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; PIERINA, S. B. **Fundamentos de Cromatografia**. [S.l.]: Editora da UNICAMP, 2006.

48 WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. Photodiode Array (PDA) and other detection methods in HPLC of plant metabolites. In: High performance liquid chromatography in phytochemical analysis, New York, p. 331-346, 2011.

49 SANTOS, A. D. C. Desenvolvimento E Validação De Métodos Por HPLC-DAD-ELSD Para Controle De Qualidade Químico Do Látex Do Caule E Do Fruto De Mangaba (Hancornia Speciosa Gomes), Sergipe, Fevereiro 2012.

50 RAIMUNDO, V. P. **Validação de um método para a quantificação de compostos validação de um método para a quantificação de compostos acoplada a espectrometria de massas de alta resolução para atender a demanda do laboratório do instituto de ciência e tecnologia de alimentos**. 2018. 91f. Dissertação (Mestre em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Ouro Preto. Porto Alegre. 2018.

51 MIGUES, V. H. Utilização dos métodos CLAE-DAD, UV e análise multivariada no controle de qualidade de plantas medicinais e fitoterápicos, Salvador, p. 447, 2018. Disponivel em: < http://repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/28044>.

52 WORLD HEALTH ORGANIZATION, (. **World Health Organization Monographs on Selected Medicinal Plants**. Geneva: World Health Organization, 2002.

53 ENCLOSURE. Encyclopaedia Britannica. **Encyclopaedia Britannica, inc.**, 29 April 2019. Disponivel em: <https://www.britannica.com/plant/buckeye>. Acesso em: 10 March 2020.

54 GUERRA, E. A. Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica aplicados á Forma Farmacêutica sólica Aesculus Hippocastanaceae L. (Castanha da Índia). **UFPE**, Recife, p. 82, 2009.

55 BRITO, A. M. S. E. A. Avaliação da qualidade de cápsulas de castanha da Índia (Aesculus hippocastanum L.). **Revista Faculdade Montes Belos (FMB)**, Montes Belos, v. 7, p. 8, 2014. ISSN 1.

56 MELO, J. G. E. A. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha da índia (Aesculus hippocastanum L.), capim-limão (Cymbopogon citratus (DC.) Stapf) e centela (Centella asiática (L.) Urban). **Acta Botânica Brasileira.**, v. 21, p. 27-35, mar 2003. ISSN 1.

57 DUTRA, L. S. Desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para quantificação de B-escina de Aesculus HIPPOCASTANUM L.(castanha da índia), Juiz de Fora, p. 89, 2012.

58 WILKINSON, J. A.; BROWN, A. M. G. Horse chestnut - Aesculus hippocastanum: potential applications in cosmetic skin-care products, 21, 1999. 437-447.

59 MORIMOTO, S.; NOMAKA, G. L.; NISHIOKA, L. Tannins and related compounds, ILIX. Aesculitannins, Novel Proanthocyanidins with Doubly-Bonded Structures from Aesculus hippocastanum L., 35, 1987. 4717-4729.

60 BOMBARDELLI, E. M. P. G. A. Aesculus hippocastanum L.1996, 6. 483-511.

61 BREMER, K. Asteraceae: cladistics and classification. **Nordic Journal of Botany**, v. 14, p. 758, 1994. ISSN 4.

62 UENO, V. A. Comparação dos compostos voláteis de duas espécies de guaco (Mikania glomerata Sprenguel e Mikania laevigata Sch.Bip. ex Baker) e os potenciais biológicos de seus óleos essenciais. **UNICAMP**, SÃO PAULO, p. 121, 2018.

63 SILVA, L. S. Mikania glomerata Sprengel (Guaco): obtenção de extrato seco e determinação do nível de cumarina por espectrofotometria. **2012. 63f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora**, Juiz de Fora, 2012.

64 BERTOLDI, F. C. et al. Validação de um método analítico rápido por CLAE-UV para determinação de, Campinas, 18, 29 Jan 2016. 316-325.

65 GRAÇA, C. Determinação da toxicidade pré-clínica do xarope de guaco (Mikania laevigata Schultz Bip. ex. Baker) em roedores.Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Curitiba, 2004. 155.

66 BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. I. E. D. D. A. F. E. I. E. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : Mikania glomerata Spreng., Asteraceae – Guaco / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos., Brasília: Ministério da Saúde, 2018. 92.

67 LORENZI, H.; MATOS, F. J. D. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas., 2008.

68 LEOPOLDO, B. . E. A. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de Mikania laevigata (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional, 18, n. 4, 2008. 577-582. Disponivel em: <>. Acesso em: 31 march 2020.

69 CZELUSNIAK, K. E. et al. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando, Botucatu, 14, 2012. 400-409.

70 MAIZA, R. D. A. E. A. Antifungal activity of essential oils on non Candida albicans yeasts., 94, n. 3, 2013. 227–233.

71 CORRÊA, M. F. P. E. A. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma., 18, 2008. 785-797.

72 OSORIO, A. D. C. **Controle de qualidade do extrato fluido e tintura de guaco(Mikania glomerata Sprengel)**. 2002. 135f. Tese(Dourodado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo. São Paulo. 2002.

73 SANTOS, S. C. Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker e M. glomerata Sprengel e ação de M. laevigata na inflamação alérgica pulmonar., Itajaí, 2005. 93.

74 CASPI, R. The MetaCyc database of metabolic pathways and. **Nucleic Acids Research**, v. 46, 2018.

75 OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, v. 14, 1998. 400-409 p.

76 COUTINHO, L. A. E. A. Chemical composition, biological activity and safety of use of plants from genus Mikania. **Fitos**, v. 1, p. 118-144, 2020.

77 CZELUSNIAK KE, E. A. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, n. 2, p. 400-9, 2012.

78 SANTOS, T. C.; CABRAL, L. M.; TOMASSINI, T. C. B. Contribuição para o estudo de Mikania glomerata Sprengel. In Proceedings of the Symposium of Medicinal Plants of Brazil, Florianópolis, p. 14, sept. 1996.

79 TORELLO, C. O. Avaliação dos efeitos do extrato padronizado de Rhodiola rosea L. na resposta imunohematopoética de camundongos infectados com Listeria monocytogenes. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas., São Paulo, 2009.

80 SEQUEIRA, E. B. Plantas com ação adaptogénica usadas no combate ao stress: Panax ginseng e Rhodiola rosea, COIMBRA, p. 42, set. 2013.

81 KELLY, G. S. Rhodiola rosea: A Possible Plant Adaptogen: Alternative Medicine Review, v. 6, p. 293-302, 2001.

82 BROWN, R. P. . G. P. L. . V. Z. Rhodiola rosea: a phytomedicinal. **HerbalGram**, v. 56, p. 40-52, 2002.

83 BLOMKVIST J., T. A. . L. D. Perspective on roseroot (Rhodiola rosea) studies. **Planta Med**, v. 75, p. 1187- 1190, 2009.

84 MA, C. Y. E. A. Simultaneous Determination of Six Active Compounds in Rhodiola L. by RP-LC. **Chromatographia** , v. 67, p. 383-8, 2008.

85 GANZERA M., Y. Y. . I. A. Analysis of the Marker Compounds of Rhodiola rosea L.(Golden Root) by Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography. **Chem Pharm Bull**, v. 49, p. 465-7, 2001.

86 AL., A. G. E. Proanthocyanidins in Rhodiola kirilowii and Rhodiola rosea callus tissues and transformed roots – determination with UPLC-MS/MS method. **Herba polonic**, v. 58, 2012.

87 HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

88 VYSETTI, B. E. A. Analysis of Geochemical Samples. **Atomic Spectroscopy**, v. 35, n. 2, p. 65-78, 2014.

89 JANKOWSKI, K. J.; RESZKE, E. Recent developments in instrumentation of microwave plasma sources for optical emission and mass spectrometry: Tutorial review. **J. Anal. Atom. Spectrom.**, v. 28, n. 8, p. 1196-1212, 2013.

90 HAMMER, M. R. A magnetically excited microwave plasma source for atomic emission spectroscopy with performance approaching that of the inductively coupled plasma. **Spectrochim**, v. 63, p. 456-464, 2008.

91 ROCHA, J. L. C. **Caracterização química e atividades biológicas in vitro e in silico de asemeia ovata (polygalaceae)**. 2016. 268f. Tese (Doutorado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana. 2016.

92 KOROLAINEM, A. E. A. From in silico target prediction to multi-target drug design: Current databases, methods and applications, v. 74, p. 2554-2574, 2011.

93 ALTSCHUL, S. F. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

94 LAGUNIN, A. E. A. QSAR modelling of rat acute toxicity on the basis of PASS prediction, v. 30, p. 241-250, 2011.

95 SANTOS, W. N. L. E. A. Simultaneous determination of 13 phenolic bioactive compounds in guava (Psidium guajava L.) by HPLC-PAD with evaluation using PCA and Neural Network Analysis (NNA). **Microchem. J.**, n. 133, p. 583-592, 2017.

96 JIE YIN, G. J. K.; MYEONG, H. W. The antioxidant and cytotoxic activities of Sonchus oleraceus L. extracts, v. 1, p. 189-194, 2007. ISSN 3.

97 SCHILEDE, E. E. A. Oral acute toxic class method: a successful alternative to the oral LD 50 test, v. 42, p. 15-23, 2005.

98 OLIVIERE, A. C. Analytical figures of merit: from univariate to multiway calibration. **Chem. Rev.**, v. 114, p. 5358-5378, 2014.

99 CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities, Pure Appl. **Chem.**, v. 67, p. 1699-1723, 1995.

100 OSZMIANSKI, J.; KALISZ, S.; ANETA, W. The Content of Phenolic Compounds in Leaf Tissues of White (Aesculus hippocastanum L.) and Red Horse Chestnut, (Aesculus carea H.) Colonized by the Horse Chestnut Leaf Miner (Cameraria ohridella Deschka & Dimić). **Molecules**, v. 19, p. 14625-14636, 2014.

101 SPIRIDON, M.; CORDUNEANU, D. Chronic Venous Insufficiency: a Frequently Underdiagnosed and Undertreated Pathology. **Maedica (Buchar)**, v. 12, n. 1, p. 59-61, 2017.

102 COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

103 REGINATO, F. Z.; SILVA, A. R. H.; BAUERMANN, L. F. Evaluation of the flavonoides use in the treatment of the inflammation. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 49, n. 3, p. 569-582, 2015.

104 LOKE, W. M. E. A. Metabolic transformation has a profound effect on anti-inflammatory activity of flavonoids such as quercetin:Lack of association between antioxidant and lipoxygenase inhibitory activity. **Biochemical pharmacology**, v. 75, p. 1045-1053, 2008.

105 MACHADO, H. E. A. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, p. 33-39, 2008.

106 DEGÁSPARIL, C. H.; WASZCZYNSKYL, N. PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE COMPOSTOS FENÓLICOS. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

107 LICHOTA, A. E. A. Therapeutic potential of natural compounds in inflammation and chronic venous insufficiency. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 68-91, 2019.

108 CASTRO-FERREIRA, R. E. A. The role of endothelial dysfunction and inflammation in chronic venous disease. **Ann. Vasc. Surg.**, v. 46, p. 380-393, 2018.

109 YASIM, A. Serum concentration of procoagulant, endothelial and oxidative stress markers in early primary varicose veins, Phlebology/Venous Forum of the Royal. **Soci. of Medi.**, v. 23, p. 15/20, 2008.

110 MANACH, C. E. A. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutritio**, v. 79, p. 727-747, 2004.

111 HARBORNE, J. B. Phytochemical Methods. London: Chapman and Hall, 1973. p. 33-88.

112 WANASUNDARA, U. E. A. Isolation and identification of an antioxidative component in canola. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 42, p. 1285-1290, 1994.

113 SARIKURKCU, C. E. A. Enzyme and Biological Activities of the Water Extracts from the Plants Aesculus hippocastanum, Olea europaea and Hypericum perforatum That Are Used as Folk Remedies in Turkey. **Molecules**, v. 25, p. 1-15, 2020.

114 DUDEK-MAHUCG, M.; MATLAWSKA, I. FLAVONOIDS FROM THE FLOWERS OF AESCULUS HIPPOCASTANUM. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 68, p. 403-408, 2011.

115 CLIFFORD, M. N. E. A. Characterization by LC-MS(N) of four new classes of p-coumaric acid-containing diacylchlorogenic acids in green coffee beans. **J Agric Food Chem**, v. 54, p. 4095-4101, 2006.

116 YEN, W. J. E. A. Antioxidant Properties of Roasted Coffee Residues. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 3, p. 2658-2663, 2005.

117 LETICIA, A. N. Emprego da cultura de tecidos e células vegetais como modelo experimental aplicado ao estudo da via de biossóntese de cumarina e de ácido clorogênico em Mikania glomerata e Mikánia laevigata (Asteraceae). **Unicamp**, v. 1, p. 1-100, 2018.

118 MLADENKA, P. E. A. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. **Free radical biology and medicine**, v. 49, p. 963-975, 2010.

119 TABAK, C. E. A. Chronic obstructive pulmonary disease and intake of catechins, flavonols, and flavones The MORGEN Study. **Am. J. Respir Crit. Care Med.**, v. 164, p. 61-64, 2001.

120 SOOBRATTEE, M. A. E. A. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutat. Res.**, v. 579, p. 200–213, 2005.

121 LAGO, J. G. G. E. A. Structure-Activity Association of Flavonoids in Lung Diseases. **Molecules**, v. 19, p. 3570-3595, 2014.

122 LAGENTE, V. E. A. Role of matrix metalloproteinases in the development of airway inflammation and remodeling. **Braz. J. Med. Biol. Res**, v. 38, p. 1521–1530, 2005.

123 MELO, L. V.; SAWAYA, A. C. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (Mikania glomerata and Mikania laevigata). **Rev. bras. farmacogn**, v. 25, p. 105-110, 2015.

124 NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for Mikania laevigata andMikania glomerata as a pharmacological tool. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, p. 809-820, 2010.

125 RUFATTO, L. C. E. A. Genus Mikania: chemical composition and phytotherapeutical activity. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz**, v. 22, p. 1384 - 1403, 2012.

126 PU, W. E. A. Anti-inflammatory effects of Rhodiola rosea L.: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 1-10, 2020.

127 SIST, P. E. A. Rhodiola rosea, a protective antioxidant for intense physical exercise: An in vitro study. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 27-36, 2018.

128 SALIM, S. Oxidative Stress and Psychological Disorders. **Current Neuropharmacology**, v. 12, p. 140-147, 2014.

129 GÁLVEZ, J. S. **Chlorogenic Acid: Recent Advances on Its Dual Role as a Food Additive and a Nutraceutical against Metabolic Syndrome**, v. 22, p. 1-21, 2017. ISSN 2.

130 BORINE, R. C. C. E. A. Relação entre a qualidade de vida e o estresse em acadêmicos da área da saúde. **Estudos Interdisciplinares em Psicologia**, v. 6, p. 100-118, 2015. ISSN 1.

131 BUCHWALD, W.; GRYSZCZNSKA, A.; ADAMCKAK, A. Biometric features and content of phenolic compounds of roseroot (Rhodiola rosea L.). **Acta Societatis Botanicorum Poloniae**, v. 85, p. 1-10, 2016.

132 TAKEDA, E. A. The regulation and function of phosphate in. **BioFactors**, v. 21, p. 345-355, 2004.

133 BRASIL. Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro de 2005.. **Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais**, Brasília, DF., 22 set 2005. Disponivel em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_269_2005.pdf/2e95553c-a482-45c3-bdd1-f96162d607b3>. Acesso em: 15 2020 2020.

134 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), W. H. O. (. Food consumption and exposure assessment of chemicals. **Report of FAO/WHO Consultation on Food Consumption and Exposure Assessment of Chemicals**, Geneva, feb 1997.

135 SILVA, M. L. **Aplicação da termogravimetria na determinação do teor de ferro em comprimidos: um estudo comparativo com a espectrofotometria**. 2016. 117f. Dissertação (Mestre em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2013.

136 GERMANO, R. M. A.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G. Importância do ferro em nutrição humana. **Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr**, v. 24, p. 85-104, 2002.

137 SALGUEIRO, M. J. E. A. Zinc status and immune system relationship. **Biol Trace Elem Res**, v. 76, p. 193-205, 2000. ISSN 3.

138 SHEN, H. E. A. Zinc deficiency induces vascular pro-inflammatory parameters associated with NF-kB and PPAR signaling. **J AM Coll Nutr**, v. 27, p. 577-587, 2008. ISSN 5.

139 MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na nutrição humana. **Rev. Nutr.**, v. 17, n. 1, p. 79-87, 2004.

140 POOJA, K. R. E. A. Phytoconstituents and antioxidant potency of rhodiola rosea – a versatile adaptogen. **Journal of Food Biochemistry**, v. 30, p. 203-214, 2006.

141 AL., M. R. G. E. Considerações sobre cromo, insulina e exercício físico. **Rev Bras Med Esport**, v. 11, n. 5, p. 262-266, 2005.

142 HEPBURN, D. D. D. . V. J. B. In vivo distribution of chromium from chromium picolinate in rats and implications for the safety of the dietary supplement. **Chem Res Toxicol** , v. 15, p. 93-100, 2002.

143 ANDRADE, E. C. B.; ALVES, S. P.; TAKASE, I. Extração sequencial de cobre, ferro e zinco em ervas medicinais. **Ciênc. Tecnol. Aliment.,** v. 25, p. 844-848, 2005.

144 HASSAM, M. I. E. A. Structure, Function And Applications of Carbonic Anhydrase Isozymes. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, p. 1570-1582, 2013.

145 WAHEED, S. E. A. Carbonic Anhydrase XII Functions in Health and Disease. **Gene**, p. 33-40, 2017.

146 PIIMNICA, D. Vasoconstriction and anti-inflammatory properties of the selective a-adrenergic receptor agonist brimonidine. **Science**, v. 75, p. 49-54, 2014.

147 BOUMA, M. G. E. A. Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood: involvement of adenosine A2 and A3 receptors. **J. Immunol**, v. 158, p. 5400-5408, 1997.

148 BESERRA, A. M. S. E. A. Avaliação toxicológica do ácido elágico em roedores, v. 91, p. 16-24, 2010.

149 BARROS, C. B. Validação de Métodos Analíticos. **Biológico**, v. 64, n. 2, p. 175-177, 2002.

150 17025, N. I. **Requisitos Gerais para a Competência de Laboratórios de Calibração de Ensaios**. Rio de Janeiro: ABNT, 2001.

151 ANVISA. Subsídios à Discussão sobre a proposta de Regulamentação para Farmácias Magistrais., junho 2005. Disponivel em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/artigos/subsidios.pdf >. Acesso em: 23 Abril 2020.

152 RIBANI, M. E. A. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

153 KONATU, F. R. B. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de multirresíduos de agrotóxicos em cultura de alface, por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial. **UNICAMP**, p. 183, 2014.

154 CURRIE, L. A. Detection and quantification limits: origins and historical overview. **Chim. Acta**, v. 391, p. 127-134, 1999.

155 HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. **LC/GC Internationa**, p. 96-105, 1998.

156 FRANCOTTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantitation of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr. B.**, v. 686, p. 77-80, 1996.

157 GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. A.; ASUERO, A. G. Intra-laboratory testing of method accuracy from recovery assays.. **Talanta**, v. 48, p. 729-736, 1999.

158 NIJHUIS, A. E. A. Strategy for ruggedness tests in chromatographic method validation.. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 187-202, 1999.

159 VAN DER HEYDEN, Y. E. A. Determination of system suitability limits with a robustness test. **J. Chromatogr. A.**, v. 845, p. 145-154, 1999.

160 BRESSOLLE, F.; BROMET-PETIT, M.; AUDRAN, M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: applications to pharmacokinetics.. **J. Chromatogr. B**, v. 686, p. 3-10, 1996.

161 ANVISA. Resolução RDC nº 27, 17 de maio de 2012. **Requisitos mínimos para a validação de métodos bioanalíticos empregados em estudos com fins de registro e pós-registro de medicamentos.**, Brasília, 17 mai 2012.

162 ANVISA. Resolução, nº 899, 29 de maio de 2003. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**, Brasília, DF, mai 29 2003.