

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Departamento de Química

Controlo de Qualidade de Suplementos Alimentares Derivados de Plantas

Por

Vanessa de Jesus Sergeira

Dissertação apresentada na Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de
Lisboa para obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Doutora Ana Luísa Simplicio, IBET/ITQB-UNL

Lisboa

2009

“Por serem naturais, não quer dizer que não tenham riscos.”

ALEXANDRA BENTO,
presidente da Associação Portuguesa de Nutricionistas

“Aquilo que é bom em doses recomendadas pode tornar-se mau em doses excessivas, o teu remédio pode ser o teu veneno.”

GRAÇA RAIMUNDO,
presidente da Associação Nacional de Dietistas

Aos meus pais, irmão e avós pelo amor e apoio incondicional

Agradecimentos

Gostaria de expressar os meus sinceros agradecimentos, em primeiro lugar à minha orientadora Doutora Ana Luísa Simplício pela excelente orientação e pela aprendizagem adquirida na realização deste projecto, pelas suas contribuições e ideias no estudo apresentado, encorajamento, confiança em mim depositada e disponibilidade a todas as horas, sem ela nada disto era possível.

Agradeço ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB) nomeadamente ao laboratório de Farmacocinética e Análise Biofarmacêutica coordenado pela Dra. Ana Simplício, ao laboratório de Nutracêuticos e Libertação controlada coordenado pela Dra. Catarina Duarte e ao laboratório de Química Analítica coordenado pelo Professor Dr. Luís Vilas Boas e pela Professora Dra. Maria Rosário Bronze por me terem possibilitado a realização deste trabalho. Também agradeço ao laboratório de investigação do departamento de química da Faculdade de Ciências e Tecnologia coordenado pelo Professor Dr. João Paulo Crespo pela sua colaboração neste trabalho.

Manifesto um profundo agradecimento aos meus amigos, nomeadamente à Raquel e Sónia pelo acompanhamento e encorajamento prestado durante a realização desta monografia.

A todos os colegas de laboratório, Joana Moura, Nádía, Joana Lamego, Hugo, Vuki, Teresa, Ana Matias, Ana Patrícia, Helena e Andreia por todo o apoio, esclarecimentos, troca de ideias, críticas e conselhos.

A todos deixo o meu sincero agradecimento

Resumo

Com a descoberta de novas substâncias activas em plantas medicinais e com o aumento da procura do que é natural, os fármacos sintéticos são por vezes substituídos por produtos de origem botânica. Contudo isto pode acarretar um problema de saúde pública, uma vez que há uma significativa falta de fiscalização e harmonização dos produtos derivados de plantas e processos. Desta forma chegam ao mercado numerosos produtos sem descrição adequada das suas características, alegações, bem como o modo de utilização, sem garantia da qualidade, segurança e eficácia fundamentais para a preservação da saúde do consumidor.

Este trabalho permitiu avaliar e comparar entre si diferentes suplementos alimentares derivados da mesma planta (*Opuntia ficus indica*), á venda no mercado mundial, de diferentes marcas e produtores. As comparações basearam-se nas suas características químicas, nas indicações alegadas nas embalagens bem como nas suas potenciais propriedades farmacológicas. Avaliou-se nas amostras escolhidas e nos seus respectivos extractos os constituintes fenólicos, nomeadamente flavonóides que apresentam elevada capacidade antioxidante, o teor em fibra e o teor em fitoesteróis. Estes constituintes são reportados por possuir propriedades benéficas à saúde humana, nomeadamente: efeito de diminuição do colesterol, antidiabético, analgésico, anti-ulcerogénico e anti-aterogénico.

Verificou-se de facto que existe no mercado produtos que apesar de possuírem a mesma descrição no rótulo, apresentam composições e concentrações diferentes, o que poderá ser devido à origem das plantas utilizadas ou ao processo de fabrico. Verificou-se que as tomas recomendadas para cada produto não estão relacionadas com as concentrações relativas e que podem existir diferenças nos processos de fabrico dos vários produtos que levam á desglicosilação de compostos.

É então extremamente necessário investir na padronização e na definição de critérios de qualidade, composição e eficácia dos suplementos, bem como na formação de pessoas qualificadas e aptas para a avaliação e aplicação rigorosa dessas regulamentações e critérios.

Abstract

With the discovery of new active substances in medicinal plants and with the increase in the demand for natural products, synthetic drugs are sometimes substituted by the ones of botanical origin. However this may be in the origin of a problem of public health, due to reduced legislation and harmonization of products and procedures.

Therefore, several products reach the market without proper description of their characteristics and claims as well as without adequate quality, safety and efficacy that are necessary for the preservation of consumer health.

This work consisted in the comparison of different food supplements derived from the same plant (*Opuntia ficus indica*), that are available in the world-wide market, with different brands and from different producers. Comparisons were based on the chemical composition as well as on their potential pharmacologic properties and claims alleged in the package. Phenolic constituents were quantified in different extracts of the chosen samples, namely flavonoids which present significant antioxidant capacity. The fiber and phytosterol content were also determined. These constituents are reported because they have alleged beneficial properties to the human health, namely: cholesterol-lowering effect, antidiabetic, analgesic, antiulcerogenic and anti-atherogenic.

It was concluded that, in fact, there are products in the market that despite having similar descriptions in the label, present different compositions and concentrations. The doses recommended for each product are not related with their relative compositions and there are probably some differences in the production processes that lead to deglycosilation of phenolic compounds in some cases but not in others.

So, it is extremely necessary to invest in the standardization and in the definition of quality criteria, composition and efficacy evaluation of dietary supplements, as well as in training of qualified persons for the rigorous evaluation and application of these regulations and criteria.

Índice

Agradecimentos	4
Resumo.	5
Abstract... ..	6
Índice de Figuras.....	10
Índice de Tabelas	13
Lista de Abreviaturas	14
1. Introdução	15
1. Suplementos alimentares.....	16
1.1. Definição e regulamentação.....	16
1.2. Controlo de qualidade.....	19
1.3. Eficácia e segurança.....	21
1.4. Suplementos naturais versus fármacos sintéticos.....	22
1.5. Bioequivalência.....	23
1.6. Efeitos secundários e interações.....	24
1.7. Consumo de suplementos alimentares.....	26
2. <i>Opuntia Ficus Indica</i>	28
2.1. Origem.....	28
2.2. Características.....	28
2.3. Composição.....	30
2.3.1. Fibra.....	31
2.3.2. Compostos fenólicos.....	32
2.3.3. Fitoesteróis.....	33
2.4. Aplicações e benefícios alegados para a saúde.....	34
2.5. Interações e efeitos secundários.....	36
3. Objectivo.....	37
2. Materiais e Métodos.....	38
1. Escolha das amostras (suplementos alimentares).....	39
2. Preparação dos extractos das amostras.....	39
2.1. Extracção a quente com H ₂ O.....	39
2.2. Hidrólise.....	40
2.3. Extracção a frio com etanol.....	40
3. Determinação dos perfis e teor relativo de compostos fenólicos, flavonóides glicosilados e não glicosilados.....	41

3.1. Perfis.....	42
3.2. Determinação do teor relativo de compostos fenólicos por HPLC.....	43
3.3 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	45
4. Avaliação da actividade antioxidante.....	46
4.1. Capacidade de resgate do radical peroxilo (ORAC).....	46
4.2. Capacidade de resgate do radical hidroxilo (HORAC).....	48
4.3. Ensaio de bioactividade dos extractos (determinação da capacidade antioxidante intracelular).....	50
4.3.1. Avaliação da toxicidade celular.....	51
4.3.2. Avaliação da capacidade antioxidante intracelular.....	52
5. Determinação do teor de fibra.....	53
6. Identificação e quantificação dos fitoesteróis.....	55
3. Resultados e Discussão.....	60
1. Perfis cromatográficos.....	61
1.1. Compostos fenólicos totais.....	62
1.2. Flavonóides glicosilados e não glicosilados.....	64
2. Determinação do teor de compostos fenólicos.....	66
2.1. Teor relativo de compostos fenólicos por HPLC-DAD a 280 nm.....	67
2.2. Teor de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu.....	68
2.3. Comparação entre os métodos de Folin-Ciocalteu e HPLC-DAD (280 nm).....	69
2.4. Determinação do teor relativo de flavonóides glicosilados e não glicosilados.....	70
2.5. Identificação e quantificação relativa de alguns flavonóides.....	72
3. Avaliação da actividade antioxidante.....	74
3.1. Capacidade de resgate do radical peroxilo (ORAC).....	74
3.2. Capacidade de resgate do radical hidroxilo (HORAC).....	75
3.3. Correlação do tipo de compostos com a actividade antioxidante.....	77
3.3.1. Fenólicos totais versus actividade antioxidante.....	77
3.3.2. Flavonóides versus actividade antioxidante.....	78
3.4. Ensaio de bioactividade dos extractos (determinação da capacidade antioxidante intracelular).....	79
3.4.1. Avaliação da toxicidade celular.....	80
3.4.2. Avaliação da capacidade antioxidante intracelular.....	83
4. Determinação do teor de fibra.....	87
5. Identificação e quantificação dos fitoesteróis.....	89
4. Conclusão e Perspectivas Futuras.....	93
5. Referências Bibliográficas.....	97

Anexo 1.....	106
A. Características dos suplementos alimentares escolhidos para este trabalho.....	106
Anexo 2.....	107
A. Preparação da solução de Na ₂ CO ₃	107
B. Recta de calibração do ácido gálico (ensaio Folin-Ciocalteu).....	107
C. Recta de calibração do Trolox (ensaio ORAC).....	107
D. Recta de calibração do ácido cafeico (ensaio HORAC).....	108
E. Resultados de avaliação da toxicidade celular nos diferentes extractos.....	108
F. Resultados de avaliação da toxicidade intracelular (ensaio stress oxidativo) nos diferentes extractos.....	110
Anexo 3.....	112
A. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (280 nm) utilizando o método mais curto...	112
B. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (370 nm), utilizando o método mais curto...	113
C. Identificação dos padrões nos extractos etanólicos (HPLC-DAD 370 nm).....	115
D. Cromatograma obtido por GC.....	117
Anexo 4.....	118
A. Procedimento para cultura de células.....	118
B. Contagem de células através de hemacitómetro.....	119
C. Preparação da solução de PBS.....	120

Índice de figuras

Figura 1.1: Posição dos suplementos alimentares entre os alimentos e os fármacos.....	16
Figura 1.2: Processos farmacocinéticos, sistema ADME.....	25
Figura 1.3: Esquema representativo do metabolismo de um fármaco.....	25
Figura 1.4: Utilização das categorias de suplementos alimentares.....	27
Figura 1.5: Satisfação relativamente às categorias de suplementos alimentares.....	27
Figura 1.6: Planta <i>Opuntia ficus Indica</i>	29
Figura 1.7: Esquema dos tipos de fibra presentes no Nopal.....	31
Figura 1.8: Estrutura básica dos flavonóides.....	32
Figura 1.9: Estrutura química dos esteróis.....	33
Figura 1.10: Mecanismo representativo da conversão do colesterol em ácidos biliares.....	35
Figura 1.11: Lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade.....	36
Figura 2.12: Montagem de refluxo usada na extracção.....	40
Figura 2.13: Agitação das amostras no aparelho ultra-sons.....	41
Figura 2.14: Extractos etanólicos em repouso.....	41
Figura 2.15: Esquema de funcionamento do HPLC.....	42
Figura 2.16: Gradiente de mistura dos dois eluentes da fase móvel (método longo de HPLC).....	43
Figura 2.17: Programa do gradiente de eluição do método curto de HPLC-DAD.....	44
Figura 2.18: Esquema de reacções elementares ocorridas no ensaio de ORAC.....	46
Figura 2.19: Esquema da reacção do peróxido de hidrogénio (H ₂ O ₂) em presença de iões metálicos (M) no ensaio HORAC.....	48
Figura 2.20: Mecanismo do método proposto para a quantificação da capacidade antioxidante intracelular.....	50
Figura 2.21: Redução do “tetrazolium” a “formazan”.....	51
Figura 2.22: Espectrofotómetro lendo placa do ensaio MTT.....	52
Figura 2.23: Montagem usada no ensaio da fibra.....	54
Figura 2.24: Mecanismo de funcionamento de aparelho de GC.....	56
Figura 2.25: Extracção da fase insaponificável com ampola de decantação.....	57
Figura 2.26: Representação da coluna utilizada no ensaio dos fitoesteróis.....	58
Figura 2.27: Esquema representativo do programa de temperaturas utilizado no ensaio dos fitoesteróis.....	59
Figura 3.28: Perfis de absorção a 280 nm com o método mais longo para a extracção a quente com água (rosa) e extracção a frio com etanol (preto/azul).....	62

Figura 3.29: Perfis das amostras (extração em água e hidrolisadas) no HPLC (280 nm) com o método mais longo.....	63
Figura 3.30: Comparação dos espectros de absorção do extracto etanólico N.C. com o 5-HMF (à esquerda) e o ácido gálico (à direita) e correspondentes índices de semelhança.....	64
Figura 3.31: Perfis das amostras (extração em água e etanol) no HPLC (360 nm) com o método mais longo.....	65
Figura 3.32: Perfil a 360 nm do extracto etanólico (azul) e aquoso (rosa) da amostra N.C. com possíveis identificações de alguns flavonóides.....	66
Figura 3.33: Teor relativo em compostos fenólicos totais determinado por HPLC-DAD (280 nm).....	67
Figura 3.34: Compostos fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu).....	69
Figura 3.35: Correlação Folin versus HPLC-DAD.....	70
Figura 3.36: Quantidade em mg por comprimido de flavonóides glicosilados equivalentes a rutina (à direita) e não glicosilados equivalentes a quercetina (à esquerda) obtidos por HPLC-DAD (370 nm) representando as barras de erro o desvio padrão.....	71
Figura 3.37: Transformação da quercetina glicosilada (rutina) em quercetina não glicosilada.....	72
Figura 3.38: Quantificação de alguns flavonóides nos extractos etanólicos por HPLC-DAD (370 nm).....	73
Figura 3.39: Resultados do ensaio ORAC para as diferentes amostras.....	75
Figura 3.40: Resultados do ensaio HORAC para as diferentes amostras.....	76
Figura 3.41: Correlação HORAC versus ORAC.....	77
Figura 3.42: Correlação dos compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) com a actividade antioxidante ORAC e HORAC.....	77
Figura 3.43: Correlação dos fenólicos totais (HPLC-DAD) com a actividade antioxidante ORAC e HORAC.....	78
Figura 3.44: Correlação dos flavonóides glicosilados com a actividade antioxidante ORAC e HORAC nos extractos aquosos.....	79
Figura 3.45: Toxicidade celular dos extractos aquosos com tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2.....	80
Figura 3.46: Toxicidade celular dos extractos etanólicos com tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2.....	81
Figura 3.47: Toxicidade celular dos extractos hidrolisados, tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2.....	82
Figura 3.48: Toxicidade intracelular dos extractos aquosos com tempo de contacto de 24 horas com as células Caco2.....	84

Figura 3.49: Toxicidade intracelular dos extractos etanólicos, tempo de contacto de 24 horas com as células Caco-2.....	85
Figura 3.50: Toxicidade intracelular dos extractos hidrolisados, tempo de contacto de 24 horas com as células Caco-2.....	86
Figura 3.51: Percentagem do teor de fibra nas amostras por comprimido.....	88
Figura 3.52: Teor de fitoesteróis determinado nas amostras por GC.....	90
Figura 4.53: Comparação dos vários resultados obtidos para as amostras nos diferentes tipos de extractos.....	94

Índice de tabelas

Tabela 1.1: Tipos de adulterantes e contaminantes encontrados em suplementos alimentares.....	21
Tabela 1.2: Classificação científica da planta <i>Opuntia ficus indica</i>	28
Tabela 3.3: Características de cada amostra.....	61
Tabela 3.4: Fenólicos totais (HPLC-DAD).....	67
Tabela 3.5: Fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu).....	69
Tabela 3.6: Quantidade de flavonóides obtidos por HPLC-DAD a 370 nm.....	71
Tabela 3.7: Quantificação de alguns flavonóides nos extractos etanólicos por HPLC-DAD a 370 nm.....	73
Tabela 3.8: Resultados do ensaio ORAC.....	75
Tabela 3.9: Resultados do ensaio HORAC.....	76
Tabela 3.10: Resultados do ensaio da fibra e teor de planta alegado na embalagem por comprimido.....	87
Tabela 3.11: Factores resposta obtidos no ensaio dos fitoesteróis.....	89
Tabela 3.12: Resultados da determinação do teor de fitoesteróis nas amostras por GC.....	90

Lista de abreviaturas

AAPH - 2,2-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorado

ADME - Absorção, distribuição, metabolismo e excreção

CAEAC - Capacidade antioxidante equivalente ao ácido cafeíco

CAET - Capacidade antioxidante equivalente ao trolox

EAG - Equivalentes de ácido gálico

FDA - Food Drug and Administration

FL - Fluoresceína

Folin - método Folin-Cicolteau

FR - Factor resposta

GC - Cromatografia gasosa

GC-FID - Gas chromatography-flame ionization detector

HDL - Lipoproteína de alta densidade

HDS - heptadecanyl stearate

HORAC - Hydroxyl Radical Averting Capacity

HPLC-DAD - High Performance/Pressure Liquid Chromatography-Diode Array Detector

IMS Health - Intercontinental Marketing Services Health

I.S. - índice de semelhança

LDL - Lipoproteína de baixa densidade

MTT - 3-(4,5-dimetritiazolil-2)-2,5-difeniltetrazolium bromide

N.C. - Nopal Cactus

OMS - Organização Mundial de Saúde

ORAC - Oxygen Radical Absorbance Capacity

PABA - Pharmacokinetics and Biopharmaceutical Analysis Laboratory (ITQB)

RFC - reagente de Folin-Ciocalteu

ROS - Reactive oxygen species

Tert - butil - peróxido tert-butil hidróxido

U.V. - Ultra violet

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1- Suplementos alimentares

1.1 - Definição e regulamentação

De acordo com o Decreto-Lei nº 136/2003 de 28 de Junho, consideram-se suplementos alimentares os géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias, nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinadas, comercializadas em forma doseada, tais 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 unidades de medidas de quantidade reduzida (Felício, 2006).

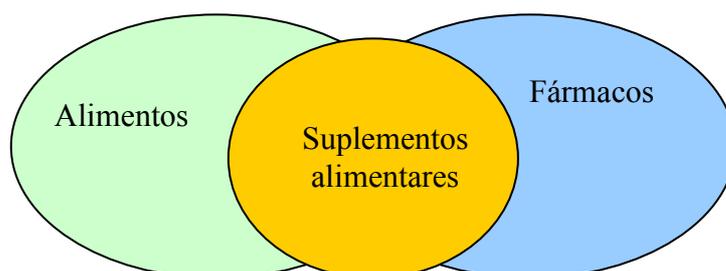


Figura 1.1: Posição dos suplementos alimentares entre os alimentos e os fármacos.

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

- ④ suplementos que contêm só vitaminas e minerais;
- ④ suplementos que contêm vitaminas, minerais e outro princípios activos não-botânicos;
- ④ suplementos que contêm ervas e ingredientes activos não-herbóreos, inclusive vitaminas e minerais;
- ④ suplementos que contêm só ervas ou botânicos (Ottaway, 2002).

Quanto á rotulagem segundo o Decreto-Lei 560/99 de 18 de Dezembro, os suplementos alimentares devem conter no rótulo a menção de "suplemento alimentar", a designação das substâncias que caracterizam o produto ou uma referência específica à sua natureza, sendo a quantidade de cada nutriente apresentada sob a forma numérica e sob a forma de percentagem relativamente a dose diária recomendada pelo fabricante. Devem também mencionar a toma diária recomendada do produto e conter uma advertência relativa aos possíveis riscos para a saúde decorrentes da ingestão de quantidades superiores à toma diária indicada. O suplemento alimentar deve ainda incluir no rótulo a menção obrigatória que o produto deve ser mantido fora do alcance das crianças, assim como a indicação de que os suplementos alimentares não devem ser utilizados como substitutos de um regime alimentar variado. Além disso, a rotulagem, apresentação e publicidade dos suplementos alimentares não pode incluir menções que atribuam aos mesmos propriedades profilácticas, de tratamento ou curativas de doenças humanas (Santos et al., 2008; Felício, 2006).

O Parlamento Europeu e o Conselho da União Europeia elaboraram a directiva L183 em 10 de Junho de 2002 que foi revista a 30 de Março de 2006 relativamente á legislação dos suplementos alimentares. Essa directiva aborda os ingredientes permitidos, a rotulagem, a apresentação e a publicidade permitidas para os suplementos alimentares. Em 2004 foi elaborada outra directiva (2004/24/EC) pelo Parlamento Europeu e pelo Conselho da Europa que estabelece que as várias empresas desta área para actuarem no mercado de um país da União Europeia, apenas necessitam da autorização das entidades nacionais reguladoras desse país (Calapai, 2008).

Na União Europeia não existe nenhuma entidade reguladora dos suplementos alimentares comum aos diferentes países da Europa (Calapai, 2008). Apenas o Comité de Produtos Medicinais Herbóreos (HMPC), constituído por peritos científicos através da directiva (2004/24/EC), tenta estabelecer a harmonização das legislações da medicina herbórea nos vários estados membros da União Europeia baseando-se em recursos científicos existentes sobre avaliação, supervisão e farmacovigilância de produtos medicinais (EMEA, 2009).

Mesmo depois da introdução dos suplementos alimentares na directiva 2004/24/EC e até hoje, o mercado de produtos herbóreos está confuso e a harmonização na União Europeia ainda é muito pequena, em particular para substâncias que não são nem vitaminas nem minerais. Os suplementos são sujeitos às

exigências nacionais de cada país, não revelando muita coerência entre países uma vez que para algumas plantas essas exigências são muito diferentes, como no caso da planta *Ginkgo biloba* que pode ser vendida como suplemento alimentar no Reino Unido e nos Países Baixos, como um medicamento sem prescrição na Alemanha e França e como um medicamento de prescrição na Irlanda. Esta disparidade resulta na necessidade da contínua avaliação da legalidade dos produtos em cada país da Europa (Gulati et al., 2006).

É importante realçar que os suplementos alimentares não necessitam da aprovação da *Food and Drug Administration (FDA)* para serem colocados no mercado. O fabricante é responsável pela autenticidade das alegações indicadas na embalagem, devendo ter evidências que estas são verídicas e também por controlar a qualidade e a segurança dos seus suplementos. Caso ocorra algum problema de segurança a FDA actua no sentido de comprovar que o produto é perigoso (De Smet, 2002).

Em Portugal, existe comercializada uma grande variedade de produtos à base de plantas, fabricados no país ou importados designados dietéticos, que não são abrangidos pela legislação aplicável aos medicamentos à base de plantas através da intervenção da Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde (INFARMED), não estando, portanto, garantida a sua qualidade, segurança e eficácia terapêutica apesar de continuarem a possuir reacções adversas ou interacções com medicamentos (Santos et al., 2008).

Caso um operador económico pretenda introduzir um novo suplemento no nosso mercado (ou alterar um já existente) ou ainda importar suplementos alimentares, deverá dirigir-se a Direcção de Serviços de Normalização e Segurança Alimentar do Gabinete de Planeamento e Políticas do Ministério da Agricultura. O Decreto-Lei no 296/2007, de 22 de Agosto, designou este Gabinete como organismo competente para o envio dos rótulos de suplementos, antes da sua entrada no mercado, estando atribuída à Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) - a missão de fiscalização, avaliação e comunicação dos riscos na cadeia alimentar (Santos et al., 2008).

1.2 – Controlo de qualidade

A qualidade de produtos fitofarmacêuticos é determinada através da identidade, pureza, conteúdo, outras propriedades químicas, físicas e biológicas e também pelo processo de fabrico. O tipo de preparação, propriedades sensoriais, constantes físicas, mistura, conteúdo de cinzas, resíduos de solventes e adulterações devem ser verificadas para provar a identidade e a pureza do material da planta. Contaminações microbiológicas e material estranho tal como metais pesados, resíduos de pesticidas, aflatoxinas e radioactividade também devem ser verificados (tabela 1.1) (Bandaranayake, 2006).

Ao considerar os produtos de origem vegetal com finalidade terapêutica, verifica-se a importância de especificações adequadas de qualidade microbiológica, da mesma forma que ocorre para os demais medicamentos não estéreis. Pois, factores como poluição na água de irrigação, atmosfera, solo, condições de colheita, manipulação, secagem e armazenamento são importantes a serem considerados no controlo de produtos naturais, por permitirem altos níveis de contaminação microbiana e por vezes patogénica (Bugno et al., 2005). O ambiente e a qualidade das matérias-primas usadas durante a formulação dos produtos também influenciam a qualidade microbiana (Okunlola et al., 2007). O alerta para a qualidade microbiológica de produtos medicinais ficou notável em 1966 quando foi reportado mais de 200 casos de contaminação de Salmonela por consumo de comprimidos para a tiróide contaminados. Outros casos se sucederam, a FDA também registou durante os anos passados, alguns casos de contaminação de Salmonela em suplementos dietéticos, como visto, a contaminação microbiana não é um acontecimento raro (Foote et al., 2002).

Os limites da contaminação microbiana para produtos medicinais derivados de plantas são: bactérias totais aeróbias 10^5 cfu/g, leveduras e fungos 10^3 cfu/g, Enterobacteria e outros organismos Gram negativo 10^3 cfu/g e E. coli e Salmonela devem estar ausentes. A presença de contaminantes microbianos pode reduzir ou até inactivar a actividade terapêutica do produto (Okunlola et al., 2007).

Num estudo efectuado no Brasil na cidade de São Paulo que avaliou 91 amostras de fármacos de origem vegetal, compostos por 65 espécies vegetais distintas evidenciaram que 92,3% das amostras analisadas estavam em desacordo com um ou

mais parâmetros microbiológicos especificados na Farmacopeia Americana. Os microrganismos detectados em plantas com maior frequência pertencem aos géneros *Aspergillus* e *Penicillium* (Bugno et al., 2005).

Considerando o risco real de aquisição e utilização de produtos naturais de má qualidade, é necessário garantir a qualidade e a segurança, através do controlo e fiscalização rigorosa, com a adopção de fortes medidas regulamentadoras e educativas (Bugno et al., 2005) de modo a que os fabricantes assegurem o nível mais baixo possível de microrganismos presentes na matéria-prima e mantenham a qualidade apropriada, a segurança e a eficácia dos seus produtos (Okunlola et al., 2007).

Métodos analíticos tais como análises espectrofotométricas, cromatografia de camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e cromatografia gasosa (GC) podem ser utilizados com vista a determinar a composição das preparações herbóreas (Bandaranayake, 2006). Sendo assim o farmacêutico e o fitoquímico têm um papel importante na produção, controlo de qualidade, regulamentação e fiscalização para garantir que os produtos no mercado sejam seguros e contenham uma rotulagem adequada e conforme com o conteúdo (Santos et al., 2008).

Idealmente, os suplementos derivados de plantas deveriam ser controlados para assegurar que não contêm qualquer adulterante ou contaminante (tabela 1.1) e a informação do produto devia incluir dados básicos sobre o fabricante, a composição, o armazenamento do produto e o seu uso correcto e seguro. Contudo, a padronização de remédios herbóreos pode ser difícil, uma vez que eles são misturas complexas e os constituintes responsáveis pelos efeitos alegados são frequentemente desconhecidos. Assim, neste tipo de produtos existem muitas variações na sua composição, entre fabricantes e lotes, bem como discrepâncias entre a informação contida no rótulo e o verdadeiro conteúdo (De Smet, 2002). Todas estas variações de qualidade e quantidade no produto final dependem de diferentes factores tais como: o material de partida, o local geográfico de crescimento que influencia a composição da planta, o cultivo com ou sem pesticidas e processos de manuseamento tais como recolha, lavagem, secagem, conservação, etc. (Loew et al., 2002).

Tabela 1.1: Tipos de adulterantes e contaminantes encontrados em suplementos alimentares (De Smet, 2002).

TYPE OF ADULTERANT OR CONTAMINANT	EXAMPLES
Botanicals	Aristolochia, digitalis, colchicum, rauwolfia, plants containing belladonna or pyrrolizidine alkaloids†
Microorganisms	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> (certain strains), salmonella, shigella, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Microbial toxins	Aflatoxins, bacterial endotoxins
Pesticides	Chlorinated pesticides, organic phosphates, carbamate insecticides and herbicides, dithiocarbamate fungicide, triazin herbicides
Fumigation agents	Ethylene oxide, methyl bromide, phosphine
Toxic metals	Lead, cadmium, mercury, arsenic
Drugs	Analgesic and antiinflammatory drugs (e.g., aminophenazone, phenylbutazone, indomethacin), corticosteroids, benzodiazepines; warfarin, fenfluramine, sildenafil*

1.3 – Eficácia e segurança

Os efeitos relativos dos fármacos são com frequência medidos em termos de potência que consiste na dose necessária para produzir um efeito de intensidade específico comparando com uma referência padrão. Este efeito é comparativo, depende tanto da afinidade como da eficácia de um fármaco e é avaliado antes da aprovação dos medicamentos, nomeadamente em ensaios pré-clínicos e clínicos que não são exigidos no caso dos suplementos alimentares. O mesmo se passa em relação à segurança e toxicidade.

Só uma pequena fração dos milhares de produtos alimentares derivados de plantas medicinais usados em todo o mundo é aleatoriamente escolhida e submetida a provas de controlo. Os testes não são obrigatórios e a maioria dos produtores argumenta que seria difícil recuperar o alto custo de pesquisa, uma vez que os produtos derivados de plantas são mais difíceis de patentear do que os novos fármacos sintetizados (De Smet, 2002). Sendo assim, a abundância de produtos disponíveis e a falta de controlo limitam o estudo da eficácia e até mesmo a segurança dos suplementos, que é avaliada retrospectivamente e com base na medicina tradicional, por exemplo.

De acordo com (Calapai, 2008), a segurança de produtos medicinais herbóreos deverá ser avaliada com base na literatura científica existente (dados de estudos clínicos, relatórios de caso, estudos pré-clínicos) e através destes critérios de segurança e eficácia no futuro iremos ter duas espécies de produtos medicinais herbóreos:

(i) produtos medicinais derivados de plantas com um nível reconhecido de segurança e eficácia;

(ii) produtos medicinais derivados de plantas de uso tradicional que não têm um nível de eficácia reconhecido.

O objectivo fundamental da nova legislação é a harmonização das regulações do mercado e do controlo de qualidade da medicina herbórea que contribuirá para o uso mais seguro de substâncias derivadas das plantas em toda a Comunidade Europeia (Calapai, 2008).

1.4 – Suplementos naturais *versus* fármacos sintéticos

Os produtos derivados de plantas são muito diferentes dos fármacos sintéticos bem definidos, por exemplo, a disponibilidade e qualidade das matérias-primas é frequentemente problemática; os princípios activos são frequentemente desconhecidos; e a standardização, avaliação da estabilidade e controlo de qualidade são factíveis mas nem sempre executados. Em comparação com a medicina moderna, a medicina herbórea têm um menor custo, é usada com maior frequência em tratamentos de doenças crónicas e a ocorrência de efeitos secundários parece ser menos frequente.

Uma das características básicas dos produtos fitoterapêuticos é o facto de não possuírem uma forte e imediata acção farmacológica e por essa razão não são usados para tratamentos de emergência, contudo, cerca de 80% da população mundial (4 biliões) que vive nos países em desenvolvimento usa a medicina herbórea como primeiro recurso para cuidados com a saúde (Bandaranayake, 2006).

Em alguns casos, os produtos usados tradicionalmente, dão origem a medicamentos reconhecidos. Aspirina, atrofina, morfina e quinina são alguns exemplos dos fármacos que foram descobertos através do estudo de curas tradicionais e do conhecimento de povos indígenas.

O crescente interesse pelos produtos derivados de plantas deve-se aos seguintes factores:

- eficácia das plantas medicinais;
- a preferência dos consumidores por terapias naturais alternativas uma vez que acreditam que os produtos derivados de plantas são superiores aos produtos sintetizados;
- a insatisfação com os resultados dos fármacos sintéticos e a fé de que a medicina herbórea pode ser eficaz em tratamentos onde a terapia convencional não é adequada;
- o elevado custo e os efeitos secundários dos fármacos modernos;
- o aumento da qualidade, eficácia e segurança da medicina herbórea com o desenvolvimento da ciência e tecnologia;
- a crença dos pacientes que os seus médicos não identificaram propriamente o problema e considerarem que os remédios herbóreos são outra opção;
- e a possibilidade de auto-medicação (Bandaranayake, 2006).

1.5 – Bioequivalência

Devido á insuficiente definição dos ingredientes activos nos produtos derivados de plantas os estudos de equivalência terapêutica e farmacocinética tornam-se difíceis. A variação da qualidade e composição de produtos medicinais derivados de plantas também contribui para esse problema (Loew et al., 2002). Além disso, a ausência de regulamentação e controlo, leva a que não seja necessário demonstrar as propriedades do produto nem seguir métodos de produção padronizados. Por exemplo, as formulações dos produtos, nomeadamente em termos de excipientes, são decididos pelo produtor sem que seja necessário demonstrar o perfil de libertação dos componentes activos.

Por estas razões, é expectável que, na gama de produtos disponíveis no mercado, derivados de uma mesma planta, se encontrem características significativamente diferentes.

1.6 – Efeitos secundários e interações

Os produtos derivados de plantas possuem riscos para a saúde através dos efeitos secundários ou interações com fármacos ou outros suplementos. O risco aumenta em pacientes específicos ou em circunstâncias especiais (p. ex., durante o período perioperatório). Os efeitos embriotóxicos, fetotóxicos e carcinogénicos permanecem ainda desconhecidos em muitos destes produtos (De Smet, 2002).

A cada produto está associada uma razão de risco-benefício, que pode alterar-se por interação com um fármaco ou suplemento alimentar afectando assim, a sua segurança e efeito terapêutico. O risco de interação aumenta com o número de produtos consumidos simultaneamente, ou seja para dois produtos o risco é de 6%, para cinco produtos o risco é de 50 % e para oito ou mais produtos o risco é de 100% (Kuhn, 2002).

A OMS recebeu cerca de 16 mil notificações de efeitos adversos entre 1968 e 1997 e cerca de cinco mil nos últimos 15 anos do século passado. Só no ano de 2001, chegaram à FDA 500 registos de situações anormais. Entre os efeitos secundários mais registados estão as hepatites, as doenças cardio-vasculares, as alterações do sistema nervoso e os problemas renais e cutâneos (Barata, 2008).

Os mecanismos de interação de planta-fármaco são os mesmos observados nas interações fármaco-fármaco (Ebadi (a), 2007) e podem ser divididos em dois grupos:

- Interações farmacodinâmicas: um fármaco altera (aumento ou redução) a resposta terapêutica esperada do outro fármaco, devido a interações específicas no receptor alvo, contudo a farmacocinética não se altera.
- Interações farmacocinéticas: ocorre uma mudança de um dos quatro processos farmacocinéticos do sistema ADME (figura 1.2): absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Este tipo de interação é devido à alteração de um ou mais parâmetros cinéticos, tais como transporte ou metabolismo e é detectável por alteração da concentração máxima no sangue, quantidade de fármaco excretada na urina, área abaixo da curva tempo-concentração, etc. (Byrne, 2003).



Figura 1.2: Processos farmacocinéticos, sistema ADME (http://quimicafarmaceutica.zip.net/images/Banco_de_dados.JPG).

Do ponto de vista farmacocinético, os suplementos alimentares podem ter efeitos profundos na absorção, metabolismo, distribuição e eliminação do fármaco através da inibição metabólica ou da indução de enzimas e transportadores específicos. Um número significativo de plantas e suplementos têm sido identificados como potenciais inibidores das estereases e do sistema enzimático citocromo P450 (concentrado no fígado e na mucosa intestinal mas também encontrada nos rins, pele, pulmões e outros tecidos), que corresponde à família de enzimas mais importante da fase I do metabolismo, responsável pela biotransformação de aminas, esteróides, colesterol e da maioria dos fármacos de prescrição (levando ao aumento da sua polaridade para facilitar o processo de eliminação). Muitos destes produtos são também capazes de afectar as funções dos transportadores das membranas celulares (Mucksavage et al., 2008).

Na fase II do metabolismo, ocorre conjugação dos metabolitos da fase I com moléculas que os tornam ainda mais solúveis em água facilitando ainda mais a sua eliminação (figura 1.3).

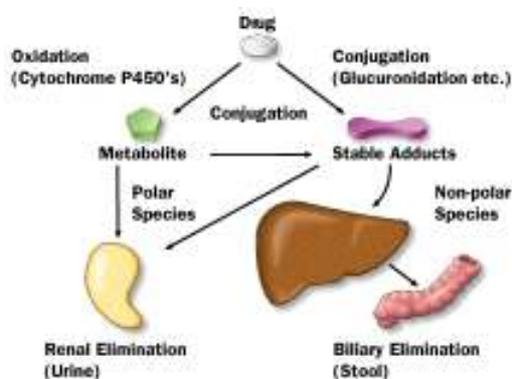


Figura 1.3: Esquema representativo do metabolismo de um fármaco (<http://www.medscape.com/pi/editorial/clinupdates/2000/301/art-cm.drug.fig3.gif>).

No caso dos suplementos alimentares este tipo de reacções enzimáticas são frequentemente desconhecidas e quanto menos se sabe acerca destas reacções maior é o risco de ocorrerem interacções resultantes da co-administração suplemento-fármaco (Cott, 2003).

1.7 – Consumo de suplementos alimentares

A OMS estima que cerca de 80% da população mundial recorre às práticas médicas tradicionais como forma de abordagem primária dos seus problemas de saúde (Lusa, 2008).

No nosso país, têm-se efectuado alguns estudos sobre este tema, num questionário realizado de Novembro de 2005 a Janeiro de 2006 e efectuado a 1.247 indivíduos com idade igual ou superior a dezoito anos, residentes em Portugal continental e com características de consumo essencialmente urbanas concluiu-se haver elevado conhecimento de suplementos alimentares (99% já tinham ouvido falar destes géneros alimentícios) e elevado consumo, para os quais contribuem os pontos de venda especializados, nomeadamente as farmácias e as lojas de produtos naturais. O seu uso assenta em motivos de prevenção e motivos de saúde e/ou clínicos. A imagem deste tipo de produtos é positiva o que favorece a intenção de recompra. A utilização de suplementos alimentares verifica-se principalmente junto da população feminina de faixas etárias mais jovens (Felício, 2006). Apurou-se nesse mesmo questionário que cerca de 81% dos entrevistados utilizam ou já utilizaram suplementos alimentares, sobressaindo a categoria das vitaminas como a mais referida (figura 1.4), no entanto a categoria dos vegetais/chás/plantas apresentou um maior grau de satisfação (figura 1.5) (Felício, 2006).

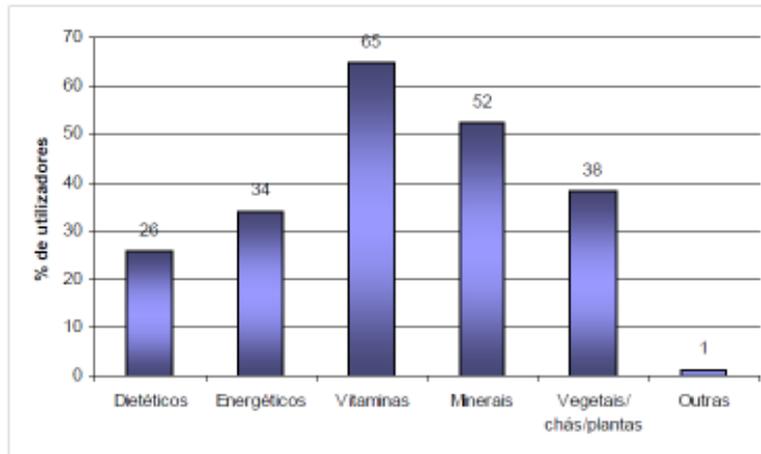


Figura 1.4: Utilização das categorias de suplementos alimentares (Felício, 2006).

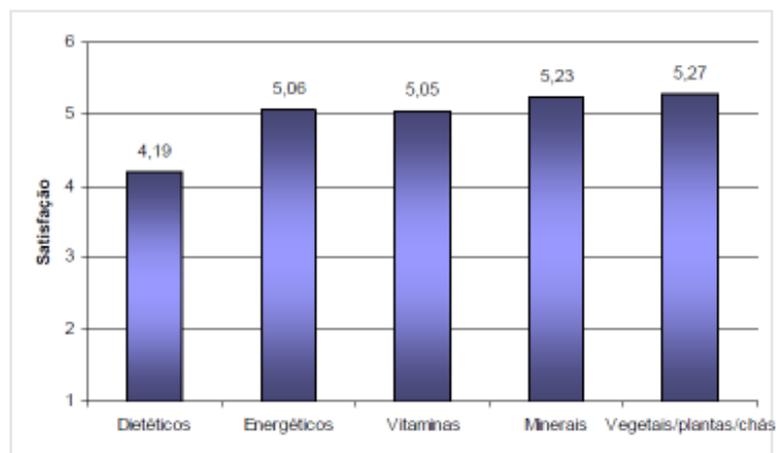


Figura 1.5: Satisfação relativamente às categorias de suplementos alimentares (Felício, 2006).

Num outro estudo mais recente, através de um questionário anónimo, confidencial e voluntário realizado a 367 indivíduos de Lisboa e Vale do Tejo no período de 10 a 20 de Maio de 2008 verificou-se que 48,8% consomem medicamentos e/ou suplementos à base de plantas. Destes 48,8%, cerca de 26% consomem medicamentos à base de plantas medicinais e 20% afirmaram consumir suplementos alimentares à base de plantas; 2,8% já sentiram uma reacção adversa, 93,9% nunca sentiram qualquer reacção adversa e 3,4% não sabe ou não se lembra e em relação à diferença entre medicamentos à base de plantas e suplementos alimentares à base de plantas, 67,6% afirmaram conhecer a diferença e 32,4% não conhecem a diferença. Para a maioria dos consumidores (25,7%), o consumo destes produtos têm por objectivo obter um efeito calmante, sendo preferidos em relação aos outros, por serem de origem natural (Santos et al., 2008).

2 – *Opuntia ficus indica*

Para este trabalho escolheu-se uma planta com propriedades farmacológicas reconhecidas, o cacto *Opuntia ficus indica* que é referido possuir constituintes antioxidantes e anti-inflamatórios na forma de fenólicos, esteróis e glicoproteínas.

Sinónimos: Opuntia, Prickly Pear (Pêra Espinhosa), Nopal, Tuna Blanca, Nochtli, Penca, Tabaibeira, Figueira-da-índia, Tuna e Figueira Tuna.

2.1 - Origem

Esta planta é originária dos solos das altas montanhas vulcânicas do México (Centro e Sul). *Opuntia ficus indica* segundo (Griffith, 2004), foi conhecida no início do século XVI e este acredita que esta espécie acompanhou Colombo no seu primeiro regresso a Lisboa em 1493. Actualmente é economicamente tão importante como o milho e a tequilha. Como a planta origina híbridos facilmente, é difícil determinar a altura do seu aparecimento, mas é sabido que o consumo humano remota pelo menos à 9 mil anos. A popularidade do fruto aumentou desde 1990 até hoje, devido ao aumento do fluxo de imigrantes mexicanos. As áreas com cultivo significativo incluem o México, a Sicília, as costas do Sul da Itália, a Argélia, o Egipto, a Arábia Saudita, o Chile, o Brasil, a África do norte e a Etiópia (Griffith, 2004).

2.2 - Características

Tabela 1.2: Classificação científica da planta *Opuntia ficus indica* (Griffith, 2004).

É uma espécie de cacto, suculento, ramificado, de porte arbustivo, com altura entre 1,5-3 m, ramos clorofilados achatados, de coloração verde-acinzentada, mais compridos (30-60 cm) do que largos (6-15 cm), variando de muito espinhosos até desprovidos de espinhos. As flores são vistosas e de cor amarelo ou laranja brilhantes. A classificação científica desta planta encontra-se na tabela 1.2.

Classificação científica	
Reino:	Plantae
Subreino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Subclasse	Caryophyllidae
Ordem:	Caryophyllales
Família:	Cactaceae
Género:	<i>Opuntia</i>
Subgénero:	<i>Opuntia</i>
Espécie:	<i>O. ficus-indica</i>

Os seus frutos são amarelo-avermelhados, suculentos e com aproximadamente 8 cm de comprimento. A sua reprodução, faz-se por semente ou vegetativamente. Esta planta é cultivada principalmente para colheita do fruto que é designado de figo da Índia, mas também pelos Nopales que são os troncos da planta com a forma de almofadas (figura 1.6) (Griffith, 2004). O cultivo do cacto necessita só que este seja plantado e deixado a crescer sozinho, sem fertilizantes e sem regas. Depois de um ano ou dois, os frutos estão prontos para serem colhidos (Janick et al., 2008).

Os frutos são comidos sem a pele exterior, depois de estarem no frigorífico durante algumas horas, têm um gosto semelhante a uma melancia extremamente doce e suculenta. O interior do fruto contém muitas sementes muito pequenas que são normalmente engolidas, mas que devem ser evitadas por pessoas que tenham problemas gastrointestinais por serem difíceis de digerir (Griffith, 2004).



Figura 1.6: Planta *Opuntia ficus Indica* (<http://luirig.altervista.org/photos-ni/opuntia-ficus-indica.htm>).

Os Nopales (tronco dos cactos) são muito ricos em fibra dietética insolúvel mas especialmente na solúvel. Também apresentam quantidades elevadas de vitaminas (especialmente vitamina A, vitamina C e vitamina K, mas também contém riboflavina e vitamina B6) e minerais (especialmente magnésio, potássio e manganês, mas também ferro e cobre). Os Nopales têm um alto conteúdo de cálcio, mas este não está biologicamente disponível porque está presente na forma de oxalato de cálcio, que é pouco solúvel e é difícil de ser absorvido pela parede intestinal (Mcconn et al., 2004). Na zona Mediterrânea esta planta tem sido considerada uma espécie infestante devido à sua capacidade de se propagar rapidamente para além das zonas onde foi originalmente cultivada. A flor dos frutos pode apresentar três cores distintas: branca, amarela e vermelha, surgindo no início de Maio e os frutos estão maduros de Agosto a Outubro (Griffith, 2004).

2.3 - Composição

O Nopal é uma planta muito rica em água, fibras, carboidratos, minerais e outros compostos de baixo peso molecular, tais como vitaminas, carotenóides, compostos fenólicos, aminoácidos (alguns essenciais ao homem), lípidos, entre outros (Liu, 2004). Desses compostos os mais interessantes são os fitonutrientes antioxidantes e anti-inflamatórios que se encontram na forma de polifenóis (nomeadamente flavonóides), esteróis e glicoproteínas. Os antioxidantes encontrados nas plantas com maior frequência são especialmente os flavonóides e outros compostos fenólicos, sendo também os mais activos, a bioactividade dos compostos fenólicos pode estar relacionada com a sua capacidade de quelar metais, inibir as lipoxigenases e eliminar os radicais livres (Ebadi (b), 2007). Estes compostos possuem: actividade antioxidante, antimutagénica, anti-inflamatória e podem reduzir a aterosclerose e tumores através da irradicação de radicais livres, que se não forem eliminados podem causar danos celulares e provocar consequentemente diabetes, cancro, doenças de coração, artrites e outras desordens (Stintzing et al., 2005; Ramadan et al., 2003)

Neste trabalho identificou-se flavonóides com propriedades muito importantes, a rutina, também conhecida como vitamina P, possui forte actividade de resgate de radicais livres (capacidade antioxidante elevada), inibição de agregação de plaquetas sanguíneas, actividade anti-inflamatória, anticancerígena e inibe a proteína de baixa densidade (LDL) responsável pelo transporte de colesterol e triglicéridos do fígado para os tecidos periféricos (Yang et al., 2008; Yusuke et al., 2000). Contudo, todos os estudos associados á rutina, apenas foram avaliados *in vitro*. A quercetina é dos flavonóides mais abundantes, possuindo actividade antiproliferativa, anti-inflamatória, anti-alérgica e antimicrobiana, que está associado á sua forte capacidade antioxidante. Em estudos realizados por (Yang et al., 2008) relatam que a quercetina possui uma capacidade antioxidante maior que a da rutina, também está associada á diminuição de risco de certas doenças respiratórias como a asma e a bronquite e como muitos outros flavonóides também previne a oxidação da LDL (Yusuke et al., 2000). Como visto para os outros flavonóides mencionados anteriormente, o canferol também é conhecido por possuir uma forte actividade antioxidante, prevenção de

aterosclerose por inibição da LDL e da agregação de plaquetas sanguíneas e inibição da formação de cancro (Yusuke et al., 2000).

2.3.1 - Fibra

O Nopal possui um perfil único com um alto conteúdo de fibras solúveis (pectina e mucilagem) e insolúveis (celulose, hemicelulose e linhina) (figura 1.7). O polissacarídeo insolúvel tem actividade hipoglicémica porque afecta a absorção intestinal da glucose, enquanto a pectina juntamente com os esteróis encontrados no Nopal parece inibir a absorção de gorduras dos alimentos, o que pode ajudar a reduzir o colesterol do tipo LDL e os níveis de triglicéridos no sangue. Estudos efectuados em animais revelaram que a pectina pode também alterar o metabolismo do colesterol no fígado (Gutierrez, 1998; Ayadi et al., 2009).

É alegado que, depois do consumo excessivo de álcool, a mucilagem de polissacarídeos de Nopal acalma o tracto gastrointestinal, elimina o efeito de boca seca e alivia as náuseas ou dores de cabeça devido á re-hidratação, enquanto a fibra dietética absorve as toxinas e acelera a limpeza da corrente sanguínea (Ramulu et al., 2003; Spiller, 1994).

A fibra também é responsável por ajudar a prevenir a obstipação, aliviar sintomas de hemorróidas, reduzir o risco de cancro do cólon e os níveis de colesterol no sangue e é útil como um meio para controlar o peso corporal (Ebadi (c), 2007).

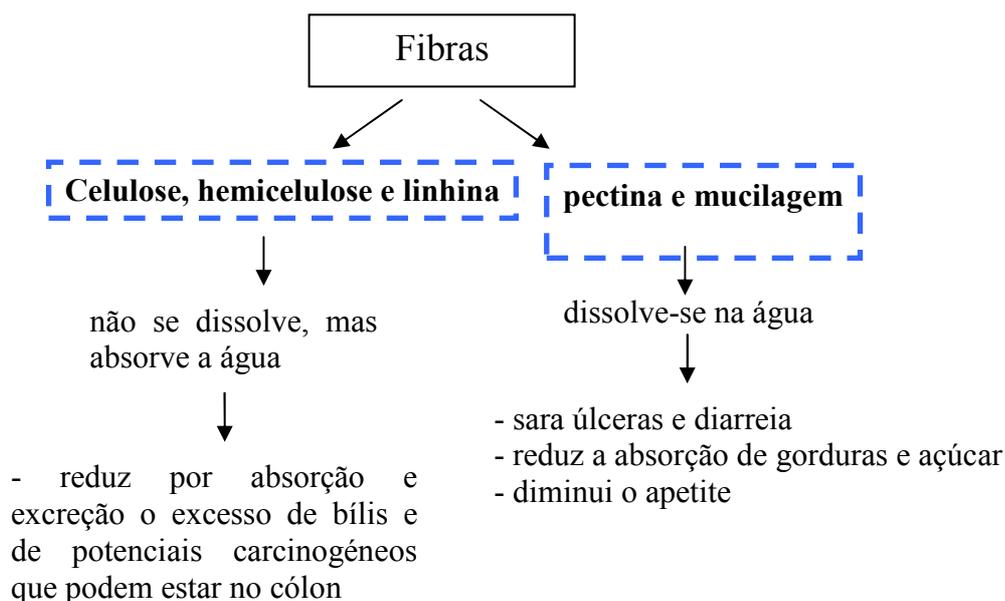


Figura 1.7: Esquema dos tipos de fibra presentes no Nopal.

2.3.2 – Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são o grupo de compostos mais abundantes nas plantas, são conhecidos por serem responsáveis pela cor e sabor das plantas. São compostos biologicamente activos, possuem poder antioxidante, propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias e anti-alérgicas e estão associados à redução do risco de doenças cardiovasculares, cancerígenas e outras doenças degenerativas. Estes compostos caracterizam-se por possuírem um fenol ligado a um anel aromático e por vezes vários grupos -OH (figura 1.8) que são facilmente oxidados (Galati et al., 2003, Liu, 2004).

Os flavonóides são o grupo mais importante dos compostos fenólicos, possuem baixa massa molecular e são encontrados em diversas plantas, frutas, vegetais, bem como alimentos processados como chá e vinho. É-lhes atribuído um vasto leque de efeitos biológicos nomeadamente acção anti-inflamatória, anti-alérgica e anti-cancerígena devido às suas propriedades antioxidantes (Tian et al., 2009).

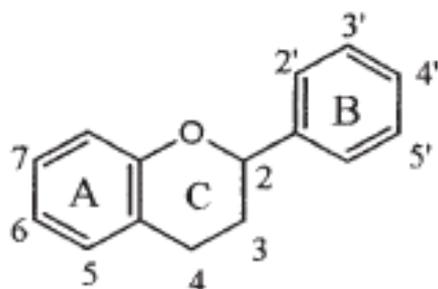


Figura 1.8: Estrutura básica dos flavonóides (Liu, 2004).

Constituem mais de 5 mil compostos e podem ser agrupados em flavonas (ex.: luteolina), flavonóis (ex.: quercetina), flavanonas (ex.: naringina), isoflavonas e antocianinas. Os flavonóis são um grupo abundante e ocorrem geralmente esterificados com glicosídeos e/ou glucurónídeos. Normalmente, o glicosídeo encontra-se na posição 3, podendo também surgir na posição 7 (figura 1.8). A glicose é o glicosídeo mais comum, mas também ocorre a rutinose, galactose, arabinose ou a xilose. Por exemplo, a rutina (quercetina-3-*o* -rutinose) também conhecida por vitamina P, é um dos flavonóides mais bioactivos como referido anteriormente e é descrita como um factor activador para a vitamina C (Ghica, 2005; Bloor, 2001).

2.3.3 – Fitoesteróis

Os fitoesteróis, também conhecidos como esteróis das plantas, são uma importante classe de moléculas orgânicas, que pertence ao grupo de álcoois esteróis. São substâncias encontradas apenas nos vegetais e não são produzidas pelo corpo humano. São similares à estrutura química do colesterol, desempenhando funções semelhantes nos tecidos animais. Por essa razão, os fitoesteróis bloqueiam a absorção de colesterol, competindo com ele e retirando-o da célula. Os principais fitoesteróis encontrados nas plantas são o beta-sitosterol, campesterol e stigmasterol estando a sua fórmula representada na figura 1.9 evidenciando as várias diferenças através de circunferências de várias cores. O grupo hidroxilo no carbono 3 do anel A é polar e o resto da cadeia alifática é não polar (figura 1.9) (Hovenkamp et al., 2008; Patel et al., 2006).

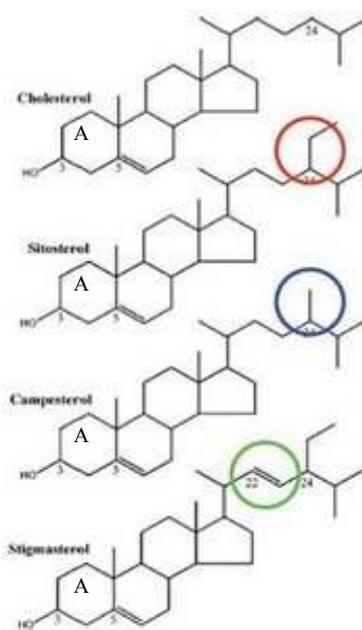


Figura 1.9: Estrutura química dos esteróis (Hovenkamp et al., 2008 adaptado).

Estes compostos ocorrem naturalmente nas plantas, têm um odor característico, são insolúveis em água e solúveis em álcool. Têm aplicações na medicina, cosmética e em aditivos alimentares (Patel et al., 2006).

2.4 – Aplicações e benefícios alegados para a saúde

Industrialmente, o Nopal é utilizado como um espessante para utilização na indústria de preparação de cosméticos, alimentos e suplementos alimentares. Em algumas partes do mundo o Nopal seco também é utilizado como ração para animais (Stintzing et al., 2005). Em vários locais da Europa, mesmo em Portugal, o fruto é usado para fazer licor.

Em geral, o Nopal é referido como capaz de inibir a produção de mediadores inflamatórios o que reduz a inflamação, ser útil no tratamento de diarreia e outras doenças associadas com a infecção bacteriana. Externamente, aplicado na pele em forma de pomada, é usado para sarar doenças reumáticas, sintomas asmáticos, feridas, borbulhas, queimaduras, hemorróidas, mordidas de insecto e escaldões e a sua polpa também é usada em shampoo (Fragoso, 2008).

Vários são os benefícios alegados para o organismo humano, nomeadamente:

1. Redução, para níveis normais, do alto nível de açúcar no sangue: estudos clínicos revelaram que o Nopal tem um efeito hipoglicémico em pacientes diabéticos devido á pectina (fibra solúvel), que contribui muito para a inibição da absorção de glicose (Ennouri et al., 2006; Gonzalez et al., 1995; Fragoso et al., 2008). Contudo autores defendem que o mecanismo de acção das plantas hipoglicémicas ainda não é certo, uma vez que as plantas podem aumentar a quantidade de insulina lançada no sangue ou podem aumentar a utilização periférica da glicose. O lançamento da insulina está estreitamente ligado com o nível de glicose e a hipoglicemia resulta num baixo nível de insulina (Ebadi (d), 2007).

2. É altamente nutritivo porque possui 18 aminoácidos (alguns essenciais), vitaminas A (β -caroteno), E (tocoferol), C (ácido ascórbico e dihidroascórbico) e vitaminas B que atuam como antioxidantes, baixam o teor de colesterol, protegem contra a aterosclerose e impedem as células de se tornarem malignas. Possui diversos minerais (potássio, cálcio, magnésio, ferro, manganês, zinco e cobre) que têm como papel facilitar muitos tipos de metabolismo que são necessários ao funcionamento de todos os sistemas do organismo (Stintzing et al., 2005; Kaliora et al., 2006).

3. Melhoramento da digestão uma vez que a fibra insolúvel absorve a água e juntamente com a solúvel arrasta suavemente os alimentos no aparelho digestivo contribuindo para movimentos intestinais regulares, além disso protege a mucosa intestinal dos sucos gastrointestinais, do consumo de comida muito condimentada, álcool, aspirina e outros produtos farmacêuticos. Ensaios clínicos demonstraram que o Nopal contribui para a cura de úlceras gástricas e reduz significativamente a inflamação gastrointestinal (Sáenz et al., 2004).

Os flavonóides também são responsáveis pelo efeito protector gastrointestinal e vários mecanismos têm sido propostos tais como: aumento do conteúdo de prostaglandina, diminuição da secreção de histamina e inibição do crescimento da bactéria *Helicobacter pylori* (Ebadi (e), 2007).

4. Redução do risco de doença cardiovascular por diferentes mecanismos:

- As fibras comportam-se como resinas que se ligam aos ácidos biliares, causando remoção de ácidos biliares nos intestinos. Em resposta o fígado converte mais colesterol LDL em ácidos biliares diminuindo assim o nível de colesterol no sangue (figura 1.10) (Staprans. et al., 2005).

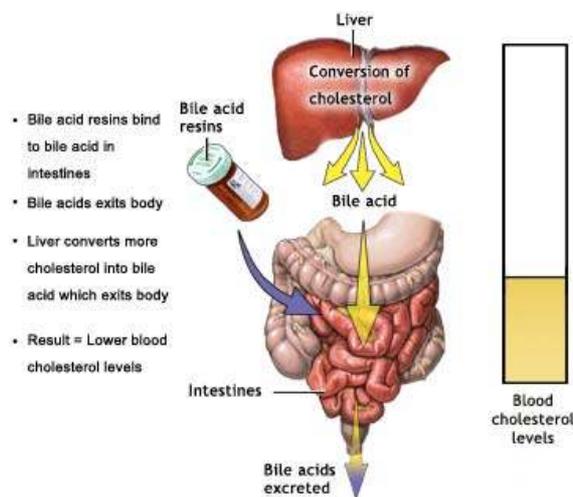


Figura 1.10: Mecanismo representativo da conversão do colesterol em ácidos biliares
(<http://z.about.com/f/p/440/graphics/images/en/19277.jpg>).

- A vitamina B3 (niacina) converte o colesterol LDL em colesterol HDL (proteína de alta densidade) (Ganji et al., 2003).

- Os aminoácidos e a fibra, em conjunto com a vitamina C e a vitamina (β -caroteno) ajudam a remover e a prevenir a formação de placas de ateromas formadas por lípidos e tecido fibroso, que se formam na parede dos vasos sanguíneos originando aterosclerose (Enouri et al., 2005; Wang, 1999; Kaliora et al., 2006) (figura 1.11).

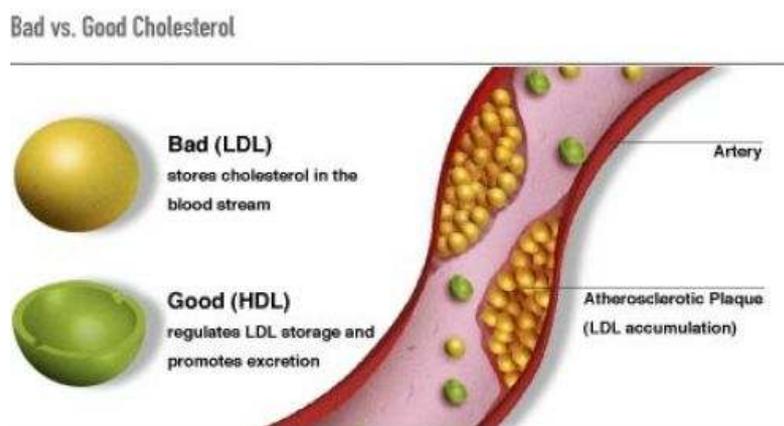


Figura 1.11: Lipoproteínas de baixa (LDL) e alta densidade (HDL) (http://z.hubpages.com/u/276475_f496.jpg).

5. Fortalece o Sistema Urinário através do efeito diurético e anti-inflamatório (Stintzing et al., 2005; Galati et al., 2002).

6. Ajuda a perder peso através do conteúdo de fibras solúveis, incluindo pectinas, gomas e mucilagens que aumentam a viscosidade da comida no tracto intestinal e reduzem a velocidade de absorção de açúcar (Fragoso et al., 2008). Sendo assim o corpo vai utilizar as reservas energéticas contribuindo para a perda de peso.

2.5 – Interações e efeitos secundários

O Nopal quando misturado com água ou outros fluídos incha muito mais que o seu tamanho normal e forma um gel pegajoso e escorregadio, que pode causar uma obstrução ou bloqueio potencialmente perigoso no estômago ou intestinos. Para evitar este risco, recomenda-se que as doses orais de Nopal sejam tomadas com pelo menos 8 copos de água. Quando tomado oralmente e em conjunto, o Nopal pode bloquear a absorção de fármacos, nutrientes dos alimentos e outros suplementos, devido à presença das fibras solúveis, por esse motivo não se deve comer refeições ou tomar fármacos num espaço de 2 horas (Bush et al., 2007).

Os efeitos secundários atribuídos ao Nopal são: inchaço, diarreia, dores de cabeça, dores abdominais, náuseas e dermatite (Fragoso et al., 2008; Shane-McWhorter, 2001).

Teoricamente, uma vez que ainda não foi documentado, o Nopal pode causar hipoglicemia (teor de açúcar no sangue demasiado baixo) em pacientes que estejam a ser tratados com agentes hipoglicémicos bem como aumentar a diurese em pacientes que estejam a ser tratados com agentes diuréticos.

A co-administração com “*chlorpropamide*” levou ao aumento de glucose no sangue e níveis de insulina. Aumento de hipoglicemia com segregadores é ainda suspeito não havendo estudos reportados (Shane-McWhorter, 2001).

3 - Objectivo de trabalho

Tendo em conta a ausência de controlo e de especificações para os suplementos alimentares, é espectável que se encontrem diferenças significativas entre produtos da mesma planta mas comercializados por diferentes produtores.

Este trabalho teve como objectivo comparar diferentes amostras de suplementos alimentares derivados da mesma planta (*Opuntia ficus indica*) á venda no mercado, relacioná-las com as alegações descritas nas embalagens e caracterizar os extractos das amostras com base na composição descrita na literatura para a planta em estudo.

Focou-se fundamentalmente o teor de fenólicos, o perfil cromatográfico de flavonóides, o teor de fibra e o conteúdo relativo em fitoesteróis. Determinou-se ainda a capacidade antioxidante dos extractos com origem nos diferentes produtos. Todos os produtos foram comparados por comprimido e em termos das doses diárias estabelecidas pelo produtor.

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

1 – Escolha das amostras (suplementos alimentares)

Escolheu-se quatro suplementos alimentares á venda no mercado derivados da planta *Opuntia ficus indica*, que, como referido anteriormente, possui propriedades farmacológicas reconhecidas, nomeadamente constituintes antioxidantes e anti-inflamatórios na forma de compostos fenólicos, esteróis e glicoproteínas. A escolha desta planta prendeu-se com o facto de ser espontânea no Alentejo e com potencial de aproveitamento.

Amostras (ver características no anexo 1-A):

- Nopal Cactus Full Spectrum (N.C.); Planetary Herbals; Soquel; Califórnia (E.U.A)
- Diapal, Bioceutica; Newbury; UK
- Nopaldia, Farmodietética, Cacém; Portugal
- Nopasvelt, dietactiv; Laboratórios Carrare; França

2 – Preparação dos extractos das amostras

Preparou-se os extractos por dois métodos como indicado na Farmacopeia Americana (561 Articles of Botanical Origin). O primeiro método consistiu numa extracção a quente com água em refluxo e o segundo numa extracção a frio com etanol. Os extractos aquosos foram também hidrolisados com solução de ácido hidrocloreídrico (HCl).

2.1 - Extracção a quente com H₂O

Para cada amostra:

- Esmagou-se 3 comprimidos num almofariz.
- Colocou-se 1,5 g de comprimido em pó num erlenmeyer de 50 ml e adicionou-se 30 ml de água destilada.
- Tapou-se o erlenmeyer com parafilm.
- Agitou-se 2 a 3 minutos no ultra sons (Branson 1200, U.S.A.) e deixou-se em repouso durante 1 hora.

- Colocou-se a amostra num balão de fundo redondo e ferveu-se a amostra em banho de água, em refluxo durante aproximadamente 1 hora. Foi usada a montagem representada na figura 2.12 constituída por uma coluna de refrigeração e uma placa de aquecimento (Heidolph MR 2002, Alemanha).



Figura 2.12: Montagem de refluxo usada na extracção.

- Centrifugou-se (VWR Galaxy 14 D, Bélgica) durante 8 minutos a 13000 r.p.m..
- Filtrou-se o sobrenadante por filtro 0,45 μm PVDF (Whatman, U.S.A.). Armazenou-se no frigorífico para posterior análise.

2.2 - Hidrólise

- A partir de 3 ml da amostra extraída em 2.1 adicionou-se 1 ml de HCl (Riedel-de Haën, Germany, 37%) e 4 ml de Metanol (LAB-SCAN, Poland, 99,9%).
- Agitou-se e procedeu-se á reacção de hidrólise na montagem da figura 2.12 a uma temperatura de 60°C durante 1 hora e sob refluxo.
- De seguida retirou-se a amostra e centrifugou-se durante 10 minutos a 13000 r.p.m..
- Retirou-se o sobrenadante e filtrou-se usando um filtro 0,45 μm PVDF (Whatman, U.S.A.). Armazenou-se no frigorífico a 4°C para posterior análise.

2.3 - Extracção a frio com etanol

Para cada amostra:

- Esmagou-se 3 comprimidos com a ajuda de um almofariz.
- Pesou-se rigorosamente aproximadamente 1,5 g de comprimido em pó para um erlenmeyer de 50 ml e adicionou-se 30 ml de etanol (Panreac, Espanha, 99,5%).

- Tapou-se o erlenmeyer com parafilm e agitou-se no aparelho ultra-sons durante aproximadamente 2 horas (figura 2.13).



Figura 2.13: Agitação das amostras no aparelho ultra-sons.

- Deixou-se as amostras em repouso durante aproximadamente 23 horas (figura 2.14).
- Filtrou-se a amostra por gravidade usando um filtro de papel de diâmetro 70 mm (Machery-Nagel MN713; Germany).
- Evaporou-se o filtrado com uma corrente de azoto comprimido.
- Adicionou-se ao resíduo, 3 ml de etanol e 3 ml de água.
- Voltou-se a filtrar através de um filtro 0,45 μm PVDF e armazenou-se no frigorífico a 4°C para posterior análise.



Figura 2.14: Extractos etanólicos em repouso.

3 – Determinação dos perfis e teor relativo de compostos fenólicos, flavonóides glicosilados e não glicosilados

Para este fim utilizou-se a técnica de cromatografia líquida de alta resolução com detecção por vector de díodos (HPLC-DAD), o equipamento consiste fundamentalmente em quatro partes distintas, sendo elas: o amostrador (*autosampler*), a bomba, a coluna (contendo a fase estacionária) e o detector (figura 2.15).

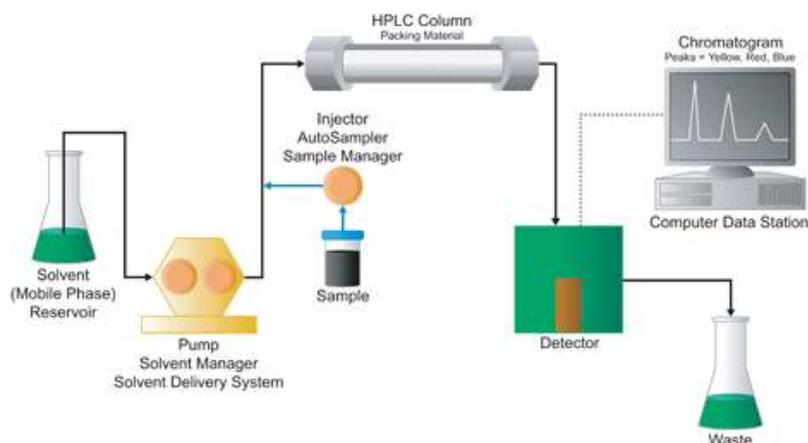


Figura 2.15: Esquema de funcionamento do HPLC

(http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/primer_e_lcsystem.jpg).

O solvente (fase móvel) é bombeado através da fase estacionária com pressão. Os componentes da amostra injectada na coluna são separados com base nas interações que terão com a fase estacionária. Depois da separação, estes passam pelo detector que envia um sinal para o sistema de aquisição de dados que desenhará o cromatograma.

3.1 Perfis cromatográficos

Optou-se pelo método otimizado por (Bravo et al., 2006) e utilizando o mesmo equipamento Surveyor (Thermo Finnigan—Surveyor, San Jose, CA, USA). As análises foram realizadas a 35°C com uma coluna LiChrospher C18 (Merck) e com dimensões 5µm, 250mm×4mm i.d.. Injectou-se 20 µL de amostra e utilizou-se uma taxa de fluxo de 700 µL/ min. A fase móvel foi constituída por uma mistura de dois eluentes: A (ácido fosfórico a 0.1%) e B (ácido fosfórico-acetonitrilo-água 5:400:595 v/v/v) e com o seguinte gradiente de mistura (figura 2.16):

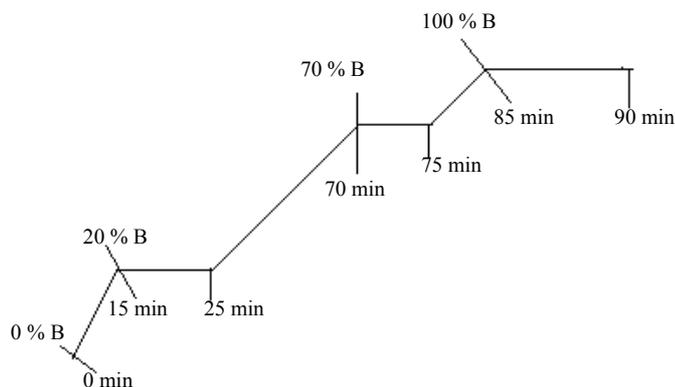


Figura 2.16: Gradiente de mistura dos dois eluentes da fase móvel (método longo de HPLC).

3.2 Determinação do teor relativo de compostos fenólicos por HPLC

Com base no método descrito na Farmacopeia Europeia (monographs 01/2005:1828), as análises em HPLC para avaliação do teor de compostos fenólicos totais e identificação de alguns compostos, foram executadas num sistema (Merck Hitachi DAD, L-2455, LaChrom Elite) e controlado através do software EZ Chrom Elite. Foi usada uma coluna (Phenomenex/ Gemini-NX, U.S.A.) de fase reversa C18, com um tamanho de partícula de 5 μm e de poro 110 \AA , estável a pH entre 1 e 12 e com dimensões de 150 mm x 4,6 mm.

Usou-se um gradiente de solventes sendo a fase móvel A uma solução de ácido fosfórico a 0,3 g/L com pH=2,6 e a fase móvel B metanol (Lab-SCAN, Poland, 99,9%).

O aparelho operou com um fluxo de 0,7 ml/ min., com volume de injeção de 10 μL , com o detector de vector de diodos ajustado para aquisição de dados entre 200 a 400 nm e durante 30 minutos para cada análise. O gradiente de eluição de fases está descrito na figura 2.17.

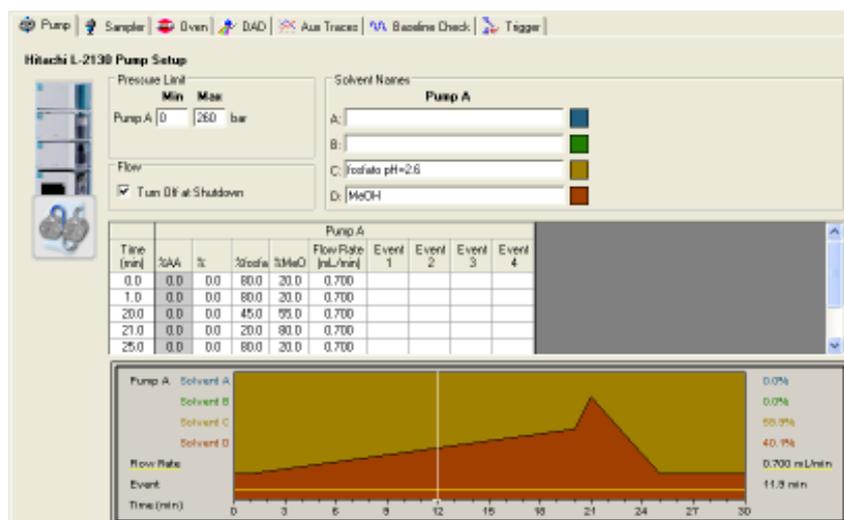


Figura 2.17: Programa do gradiente de eluição do método curto de HPLC-DAD.

Determinou-se:

A - Área total do cromatograma obtido a 280 nm, que se correlaciona com o teor de compostos fenólicos totais.

B – Área dos picos detectados a 370 nm na zona do cromatograma compreendida entre a quercetina ($tr \approx 25$ min) e a isorhamnetina ($tr \approx 26,5$ min), que se correlaciona com o teor de flavonóides não glicosilados

C – Área dos picos detectados a 370 nm e eluídos antes da quercetina ($tr \approx 25$ min) que se correlaciona com o teor de flavonóides glicosilados.

Para identificação da rutina ($tr \approx 19,85$ min), quercetina ($tr \approx 25$ min) e canferol ($tr \approx 25,85$ min.) com base nas áreas e tempos de retenção dos picos detectados a 370 nm, usou-se as soluções a seguir descritas:

Solução de quercetina (Sigma Aldrich, Germany, 95%) com a concentração de 204 ppm em metanol.

Solução de isorhamnetina (Sigma, Extrasynthese, $\geq 99\%$) com a concentração de 160 ppm em metanol.

Solução de rutina (Sigma, Extrasynthese) com a concentração de 1000 ppm em etanol.

Solução de canferol (Sigma, Extrasynthese) com a concentração de 1200 ppm em etanol.

3.3 - Determinação do teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O teor de compostos fenólicos foi determinado utilizando uma versão modificada do método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, descrito por (Singleton *et al.*, 1965). Este método baseia-se na capacidade dos compostos fenólicos presentes na amostra reduzirem o reagente de Folin-Ciocalteu (RFC) em condições básicas, durante 30 min a 40 °C. O RFC é uma solução de iões complexos poliméricos formados a partir de heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente oxida os fenolatos, reduzindo os ácidos a um complexo azul (Halliwell, 2004).

Procedimento experimental:

- Em tubos de Falcon de 15 ml, um para cada amostra, colocou-se 1580 µL de água destilada.
- Adicionou-se de seguida 20 µL de amostra a analisar. No caso dos ensaios em branco, adicionou-se 20 µL do solvente da amostra.
- Adicionou-se 100 µL de RFC (Merck, Germany) e agitou-se bem no aparelho vortex.
- Aguardou-se entre 30 segundos a 8 minutos.
- Adicionou-se 300 µL da solução saturada de carbonato de sódio (ver anexo 2-A) e agitou-se as soluções no vortex.
- Colocou-se os balões numa estufa (Binder, Germany) a 40 °C durante 30 minutos.

- Mediu-se a absorvância de cada amostra no espectrofotómetro (Termo Spectronic, Model Genesys 10 UV, U.S.A) a 765 nm contra o branco, utilizando cuvets descartáveis.

- Determinou-se a concentração em fenólicos através da equação determinada a partir da recta de calibração realizada (anexo 2-B). Para a recta de calibração utilizou-se soluções aquosas de ácido gálico com as seguintes concentrações: 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 500; 750 e 1000 mg/L. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por litro de extracto analisado (Serra et al., 2008; Tarozzi et al.).

4 – Avaliação da actividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante dos extractos foi efectuada por três métodos distintos como a seguir se descreve.

4.1 – Capacidade de resgate do radical peroxilo (ORAC)

O método de ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) mede a capacidade antioxidante de resgate do radical peroxilo produzido pelo cloreto de α, α – azodiisobutiramidina 2,2-azobis(2-amidinopropano) (AAPH) a 37 °C. Recorrendo a um fluoróforo que se oxida na presença do AAPH (figura 2.18) e acompanhando a cinética da reacção mede-se a redução da fluorescência da solução e monitoriza-se a capacidade protectora dos antioxidantes testados (Ou et al., 2001).

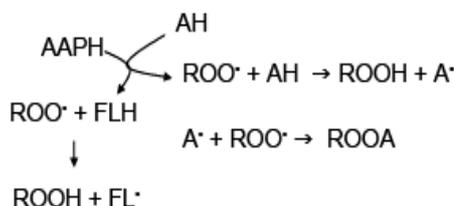


Figura 2.18: Esquema de reacções elementares ocorridas no ensaio de ORAC. O AAPH, por termodegradação, produz os radicais peroxilo que reagem com a Fluoresceína (FLH). Na presença de um antioxidante, AH, este resgata o radical, dando origem a compostos não reactivos, ROOH e ROOA (Matias, 2008).

Optou-se por calcular a actividade antioxidante através do método optimizado e descrito (Ou et al., 2001; Huang et al., 2002), em que se calcula a actividade antioxidante a partir da perda de fluorescência da fluoresceína (fluoróforo utilizado) ao longo de 30 minutos relativamente a um antioxidante padrão - Trolox (análogo hidrofílico da vitamina E) através do fluorímetro (FL x 800, Biotek Instruments, U.S.A.). O resultado final é expresso em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox ($\mu\text{M CAET}$).

Procedimento experimental:

Preparou-se as seguintes soluções:

Solução de AAPH:

- Dissolveu-se 0,414 g de AAPH (Fluka, Germany, 98%) em 10 ml de solução salina de fosfato (PBS) (anexo 4-C). Esta solução de AAPH foi sempre preparada no dia de ensaio e armazenada no frio (em gelo ou a 4°C).

Solução de Fluoresceína (FL):

- Preparou-se uma solução stock de Fluoresceína dissódica (TCI Europe, Bélgica) a 4×10^{-3} mM, (1:20000) em PBS (75 mM e pH=7,4) e armazenou-se a 5°C.
- No dia do ensaio, diluiu-se a solução stock de 1:1000 em PBS (75mM e pH=7,4). Ao longo do ensaio esta solução permaneceu num banho a 37°C.

Solução de Trolox:

- Preparou-se soluções de Trolox (Sigma, Germany) em PBS (75mM, pH=7,4) com as seguintes concentrações (5, 10, 20, 40 e 50) (μM) para traçar a recta de calibração (anexo 2-C).

Numa placa de 96 poços adicionou-se as seguintes quantidades das soluções descritas anteriormente:

FL – 150 μL

PBS (corresponde ao branco) ou amostra – 25 μL

AAPH – 25 μL

Analisou-se a fluorescência no fluorímetro com o c.d.o. de emissão = 538 nm e de excitação = 490 nm e procedeu-se à recolha dos dados através do software Gene5

(Biotek). O resultado final é expresso em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET).

4.2 – Capacidade de resgate do radical hidroxilo (HORAC)

O ensaio HORAC (*Hydroxyl Radical Averting Capacity*) é um método directo baseado na oxidação da fluoresceína por radicais hidroxilos pela via clássica de transferência do átomo de hidrogénio (figura 2.19). Os radicais livres são gerados pelo peróxido de hidrogénio que provocam a fluorescência da fluoresceína ao longo do tempo e os antioxidantes presentes nas amostras bloqueiam a oxidação da fluoresceína. A área abaixo da curva de decadência da fluorescência é usada para quantificar a actividade antioxidante total do grupo hidroxilo numa amostra em comparação com a curva padrão (ácido cafeico).

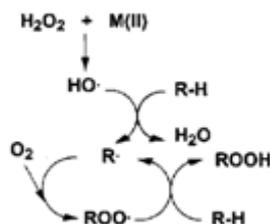


Figura 2.19: Esquema da reacção do peróxido de hidrogénio (H_2O_2) em presença de iões metálicos (M). A reacção gera o radical hidroxilo $\text{HO}\cdot$. Este radical é bastante reactivo e ao reagir com espécies antioxidantes (R-H) capta um hidrogénio originando uma espécie com um electrão desemparelhado ($\text{R}\cdot$). Por sua vez esta espécie reage com o O_2 molecular formando o radical peróxido $\text{ROO}\cdot$ (Matias, 2008).

O método utilizado foi desenvolvido de acordo com trabalhos prévios (Ou et al., 2002), utilizando como fluoróforo a fluoresceína, que na sua forma oxidada se torna incolor. Tal como no método ORAC, é possível acompanhar a cinética da reacção medindo a redução da fluorescência da solução e dessa forma, quantificar a capacidade protectora dos antioxidantes testados.

Por optimização do método (Matias, 2008), seleccionou-se, o ácido cafeico como composto fenólico padrão, pelo que, em cada ensaio, é necessário efectuar uma recta de calibração com soluções deste composto. Os resultados finais de HORAC são calculados através da regressão linear entre os valores de concentração de ácido

caféico e a área abaixo da curva de decaimento da fluoresceína, sendo expressos em equivalentes de ácido caféico (CAEAC).

Procedimento experimental:

Preparou-se as seguintes soluções:

Solução de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) (Sigma, Germany, 30%):

- 1,1 M em PBS a 75 mM (anexo 4-C).

Solução de fluoreto de cobalto (CoF_2) e ácido picolínico:

- Dissolveu-se 15,7 mg de fluoreto de cobalto (II) tetra-hidratado (CoF_2) (Sigma, U.S.A., 99,99%) e 20 mg de ácido picolínico (Sigma, Germany, 99%) em 10 mL de água destilada (para facilitar a dissolução, levou-se ao ultra-sons).

Solução de ácido caféico:

- Preparou-se soluções de ácido caféico (Sigma, Germany, 99%) em PBS nas concentrações de 100, 200, 300, 400 e 600 μ M para posteriormente traçar a recta de calibração (anexo 2-D).

Numa placa de 96 poços transparente, adicionou-se as seguintes quantidades das soluções descritas anteriormente:

FL - 180 μ L

PBS, ácido caféico ou amostra – 10 μ L

- Incubou-se a placa a 37°C dentro do fluorímetro durante 10 min.
- Adicionou-se 5 μ L de H_2O_2 a cada um dos poços
- Adicionou-se 5 μ L de CoF_2 a cada um dos poços (através do injector do fluorímetro).
- Colocou-se a placa no fluorímetro e mediu-se a fluorescência, procedendo-se à análise dos dados através do software Gene5 e usando os mesmos c.d.o. referidos no ensio ORAC.

4.3 – Ensaio de bioactividade dos extractos (determinação da capacidade antioxidante intracelular)

Antes de proceder à avaliação da capacidade antioxidante intracelular, verificou-se a toxicidade de cada extracto em células Caco-2, de modo a estabelecer as concentrações de extracto a aplicar.

A análise da viabilidade celular realizou-se por meio de um indicador bioquímico de toxicidade, a redução do MTT (Sigma, U.S.A.) e aplicou-se o método colorimétrico optimizado e descrito por (Frade et al., 2007), utilizando as células de adenocarcinoma do cólon Caco-2. O modelo celular de avaliação da citotoxicidade Caco-2 é bastante utilizado pois a camada de células diferenciadas e cultivadas *in vitro* mimetiza o epitélio intestinal (Pinto et al., 1983, Feliciano et al., 2009).

O princípio do método baseia-se em pré-incubar as células com diferentes diluições dos extractos em simultâneo com diacetato de diclorofluoresceína (DCF-DA), a DCF-DA permeia a membrana celular permanecendo no interior das células (por acção de esterases) na sua forma mais polar (DCF), os antioxidantes adicionados podem permanecer ligados à membrana celular ou por difusão membranar passar para o interior da célula, de seguida, as células são tratadas com um dos dois indutores de stress: o peróxido de ter-*t* butil hidróxido (*t*-BHP) ou o peróxido de hidrogénio (H_2O_2), que se decompõe em espécies reactivas de oxigénio (ROS), nomeadamente os radicais $ROO\bullet$ e $OH\bullet$ respectivamente que se difundem para o meio intracelular, estas espécies reactivas podem então ser resgatadas ainda no exterior da célula pelos compostos antioxidantes ligados às membranas celulares ou no interior das células antes que estas espécies oxidem a DCF (figura 2.20) (Yokomizo et al., 2006).

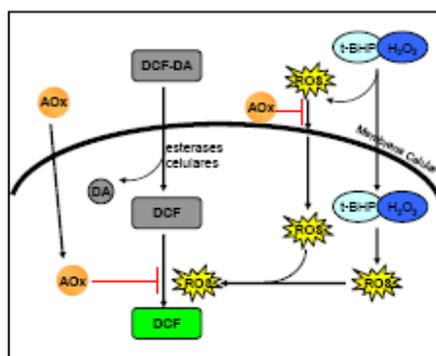


Figura 2.20: Mecanismo do método proposto para a quantificação da capacidade antioxidante intracelular (Wolfe et al., 2007).

- Depois do tempo de incubação, adicionou-se 150 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido LAB-SCAN, Ireland, 99,5%) em cada poço para parar a reacção e para dissolver os cristais de “formazan” formados.
- Agitaram-se as placas num agitador de placas durante 2 minutos.
- Leu-se a absorvância no espectrofotómetro (Molecular Device Spectramax 340 Microplate) a dois comprimentos de onda: 570 nm que corresponde ao comprimento de onda máximo do produto “formazan” (cor púrpura) (figura 2.22) e 690 nm que corresponde a absorvância da placa.

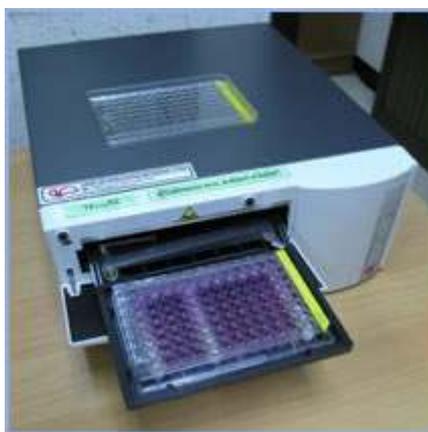


Figura 2.22: Espectrofotómetro lendo placa do ensaio MTT (<http://www.greatlifeintl.com/images/invitromachine.jpg>).

- Calculou-se a percentagem de viabilidade celular através da equação 2.1:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Média da absorvância da amostra}}{\text{Média da absorvância do controlo}} \times 100 \quad \text{Equação 2.1}$$

Sendo, a média da absorvância (amostra ou controlo) igual a absorvância a 570 nm (absorvância do “formazan” mais a placa) menos a absorvância a 690 nm (absorvância da placa).

4.3.2 – Avaliação da capacidade antioxidante intracelular

- Começou-se por inocular em placas de 96 poços 1×10^4 células/poço em meio RPMI 1640 + 10% de FBS e L-glutamina.
- Incubou-se as placas a 37 °C numa atmosfera com 5% de CO₂.

- Depois de atingirem a confluência, preparou-se várias diluições dos extractos com meio fresco, adicionaram-se às células e incubou-se durante 24 horas.
- Removeu-se o meio, lavou-se as células com PBS (2 vezes) e adicionou-se DCF-DA (Fluka, Germany, 95%) diluído em PBS com uma concentração de 0,1 mM.
- Incubou-se as células durante 30 minutos.
- Removeu-se o meio, lavou-se as células com PBS e adicionou-se o indutor de stress, peróxido de tert-butil (t-BPH) a 2 mM (Sigma, Germany) ou peróxido de hidrogénio (H₂O₂) a 28 mM (Sigma, Germany, 30%).
- Fez-se imediatamente a leitura da placa com o fluorímetro (Biotek Instruments, FL x 800, U.S.A.) (F₀).
- Incubou-se novamente as placas durante 45 minutos.
- Fez-se nova leitura da placa (F₄₅ min.).

A quantificação das ROS foi obtida através da medição da fluorescência ($\lambda_{\text{emissão}} = 538 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{excitação}} = 490 \text{ nm}$) ao tempo zero (F₀) e após 45 minutos de indução de stress oxidativo (F₄₅ min.) e calculou-se através da equação 2.2:

$$F_{\text{rel}} = (F_{45} - F_0) / F_0 \quad \text{Equação 2.2}$$

Os resultados são expressos em termos de % de ROS relativamente ao controlo (células sujeitas ao indutor de stress oxidativo mas sem a acção dos extractos) e é calculado através da equação 2.3:

$$\% \text{ de ROS} = (F_{\text{rel amostra}} / F_{\text{rel controlo}}) \times 100 \quad \text{Equação 2.3}$$

5 - Determinação do teor em fibra

As fibras alimentares não fornecem nutrientes para o organismo mas são um elemento essencial na dieta. Elas ajudam a prevenir doenças graves e a perder peso. Dietas com quantidades suficientes de fibras regularizam o funcionamento do intestino e evitam obstipação e outros problemas associados, contudo o consumo exagerado de fibras pode dificultar a absorção de alguns minerais (Ramulu et al., 2003).

Para a determinação da percentagem de fibras nas amostras, optou-se por um método descrito na Farmacopeia Americana (561 Articles of Botanical Origin, 2003) que tem como princípio base, a fibra corresponder á perda do resíduo durante a queima da amostra a elevadas temperaturas e após ter sido sujeita a uma digestão sequencial ácida e básica em condições específicas. Os compostos retirados são predominantemente proteínas, açúcares, amido, lipídios e porções de carboidratos estruturais como a linhina. Esses resíduos (contendo celulose, hemicelulose, linhina, cinza e tanino) são substâncias indigeríveis, muitas vezes designadas de carboidratos estruturais e são caracterizados por baixo ou nenhum valor nutritivo (Ramulu et al., 2003).

Procedimento experimental:

- Moeu-se os comprimidos de cada amostra com a ajuda de um almofariz.
- Tomou-se cerca de 2 g de cada amostra e extraiu-se com 200 ml de éter dimetílico (Sigma-Aldrich, France, 99,5%) usando o aparelho de Soxhlet durante aproximadamente 1 hora e conforme ilustra a montagem da figura 2.23. Esta etapa teve como objectivo extrair as gorduras presentes na amostra.



Figura 2.23: Montagem usada no ensaio da fibra.

- Adicionou-se á amostra, livre de solvente, 200 ml de solução de ácido sulfúrico a 1,27% a ferver.
- Voltou-se a ferver essa mistura durante 30 minutos sob refluxo na mesma montagem.

- Filtrou-se a mistura através de um filtro resistente ao ácido (Hardened Ashless Whatman 541, England) com 9 cm de diâmetro.
- Lavou-se o resíduo com água destilada a ferver até o efluente “lavado” não ter ácido ($\text{pH} \geq 7$).
- Deixou-se secar o resíduo e de seguida voltou-se a colocar o resíduo no balão de fundo redondo com 200 ml de solução de hidróxido de sódio (Panreac, Espanha, 98%) a 0,313N a ferver.
- Ferveu-se novamente essa mistura na mesma montagem durante 30 minutos.
- Filtrou-se através de um filtro pesado anteriormente.
- Lavou-se o resíduo com água a ferver até a última lavagem apresentar $\text{pH}=7$.
- Secou-se na estufa (WTB Binder, Germany) a 85°C até peso constante.
- Incinerou-se na mufla (Heraeus Instruments; Germany), o resíduo seco dentro de um cadinho pesado anteriormente durante aproximadamente 5 horas e á temperatura de 500°C .
- Refrescou-se o cadinho com as cinzas no excicador e pesou-se.
- Calculou-se o peso de fibra através da equação 2.4:

$$\text{Peso da fibra} = \text{peso obtido depois de seco a } 85^{\circ}\text{C} - \text{peso das cinzas} \quad \text{Equação 2.4}$$

\downarrow
 subtrair peso do filtro

\downarrow
 subtrair peso do cadinho

6 - Identificação e quantificação dos fitoesteróis

Tendo em conta, os reagentes e os aparelhos disponíveis, optou-se por criar um método com base em várias publicações e com análise por cromatografia gasosa (GC).

A técnica de GC é um método simples, sensível, muito eficaz para separar componentes de misturas, sendo uma das ferramentas mais importantes em química, também é útil na análise de contaminantes do ar, álcool no sangue, óleos essenciais e produtos alimentícios. Para este ensaio optou-se por uma modificação do método (Verleyen et al.; 2001), no qual o sistema de injeção da amostra foi “on-column”, em que a amostra líquida é injectada na sua totalidade, sem aquecimento, directamente na coluna com uma seringa, deixa-se então que o solvente se evapore para produzir a concentração dos componentes da amostra. O fluxo de gás passa pela coluna através

da qual os componentes da amostra se deslocam a velocidades diferentes, dependendo do seu grau de interação com a coluna, componentes com maior interação são retidos por mais tempo e à medida que vão eluindo da coluna, são quantificados por um detector de ionização de chama (FID ou DIC) (figura 2.24). Este detector consiste numa chama de hidrogénio (H_2) e ar, que mede a corrente eléctrica gerada por electrões das partículas da amostra (Barwick, 1999).

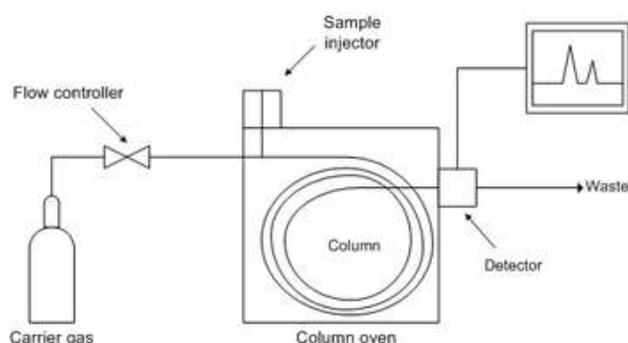


Figura 2.24: Mecanismo de funcionamento de aparelho de GC (http://en.wikipedia.org/wiki/File:Gas_chromatograph.png).

O método para determinação dos fitoesteróis consiste na extracção prévia dos lípidos contidos nas amostras, selecção do material insaponificável, derivatização e análise por GC, como a seguir se descreve.

Procedimento experimental:

1 - Extracção dos lípidos totais (Ramadan et al., 2003):

- Pesou-se cerca de 2 g de amostra.
- Adicionou-se 100 μ L de solução do padrão interno da extracção, colesterol (Sigma, U.S.A., 95%) a 3mg/ml diluído em etanol (Panreac, Espanha, 98%).
- Adicionou-se 30 mL de uma mistura de clorofórmio (Lab-SCAN, Poland, 99,5%) e metanol (Lab-SCAN, Poland, 99,9%) com a proporção de 2:1 (v/v) e sonicou-se durante 1 hora a 35°C.
- Filtrou-se para um balão de fundo redondo pesado anteriormente.
- Evaporou-se o filtrado à secura com um banho a 40°C e sob uma ligeira corrente de nitrogénio.
- Pesou-se o resíduo.

2 – Saponificação (Toivo et al., 2001):

- Adicionou-se 5 ml de uma solução de hidróxido de potássio (KOH) (Panreac, Espanha, 85%) a 6% (m/v) diluído em etanol (Panreac, Espanha, 98%).
- Colocou-se a mistura sob refluxo durante 60 minutos (montagem da figura 2.23).
- Com uma ampola de decantação separou-se a fase saponificável da insaponificável com ciclohexano (Riedel-de Haën, Germany, 99,5%) + água destilada (20 mL + 12 mL) (figura 2.25).
- Evaporou-se à secura a fase insaponificável na qual estão contidos os esteróis com um banho a 40°C e sob uma ligeira corrente de nitrogénio.



Figura 2.25: Extração da fase insaponificável com ampola de decantação.

3 - Derivatização das amostras (Verleyen e tal., 2001):

- Ressuspendeu-se o resíduo em 200 μ L de clorofórmio e agitou-se no vortex.
- Preparou-se a mistura de padrões adicionando 50 μ L de cada solução dos seguintes padrões diluídos em clorofórmio: brassicasterol (1111 ppm, Sigma-Aldrich), stigmasterol (1089 ppm, Sigma-Aldrich), colesterol (3075 ppm, Sigma-Aldrich), campesterol (1250 ppm, Sigma-Aldrich) e beta-sitosterol (1000 ppm, Sigma-Aldrich).
- Colocou-se as amostras e a mistura de padrões em tubos de digestor, adicionou-se a cada tubo: 100 μ L de N,O-bis-(trimethylsilyl)trifluoracetamide (BSTFA) contendo 1% de trimethylchlorosilane (TMCS) (Fluka, Suíça) que actua como agente derivatizante e 50 μ L de piridina (Sigma, U.S.A., 99%) que actua como catalisador da reacção.
- Levou-se os tubos ao digestor (AccuBlock, Labnet International) à temperatura de 70°C durante 60 minutos para completa sililação.

4 - Adição do padrão interno e diluições:

- Depois de retirar os tubos do digestor adicionou-se a cada tubo 5 μ L de solução de padrão interno HDS (heptadecanyl stearate) com uma concentração de aproximadamente 20 mg/ml de clorofórmio de modo a determinar os factores de resposta dos compostos de interesse em relação a este padrão conforme reportado por (Verleyen et al., 2001).
- Diluiu-se as várias amostras e a mistura de padrões com clorofórmio até perfazer o volume de 1 ml.
- Agitou-se os tubos, transferiu-se os conteúdos para vials de GC e procedeu-se á análise.

5 - Análise cromatográfica:

Para análise dos fitoesteróis utilizou-se o equipamento de GC (Chrompack CP 9001 GAS Chromatography) e trabalhou-se com uma coluna (figura 2.26) Zebron ZB-5MS (Phenomenex, U.S.A.) com 15 m de comprimento, 0,25 μ m de espessura de filme e 0,25 mm de diâmetro interno. Utilizou-se como gás de transporte o hélio á pressão de 150 kPa, um detector FID, injeção on-column á temperatura de 60°C e volume de amostra 1 μ L.

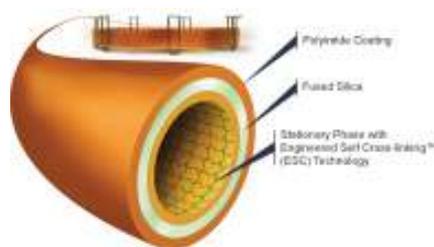


Figura 2.26: Representação da coluna utilizada no ensaio dos fitoesteróis
(<http://www.phenomenex.com/products/brands/viewzb.aspx?id=8003>).

Utilizou-se durante a análise o programa de temperaturas apresentado na figura 2.27. O equipamento foi controlado e os resultados analisados através do programa Borwin Chromatography Software.

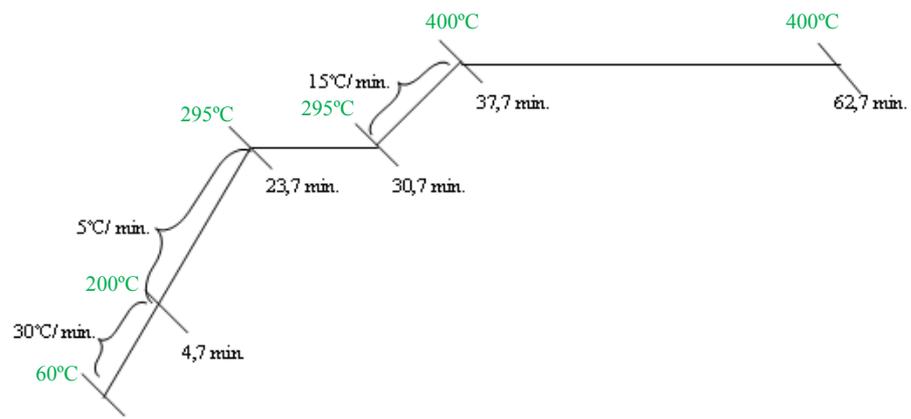


Figura 2.27: Esquema representativo do programa de temperaturas utilizado no ensaio dos fitoesteróis (Verleyen, 2001).

CAPÍTULO 3:
RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os comprimidos das amostras analisadas possuíam diferentes massas como mencionado na tabela 3.3. Como se pode verificar, a massa de cada comprimido não está relacionada com o conteúdo em planta nem este com a toma diária recomendada pelo fabricante e as diferentes amostras possuem diferentes excipientes como indicado na tabela do anexo 1-A.

Os resultados apresentados para os diversos testes (excepto em testes celulares e na determinação dos perfis de compostos fenólicos) correspondem ao peso médio de cada comprimido de amostra (tabela 3.3). Foram testados extractos aquosos, etanólicos e hidrolisados dos extractos aquosos, para simular vários ambientes que ocorrem durante a digestão. Os extractos aquosos devem permitir concentrar preferencialmente os compostos mais polares, nomeadamente ácidos e compostos fenólicos glicosilados; os extractos etanólicos permitem concentrar compostos mais lipofílicos, nomeadamente agliconas de flavonóides. Com a hidrólise química pretendeu-se simular o metabolismo pela microflora intestinal que leva a desglicosilação.

Tabela 3.3: Características de cada amostra.

Amostra	massa do comprimido (g)	toma recomendada (comprimidos)	teor de Nopal declarado por comprimido
Nopal cactus	1,42	1-2	1 grama (folha)
Diapal	0,50	6	Extracto seco equivalente a 500 mg
Nopaldia	0,50	6	Extracto equivalente a 500 mg
Nopasvelt	0,65	6	500 mg em pó

1 – Perfis cromatográficos

Para a determinação dos perfis usou-se o método mais longo descrito em 3.1 da secção dos materiais e métodos, uma vez que este método está optimizado para melhor separação dos picos de modo a facilitar a sua identificação. Com este método, os compostos mais hidrofóbicos, nomeadamente os flavonóides não glicosilados eluem a comprimentos de onda acima dos 70 minutos enquanto os flavonóides glicosilados eluem em geral a tempos de retenção compreendidos entre os 50 e os 70 minutos. A menores tempos de retenção eluem os ácidos fenólicos e outros compostos fenólicos que não são flavonóides.

1.1 – Compostos fenólicos totais

Para avaliação comparativa do conteúdo em compostos fenólicos utilizou-se a absorção ao comprimento de onda 280 nm, por este ser adequado para detectar uma grande quantidade deste tipo de compostos (Bravo et al., 2006).

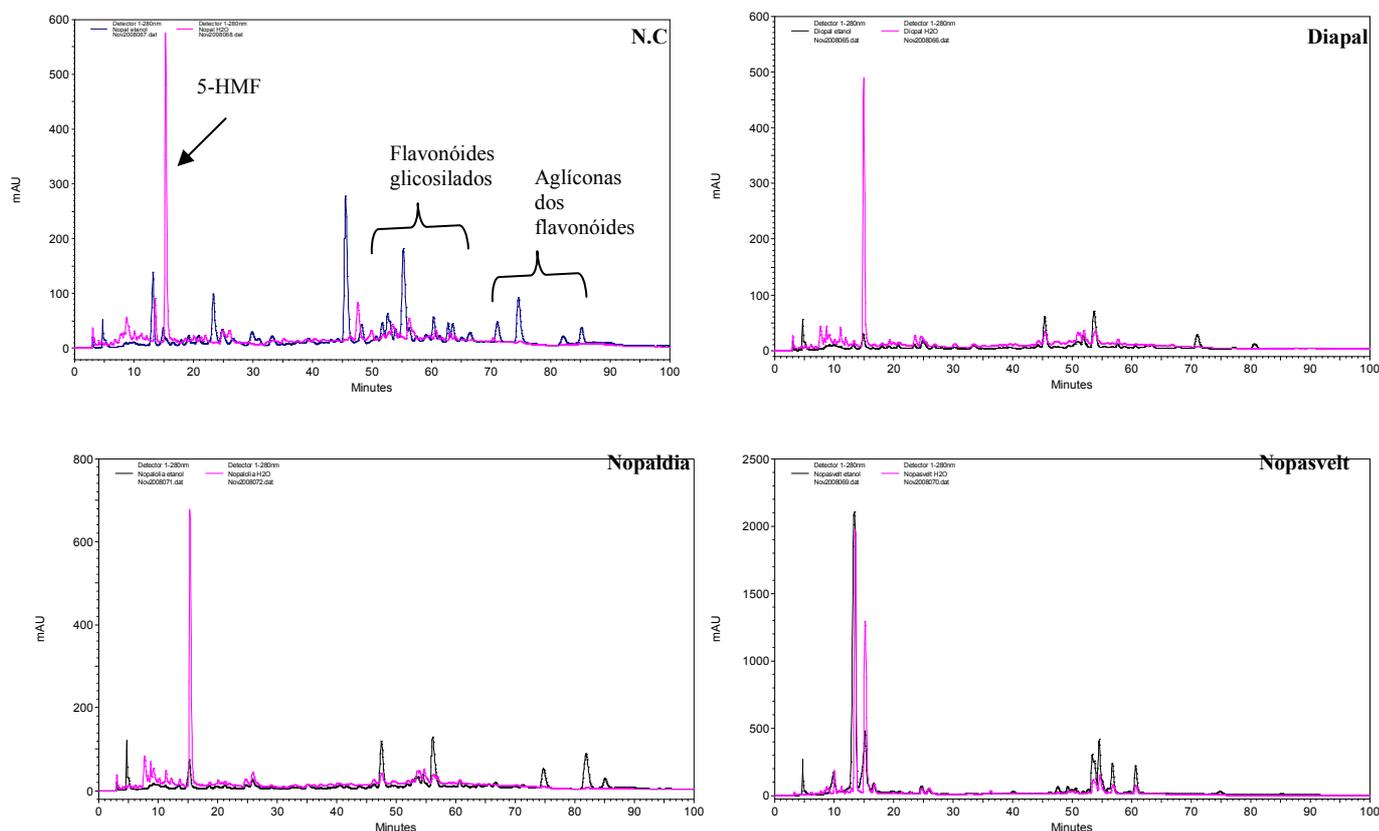


Figura 3.28: Perfis de absorção a 280 nm com o método mais longo para a extracção a quente com água (rosa) e extracção a frio com etanol (preto/azul).

Na maior parte dos cromatogramas (figura 3.28) os picos maiores (principalmente a partir dos 45 min em diante) são detectados nos extractos etanólicos demonstrando que estes extractos estão mais concentrados em relação aos restantes. Tendo em conta a escala dos cromatogramas verifica-se que a amostra Nopasvelt é a mais rica neste tipo de compostos comparadamente com as restantes, seguindo-se pela amostra N.C., Nopaldia e por último o Diapal.

Os extractos aquosos demonstraram, como seria de esperar, uma maior concentração de compostos mais polares (a tempos de retenção menores), nomeadamente o pico com o tempo de retenção 15,4 minutos que por comparação dos

tempos de retenção e de espectros de absorção muito provavelmente corresponderá ao composto 5-hidroximetilfurfural (5-HMF) (figura 3.28).

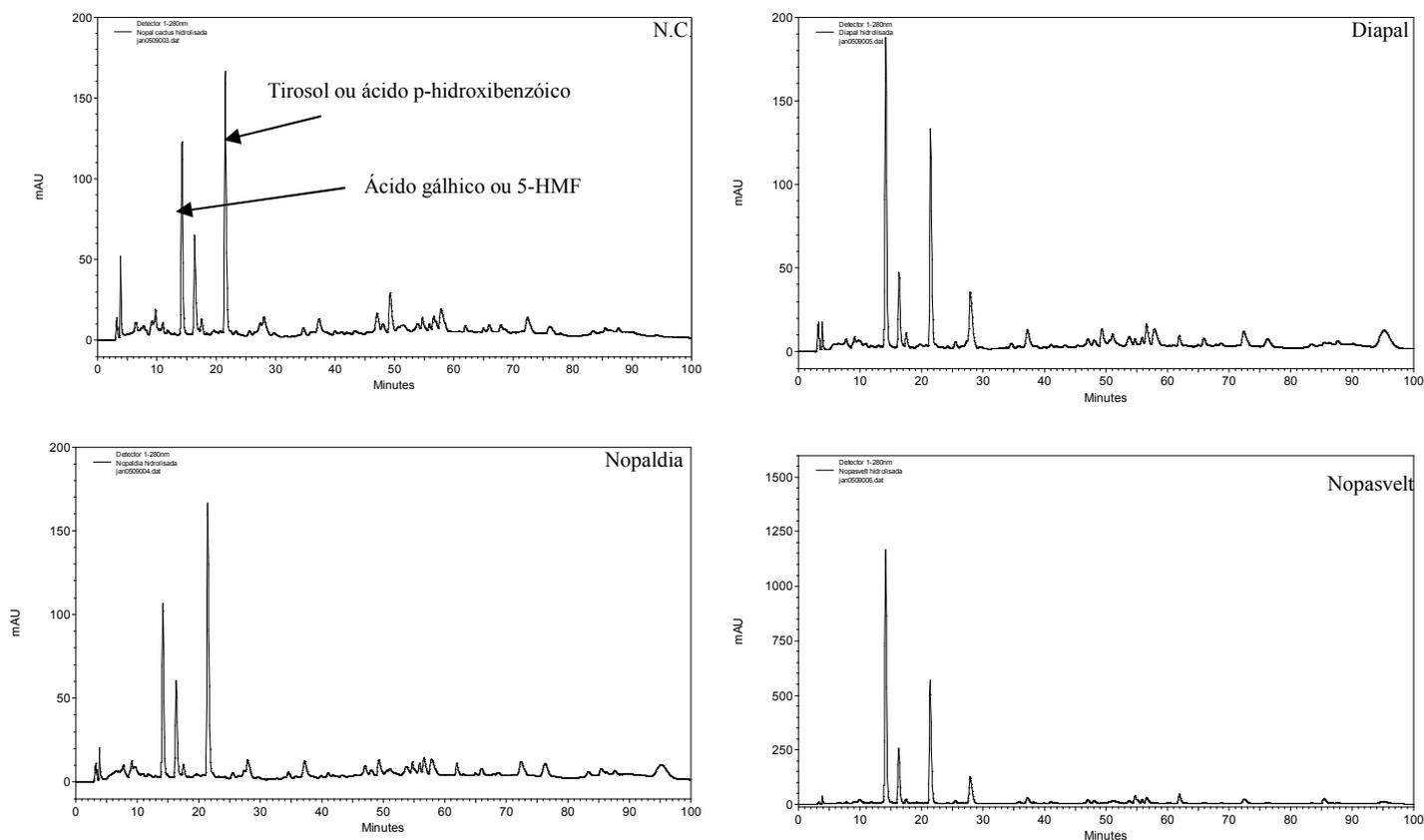


Figura 3.29: Perfis das amostras (extração em água e hidrolisadas) no HPLC (280 nm) com o método mais longo.

Em relação aos extractos aquosos hidrolisados (figura 3.29) verificou-se o aparecimento de novos picos, nomeadamente ao tempo de retenção de aproximadamente 22 minutos que por comparação dos tempos de retenção poderá corresponder ao tirosol ou ao ácido p-hidroxibenzóico, verificando-se também o aumento de um pico com tempo de retenção de 14,5 minutos que também por comparação dos tempos de retenção e espectros de absorção poderá corresponder ao ácido gálgico (I.S.= 98,98%) ou ao 5-HMF (I.S.= 99,67%) (figura 3.30).

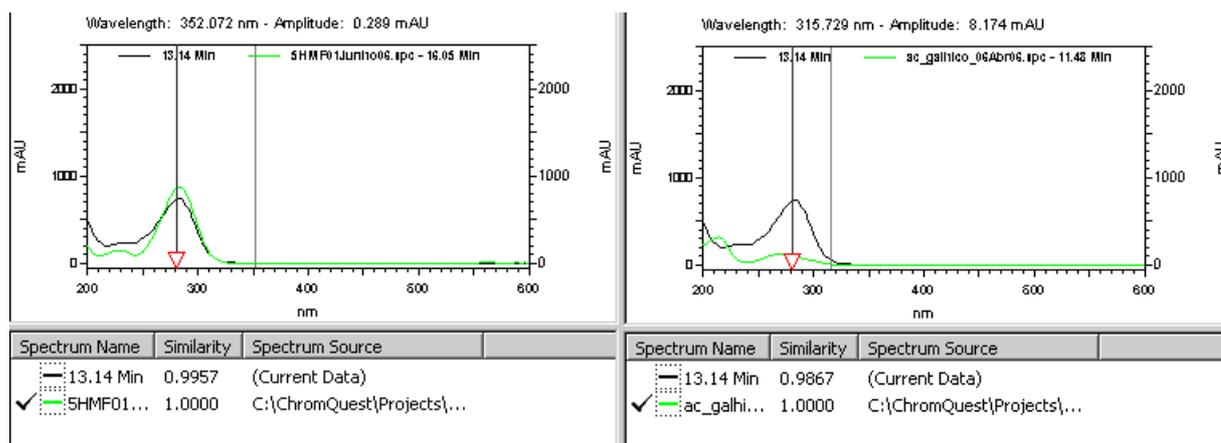


Figura 3.30: Comparação dos espectros de absorção do extracto etanólico N.C. com o 5-HMF (à esquerda) e o ácido gálico (à direita) e correspondentes índices de semelhança.

1.2 – Flavonóides glicosilados e não glicosilados

Muitos dos flavonóides encontram-se na natureza sobre a forma de glicosídeos, o que promove uma melhor absorção intestinal e uma maior biodisponibilidade destes compostos. No entanto o glicosídeo apresenta menor reactividade na neutralização de radicais que o flavonóide correspondente, bem como uma maior hidrossolubilidade (Martínez-Flores et al., 2002).

Segundo (Oganessian et al., 1972), os flavonóides têm uma absorção máxima entre 350 e 370 nm, daí ter sido escolhido o comprimento de onda de 360 nm para avaliar o perfil dos flavonóides (figura 3.31).

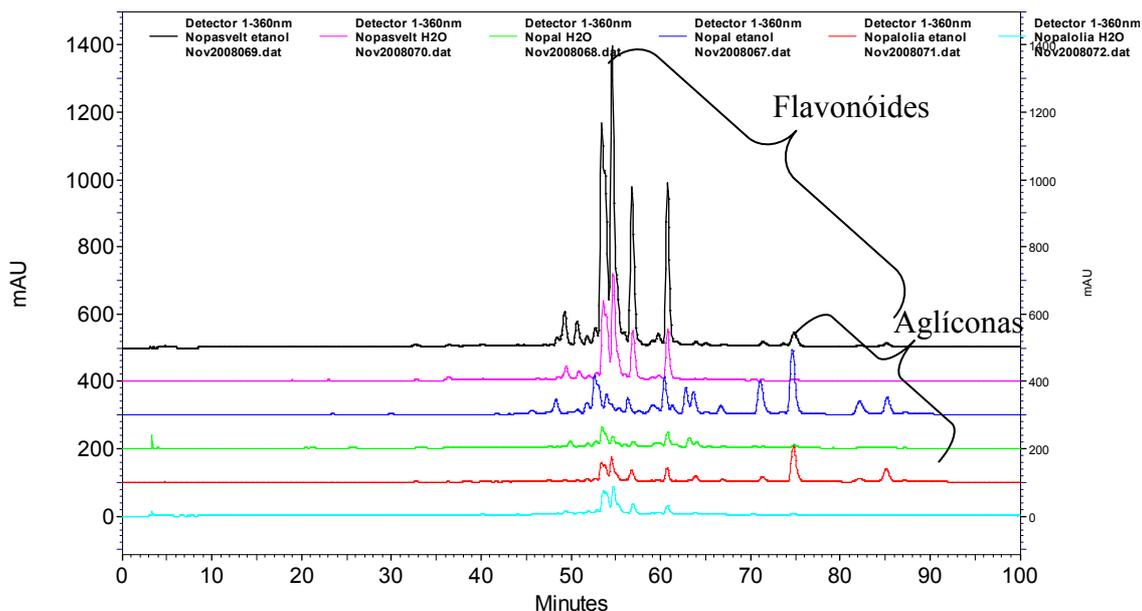


Figura 3.31: Perfis das amostras (extração em água e etanol) no HPLC (360 nm) com o método mais longo.

Através do cromatograma (figura 3.31), verifica-se que das amostras em estudo representadas, estas possuem uma grande variedade de flavonóides, sendo a amostra Nopasvelt (preto e rosa) a mais rica, contudo, olhando para a zona dos flavonóides não glicosilados (aglíconas) a amostra Nopal Cactus (azul escuro) é a mais rica.

Por comparação entre o tempo de retenção e os espectros de absorção dos compostos padrão é provável que o pico com um tempo de retenção 71 minutos corresponda à quercetina (I.S.= 99,48%), aos 74,5 minutos à luteolina (I.S.= 97,99%), aos 82 minutos o canferol (I.S.= 99,15%) e aos 85 minutos a isorhamnetina (I.S.= 80,07%) (figura 3.32).

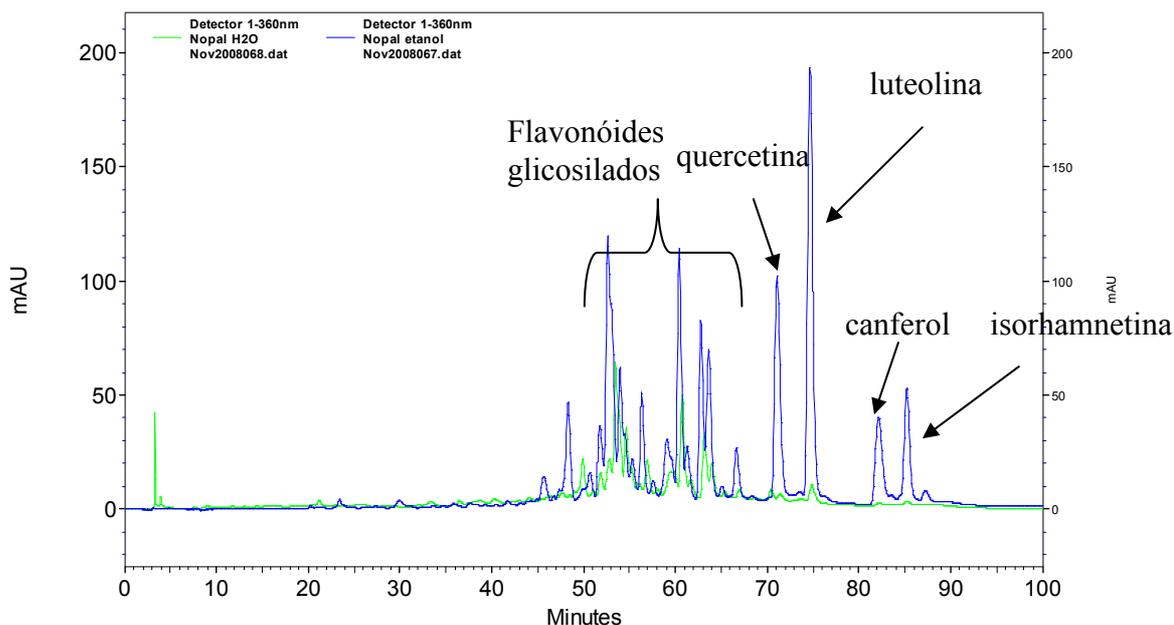


Figura 3.32: Perfil a 360 nm do extracto etanólico (azul) e aquoso (verde) da amostra N.C. com possíveis indentificações de alguns flavonóides.

2- Determinação do teor de compostos fenólicos

A determinação do teor de compostos fenólicos por HPLC foi efectuada usando um método cromatográfico mais curto (30 min) do que o usado na determinação dos perfis cromatográficos (100 min) uma vez que, neste caso, apenas se pretendia determinar a área total dos cromatogramas e como tal, a resolução entre os picos era menos relevante. A utilização de um método curto facilita a análise de replicados. A absorção a 280 nm, característica dos compostos contendo anéis benzénicos, é habitualmente usada como indicativa do teor total de compostos fenólicos. Neste trabalho esta avaliação foi apenas relativa na medida em que não se correlacionaram as áreas totais com compostos padrão. Já o teor de flavonóides foi obtido a partir dos cromatogramas a 370 nm por correlação com a área do pico de quercetina em soluções padrão a várias concentrações para os flavonóides não glicosilados e por correlação com a área do pico da rutina em soluções padrão a várias concentrações para os flavonóides glicosilados.

O teor em compostos fenólicos totais pode ser determinado também por métodos químicos, em equivalentes de um composto padrão, tais como o método de

Folin-Ciocalteu. Neste ponto apresenta-se os resultados obtidos pelos diferentes métodos.

2.1 – Teor relativo de compostos fenólicos por HPLC-DAD a 280 nm

Através da determinação dos perfis cromatográficos a 280 nm, pretendeu-se caracterizar os extractos em termos da quantidade relativa e do tipo de compostos fenólicos que existem em cada uma das amostras, bem como da eficiência de cada um dos processos de extracção utilizados e da precisão do método de extracção, pelo que se efectuaram três replicados de cada análise (ver cromatogramas no anexo 3-A).

Tabela 3.4: Fenólicos totais (HPLC-DAD).

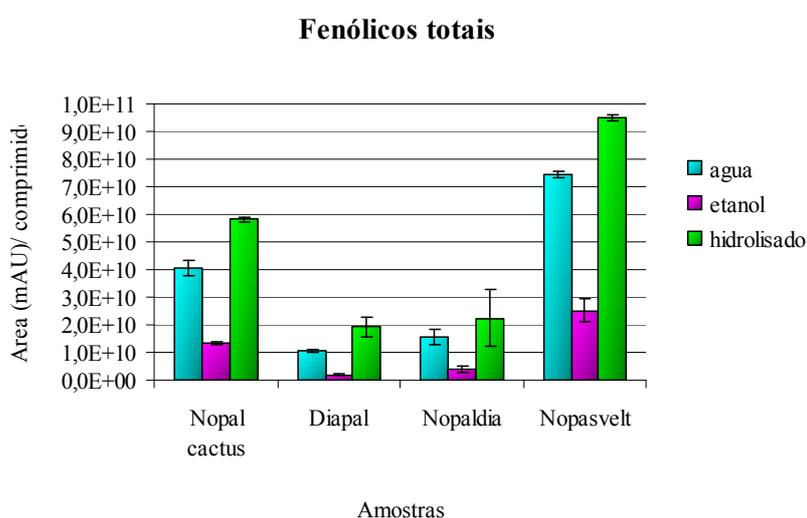


Figura 3.33: Teor relativo em compostos fenólicos totais determinado por HPLC-DAD (280 nm).

HPLC-DAD (280 nm)		
Amostra	Área Média (mAU / comprim.) (n=3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal cactus (água)	4,0E+10	6,7
Diapal (água)	1,1E+10	4,4
Nopaldia (água)	1,6E+10	18,1
Nopasvelt (água)	7,5E+10	1,6
Nopal cactus (etanol)	1,3E+10	5,0
Diapal (etanol)	1,8E+09	18,4
Nopaldia (etanol)	3,9E+09	23,9
Nopasvelt (etanol)	2,5E+10	15,5
Nopal cactus (hidrolisada)	5,8E+10	1,4
Diapal (hidrolisada)	1,9E+10	18,5
Nopaldia (hidrolisada)	2,2E+10	46,2
Nopasvelt (hidrolisada)	9,5E+10	1,3

Sobre a quantidade relativa de compostos fenólicos, avaliada pela área total do cromatograma (figura 3.33 e tabela 3.4), pode-se verificar que a amostra Nopasvelt é a que possui maior teor, pelo que esta será a amostra com mais quantidade de extracto de planta ou com uma origem de planta com condições mais propícias á produção deste tipo de compostos. Apesar disso, a toma recomendada para este produto (6 comprimidos) é maior que a recomendada para o Nopal Cactus (1 a 2 comprimidos), que apresenta um teor de compostos fenólicos menor. Sendo assim o Nopasvelt será a

amostra que eventualmente provocará uma maior resposta no organismo. Relativamente ao Diapal e ao Nopaldia, estes apresentam aproximadamente a mesma quantidade de compostos fenólicos, quantidade essa que é significativamente menor que nas restantes amostras. Possuem também a mesma massa por comprimido e é sugerida a mesma toma diária (6 comprimidos). Em comparação com o Nopasvelt a toma diária de Diapal ou Nopaldia, terá um teor em compostos fenólicos até 7 vezes menor enquanto a toma de Nopal Cactus terá um teor até 10 vezes menor.

O método mais eficiente para a extracção dos compostos fenólicos totais é o método de extracção a quente com água, conseguindo-se cerca de 3 vezes a quantidade de compostos fenólicos que se consegue extrair com etanol. Após a hidrólise, verifica-se um ligeiro aumento no teor calculado de compostos fenólicos totais em relação aos extractos aquosos. É de relembrar que os extractos hidrolisados foram obtidos a partir dos extractos em água e que a hidrólise conduz à quebra da ligação dos açúcares e libertação das agliconas (compostos não glicosilados). Esta variação pode ser devida ao facto de se alterar o coeficiente de extinção de cada composto por hidrólise com consequente alteração na absorvância total a 280 nm.

Na precisão de resultados também se obteve diferenças verificando-se para algumas amostras um desvio padrão relativo superior a 10%.

2.2 - Teor de compostos fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu

Utilizando o método Folin-Ciocalteu (Singleton, 1965), determinou-se a quantidade de compostos fenólicos presentes nas amostras em equivalentes de ácido gálico (figura 3.34 e tabela 3.5), este método permitiu quantificar de forma objectiva os compostos nos diferentes extractos.

Tabela 3.5: Fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu).

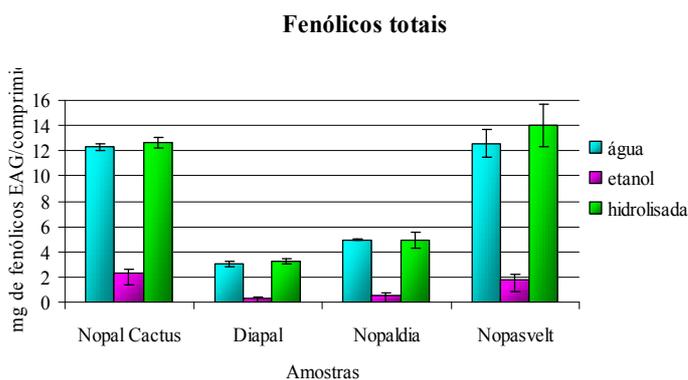


Figura 3.34: Compostos fenólicos totais (método Folin-Ciocalteu).

Teste de Folin-Ciocalteu (determinação da concentração de fenólicos totais EAG - equivalentes de ácido gálico) (mg de fenólicos EAG / comprimido)		
Amostra	Média (n=3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal cactus (água)	12,0	2,1
Diapal (água)	3,2	5,6
Nopaldia (água)	4,9	1,3
Nopasvelt (água)	13,8	8,1
Nopal cactus (etanol)	2,3	13,9
Diapal (etanol)	0,3	35,1
Nopaldia (etanol)	0,6	19,2
Nopasvelt (etanol)	1,8	21,3
Nopal cactus (hidrolisada)	12,7	3,1
Diapal (hidrolisada)	3,3	6,5
Nopaldia (hidrolisada)	4,9	12,4
Nopasvelt (hidrolisada)	14,0	12,1

Ao contrário do observado por HPLC, verificou-se que a amostra Nopasvelt apresenta aproximadamente o mesmo teor de compostos fenólicos que a amostra Nopal Cactus apesar de os comprimidos desta última possuírem aproximadamente duas vezes a massa dos comprimidos de Nopasvelt. Sendo assim, a massa em excesso será principalmente devida a excipientes. Sobre as outras duas amostras, tendo em conta que possuem a mesma massa de comprimido e é recomendada a mesma toma diária, verifica-se que a amostra Nopaldia possui uma concentração de compostos fenólicos ligeiramente maior que a amostra Diapal.

Conclui-se de facto, que a extracção a quente com água é a mais eficaz na extracção de compostos fenólicos. No caso do método Folin-Ciocalteu ao contrário do que se verificou por HPLC a 280 nm, os extractos hidrolisados não mostraram diferenças significativas em relação aos não hidrolisados.

2.3 – Comparação entre os métodos de Folin-Ciocalteu e HPLC-DAD (280 nm)

Correlacionara-se as áreas totais obtidas as 280 nm para os diferentes extractos com o respectivo teor equivalente em ácido gálico determinado pelo método de Folin-Ciocalteu (figura 3.35).

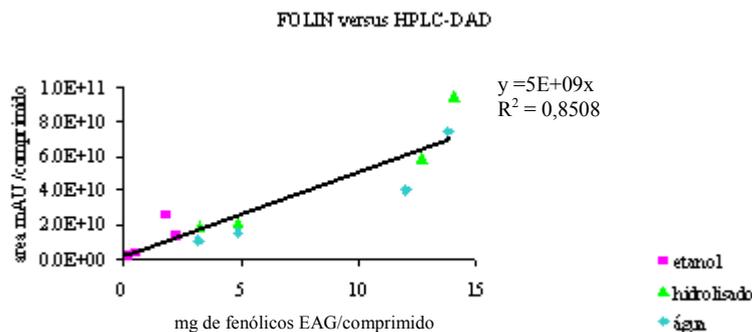


Figura 3.35: Correlação Folin versus HPLC-DAD.

Através desta correlação pode-se verificar que existe uma relação aproximadamente linear entre os dois métodos usados neste trabalho para a avaliação de compostos fenólicos no entanto, como referido anteriormente são detectadas diferenças entre amostras hidrolizadas e não hidrolizadas quando se usa o método de HPLC, que apresenta em geral áreas maiores quando as amostras apresentam maior teor em agliconas.

O mesmo não é verificado com o método de Folin-Ciocalteu, pelo que este facto deve ser considerado caso se pretenda optar por apenas um dos métodos.

2.4 – Determinação do teor relativo de flavonóides glicosilados e não glicosilados

Como referido na introdução, a actividade antioxidante é atribuída aos flavonóides. Para a sua avaliação utilizou-se o mesmo método de HPLC-DAD usado para a quantificação de compostos fenólicos totais mas com um comprimento de onda de 370 nm, uma vez que os compostos que absorvem a 370 nm são maioritariamente flavonóides (ver cromatogramas no anexo 3-B). A selecção da área correspondente aos flavonóides não glicosilados foi efectuada por selecção dos picos que eluem entre os compostos quercetina e a isorhamnetina, ou seja, entre os 25 e os 26,5 minutos. E a selecção da área correspondente aos flavonóides glicosilados foi efectuada por selecção dos picos que eluem antes do pico de quercetina, ou seja, antes dos 25 minutos. Correlacionámos a área obtida com os padrões utilizados (rectas de calibração no anexo 3-C), apresentando os resultados (figura 3.36 e tabela 3.6) dos

flavonóides glicosilados em equivalentes de rutina (flavonóide glicosilado) e os não glicosilados em equivalentes de quercetina (flavonóide não glicosilado).

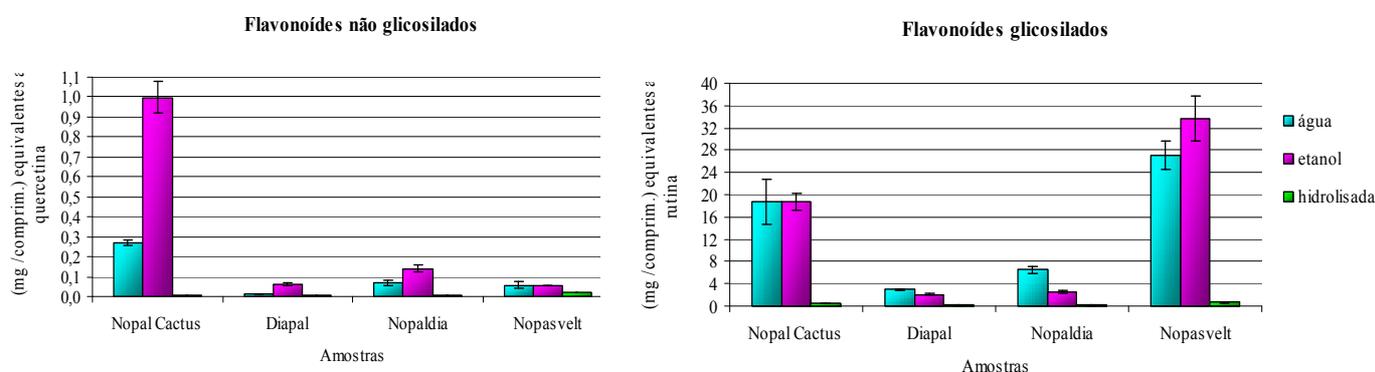


Figura 3.36: Quantidade em mg por comprimido de flavonóides glicosilados equivalentes a rutina (à direita) e não glicosilados equivalentes a quercetina (à esquerda) obtidos por HPLC-DAD (370 nm) representando as barras de erro o desvio padrão.

Tabela 3.6: Quantidade de flavonóides obtidos por HPLC-DAD a 370 nm.

Amostra	Flavonóides não glicosilados eq. a quercetina, HPLC-DAD (370nm)		Flavonóides glicosilados eq. a rutina, HPLC-DAD (370nm)	
	mg/comprimido (média, n≥3)	Desvio padrão relativo (%)	mg/comprimido (média, n≥3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal cactus (água)	0,3	4,8	18,7	21,0
Diapal (água)	1,3E-02	3,5	3,0	5,0
Nopaldia (água)	7,0E-02	21,0	6,5	8,5
Nopasvelt (água)	5,9E-02	32,0	27,2	9,3
Nopal cactus (etanol)	1,0	7,9	18,7	8,5
Diapal (etanol)	6,4E-02	11,1	2,1	2,4
Nopaldia (etanol)	0,1	11,3	2,5	13,0
Nopasvelt (etanol)	5,5E-02	3,4	33,7	12,1
Nopal cactus (hidrolisada)	7,1E-03	9,3	0,6	8,7
Diapal (hidrolisada)	3,5E-03	12,2	0,1	16,6
Nopaldia (hidrolisada)	6,3E-03	18,6	0,2	24,7
Nopasvelt (hidrolisada)	1,9E-02	5,4	0,7	8,7

Comparando os diferentes extractos e olhando para a quantidade de agliconas (flavonóides não glicosilados), verifica-se que o N.C. possui uma grande percentagem no extracto etanólico comparadamente com as amostras restantes. Tendo em conta esta amostra possuir a mesma quantidade de compostos fenólicos que o Nopasvelt, determinada anteriormente, isto revela que o tipo de flavonóides presentes em cada um dos extractos é diferente e consequentemente a origem das plantas ou o método usado para as processar também deverá ser diferente. Conclui-se também que os flavonóides não glicosilados são mais facilmente extraídos em etanol, como seria de

esperar, uma vez que os flavonóides não glicosilados são menos polares que os glicosilados, porque possuem menor número de grupos – OH (figura 3.37).

No caso dos flavonóides glicosilados, verifica-se que estão em maior quantidade que os não glicosilados, que a amostra Nopasvelt possui a maior parte dos seus flavonóides na forma glicosilada e que os flavonóides glicosilados são solúveis tanto em água como em etanol. Nos extractos hidrolisados, os flavonóides glicosilados estão em muito menor quantidade que nos extractos não hidrolisados uma vez que ao efectuar-se a hidrólise ácida quebrou-se os açúcares das moléculas tornando-se em favonóides não glicosilados (agliconas) (ver exemplo da figura 3.37). Contudo um aumento significativo dos flavonóides não glicosilados nos extractos hidrolisados não se verificou. Pensa-se que a hidrólise ácida foi tão agressiva que quebrou outras ligações além dos açúcares transformando-se os flavonóides noutros compostos fenólicos além dos flavonóides e que não são detectados a 370 nm.

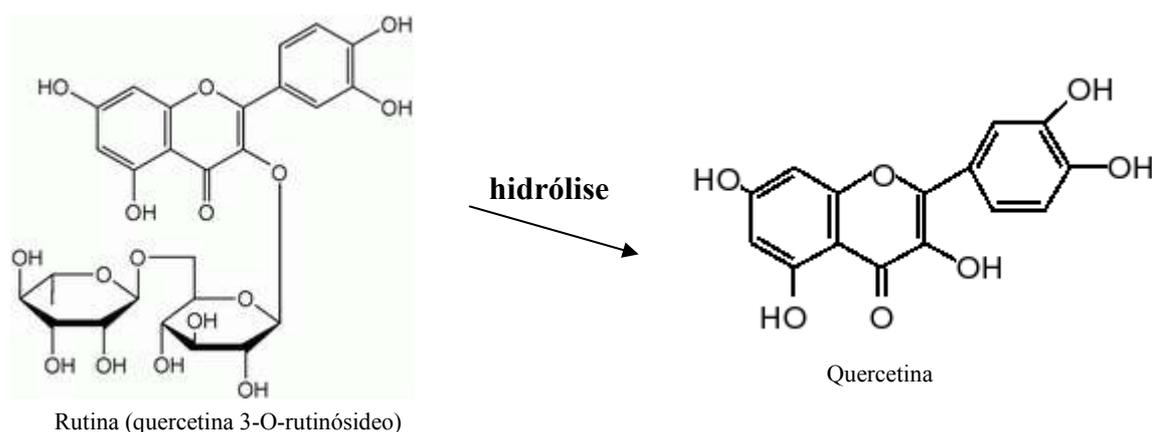


Figura 3.37: Transformação da quercetina glicosilada (rutina) em quercetina não glicosilada (<http://pt.wikipedia.org>) (adaptado).

2.5 – Identificação e quantificação relativa de alguns flavonóides

Identificou-se e quantificou-se (figura 3.38) três flavonóides, baseando-se nos tempos de retenção, a partir dos extractos etanólicos uma vez que estes extractos são os mais concentrados. Este método não é muito rigoroso uma vez que devido a ser um método mais curto de HPLC-DAD não se consegue uma total separação de todos os picos (ver cromatogramas no anexo 3-C).

Extractos etanólicos

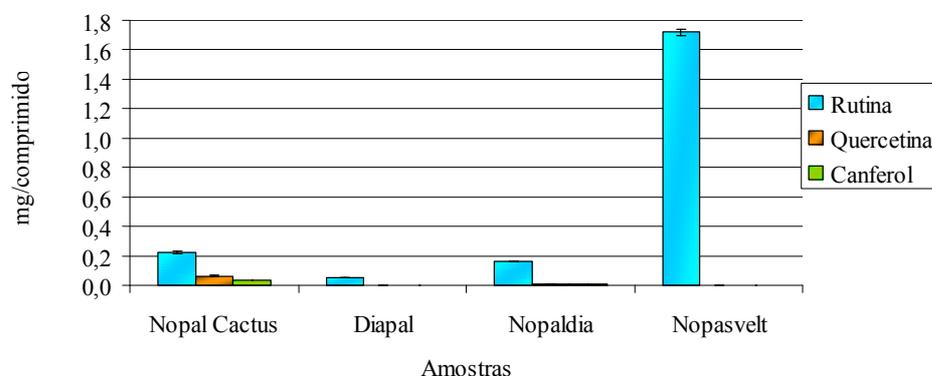


Figura 3.38: Quantificação de alguns flavonóides nos extractos etanólicos por HPLC-DAD (370 nm).

Tabela 3.7: Quantificação de alguns flavonóides nos extractos etanólicos por HPLC-DAD (370 nm).

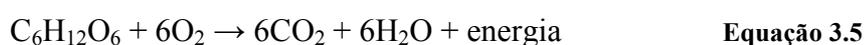
HPLC-DAD (370 nm) extractos etanólicos						
Amostra	Rutina		Quercetina		Canferol	
	Média (mg / comprimido) (n=3)	Desvio padrão relativo (%)	Média (mg / comprimido) (n=3)	Desvio padrão relativo (%)	Média (mg / comprimido) (n=3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal Cactus	2,2E-01	4,8	6,2E-02	7,6	3,5E-02	2,7
Diapal	5,0E-02	1,8	1,5E-03	14,8	2,0E-03	4,1
Nopaldia	1,6E-01	0,9	5,8E-03	11,4	4,4E-03	2,9
Nopasvelt	1,7	1,2	2,0E-03	15,8	1,0E-03	12,4

Escolheu-se estes 3 flavonóides por serem reportados fazerem parte da constituição da planta em estudo e possuírem propriedades benéficas ao organismo descritas no ponto 2.3 da introdução. Verifica-se que a amostra N.C. é a que possui maior quantidade de quercetina por comprimido comparadamente com as restantes amostras, o que era de esperar uma vez que a massa de comprimido N.C. corresponde a cerca de 3 vezes as restantes, contudo, se imaginarmos os resultados para a mesma massa de comprimido (ver tabela 3.7), a amostra N.C. continua a possuir uma enorme quantidade a mais. O canferol é o que está em menor quantidade em todas as amostras excepto no Diapal e verifica-se que a amostra Nopasvelt possui uma enorme quantidade de rutina por comprimido comparadamente com as outras amostras. A rutina é uma das formas glicosiladas da quercetina (quercetina 3-rutinósideo), como referido anteriormente (figura 3.37). Estes resultados leva-nos a pensar que a origem das plantas usadas para o processamento dos vários suplementos é diferente ou o

próprio processamento das amostras é diferente, o que pode transformar a rutina em quercetina ou vice-versa.

3 - Avaliação da actividade antioxidante

Todos os organismos aeróbios para o processo de respiração celular, necessitam de oxigénio molecular como aceitador de electrões para uma produção eficiente de energia, como se pode ver na equação química 3.5:



Contudo, o oxigénio é um forte oxidante que pode ter consequências graves se os seus produtos não forem neutralizados por um sistema antioxidante eficiente. É aí, que surge a importância dos flavonóides porque possuem uma enorme capacidade antioxidante através da neutralização das ROS, embora também desempenhem uma função preventiva na oxidação da LDL (Sorg, 2004).

Como referido anteriormente, determinou-se a capacidade antioxidante dos diferentes extractos das diferentes amostras através de 3 ensaios diferentes.

3.1 – Capacidade de resgate do radical peroxilo (ORAC)

Primeiramente, utilizou-se o ensaio ORAC em que a capacidade antioxidante corresponde à capacidade de resgate do radical peroxilo e é medida em termos do padrão Trolox, sendo o resultado final expresso em termos de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (CAET) (figura 3.39 e tabela 3.8).

Tabela 3.8: Resultados do ensaio ORAC.

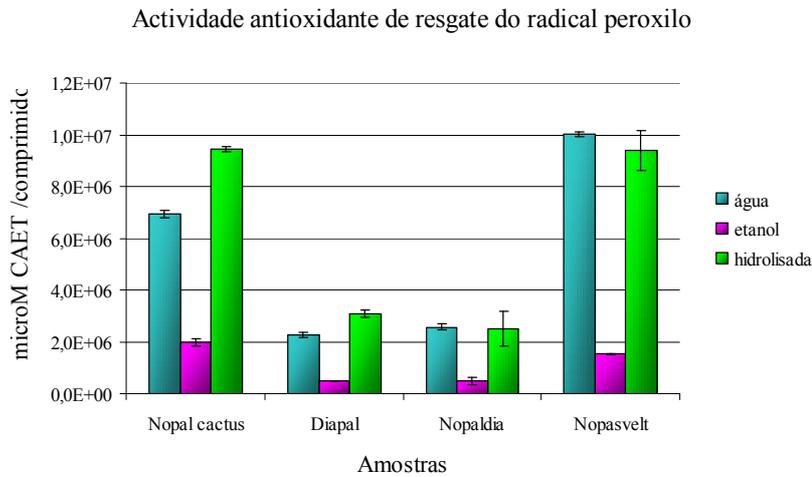


Figura 3.39: Resultados do ensaio ORAC para as diferentes amostras.

Amostra	Conc. (μM CAET/comprimido) (média, $n \geq 3$)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal cactus (água)	6,9E+06	2,0
Diapal (água)	2,3E+06	4,1
Nopaldia (água)	2,6E+06	4,7
Nopasvelt (água)	1,0E+07	1,0
Nopal cactus (etanol)	2,0E+06	6,5
Diapal (etanol)	4,6E+05	0,2
Nopaldia (etanol)	4,7E+05	30,0
Nopasvelt (etanol)	1,5E+06	2,1
Nopal cactus (hidrolisada)	9,4E+06	1,2
Diapal (hidrolisada)	3,1E+06	5,3
Nopaldia (hidrolisada)	2,5E+06	27,4
Nopasvelt (hidrolisada)	9,4E+06	8,3

Tanto o comprimido Nopasvelt como N.C. apresentam maior capacidade de resgate do radical peróxido comparativamente com as amostras restantes e verifica-se que Diapal e Nopaldia são muito semelhantes. Estes resultados estão de acordo com a quantidade de compostos fenólicos determinada anteriormente. Verifica-se algumas diferenças entre os extractos aquosos e hidrolisados, principalmente uma diferença mais acentuada no N.C., possivelmente porque nesta amostra os compostos fenólicos nos diferentes extractos são mais distintos.

3.2 – Capacidade de resgate do radical hidroxilo (HORAC)

De seguida optou-se por avaliar também a capacidade antioxidante através do ensaio HORAC, em que a capacidade antioxidante determinada corresponde à capacidade de resgate do radical hidroxilo, utilizando como padrão o ácido cafeico e o resultado final expresso em termos de capacidade antioxidante equivalente ao ácido cafeico (CAEAC) (figura 3.40 e tabela 3.9).

Tabela 3.9: Resultados do ensaio HORAC.

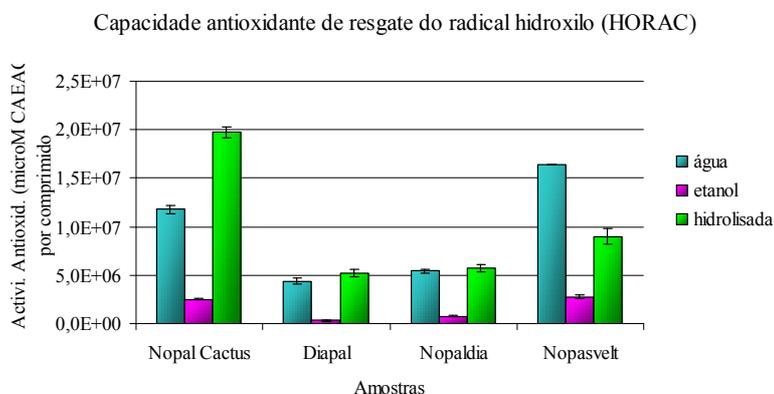


Figura 3.40: Resultados do ensaio HORAC para as diferentes amostras.

Amostra	Conc. (microM CAEAC/comp rimido) (média, n≥3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal cactus (água)	1,2E+07	4,9
Diapal (água)	4,4E+06	7,2
Nopaldia (água)	5,4E+06	3,2
Nopasvelt (água)	1,6E+07	0,1
Nopal cactus (etanol)	2,5E+06	5,6
Diapal (etanol)	3,1E+05	2,4
Nopaldia (etanol)	8,0E+05	8,2
Nopasvelt (etanol)	2,8E+06	7,0
Nopal cactus (hidrolisada)	2,0E+07	4,3
Diapal (hidrolisada)	5,3E+06	7,1
Nopaldia (hidrolisada)	5,7E+06	7,0
Nopasvelt (hidrolisada)	9,0E+06	9,2

Comparando com os valores obtidos no ensaio ORAC, verificou-se valores mais elevados na capacidade de resgate do radical hidroxilo, verificando-se também maior diferença entre os extractos aquosos e hidrolisados nas amostras N.C. e Nopasvelt. Este facto é devido aos diferentes compostos fenólicos dos diferentes extractos serem mais distintos nestas amostras e alguns compostos possuírem maior acção na capacidade de resgate do radical hidroxilo, notando-se assim uma diferença mais acentuada nos valores.

Comparando a capacidade de resgate do radical peroxilo com a do hidroxilo, verifica-se a existência de uma correlação linear entre estes dois ensaios na avaliação da actividade antioxidante (figura 3.41). Contudo a capacidade antioxidante dos extractos naturais depende das sinergias existentes entre os diferentes compostos presentes na mistura pelo que podem existir diferentes mecanismos de actuação sobre os radicais livres, num mesmo extracto. Desta forma, é relevante a combinação de mais do que um método para conseguir reunir dados suficientes que definem a capacidade antioxidante total de uma amostra (Pérez-Jiménez, 2008).

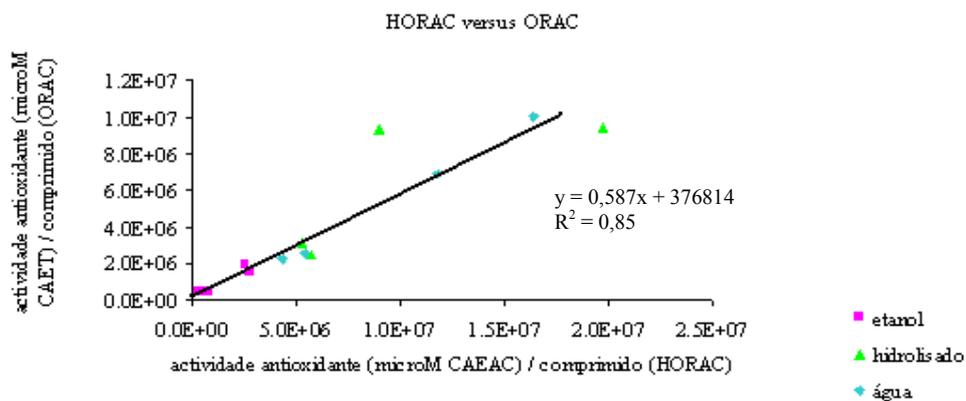


Figura 3.41: Correlação HORAC versus ORAC.

3.3 – Correlação do tipo de compostos com a actividade antioxidante

Tendo em conta que a actividade antioxidante dos extractos de plantas é frequentemente atribuída aos compostos fenólicos nela existentes, correlacionou-se a capacidade de resgate radicalar com o teor de compostos fenólicos e com os dois tipos de flavonóides, com o objectivo de tentar identificar as classes de compostos que mais afectam os resultados da actividade antioxidante.

3.3.1 – Fenólicos totais versus actividade antioxidante

Correlacionou-se os resultados da quantificação de compostos fenólicos totais através do método Folin-Ciocalteu com os resultados obtidos para os dois ensaios de capacidade de resgate radicalar verificando-se que existe de facto uma relação entre os dois parâmetros (figura 3.42).

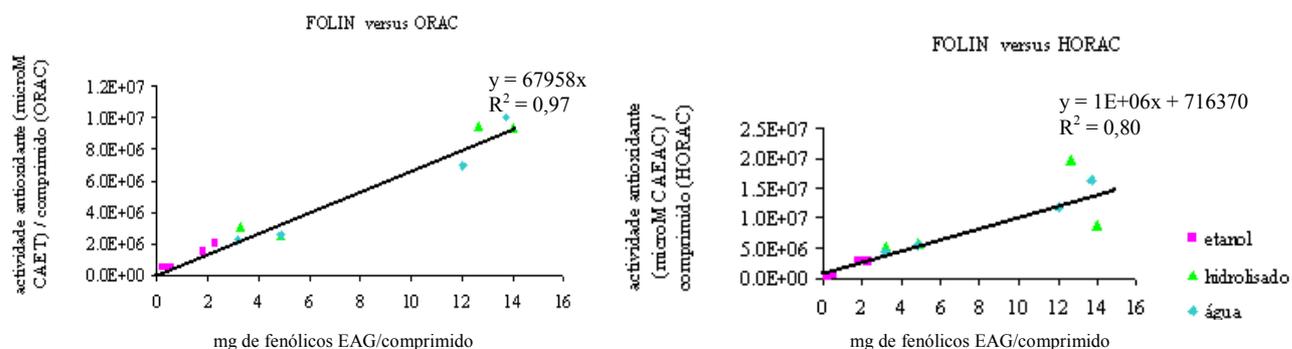


Figura 3.42: Correlação dos compostos fenólicos (Folin-Ciocalteu) com a actividade antioxidante ORAC e HORAC.

Correlacionou-se os resultados da quantificação de compostos fenólicos totais determinados pelo método HPLC-DAD com os resultados obtidos para os dois ensaios de capacidade de resgate radicalar (figura 3.43).

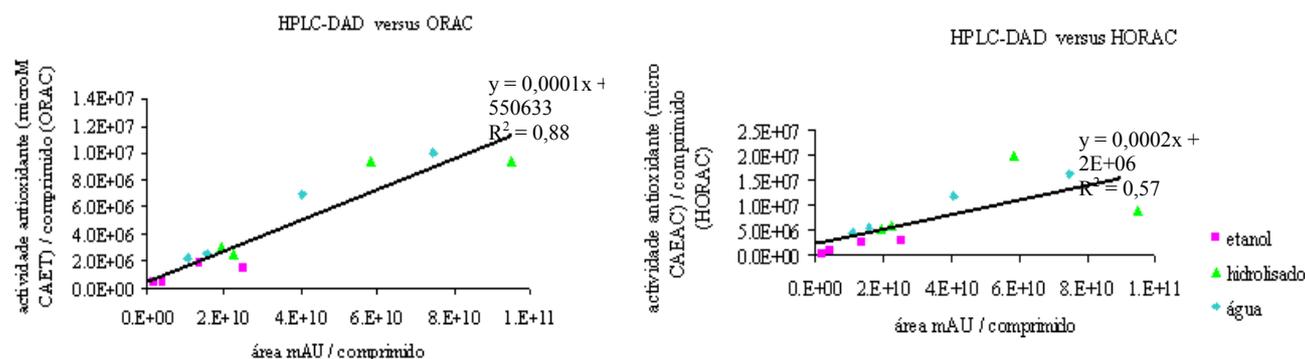


Figura 3.43: Correlação dos fenólicos totais (HPLC-DAD) com a actividade antioxidante ORAC e HORAC.

Na determinação de compostos fenólicos, tanto os resultados obtidos pelo método de Folin-Ciocalteu como pelo método HPLC-DAD (280 nm), apresentam uma boa correlação com a actividade antioxidante medida através da capacidade de resgate do radical peroxilo (ORAC), não se verificando um valor de correlação tão elevado com os resultados obtidos pelo ensaio HORAC. E os resultados determinados através do método Folin-Ciocalteu correlacionam-se melhor com a actividade antioxidante que os resultados obtidos por HPLC-DAD (280 nm).

3.3.2 - Flavonóides versus actividade antioxidante

Correlacionou-se os resultados obtidos por HPLC-DAD (370 nm) para os dois tipos de flavonóides (glicosilados e não glicosilados (dados não exibidos)) com os resultados da actividade antioxidante dos diferentes extractos obtidos com o ensaio ORAC e HORAC, verificando-se apenas, uma correlação positiva com a actividade antioxidante nos resultados de quantificação de flavonóides glicosilados dos extractos aquosos (figura 3.44). A explicação deste facto é devido aos flavonóides glicosilados serem mais solúveis em água porque possuem maior número de grupos hidroxilo e são apontados por possuírem uma maior actividade antioxidante que os não glicosilados.

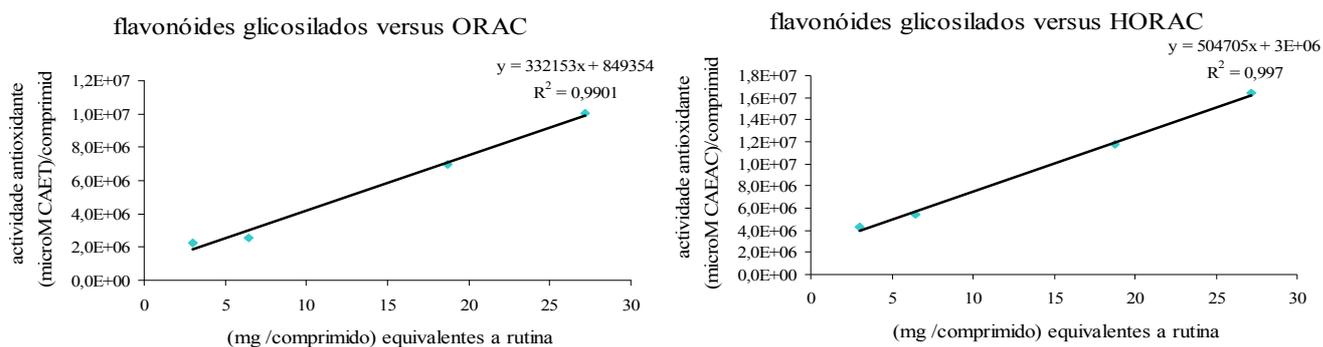


Figura 3.44: Correlação dos flavonóides glicosilados com a actividade antioxidante ORAC e HORAC nos extractos aquosos.

Verificou-se uma excelente correlação entre a área dos flavonóides glicosilados nos extractos aquosos com a sua actividade antioxidante. Isto leva-nos a crer que estes compostos são de facto os responsáveis pela actividade antioxidante exibida nos extractos. Contudo, os compostos glicosilados possuem uma estrutura molecular maior, devido às ligações com os açúcares, o que conduz a problemas na permeabilidade da membrana celular das células, como relatou (Tian et al., 2009), transformando-se muitas vezes nos seus correspondentes não glicosilados para poderem entrar nas células. Para avaliar melhor este efeito, testes de permeabilidade deveriam ser executados com os extractos.

3.4 - Ensaio de bioactividade dos extractos (determinação da capacidade antioxidante intracelular)

Após a caracterização da capacidade antioxidante dos extractos através de ensaios químicos, determinou-se as suas capacidades antioxidantes *in vitro* perante diferentes radicais indutores de stress oxidativo, de modo a avaliar o comportamento e actuação dos mesmos perante sistemas biológicos, nomeadamente, avaliar a possível toxicidade associada aos extractos naturais e estudar a potencial capacidade preventiva dos extractos sobre o sistema celular utilizado. Tanto os ensaios de toxicidade como de avaliação da potencial actividade biológica dos extractos foram realizados *in vitro* e recorrendo à linha celular humana de adenocarcinoma do cólon

(Caco-2), escolheu-se esta linha celular devido ao método implementado estar otimizado para esta linha celular.

Começou-se por preparar várias diluições dos diferentes extractos, com meio RPMI 1640 fresco com 0,5% FBS e L-glutamina, de forma a normalizar a quantidade de fenólicos presente nos diferentes extractos para posterior comparação.

3.4.1 – Avaliação da toxicidade celular

Verificou-se a toxicidade dos diferentes extractos com diferentes concentrações de fenólicos e com um período de contacto com as células de 4 e 24 horas. Considerou-se apresentar toxicidade o extracto que revelar uma percentagem de células viáveis inferior a 80%.

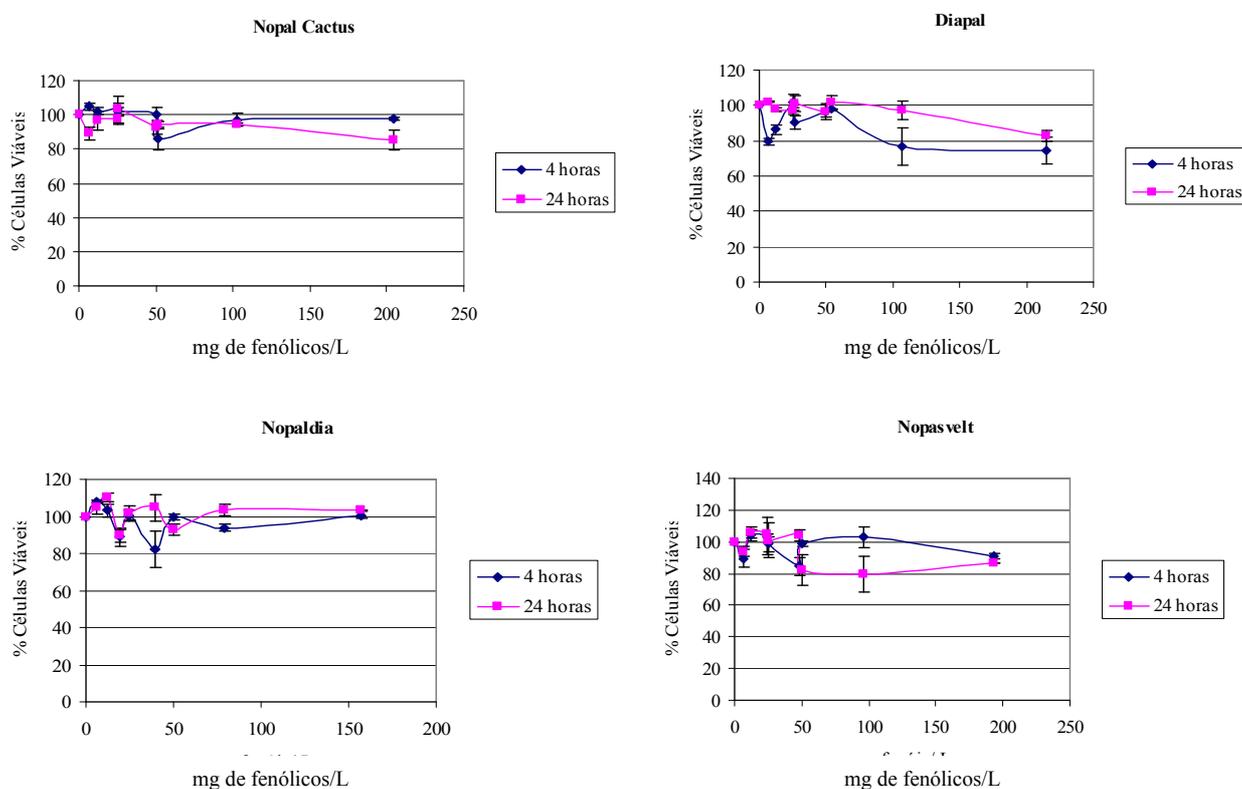


Figura 3.45: Toxicidade celular dos extractos aquosos com tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2 (ver anexo 2-E).

No caso dos extractos aquosos (figura 3.45), o Diapal revelou alguma toxicidade com o tempo de contacto de 4 horas, que não se verificou com o tempo de contacto de 24 horas, sendo assim conclui-se que a toxicidade anteriormente observada é devido a um choque inicial e que posteriormente as células adaptam-se ao meio e recuperam.

Pode-se dizer, que nenhum dos extractos aquosos das amostras revelou toxicidade relevante até ao limite de concentrações testadas, uma vez que a viabilidade celular é mais ou menos constante com o aumento da concentração de extracto.

Também não se verificou toxicidade relevante nos extractos preparados em etanol para esta linha celular até ao limite de concentrações testadas (figura 3.46).

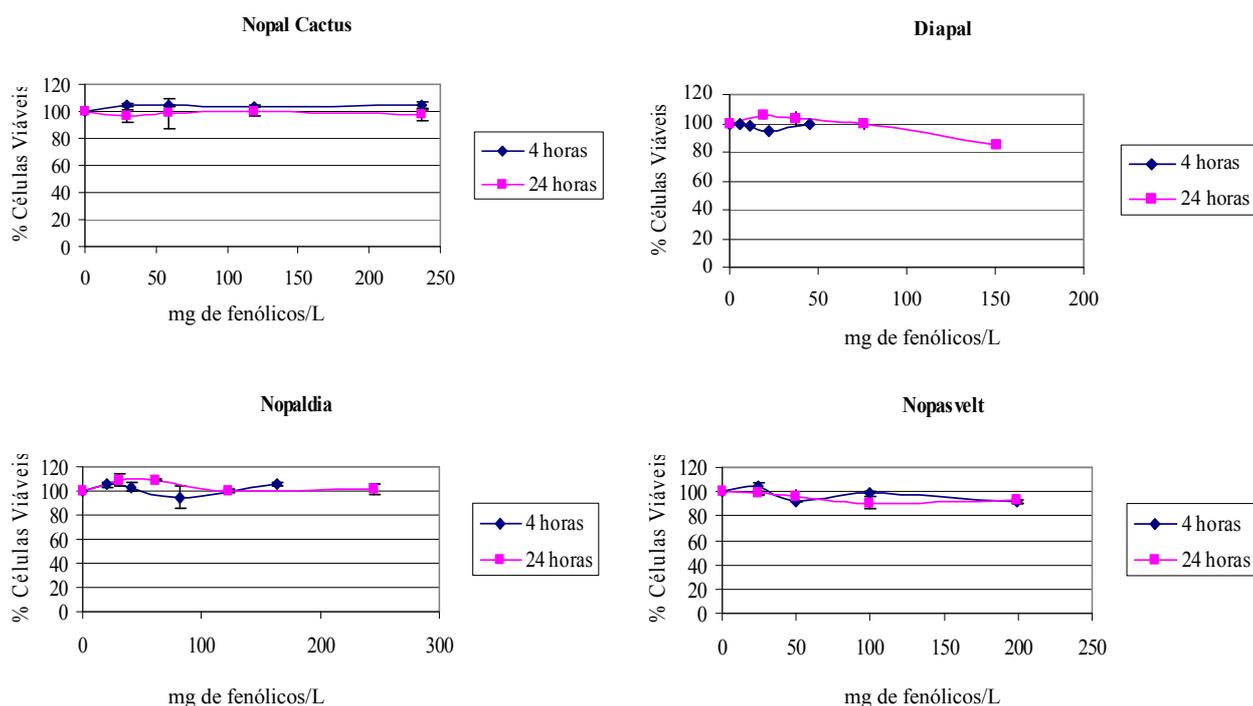


Figura 3.46: Toxicidade celular dos extractos etanólicos com tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2 (ver anexo 2-E).

Comparando com os resultados dos extractos aquosos, verificou-se menor variabilidade de resultados com os extractos etanólicos.

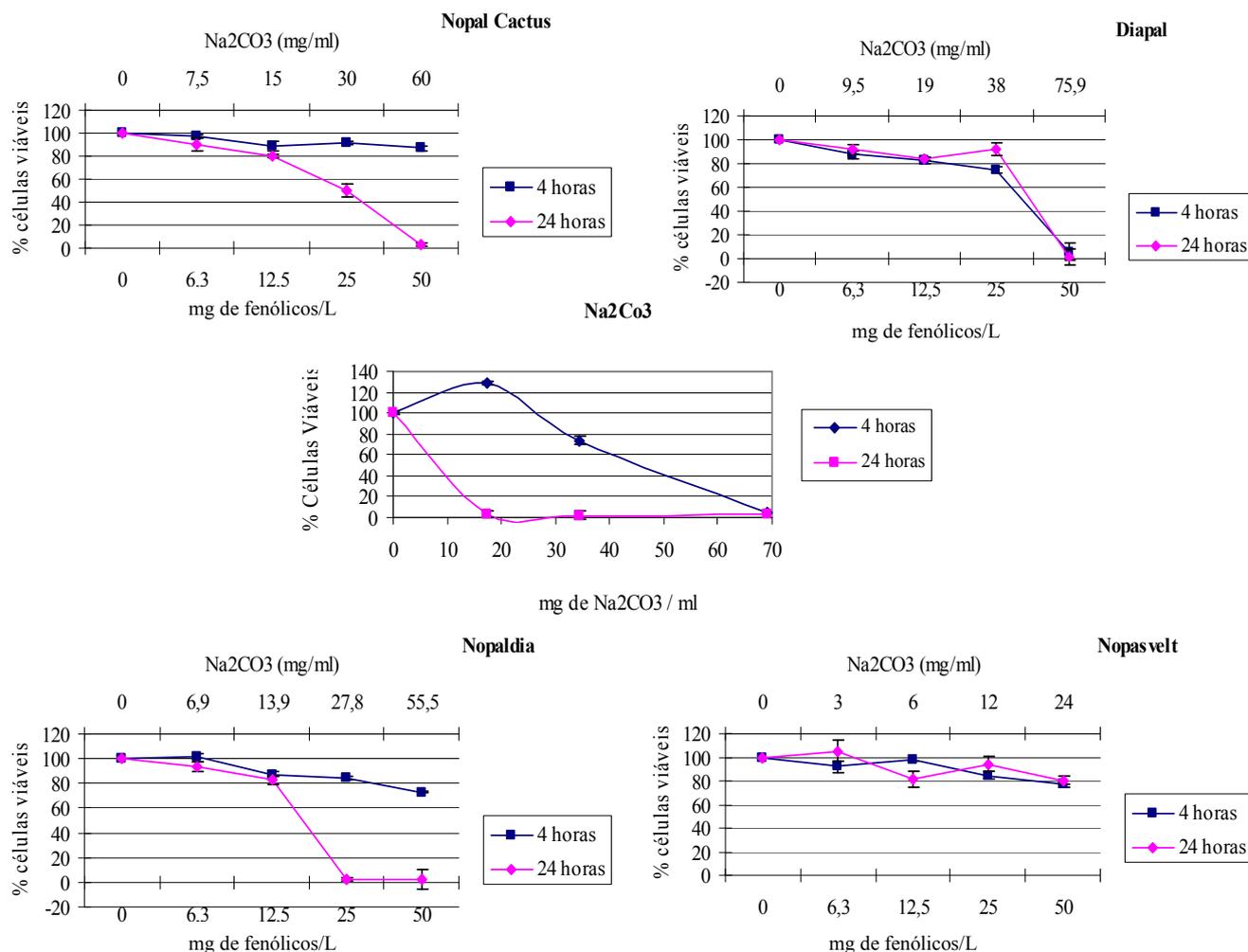


Figura 3.47: Toxicidade celular dos extractos hidrolizados, tempo de contacto de 4 e 24 horas com as células Caco-2 (ver anexo 2-E).

Já no caso dos extractos hidrolizados (figura 3.47), foi detectada toxicidade em alguns casos, nomeadamente com um tempo de contacto de 4h no extracto Diapal e com um tempo de contacto de 24 h em todos os extractos excepto no Nopasvelt. Mas como estes extractos foram neutralizados com uma solução concentrada de carbonato de sódio testou-se esta solução de carbonato de sódio nas mesmas condições e verificou-se que a toxicidade revelada nos extractos é devido a esta solução. Optou-se pela solução de carbonato de sódio devido à disponibilidade de soluções no laboratório mas devido à sua toxicidade esta não foi a melhor escolha e recomenda-se a não utilização da mesma em ensaios celulares *in vitro*.

Também se conclui que a toxicidade de carbonato de sódio é directamente proporcional à sua quantidade, uma vez que não se viu toxicidade no extracto Nopasvelt que possuía uma concentração de fenólicos mais elevada, logo foi

necessário menor quantidade de extracto e consequentemente menor quantidade de Na_2CO_3 , conforme indicado na figura 3.47. A toxicidade de carbonato de sódio também depende do tempo de contacto com as células uma vez que para as mesmas concentrações só se verifica toxicidade com um tempo de contacto entre as células e os extractos de 24 horas.

3.4.2 – Avaliação da capacidade antioxidante intracelular

As ROS são produzidas essencialmente a nível celular, surgindo durante o próprio metabolismo da célula (respiração aeróbia). Também a exposição a determinados agentes agressores externos, como é o caso da poluição ambiental, o fumo do tabaco, toxinas, radiações, etc, podem conduzir à acumulação de radicais livres no organismo (Fitó, 2007). O organismo possui um sistema de defesa antioxidante que permite eliminar as ROS, através da SOD (enzima superóxido dismutase) e Catalase que convertem, respectivamente, os radicais $\text{O}_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , em espécies não reactivas. No entanto, este sistema não é 100 % eficiente e o consumo de antioxidantes naturais, provenientes de uma dieta rica em frutos e legumes, têm sido relacionado com a prevenção de doenças relacionadas com o stress oxidativo celular (Pérez-Jiménez et al., 2009).

Os resultados da capacidade antioxidante exibida pelos extractos são expressos em termos de percentagem de ROS produzidas relativamente ao controlo (células sujeitas ao indutor de stress oxidativo mas sem a acção dos extractos). E para discussão dos resultados considerou-se relevante uma inibição de produção de ROS de 10%.

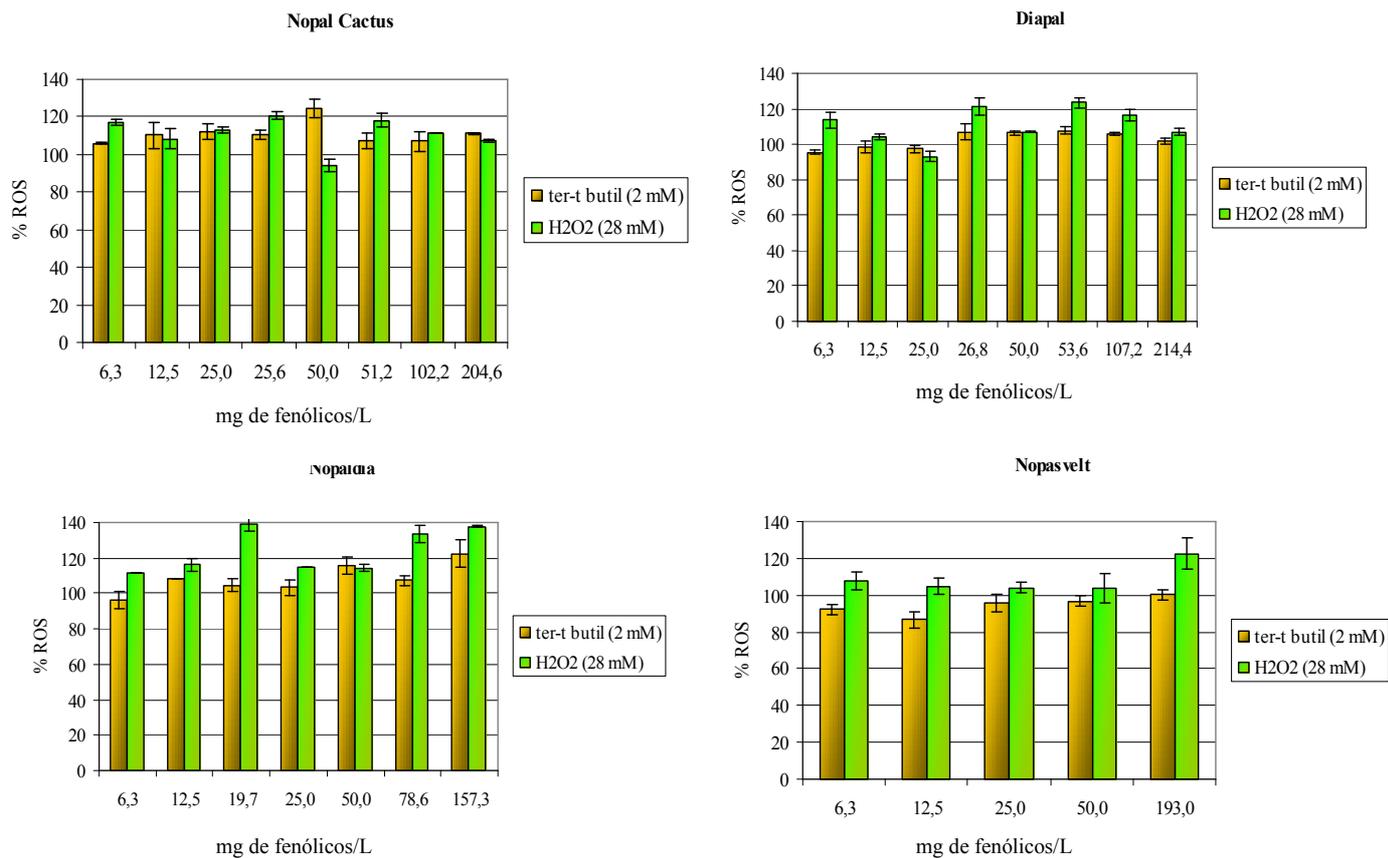


Figura 3.48: Toxicidade intracelular dos extractos aquosos com tempo de contacto de 24 horas com as células Caco2 (ver anexo 2-F).

Sendo assim, nos extractos aquosos (figura 3.48), Nopasvelt é o único que apresenta uma percentagem de resgate de ROS significativa, 13,3% á concentração de 12,5 mg de compostos fenólicos/L com o indutor de stress peróxido tert-butil hidróxido (consultar tabelas do anexo 2-F). O aumento da concentração de extracto, não aumentou em geral a capacidade de resgate e não se notaram diferenças significativas estatisticamente entre as concentrações e amostras.

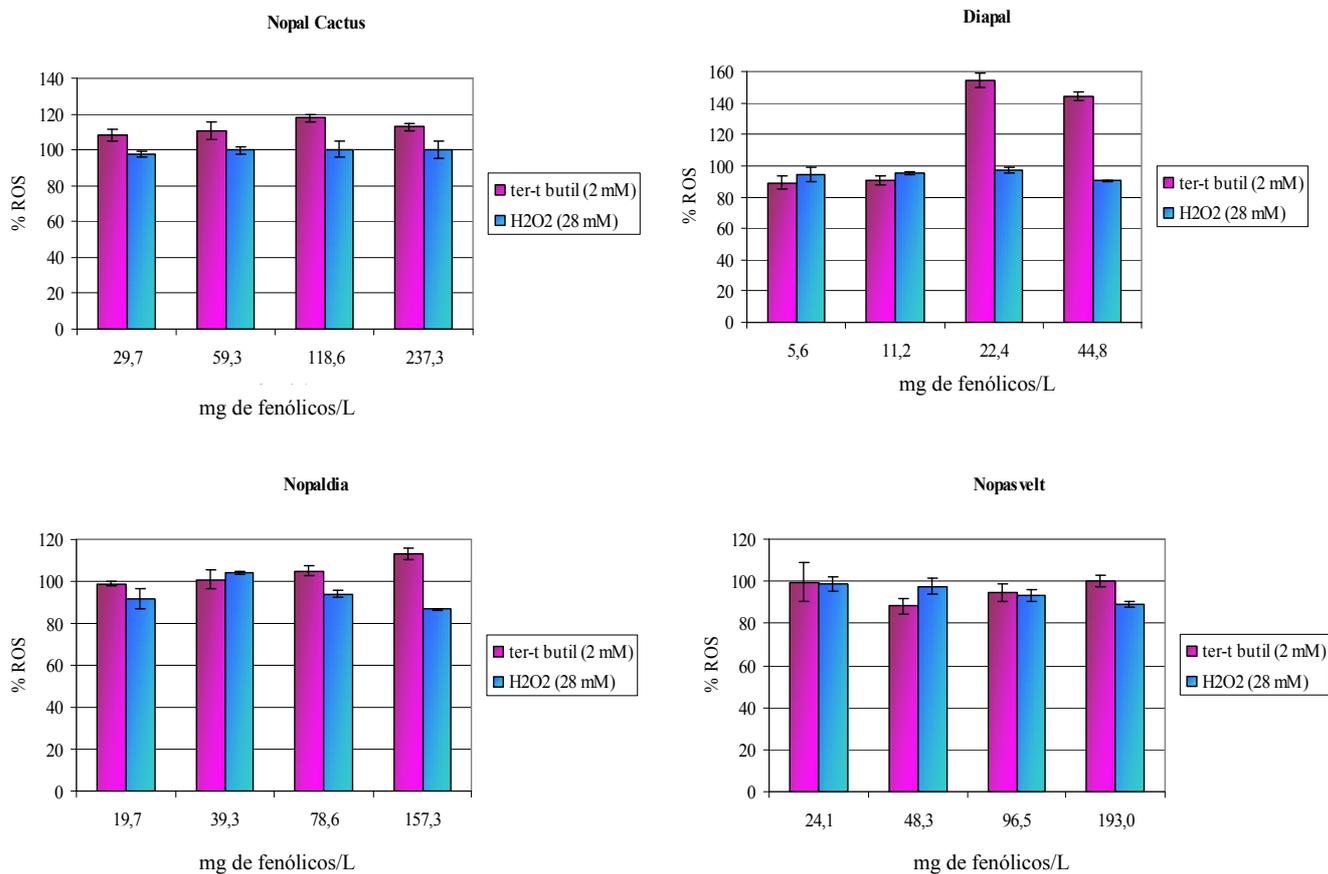


Figura 3.49: Toxicidade intracelular dos extractos etanólicos, tempo de contacto de 24 horas com as células Caco-2 (ver anexo 2-F).

Com os extractos etanólicos (figura 3.49), verificou-se resgate de ROS significativo, no Diapal, 10,1% á concentração de 5,6 mg de fenólicos/L com o indutor de stress ter-t butil; no Nopaldia 13,3% á concentração de 157,3 mg de fenólicos/L com o indutor de stress H₂O₂, enquanto no Nopasvelt verificou-se 11,8% á concentração de 48,3 mg de fenólicos/L com o indutor de stress ter-t butil e 10,8% á concentração de 193 mg de fenólicos/L com o indutor de stress H₂O₂.

Olhando de forma geral para todas as concentrações, pode-se dizer que em geral a amostra Nopasvelt é a que apresenta maior potencial no resgate de ROS, verificando-se este facto mais no extracto etanólico do que no aquoso.

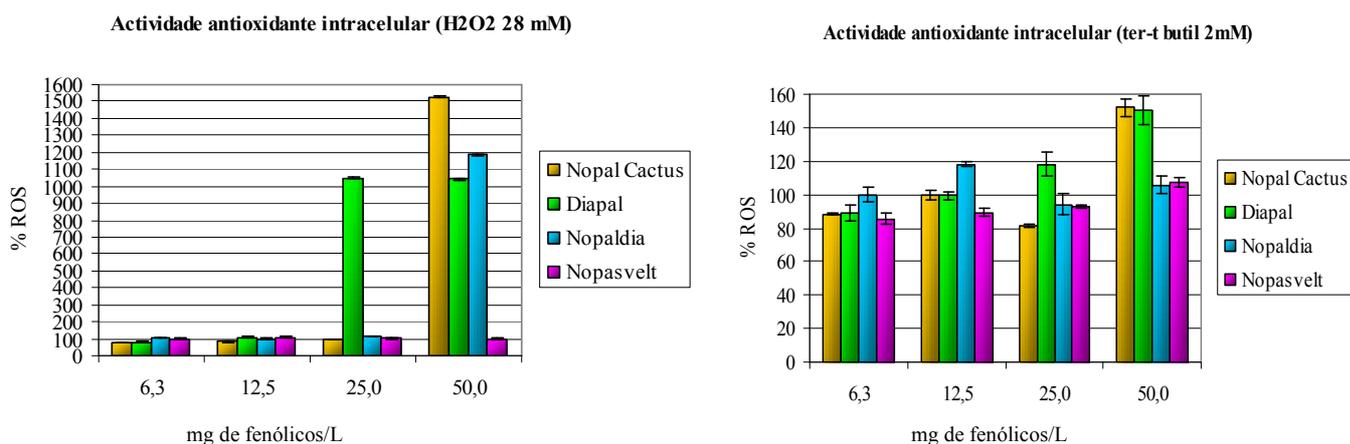


Figura 3.50: Toxicidade intracelular dos extractos hidrolisados, tempo de contacto de 24 horas com as células Caco-2 (ver anexo 2-F).

Nos extractos hidrolisados (figura 3.50 e anexo 2-F), com o indutor peróxido de hidrogénio, conseguiu-se um resgate máximo de ROS de 23,7% para a amostra N.C. e 19,4% para o Diapal á concentração de 6,3 mg de fenólicos /L. As altas percentagens de produção de ROS observadas principalmente com o indutor de peróxido de hidrogénio e a altas concentrações revela condições de stress oxidativo excessivo e morte celular causadas pela quantidade de carbonato de sódio presente nos extractos, ou porque os antioxidantes são retirados do meio celular e as ROS danificam os componentes celulares interferindo com a actividade das células e causando consequentemente morte celular (Ebadi (b), 2007).

Para o indutor de peróxido tert-butil hidróxido (figura 3.50), conseguiu-se um resgate máximo de 18,6% de ROS para a amostra N.C. á concentração de 25 mg de fenólicos/L e 11,6 % para a concentração de 6,3 mg de fenólicos/L, verificou-se 10,9% de resgate máximo para o Diapal e 14,5% para o Nopasvelt. Olhando para as várias concentrações testadas, de forma geral o Nopasvelt (cor rosa) é o extracto com mais actividade antioxidante uma vez que possui maior capacidade de resgate de ROS, nomeadamente com o indutor peróxido tert-butil hidróxido.

A capacidade de resgate de ROS dos diferentes extractos avaliada neste trabalho pode ser devido aos flavonóides anteriormente identificados no ponto 2.5, através do aparelho HPLC-DAD (370 nm), bem como devido a outros flavonóides não identificados. Contudo, trabalhos experimentais realizados por (Tian et al, 2009) sobre a permeabilidade de vários flavonóides, usando o modelo celular Caco-2, demonstraram diferenças nos mecanismos de transporte por difusão passiva. Para os

flavonóides identificados no ponto 2.5, os trabalhos de (Tian et al., 2009), revelaram que o canferol possui uma permeabilidade cerca de 2 vezes superior á da quercetina e não detectaram permeabilidade relevante da rutina. Sendo assim e segundo (Tian et al., 2009), o canferol terá mais actividade antioxidante intracelular comparadamente com os outros dois flavonóides identificados (quercetina e rutina), já que possui também maior permeabilidade. Contudo a permeabilidade instestinal passiva depende de vários factores tais como: lipofilicidade, capacidade de ligação ao hidrogénio, tamanho da molécula, entre outros, verificando-se também diferenças de mecanismos de efluxo entre os diferentes flavonóides glicosilados e não glicosilados (Tian et al., 2009).

Sendo assim a capacidade antioxidante de um composto depende muito da sua natureza, se está glicosilado ou não, bem como o seu mecanismo de efluxo que afecta a sua permeabilidade intestinal.

4 – Determinação do teor de fibra

A fibra dietética encontrada principalmente em frutos, verduras e legumes, constitui todas as partes da planta que o nosso organismo não pode digerir ou absorver. A fibra é classificada em duas categorias, a solúvel e a não solúvel em água, como descrito anteriormente. A quantidade de cada tipo de fibra presente nas plantas varia com as diferentes espécies. A fibra tem como benefícios o alívio da obstipação bem como a diminuição do risco de diabetes, doenças de coração e ajuda a perder peso. O conteúdo de fibra presente nas plantas depende da sua idade, dos fertilizantes usados bem como das práticas de armazenamento aplicadas (Stintzing et al., 2005). Pretendeu-se então avaliar o conteúdo de fibra presente em cada amostra, apresentando os resultados em percentagem por comprimido (figura 3.51).

Tabela 3.10: Resultados do ensaio da fibra e teor de planta alegado na embalagem por comprimido.

Amostra	% de planta em cada comprimido (alegado na embalagem)	Ensaio	
		% mássica de fibra média (n=3)	Desvio padrão relativo (%)
Nopal Cactus	≈ 70 %	15,6	13,5
Diapal	25 %	5,3	13,0
Nopaldia	25 %	9,3	5,0
Nopasvelt	≈ 77 %	16,9	11,0

Quantidade de fibra

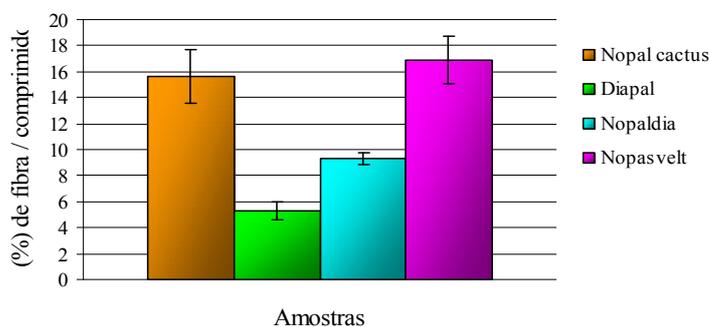


Figura 3.51: Percentagem do teor de fibra nas amostras por comprimido.

Através do ensaio da fibra observa-se que a amostra N.C. e Nopasvelt são muito semelhantes, contudo, tendo em conta a massa de cada comprimido e a toma diária recomendada, a amostra Nopasvelt é a que apresenta uma melhor fonte de fibras enquanto o Diapal apresenta o teor mais pobre.

Relacionando com a percentagem de planta alegada na embalagem (tabela 3.10) para as diferentes amostras verifica-se uma concordância de valores entre a quantidade de planta alegada na embalagem e a quantidade de fibra determinada, excepto os valores de Diapal e Nopaldia que deveriam ser mais semelhantes uma vez que a alegação é a mesma (25 % de planta por comprimido). De acordo com a percentagem de fibra determinada para as outras amostras (N.C. e Nopasvelt), os 25 % de planta supostamente presentes na amostra Diapal e Nopaldia deveriam apresentar uma percentagem de fibra de cerca de 5,5. Desta forma conclui-se que a amostra Diapal roda esse valor e que a amostra Nopaldia possui um valor acima o que pode ser explicado por uma má interpretação da rotulagem ou o teor de planta desta amostra não corresponder ao alegado na embalagem.

No entanto este método envolve muitos passos que poderá levar à perda de amostra e pode ser verificado através dos coeficientes de variação obtidos das réplicas da mesma amostra.

5 - Identificação e quantificação dos fitoesteróis

Efectuou-se a extracção dos fitoesteróis nas amostras a partir do processo de extracção indicado nos materiais e métodos, usando o colesterol como um controlo da eficiência do processo de extracção e usando o HDS como padrão interno da análise em GC. O padrão interno HDS, além de permitir o cálculo dos factores de resposta permite verificar se a análise foi bem sucedida. Depois da análise no aparelho GC, pretendeu-se identificar nas amostras os seguintes fitoesteróis: brassicasterol, stigmasterol, campesterol e beta-sitosterol, uma vez que, segundo a literatura, estes são os fitoesteróis mais encontrados na planta em estudo. Identificou-se os fitoesteróis de interesse por comparação dos tempos de retenção das amostras com a mistura de padrões, retirou-se as respectivas áreas e procedeu-se à quantificação dos mesmos usando os factores de resposta.

Para o cálculo dos factores resposta (FR) usou-se a integração das áreas dos picos da mistura de padrões e aplicou-se a equação 3.6:

$$FR = \frac{\text{Área do padrão interno} \times \text{Concentração do padrão a determinar}}{\text{Área do padrão a determinar} \times \text{Concentração do padrão interno}} \quad \text{Equação 3.6}$$

Tabela 3.11: Factores resposta obtidos no ensaio dos fitoesteróis.

Padrão:	Concentração inicial (ppm):	Factor resposta:
Colesterol	3075	0,78
Brassicasterol	1111	0,83
Stigmasterol	1089	0,94
Campesterol	1250	0,88
Beta-sitosterol	1000	0,82
HDS (padrão interno)	19900	-

Verifica-se que os factores de resposta, obtidos no ensaio (tabela 3.11), são semelhantes o que é característico de cada família de compostos.

Para a determinação da concentração de padrão em cada amostra utilizou-se os factores resposta calculados em cima e utilizou-se a fórmula anterior mas com a integração das áreas dos picos das amostras.

Como referido antes, utilizou-se o colesterol como padrão interno do processo de extracção de maneira a determinar a eficiência deste mesmo método, através da

equação 3.7, uma vez que o método de extração usado não estava otimizado para este tipo de amostras.

$$\text{Eficiência de extração} = \frac{[\text{colesterol obtida nas amostras}] \text{ em ppm}}{[\text{colesterol colocada no início do processo}] \text{ em ppm}} \times 100 \quad \text{Equação 3.7}$$

Efectuou-se 3 extrações e 3 análises em GC para cada amostra, no entanto obteve-se uma grande disparidade de valores no cálculo da eficiência de extração. Desta forma optou-se por das três extrações efectuadas para cada amostra seleccionar apenas os resultados da extração que tiveram uma eficiência mais elevada (ver cromatograma no anexo 3-D). Como os valores da eficiência de extração obtidos não corresponderam a 100% (situação ideal) de forma a tornar os resultados mais reais correlacionou-se as concentrações obtidas para uma eficiência de 100%. Sendo assim, os resultados apresentados correspondem a uma eficiência de extração de 100% (situação ideal) (figura 3.52 e tabela 3.12).

Tabela 3.12: Resultados da determinação do teor de fitoesteróis nas amostras por GC.

Amostras	Brassicasterol		Stigmasterol		Campesterol		Beta-sitosterol		Esteróis totais (mg/comprim.)	Eficiência do método de extração (%)
	(mg/comprim.)	% dos esteróis totais	(mg/comprim.)	% dos esteróis totais	(mg/comprim.)	% dos esteróis totais	(mg/comprim.)	% dos esteróis totais		
Nopal Cactus	0,1	≈ 12	0,11	≈ 13	1,6E-02	≈ 2	0,59	≈ 72	0,82	13,2
Diapal	2,4E-02	≈ 17	2,1E-02	15	2,8E-03	2	9,4E-02	≈ 67	0,14	44,5
Nopaldia	2,5E-02	≈ 11	3,3E-02	15	1,1E-02	5	0,15	≈ 68	0,22	24,5
Nopasvelt	1,8E-02	≈ 4	0,12	≈ 26	9,1E-03	≈ 8	0,26	≈ 62	0,42	22,2

Quantificação dos esteróis

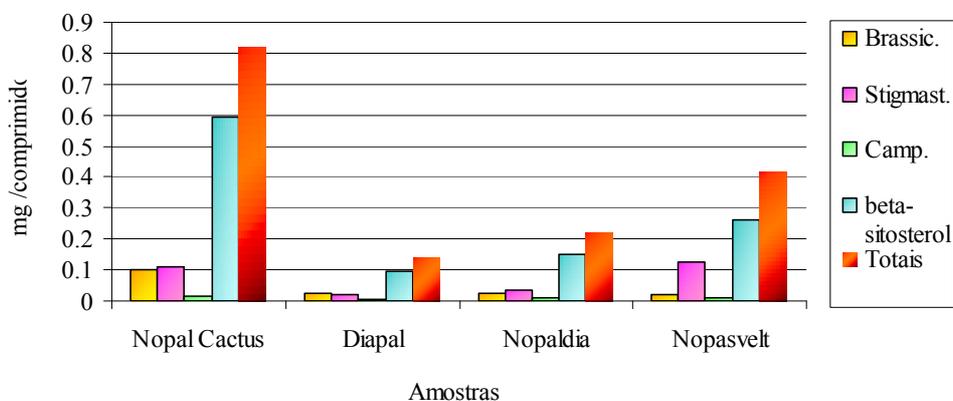


Figura 3.52: Teor de fitoesteróis determinado nas amostras por GC.

Optou-se por identificar estes quatro fitoesteróis, uma vez que segundo (Ramadan et al., 2003), são os que se encontram em maior quantidade em *Opuntia Ficus Indica*. Os mesmos autores relataram que o óleo de sementes e o óleo de polpa desta planta possuem respectivamente 72% e 49% de beta-sitosterol em relação aos esteróis totais. Através dos resultados obtidos confirmou-se que o beta-sitosterol é o que está em maior quantidade em todas as amostras, cerca de 67% (média de todas as amostras) dos esteróis totais identificados seguindo-se o stigmasterol com cerca de 17%, o brassicasterol com 11% e por fim o campesterol com apenas 4%. De acordo com o trabalho realizado por (Ramadan et al., 2003), o campesterol seria o fitoesterol com maior quantidade a seguir ao beta-sitosterol, facto que não se observou nos nossos resultados uma vez que este foi o que apresentou um menor teor excepto no caso da amostra Nopasvelt em que o teor de brassicasterol foi ainda mais inferior. Esta diferença possivelmente será devido às várias partes da planta possuírem diferenças nas concentrações de esteróis.

No que respeita aos fitoesteróis totais analisados a amostra N.C. é a que apresenta um maior teor cerca de duas vezes o teor da amostra Nopasvelt, este facto está relacionado com a massa de cada comprimido que também é cerca de 2 vezes superior. Contudo a toma diária recomendada de N.C. consiste em 1 a 2 comprimidos e a de Nopasvelt 6. Acabando por consumir maior quantidade de esteróis o consumidor que optar pela amostra Nopasvelt.

É de referir que a amostra Nopasvelt comparadamente com as restantes possui muito menor conteúdo de brassicasterol mas em contrapartida possui um maior conteúdo de stigmasterol.

O interesse de identificar e quantificar estes compostos prende-se pelo facto de muitos autores sugerirem que eles devido a serem muito similares com o colesterol diminuem a absorção deste último, competindo com ele na ligação á lipoproteína de baixa densidade (LDL) que transporta o colesterol e triglicerídeos do fígado e intestino delgado para as células e tecidos. A redução da ligação á LDL é importante para a redução do risco de doenças coronárias (Ostlund, 2007).

Segundo a FDA, um produto que reduza o risco de doença do coração através dos fitoesteróis, têm que possuir pelo menos 0,8 g de fitoesteróis numa toma diária. Ou seja, segundo a FDA e tendo em consideração a toma diária das amostras analisadas, estas não poderiam ser consideradas como redutoras do risco de doença coronária. Nas amostras em estudo a maior quantidade de fitoesteróis obtida numa

toma diária é de aproximadamente 2,5 mg para a amostra Nopasvelt, sendo esta a amostra com maior probabilidade de acção contra a doença de aterosclerose.

CAPÍTULO 4:
CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

Neste trabalho avaliou-se os constituintes fenólicos nomeadamente os flavonóides por possuírem elevada actividade antioxidante, o teor em fibra e o teor em fitoesteróis por possuírem um enorme leque de propriedades benéficas à saúde. Uma vez que os resultados obtidos na quantificação do teor de compostos fenólicos totais das amostras através do método de Folin-Ciocalteu se correlacionam melhor com os resultados obtidos na determinação da actividade antioxidante através do método ORAC, optámos por representar nos dados gerais (figura 4.53) os resultados obtidos por estes dois métodos dentro das opções testadas.

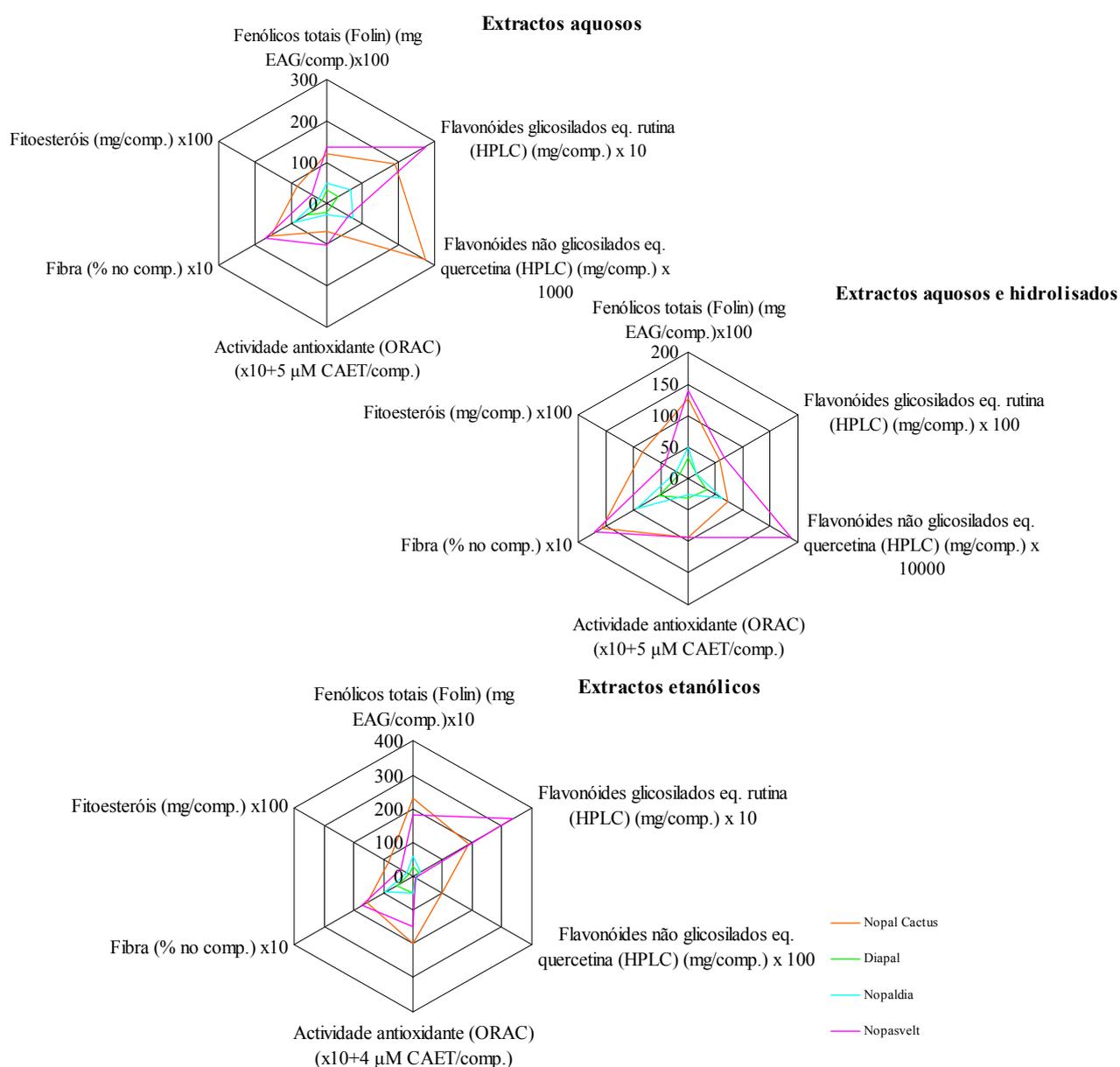


Figura 4.53: Comparação dos vários resultados obtidos para as amostras nos diferentes tipos de extractos.

Em conclusão desta análise, tendo em conta os vários parâmetros analisados neste trabalho para as diferentes amostras em estudo e apresentando os resultados por comprimido (figura 4.53) verificou-se que a amostra Nopasvelt é a que possui um maior teor de fibra, contudo quanto ao teor de fitoesteróis prevalece a amostra N.C.. Em relação aos extractos, a amostra Nopasvelt revela maiores teores e consequentemente melhores benefícios ao organismo em extractos aquosos e aquosos hidrolisados, enquanto nos extractos etanólicos prevalece a amostra N.C., sendo a amostra Diapal, a menos concentrada uma vez que apresenta um teor mais pobre dos vários parâmetros em todos os tipos de extractos estudados.

Este trabalho permitiu avaliar e comparar entre si diferentes suplementos alimentares derivados da mesma planta (*Opuntia ficus indica*) á venda no mercado mundial, de diferentes marcas e produtores. As comparações foram efectuadas em termos das indicações alegadas nas embalagens bem como das suas composições e potenciais propriedades farmacológicas, concluindo-se de facto que existem produtos no mercado que apesar de possuírem a mesma descrição no rótulo, apresentam composições diferentes. Dos produtos estudados neste trabalho, alguns referem-se, no rótulo, ao extracto seco da planta enquanto outros se referem simplesmente à planta e outros referem as duas o que leva a interpretações controversas quanto à composição dos produtos. Desta forma, no sentido de ultrapassar este problema, a legislação deveria ser mais objectiva e os próprios produtores deveriam ter mais formação e orientação para saber qual a base a que devem referir-se aquando da descrição no rótulo. Os produtos não se encontram standardizados uma vez que os critérios técnicos, métodos, processos e práticas relativamente ao produto também não se encontram padronizados. Também se verifica que as tomas recomendadas para cada produto não estão relacionadas com as suas composições relativas, verificando-se uma grande disparidade de valores. Quanto ao processo de fabrico dos produtos analisados, o facto de umas amostras possuírem mais compostos glicosilados e outras mais não glicosilados, leva-nos a concluir que os processos são diferentes e em alguns casos o processo de fabrico leva à desglicosilação dos compostos.

Se estas diferenças se verificam nestas quatro amostras de produtos derivados de *Opuntia*, seleccionados para este trabalho, é espectável que casos similares aconteçam também noutros suplementos alimentares derivados de outras plantas. Estas diferenças podem acarretar consigo riscos para a saúde tendo em conta o aumento do poder de compra e o envelhecimento da população, que leva ao consumo,

por vezes exagerado deste tipo de produtos. É então extremamente necessário investir na padronização e na definição de critérios de qualidade, composição e eficácia dos suplementos, bem como na formação de pessoas qualificadas e aptas para a avaliação rigorosa dessas regulamentações e critérios.

Em relação às perspectivas futuras, os resultados obtidos *in vitro* demonstram que os extractos naturais provenientes de *Opuntia ficus indica* têm potenciais aplicações importantes tanto na indústria alimentar como em uso medicinal devido ao alto conteúdo de compostos fenólicos, nomeadamente flavonóides que possuem uma forte actividade antioxidante demonstrada neste estudo, bem como devido ao conteúdo de fibras e fitoesteróis que possuem relevância no combate de doenças diabéticas e de coração. Desta forma sugere-se o aprofundamento da pesquisa científica neste campo e posteriormente estudos *in vivo* com o objectivo de colocar no mercado mais produtos naturais com aplicações cientificamente testadas e comprovadas, de acordo com as regulamentações indicadas para esses produtos e de acordo com as alegações indicadas para o produto de forma a assegurar o consumo dos mesmos.

CAPÍTULO 5:
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ayadi M.A., Abdelmaksoud W., Ennouri M., Attia H.; Cladodes from *Opuntia ficus indica* as a source of dietary fiber: Effect on dough characteristics and cake making; *Industrial Crops and Products*, vol. 30, 40–47 (2009)
- Bandaranayake W. M.; Quality Control, Screening, Toxicity, and Regulation of Herbal Drugs; Modern Phytomedicine; *Turning Medicinal Plants into Drugs*; Edited by Iqbal Ahmad, Farrukh Aquil and Mohammad Owais; cap. 2; pág. 25-53 (2006)
- Barata J.; Terapêuticas Alternativas de Origem Botânica - Efeitos Adversos e Interações Medicamentosas; *Lidel* (2008)
- Barwick V. J.; Sources of uncertainty in gas chromatography and high-performance liquid chromatography Review; *J. Chromatogr. A*; 849 13–33 (1999)
- Bloor J. S.; Overview of Methods for Analysis and Identification of Flavonoids; Flavonoids and Other Polyphenols; Methods in Enzymology; *Lester Packer*; Volume 335 (2001)
- Brackett R. E.; The Regulation of Dietary Supplements: A Review of Consumer Safeguards; Center for Food Safety and Applied Nutrition, *Food and Drug Administration*; March 9 (2005)
- Bravo M.N., Silva S., Coelho A.V., Vilas Boas L., Bronze M.R.; Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal; *Analytica Chimica Acta*; 563, 84–92 (2006)
- Bugno A., Buzzo A. A., Nakamura C. T., Pereira T. C., Matos D., Pinto T. J. A.; Avaliação da contaminação microbiana em drogas vegetais; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*; vol. 41, n. 4 (2005)
- Bush T. M., Rayburn K. S., Holloway S. W., et al.; Adverse interactions between herbal and dietary substances and prescription medications: a clinical survey. *Altern Ther Health Med.*; 13(2):30-35 (2007)
- Byrne, B. E.; Drug interactions: a review and update; *Endodontic Topics*; 4, 9–21 (2003)
- Calapai G.; European legislation on herbal medicines: a look into the future; *Drug Safety*; 31(5), 428-431 (2008)
- Cott, J.; Interaction of herbs with other Medicines; The example of St John's wort; Dietary Supplements of Plant Origin; A nutrition and health approach; *Taylor & Francis* (2003)
- De Smet, P. A. G. M.; Drug Therapy (Review Article); *The New England Journal of Medicine*; Vol. 347, No.25; December 19 (2002)

- Duarte, I.; Estudo de um sistema sulfona-amina como pró-farmaco para aminas: aplicações de técnicas separativas na sua caracterização, relatório de estágio, Novembro (2005)
- Ebadi, M. (a); Herb-drug interactions; Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine; *Taylor & Francis*, second edition; 4, pág. 37 (2007)
- Ebadi, M. (b); Dietary Antioxidants; Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine; *Taylor & Francis*, second edition; 8, pág. 109-110 (2007)
- Ebadi, M. (c); Vitamins and Diet; Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine; *Taylor & Francis*, second edition; 66, pág. 628 (2007)
- Ebadi, M. (d); Plants and Diabets; Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine; *Taylor & Francis*, second edition; 52, pág. 499 (2007)
- Ebadi, M. (e); Ulcer Therapy with Herbal Medicine; Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine; *Taylor & Francis*, second edition; 64, pág. 593 (2007)
- EMA; Committee on Herbal Medicinal Products (HMPC); European Medicines Agency; 9 March (2009)
- Ennouri, H. F., Bourret E., Zeghal N., Guermazi F. and Attia H.; Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats; *Bioresource Technology*; 971382–1386 (2006)
- Ennouri, H. F., Bourret E., Zeghal N., Guermazi F. and Attia H.; Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of seed supplemented diet on rats; *Bioresource Technology*; 97 2136–2140 (2006)
- Farmacopeia Americana; “561 Articles of Botanical Origin/ Chemical tests”; página 2086 (2003)
- Farmacopeia Europeia; Ginkgo Leaf, monographs 01/2005:1828; pág. 1657-1658 (2005)
- Feliciano R. P., Bravo M. N., Pires M. M., Serra A. T., Duarte C. M., Villas Boas L. e Bronze M. R.; Phenolic Content and Antioxidant Activity of Moscatel Dessert Wines from the Setúbal Region in Portugal; *Food Anal. Methods*; 2:149–161 (2009)
- Felício J. A.; Estudo de Mercado Consumo de Suplementos Alimentares em Portugal (estudo desenvolvido para a ASAE); Centro de Estudos de Gestão; Universidade Técnica de Lisboa (2006)

- Fernandez M. L., Lin E. C. K., Trejo A. and McNamara D. J.; Prickly Pear (*Opuntia* sp.) Pectin Alters Hepatic Cholesterol Metabolism without Affecting Cholesterol Absorption in Guinea Pigs Fed a Hypercholesterolemic Diet; *Biochemical and Molecular Roles of Nutrients*; 817-824 (1994)
- Fitó M., Torre R. D. L., Covas M. I.; Olive Oil and Oxidative Stress (Review); *Molecular Nutrition & Food Research* , 51, 1215-1224 (2007)
- Foot J. C., B.A., B.A., M.S.; The Microbiological Evaluation of Chamomille; Dissertation in Food and Nutrition; Texas Tech University (2002)
- Frade R. F. M., Matias A., Branco L. C., Afonso C. A. M. and Duarte C. M. M., Effect of Ionic Liquids on Human Colon Carcinoma Ht-29 and Caco-2 Cell Lines, *Green Chem.*, , 9, 873 – 877 (2007)
- Fragoso R. L., Reyes-Esparza J., Burchiel S. W., Herrera-Ruiz D., Torres E.; Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico; *Toxicology and Applied Pharmacology*; 227 125–135 (2008)
- Galati E. M., Tripodo M. M., Trovato A., Miceli N. and Monforte M. T.; Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter: Note I: diuretic activity; *Journal of Ethnopharmacology*; 79, 17–21(2002)
- Galati E. M., Mondello M. R., Giuffrida D., Dugo G., Miceli N., Pergolizzi S. and Taviano M. F.; Chemical Characterization and Biological Effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. Fruit Juice: Antioxidant and Antiulcerogenic Activity; *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 51, No. 17 (2003)
- Ganji S. H., Kamanna V. S. and Kashyap M. L.; Niacin and cholesterol: role in cardiovascular disease (review); *Journal of Nutritional Biochemistry*; 14, 298–305 (2003)
- Gentile C., Tesoriere L., Allegra M., Livrea M. A. and D'Alessio P.; Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression; *Annals New York Academy Sciences*; 1028, 481–486 (2004)
- Ghica M.-E. and Brett A. M. O.; Electrochemical Oxidation of Rutin; *Electroanalysis*; 17(4), 313-318 (2005)
- González T. A., Gabriel-Ortiz G., Puebla-Pérez A. M., Huízar-Contreras M. D., Munguía-Mazariegos M. D. R., Mejía-Arreguín S. and Calva E.; A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats; *Journal of Ethnopharmacology*; 55, 27-33 (1996)

- Griffith M. P.; The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence; *American Journal of Botany*, 91(11): 1915–1921 (2004)
- Gulati O. P. and Ottaway P. B.; Legislation relating to nutraceuticals in the European Union with a particular focus on botanical-sourced products; *Toxicology*; 221 75–87 (2006)
- Gutierrez M. A.: Medicinal Use Of The Latin Food Staple Nopales: The Prickly Pear Cactus; *Nutrition Bytes*, Volume 4, Issue 2 (1998)
- Halliwell B. and Whiteman M.; Measuring Reactive Species and Oxidative Damage in Vivo and in Cell Culture: How Should You Do It and What Do the Results Mean?; *British Journal of Pharmacology*; 142, 231–255 (2004)
- Hovenkamp E., Demonty I., Plat J., Lutjohann D., Mensink R. P., Trautwein E. A.; Biological effects of oxidized phytosterols: A review of the current knowledge Review; *Progress in Lipid Research* 47, 37–49 (2008)
- Huang D., Ou B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J. A., Prior R. L.; High-Throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format; *J. Agric. Food Chem.*, 50, 4437-4444 (2002)
- Janick J. and Paull R. E.; *Opuntia ficus-incica* cactus pear; Cactaceae (C), *The Encyclopedia of Fruit & Nuts*, pág. 216 (2008)
- Kaliora A. C., Dedoussis G. V., Schmidt H.; Dietary antioxidants in preventing atherogenesis (Review); *Atherosclerosis*; 187, 1–17 (2006)
- Kuhn M. A.; Herbal Remedies: Drug-Herb Interactions; *Critical Care Nurse*; Vol 22, No. 2 (2002)
- Liu R. H.; Potential Synergy of Phytochemicals in Cancer Prevention: Mechanism of Action; *J. Nutr.* 134: 3479S–3485S, (2004)
- Loew D. and Kaszkin M.; Approaching the Problem of Bioequivalence of Herbal Medicinal Products; Review Article; *Phytotherapy Research*; Volume 16 Issue 8, Pages 705 – 711 (2002)
- LUSA; Um terço dos portugueses usa medicamentos naturais, que originam milhares de notificações; - *Agência de Notícias de Portugal*, S.A.; 12 de Abril; (2008)
- Martínez-Flórez S., González-Gallego J., Culebras J. M. y Tuñón M. J.; Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes (Revisión); *Nutr. Hosp.*; 17 (6); 271-278 (2002)

Matias A. A. F.; Desenvolvimento de Óleos Alimentares Funcionais – da Ciência à aplicação; Laboratório de Nutracêuticos e Liberação Controlada, ITQB, Julho (2008)

Maurício M.; Mais de metade das portuguesas estão em dieta permanente; *Público.pt* (2008)

Mcconn M. M. and Nakata P. A.; Oxalate Reduces Calcium Availability in the Pads of the Prickly Pear Cactus through Formation of Calcium Oxalate Crystals; *J. Agric. Food Chem.*, 52, 1371-1374 (2004)

Mucksavage J. J. and Lingtak-Neander C.; Dietary Supplement Interactions With Medication; *Handbook of Drug-Nutrient Interactions*; 11, 217-240 (2004)

Oganesyan É. T., Shinkarenko A. L. , Simonyan A. V. and Frolova V. I. ; Determination of The Molecular Weight of flavonoids; *Chesmistry of Natural Compounds*; Volume 8, Number 1 / January page 51-52 (1972)

Okunlola A., Babatunde A. A. and Oluwatoyin A. O.; Evaluation of Pharmaceutical and Microbial Qualities of Some Herbal Medicinal Products in South Western Nigeria; *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*; 6 (1): 661-670 (2007)

Ostlund R. E. Jr; Phytosterols, Cholesterol Absorption and Healthy Diets; *Lipids* 42:41–45 (2007)

Ottaway P. B.; Dietary Supplements, Nutraceuticals & Functional Foods In Europe; *Nutraceuticals World* (2002)

Ou B., Hampsch-Woodill M. and Prior R. L.; Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe; *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4619-4626 (2001)

Ou, B., Hampsch-Woodill M., Flanagan J., Deemer E. K., Prior R.L. and Huang D.; Novel Fluorometric Assay for Hydroxyl Radical Prevention Capacity Using Fluorescein as the Probe, *J. Agric. Food Chem.*, 50, 2772-2777 (2002)

Patel M. D.; P.D. Thompson; Phytosterols and vascular disease; *Atherosclerosis* 186 12–19 (2006)

Pérez-Jiménez J., Arranz S., Tabernero M., Díaz- Rubio M. E., Serrano J., Goñi I. and Saura-Calixto F.; Updated Methodology to Determine Antioxidant Capacity in Plant Foods, Oils and Beverages: Extraction, Measurement and Expression of Results; *Food Research International*, 41, 274-285 (2008)

Pinto M., Robine-Leon S. and Appay M. D.; Enterocyte-Like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture, *Biol. Cell.*, 47, 323–330 (1983)

- Ramadan M. F. and Mörsel J.-T.; Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: a good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols; *Food Chemistry*; 83 447–456 (2003)
- Ramadan M. F. and Mörsel J.-T.; Oil cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L.); *Food Chemistry*; 82:339-345 (2003)
- Ramadan M. F. and Mörsel J.-T.; Lipid profile of prickly pear pulp fractions; *Food, Agriculture & Environment*; Vol.1(2), 66-70 (2003)
- Ramulu P. and Rao P. U.; Total, insoluble and soluble dietary fiber contents of Indian fruits; *Journal of Food Composition and Analysis*; Volume 16, Issue 6, , Pages 677-685 December (2003)
- Sáenz C., Sepúlveda E. and Matsuhira B.; *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives; *Journal of Arid Environments*; 57, 275–290 (2004)
- Santos A. C., Oliveira S., Águas S., Monteiro C., Palma M. L., Martins A. P. e Costa M. C.; Recolha de dados sobre consumo de medicamentos e/ou suplementos à base de plantas medicinais numa amostra da população de Lisboa e Vale do Tejo; *Rev. Lusofona de Ciências e Tecnologias da Saude*; (5) 2: 128-141 (2008)
- Serra A. T., Matias A. A., Nunes A. V. M., Leitão M. C., Brito D., Bronze R., Silva S., Pires A., Crespo M. T., Romão M. V. S. and Duarte C. M.; In vitro evaluation of olive- and grape-based natural extracts as potential preservatives for food; *Innovative Food Science and Emerging Technologies*; 9, 311-319 (2008)
- Shane-McWhorter L.; Biological Complementary Therapies: A Focus on Botanical Products in Diabetes; *Diabetes Spectrum*; Volume 14, Number 4, 199-208 (2001)
- Singleton V. L. and Rossi J. A.; Colorimetry of Total Phenolics with Phosphor-Molybdicphosphotungstic Acid Reagents, *Am. J. Enol. Vitic.*, 16, 144-158 (1965)
- Sorg O.; Oxidative stress: A theoretical model or a biological reality; *C. R. Biologies*; 327:649-662 (2004)
- Spiller R. C.; Pharmacology of dietary fibre; *Pharmacology & Therapeutics*; Volume 62, Issue 3, 1994, Pages 407-427
- Staprans I., Pan X. M., Rapp J. H., Feingold K. R.; The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis; *Mol. Nutr. Food Res.*, 49, 1075 – 1082 (2005)

- Stintzing F. C. and Carle R.; Cactus Stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses; *Mol. Nutr. Food Res.*; 49, 175-194 (2005)
- Tarozzi A., Marchesi A., Cantelli-Forti G. and Hrelia P.; Cold-Storage Affects Antioxidant Properties of Apples in Caco-2 Cells; Nutrient Metabolism; *Journal of Nutrition*; 1105-1109 (2004)
- Tawfik W. A., Abdel-Azim N. S., Shahat A.-A. A., Hassan N. M., Ismail S. I. and Hammouda F. M.; Chemical Investigation of *Opuntia tuna* Mill Growing in Egypt, *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3(1): 96-102 (2009)
- Tian X.-J., Yang X.-W., Yang X., Wang K.; Studies of intestinal permeability of 36 flavonoids using Caco-2 cell monolayer model; *International Journal of Pharmaceutics*; 367, 58–64 (2009)
- Toivo J., Phillips K., Lampi A.-M., Piironen V.; Determination of Sterols in Foods: Recovery of Free, Esterified, and Glycosidic Sterols; *Journal of Food Composition and Analysis*; 14, 631-643 (2001)
- Verleyen T., Verhe R., Garcia L., Dewettinck K., Huyghebaert A. and Greyt W. D.; Gas chromatographic characterization of vegetable oil deodorization distillate; *Journal of Chromatography A*; 921, 277-285 (2001)
- Wang H.X. and Ng T.B.; Natural Products With Hypoglycemic Hypotensive, Hypocholesterolemic, Antiatherosclerotic and Antithrombotic Activities (Minireview); *L & Sciences*, Vol. 65. No. 25, pp. 2663~2677 (1999)
- Wolfe K. L. and Liu R. H.; Cellular Antioxidant Activity (Caa) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements; *J Agric Food Chem.*, , 55, 8896-907 (2007)
- Yang J., Guo J. and Yuan J.; In vitro antioxidant properties of rutin; *LWT*; 41, 1060–1066 (2008)
- Yokomizo A. and Moriwaki M.; Effects of Uptake of Flavonoids on Oxidative Stress Induced by Hydrogen Peroxide in Human Intestinal Caco-2 Cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 70, 1317-1324 (2006)
- Yusuke A., Watanabe S., Kimira M., Shimoi K., Mochizuki R. and Kinae N.; Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration; *Journal of Nutrition*; 130:2243-2250 (2000)

ANEXO 1

A - Características dos suplementos alimentares escolhidos para este trabalho

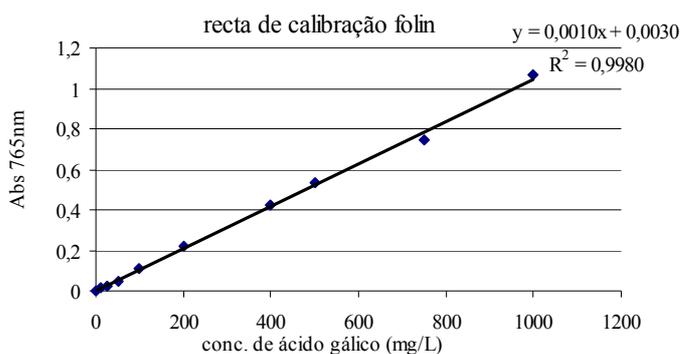
Nome do suplemento:	Nopal Cactus	Diapal	Nopaldia	Nopasvelt
Ingredientes por cada compr.:	Cálcio folha de Prickly Pear 1g celulose microcristalina fosfato de cálcio ácido esteárico bióxido de silício coloidal goma de celulose modificada	Extract. seco (4:1) de Opuntia ficus-indica (Nopal) (Fibras) 25% Gelificante: cellulose microcristalina Anti-aglom.: Amido de trigo, Fosfato tricálcio, Esterato de Magnésio	E1201 Extrac. seco concentr. (4:1) Opuntia ficus-indica Nopal (Extract. eq. a 500 mg) 25% Anti-aglom.: E 341 Lactose Anti- aglom. E 553b	Nopal em pó (500 mg) Antiaglom.: celulose, sílica coloidal; Ag. volume: etilcelulose.
Função:	Regula os níveis de glucose Equilibra os fluidos e electrólitos	Acção benéfica ao nível do pâncreas e fígado Regula o nível de açúcar no sangue	Regula o nível de açúcar no sangue Melhora o funcionamento digestivo	Capta as gorduras afinando a silhueta Desacelera o processo de digestão e reduz o apetite
Apresentação:	60 compr. de 1500 mg	90 compr. de 500 mg	300 compr. de 500 mg	120 compr. de 650 mg
Modo de tomar:	1 compr. á refeição c/ 8 copos de água	2 compr. antes da refeição c/ 1 copo de água	2 compr. antes da refeição c/ 2 copos de água	2 compr. antes da refeição c/ 1 copo de água
Dose diária:	1-2 compr.	6 compr.	6 compr. (3000 mg de Nopal)	6 comp. (3000 mg de Nopal)
Preço:	12,28€	12,66€	29.90€	27,31€
Embalagem:				

ANEXO 2

A - Preparação da solução de Na₂CO₃

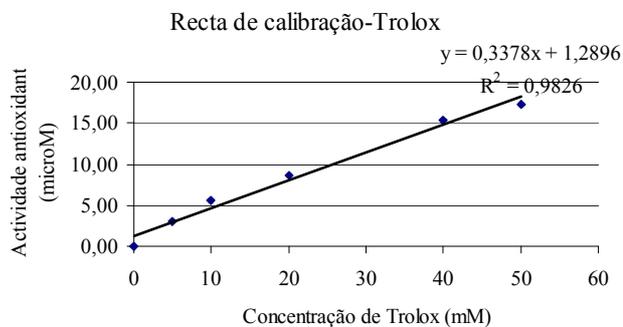
- Dissolveu-se 200 g de Na₂CO₃ anidro (PRONALAB, Portugal) em 800 ml de água bidestilada.
- Levou-se a solução á ebulição e deixou-se arrefecer.
- Adicionou-se mais 15,5 g de Na₂CO₃ para saturação.
- Deixou-se repousar 24 horas.
- Filtrou-se e adicionou-se água bidestilada até perfazer 1 litro de volume.

B - Recta de calibração do ácido gálico (ensaio Folin-Ciocalteu)



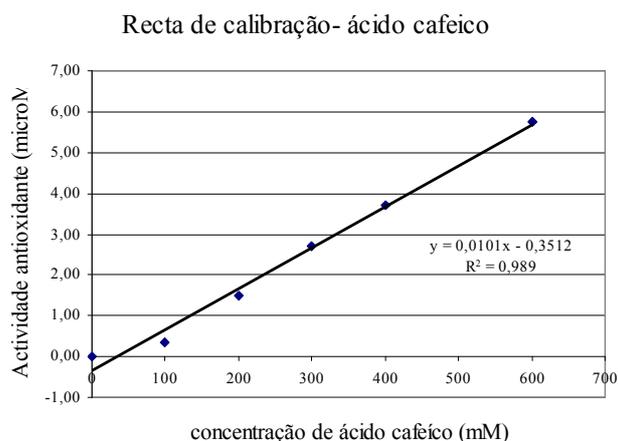
Concent. (mg/L)	Abs 765nm			média
	ensaio 1	ensaio 2	ensaio 3	
0	-	-	-	0
12.5	0.028	0.011	0.017	0.019
25	0.03	0.027	0.024	0.027
50	0.046	0.046	0.052	0.048
100	0.096	0.12	0.12	0.112
200	0.219	0.221	0.221	0.220
400	0.389	0.444	0.448	0.427
500	0.52	0.547	0.534	0.534
750	0.784	0.678	0.772	0.745
1000	0.997	1.204	1.004	1.068

C - Recta de calibração do Trolox (ensaio ORAC)



Concen. Trolox (mM)	Activid. Antioxid. (µM)	Desvio padrão relativo (%), n=3
5	3,02	4,7
10	5,66	1,7
20	8,63	1,2
40	15,36	1,6
50	17,30	0,8

D - Recta de calibração do ácido cafeíco (ensaio HORAC)



Concen. ácido cafeíco(mM)	Activid. Antioxid. (μM)	Desvio padrão relativo (%), n=3
100	0,00	12,0
200	1,48	16,4
300	2,71	22,0
400	3,71	7,3
600	5,76	8,1

E - Resultados de avaliação da toxicidade celular nos diferentes extractos

Nopal Cactus (água)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	105.0	2.2	89.3	3.7
12.5	102.1	2.2	96.4	5.7
25.0	103.5	3.3	97.8	3.7
25.6	102.1	2.4	103.0	7.5
50.0	100.0	3.9	92.8	4.1
51.2	85.9	6.3	94.2	1.5
102.3	97.2	3.6	94.6	0.9
204.6	97.6	0.8	85.2	5.6

Diapal (água)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	102.0	1.8	79.6	0.6
12.5	97.8	2.6	86.3	1.2
25.0	96.9	4.8	101.8	2.1
26.8	101.0	3.9	90.4	4.7
50.0	96.8	4.6	96.5	3.2
53.6	101.8	0.4	97.8	3.6
107.2	97.5	10.4	76.7	5.4
214.4	82.7	7.4	74.2	3.3

Nopaldia (água)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	108.1	0.8	105.1	3.8
12.5	103.0	3.3	110.3	2.3
19.7	89.0	4.9	89.4	3.3
25.0	100.6	2.5	101.5	4.3
39.3	82.3	9.5	104.7	7.1
50.0	99.6	1.2	92.6	3.1
78.6	93.9	2.2	103.2	2.9
157.3	100.6	2.0	103.0	0.7

Nopasvelt (água)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	89.3	5.6	94.0	3.0
12.5	104.4	3.4	105.6	3.6
24.1	103.5	12.0	105.2	0.0
25.0	98.4	4.5	100.9	10.9
48.3	84.6	5.7	104.4	3.4
50.0	98.9	2.0	82.5	9.8
96.5	103.0	6.5	79.8	11.5
193.0	91.0	1.8	86.7	0.0

Nopal Cactus (etanol)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
29.7	104.6	1.2	96.5	4.6
59.3	104.3	0.9	98.4	11.0
118.6	104.0	0.7	100.1	3.3
237.3	104.9	2.7	97.1	3.8

Diapal (etanol)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
24.9	103.8	3.5	98.3	1.4
49.8	91.2	0.0	96.7	4.5
99.6	98.2	1.6	90.6	5.1
199.1	92.2	1.6	93.4	2.5

Nopaldia (etanol)			Nopaldia (etanol)		
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)		% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		0	100.0	
5.6	99.7	0.5	18.9	104.9	1.7
11.2	97.7	0.5	37.8	103.4	4.6
22.4	94.0	0.9	75.6	99.4	3.9
44.8	99.0	1.0	151.1	84.8	0.7

Nopasvelt (etanol)		
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0	
20.5	105.2	2.1
40.9	103.5	3.6
81.9	94.8	8.9
163.8	105.8	1.0

Nopasvelt (etanol)		
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0	
30.7	109.3	4.8
61.4	109.2	0.6
122.8	100.2	1.2
245.6	101.5	4.2

Nopal Cactus (hidrólise)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	97.5	1.1	89.6	5.9
12.5	88.6	3.7	80.3	1.7
25.0	91.9	1.4	50.4	6.0
50.0	86.9	2.1	2.2	1.4

Diapal (hidrólise)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	6.3	87.4	3.0	91.7
12.5	12.5	83.2	2.8	83.8
25.0	25.0	74.9	3.0	91.9
50.0	50.0	5.9	7.7	1.4

Nopaldia (hidrólise)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	101.1	3.4	93.5	4.0
12.5	87.1	2.0	82.6	3.6
25.0	84.3	1.2	2.1	1.5
50.0	72.6	0.7	2.4	7.7

Nopasvelt (hidrólise)				
Conc. (mg/L) (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100.0		100.0	
6.3	92.2	4.9	105.2	8.6
12.5	98.4	1.2	81.2	6.5
25.0	84.5	2.9	94.1	6.2
50.0	76.7	2.8	80.6	3.3

% de solução saturada de Na ₂ CO ₃ (n=3)	pré-incubação de 4h		pré-incubação de 24h	
	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)	% Cel. viáveis	Desvio padrão relativo (%)
0	100,0		100,0	
7,8	129,2	4,2	2,9	10,3
15,6	73,8	21,6	2,4	10,0
31,3	5,5	0,6	2,9	5,8
7,8	129,2	4,2	2,9	10,3

F - Resultados de avaliação da toxicidade intracelular (ensaio stress oxidativo) nos diferentes extractos

Nopal cactus (água)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	105,7	0,5	116,9	1,5
12,5	110,3	7,1	108,4	5,6
25,0	112,2	4,4	112,9	1,6
25,6	110,5	2,2	120,5	2,1
50,0	124,8	4,9	94,1	3,5
51,2	107,2	4,1	118,1	3,9
102,2	107,2	5,3	111,3	0,3
204,6	111,0	0,7	107,3	1,1

Diapal (água)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	95,5	1,1	113,5	4,7
12,5	98,5	3,4	104,2	1,8
25,0	97,5	1,9	93,1	2,7
26,8	106,8	4,3	121,5	4,9
50,0	106,3	1,2	106,9	0,3
53,6	107,5	2,0	123,4	2,9
107,2	105,7	1,1	116,3	3,5
214,4	101,8	1,4	107,0	2,0

Nopaldia (água)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	95,9	4,9	111,6	2,8E-03
12,5	108,5	3,6E-02	116,1	3,7
19,7	104,8	3,7	139,3	4,5
25,0	103,2	4,8	115,0	0,2
50,0	115,4	5,0	114,4	1,8
78,6	107,5	3,0	133,5	4,6
157,3	122,6	8,0	137,7	0,4

Nopasvelt (água)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	92,2	3,0	107,9	5,0
12,5	86,7	4,2	104,9	4,2
25,0	95,8	4,6	104,0	2,7
50,0	96,9	2,8	104,0	8,1
193,0	100,2	3,1	122,6	8,5

Nopal Cactus (etanol)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
29,7	108,4	3,5	97,7	1,3
59,3	110,6	4,9	100,0	2,1
118,6	117,8	1,9	100,2	4,4
237,3	113,0	2,1	99,9	4,8

Diapal (etanol)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
5,6	89,1	4,0	94,6	2,7
11,2	90,6	2,8	95,5	3,5
22,4	154,6	4,8	97,0	1,3
44,8	144,3	2,4	90,4	5,9

Nopaldia (etanol)					Nopasvelt (etanol)				
Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)		Concentração de fenólicos (mg/L) (n=3)	Ter-t butil (2mM)		H2O2 (28 mM)	
	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)		% de ROS	Desvio padrão relativo (%)	% de ROS	Desvio padrão relativo (%)
19,7	99,0	1,2	91,9	4,7	24,1	99,7	9,4	98,6	3,3
39,3	100,9	4,3	104,5	0,7	48,3	88,2	3,6	97,6	3,6
78,6	105,0	2,5	94,0	1,6	96,5	94,6	4,0	93,3	2,6
157,3	112,9	2,8	86,7	0,5	193,0	100,4	2,7	89,2	1,4

Amostras (água) hidrolisadas								
Conc. de polif. (mg/L)	Ter-t butil (2 mM)							
	Nopal Cactus		Diapal		Nopaldia		Nopasvelt	
	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	88,4	0,2	89,1	4,6	99,8	4,4	85,5	3,4
12,5	99,6	2,7	99,5	2,5	117,9	1,4	89,3	2,5
25	81,4	0,9	118,3	7,0	94,4	6,4	93,3	0,9
50	151,9	5,6	150,3	8,6	105,7	5,3	107,1	3,1

Amostras (água) hidrolisadas								
Conc. de polif. (mg/L)	H2O2 (28 mM)							
	Nopal Cactus		Diapal		Nopaldia		Nopasvelt	
	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)	% ROS	Desvio padrão relativo (%)
6,3	76,3	1,9	80,6	1,5	105,5	4,1	98,0	3,5
12,5	85,4	4,5	107,4	4,4	96,2	4,6	109,4	0,8
25	96,9	0,2	1048,1	2,6	116,0	1,4	103,5	4,7
50	1527,9	2,4	1040,1	4,3	1184,3	2,6	98,8	3,2

ANEXO 3

A - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (280 nm) utilizando o método mais curto

Legenda:

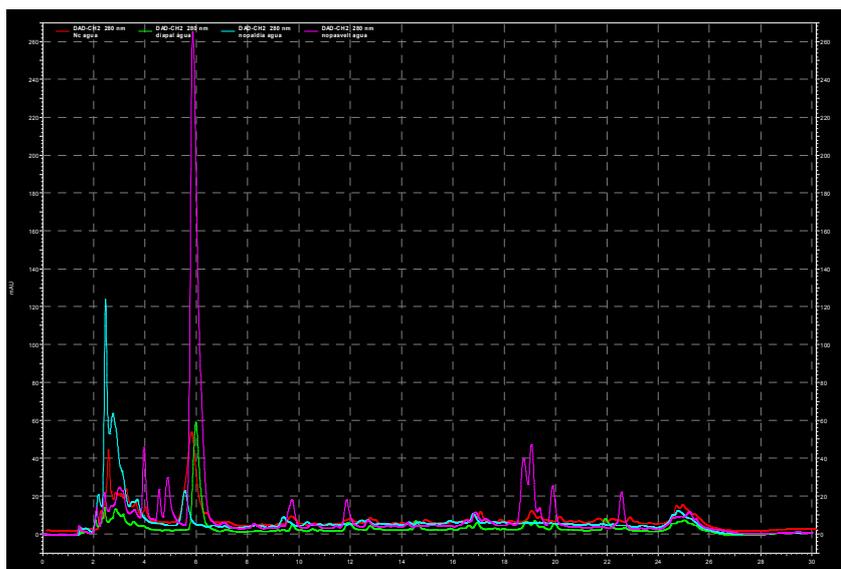
N.C. – vermelho

Diapal - verde

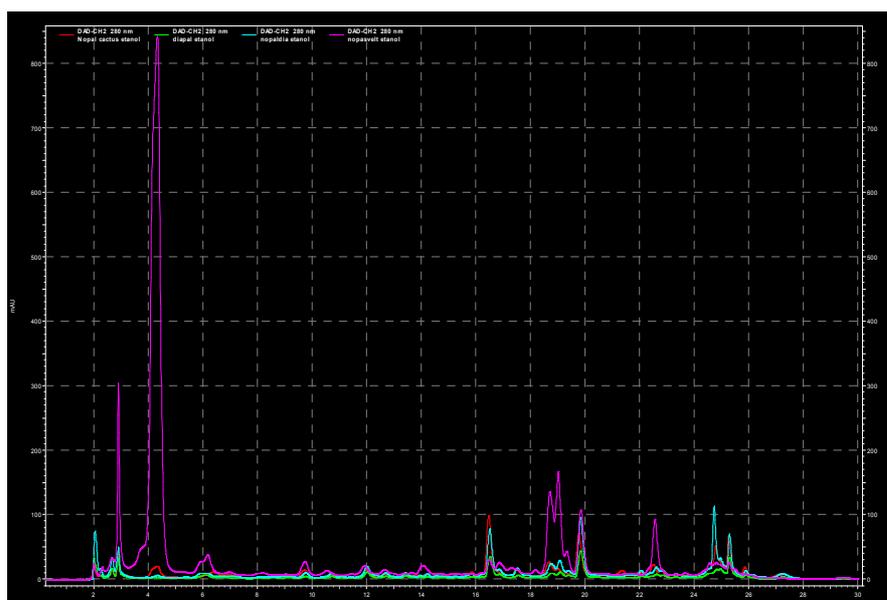
Nopaldia - azul

Nopasvelt - rosa

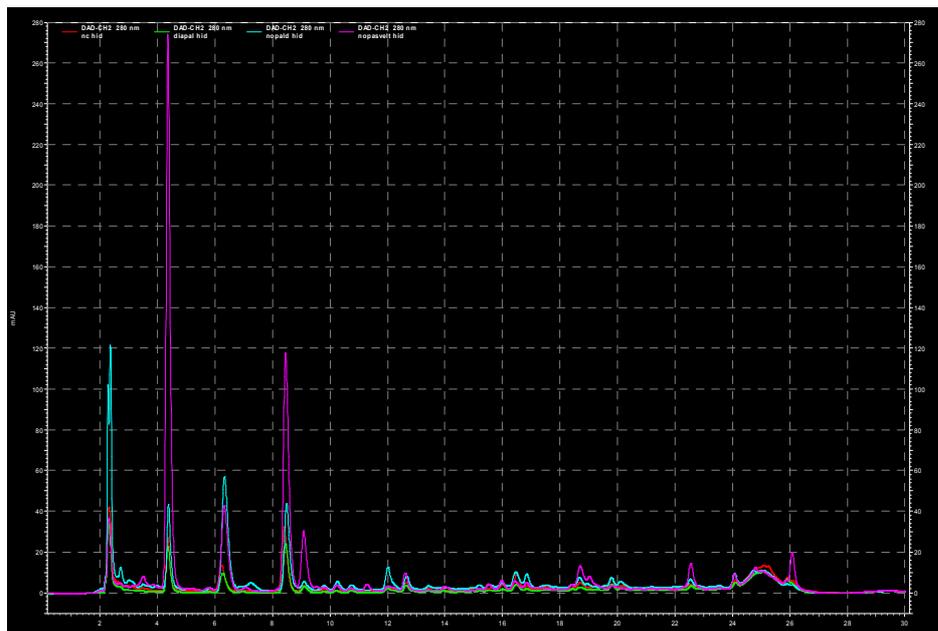
Extractos aquosos:



Extractos etanólicos:



Extractos aquosos hidrolisados:



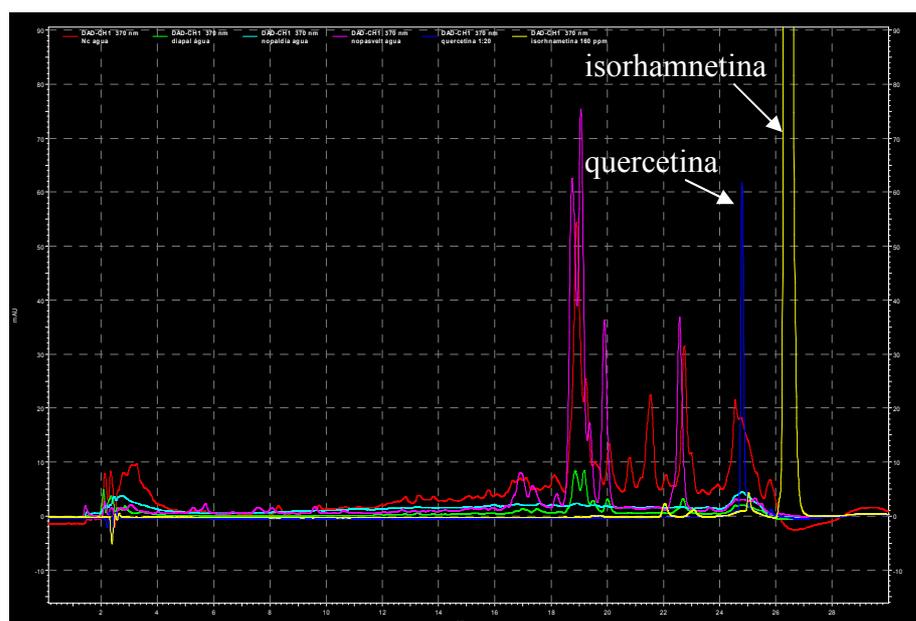
B - Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD (370 nm), utilizando o método mais curto

Legenda:

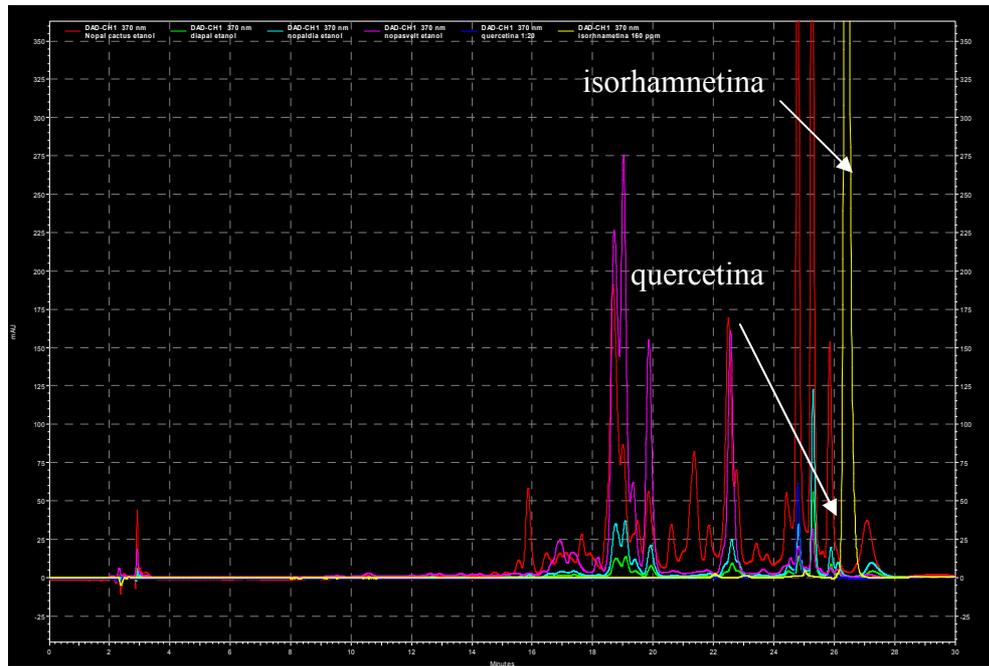
N.C. – vermelho Nopasvelt – rosa Diapal – verde Nopaldia - azul

Quercetina – azulão Isorhamnetina - amarelo

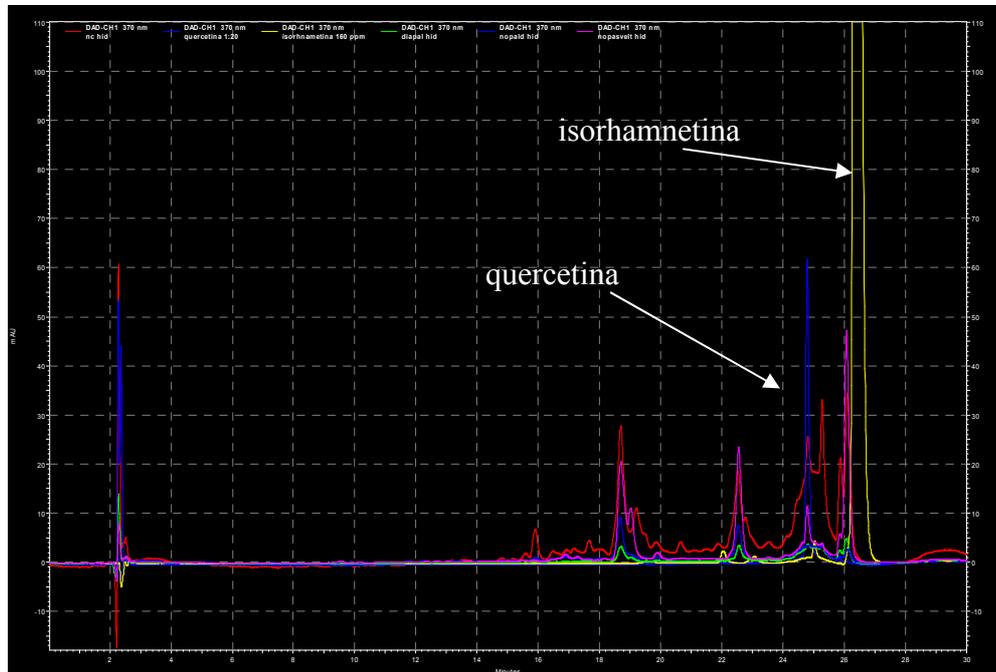
Extractos aquosos:



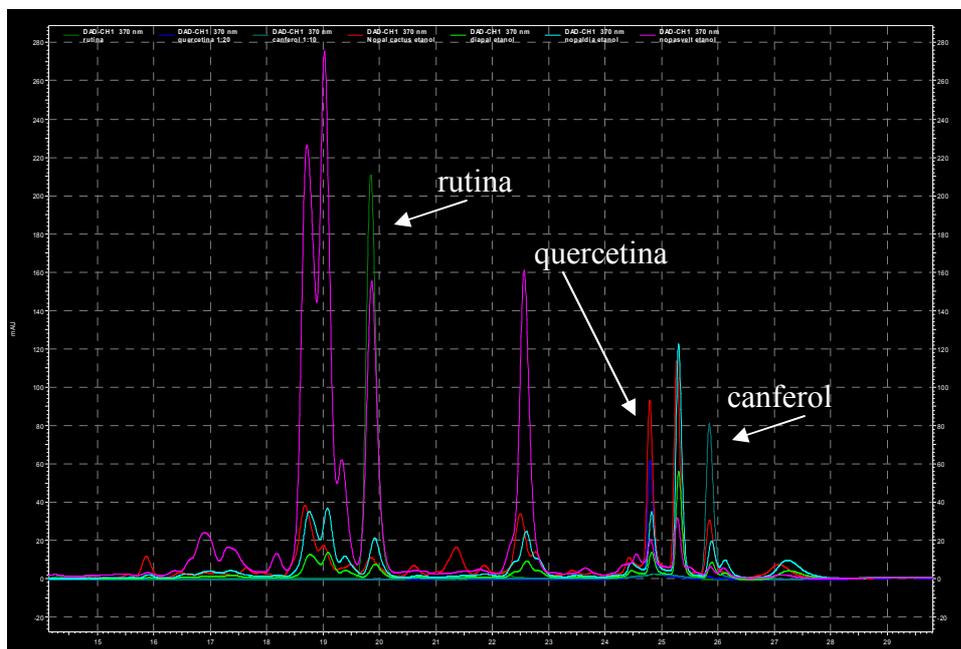
Extractos etanólicos:



Extractos acuosos hidrolisados:



C - Identificação dos padrões nos extractos etanólicos (HPLC-DAD 370 nm)



Legenda:

N.C.- vermelho

Diapal - verde

Nopaldia - azul

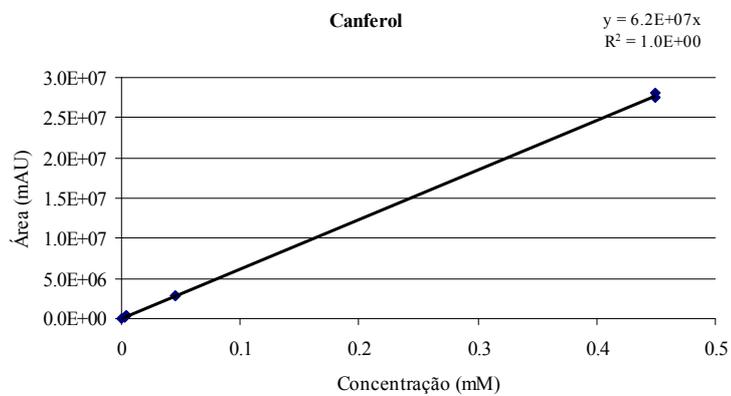
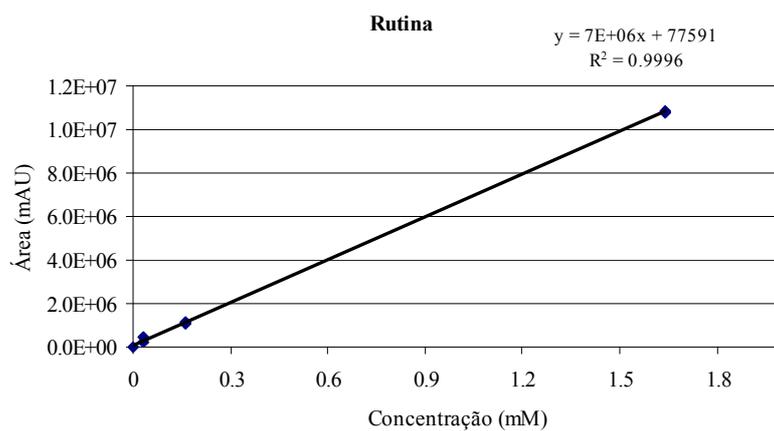
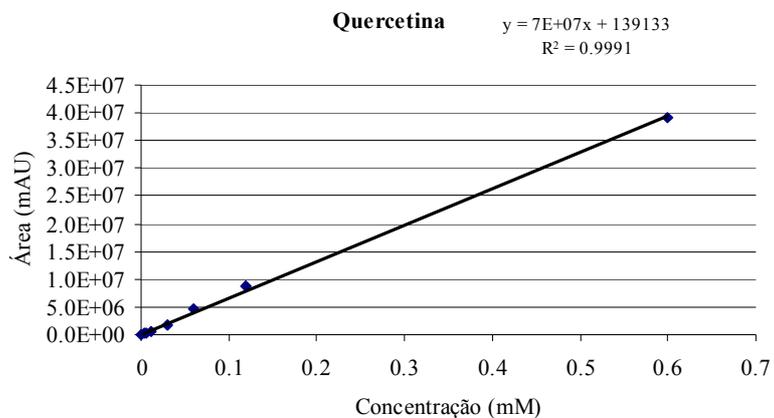
Nopasvelt - rosa

Rutina - verde escuro

Quercetina - azulão

Canferol - azul acinzentado

Rectas de calibração:



D - Cromatograma obtido por GC

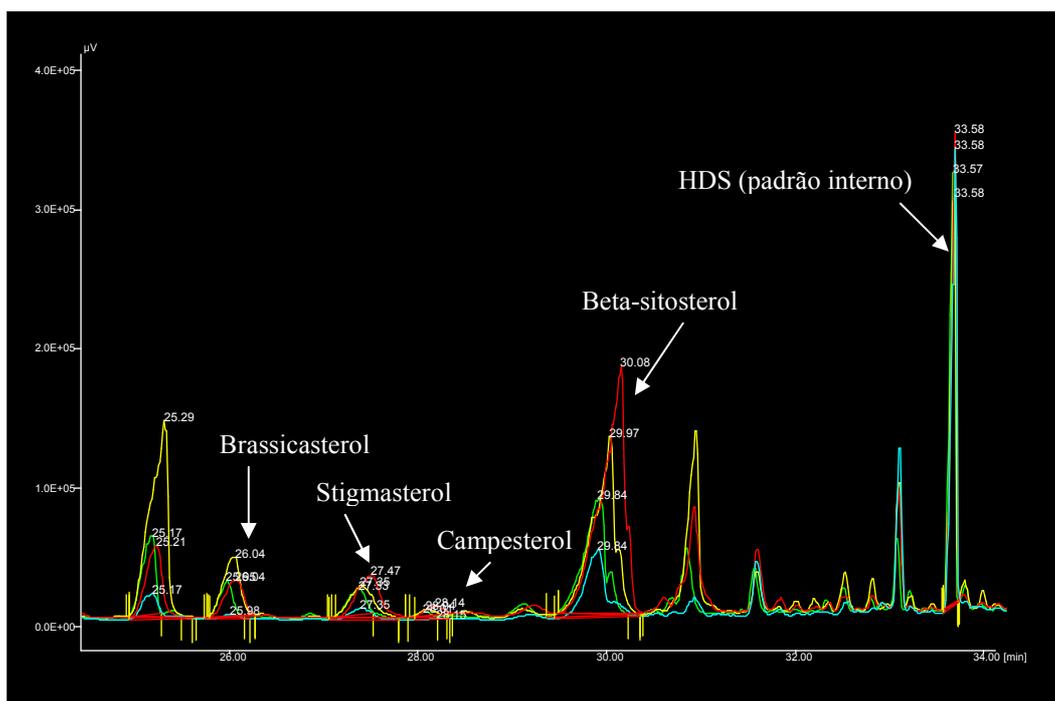
Legenda:

N.C. – verde

Diapal - amarelo

Nopaldia - vermelho

Nopasvelt - azul



ANEXO 4

A - Procedimento para cultura de células

- As células Caco-2 (adenocarcinoma do cólon) foram adquiridas à DSMZ (*German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*) e cultivadas em frascos de 175 cm² em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS) (Invitrogen) e 2 mM L-glutamina (Invitrogen), sendo conservadas a 37 °C, numa atmosfera controlada com 5 % CO₂.
- O meio foi mudado de dois em dois dias até à subconfluência das células de aproximadamente 75%, sendo, de seguida, removidas dos frascos utilizando tripsina para diminuir a sua aderência.
- Após se observarem as células destacadas da superfície, adicionou-se meio suplementado com soro, de forma a inibir a acção continuada da tripsina.

Notas:

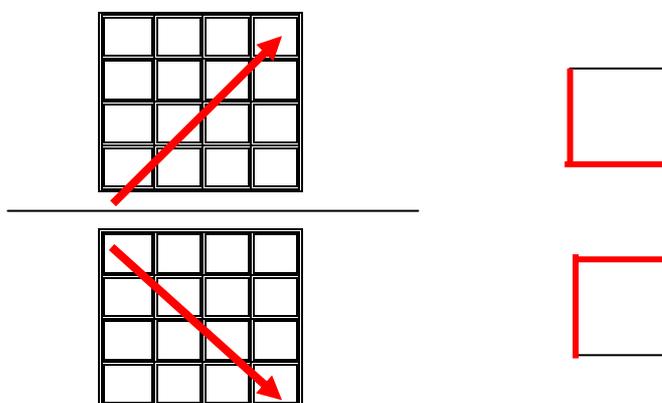
- . Antes de começar, a tripsina e o meio tem que estar a aquecer num banho a 37°C.
- . Não esquecer de um tubo estéril para ser usado como recipiente do lixo.
- . Lavar o tubo da tripsina e do meio com álcool antes de colocar na bancada de fluxo laminar (Nuair Biological Safety cabinets class II, U.S.A.).
- . No fim limpar a bancada de fluxo laminar com álcool.
- . Meio muito cor de rosa corresponde a muito CO₂, pH mais básico
- . Meio amarelado significa falta de alimento, tem que se mudar o meio.

B - Contagem de células através de hemacitómetro

Células: Caco-2

Reagentes: Corante - azul Tripano (Invitrogen, Espanha)

1. Retirar o hemacitómetro (Brand, Germany) do frasco e passar por álcool (colocar em cima de uma bancada e de um papel absorvente);
2. Retirar também a lamela da caixa e lavar igualmente com álcool;
3. Colocar a lamela por cima da lâmina e apertar os parafusos;
4. Numa placa de 96 poços colocar em 2 poços 20 µL de suspensão celular e 180 µL de corante;
5. Ressuspender bem e introduzir no hemacitómetro com muito cuidado de modo a não formar bolhas;
(Nota: Cada poço corresponde a um hemacitómetro)
6. Proceder à contagem das células vivas (mais brilhantes) no microscópio (Olympus, CKX41, Japan) (as células azuis escuras são mortas);



7. Determinação do nº de células.

$$n^{\circ} \text{ total de células} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrados contados}} \times \text{valor diluição} \times 5000 \text{ (cell/mL)}$$

C - Preparação da solução de PBS

Reagentes:

- NaCl a 137 mM (Sodium Chloride, Sigma, U.S.A.)
- KH_2PO_4 a 1,5 mM (Potassium phosphate monobasic, Fluka, Germany, 99,5%)
- Na_2HPO_4 a 8,1 mM (Sodium phosphate dibasic, Sigma, U.S.A., 96%)
- KCl a 2,7 mM (Potassium Chloride, Sigma, U.S.A., 99%)

- 1- Pesar os reagentes.
- 2- Solubilizar em água os reagentes num gobelé até quase perfazer o volume final, sob agitação.
- 3- Levar ao eléctrodo de pH (Metrohm 827 pH lab, Switzerland) e ajustar com algum KH_2PO_4 até $\text{pH}=7,4$.
- 4- Transferir para um balão volumétrico e completar o volume previsto.
- 5- Fechar o balão e homogenizar.
- 6- Armazenar a -4°C .