

Dissertação – Projecto

SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE



UNIVERSIDADE DE
COIMBRA



Luís André da Costa Barbosa

Dissertação do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelos Professores Doutores Rita Alves e Fernando Ramos, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e apresentada à unidade orgânica de Dissertação - Projecto

Setembro de 2018

Declaração

Eu, Luís André da Costa Barbosa, estudante do Mestrado em Segurança Alimentar com o nº 2016169352, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Dissertação/Projecto.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Dissertação, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 13 de Setembro 2018.

Assinatura:

(Luís André da Costa Barbosa)

Dissertação – Projecto

SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Luís André da Costa Barbosa

Dissertação do Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelos Professores Doutores Rita Alves e Fernando Ramos, e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e apresentada à unidade orgânica de Dissertação - Projecto

Setembro de 2018



UNIVERSIDADE D
COIMBRA



ÍNDICE GERAL

	Página
ÍNDICE GERAL.....	4
ÍNDICE DE FIGURAS	6
ÍNDICE DE TABELAS	6
ABREVIATURAS	7
AGRADECIMENTOS.....	8
RESUMO	9
Palavras-chave:.....	9
ABSTRACT.....	10
Keywords:.....	10
OBJETIVOS DO ESTUDO	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
INTRODUÇÃO.....	12
ASPETOS LEGAIS.....	13
DADOS DE CONSUMO	16
MECANISMO DE AÇÃO/FARMACOCINÉTICA E BIOTRANSFORMAÇÃO.....	22
Metabolismo primário e secundário	22
Antioxidantes.....	22
COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	24
Compostos fenólicos	24
Não-Flavonoides.....	25
Flavonoides.....	26
Taninos	28
Terpenos.....	29
CONDIÇÕES DE <i>STRESS</i> OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	29
BIOATIVIDADE E BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS	32
EFEITOS BENÉFICOS	34
EFEITOS ADVERSOS: efeito pró-oxidante devido à elevada concentração?	36
AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA/AUTENTICIDADE.....	39
PARTE EXPERIMENTAL.....	41
DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS.....	41
REAGENTES E PADRÕES	42
MATERIAIS	43

EQUIPAMENTOS.....	43
PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	43
Preparação dos extratos dos suplementos alimentares	43
Preparação das infusões.....	43
METODOLOGIAS ANALÍTICAS.....	44
DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	44
DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS.....	44
DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	45
Poder redutor do íon férrico (método FRAP)	45
Inibição do radical DPPH*	45
TRATAMENTO ESTATÍSTICO.....	46
RESULTADOS	46
DISCUSSÃO.....	50
CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	60
BIBLIOGRAFIA	63
ANEXOS	71

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1 _____	25
Figura 2 _____	25
Figura 3 _____	26
Figura 4 _____	26
Figura 5 _____	27
Figura 6 _____	27
Figura 7 _____	29
Figura 8 _____	33
Figura 9 _____	35
Figura 10 _____	37
Gráfico 1 _____	18
Gráfico 2 _____	19

ÍNDICE DE TABELAS

	PÁGINA
Tabela 1 _____	19
Tabela 2 _____	20
Tabela 3 _____	41
Tabela 4 _____	47
Tabela 5 _____	48
Tabela 6 _____	49
Tabela 7 _____	71

ABREVIATURAS

ADN – ácido desoxirribonucleico

COX – enzima cicloxigenase

DDR – dose diária recomendada

DSHEA – *Dietary Supplement Health and Education Act*

EMEA – Agência Europeia do Medicamento

EUA – Estados Unidos da América

FDA – *Food and Drug Administration*

LDL – lipoproteína de baixa densidade

LOX – enzima lipoxigenase

OMS – Organização Mundial de Saúde

RASFF – Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais

RNS – espécies reativas de azoto

ROS – espécies reativas de oxigénio

UE – União Europeia

AGRADECIMENTOS

Quero aqui deixar um agradecimento especial aos meus orientadores, Professora Doutora Rita Alves e Professor Doutor Fernando Ramos, por todo interesse demonstrado, desde a completa disposição para ajudar, às ideias que auxiliaram ao sucesso desta tese. Um agradecimento especial à Professora Doutora Beatriz Oliveira pela orientação e todo o apoio durante a elaboração da tese. Devo igualmente agradecer à Doutora Anabela Costa toda a disponibilidade e orientação prestadas durante a realização do trabalho laboratorial.

Quero agradecer igualmente às minhas colegas de trabalho, Doutora Daniela Garcia, Ana Paula Moreira e Rosa Maria Gonçalves pela compreensão e disponibilidade demonstradas neste último ano.

Agradeço também todos os meus amigos e colegas da Universidade de Coimbra, que conviveram e colaboraram comigo ao longo destes dois anos de percurso, contribuindo assim para o meu crescimento académico e pessoal.

Finalmente, deixo o meu maior agradecimento à minha família, em especial aos meus irmãos Pedro e João, e à minha mãe Maria José, um exemplo de luta, persistência e bondade que eu sonho um dia igualar.

RESUMO

A preocupação com os efeitos da alimentação na saúde está na base do interesse crescente nos suplementos alimentares: só em Portugal estima-se que uma em cada cinco pessoas consuma algum tipo de suplemento alimentar. Atualmente, os suplementos alimentares incluem produtos de origem diversa, como vitaminas, minerais, aminoácidos, ácidos gordos essenciais e fitoquímicos. Dentro deste vasto leque de produtos destacamos os compostos com atividade antioxidante, amplamente utilizados como componentes de vários produtos da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética.

Os benefícios potenciais dos antioxidantes para a prevenção de diversas patologias e para a melhoria da qualidade de vida resultaram na produção de suplementos alimentares e alimentos funcionais com potencial “poder antioxidante”, cuja veracidade será objeto de avaliação neste trabalho. A determinação da atividade antioxidante será realizada por dois métodos (DPPH e FRAP) e serão igualmente quantificados os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides.

Tendo em consideração os vários produtos que poderiam ser objeto de estudo, foi realizada uma seleção de suplementos alimentares à base de plantas, incluindo chás, com potencial atividade antioxidante. Em geral, as infusões de chá verde e de cavalinha apresentaram as maiores concentrações de compostos fenólicos (incluindo flavonoides) e maior atividade antioxidante, tendo em conta as doses diárias recomendadas. Por sua vez, os suplementos na forma de cápsulas de Ginseng e de comprimidos de Cavalinha apresentaram os valores mais baixos de compostos bioativos e de atividade antioxidante. Outras amostras, de marcas diferentes, mas com o mesmo ingrediente principal, apresentaram valores muito dispares entre si.

Palavras-chave: atividade antioxidante, suplementos alimentares

ABSTRACT

The effects of what we eat on our health is the basis of the growing interest in food supplements: it is estimated that one in five people consume some type of food supplement in Portugal.

Currently, food supplements include products of multiple sources, such as vitamins, minerals, amino acids, essential fatty acids and phytochemicals. Within this wide range of products, we highlight the compounds with antioxidant activity, already widely used as components of various food, pharmaceutical and cosmetic products.

The potential benefits of antioxidants to prevent various diseases and to improve life quality have resulted in the development of food supplements and functional foods with potential "antioxidant power", whose veracity will be evaluated in this work. The determination of the antioxidant activity will be performed by two methods (DPPH and FRAP) and the total phenolic and flavonoid contents will be also quantified.

Considering the various products that could be the subject of study, a selection of herbal dietary supplements with antioxidant activity claims was made.

Considering the various products that could be the object of study, a selection of herbal dietary supplements with potential antioxidant activity, including teas, was carried out.

In general, infusions of green tea and horsetail showed the highest concentrations of phenolic compounds (including flavonoids) and higher antioxidant activity, considering the recommended daily doses. On the other hand, supplements in the form of Ginseng capsules and Horsetail tablets showed the lowest values of bioactive compounds and antioxidant activity. Other samples (different brands but with the same main ingredient) showed disparate values between each other.

Keywords: antioxidant activity, food supplements

OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo principal deste trabalho consiste na determinação e na comparação da atividade antioxidante de diversos suplementos alimentares. A alimentação é um fator essencial para a saúde: uma dieta rica e equilibrada, juntamente com um estilo de vida saudável, pode contribuir positivamente para a manutenção do estado de saúde. Apesar dos benefícios reconhecidos, o estilo de vida moderno tem descurado a ingestão de alimentos onde os antioxidantes estão naturalmente presentes. Segundo algumas opiniões, o elevado ritmo de vida que caracteriza as sociedades modernas dificulta o cumprimento de dietas adequadas, levando assim ao consumo crescente de suplementos alimentares.

O resultado da determinação da atividade antioxidante dos suplementos selecionados será comparado com a descrição presente no rótulo e em outros produtos descritos na literatura científica.

A presente dissertação encontra-se dividida em duas partes: na primeira parte é realizada uma revisão da literatura científica sobre o tema; na segunda parte é descrito o trabalho laboratorial realizado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Definir os conceitos de “suplemento alimentar” e “alimento funcional”, tendo em consideração os produtos-fronteira entre os suplementos alimentares e os medicamentos.
2. Abordar os aspetos legais que envolvem a produção, distribuição e venda dos suplementos alimentares, em particular o papel das autoridades comunitárias (EFSA) e nacionais (ASAE).
3. Descrever os benefícios terapêuticos e os efeitos tóxicos dos diferentes constituintes dos suplementos alimentares com atividade antioxidante.
4. Determinar e comparar a atividade antioxidante em diversas amostras de suplementos alimentares.
5. Avaliação crítica da informação presente nos rótulos dos suplementos alimentares tendo em conta os resultados obtidos anteriormente.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

INTRODUÇÃO

Atualmente, muitos consumidores procuram uma nova forma de manter o estado de saúde através dos suplementos alimentares. As preparações à base de plantas têm desempenhado um papel fundamental, desde os primórdios da Humanidade, na saúde e bem-estar das populações. Em muitas comunidades rurais, estas preparações à base de plantas (geralmente infusões) são ainda hoje bastante populares. As plantas (e produtos derivados) podem ter várias propriedades benéficas, estando estas associadas à presença de metabolitos secundários como os compostos fenólicos. A investigação tem demonstrado que os componentes não-nutritivos das plantas, muitos deles conhecidos como quimioprotetores, podem ter ação contra várias patologias, incluindo cancro e doenças coronárias. Os fatores ambientais são a principal variável para a quantidade e o tipo de metabolitos secundários presentes (1).

Os suplementos alimentares são utilizados por motivos de saúde, razões estéticas ou para melhorar a performance física e mental. Os riscos associados à produção moderna de alimentos é outro dos principais motivos para o seu consumo (2). A utilização do termo “produto natural”, com fins puramente comerciais, contribui para esta tendência, fazendo assim crer que estes suplementos são mais seguros (3). No entanto, foram já descritos casos de contaminações (toxinas, fungos, etc.), interações com medicamentos, e a presença de componentes não declarados. Os problemas de rotulagem têm implicações graves no comércio internacional destes produtos, mesmo dentro da União Europeia (2)(3).

Como já foi referido, a utilização de plantas medicinais é uma tradição presente em diferentes culturas. A globalização do mercado dos suplementos alimentares permitiu a difusão de diversas plantas ou produtos derivados: os suplementos alimentares à base de plantas estão entre aqueles com maior crescimento no mercado. No que diz respeito ao objeto de estudo desta tese, estudos de mercado mostram os suplementos alimentares com potencial atividade antioxidante entre os mais procurados. A preparação de suplementos alimentares à base de plantas com atividade antioxidante pode partir de extratos completos ou isolando compostos bioativos específicos, como os polifenóis (4).

ASPETOS LEGAIS

Com o aumento da procura dos suplementos alimentares, as autoridades nacionais e europeias adotaram uma série de medidas para garantir a proteção dos consumidores e o seu direito à informação, harmonizando os regulamentos desta área (5).

Deste modo, convém em primeiro lugar distinguir “alegação nutricional”, “alegação de saúde” e “alegação de redução de um risco de doença”. Entende-se por alegação nutricional *“qualquer alegação que declare, sugira ou implique que um alimento possui propriedades nutricionais benéficas particulares devido à energia (valor calórico) e/ou aos nutrientes ou outras substâncias que contém, contém em proporção reduzida ou aumentada, ou não contém”*. Por outro lado, entende-se por alegação de saúde *“qualquer alegação que declare, sugira ou implique a existência de uma relação entre uma categoria de alimentos, um alimento ou um dos seus constituintes e a saúde”*. Por fim, entende-se alegação de redução de um risco de doença *“qualquer alegação de saúde que declare, sugira ou implique que o consumo de uma categoria de alimentos, de um alimento ou de um dos seus constituintes reduz significativamente um fator de risco de aparecimento de uma doença humana”*. Neste Regulamento (CE) nº 1924/2006 é salientado igualmente que *“nenhuma alegação nutricional ou de saúde poderá ser incompatível com os princípios de nutrição e saúde geralmente aceites, incentivar ou justificar o consumo excessivo de um alimento ou depreciar as boas práticas alimentares”* (5).

Legalmente, os suplementos alimentares são considerados, tanto pela União Europeia (Diretiva 2002/46/CE) como pelos Estados Unidos da América (*Dietary Supplement Health and Education Act*) como alimentos (2). Segundo a definição presente na Diretiva 2002/46/EC, *“os suplementos alimentares são géneros alimentícios que se destinam a suplementar a dieta normal e que constituem fontes concentradas de determinados nutrientes ou outras substâncias com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinados, comercializados em forma doseada, ou seja, as formas de apresentação como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em quantidades reduzidas”* (6)(7). Apesar desta definição, permanecem dúvidas sobre a segurança dos suplementos alimentares: os suplementos alimentares não carecem de aprovação, por parte das entidades de regulamentação, antes de entrarem no mercado e os

produtores não precisam de apresentar provas sobre a sua segurança e eficiência (2)(3). No entanto, é proibida a comercialização de suplementos alimentares contendo produtos que não se enquadrem na legislação ou ponham em risco a saúde do consumidor. Além disso, os suplementos alimentares não devem reivindicar a função de medicamento (tratamento de doenças) nem devem substituir uma alimentação convencional (3)(5).

A legislação comunitária difere bastante dos países fora do espaço europeu: enquanto a China e os Estados Unidos baseiam a regulamentação dos suplementos alimentares nos géneros alimentícios, o Japão não tem uma categoria específica para os suplementos alimentares (4). No caso dos Estados Unidos, o papel de entidade reguladora é assumido pela *Food and Drug Administration* (FDA) e a base da regulamentação dos suplementos alimentares é o *Dietary Supplement Health and Education Act* (DSHEA). Esta regulamentação define os suplementos alimentares como um “*produto destinado à suplementar a alimentação, que pode incluir vitaminas, minerais, componentes botânicos ou aminoácidos, sob a forma de concentrado, metabolito ou extrato, isolado ou combinando mais do que um ingrediente*”. Segundo o DSHEA, a responsabilidade da informação rotulada, segurança dos ingredientes e conteúdo da embalagem é do produtor. A FDA não exige uma análise rigorosa dos suplementos alimentares, mas determina que o rótulo contenha informação de que estes produtos não se destinam a diagnosticar, tratar, curar ou prevenir qualquer doença (4)(8)(9).

Tendo em conta o aumento do consumo e a falta de informação dos consumidores quanto aos riscos associados, as adulterações dos suplementos alimentares são atualmente um problema de saúde pública. No entanto, a falta de harmonização da legislação europeia dos suplementos alimentares resulta em discrepâncias: a mesma substância pode ser identificada como suplemento alimentar num Estado-Membro e como planta medicinal noutra. Esta situação resulta na confusão dos consumidores, na identificação errada de produtos e em perdas monetárias (2)(3)(7). Por exemplo, apenas nove Estados-Membros têm listas de substâncias proibidas ou permitidas em suplementos alimentares. Os consumidores não estão também protegidos quanto à publicidade enganosa por vezes presente nestes produtos (3).

De forma a colmatar este problema alguns países europeus têm também adotado um conjunto de recomendações relativas à produção de alimentos, suplementos nutricionais e segurança alimentar presentes no *Codex Alimentarius*. De forma complementar, a Agência Europeia do Medicamento (EMA) criou uma lista de critérios a cumprir para as substâncias obtidas a partir de plantas, preparações e associações que podem ser utilizadas nos suplementos alimentares. Entre esses critérios destacam-se a indicação do seu fim,

concentração específica, dosagem, via de administração e outras informações para a sua utilização segura. As plantas utilizadas nos suplementos alimentares estão ainda descritas em bases de dados desenvolvidas pela *European Food Information Resource* (EuroFir), como a eBASIS (Substâncias Bioativas em Sistemas de Informação Alimentar) ou a Nettox (4).

Em suma, a legislação europeia em vigor (Diretiva 2002/46/CE) é insuficiente (3). O mercado dos suplementos alimentares é apenas parcialmente regulado, devendo as autoridades trabalhar no sentido de criar legislação que garanta o mesmo nível de proteção em toda a UE, prevenir e combater adulterações, garantir que é fornecida mais informação ao consumidor, criar sistemas de monitorização eficazes e não permitir falsas alegações (2)(3). Neste sentido, de forma a precaver problemas de segurança alimentar no espaço comunitário, a UE criou o Sistema de Alerta Rápido para os Géneros Alimentícios e Alimentos para Animais (RASFF) (3). O RASFF permite às autoridades emitir, de forma rápida, notificações para os Estados-Membros e a tomada de ações imediatas, incluindo a retirada de um produto. Na base de dados do RASFF é possível realizar uma pesquisa de notificações pelas diferentes categorias de produtos. De referir, no caso das *“Dietetic foods, food supplements, fortified foods”*, que as notificações nesta categoria aumentaram drasticamente em comparação com as restantes. De salientar também que um dos principais desafios deste sistema é a venda de suplementos *online*, já que os seus produtores estão geralmente registados fora do espaço comunitário, podendo não cumprir os mesmos parâmetros de qualidade e segurança dos europeus (2).

Como Estado-Membro da União Europeia, Portugal transpôs a Diretiva 2002/46/CE através do Decreto-Lei nº136/2003 de 28 de junho. Este documento legal estipula também que a colocação de um suplemento nutricional no mercado é da exclusiva responsabilidade do fabricante ou distribuidor, tendo este que notificar previamente as autoridades competentes. Antes da colocação no mercado, o rótulo do suplemento deverá ser enviado para aprovação. Este rótulo está obrigado a conter a menção *“suplemento alimentar”*; a designação das categorias dos seus constituintes (sendo as quantidades apresentadas sob a forma numérica e em percentagem relativamente à dose diária recomendada); advertências relativas aos possíveis riscos decorrentes da ingestão de quantidades superiores à DDR; a menção *“manter fora do alcance das crianças”*; a data de durabilidade mínima ou data limite de consumo; indicação de que não devem substituir um regime alimentar variado; condições especiais de conservação e de utilização; nome e endereço do produtor responsável (10). De igual forma, não é permitida qualquer menção na rotulagem ou publicidade que atribua aos suplementos

propriedades profiláticas ou de tratamento, bem como não é permitido declarar, expressa ou implicitamente, que uma alimentação equilibrada e variada não constitui uma fonte suficiente de nutrientes (11).

DADOS DE CONSUMO

O mercado dos suplementos alimentares sofreu mudanças profundas nos padrões de consumo nos últimos anos (4). As mudanças nos padrões de consumo acompanham, desde logo, a procura crescente de terapias complementares ou alternativas à medicina convencional (12). Tendo como ponto de partida que os medicamentos representam um gasto excessivo e nem sempre isento de efeitos secundários (com a sua natureza sintética a ser responsabilizada pelos mesmos), os consumidores têm dado prioridade crescente aos produtos designados como “naturais”. O crescimento deste mercado é facilitado pela globalização, pela diversidade de produtos disponíveis, pela facilidade de acesso, tendo as estratégias de marketing, a publicidade, a informação *online*, o aproveitamento do seu uso tradicional e o testemunho de celebridades desempenhado um papel também importante (4).

Entre os locais de venda dos suplementos encontram-se as farmácias, as ervanárias, as lojas de produtos naturais, os ginásios, os supermercados, as televendas, os *sites online* e o mercado negro, estes dois últimos muito vulneráveis aos produtos falsificados, de baixa qualidade ou contaminados (2)(3). Atualmente, os suplementos alimentares compreendem um grande volume de negócios: segundo o Euromonitor International (2013), o mercado mundial atingirá os 50 biliões de dólares, com um crescimento de 4% previsto até 2018. As empresas do sector são capazes de desenvolver vários produtos, com diversas alegações, devido às baixas restrições regulamentares, obtendo margens de lucro elevadas (4).

Num estudo realizado nos Estados Unidos, o consumo de suplementos alimentares surge associado ao sexo feminino, aos indivíduos com 60 ou mais anos e com excesso de peso (13). No entanto, tendo em conta a multiplicidade de razões apontadas para o consumo destes produtos e a capacidade de resposta da indústria, o público-alvo destes produtos tem evoluído constantemente. Assim, as razões para a suplementação podem ser divididas por diferentes grupos de consumidores: idosos (necessidade de assegurar quantidades mínimas de nutrientes, maior necessidade de ferro ou absorção reduzida de vitaminas e antioxidantes); atletas e adultos fisicamente ativos (maior necessidade de vitaminas do complexo B, vitamina C, proteínas e hidratos de carbono); crianças e adolescentes (em especial estudantes em

época de exames); mulheres durante a gravidez, o aleitamento ou a menopausa; vegetarianos e vegans; indivíduos sujeitos à nutrição entérica e parentérica; com carências provocadas pela medicação; indivíduos com doenças crônicas ou elevado risco de cancro (2)(3).

As principais razões para o consumo de suplementos (independentemente do género, faixa etária ou nível socioeconómico) são a melhoria do desempenho físico, intelectual e da aparência estética (4)(13). Entre outras razões mais específicas podemos salientar: a prevenção de doenças neurodegenerativas ou cancro; o fortalecimento do sistema imunitário ou recuperação após doença; o tratamento da obesidade ou problemas relacionados com o estilo de vida; melhoria da saúde cardiovascular, gastrointestinal, hepática, respiratória, ocular ou do sistema ósseo; combate contra os efeitos do *stress* e envelhecimento; a insatisfação com a medicina convencional, os elevados custos com tratamentos e os efeitos secundários dos fármacos; orientações religiosas e filosóficas (2)(4)(13).

Tendo em conta estas motivações, convém agora abordar a perceção pública e os comportamentos de consumo em relação aos suplementos alimentares. Num estudo realizado em 2012, 99% dos inquiridos confirmam ter conhecimento sobre a existência de suplementos alimentares, enquanto 81% afirmam estar a consumir ou ter já consumido suplementos alimentares (4). Noutro estudo é referido que o consumo de suplementos alimentares foi aconselhado por um profissional de saúde em apenas 23% dos casos (13). Em geral, o consumo de suplementos não é monitorizado por qualquer profissional de saúde, mostrando os consumidores poucos conhecimentos sobre os mesmos ou não tendo consciência das doses recomendadas. Além disso, o seu acesso é facilitado pelo comércio *online*, sendo a informação presente no rótulo ou *sites* de venda a única que os consumidores conhecem (2). Num caso preocupante, 33% dos inquiridos dizem mesmo desconhecer a diferença entre medicamento e suplemento alimentar (4).

Em consequência da perceção e dos comportamentos de consumo referidos, podem salientar-se alguns riscos associados ao consumo de suplementos alimentares. Em primeiro lugar, a utilização excessiva de suplementos alimentares devido à ideia generalizada que estes produtos são desprovidos de efeitos adversos (12). No entanto, estes produtos estão sujeitos a diversos fatores que podem comprometer a sua qualidade e segurança: presença de substâncias tóxicas e contaminantes; presença de medicamentos ou outras substâncias não declaradas; ausência de informação quanto à potência, pureza e forma de utilização (2)(3)(4). No que diz respeito aos suplementos à base de plantas, surgem situações de contaminação ou adulteração resultantes da incorreta identificação das espécies, utilização de partes

erradas da planta ou devido à toxicidade intrínseca dos compostos bioativos (4). Por outro lado, nos consumidores polimedicados há um maior risco de interações entre os fármacos e os compostos bioativos dos suplementos (2).

Quanto ao mercado mundial, há dados que revelam que 49 % da população americana consome algum tipo de suplemento alimentar. Já na Europa, o consumo de suplementos alimentares é mais comum em países mais ricos (7). Tendo em conta as notificações do sistema RASFF sobre suplementos alimentares, os principais mercados são o Reino Unido, a Alemanha, os Países Baixos e a França. Entre os principais mercados não-europeus identificados estão os EUA, a China e a Índia (2). Cerca de 20% dos consumidores europeus utiliza pelo menos um suplemento alimentar (7). Os suplementos alimentares com maior procura são aqueles que alegam atividade antioxidante, contendo vitaminas, selénio, zinco, ácidos gordos polinsaturados ou magnésio (14). A utilização periódica (37,3%) prevalece sobre a utilização após sensação de cansaço ou agravamento do estado de saúde (22,2%) (7).

Em Portugal, a venda de suplementos nas farmácias sofreu várias alterações entre 2010 e 2016: considerando os 20 suplementos alimentares mais vendidos, foi registado um pico de vendas em 2010, decrescendo este número até 2014 e voltando a evoluir positivamente até 2016. O mínimo relativo registado em 2014 pode ser justificado com o período mais crítico da crise económica em Portugal (4). Podemos igualmente extrapolar esta evolução do consumo de suplementos alimentares nas farmácias para outros produtos similares e outros locais de venda.

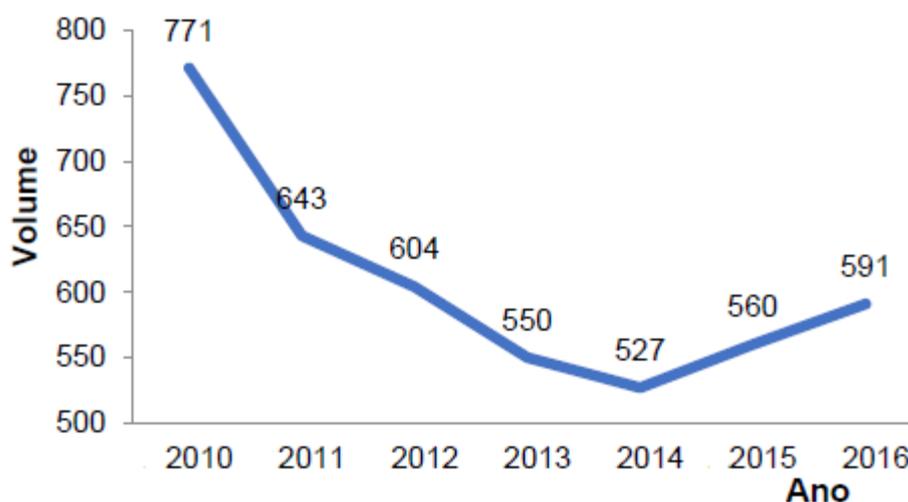


Gráfico 1: evolução das vendas em volume, por farmácia, entre 2010 e 2016, dos 20 suplementos alimentares mais vendidos. Adaptado de (4).

Quanto à evolução no valor de vendas de cada classe de suplementos alimentares, os multivitamínicos permanecem como os mais vendidos (4).

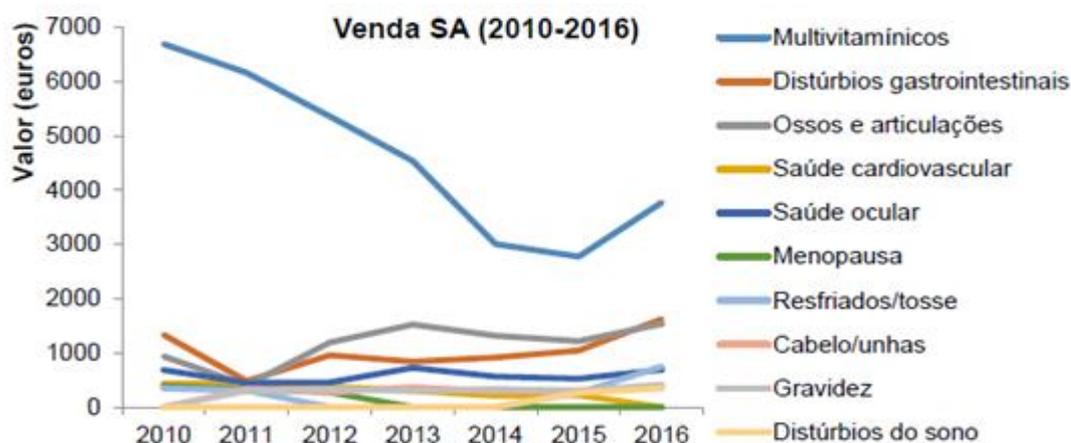


Gráfico 2: evolução de vendas das diferentes classes de suplementos alimentares entre 2010 e 2016. Adaptado de (4).

Entre os diferentes produtos de saúde vendidos em farmácias, os suplementos alimentares correspondem às percentagens de volume e valor indicadas na seguinte tabela.

Ano	Volume (%)	Valor (%)
2010	16,3	20,0
2011	15,5	17,1
2012	12,8	18,3
2013	13,2	19,6
2014	13,8	20,2
2015	14,3	20,9
2016	14,9	21,4

Tabela 1: posicionamento dos suplementos alimentares em relação aos restantes segmentos de produtos de saúde. Adaptado de (4).

O ano 2014 representou, novamente, um ponto de viragem na diminuição do consumo. Pode igualmente concluir-se que houve um aumento aparente do preço dos suplementos alimentares já que a menores volumes de vendas correspondem maiores valores faturados (4). Na tabela 2 são apresentados exemplos de suplementos à base de plantas com atividade antioxidante disponíveis no mercado português.

Denominação	Composição	Função	Dose diária recomendada	Local de venda
Suplemento Chá Verde, cápsulas	Extrato Chá verde em pó; > 40% polifenóis	Antioxidante; controlo do peso	1 cápsula antes do almoço e do jantar	Supermercado
Suplemento Chá Verde, cápsulas	Extrato de chá verde	Antioxidante; controlo do peso; diurético; melhora memória; alivia alergias;	1 cápsula 3 vezes ao dia	Supermercado
Suplemento Chá Verde, cápsulas	Extrato seco concentrado de <i>Coffea arabica</i> ; 45% ácido clorogénico	Antioxidante	1 cápsula 15 minutos antes do almoço e jantar	Supermercado
Suplemento Garcinia e Chá Verde, solução	Sementes <i>Coffea arabica</i> 1,6%, fruto de <i>Garcinia cambogia</i> 1%, folha de <i>Cynara scolymus</i> , folha de <i>Ortosiphon stamineus</i> e <i>Aloe barbadensis</i>	Antioxidante; controlo do peso	20 mL diários, diluídos em 1,5L de água; beber ao longo do dia, de preferência antes das refeições;	Supermercado
Suplemento Ginkgo Biloba, cápsulas	Extrato concentrado de <i>Ginkgo biloba</i> 30 % (folhas)	Antioxidante; manutenção da função cognitiva	1 cápsula por dia	Supermercado
Suplemento Graviola e Vitamina C, cápsulas	Extrato seco de <i>Annona muricata</i>) 18,18 % (fruto); vitamina C 5,45 %	Antioxidante; funcionamento do sistema imunitário	3 cápsulas por dia, 30 minutos antes das refeições	Supermercado
Suplemento Mangostão, solução	<i>Garcinia mangostana</i> 1,6 %; Resveratrol (<i>Vitis vinifera</i>) 0,33 %; ácido L-ascórbico	Antioxidantes; anti-inflamatória e antienvelhecimento	Tomar 30 mL por dia, em jejum, puro ou diluído em água.	Supermercado
Acerola e Roseira Brava, cápsulas	<i>Malpighia punicifolia</i> 180 mg; <i>Rosa canina</i> 180mg;	Antioxidante; aumento da absorção de ferro; formação normal de colagénio; funcionamento dos vasos sanguíneos e sistema imunitário; redução da fadiga.	1 a 2 cápsulas por dia às refeições.	Ervanária
Bioflavonoides cítricos e roseira brava, solução	Extrato (1:1) bioflavonoides cítricos e <i>Rosa canina</i>	Antioxidante	3 colheres de chá com uma pequena porção de água	Ervanária
Ginkgo Biloba, ampolas	Ginkgo Biloba 1500mg; vitamina C 40mg	Antioxidante; formação normal de colagénio; funcionamento normal dos vasos sanguíneos	Tomar 1 ampola por dia (de preferência ao pequeno-almoço)	Ervanária

Resveratrol, solução	Sumo à base de concentrado de uva tinta (<i>Vitis vinifera</i>), extrato de casca de uva e extrato de uva Muscadine (<i>Vitis rotundifolia</i>)	Antioxidante, anti-inflamatórias, antienvhecimento e como suporte cardiovascular	1 colher de chá com quantidade igual de água, 1 vez por dia; bochechar, engolir e beber 100 mL de água	Ervanária
Acerola, pastilhas	<i>Rosa canina</i> ; Vitamina C; bioflavonoides; hesperidina; rutina;	Antioxidante; funcionamento normal do sistema imunitário;	1 pastilha chupável por dia	Ervanária
Desmodium, solução	Extrato glicerinado de Desmodium (<i>Desmodium ascendens</i>) 1:5;	Antioxidante	28 gotas diluídas em água, 3 vezes ao dia, antes das refeições	Farmácia online
Hibisco, solução	Hibisco	Antioxidante; controlo do peso; ajuda na redução do colesterol;	Diluir 40 mL em 1,5 L de água e beber ao longo do dia	Farmácia online
Multivitamínico, cápsulas	<i>Glycine Max</i> (fosfolípidos); óleo de peixe (EPA e DHA); vitamina E; alfa-tocoferol, ácido palmítico-6-L-ascórbico, BHA, BHT.	Antioxidante; normal funcionamento cerebral;	2 cápsulas ao pequeno-almoço e 2 cápsulas ao jantar.	Farmácia online

Tabela 2: exemplos de suplementos alimentares disponíveis no mercado português

Da análise da tabela anterior podemos salientar a inclusão de extratos como *Panax ginseng*, *Ginkgo biloba*, alcachofra, café verde e chá verde em suplementos alimentares como fonte de compostos ativos com atividade antioxidante. Os antioxidantes em suplementos alimentares são vendidos quer como substâncias isoladas, quer como misturas, podendo ter origem natural ou sintética: extratos concentrados de plantas e algas; vitaminas, enzimas e minerais; polifenóis, polissacarídeos e, entre outros, compostos organosulfurados. A atividade antioxidante de alguns alimentos e compostos bioativos utilizados em suplementos tem sido intensamente investigada. Contudo, os dados sobre a atividade antioxidante efetiva nas diferentes formulações presentes no mercado são escassos (15).

Em relação aos suplementos à base de plantas, geralmente toda a planta é utilizada para a elaboração destes produtos. No entanto, devido à sua disponibilidade e à maior concentração de metabolitos secundários (por estarem mais expostas), as folhas são as partes mais utilizadas (16). Quanto aos suplementos alimentares com propriedades antioxidantes, é geralmente aceite que uma mistura de antioxidantes é mais eficaz que o consumo de uma concentração elevada de um único composto. De igual forma, as infusões são aparentemente mais apreciadas pelos consumidores (15).

MECANISMO DE AÇÃO/FARMACOCINÉTICA E BIOTRANSFORMAÇÃO

Metabolismo primário e secundário

O metabolismo primário engloba o conjunto de processos essenciais à sobrevivência da planta – crescimento, desenvolvimento, respiração, fotossíntese e síntese de proteínas. Os compostos resultantes do metabolismo primário (aminoácidos, lípidos, hidratos de carbono e ácidos nucleicos) têm uma distribuição universal (17). Por sua vez, do metabolismo secundário resulta a produção de compostos igualmente importantes: as plantas não possuem um sistema imunológico idêntico ao dos animais, sendo a produção de substâncias químicas repelentes o mecanismo de proteção que lhes permite uma maior resistência (18). Estes compostos são sintetizados a partir de produtos do metabolismo primário. Os metabolitos secundários podem ser agrupados em compostos azotados, fenólicos e terpenos (19).

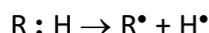
Nos organismos vivos, as espécies reativas de oxigénio e azoto são produzidas principalmente durante o metabolismo aeróbio. Em níveis fisiológicos, estas espécies intermediárias participam em numerosos processos metabólicos (sinalização celular, produção de energia, transcrição genética, defesas imunitárias) (15). Contudo, a diminuição dos mecanismos de defesa antioxidante ou a exposição aos fatores ambientais (fumo de tabaco, poluição, radiação ultravioleta, dieta rica em gorduras, etc.) e algumas condições patológicas (infecção crónica, inflamação, etc.) podem levar ao aumento da produção de espécies reativas, resultando em *stress* oxidativo. O *stress* oxidativo pode danificar o ADN, lípidos e proteínas, comprometendo o funcionamento celular. O *stress* oxidativo tem sido também associado ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crónicas (15)(20).

Antioxidantes

A proteção contra os danos provocados pelas espécies reativas de oxigénio e azoto é garantida por um sistema de defesas antioxidantes complexo. No contexto dos suplementos alimentares, o termo “antioxidante” pode ser definido como uma substância que, em pequenas quantidades, é capaz de prevenir ou retardar a oxidação (21). Entre os exemplos de antioxidantes enzimáticos estão a superóxido dismutase, a catalase, a glutathione peroxidase e a glutathione reductase. Nos antioxidantes não-enzimáticos podem ser incluídos os antioxidantes sintéticos e os naturais (como o α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico e os

compostos fenólicos) (22). As propriedades antioxidantes são também essenciais para a estabilização dos alimentos. Assim, para prevenir ou retardar a deterioração oxidativa nos produtos alimentares (como a oxidação lipídica) recorre-se a aditivos, como antioxidantes de origem natural ou sintética (21).

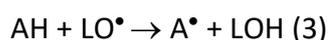
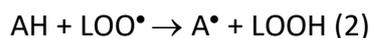
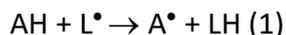
Para compreender a importância da atividade antioxidante é necessário perceber o mecanismo de formação de radicais livres. Um radical livre contém um ou mais eletrões desemparelhados, sendo espécies altamente reativas. A formação destes radicais ocorre por rutura de uma ligação covalente em que cada eletrão partilhado fica no seu átomo.



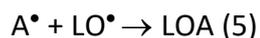
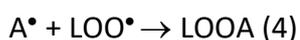
Os radicais livres podem reagir com outras moléculas, partilhando os seus eletrões desemparelhados e formar uma nova ligação covalente.



Um radical pode doar um eletrão desemparelhado a outra molécula, retirar um eletrão de outra molécula e formar um par de eletrões (radical ionizante) ou combinar-se com espécies não radicalares. Em qualquer dos casos, essa molécula torna-se um radical livre, prosseguindo a reação em cadeia. O mecanismo de ação dos diferentes antioxidantes é semelhante: um antioxidante primário (como os flavonoides ou ácidos fenólicos) tem capacidade de doar átomos de hidrogénio ou eletrões aos radicais livres, podendo retardar ou inibir o passo de iniciação, reagindo com um radical lipídico livre (1) ou inibir a propagação por reação com radicais peroxilo (2) e alcoxilo (3) (21).



O radical A^{\bullet} formado tem reatividade baixa e não reage com os lípidos. No entanto, estes radicais podem interferir com as cadeias de propagação, levando à formação de complexos peroxilo-antioxidante (4) e alcoxilo-antioxidante (5) (21).



COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

Compostos fenólicos

Consideram-se compostos fenólicos todas as estruturas que possuem, pelo menos, um núcleo benzénico com um ou mais hidroxilos, livres ou ligados na forma de ésteres, éteres ou heterósidos. No entanto, esta definição possui exceções, caso de como diversos alcaloides e terpenos. Aceita-se, atualmente, como compostos fenólicos todos aqueles que, não sendo azotados, têm um ou mais ciclos aromáticos e são principalmente derivados do metabolismo do ácido xiquímico e/ou de um poliacetato. A origem biossintética dos compostos fenólicos deriva essencialmente de duas grandes vias:

- 1) Via do ácido xiquímico: com origem neste ácido, cuja biossíntese se faz a partir da condensação do fosfoenolpiruvato com a 4-fosfo-eritrose. Do ácido xiquímico originam-se ácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina), que por desaminação resultam em ácidos cinâmicos e os seus derivados.
- 2) Via do acetato: que ao originar ácidos β -polictometilénicos de comprimento variável resultam, por ciclização, em compostos fenólicos (23).

Nas plantas, cerca de 40% dos compostos fenólicos são sintetizados pela via acetato-malonato e os restantes 60% pela via do ácido xiquímico, estando esta ausente nos animais. Os compostos fenólicos possuem estruturas químicas heterogénicas, na forma livre ou conjugada, podendo ligar-se a outros compostos, principalmente açúcares (glucose, galactose, xilose ou ramnose), aumentando assim a diversidade estrutural destes compostos (24). Os compostos fenólicos representam o maior grupo em todo o Reino Vegetal, tendo sido identificados mais de 8000 compostos até ao momento (25). Desta forma, os compostos fenólicos estão presentes numa grande variedade de frutas e vegetais, estimando-se um consumo diário de 1 g/dia de composto fenólicos na dieta humana, sendo um terço destes compostos constituído por ácidos fenólicos e os restantes dois terços por flavonoides. Os compostos fenólicos são geralmente divididos, tendo em conta a sua estrutura química, em não-flavonoides (como os ácidos fenólicos) e flavonoides (como os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, isoflavonas e flavanonóis) (24).

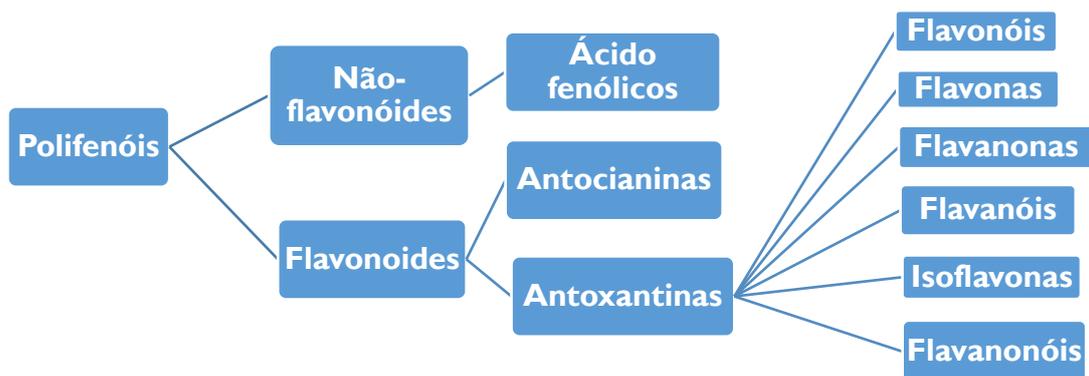


Figura 1: classificação dos diferentes compostos polifenólicos.

Não-Flavonoides

Nas plantas, excluindo a hidroquinona, é relativamente pequeno o número de fenóis livres. A presença dos derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico caracteriza, em fitoquímica, este grupo de compostos com alguma importância terapêutica.

- 1) Ácidos fenólicos derivados do ácido benzoico: os ácidos fenólicos hidroxilados são muito abundantes na natureza, estando representados nos taninos hidrolisáveis, como o ácido gálico e o ácido elágico (dímero).
- 2) Ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico: geralmente na forma de heterósidos fenilpropanoicos (C6 – C3). Os mais difundidos na natureza são o ácido p-cumárico, o ácido cafeico, o ácido ferúlico e o ácido sináptico (23).

Os principais compostos fenólicos não-flavonoides são os ácidos fenólicos C6-C1 (como o ácido gálico, precursor biossintético dos taninos hidrolisáveis), os ácidos hidroxicinâmicos C6-C3 e os estilbenos C6-C2-C6.

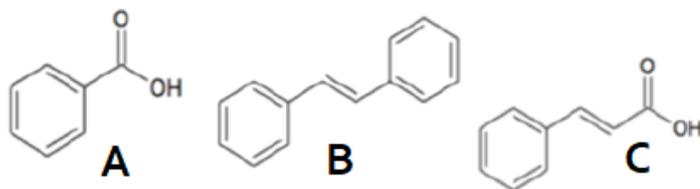
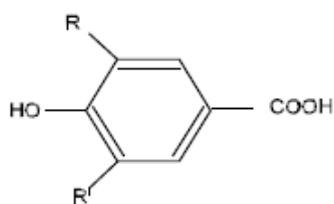


Figura 2: a) ácidos fenólicos, b) estilbenos, c) ácidos hidroxicinâmicos. Adaptado de (21).

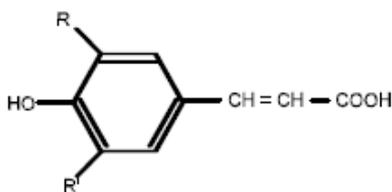
A definição de ácidos fenólicos engloba os ácidos benzoicos com sete átomos de carbono (C6 – C1) e os ácidos cinâmicos com nove átomos de carbono (C6– C3). Normalmente na forma

hidroxilada, são designados por ácidos hidroxibenzóicos (figura 3) e ácidos hidroxicinâmicos (figura 4) (21).



R = R' = H; Ácido *p*-hidroxibenzóico
R = OH, R' = H; Ácido protocatéquico
R = OCH₃, R' = H; Ácido vanílico
R = R' = OH; Ácido gálgico
R = R' = OCH₃; Ácido siríngico

Figura 3. Estrutura dos ácidos hidroxibenzóicos. Adaptado de (26).



R = R' = H; Ácido *p*-cumárico
R = OH, R' = H; Ácido cafeico
R = OCH₃, R' = H; Ácido ferúlico
R = R' = OCH₃; Ácido sinápico

Figura 4. Estrutura dos ácidos hidroxicinâmicos. Adaptado de (26).

Os ácidos hidroxicinâmicos encontram-se na natureza na forma conjugada ou de ésteres. Por exemplo, conjugados com o ácido quínico são designados ácidos clorogénicos (23).

Flavonoides

Os flavonoides têm inúmeras funções na natureza e formam um vasto grupo de metabolitos secundários. Em geral, as estruturas predominantes são os flavonóis e flavonas, quase sempre na forma heterosídica. As antocianinas são outra forma estrutural de flavonoides, que podem ocorrer em raízes e folhas. Uma elevada proporção de flavonoides são heterósidos hidrossolúveis e são consumidos diariamente na nossa dieta. Os flavonoides são moléculas de baixa massa molecular que se encontram amplamente distribuídas no reino vegetal, estando presentes em toda a parte aérea das plantas. Tendo por base a estrutura da flavona (2-fenil-benzopirona), os flavonoides incluem um enorme grupo de moléculas. Dependendo das suas estruturas químicas, os derivados flavonoides têm diferentes atividades farmacológicas, de tal forma que uma simples comparação das suas quantidades não é suficiente para avaliar a sua atividade biológica (23).

Do ponto de vista biossintético, os flavonoides resultam da união de duas subunidades, tendo sido já identificadas mais de 4000 substâncias pertencentes a este grupo de compostos secundários (21). Do ponto de vista químico, os flavonoides são compostos tricíclicos, com 15 átomos de carbono na sua estrutura básica (figura 5). Os flavonoides podem ocorrer na forma

de genina (aglicona), glicosídica ou como derivados metilados. A estrutura geral destes compostos é constituída assim por dois anéis aromáticos (A e B) e um heterociclo oxigenado (anel pirano ou anel C) que pode ou não ciclizar, formando um sistema C6-C3-C6. As substituições (por oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfatação) nos anéis A e B podem dar origem a compostos diferentes dentro de cada classe de flavonoides (23).

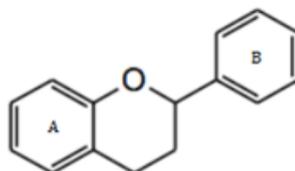


Figura 5. Estrutura geral dos flavonoides. Adaptado de (23).

O anel B condensado com o anel benzénico ou é uma γ -pirona (flavonóis e flavonas) ou o seu derivado di-hidro. A posição dos substituintes benzénicos divide a classe destas moléculas em flavonoides (substituição na posição 2) e isoflavonoides (substituição na posição 3). Os flavonóis diferem das flavonas por possuírem um grupo hidroxilo na posição 3 e ambos têm uma dupla ligação entre C2 – C3. As catequinas são muito semelhantes aos flavonóis, mas distinguem-se destes por não possuírem o grupo carbonilo característico no anel C (21)(23). De acordo com o grau de oxidação e padrão de substituição do anel (isto é, a presença ou ausência do grupo de cetona e/ou o grupo 3-hidroxilo no anel C), os flavonoides podem ser divididos em diferentes classes (figura 6) (26).

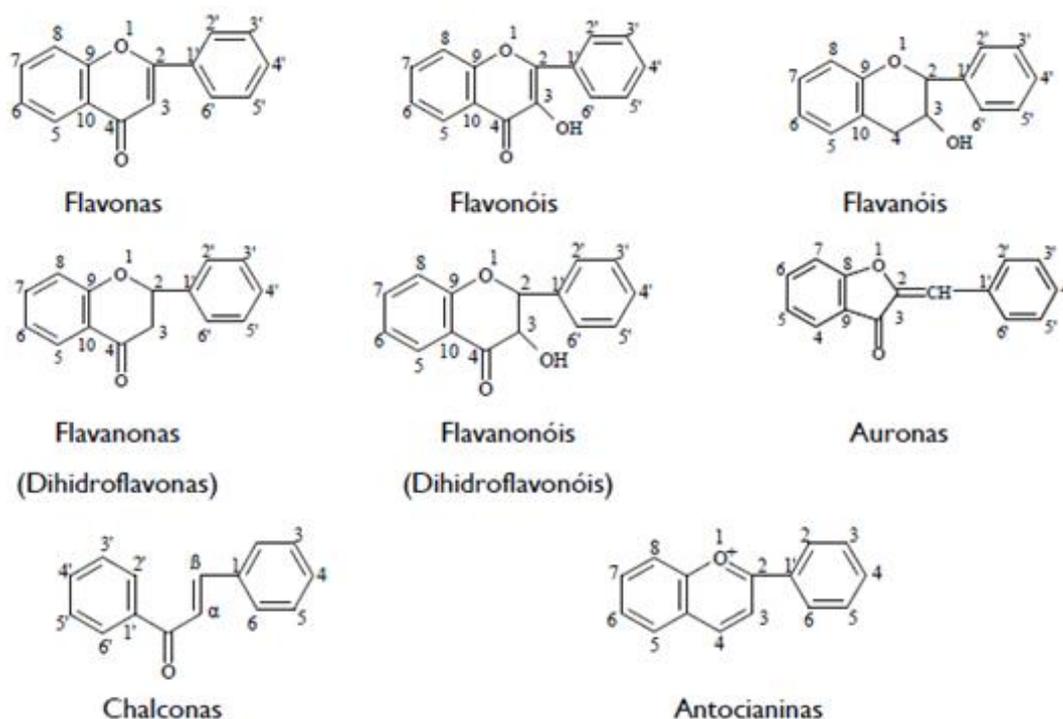


Figura 6. Diferentes classes dos flavonoides. Adaptado de (26).

As flavonas e os flavonóis diferem entre si pela ausência ou presença de um grupo hidroxilo na posição 3 do anel pirona, sendo estes os compostos mais abundantes. As flavanonas apresentam uma saturação na ligação C2-C3. Por outro lado, os flavanóis apresentam uma estrutura semelhante à dos flavanonóis, sendo que nos flavanóis há ausência de uma cetona no carbono 4 do anel pirano. Estes compostos podem existir na forma monomérica (catequinas) ou polimérica (proantocianidinas). As catequinas podem ser encontradas em muitas frutas, sendo predominantes no chá verde. As proantocianidinas, conhecidas como taninos condensados, são catequinas complexas ligadas entre C4-C8 (ou C6), que formam dímeros, oligómeros e polímeros e que são responsáveis pela adstringência de frutos e bebidas (23)(27)(28)(29). Os flavonoides estão muitas vezes hidroxilados nas posições 3, 5, 7, 3', 4' e 5'. Quando se formam heterósidos, a ligação glicosídica está normalmente localizada na posição 3 ou 7 (usualmente a L-ramnose, a D-glucose ou os seus di-holósidos) (23).

As antocianinas são os glucósidos hidrossolúveis das antocianidinas. Fazem parte dos fenóis com 15 átomos de carbono (ou seja, flavonoides), com o típico sistema de anel-A benzoil e o anel-B hidroxicinamoil, sendo o sistema de numeração dos carbonos igual aos outros flavonoides (23). As antocianinas podem ser distinguidas pela sua carga positiva presente no anel pirano, que é responsável pela pigmentação vermelha, azul ou roxa nos tecidos de frutas e flores. Visto que a forma livre de aglicona é altamente instável, estas aparecem na natureza sempre na forma glicosilada (30).

Os isoflavonoides, neoflavonoides, calconoides e auronoides são compostos menos comuns que os flavonoides anteriormente abordados. Os isoflavonoides ganharam um interesse crescente como fitoestrogénios, sendo frequentemente encontrados em suplementos dietéticos, em especial para a menopausa (31).

Taninos

Anteriormente, o termo “tanino” designava as substâncias de origem vegetal utilizadas para curtir peles. Os taninos são compostos fenólicos hidrossolúveis, com massas moleculares entre 500 e 3000, com reações comuns aos fenóis, precipitando alcaloides e proteínas. Os taninos podem ser divididos em dois grupos:

1. Taninos hidrolisáveis: galhotaninos e elagitaninos são metabolitos de um poliol alifático central (geralmente a glucose), esterificado por moléculas de ácido fenólico.

2. Taninos complexos: formados pela ligação de taninos hidrolisáveis ao C₆ ou C₈ de uma unidade 3-flavanol (23).

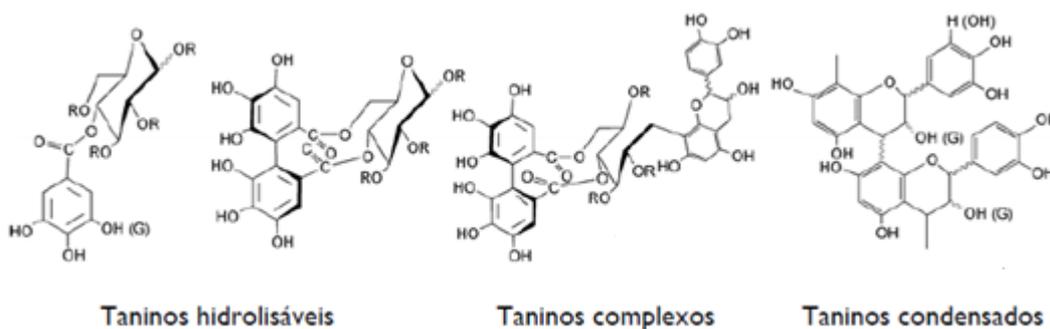


Figura 7. Taninos hidrolisáveis e alguns compostos derivados. Adaptado de (23).

Uma das características mais importantes dos taninos é a sua adstringência, que resulta das ligações de hidrogénio entre os grupos fenólicos e interações hidrofóbicas. O papel biológico de muitos taninos nas plantas está relacionado com a proteção contra animais herbívoros, insetos, fungos e bactérias. Supõe-se que atuem através de mecanismos relacionados com a capacidade de sequestrar radicais livres, complexar macromoléculas de natureza proteica ou poli-holósida e com iões metálicos (23).

Terpenos

Os terpenos são o maior grupo de metabolitos secundários de origem vegetal. Abundantes em óleos essenciais de plantas aromáticas, são responsáveis pelas suas características odoríferas, tendo ainda propriedades antimicrobianas. Em geral, os óleos essenciais são insolúveis em meio aquoso, tóxicos para muitos insetos e mamíferos, participam na regulação da evapotranspiração e como polinizadores. Ao nível químico, os terpenos são unidades sucessivas de isopreno (C₅): monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (23).

CONDIÇÕES DE *STRESS* OXIDATIVO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante tem sido das mais associadas aos compostos fenólicos. Nas últimas décadas, os radicais livres promoveram uma revolução na compreensão das perturbações que ocorrem nas células: no decorrer da atividade metabólica normal há formação de radicais livres, existindo mesmo algumas células especializadas na sua produção; os radicais oxigenados desempenham um papel importante nas reações inflamatórias, na

carcinogênese, na aterosclerose, nas lesões do trato gastrointestinal e no envelhecimento. A compreensão destes mecanismos e a descoberta de substâncias que os possam regular constitui uma via promissora na terapia destas patologias (23). A oxidação é um processo fundamental do metabolismo humano: concentrações moderadas de radicais livres são benéficas para as células do organismo humano, estando envolvidas em vários processos fisiológicos como a ativação do sistema imunitário, a regulação do crescimento celular, a produção de energia, a transmissão de sinais químicos e desintoxicação. A produção destas substâncias é normalmente contrabalançada pelos antioxidantes endógenos (23)(24)(32).

Os hábitos alimentares menos saudáveis são responsáveis pelo menor consumo de alimentos ricos em antioxidantes. Estes hábitos alimentares associados ao *stress*, à poluição ambiental, ao sedentarismo e aos processos metabólicos que ocorrem naturalmente no organismo produzem radicais livres na forma de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de azoto (RNS). Entre as espécies reativas de oxigênio estão o anião superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxilo (HO^{\bullet}), o radical peróxido (ROO^{\bullet}), o radical alcoxilo (RO^{\bullet}) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}). As principais espécies de RNS incluem o óxido nítrico (NO^{\bullet}), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nítrico (HNO_2), nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-) (21).

No entanto, a produção excessiva de radicais livres resulta na oxidação de lípidos, proteínas, hidratos de carbono e mutações no ADN, causando danos celulares, impedindo a sua função normal e resultando no aparecimento de diversas patologias. A polinsaturação dos ácidos gordos e a sua organização particular permite que os lípidos membranares sejam um alvo privilegiado dos radicais livres: a sua peroxidação conduz a numerosos derivados dos fenómenos de oxidação celular – hidroperóxidos lipídicos, aldeídos, dialdeídos conjugados, hidrocarbonetos e conjugados fluorescentes. Alguns destes derivados têm atividade biológica – ação quimiotática, efeito sobre a divisão celular, etc. Outros efeitos dos radicais livres resultam da sua ação sobre os polissacáridos (despolimerização do ácido hialurónico), as proteínas (modificações químicas de aminoácidos cruciais para as funções enzimáticas ou fragmentação das cadeias peptídicas) e os ácidos nucleicos (alterações cromossómicas). Entre os principais fatores determinantes para o aparecimento dos radicais livres estão a exposição às radiações solares, a intoxicação com alguns produtos químicos ou medicamentos, a peroxidação ou reoxigenação intensa em tecidos privados de oxigênio, por processos inflamatórios, má nutrição, consumo de tabaco e álcool, *stress* e obesidade (23).

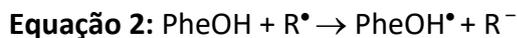
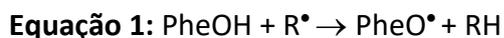
Para fazer face ao aumento dos radicais livres existem vários sistemas de defesa antioxidante e de reparação. Quando é perturbado o equilíbrio entre pró-oxidantes e

antioxidantes a favor dos primeiros diz-se que há “*stress oxidativo*”. Muitos investigadores estão convencidos que os efeitos acumulados dos radicais livres têm um papel importante no aparecimento de doenças tão diversas como o cancro, a artrite reumatoide, a aterosclerose, a isquemia cardiovascular e a doença de Parkinson. No entanto, não tem sido fácil determinar com rigor a importância relativa dos radicais na sua génese e são ainda escassos os sucessos obtidos com antioxidantes na sua prevenção e tratamento (23).

Os principais meios de oposição aos radicais livres são substâncias obtidas normalmente na alimentação, como as vitaminas C e E, o β -caroteno e alguns compostos fenólicos. O potencial dos compostos fenólicos tem levado a vários estudos: muitos flavonoides têm sido referidos como fortes *scavengers* e antioxidantes dos radicais livres. Alguns autores sugerem que os flavonoides para terem este efeito de *scavenger* devem ter hidroxilos em 3' e 4', embora não seja um requisito absoluto (23)(24). Os compostos fenólicos, para além de serem considerados como potenciais protetores contra os efeitos nocivos dos radicais livres, são também inibidores dos processos de peroxidação e de envelhecimento dos tecidos. De igual forma, podem agir de modo a complexar o ferro, suprimindo um dos processos catalisadores da oxidação da vitamina C e dos lípidos. Também tem sido explicada a atividade antioxidante dos flavonoides pela proteção da vitamina E nas membranas dos microssomas, embora com um efeito mais tardio que o ascorbato e a glutatona. Os autores admitem dois mecanismos responsáveis por essa atividade: no primeiro, os flavonoides poderiam complexar os radicais livres gerados no sistema ácido araquidónico/lipoxigenase, prevenindo a interação dos radicais com a vitamina E; no segundo, semelhante ao do ascorbato e da glutatona, por interação com os radicais tocoperóxido de modo a reciclar a vitamina E nas membranas. As bases bioquímicas mais correntes para o efeito antioxidante dos flavonoides ligam-se à inibição da peroxidação lipídica. No entanto, devido à estrutura polifenólica, essa inibição pode resultar da possibilidade de complexarem os metais de transição, como é o caso do ferro que é, frequentemente, utilizado como indutor de peroxidação (23).

De modo geral, são três os mecanismos envolvidos nas propriedades biológicas dos polifenóis: eliminação dos radicais livres; inibição de mediadores pró-oxidantes e pró-inflamatórios (como NF-kB, iNOS, COX-2 e LOX); melhoria das defesas celulares (33). O primeiro mecanismo pode ocorrer de duas formas: através de reações da transferência do átomo de hidrogénio (HAT) ou de transferência de um eletrão (SET). Como resultado de uma reação HAT, o átomo de hidrogénio é transferido do composto fenólico para o radical

(equação 1), podendo este último reagir com outros radicais. Por outro lado, numa reação SET, o eletrão do composto fenólico é transferido para reduzir os radicais (equação 2).



Importa salientar que as reações HAT e SET podem ocorrer em simultâneo, sendo a reação principal determinada pelas propriedades do antioxidante, a solubilidade e o coeficiente do solvente. Atualmente acredita-se que a reação HAT é a mais importante (34). Além das propriedades antioxidantes, os compostos fenólicos são conhecidos por apresentar capacidade de inibição dos mediadores pró-oxidantes e pró-inflamatórios. Embora menos estudada, existem alguns dados sobre a relação estrutura-atividade dos flavonoides com outras enzimas: os flavanóis serão inibidores da LOX, enquanto as flavonas agem contra a COX. No entanto, as evidências sugerem que a presença da ligação dupla C2-C3, do grupo catecol no anel B, grupos carbonilo e hidroxilo C5 e C7 são relevantes para o efeito inibitório sobre estas duas enzimas, além da inibição de iNOS, e cinases de I κ B (responsáveis pela ativação do fator de transcrição NF- κ B) (28). A informação existente sobre estrutura-atividade entre ácidos hidroxicinâmicos e pró-oxidantes ou enzimas pró-inflamatórias ainda é muito limitada. No entanto, existem já alguns dados sobre a função do 3,4-catecol e dos grupos α,β - insaturados na inibição da atividade de NF- κ B (35).

BIOATIVIDADE E BIODISPONIBILIDADE DOS COMPOSTOS FENÓLICOS

De uma forma geral, o consumo de diferentes compostos fenólicos tem sido associado a efeitos benéficos para a saúde (24). Vários estudos epidemiológicos indicam uma associação inversa entre o consumo de flavonoides e o risco de doenças cardiovasculares ou vários tipos de cancro. O corpo humano não é capaz de sintetizar flavonoides e a dieta é a sua principal fonte (frutas, vegetais, legumes, vinho e chá). No entanto, o consumo total de flavonoides varia em todo o mundo, havendo uma percentagem significativa da população com um consumo insuficiente. A suplementação pode ser uma forma de minimizar este problema (36).

Os mecanismos de absorção e de biodisponibilidade dos flavonoides não estão ainda completamente explicados, possivelmente variando quer se trate de uma genina, de formas heterosídicas ou polímeros. A solubilidade lipídica dos flavonoides está ainda pouco

documentada: verificou-se que, uma vez absorvidos, os flavonoides são transportados na albumina plasmática ou nas lipoproteínas. No entanto, mantém-se a questão para as formas heterosídicas, supostamente hidrolisadas no intestino e transformadas no fígado em derivados sulfo e glucuronados: em teoria estas formas são pouco absorvidas na parte superior do trato digestivo e a sua digestibilidade depende da presença de enzimas bacterianas que podem também quebrar as moléculas dos flavonoides e transformá-los em ácidos fenólicos (23).

A biodisponibilidade varia muito entre os diversos compostos fenólicos (37). A absorção dos compostos fenólicos depende da sua estrutura química, tamanho molecular, solubilidade, grau de glicosilação, acilação e polimerização (38). Por exemplo, a biodisponibilidade pode ser baixa quando os compostos fenólicos possuem uma massa molecular elevada. Por outro lado, da hidrólise dos compostos fenólicos originais pode resultar metabolitos biologicamente mais ativos (39). Em geral, os flavonoides são absorvidos como agliconas após uma hidrólise prévia dos glicosídeos.

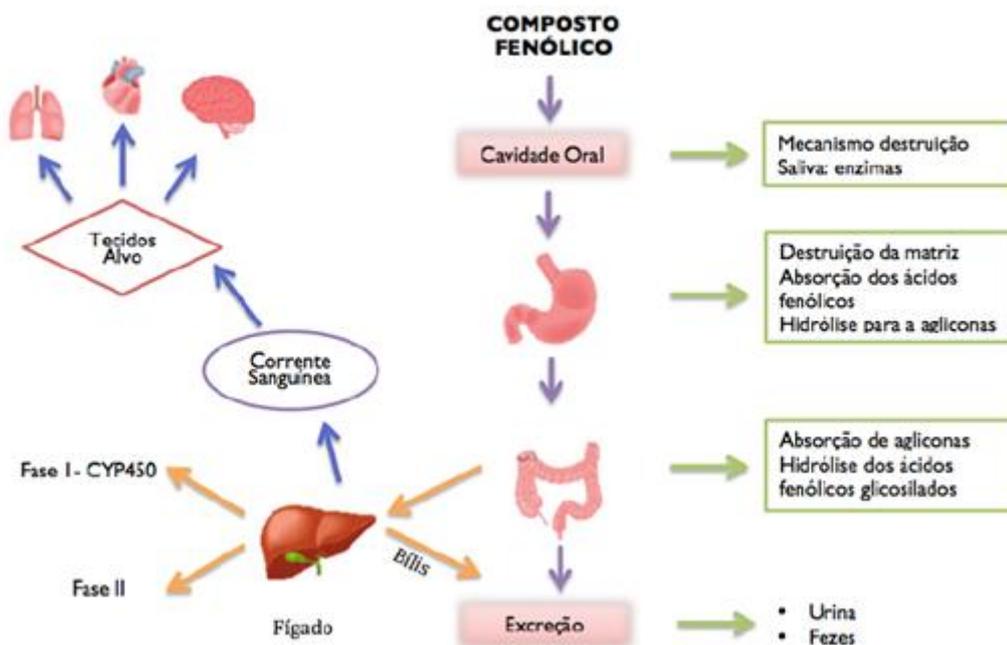


Figura 8. Esquema das etapas envolvidas na biodisponibilidade dos compostos fenólicos.

Adaptado de (40).

Durante a absorção, os compostos fenólicos também podem sofrer vários processos de modificação (metilações, sulfatações), servindo estas alterações estruturais como elementos de sinalização na sua excreção. Assim, a estrutura com que estes compostos chegam à

corrente sanguínea é bastante diferente daquela em que foram ingeridos, dificultando o esclarecimento da sua atividade biológica (23).

EFEITOS BENÉFICOS

A atividade antioxidante é a que desperta mais atenção à comunidade científica devido aos benefícios na prevenção de doenças crônicas associadas geralmente à acumulação de espécies reativas de oxigênio no organismo (24). Vários estudos epidemiológicos e clínicos têm relacionado o consumo de alimentos ricos em antioxidantes com baixas taxas de incidência e mortalidade de doenças crônicas (câncer, diabetes, aterosclerose, artrite reumatoide, doenças neurodegenerativas e coronárias). Estes potenciais benefícios dos antioxidantes da dieta levaram ao crescimento dramático no mercado destes suplementos alimentares nos últimos anos (15).

Os flavonoides têm atraído a atenção devido às suas propriedades anticarcinogénica, antialérgica, anti-inflamatória e semelhança ao estrogénio (23). Têm sido atribuídas várias propriedades terapêuticas aos compostos fenólicos. Das principais atividades biológicas destes compostos, destacam-se a atividade antioxidante e antitumoral; o efeito cardioprotetor capaz de reduzir a mortalidade por doenças coronárias; a atividade antiperoxidativa ao nível das membranas celulares do fígado; a inibição da carcinogénese pulmonar; a atividade antibacteriana e antiviral; a atividade antidiarreica; a atividade estrogénica de algumas isoflavonas; como protetores solares.

O *stress* oxidativo induz mudanças estruturais e funcionais nos componentes vasculares. O aumento da produção de espécies reativas favorece a disfunção vascular, induzindo alterações na permeabilidade vascular e na inflamação, acompanhada pela perda da função vascular modulatória, o desequilíbrio entre o vasorelaxamento e a vasoconstrição e a expressão aberrante de moléculas inflamatórias de adesão. A disfunção vascular conduz ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares, diabetes, doenças inflamatórias do intestino e distúrbios neurológicos. Já foram identificados mecanismos associados com a disfunção endotelial e o papel da mitocôndria na produção das espécies reativas de oxigênio (20).

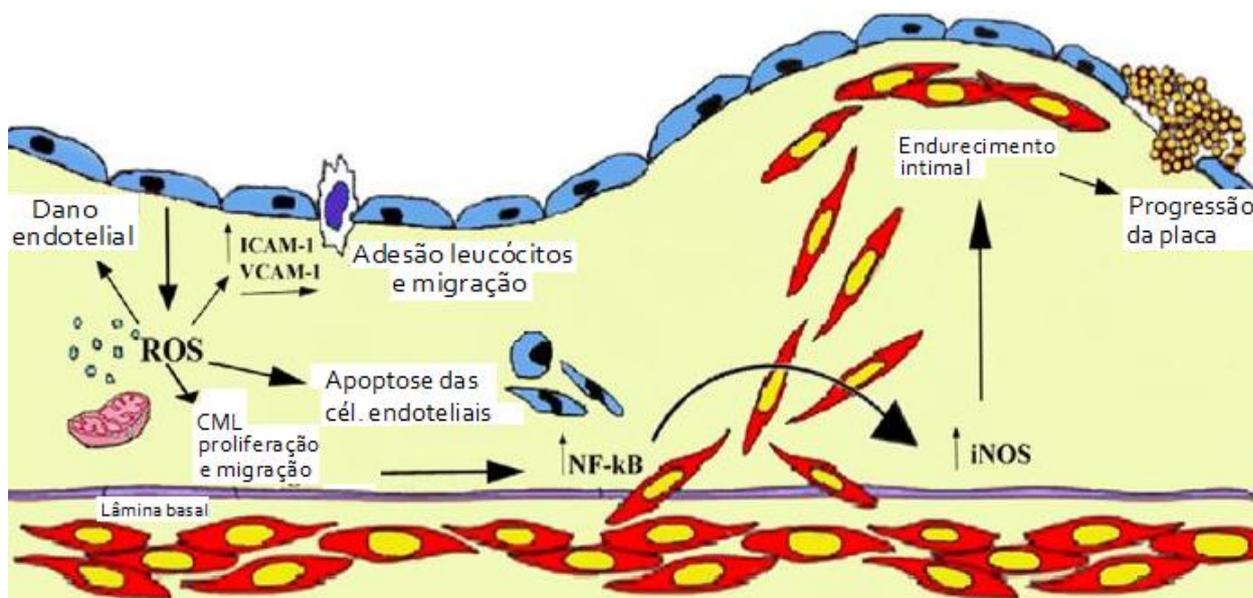


Figura 9: desenvolvimento da disfunção endotelial pela produção em excesso de espécies reativas de oxigênio. Adaptado de (20).

A mitocôndria aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio, causando apoptose das células endoteliais e o aumento da expressão de moléculas de adesão celular (ICAMs, VCAMs) com consequente adesão de leucócitos e migração, bem como proliferação e migração de células da musculatura lisa (CML). A acumulação de espécies reativas de oxigênio leva ao aumento de NFkB em CML, que induz o aumento da atividade de iNOS, favorecendo o endurecimento da intima e a disfunção vascular (20). Estudos *in vitro* mostram igualmente que a ligação dos polifenóis ao LDL aumenta a sua resistência à oxidação. Os flavonoides poderão atuar não só como antioxidantes: por exemplo, a ingestão de polifenóis no vinho tinto abrandou o processo de aterosclerose sem envolver a peroxidação lipídica, sugerindo um mecanismo de ação diferente. Já a suplementação de ratinhos com uma mistura de catequinas, ácido cafeico e resveratrol diminuiu significativamente a aterosclerose por inflamação (24).

Os flavonoides têm sido implicados em efeitos benéficos no trato gastrointestinal (tratamento de úlceras gástricas e diarreias crônicas), sendo os flavonóis os mais ativos (23). Vários estudos analisaram o café como fonte de antioxidantes fundamentais para a manutenção das funções celulares: importa destacar o papel dos ácidos clorogênicos na inibição de compostos N-nitroso no trato gastrointestinal ou dos diterpenos (cafestol e kawheol) como quimioprotetores e anticancerígenos (41).

O fígado, um dos órgãos principais de metabolização, recebe antioxidantes e outros compostos bioativos através do sistema digestivo. Assim, é mais suscetível aos efeitos negativos dos xenobióticos e das moléculas envolvidas na sua destoxificação. Este processo pode resultar em inflamação e fibrose. Alguns estudos apontam um efeito benéfico potencial do café sobre o fígado, nomeadamente em relação ao desenvolvimento da cirrose hepática. Verificou-se também a redução da atividade da alanina aminotransferase sérica e dos níveis da enzima hepática gama-glutamyltransferase, dois indicadores da doença hepática. O estudo *in vitro* das células do hepatoma humano HepG2 revelou que o extrato de grãos de café verde (rico em ácidos clorogénicos) protege as células do fígado humano do *stress* oxidativo. Estes resultados confirmam a importância destes constituintes na defesa contra os danos oxidativos. Os mecanismos envolvidos provavelmente incluem a interação com radicais livres e a modulação da expressão endógena de defesas antioxidantes, a sinalização ou a expressão genética através do NF-Kb ou Nrf2 (41)(42).

O café verde mostrou-se também como uma excelente fonte de compostos com potencial atividade antioxidante multidirecional. Merecem destaque os resultados na inibição da LOX (lisil oxidase), responsável pelo desenvolvimento do cancro na forma de metástases (42)(43)(44). A análise de 669 casos de adenocarcinoma invasivo demonstrou que o consumo de antioxidantes na dieta e na forma de suplementos antioxidantes pode reduzir o risco de cancro (45).

No caso das flavonas foi possível determinar a sua atividade ansiolítica, depressora do sistema nervoso central, uma vez que estas moléculas apresentam uma estrutura cuja eletronegatividade dos anéis A e B permite a ligação aos recetores GABA_A (23).

As isoflavonas são os constituintes mais representativos usados com atividade semelhante ao estrogénio. A genisteína e a daidzeína são os mais estudados, sendo comercializados na forma de 7-O-glucósidos. Estas moléculas possuem em comum com o estradiol (o estrogénio endógeno principal) uma estrutura planar rígida e a presença de dois grupos hidroxilo em C7 e C4' nos anéis A e B, respetivamente, a uma distância muito semelhante à dos hidroxilos C3 e C17 do estradiol (23).

EFEITOS ADVERSOS: efeito pró-oxidante devido à elevada concentração?

Os oxidantes desempenham funções importantes no organismo, sendo a sua remoção excessiva problemática. A concentração é um fator importante: níveis demasiado altos ou

demasiado baixos também são prejudiciais. Os oxidantes e antioxidantes têm uma natureza química semelhante e participam no mesmo tipo de reações. Atualmente é discutível se o consumo total de antioxidantes da dieta excede ou não as necessidades, já que muitos aditivos são também antioxidantes relativamente fortes (46). Foram já identificados muitos supostos antioxidantes em suplementos alimentares que atuam na verdade como pró-oxidantes ou simples transportadores de elétrões, representando igualmente um desafio à regulação destes produtos (2).

A característica estrutural dos antioxidantes é a abundância de eletrões, que podem ser doados diretamente às espécies reativas de oxigénio ou aos radicais livres. Assim, um antioxidante é oxidado formando um oxidante ou um radical. O fator chave da capacidade antioxidante reside no destino destes produtos derivados dos antioxidantes. Na figura 10, o ArOH representa um antioxidante típico contendo um grupo hidroxilo (-OH), enquanto LH refere-se aos substratos biológicos que são suscetíveis a oxidação induzida pelas espécies reativas de oxigénio (45).

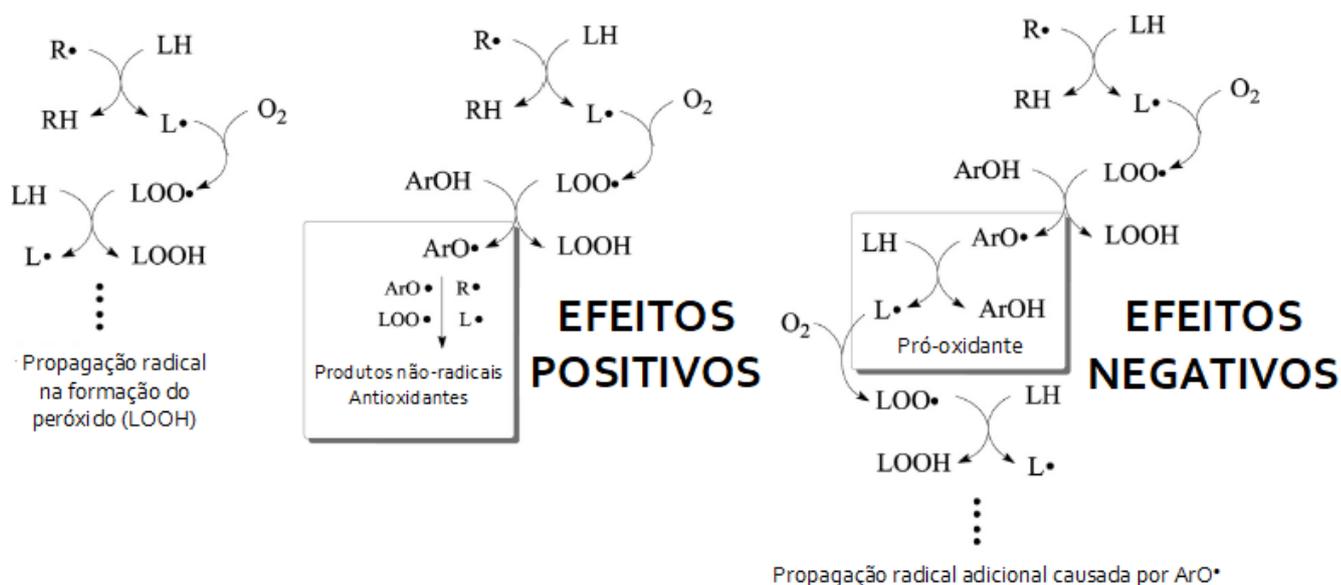


Figura 10. A ação antioxidante do ArOH depende do $ArO\cdot$. Adaptado de (45).

$R\cdot$ refere-se aos radicais prejudiciais que podem retirar um átomo de hidrogénio do LH para produzir o radical correspondente $L\cdot$. Depois o $L\cdot$ retira um átomo de hidrogénio de outro LH. Como resultado, o LH é esgotado por via da propagação radicalar na presença de oxigénio. Dado que o ArOH pode ser envolvido na propagação radicalar, o ArOH em vez do LH fornece o átomo de hidrogénio ou o eletrão de $L\cdot$ ou $R\cdot$ e é convertido em $ArO\cdot$. A ação antioxidante do ArOH depende da ação subsequente do $ArO\cdot$: se o $ArO\cdot$ é suficientemente estável e não inicia a propagação radicalar e se o $ArO\cdot$ consegue recombinar com outros radicais para forma

produtos não-radicais, o ArOH termina a propagação radical e funciona como um verdadeiro antioxidante. Por outro lado, se o ArO• é tão ativo que consegue retirar átomos de hidrogénio do LH e iniciar a propagação radicalar adicional, o ArOH torna-se um pró-oxidante. Vários antioxidantes utilizados conjuntamente podem formar um sistema sinérgico que quelatam radicais antioxidantes e assim suprimem a iniciação da propagação radicalar adicional. Por outro lado, quando um antioxidante é utilizado isoladamente é convertido em pró-oxidante rapidamente (45).

Os antioxidantes têm potencialidades na prevenção e tratamento das mais diversas patologias. No entanto, alguns investigadores referem que esta suplementação pode ter igualmente efeitos incertos ou negativos. A comparação de 417 pacientes com 395 indivíduos saudáveis em Nova Jérnia demonstrou que o consumo de compostos fenólicos totais dos alimentos pode de facto diminuir o risco de cancro do endométrio, mas a suplementação com compostos fenólicos individuais não diminui o risco de cancro (45). Outro estudo demonstrou que o consumo de vitamina C não diminui o risco de esofagite de refluxo ou esófago de Barrett, embora possa ser útil no adenocarcinoma esofágico (45).

O estudo de 51 529 profissionais de saúde masculinos (Harvard School of Public Health, Boston, Massachusetts, de 1986 a 2004) mostrou que o consumo de antioxidantes não diminui o risco de cancro rectal (45). Um estudo sobre os efeitos da vitamina E e do beta-caroteno, isolados e em conjunto, na incidência do cancro do pulmão em 30 000 fumadores finlandeses (entre os 50 e os 69 anos) demonstrou que o risco aumentou no grupo suplementado com beta-caroteno, que a suplementação com vitamina E tem um efeito marginal na incidência da doença coronária fatal e não demonstrou efeitos no enfarte do miocárdio não-fatal (24).

A comparação entre 1215 pacientes (com mais de 50 anos, entre 1997 e 2001) com fratura da anca e 1349 voluntários com idade semelhante no Utah indicou que a vitamina C e o consumo de antioxidantes em geral não reduz o risco de fratura na anca entre fumadores (45).

Embora a vitamina E iniba a peroxidação lipídica, o excesso de vitamina E em emulsões lipídicas pode acelerar a peroxidase lipídica *in vitro*. Os estudos *in vitro* demonstram igualmente que a administração de vitamina E aumenta os níveis de produtos da peroxidação lipídica no plasma em fumadores com uma dieta rica em gorduras. Níveis elevados de vitamina E podem também afetar a ação da vitamina K na coagulação sanguínea. Uma meta-análise aos suplementos com vitamina E em doses elevadas mostrou que esta aumenta a mortalidade geral da população. Uma meta-análise de 15 ensaios clínicos não demonstrou efeitos

benéficos dos antioxidantes em doenças cardiovasculares. Apesar do tratamento com antioxidantes aumentar significativamente a concentração de vitaminas na corrente sanguínea, não foram demonstrados efeitos benéficos na proteção cardiovascular (24).

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA/AUTENTICIDADE

A avaliação da autenticidade procura a ausência de adulterações ou falsificações, através da presença de marcadores químicos, conforme à descrição comercial. A avaliação da autenticidade insere-se na política de promoção da qualidade na UE, com o objetivo de permitir a livre circulação de produtos, a lealdade de concorrência, garantir a segurança e saúde pública, fornecer informação adequada ao consumidor e promover a defesa do ambiente. Entre os comportamentos recomendados na aquisição de suplementos alimentares estão a compra a produtores de confiança; obter informação junto de um médico ou outro profissional de saúde credenciado; informar sempre estes sobre as suas condições de saúde e o uso de outros medicamentos ou suplementos, estado de gravidez ou aleitamento; ter especial cuidado com as crianças; ler atentamente a rotulagem; não exceder doses recomendadas. Tal como os medicamentos, as substâncias presentes nos suplementos alimentares podem apresentar efeitos secundários (3).

Ainda hoje prevalece a ideia que os produtos de origem natural são mais seguros (2)(3). No entanto, faltam estudos e monitorização efetiva sobre as interações destes produtos. A própria EFSA reconhece a falta de dados sobre os suplementos alimentares, emitindo uma série de recomendações sobre os mesmos, nomeadamente o seu consumo conjunto com medicamentos (7). A monitorização resume-se demasiadas vezes apenas a um Estado-Membro, numa lógica voluntária de alguma instituição e com um alcance reduzido (3). Os suplementos alimentares contêm substâncias fracamente controladas, com pouca ou nenhuma supervisão clínica, erros nas dosagens, concentrações e efeitos indicados e a presença de substâncias perigosas. A regulação e vigilância destes produtos é ainda escassa, sugerindo alguns estudos o reforço da legislação e dos parâmetros de segurança. O aumento exponencial do número de notificações do sistema RASFF sugere a necessidade de maiores cuidados com a proteção dos cidadãos (2).

A quantidade de flavonoides nos suplementos alimentares é frequentemente declarada pelo produtor como a soma de todos os flavonoides e só em alguns casos há informação quantitativa dos flavonoides individuais. Para garantir a eficácia farmacológica, para

compreender melhor as suas propriedades bioativas e para aumentar a qualidade destes produtos é fundamental estabelecer métodos analíticos apropriados para a realização de avaliações de rotina (36). O conhecimento da atividade antioxidante dos produtos disponíveis no mercado é muito importante para poderem ser comparados entre si.

PARTE EXPERIMENTAL

O trabalho laboratorial decorreu na Faculdade de Farmácia do Porto. Foram avaliados a atividade antioxidante, por dois métodos diferentes e os teores totais de compostos fenólicos e flavonoides em 14 amostras adquiridas no início do mês de janeiro, na área do Grande Porto, Portugal.

DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram selecionados produtos à base de plantas com potencial atividade antioxidantes ou contendo compostos antioxidantes conhecidos. A Tabela 3 apresenta uma descrição detalhada de cada amostra.

Tabela 3: identificação e descrição das amostras utilizadas.

IDENTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS	DESCRIÇÃO	QDS	PREÇO
Suplementos alimentares			
1 Cavalinha Marca A	90 comprimidos; 600 mg/dd; tomar 1 comprimido ao almoço e ao jantar. <i>Equisetum arvensis</i> (Cavalinha) 300 mg.	2	3,75 €
2 Garcinia Marca A	72 cápsulas; 800 mg/dd; tomar 1 cápsula ao almoço e ao jantar. Extrato seco concentrado (4:1) <i>Garcinia cambogia</i> (teor mínimo de 60% de ácido hidroxicítrico) 200mg, <i>Rhamnus purshiana</i> (Cáscara sagrada) 100mg, extrato seco concentrado (13:1) de <i>Cynara scolymus</i> (Alcachofra) 7,68 mg.	2	7,44 €
3 Alcachofra 1 Marca A	50 cápsulas; 600 mg/dd; 1 cápsula 3 vezes ao dia, 10 a 15 minutos antes das refeições principais. <i>Cynara scolymus</i> (Alcachofra) 600 mg quantidade diária. 59,52 % Alcachofra.	3	4,94 €
4 Café verde 1 Marca A	60 cápsulas; 1000 mg/dd; tomar 1 cápsula antes do pequeno almoço e do almoço. Extrato seco concentrado de café verde (10:1) 100 mg quantidade diária (2 cápsulas). Café verde (fruto) 12,5%.	2	5,74 €
5 Café verde 2 Marca B	30 cápsulas; 1000 mg/dd; tomar 1 cápsula por dia fora das refeições; café verde (extrato 4:1) 200 mg (equivalente a 1000 de vegetal dessecado contendo 45% de ácido clorogénico), aveia (extrato seco estandardizado a 40% de ácido ferúlico) 50mg, <i>Piper nigrum</i> (extrato estandardizado a 95% de piperina) 2 mg.	1	13,75 €
6 Chá verde cap 1 Marca A	50 cápsulas; 600 mg/dd; tomar 1 cápsula antes do pequeno almoço e do almoço. <i>Camellia sinensis</i> 600 mg quantidade diária (2 cápsulas). Chá verde (folhas) 84.27%.	2	4,24 €
7 Chá verde cap 2 Marca B	30 cápsulas; 3750 mg/dd; tomar 1 cápsula por dia, fora das refeições. Chá verde (extrato seco 5:1 estandardizado a 50% de polifenóis, equivalente a 750 mg de vegetal dessecado) 150 mg, chá verde (extrato seco 30:1 estandardizado a 50%	1	6,90 €

	de epigalocatequinas, equivalente a 3000 mg de vegetal dessecado) 100 mg, chá verde (extrato estandardizado a 90% de epicatequina) 10mg, <i>Piper nigrum</i> (extrato estandardizado a 95% de piperina) 3mg.		
8 Ginseng e alecrim Marca B	30 cápsulas; 1000mg/dd; tomar uma cápsula por dia, antes de uma das principais refeições; extrato seco de Ginseng (4:1) 150mg (equivalente a 600mg de vegetal dessecado), extrato seco de Alecrim (4:1) 100mg (equivalente a 400mg de vegetal dessecado) e <i>Piper Nigrum</i> 3mg (extrato estandardizado a 95% piperina).	1	6,90 €
9 Gingko biloba 1 Marca B	30 cápsulas; Tomar 1 cápsula por dia; <i>Gingko biloba</i> (4:1) com mais 24% de flavonoides glicosilados; castanheiro da Índia (4:1);	1	6,24 €
10 Ginseng Marca C	50 cápsulas; 1 cápsula fornece 15mg de extrato seco da raiz de ginseng; tomar 1 cápsula por dia, antes das refeições, com um copo de água; extrato seco da raiz de ginseng (<i>Panax ginseng</i>), com 30% ginsenósidos.	1	9,94 €
11 Gingko biloba 2 Marca C	50 cápsulas; 2 cápsulas fornecem 500mg de extrato seco da folha de <i>Gingko biloba</i> . tomar 2 cápsulas por dia, antes das refeições, com um copo de água. Extrato seco das folhas de <i>Gingko biloba</i> ; 24% de flavonoides totais.	2	6,99 €
12 Alcachofra 2 Marca D	40 cápsulas; <i>Cynara scolymus</i> ; Tomar 2 cápsulas por dia.	2	9,99 €
Saquetas para infusões			
13 Chá cavalinha	10 saquetas; <i>Equisetum arvensis</i> L. (Cavalinha, planta) 100%; uma saqueta por cada chávena de chá. Preparar com água fervida durante 4 a 5 minutos; recomendado 1 chávena em jejum e no fim de cada refeição.	4	2,5 €
14 Chá verde	10 saquetas; <i>Thea sinensis</i> (Chá verde, folhas); uma saqueta por cada chávena de chá. Preparar com água fervida durante 4 a 5 minutos; recomendado uma chávena 3 vezes ao dia.	3	2,5 €
dd, dose diária; QDS, quantidade diária sugerida pelo fabricante			

REAGENTES E PADRÕES

O reagente Folin-Ciocalteu, o acetato de sódio, o cloreto férrico, o DPPH* (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), a TPTZ (2,4,6-Tris(2-piridil)-s-triazina), e os padrões sulfato ferroso, hidrato de catequina, ácido gálgico e trolox foram adquiridos na Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha).

O ácido clorídrico (0,1%), o hidróxido de sódio, o etanol absoluto, o carbonato de sódio, o nitrito de sódio e o cloreto de alumínio e foram adquiridos na Merck. A água destilada ultrapura foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA).

MATERIAIS

Tubos de *falcon* de 15 mL; *ependorfs* de 2 mL; almofariz; papel de filtro; barquinhos; *vials* de cor âmbar (22 mL); funil de vidro; magnetes; papel de alumínio; pipetas Pasteur; balão volumétrico de 100 mL, microplacas, tubos de ensaio.

EQUIPAMENTOS

Balança analítica (Mettler Toledo, AG204); estufa (Binder); placa de agitação (VARIOMAG, TELEMODUL 40 CT, H+P Labortechnik, Alemanha); centrífuga (Labofuge Ae, Heraeus Sepatech, Alemanha); vortex (VWR INTERNATIONAL, Darmstadt, Alemanha); leitor de microplacas (BioTek Synergy HT, GEN S5, EUA).

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Preparação dos extratos dos suplementos alimentares

Pesaram-se 10 cápsulas/comprimidos de cada amostra, sendo o seu conteúdo homogeneizado em almofariz. Em seguida, pesaram-se rigorosamente 500 mg para um *vial* de cor âmbar e a extração foi realizada utilizando um solvente hidroetanólico (1:1, 15mL), em placa de agitação a 40 °C, durante 30 minutos. Em seguida, os *vials* foram centrifugados (5000 rpm, 5 min) e o sobrenadante foi recolhido para um tubo de *falcon* envolvido em papel de alumínio. O resíduo foi re-extraído mais duas vezes, juntando-se todos os sobrenadantes. O volume final foi medido e, em seguida, o extrato foi filtrado para outro tubo de *falcon*.

O processo de extração foi realizado em triplicado. sendo congelados e conservados 8 *ependorfs* e 1 tubo de ensaio para cada suplemento a – 20 °C.

Preparação das infusões

As infusões foram preparadas colocando uma saqueta em água destilada ultrapura, até a fervura, durante 10 minutos. As infusões foram preparadas em triplicado. As amostras 13B e 14B correspondem ao duplicado, utilizando apenas metade da massa das amostras 13 e 14 respetivamente, de forma à precaver possível erros de execução ou saturação das soluções.

METODOLOGIAS ANALÍTICAS

DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Para elaborar a curva de calibração usada na determinação dos compostos fenólicos totais, utilizou-se ácido gálico como padrão. Foi preparada uma solução-mãe com uma concentração de 1 mg/mL a partir da qual se prepararam diferentes diluições com concentrações finais, numa gama linear, entre 0 – 100 mg/L (47)(48)(49).

O ensaio foi realizado em microplaca adicionando, em triplicado, 30 µL de cada solução padrão, das amostras ou do branco (água desionizada), 150 µL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 120 µL de NaCO₃ 7,5%. A microplaca foi incubada em estufa a 45 °C durante 15 minutos. Após arrefecimento durante 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, tendo o cuidado de colocar desde a incubação a respetiva tampa, procedeu-se à leitura das absorvências a 765 nm (47)(48)(49).

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (mg EAG) por g, dose, ou dose diária recomendada pelo fabricante (47)(48)(49).

DETERMINAÇÃO DOS FLAVONOIDES TOTAIS

A catequina foi o padrão utilizado na construção da curva de calibração para a determinação do teor em flavonoides totais. As soluções-padrão foram preparadas para ter concentrações finais, numa gama linear, entre 0 – 300 mg/L (48)(49)(50).

Para a realização do ensaio, colocaram-se em tubos de ensaio 1 mL de cada solução-padrão, extrato ou água desionizada (branco), 4 mL de água desionizada e 300 µL de nitrito de sódio (5%). Após 5 minutos, adicionaram-se 300 µL de AlCl₃ (10%) e aguardou-se 1 minuto. Adicionaram-se 2 mL de solução de hidróxido de sódio 1 mol/L e 2,4 mL de água desionizada. Agitou-se em *vortex*, e efetuaram-se as leituras das absorvências, em triplicado, a 510 nm, que corresponde ao máximo de absorção do complexo AlCl₃-flavonoide formado (48)(49)(50).

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de catequina (mg EC) por g, dose, ou dose diária recomendada pelo fabricante (48)(49)(50).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Poder redutor do ião férrico (método FRAP)

O método FRAP permite a avaliação do poder antioxidante por redução do ião férrico, segundo a metodologia previamente descrita por Benzie e Strain (1996) com ligeiras modificações. A redução de complexo Fe(III)/ ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] em Fe(II), a forma ferrosa, ocorre pela presença do composto antioxidante na solução (49).

Construiu-se uma curva de calibração com sulfato ferroso numa gama linear entre 0 e 500 μM a partir de uma solução-mãe de sulfato ferroso 1 mM. A determinação do poder redutor do ião férrico foi realizada adicionando-se 35 μL dos padrões, extratos ou branco (água desionizada) e 265 μL do reagente de FRAP (que contém TPTZ 10 mM, cloreto férrico 20 mM e tampão acetato 0,3 M com pH 3,6), em triplicado, numa microplaca. Esta foi incubada em estufa a 37 °C durante 30 minutos, tendo sido posteriormente realizada a leitura das absorvências a 595 nm (49).

Os resultados foram expressos em μmol de equivalentes de sulfato ferroso (μmol ESF) por g, dose, ou dose diária recomendada pelo fabricante (49).

Inibição do radical DPPH•

Este ensaio pretende analisar a capacidade de um determinado extrato ou dos seus constituintes sequestrarem radicais livres (23)(48)(51). A solução etanólica de DPPH• apresenta uma coloração azul-violeta intensa que vai mudando para amarelo quando o mesmo é inibido (23)(48)(49).

A solução etanólica de DPPH• 6×10^{-5} M foi preparada imediatamente antes do ensaio e devidamente envolvida em papel de alumínio, garantindo-se que todo o DPPH• ficou bem dissolvido. Após a preparação da solução, a sua absorvência foi medida a 525nm e ajustada a 0,650–0,660. As soluções-padrão de trolox para a reta de calibração foram preparadas em etanol absoluto, numa gama de linearidade entre 0 e 177,84 mg/L. O ensaio foi realizado em microplaca adicionando-se, em triplicado, 30 μL das soluções-padrão, das amostras ou branco (água desionizada) e 270 μL de solução de DPPH• (48)(49).

Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de trolox (mg ET) por g, dose, ou dose diária recomendada pelo fabricante (48)(49).

TRATAMENTO ESTATÍSTICO

A análise estatística foi realizada utilizando o IBM SPSS v. 20 (IBM Corp., Armonk 241 NY, USA). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ($n = 9$). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliar a normalidade dos dados. A ANOVA unidirecional foi utilizada para avaliar as diferenças significativas entre as amostras, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey HSD ou Dunnett (selecionado com base na igualdade das variâncias) para fazer comparações emparelhadas entre médias. O nível de significância para todos os testes de hipóteses (p) foi de 0,05. RESULTADOS

RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho estão apresentados nas tabelas seguintes, expressos de diferentes formas: Tabela 4 expressos em mg ou $\mu\text{mol/g}$; Tabela 5 expressos em mg ou $\mu\text{mol/unidade}$; e Tabela 6 expressos em mg ou $\mu\text{mol/DDR}$. Estas diferentes formas de apresentação dos resultados permite uma discussão mais detalhada dos valores obtidos nos diferentes parâmetros avaliados. Na secção Anexos apresenta-se ainda uma tabela (tabela 7) com os resultados expressos em mg ou $\mu\text{mol/L}$

Tabela 4: compostos bioativos e atividade antioxidante por mg ou $\mu\text{mol/g}$

Identificação das amostras	Fenólicos totais (mg EAG/g)	Flavonoides totais (mg EC/g)	FRAP ($\mu\text{mol ESF/g}$)	Inibição do DPPH* (mg ET/g)
1 Cavalinha	0,50 \pm 0,08 ⁱ	0,18 \pm 0,06 ^m	4,64 \pm 0,59 ^h	-
2 Garcinia	4,49 \pm 0,73 ^h	3,59 \pm 0,07 ^j	2220,33 \pm 211,14 ^b	183,98 \pm 3,27 ^c
3 Alcachofra 1	3,32 \pm 0,57 ^h	2,24 \pm 0,10 ^k	1836,97 \pm 228,83 ^c	161,71 \pm 7,21 ^d
4 Café verde 1	58,56 \pm 2,44 ^e	55,96 \pm 1,36 ^e	1085,66 \pm 31,59 ^g	74,74 \pm 4,45 ^g
5 Café verde 2	80,39 \pm 3,31 ^d	81,75 \pm 1,42 ^c	1447,64 \pm 70,23 ^e	95,83 \pm 5,80 ^f
6 Chá verde cap 1	97,01 \pm 7,14 ^c	21,78 \pm 0,43 ^g	1764,01 \pm 94,66 ^{cd}	213,06 \pm 4,08 ^b
7 Chá verde cap 2	418,41 \pm 18,34 ^a	95,23 \pm 4,55 ^a	6109,27 \pm 359,22 ^a	542,10 \pm 32,68 ^a
8 Ginseng e alecrim	88,83 \pm 4,57 ^{cd}	87,76 \pm 2,95 ^b	1408,03 \pm 116,10 ^{ef}	127,78 \pm 6,00 ^e
9 Gingko biloba 1	46,38 \pm 2,79 ^f	26,27 \pm 0,51 ^f	717,82 \pm 57,92 ^h	45,67 \pm 2,28 ^h
10 Ginseng	0,23 \pm 0,04 ⁱ	0,60 \pm 0,08 ^l	2,25 \pm 0,59 ^h	-
11 Gingko biloba 2	119,85 \pm 16,15 ^b	71,60 \pm 9,96 ^d	1531,09 \pm 232,49 ^{de}	130,13 \pm 15,51 ^e
12 Alcachofra 2	14,92 \pm 0,89 ^g	13,13 \pm 1,06 ⁱ	270,79 \pm 14,53 ⁱ	20,30 \pm 1,76 ⁱ
13 Chá cavalinha	24,62 \pm 3,23 ^g	15,31 \pm 1,58 ^{hi}	290,85 \pm 27,33 ⁱ	29,16 \pm 3,56 ^{hi}
13 B Chá cavalinha	5,08 \pm 1,15 ^h	2,48 \pm 0,35 ^k	73,22 \pm 5,08 ^j	8,09 \pm 0,95 ^j
14 Chá verde	60,93 \pm 6,69 ^e	17,41 \pm 1,11 ^h	1197,55 \pm 107,14 ^{fg}	128,92 \pm 9,54 ^e
14 B Chá verde	17,10 \pm 1,17 ^g	3,20 \pm 1,05 ^{jk}	344,02 \pm 24,82 ⁱ	34,97 \pm 2,77 ^{hi}

Letras diferentes em cada coluna representam diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$). EAG, equivalentes de ácido gálico; EC, equivalentes de catequina; ESF, equivalentes de sulfato ferroso; ET, equivalentes de trolox.

Tabela 5: compostos bioativos e atividade antioxidante por mg ou μmol /unidade

Identificação das amostras	Fenólicos totais (mg EAG/und)	Flavonoides totais (mg EC /und)	FRAP (μmol ESF/und)	Inibição do DPPH* (mg ET/und)
1 Cavalinha	0,28 \pm 0,05 ^j	0,10 \pm 0,03 ^j	2,59 \pm 0,33 ^j	-
2 Garcinia	1,93 \pm 0,32 ⁱ	1,54 \pm 0,03 ^h	954,57 \pm 90,77 ^d	79,10 \pm 1,41 ^c
3 Alcachofra 1	1,19 \pm 0,20 ⁱ	0,81 \pm 0,04 ⁱ	661,44 \pm 82,40 ^{ef}	58,23 \pm 2,59 ^d
4 Café verde 1	23,86 \pm 0,99 ^g	22,80 \pm 0,55 ^{ef}	442,28 \pm 12,87 ^g	30,45 \pm 1,81 ^f
5 Café verde 2	33,07 \pm 1,36 ^f	33,63 \pm 0,59 ^d	595,47 \pm 28,89 ^{ef}	39,42 \pm 2,39 ^e
6 Chá verde cap 1	40,08 \pm 2,95 ^e	9,00 \pm 0,18 ^g	728,71 \pm 39,10 ^e	88,01 \pm 1,69 ^c
7 Chá verde cap 2	195,21 \pm 8,55 ^a	44,43 \pm 2,12 ^c	2850,34 \pm 167,60 ^a	252,92 \pm 15,25 ^a
8 Ginseng e alecrim	34,73 \pm 1,79 ^f	34,31 \pm 1,15 ^d	550,43 \pm 45,39 ^{fg}	49,95 \pm 2,35 ^d
9 Gingko biloba 1	21,37 \pm 1,29 ^g	12,11 \pm 0,23 ^g	330,83 \pm 26,69 ^h	21,05 \pm 1,05 ^g
10 Ginseng	0,08 \pm 0,01 ^k	0,21 \pm 0,03 ^j	0,81 \pm 0,21 ^k	-
11 Gingko biloba 2	55,73 \pm 7,51 ^d	66,59 \pm 6,47 ^a	712,03 \pm 108,12 ^e	60,52 \pm 7,21 ^d
12 Alcachofra 2	7,80 \pm 0,47 ^h	13,73 \pm 1,11 ^g	141,61 \pm 7,60 ⁱ	10,62 \pm 0,92 ^h
13 Chá cavalinha	46,61 \pm 6,11 ^e	57,97 \pm 5,97 ^b	550,64 \pm 51,75 ^{fg}	55,21 \pm 6,75 ^d
13 B Chá cavalinha	19,24 \pm 4,35 ^g	18,81 \pm 2,90 ^f	277,25 \pm 19,23 ^h	30,65 \pm 3,59 ^f
14 Chá verde	119,95 \pm 13,18 ^b	68,55 \pm 4,36 ^a	2357,62 \pm 210,93 ^b	253,81 \pm 18,79 ^a
14 B Chá verde	67,95 \pm 4,65 ^c	25,45 \pm 8,32 ^e	1367,13 \pm 98,64 ^c	138,96 \pm 11,02 ^b

Letras diferentes em cada coluna representam diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$). EAG, equivalentes de ácido gálico; EC, equivalentes de catequina; ESF, equivalentes de sulfato ferroso; ET, equivalentes de trolox.

Tabela 6: compostos bioativos e atividade antioxidante por mg ou μmol /DDR

Identificação das amostras	Fenólicos totais (mg EAG /DDR)	Flavonoides totais (mg EC/DDR)	FRAP (μmol ESF /DDR)	Inibição do DPPH• (mg ETDDR)
1 Cavalinha	0,56 \pm 0,09 ⁱ	0,21 \pm 0,07 ^j	5,18 \pm 0,66 ⁱ	-
2 Garcinia	3,86 \pm 0,63 ^h	3,09 \pm 0,06 ⁱ	1909,13 \pm 181,54 ^d	158,20 \pm 2,81 ^d
3 Alcachofra 1	3,58 \pm 0,61 ^h	2,42 \pm 0,11 ⁱ	1984,32 \pm 247,19 ^d	174,68 \pm 7,78 ^d
4 Café verde 1	47,71 \pm 1,99 ^e	45,59 \pm 1,11 ^e	884,55 \pm 25,74 ^f	60,90 \pm 3,63 ^f
5 Café verde 2	33,07 \pm 1,36 ^f	33,63 \pm 0,59 ^f	595,47 \pm 28,89 ^g	39,42 \pm 2,39 ^g
6 Chá verde cap 1	80,15 \pm 5,90 ^d	17,99 \pm 0,36 ^g	1457,43 \pm 78,20 ^e	176,03 \pm 3,37 ^d
7 Chá verde cap 2	195,21 \pm 8,55 ^b	44,43 \pm 2,12 ^e	2850,34 \pm 167,60 ^c	252,92 \pm 15,25 ^c
8 Ginseng e alecrim	34,73 \pm 1,79 ^f	34,31 \pm 1,15 ^f	550,43 \pm 45,39 ^g	49,95 \pm 2,35 ^g
9 Gingko biloba 1	21,37 \pm 1,29 ^g	12,11 \pm 0,23 ^h	330,83 \pm 26,69 ^h	21,05 \pm 1,05 ^h
10 Ginseng	0,08 \pm 0,01 ^j	0,21 \pm 0,03 ^j	0,81 \pm 0,21 ^j	-
11 Gingko biloba 2	111,47 \pm 15,02 ^c	133,19 \pm 12,95 ^c	1424,06 \pm 216,24 ^e	121,04 \pm 14,42 ^e
12 Alcachofra 2	15,60 \pm 0,93 ^g	27,47 \pm 2,22 ^f	283,22 \pm 15,20 ^h	21,24 \pm 1,84 ^h
13 Chá cavalinha	186,42 \pm 24,44 ^b	231,88 \pm 23,88 ^a	2202,57 \pm 206,99 ^d	220,82 \pm 26,99 ^c
13 B Chá cavalinha	76,96 \pm 17,38 ^d	75,22 \pm 11,60 ^d	1109,00 \pm 76,91 ^{ef}	122,58 \pm 14,35 ^e
14 Chá verde	359,85 \pm 39,54 ^a	205,64 \pm 13,07 ^b	7072,85 \pm 632,79 ^a	761,43 \pm 56,37 ^a
14 B Chá verde	203,84 \pm 13,96 ^b	76,34 \pm 24,96 ^d	4101,38 \pm 295,92 ^b	461,89 \pm 33,07 ^b

Letras diferentes em cada coluna representam diferenças significativas entre amostras ($p < 0,05$). EAG, equivalentes de ácido gálico; EC, equivalentes de catequina; ESF, equivalentes de sulfato ferroso; ET, equivalentes de trolox.

DISCUSSÃO

Atualmente, vários suplementos alimentares à base de plantas estão disponíveis no mercado. Para este estudo foram selecionados 14 exemplos destes suplementos, tendo em conta que na sua composição (como será de seguida referido) se encontravam extratos de plantas com potencial atividade antioxidante. Estas amostras foram analisadas quanto aos teores em compostos fenólicos e flavonoides e quanto à atividade antioxidante (FRAP e DPPH). As amostras analisadas podem ser comparadas e agrupadas tendo em conta os valores obtidos nestes parâmetros e fatores como a marca do produto, o preço, a forma farmacêutica em que são comercializados (comprimidos, cápsulas ou infusões), a composição das amostras (se resultam, por exemplo, de uma mistura de extratos) e a dose diária recomendada, sendo estes dois últimos os fatores mais relevantes.

Antes de iniciar a discussão dos resultados propriamente dita, deve ser referido que o método utilizado na determinação dos compostos fenólicos inclui todos os fenóis, taninos e flavonoides das amostras em estudo. O método mais utilizado para determinação dos compostos fenólicos totais é o método Folin-Denis, modificado por Folin-Ciocalteu. Este ensaio baseia-se em reações de oxidação-redução, em que os íões de fenolato são oxidados e o fosfotúngsticofosfomolibdico são reduzidos, formando produtos corados. No entanto, esta técnica apenas permite obter uma estimativa da concentração em compostos fenólicos totais, não sendo possível caracterizar individualmente estes compostos. Além disso, o reagente de Folin-Ciocalteu reage também com outros compostos redutores que possam estar presentes na amostra (por exemplo, ácido ascórbico, açúcares e aminoácidos redutores). Assim, os dados obtidos poderão ser alvo de interferências. O mais correto será utilizá-lo quando os principais antioxidantes da amostra são compostos fenólicos. Este método dá-nos, desta forma, apenas uma estimativa geral do poder redutor da amostra (47).

Quanto às amostras analisadas, é de salientar que foram analisadas 2 amostras de cavalinha (*Equisetum arvensis*), uma na forma de comprimidos (300mg de extrato) e outra como infusão constituída apenas pelo extrato da planta. A escolha desta planta deve-se ao facto de ser rica em alcaloides, flavonoides, vitamina C e esteróis. O seu consumo está

associado às suas propriedades diuréticas, anti-inflamatórias, antioxidantes, antidiabéticas, vaso-relaxante e hemostática (52)(53).

Foram também analisadas duas amostras de alcachofra (*Cynara scolymus*), ambas na forma de cápsulas. A informação na rotulagem das amostras é muito diferente, sendo uma delas muito mais completa, referindo inclusivamente que apenas 59,52% da composição é alcachofra; refere ainda como dose diária recomendada 600mg, pela toma de 3 cápsulas por dia. A amostra com mais informação tem mais cápsulas e um custo que corresponde a metade do valor da outra amostra. A alcachofra foi escolhida porque está associada aos benefícios que os seus constituintes ativos (ésteres do ácido cafeico, lactonas sesquiterpénicas e flavonoides) exercem no tratamento sintomático de problemas digestivos (23). A alcachofra também aparece em suplementos que resultam de associações de vários extratos de plantas para a perda e controlo do peso (ver exemplo na tabela 2).

Foi analisada igualmente uma associação de *Garcinia cambogia* (extrato seco concentrado 4:1, teor mínimo de 60% de ácido hidroxícítrico), *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada, extrato seco concentrado 13:1) e *Cynara scolymus* (Alcachofra). A *Garcinia* tem sido promovida como ajudante na perda de peso e como potencial agente para controlo do colesterol. Os seus efeitos benéficos têm sido atribuídos ao ácido hidroxícítrico (por mecanismos que poderão incluir a inibição do metabolismo e a supressão do apetite). Outros componentes bioativos incluem benzofenonas, potencialmente responsáveis pela redução dos níveis de *stress* oxidativo. No entanto, as evidências de atividade antioxidante em humanos é ainda escassa (54). Em relação à cáscara sagrada (normalmente extrato seco da casca inteira ou fragmentada do caule e ramos) esta possui principalmente derivados antraquinónicos (designados cascarósidos), aloínas, antraquinonas livres e taninos. Os constituintes antraquinónicos têm ação colagoga e laxante em doses baixas (23).

Foram analisadas três amostras de chá verde (*Camellia sinensis* ou *Thea sinensis*), duas na forma de cápsulas e uma na forma de infusão. A composição das amostras na forma de cápsulas difere muito entre si, referindo a amostra 6 que a toma de 2 cápsulas fornece 600 mg/dd de *Camellia sinensis* e a amostra 7 que a toma de apenas 1 cápsula fornece 3750 mg/dd. O rótulo da amostra 6 indica apenas que a sua composição resulta de 84,27% de folhas de chá verde. Já a rotulagem da amostra 7 indica que esta resulta da adição de extratos secos de chá verde padronizados para polifenóis, epigalhocatequinas e epicatequinas, juntamente com 3mg de *Piper nigrum* (extrato padronizado a 95% de piperina). A adição de *Piper nigrum* (piperina) é comum a outras amostras analisadas da mesma marca (amostras 5 e 8), sendo

esta justificada no rótulo (como a adição de fibras de cereais ou aveia na amostra 5) por permitir uma “assimilação e biodisponibilidade próximas dos 100%, e liberação prolongada para efeito fisiológico ao longo do dia”. De referir que a pimenta é proveniente dos frutos (drupas) da pimenteira, tendo ação estimulante sobre o sistema digestivo. Entre os seus constituintes principais estão o β -pineno, o limoneno e o β -cariofileno (23). Voltando ao chá verde, este corresponde às folhas que sofrem uma secagem rápida, de forma a manterem uma cor verde amarelada. A presença de flavonoides e outros compostos fenólicos tem incentivado o uso de chá para que o organismo possa beneficiar de ação antimutagénica e da inibição que estes compostos exercem sobre os radicais livres. Os compostos fenólicos podem apresentar-se em quantidades variáveis, dependendo da época do ano em que é feita a colheita, idade das folhas e da variedade em questão, representando cerca de 30% do peso seco, dos quais a maioria são flavanóis. O chá verde é igualmente rico em vitamina C. Ao ingerir uma chávena de chá verde um indivíduo consome 300 a 400 mg de polifenóis. A oxidação dos polifenóis no processo fermentativo permite explicar a maior atividade antibacteriana e antioxidante do chá verde relativamente ao chá preto. As epicatequinas e a cafeína são os compostos com maior relevância para os efeitos benéficos atribuídos a esta infusão. Entre eles estão: redução do colesterol LDL e prevenção da aterosclorose; prevenção de vários tipos de cancro; diminuição do nível de açúcar no sangue; controlo da hipertensão arterial; retardamento do envelhecimento; como antisséptico. O chá verde é tradicionalmente usado no tratamento de diarreias ligeiras devido à presença de taninos e para facilitar a eliminação renal da água (23)(53). A amostra de infusão de chá verde analisada refere apenas que a sua composição resulta de 100% de folhas de *Thea sinensis*.

Foram analisadas ainda duas amostras de café verde, ambas reivindicando uma composição capaz de fornecer 1000 mg/dd. A primeira (amostra 4) mais barata e com maior número de cápsulas, é constituída por 12,5% do fruto do café verde, sendo necessário a toma de duas cápsulas para alcançar a dose equivalente pretendida. Por sua vez, a amostra 5 necessita de apenas uma cápsula para atingir a dose equivalente a 1000 mg/dd, sendo a sua composição resultado de 200 mg de extrato seco de café verde (com 45% de ácido clorogénico), aveia (40% ácido ferúlico) e *Piper nigrum* (95% piperina), estes dois últimos componentes presentes devido aos objetivos já anteriormente referidos. O café verde resulta da eliminação do pericarpo do fruto do cafezeiro, quer por fermentação e lavagem, quer por secagem e separação mecânica da casca. Na composição do café verde predominam polissacáridos, lípidos e ácidos fenólicos (cafeoilquínicos e clorogénicos) (23).

Foram igualmente comparadas as amostras 8 e 10, ambas contendo Ginseng como componente principal, sendo que a amostra 8 resulta da combinação de 150 mg do extrato seco de Ginseng com 100mg de alecrim e 3 mg de *Piper nigrum*, e a amostra 10 é constituída apenas por 15 mg de extrato seco da raiz de ginseng. Nas raízes de *Panax ginseng* predominam os ginsenósidos, saponósidos triterpénicos tetracíclicos poli-hidroxilados. Além destes compostos estão descritos glúcidos, fitosteróis, vitaminas do grupo B, peptídeos, hidrocarbonetos e álcoois sesquiterpénicos. Ensaio farmacológico têm demonstrado que o extrato de ginseng padronizado aumenta a capacidade de resistência às doenças, à fadiga e ao stress. Têm ação antiviral e antiagregante, inibem a peroxidação lipídica devido à ação anti-radicalar e atuam como tónico cardíaco (23). O interesse da combinação do ginseng com o alecrim resultará do facto de este ter como constituintes ativos óleos essenciais, ácidos fenólicos, ésteres heterosídicos fenilpropanoicos, ésteres de ácido cafeico (ácido rosmarínico), diterpenos tricíclicos e diversos flavanoides de geninas metiladas. As folhas de alecrim são usadas na normalização de perturbações digestivas ligeiras, devido à presença de flavonoides e derivados hidroxicinâmicos, tendo a sua atividade antioxidante despertado o interesse da indústria alimentar (23).

Por fim, foram analisadas duas amostras de *Ginkgo biloba*, uma (amostra 9) resultando de uma combinação com castanheiro-da-índia e reivindicando 24% de flavonoides glicosilados na sua composição, e a outra resultando apenas do extrato seco de folhas de *Ginkgo biloba* e reivindicando 24% de flavonoides totais na sua composição. Enquanto que a dose diária da amostra 9 é de apenas 1 cápsula, a amostra 11 recomenda a toma de 2 cápsulas. O Ginkgo contém nas suas folhas ginkgólidos (compostos diterpénicos com três ciclos lactónicos e um núcleo tetrafurânico com um radical butílico), flavonoides e biflavonoides, protoantocianidinas, catequinas, glúcidos e lípidos diversos. Na terapêutica são principalmente usados em sintomas ligados à insuficiência cerebral ou periférica. No total já foram identificadas cerca de 40 estruturas diferentes de flavonoides nesta planta, sendo estas substâncias possivelmente responsáveis pela atividade anti-radicalar. Tendo em conta a sua utilização na insuficiência cerebral ou periférica, justifica-se assim a sua associação com o castanheiro-da-índia, utilizado no tratamento das perturbações da circulação venosa, devido às suas propriedades vasoconstritoras. As cascas e folhas contêm sobretudo heterósidos de núcleo cumarina, tendo sido identificados ainda a fraxina, o escopoletósido, uma mistura de saponósidos do núcleo esteroide, flavonoides, uma leucoantocianina e a procianidina e taninos diversos (23).

De um modo geral, os resultados revelam a presença de compostos fenólicos e flavonoides em todas as amostras. Convém referir que a atividade antioxidante observada resultará da presença destes compostos nos extratos das plantas utilizadas na sua composição, já que durante a seleção das amostras se decidiu excluir todas aquelas em que ocorreram adição de antioxidantes como, por exemplo, ácido ascórbico. No entanto, outros compostos poderão estar envolvidos nos resultados dos ensaios FRAP e DPPH, o que explicará as diferenças observadas em algumas amostras. Mesmo assim, no caso das amostras 1 e 10, as quantidades mínimas de compostos fenólicos e flavonoides totais resultou numa atividade antioxidantes muito baixa (FRAP) ou, no caso do DPPH, na ausência mesmo de reação.

Tendo em conta as doses diárias recomendadas, foram registadas diferenças significativas entre as amostras com o mesmo componente principal, variando a marca ou a sua forma farmacêutica. São exemplo disso as amostras 1 e 13 (comprimidos e infusão de cavalinhas), 3 e 12 (cápsulas de alcachofra), 6, 7 (cápsulas de chá verde) e 14 (infusão de chá verde), 8 e 10 (cápsulas de Ginseng), e 9 e 11 (cápsulas de Gingko biloba). Mesmo as amostras 4 e 5 (cápsulas de café verde) apresentam diferenças entre si para os parâmetros analisados, embora não tão disparees como as referidas anteriormente. Neste capítulo, as diferenças mais significativas são as verificadas entre as amostras de cavalinha e ginseng, tendo em conta os valores quase residuais das amostras 1 e 10.

Por fim, de referir que os valores obtidos para os flavonoides totais na amostra 6 (cápsulas de chá verde) terão resultado de um erro do operador, já que os valores deste parâmetro não se encontram em linha como os das restantes determinações. Este erro experimental reforça a importância de realizar vários duplicados das amostras para serem usados em cada ensaio (evitando assim colocar em causa todos os resultados realizados para os diferentes parâmetros), realizar múltiplas determinações para os mesmos parâmetros analisados (no caso desta tese, podemos relacionar os teores observados de compostos fenólicos totais com os teores de flavonoides totais e os ensaios de FRAP e DPPH) e a comparação dos valores obtidos entre diferentes amostras (por exemplo, para valores semelhantes de compostos fenólicos entre amostras diferentes será espectável valores semelhantes no ensaio DPPH, como acontece com as amostras 2 e 3).

De forma a evitar erros relacionados com a execução dos ensaios ou de saturação das soluções, as amostras correspondentes às infusões de cavalinha e chá verde foram realizadas

em duplicado, correspondendo as amostras 13B e 14B a uma diluição de metade da massa das amostras 13 e 14, respetivamente.

A amostra 14, tendo em conta a dose diária recomendada, apresenta os valores mais elevados de compostos fenólicos totais fornecidos e também a maior atividade antioxidante (FRAP e DPPH) registada. Já no que diz respeito aos flavonoides totais, é a amostra 13 (chá de cavalinha) que apresenta os valores mais elevados. Estes valores para a amostra 13 (juntamente como registados nos restantes parâmetros) representam um contraste muito significativo em relação aos valores observados na amostra 1 (comprimidos de cavalinha), os mais baixos dos resultados obtidos, juntamente com a amostra 10 (cápsulas de ginseng).

No entanto, se forem analisados os resultados obtidos por unidade de produto (tabela 5) e não por DDR, a amostra 7 é aquela que fornece valores mais elevados de compostos fenólicos totais e no ensaio de FRAP, sendo a amostra 14 superior para os flavonoides totais e o ensaio DPPH. De um lado temos assim 10 saquetas de infusão de chá verde com um custo de 2,5 € contra 30 cápsulas de chá verde com um custo de 6,90 €, fornecendo ambas (por unidade) valores idênticos de compostos fenólicos, flavonoides e de atividade antioxidante, apesar da DDR da amostra 14 ser de 3 chávenas por dia e da amostra 7 ser apenas 1 cápsula por dia. Na perspetiva do consumidor, há assim várias opções tendo em conta a relação número de unidades/preço de custo se o objetivo final for a melhor relação entre preço e poder antioxidante. Assim, a infusão de chá verde poderá ser uma alternativa interessante para os consumidores que não apreciam suplementos alimentares em forma de cápsulas e vice-versa.

Por fim, tendo em conta apenas os valores por unidade, as amostras 1 e 10 apresentam novamente os valores mais baixos dos parâmetros analisados.

Os valores mais elevados dos parâmetros analisados (por unidade) obtidos para as amostras de chá verde (14 e 7) estão em linha com o que era esperado pela utilização de extratos desta planta. O chá verde é descrito (48) como rico em compostos polifenólicos, tais como flavonoides (nomeadamente catequinas) e ácidos fenólicos, entre outros. De salientar que as diferenças entre as amostras 7 e 6 (ambas na forma de cápsulas) se deverá ao facto da amostra 7 resultar da adição de extratos secos padronizados para polifenóis, epigalhocatequinas e epicatequinas, juntamente com 3mg de *Piper nigrum* (extrato padronizado a 95% de piperina), tal como é descrito no rótulo. A piperina (55), o β -cariofileno

(56), o β -pineno (57) e o limoneno (58) presentes na *Piper nigrum* têm atividade antioxidante, embora a sua influência final para os parâmetros analisados possivelmente seja marginal. Apresenta assim, por unidade, valores idênticos aos obtidos para a infusão de chá verde e superiores aos da amostra 6, que resulta apenas da utilização de 84,27% de folhas de chá verde na sua composição. Os valores de fornecidos de 600 mg/dd de *Camellia sinensis* para a amostra 6 e de 3750 mg/dd para a amostra 7 apontavam já para uma diferença significativa para os parâmetros analisados. Por fim, se o “poder antioxidante” fornecido for o objetivo final destes suplementos, as DDR tal como estão descritas no rótulo não são coerentes.

A comparação dos valores obtidos para a cavalinha em forma de comprimidos (amostra 1) e na forma de infusão (amostra 13) mostra-se a mais problemática deste estudo. Enquanto a amostra 1 apresenta os valores mais baixos dos parâmetros analisados, a amostra 13 (por DDR) está entre os valores de compostos fenólicos e flavonoides fornecidos mais elevados (semelhantes aos da amostra 7, e apenas inferiores aos da amostra 14), bem como os valores registados para os ensaios de FRAP e DPPH. Esta diferença pode ser explicada por vários fatores: desde logo, a amostra 1 é constituída por comprimidos com apenas 300mg de extrato, enquanto que a infusão é descrita no rótulo como contendo 100% de *Equisetum arvense L*, sendo que a massa média de cada saqueta é de 1,5 gramas. Podemos igualmente especular que o extrato utilizado na amostra 1 não é tão rico nos compostos responsáveis pela atividade antioxidante, que estes não foram preservados durante o seu processo de produção, que a forma como são comercializados (comprimidos e saquetas) poderá ter influência ou que, simplesmente, o objetivo do suplemento 1 não é a atividade antioxidante mas a atividade diurética, tal como é descrito em (52)(53). Outra diferença a ter em conta, a extração da amostra 1 foi realizada utilizando um solvente hidroetanólico (1:1) e a preparação da infusão foi realizada colocando apenas uma saqueta em água destilada ultrapura. No artigo (59) os valores registados para o ensaio de DPPH são muito superiores quando utilizada uma solução aquosa na extração (em comparação com as extrações realizadas com acetato de etilo e butanol). A diferença entre as amostras é também significativa quanto ao seu preço de custo, sendo o da amostra 13 menor (2,5 € para 3,75) e tendo um poder antioxidante é consideravelmente mais elevado.

A amostra 2, apesar de identificada como “cápsulas de Garcinia”, resulta de uma mistura de *Garcinia cambogia*, cascara sagrada (*Rhamnus purshiana*) e alcachofra (*Cynara scolymus*). Os valores registados para os parâmetros analisados são semelhantes aos registados na amostra 3 (cápsulas de alcachofra), sendo a sua composição muito diferente: enquanto a amostra 2 é constituída por 200 mg extrato seco de *Garcinia cambogia*, 100mg de *Rhamnus purshiana* (Cáscara sagrada) e apenas 7,68 mg de *Cynara scolymus* (Alcachofra), a amostra 3 é constituída por 600 mg de *Cynara scolymus* (sendo apenas 59,52% alcachofra). Apesar da diferença na sua composição, os valores de compostos fenólicos totais e flavonoides são semelhantes. Curiosamente, os valores dos ensaios de FRAP e DPPH são elevados, tal como se pode observar pela comparação das amostras 2, 3 e 4 (onde os teores em compostos fenólicos e flavonoides são mais elevados, mas os valores dos ensaios FRAP e DPPH são menores).

Os valores de compostos fenólicos totais e de flavonoides totais estão em linha com os descritos (60) para os extratos obtidos do fruto de Garcinia, embora os valores de DPPH e FRAP sejam significativamente menores. Assim, no caso da amostra 2 poderão estar envolvidos na atividade antioxidante registada o ácido hidroxicítrico (61), as benzofenonas (62) cascarósidos (63) tal como é descrito na literatura para outros extratos. Apesar dos valores registados para a atividade antioxidante, a Garcinia tem sido utilizada sobretudo na perda de peso e no controlo do colesterol (23).

Tal como referido, os teores baixos em compostos fenólicos e flavonoides e relativamente altos de atividade antioxidante são também comuns à amostra 3. Por sua vez, a amostra 12, também constituída por cápsulas de alcachofra, apresenta teores mais elevados de compostos fenólicos e de flavonoides, mas valores menores para os ensaios de DPPH e FRAP. Como explicação para estes resultados poderá estar uma composição diferente das amostras, tendo em conta os constituintes ativos presentes na *Cynara scolymus* (ésteres do ácido cafeico, lactonas sesquiterpénicas e flavonoides) e o seu papel nos parâmetros analisados (23). Em geral, tendo em consideração os valores baixos para os parâmetros analisados, justifica-se que a utilização dos extratos desta planta esteja normalmente associada a perda e controlo do peso (como exemplificado na tabela 2).

Como já referido, as amostras 4 e 5 (cápsulas de café verde) apresentam as diferenças menores entre si para os parâmetros analisados, embora os valores registados para a amostra

5 sejam mais elevados por unidade. O mesmo não se verifica quando é tido em conta as DDR: nesse caso é a amostra 4 que fornece teores mais elevados de compostos fenólicos e flavonoides, bem como uma maior atividade antioxidante. Tendo em conta que o pretendido seria que (ajustadas as DDR) os dois suplementos fornecessem os mesmos valores, as indicações dos fornecedores mostram-se novamente incoerentes. De salientar que ambos os suplementos reivindicam 1000 mg/dd do extrato do fruto seco de café. Assim, para as diferenças observadas deverá contribuir o facto de a amostra 4 ser constituída pelo extrato seco concentrado de café verde (sendo este 12,5% do fruto) e a amostra 5 ser constituída por 200mg de extrato de café (com 45% de ácido clorogénico), 50 mg de aveia (contendo 45% de ácido ferúlico que, como descrito em (64) poderá contribuir para a atividade antioxidante) e 2mg *Piper nigrum* (95% piperina, que terá uma influência marginal). A composição do café verde (por exemplo, em ácidos fenólicos) é também variável caso o processo de obtenção seja por fermentação e lavagem ou por secagem e separação mecânica da casca (23).

As amostras 8 e 10 (cápsulas de Ginseng) apresentam as diferenças mais significativas dos parâmetros analisados, depois das observadas para as amostras 1 e 13 (comprimidos e cápsulas de cavalinha). Em causa poderá estar o facto de a amostra 8 resultar de uma associação de Ginseng com alecrim ou o papel que a quantidade e a origem dos extratos utilizados de ginseng desempenham nos resultados finais obtidos. Começando pela composição, a amostra 10 é constituída apenas pelo extrato seco da raiz de ginseng, com 30% ginsenosídeos. Por sua vez, a amostra 8 é constituída por 150 mg do extrato seco de Ginseng (vegetal dessecado), 100 mg do extrato seco de Alecrim e 3 mg de *Piper Nigrum*. Embora esta última, novamente, tenha uma influência marginal nos valores observados, o mesmo não se pode dizer do extrato de alecrim: entre os seus constituintes ativos encontram-se flavonoides e derivados hidroxicinâmicos, que contribuem para uma atividade antioxidante reconhecida já pela própria indústria alimentar. O objetivo desta combinação será maximizar os efeitos associados ao ginseng de resistência às doenças, à fadiga e ao *stress* (23).

Para esta diferença contribuirá ainda o facto de os resultados obtidos em (65) serem significativamente maiores para os teores de compostos fenólicos, de compostos flavonoides e para o ensaio de DPPH quando é utilizado o extrato do fruto do ginseng e não o da raiz.

Por fim, resta comparar as amostras 9 e 11, correspondentes ao *Gingko biloba* na forma de cápsulas. Para todos os parâmetros analisados, a amostra 11 apresenta valores mais elevados.

Tendo em conta que ambas as amostras reivindicam fornecer 24% de flavonoides glicosilados (amostra 8) e 24% de flavonoides totais (amostra 11), a diferença dependerá do conteúdo e composição das folhas em ginkgólidos, flavonoides, bioflavonoides, protoantocianidinas e catequinas. Tendo em conta que já foram identificadas cerca de 40 estruturas diferentes de flavonoides nesta planta, a composição dos extratos utilizados pelas amostras pode variar bastante. De referir que apenas o rótulo da amostra 11 indica que o extrato utilizado é de folhas de *Ginkgo biloba*: como referido em (66), a composição em compostos fenólicos, flavonoides e proantocianidinas varia bastante quando são utilizadas outras partes da planta. Mais uma vez, as indicações de DDR são incoerentes, já que o rótulo da amostra 9 recomenda a toma de apenas 1 cápsula, enquanto o da amostra 11 recomenda a toma de 2, duplicando assim a diferença já significativa entre ambas, apesar de partirem de uma percentagem de flavonoides idêntica. De referir que a utilização principal do *Ginkgo biloba* (em especial associada ao castanheiro-da-índia) são as perturbações da circulação venosa.

CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

De um modo geral, os resultados revelam a presença de compostos fenólicos e flavonoides em todas as amostras. Convém referir que a atividade antioxidante observada resultará sobretudo da presença destes compostos nos extratos das plantas utilizadas na sua composição. Por exemplo no caso das amostras 1 e 10, as quantidades mínimas de compostos fenólicos e flavonoides totais resultou numa atividade antioxidantes muito baixa (FRAP) e mesmo ausência de reação (DPPH).

Tendo em conta as DDR, foram observadas diferenças significativas entre as amostras 1 e 13 (comprimidos e infusão de cavalinhas), 3 e 12 (cápsulas de alcachofra), 6, 7 (cápsulas de chá verde) e 14 (infusão de chá verde), 8 e 10 (cápsulas de *Ginseng*), e 9 e 11 (cápsulas de *Gingko biloba*), sendo as mais significativas as verificadas entre as amostras de cavalinha e ginseng.

A amostra 14, tendo em conta a DDR, apresenta os valores mais elevados de compostos fenólicos totais fornecidos e a maior atividade antioxidante. Quanto aos flavonoides totais, é a amostra 13 que apresenta os valores mais elevados. As infusões analisadas parecem assim ganhar vantagem sobre as restantes amostras (cápsulas).

No entanto, analisados os resultados por unidade de produto, a amostra 7 é aquela que fornece valores mais elevados de compostos fenólicos totais e no ensaio de FRAP, sendo a amostra 14 superior para os flavonoides totais e o ensaio DPPH. A infusão de chá verde poderá ser assim uma alternativa para quem não aprecia suplementos alimentares em forma de cápsulas e vice-versa. Os valores mais elevados (por unidade) obtidos para as amostras de chá verde (14 e 7) estão em linha com o que é descrito (48) sobre os extratos desta planta, nomeadamente serem rico em compostos polifenólicos. Igualmente por unidade de produto, as amostras 1 e 10 apresentam os valores mais baixos dos parâmetros analisados.

Ao longo da análise dos resultados, as informações presentes nos rótulos (principalmente dos suplementos que resultam de vários extratos) revela-se fundamental para comparar e compreender as diferenças dentro de cada grupo. Em suma, este trabalho reforça a importância da utilização destes parâmetros como forma de discriminar diferentes amostras no que diz respeito à sua atividade antioxidante.

O reconhecimento da relação entre nutrição e saúde, aliada a uma atitude preventiva, levou ao aumento crescente do consumo de suplementos alimentares na última década. Outra razão para este aumento deve-se ao facto de os medicamentos serem encarados como demasiado caros, com efeitos duvidosos ou desnecessários (4). Entre os diferentes produtos disponíveis, os suplementos com propriedades antioxidantes gozam de uma popularidade considerável, existindo vários estudos científicos que suportam os seus potenciais efeitos benéficos. Na seleção das amostras para este estudo foram excluídos todos os produtos cuja composição, sendo à base de plantas com potencial atividade antioxidante, resulta da adição “artificial” de antioxidantes (como por exemplo, o ácido ascórbico). Esta seleção tentou assim estar mais próxima da ideia de suplemento alimentar natural, isto é, um suplemento cujas propriedades (neste caso, atividade antioxidante) depende apenas das plantas presentes na sua composição. Convém sempre salientar que suplementação deve estar associada à mudança do estilo de vida, devendo ser individualizada após avaliação do estado de saúde e todas as reações adversas devem ser comunicadas.

De um modo geral, os suplementos alimentares necessitam de uma melhor regulamentação: partindo de preparações à base de plantas, os suplementos alimentares podem estar sujeitos à contaminação por metais pesados, pesticidas e micotoxinas, além de adulterações nas concentrações dos seus compostos ativos ou à presença não autorizada de outros (2). A adequação do quadro regulamentar dos suplementos alimentares deve passar igualmente por incentivos aos fabricantes na pesquisa clínica, pela obrigatoriedade dos fabricantes em fornecerem uma ficha pormenorizada das suas características, a criação de uma base de dados padronizada com a descrição de cada componente, o valor nutricional, quantidade de micronutrientes, garantindo assim a competitividade do mercado, a segurança do consumidor e padrões de qualidade (4). Só uma análise como a realizada neste estudo permitirá ao consumidor saber que a infusão de chá verde tem um potencial antioxidante idêntico ao das cápsulas da amostra 7, facilitando assim a sua escolha quanto ao efeito pretendido, preço e duração da toma. Convém salientar igualmente que na UE os suplementos alimentares não estão sujeitos a qualquer requisito de pré-aprovação. Além disso, os consumidores não estão informados das possíveis interações medicamentosas (2)(3). Os consumidores devem ser aconselhados adequadamente quanto aos possíveis efeitos adversos. Os problemas relacionados com a concentração, composição, contaminantes e interações com medicamentos representam um risco de saúde pública. Convém igualmente

salientar que a aquisição de muitos suplementos alimentares está disponível através da Internet ou locais de venda não controlados pelas autoridades oficiais (4).

Deste modo, o desenvolvimento de métodos analíticos para a deteção de adulterações é essencial de forma a tornar as análises mais rotineiras e garantir um maior controlo destes produtos (3). A realização de ensaios clínicos semelhantes aos desenvolvidos pela indústria farmacêutica será a forma de determinar a dose ideal de antioxidantes presentes nos suplementos alimentares. No entanto, a análise dos efeitos dos antioxidantes nas doenças crónicas implica ensaios clínicos longos e dispendiosos. Não existindo patentes sobre os compostos antioxidantes, não há interesse económico na realização destes estudos.

No caso das amostras 4 e 5, por exemplo, tendo em conta os parâmetros analisados e a DDR indicada pelos fabricantes, esta não se mostrou coerente com os resultados obtidos, havendo disparidades ainda mais significativas para outras amostras com o mesmo componente principal e considerando que o objetivo principal é o “poder antioxidante” do suplemento. Tendo em conta os resultados obtidos, o consumidor que procura suplementos alimentares à base de plantas com atividade antioxidante podem facilmente ser induzidos em erro: embora não estejam presentes nos rótulos alegações de “poder antioxidante”, uma pesquisa de plantas com potencial poder antioxidante associa as plantas objeto de estudo desta tese a esse efeito. Será assim recomendada a descrição mais específica da sua composição. De referir, igualmente, que se registaram diferenças significativas na determinação da massa de algumas amostras, colocando assim em causa a qualidade final destes produtos. Tendo em conta que são recomendadas doses diárias, deveria haver rigor nas concentrações dos componentes efetivamente disponíveis.

Embora cumpram os requisitos para a colocação no mercado, há pouca ou nenhuma informação sobre a percentagem dos seus constituintes, nomeadamente compostos fenólicos. Por exemplo, seria útil saber qual o valor de compostos fenólicos que estes suplementos alimentares fornecem, tendo em conta o valor de 1g/dia recomendado. A informação presente nos rótulos revela-se igualmente limitada, considerando a facilidade de acesso a estes produtos e o facto de as mais diversas alegações (desde controlo do peso até ação anti-inflamatória) surgirem associadas ao efeito antioxidante (ver tabela 2).

BIBLIOGRAFIA

- (1) CARABAJAL, M. P. A. [et.al.] (2016) – **Evaluation of antioxidant and antimutagenic activity of herbal teas from native plants used in traditional medicine in Argentina.** “South African Journal of Botany” 110 (2017) 258–265.
- (2) PETROCZI, A. [et.al.] (2010) – **Mission impossible? Regulatory and enforcement issues to ensure safety of dietary supplements.** “Food and Chemical Toxicology” 49 (2011) 393–402.
- (3) BUREAU EUROPÉEN DES UNIONS DE CONSOMMATEURS, (2016) – **Food Supplements: challenges & risks for consumers.**
- (4) SILVA, C. F. C. (2017) – **Padrões de consumo (2010-2016) de suplementos alimentares de venda em farmácia.** Dissertação de Mestrado em Controlo de Qualidade, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Porto, junho 2017.
- (5) PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, (2006) – **Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos.** “Jornal Oficial da União Europeia” L 404 de 30 de dezembro de 2006.
- (6) PARLAMENTO EUROPEU E CONSELHO DA UNIÃO EUROPEIA, (2002) – **Diretiva 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 10 de Junho de 2002 relativa à aproximação das legislações dos Estados-Membros respeitantes aos suplementos alimentares.** “Jornal Oficial das Comunidades Europeias” L 183/51 de 12 de julho de 2002.
- (7) GARCIA-ALVAREZ, A. [et.al.] (2014) – **Usage of plant food supplements across six European countries: findings from the PlantLibra Consumer survey.** “PLOS ONE” 9 (3), 18 de Março de 2014.
- (8) U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, (1995) – **Dietary Supplement Health and Education Act of 1994 (DSHEA).** 1 de Dezembro de 1995.

- (9) Dwyer, J. T. [et.al.] (2018) – **Dietary Supplements: Regulatory Challenges and Research Resources.** “Nutrients” 10, 41 (2018).
- (10) PORTUGAL, Imprensa Nacional Casa da Moeda – **Decreto-Lei n.º 136/2003**, de 28 de Junho.
- (11) PORTUGAL, Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas – **Decreto-Lei n.º 296/2007.** Diário da República, 1.ª série, N.º 161 — 22 de Agosto de 2007.
- (12) EGAN, B. [et.al.] (2011) – **An overview of consumer attitudes and beliefs about food supplements.** “Food & Function”, 2, 747 (2011).
- (13) BAILEY, R. L., [et.al.] (2013) – **Why US Adults Use Dietary Supplements.** “JAMA Internal Medicine”, 173(5) (2013) 355-361.
- (14) ALLAERT, F. A. [et.al.] (2016) – **Effect of magnesium, probiotic, and vitamin food supplementation in healthy subjects with psychological stress and evaluation of a persistent effect after discontinuing intake.** “Panminerva Medica”, 58, (2016) 263–270.
- (15) ALMEIDA, I. M. C. [et.al.] (2011) – **Dietary antioxidant supplements: Benefits of their combined use.** “Food and Chemical Toxicology” 49 (2011) 3232–3237.
- (16) KAROUSOU, R., DEIRMENTZOGLU, S. (2011) – **The herbal market of Cyprus: Traditional links and cultural exchanges.** “Journal of Ethnopharmacology” 133 (2011) 191-203.
- (17) GHASEMZADEH, A., JAAFAR, H. Z. E. (2011) – **Effect of CO₂ enrichment on synthesis of some primary and secondary metabolites in ginger (Zingiber officinale Roscoe).** “International Journal of Molecular Sciences” 12 (2011) 1101-1114.
- (18) GROSSKINSKY, D. K. [et.al.] (2012) – **Phytoalexin transgenics in crop protection-Fairy tale with a happy end?** “Plant Science” 195 (2012) 54– 70.

- (19) BARTWAL, A. [et.al.] (2013) – **Role of secondary metabolites and brassinosteroids in plant defense against environmental stresses.** “Journal of Plant Growth Regulation” 32 (2013) 216–232.
- (20) BIELLI, A. [et.al.] (2015) – **Antioxidants and vascular health.** “Life Sciences” 143 (2015) 209–216.
- (21) GÜLÇİN, İlhami (2012) – **Antioxidant activity of food constituents: an overview.** “Archives of Toxicology” 86 (2012) 345-391.
- (22) NDHLALA, A. R., [et.al.] (2010) – **Natural Antioxidants: Fascinating or Mythical Biomolecules?** “Molecules” 15 (2010) 6905-6930.
- (23) PROENÇA DA CUNHA, A. (2005) – **Farmacognosia e Fitoquímica.** 3ª Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- (24) YOSHIHARA, D., [et.al.] (2010) – **Antioxidants: benefits and risks for long-term health.** “Maturitas” 67 (2010) 103-107.
- (25) RIO, Daniele DEL [et.al.] – **Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases.** “Antioxidants & Redox Signaling” 18, 14 (2013) 1818-92.
- (26) VINHA, A. F. [et.al.] (2012) – **Phytochemical characterization and radical scavenging activity of aqueous extracts of medicinal plants from Portugal.** “European Journal of Medicinal Plants” 2, 4 (2012) 335-347.
- (27) KUMAR, S., PANDEY, A. K. (2013) – **Chemistry and biological activities of flavonoids: An overview.** “The Scientific World Journal” (2013).
- (28) COMALADA, M. [et.al.] (2006) – **Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure-activity relationship.** “Biochemical Pharmacology”. 72 (2006) 1010-1021.

- (29) HOOPER, L. [et.al.] (2008) – **Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials.** “The American Journal of Clinical Nutrition” 88 (2008) 38–50.
- (30) VEBERIC, R. [et.al.] (2015) – **Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species.** “Food Science and Technology” 60 (2015) 509–517.
- (31) THE NORTH AMERICAN MENOPAUSE SOCIETY (2011) – **The role of soy isoflavones in menopausal health.** Menopause. “The Journal of The North American Menopause Society” 18, 7 (2011) 732 – 753.
- (32) BOUAYED, J. e BOHN, T. (2010) – **Exogenous antioxidants – Double-edged swords in cellular redox state.** “Oxidative Medicine and Cellular Longevity” 3, 4 (2010) 228-237.
- (33) GONZÁLEZ, R. [et.al.] (2011) – **Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation.** “Critical Reviews in Food Science and Nutrition” 51, 4 (2011) 331–362.
- (34) CATARINO, M, D. [et.al.] (2015) – **Antioxidant Capacities of Flavones and Benefits in Oxidative-Stress Related Diseases.** “Current Topics in Medicinal Chemistry” 15, 2 (2015) 105–119.
- (35) CHIANG, Yi-Ming [et.al.] (2005) – **Ethyl caffeate suppresses NF-kB activation and its downstream inflammatory mediators, iNOS, COX-2, and PGE2 in vitro or in mouse skin.** “British Journal of Pharmacology” 146, 3 (2005) 352–363.
- (36) MAGIERA, S. [et.al.] (2014) – **UHPLC–UV method for the determination of flavonoids in dietary supplements and for evaluation of their antioxidant activities.** “Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis” 102 (2015) 468–475.
- (37) MANACH, C. [et.al.] (2004) – **Polyphenols: food sources and bioavailability.** “American Journal of Clinical Nutrition” 79 (2004) 727-747.

- (38) KARAKAYA, S. (2004) – **Bioavailability of phenolic compounds.** “Critical Reviews in Food Science and Nutrition” 44 (2004) 453–464.
- (39) SELMA, M. V., ESPÍN, J. C., TOMÁS-BARBERÁN, F. A. (2009) – **Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health.** “Journal of Agricultural and Food Chemistry” 57 (2009) 6485–6501.
- (40) SOUZA, J. E., CASANOVA, L. M., COSTA, S. S. (2015) – **Biodisponibilidade de compostos fenólicos: um importante desafio para o desenvolvimento de fármacos?** “Revista Fitos” 9 (2015) 1-72.
- (41) ALVES, R. C. [et.al.] (2009) – **Benefícios do café na saúde: mito ou realidade?** “Química Nova” 32, 8 (2009) 2169-2180.
- (42) BAEZA, G. [et.al.] (2014) – **Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress.** “Food Research International” 62 (2014) 1038-1046.
- (43) BAE, Jae-Hoon [et.al.] (2014) – **Coffee and health.** “Integrative Medicine Research” 3 (2014) 189-191.
- (44) GAWLIK-DZIKI, U. [et.al] (2014) – **Lipoxygenase inhibitors and antioxidants from green coffee - mechanism of action in the light of potential bioaccessibility.** “Food Research International” 61 (2014) 48–55.
- (45) LIU, Zai-Qun (2013) – **Antioxidants may not always be beneficial to health.** “Nutrition” 30 (2014) 131-133.
- (46) GOSTNER, J. M. [et.al.] (2015) – **The good and bad of antioxidant foods: An immunological perspective.** “Food and Chemical Toxicology” 80 (2015) 72–79.
- (47) KHODDAMI, A., WILKES, M. A., ROBERTS, T. H., (2013) – **Techniques for analysis of plant phenolic compounds.** “Molecules” 18 (2013) 2328-2375.

- (48) COSTA, A. S. G. [et.al.] (2011) – **Teas, dietary supplements and fruit juices: A comparative study regarding antioxidant activity and bioactive compounds.** “Lebensmittel Wissenschaft und Technologie“ 49 (2012) 324-328.
- (49) COSTA, A. S. G. [et.al.] (2013) – **Optimization of antioxidants extraction from coffee silverskin, roasting by-product, having in view a sustainable process.** “Industrial Crops and Products” 53 (2014) 350–357.
- (50) BARROSO, M. F. [et.al.] (2011) – **Flavored waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HSSPME/GC-MS.** “Journal of Agricultural and Food Chemistry” 59 (2011) 5062-5072.
- (51) BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E., BERSET, C. (1995) – **Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity.** “Lebensmittel Wissenschaft und Technologie” 28 (1995) 25-30.
- (52) COOK, R. [et.al.] (2013) – **The Saccharomyces cerevisiae transcriptome as a mirror of phytochemical variation in complex extracts of Equisetum arvense from America, China, Europe and India.** “BMC Genomics” 14, 445 (2013).
- (53) PAL, D., VERMA, P. (2013) – **Flavonoids: a powerful and abundant source of antioxidants.** “International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences” 5, 3 (2013) 95-98.
- (54) KIM, Ji-Eun [et.al.] (2011) – **Does Glycine max leaves or Garcinia Cambogia promote weight-loss or lower plasma cholesterol in overweight individuals: a randomized control trial.** “Nutrition Journal” 10, 94 (2011).
- (55) MITTAL, R.1., GUPTA, R.L. (2000) – **In vitro antioxidant activity of piperine.** “Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology” 22, 5 (2000) 271-4.

- (56) DAHHAM, S. S. [et.al.] (2015) – **The Anticancer, Antioxidant and Antimicrobial Properties of the Sesquiterpene β -Caryophyllene from the Essential Oil of *Aquilaria crassna*.** “Molecules” 20 (2015) 11808-11829.
- (57) MORAIS, S. M., [et.al.] (2006) – **Atividade de óleos essenciais de espécies de *Croton* do Nordeste do Brasil.** “Química Nova” 29, 5 (2006) 907-910.
- (58) ROBERTO, D., [et.al.] (2010) – **Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H_2O_2 modulation and cell proliferation.** “Basic Clinical Pharmacology & Toxicology” 106, 1 (2010) 38-44.
- (59) MIMICA-DUKIC, N., [et.al.] (2008) – **Phenolic Compounds in Field Horsetail (*Equisetum arvense* L.) as Natural Antioxidants.** “Molecules” 13 (2008) 1455-1464.
- (60) HAWA, S., [et.al.] (2013) – **Phytochemicals Content, Antioxidant Activity and Acetylcholinesterase Inhibition Properties of Indigenous *Garcinia parvifolia* Fruit.** “BioMed Research International” (2013).
- (61) MINAKSHI, G.C. [et.al.] (2015) – **Phytochemical Evaluation and Antioxidant Potential of *Garcinia indica* Fruits on H_2O_2 Induced Oxidative Stress in THP-1 Cell Line.** “International Journal of Pharmacology” 11, 7 (2015) 672-680.
- (62) KHAN, K. M., [et.al.] (2015) – **Synthesis of Benzophenone Hydrazone Analogs and their DPPH Radical Scavenging and Urease Inhibitory Activates.** “Journal Chemical Society of Pakistan” 37, 3 (2015) 479-483.
- (63) KUMAR, S., [et al.] (2018) – **Phytochemical Screening, In vitro Antifungal and Antioxidant Activity of Essential Oil from roots of *Rheum webbianum* Royle from Himalayan Region.** “International Journal of Green Pharmacy” 95 (2018) LPU Conference, Special Issue.
- (64) LIANG, C. P., [et.al.] (2014) – **In Vitro Antioxidant Activities, Free Radical Scavenging Capacity, and Tyrosinase Inhibitory of Flavonoid Compounds and Ferulic Acid from *Spiranthes sinensis* (Pers.) Ames.** “Molecules” 19 (2014) 4681-4694.

- (65) CHUNG, I. M., [et.al.] (2015) – **Comparative phenolic compound profiles and antioxidative activity of the fruit, leaves, and roots of Korean ginseng (Panax ginseng Meyer) according to cultivation years.** “Journal of Ginseng Research” 40 (2016) 68-75.
- (66) QIU, J., [et.al.] (2016) – **Screening and Identifying Antioxidative Components in Ginkgo biloba Pollen by DPPHHPLC-PAD Coupled with HPLC-ESI-MS2.** “PLOS ONE” 17 de janeiro de 2017.

ANEXOS

Tabela 7: compostos bioativos e atividade antioxidante por mg ou $\mu\text{mol/L}$

Identificação das amostras	Fenólicos totais (mg EAG/L)	Flavonoides totais (mg EC/L)	FRAP ($\mu\text{mol ESF/L}$)	Inibição do DPPH* (mg ET/L)
1 Cavalinha	11,6 \pm 0,7	4,3 \pm 0,9	108,2 \pm 4,2	-
2 Garcinia	54,6 \pm 2,2	43,6 \pm 2,1	26975,1 \pm 1193,5	2235,16 \pm 97,51
3 Alcachofra 1	40,2 \pm 1,1	27,2 \pm 1,1	22266,1 \pm 539,7	1959,67 \pm 57,8
4 Café verde 1	730,5 \pm 40,6	697,9 \pm 37,3	13535,2 \pm 570,8	931,89 \pm 40,08
5 Café verde 2	947,4 \pm 17,9	963,2 \pm 12,0	17053,7 \pm 404,4	1129,00 \pm 14,07
6 Chá verde cap 1	1155,0 \pm 36,3	259,2 \pm 0,6	21001,6 \pm 289,5	2536,53 \pm 36,72
7 Chá verde cap 2	5067,6 \pm 172,3	1153,5 \pm 51,2	73960 \pm 3214,2	6564,69 \pm 280,23
8 Ginseng e alecrim	1056,4 \pm 21,3	1043,7 \pm 28,2	16747 \pm 688,4	1519,79 \pm 19,13
9 Gingko biloba 1	565,2 \pm 16,3	320,1 \pm 7,1	8746,8 \pm 250,0	556,70 \pm 26,97
10 Ginseng	5,3 \pm 0,3	14,2 \pm 1,8	53,2 \pm 1,6	-
11 Gingko biloba 2	1449,3 \pm 182,0	866,4 \pm 87,7	18514,8 \pm 2479,8	1573,06 \pm 176,30
12 Alcachofra 2	177,0 \pm 5,9	155,7 \pm 10,6	3215,1 \pm 144,8	240,87 \pm 12,92
13 Chá cavalinha	357,6 \pm 49,4	222,4 \pm 30,5	4212,4 \pm 362,5	421,99 \pm 43,41
13 B Chá cavalinha	151,7 \pm 30,7	74,10 \pm 10,0	2186,0 \pm 58,1	241,63 \pm 7,53
14 Chá verde	957,1 \pm 87,3	273,5 \pm 17,0	18811,1 \pm 1375,1	2025,11 \pm 141,68
14 B Chá verde	537,1 \pm 8,0	100,6 \pm 32,7	10807,7 \pm 512	1098,55 \pm 82,79

EAG, equivalentes de ácido gálico; EC, equivalentes de catequina; ESF, equivalentes de sulfato ferroso; ET, equivalentes de trolox.

Luís André da Costa Barbosa

SUPLEMENTOS ALIMENTARES À BASE DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

