

Ana Patrícia Ferreira Vicente da Silva

Desenvolvimento do Método para Identificação e Quantificação de Fitosteróis no Suplemento Alimentar sob a Forma de Comprimido

Dissertação de Mestrado em Segurança Alimentar, orientada pelo Professor Doutor Fernando Ramos e pela Professora Doutora Maria Conceição Castilho e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2013



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

AGRADECIMENTOS

Não teria chegado ao final deste percurso se não fosse com o apoio e a força constante de algumas pessoas e, por isso, merecem um especial agradecimento.

O primeiro parágrafo desta secção é dirigido à primeira pessoa que me acolheu com firmeza neste projecto, o Professor Doutor Fernando Ramos. Uma pessoa excepcional que me transmitiu muitos dos seus conhecimentos e que acreditou nas minhas capacidades, apesar de eu admitir que “não tenho experiência num laboratório, mas que ambicionava conhecer o mundo da investigação”. Agradeço-lhe ainda, toda a paciência que despendeu comigo e me transmitir a sua calma em situações de desespero.

Agradeço à Professora Doutora Maria Conceição Castilho pela sua vivacidade, pelo seu optimismo e apoio, sempre que necessário. Devo-lhe, também, a sua confiança por acreditar no final desta etapa.

Este estudo também foi possível com o apoio de algumas pessoas que passaram pelo laboratório durante estes 10 meses, como as minhas colegas de Mestrado, em especial a Diana Lourenço, que passou a ser uma amiga que levo deste percurso por tanto me ouvir e me aconselhar. Agradeço à Doutora Isabel Andrade, por me deixar trabalhar em conjunto com ela e me ter transmitido alguns dos seus conhecimentos. Agradeço, ainda, à D. Isabel e à D. Anabela, pois receberam-me muito bem e ajudaram-me na integração deste estudo.

Agradeço aos meus colegas da Makro de Coimbra, que sempre se mostraram receptíveis nas trocas de horários para que eu conseguisse atingir mais rapidamente esta meta.

Agradeço, também, aos meus “amigos de verdade, que se contam pelos dedos”, pois apenas numa mão encontro o significado da cumplicidade, da ternura, da simplicidade e especialmente o valor de uma amizade verdadeira. Mais uma vez, estiveram presentes na concretização de um dos meus objectivos, acompanhando-me sempre, mesmo estando eu ausente em certos momentos. Estou grata por fazerem parte da minha vida Natália, Marta, Joana e Ana!

Deixo para último agradecimento, as pessoas a quem devo aquilo que sou hoje, à minha família. Agradeço aos meus pais a forma como me educaram e todos os ensinamentos

que me deram, pois fizeram com que eu chegasse até este patamar. Aproveito para agradecer, em especial, à minha mãe, por toda a paciência que teve comigo nos momentos mais complicados, pela compreensão e pela ajuda insubstituível que me deu. Obrigada Mãe! Não posso terminar sem agradecer à minha irmã, pois é uma pessoa que eu admiro por toda a sua espontaneidade e por ser conhecedora dos seus objectivos, por isso os conselhos que me deu, guardo-os comigo.

A todos aqueles que estiveram presentes no percurso deste caminho e não me deixaram cair nas “pedras” que iam surgindo, o meu sincero e profundo agradecimento.

RESUMO

As doenças cardiovasculares assumem a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo, estando nitidamente associadas a elevados níveis de colesterol total e colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL). Por esse motivo, a investigação científica focou-se em estratégias que visem a redução do colesterol, surgindo assim os fitosteróis que são constituintes naturais de plantas estruturalmente semelhantes ao colesterol animal, e que apresentam capacidade de reduzir a hipercolesterolemia.

No trabalho de dissertação apresentado pretendeu-se contribuir para a melhoria e o desenvolvimento da qualidade de produtos enriquecidos com fitosteróis, nomeadamente sob a forma de comprimido, por ainda ser uma matriz “desconhecida”. A execução deste objectivo centrou-se no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de fitosteróis num suplemento alimentar sob a forma de comprimido.

O método utilizado para a análise de fitosteróis foi a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS), desenvolvido com base nas metodologias de Santos *et al.* (2007) e Saraiva *et al.* (2011b).

No suplemento analisado foram identificados e quantificados cinco fitosteróis, designadamente o campesterol ($49,87 \mu\text{g mg}^{-1}$), campestanol ($19,76 \mu\text{g mg}^{-1}$), estigmasterol ($7,71 \mu\text{g mg}^{-1}$), β -sitostanol ($133,29 \mu\text{g mg}^{-1}$) e β -sitosterol ($298,26 \mu\text{g mg}^{-1}$), destacando-se este último como o mais abundante. Para além dos compostos que se pretendiam analisar, identificou-se a vitamina α -tocoferol, com a metodologia utilizada.

Relativamente ao controlo de qualidade, verificou-se que a quantidade determinada pelo método analítico desenvolvido é concordante com a quantidade rotulada, confirmando assim que o suplemento alimentar analisado com a adição de fitosteróis apresenta-se como um produto seguro, uma vez que não ultrapassa os 3 gramas de consumo diário.

Este estudo demonstra que importa assegurar a segurança alimentar dos produtos enriquecidos com fitosteróis, uma vez que o mercado deste tipo de produtos está em constante crescimento.

ABSTRACT

Cardiovascular diseases take the primary cause of mortality and morbidity in the world and are associated with clearly higher levels of total cholesterol and low density lipoprotein (LDL). For this reason, scientific research has focused on strategies to reduce cholesterol, thus appearing, phytosterols which are natural constituents of plants structurally similar to cholesterol animal, and having capacity to reduce hypercholesterolemia.

Presented in the dissertation sought was to contribute towards the improvement and development of the quality of products enriched with phytosterols, particularly in the form of tablet, for being a matrix still "unknown." The accomplishment of this objective focused on the development and validation of an analytical methodology for the determination of phytosterols in a food supplement in the form of tablet.

The method used to analyse the phytosterols was gas chromatography-mass spectrometry, (GC-MS) methodology developed by Santos *et al.* (2007) and Saraiva *et al.* (2011b).

In the examined supplement were identified and quantified five phytosterols, including campesterol ($49.87 \mu\text{g mg}^{-1}$), campestanol ($19.76 \mu\text{g mg}^{-1}$), stigmasterol ($7.71 \mu\text{g mg}^{-1}$), β -sitostanol ($133,29 \mu\text{g mg}^{-1}$) and β -sitosterol ($298.26 \mu\text{g mg}^{-1}$), especially the latter as the most abundant. In addition to the compounds that sought to analyze, we identified a vitamin, the α -tocopherol, with the methodology used.

Concerning the quality control, it was found that the amount determined by the analytical method is consistent with the labeled amount, thereby confirming that the food supplement analyzed is presented as safe, since it does not exceed 3 grams daily intake.

This study evidences the importance of ensuring the safety of food products enriched with phytosterols, since the market for this type of products is constantly growing.

ABREVIATURAS

ABCI	“ATP-binding cassette transporter A1”
ABCG5	“ATP-binding cassette transporter G5” (designado também como esterolina1)
ABCG8	“ATP-binding cassette transporter G8” (designado também como esterolina2)
ACAT	Acetil-coenzima A: colesterol acil transferase
AOAC	“Association of Official Analytical Chemists”
AOCS	“American Oil Chemists' Society”
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
BSTFA	N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida
CCAH	Comité Científico da Alimentação Humana
CE	Comissão Europeia
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de díodos (diode-array detector)
DDR	Dose Diária Recomendada
DTE	1,4-ditioeritritol
EFSA	Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (European Food Safety Authority)
EIC	“Extracted Ion Chromatogram”
ELSD	Detector evaporativo de dispersão de luz (evaporative light scattering detector)
eV	Electrão-volt
FAO	Organização das nações unidas para a alimentação e agricultura (Food and Agriculture Organization)
FDA	“Food and Drug Administration”
FID	Detector de ionização de chama (flame ionization detector)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (Fourier transform infrared spectroscopy)
G	Gramma
GC	Cromatografia gasosa (gas chromatography)
GRAS	Geralmente Reconhecido como Seguro (Generally Recognized as Safe)
HPLC	Cromatografia líquida de alta resolução (high performance liquid chromatography)
ICH	“International Conference on Harmonisation”
IFST	“Institute of Food Science and Technology”
ISO	Organização internacional de normalização (International Organization for Standardization)

JECFA	Comité de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (Joint Expert Committee on Food Additives)
Kg	Quilograma
KOH	Hidróxido de Potássio
LC	Cromatografia Líquida (liquid chromatography)
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low Density Lipoprotein)
LOD	Limite de Detecção
LOQ	Limite de Quantificação
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
mg	Miligrama
min	Minuto
mL	Mililitro
MS	Espectrometria de massa (mass spectrometry)
MSTFA	<i>N</i> -metil- <i>N</i> -trimetilsililtrifluoroacetamida
MTBSTFA	<i>N</i> - (terc-butildimetilsilil) - <i>N</i> -metiltrifluoroacetamida
NCEP	“National Cholesterol Education Program”
NH ₄ I	Iodeto de amónio
NIH	“National Institutes of Health”
NPC1L1	Niemann-Pick C1-like 1
PI	Padrão Interno (ou IS – Internal Standard)
Psi	Unidade de pressão no sistema inglês/americano
r ²	Coeficiente de Determinação
RP	Fase reversa (reversed phase)
RT	Tempo de retenção (Ret time)
SCAN	Análise completa de todos os iões
SFE	Extracção com fluídos supercríticos (supercritical fluid extraction)
SIM	Monitorização selectiva de iões (selected ion monitoring)
SPE	Extracção em fase sólida (solid-phase extraction)
TMCS	Trimetilclorosilano
TMIS	Trimetilliodosilane
UV	Ultra-violeta
VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
WHO	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
®	Marca Registada
µg	Micrograma
µL	Microlitro

DESIGNAÇÕES ANGLO-SAXÓNICAS

Splitless – termo usado para designar a ausência do fluxo gasoso, durante a injeção num sistema de cromatografia gasosa.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS.....	I
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
ÍNDICE GERAL.....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE TABELAS.....	XII
PARTE I - REVISÃO DA LITERATURA.....	I
INTRODUÇÃO GERAL.....	2
CAPÍTULO I - Os Fitosteróis na alimentação.....	6
1. FITOSTERÓIS.....	7
1.1. Estrutura Química e Nomenclatura.....	7
2. ORIGEM E OCORRÊNCIA.....	9
2.1. Fontes naturais.....	9
2.2. Ingestão Diária Média.....	11
2.3. Fitosteróis como suplementos alimentares.....	12
3. PROPRIEDADES DOS FITOSTERÓIS.....	13
3.1. Efeitos Benéficos.....	14
3.1.1. Efeito Hipocolesterolemiantes.....	14
3.1.2. Efeito anti aterosclerótico.....	15
3.1.3. Efeito imunitário.....	16
3.1.4. Efeito antioxidante.....	16
3.1.5. Efeito anticancerígeno.....	16
3.2. Efeitos Adversos.....	17

4.	METABOLISMO	18
5.	MECANISMO DE ACÇÃO.....	20
CAPÍTULO II - A segurança alimentar em suplementos alimentares com fitosteróis.....		22
1.	A UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E FITOSTERÓIS	23
2.	LEGISLAÇÃO.....	25
2.1.	Suplementos Alimentares.....	25
2.2.	Produtos enriquecidos com fitosteróis.....	26
CAPÍTULO III - Metodologias analíticas para a determinação de fitosteróis.....		28
1.	PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	30
1.1.	Extracção	30
1.2.	Saponificação	30
1.3.	Extracção da fracção insaponificável.....	31
2.	DETERMINAÇÃO	31
2.1.	Métodos Cromatográficos	31
2.1.1.	Cromatografia Gasosa	31
2.1.2.	Cromatografia Líquida	33
PARTE II - ESTUDO EXPERIMENTAL		34
CAPÍTULO I - Determinação Analítica Laboratorial.....		35
1.	AMOSTRAGEM.....	36
2.	MATERIAIS	37
2.1.	Reagentes Químicos e soluções padrão	37
2.2.	Materiais e equipamento	38
3.	PROCEDIMENTO ANALÍTICO.....	39
3.1.	Saponificação	39
3.2.	Processo de extracção da fracção insaponificável.....	39
3.3.	Derivatização.....	39
3.4.	Condições cromatográficas	40
3.5.	Quantificação	40

4.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE FITOSTERÓIS NUM SUPLEMENTO ALIMENTAR SOB A FORMA DE COMPRIMIDO	41
4.1.	Selectividade.....	41
4.2.	Linearidade	41
4.3.	Precisão	42
4.4.	Exactidão.....	42
4.5.	Limite de Detecção	43
4.6.	Limite de Quantificação	43
5.	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	44
5.1.	Optimização da saponificação e da extracção.....	44
5.2.	Optimização da derivatização.....	45
5.3.	Optimização das condições cromatográficas.....	45
5.3.1.	Optimização da quantidade de amostra	45
5.3.2.	Estudo do padrão interno.....	46
	CAPÍTULO II - Resultados e Discussão	49
1.	IDENTIFICAÇÃO DOS FITOSTERÓIS.....	50
2.	VALIDAÇÃO DO MÉTODO	51
2.1.	Selectividade.....	51
2.2.	Linearidade	52
2.3.	Precisão e Exactidão.....	54
2.4.	Limite de Detecção e Limite de Quantificação	55
3.	TEOR DE FITOSTERÓIS NO SUPLEMENTO ALIMENTAR SOB A FORMA DE COMPRIMIDO.....	56
	CONCLUSÃO GERAL	60
	BIBLIOGRAFIA	64
	ANEXOS	72
	Anexo I - Folheto Informativo do Produto.....	73
	Anexo II - Identificação dos Fitosteróis	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química dos fitosteróis mais relevantes (retirado de Trautwein e Demonty, 2007).....	8
Figura 2 - Embalagem do Centrum Cardio® (Pfizer, 2012).....	36
Figura 3 - A amostra em comprimido e após ser triturada.	37
Figura 4 - Cromatograma da quantidade de 5 mg da amostra, isento do padrão interno.....	46
Figura 5 - Cromatograma da quantidade de 50 mg da amostra, isenta de padrão interno.	46
Figura 6 - Cromatograma da quantidade de 10 mg da amostra, com a adição de 50 µl de padrão interno (PI) antes da saponificação.	47
Figura 7 - Cromatograma da amostra (10 mg), com a adição de 50 µl do colestano (PI) no momento da extracção da fracção insaponificável.....	48
Figura 8 - Cromatograma obtido após o procedimento analítico descrito da amostra.....	50
Figura 9 - Cromatograma de uma amostra isenta de fitosteróis (Centrum®) com a adição de PI.....	51
Figura 10 - Curva de calibração para o campesterol.....	52
Figura 11 - Curva de calibração para o campestanol.....	52
Figura 12 - Curva de calibração para o estigmasterol.....	53
Figura 13 - Curva de calibração para o β-sitosterol.....	53
Figura 14 - Curva de calibração para o β-sitostanol.....	53
Figura 15 - Percentagem do teor total dos fitosteróis quantificados na amostra.....	57

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Teor de fitosteróis em alguns alimentos seleccionados (retirado de Abidi, 2001; Ramos e Saraiva, 2009).....	10
Tabela 2 - Resumo do metabolismo dos esteróis vegetais e animal (retirado de Koschutnig, 2009).....	20
Tabela 3 - Composição do Centrum Cardio® em dois comprimidos (retirado da embalagem).	36
Tabela 4 - Os diferentes níveis de fortificação para cada composto.	42
Tabela 5 - Tempos de retenção (RT) e fragmentação dos iões para identificação dos fitosteróis presentes no suplemento alimentar.	50
Tabela 6 - Valores obtidos para a precisão do método na amostra.	54
Tabela 7 - Valores relativos à exactidão do método para os fitosteróis presentes na amostra.	54
Tabela 8 - Valores obtidos para o limite de detecção e quantificação de cada composto.	55
Tabela 9 - Teor de fitosteróis ($\mu\text{g mg}^{-1}$) no suplemento alimentar sob a forma de comprimido.....	56

PARTE I

REVISÃO DA LITERATURA

INTRODUÇÃO GERAL

INTRODUÇÃO GERAL

O estilo de alimentação é um factor essencial para a saúde de uma pessoa e da população em geral. Uma dieta equilibrada e variada, como parte integrante de um estilo de vida saudável, pode contribuir significativamente para a manutenção de uma saúde saudável. No entanto, uma dieta desequilibrada e pobre em nutrientes essenciais pode favorecer o aparecimento de problemas de saúde como obesidade, dislipidemia, hipertensão, diabetes, colesterol alto, contribuindo assim, para o desenvolvimento das doenças cardiovasculares.

As doenças cardiovasculares são a principal causa de mortalidade e morbidade no mundo. A aterosclerose é a base deste tipo de doenças, estando nitidamente associada a elevados níveis de colesterol total e colesterol da lipoproteína de baixa densidade (LDL) (WHO, 2007). Assim, para uma melhoria da qualidade de vida da população todas as estratégias que visem a redução dos níveis de colesterol são relevantes.

A identificação de compostos naturais que auxiliam no controlo e prevenção do risco cardiovascular tem sido cada vez mais pesquisada. Como tal, surgem os esteróis e os estanois vegetais, designados como fitosteróis.

Os fitosteróis são constituintes naturais das plantas que exercem diversas funções biológicas semelhantes às do colesterol animal, uma vez que são responsáveis pela permeabilidade e a fluidez das membranas celulares (Trautwein e Demonty, 2007). Apresentam grande interesse na área da saúde por possuírem um efeito hipocolesterolemiantes, sendo comprovado em vários estudos clínicos que uma ingestão diária de 1,5 – 3 g pode reduzir os níveis de colesterol LDL em 10 a 15% (Katan *et al.*, 2003), diminuindo assim a formação de placas de aterosclerose (Trautwein e Demonty, 2007). Estes compostos também são conhecidos por possuírem efeitos anti-inflamatórios, antiaterogénicos, antioxidantes e propriedades anticancerígenas (Li *et al.*, 2007).

Contudo, o modo de vida moderno tem descurado a preparação e ingestão dos alimentos que contêm naturalmente estas substâncias, como vegetais, frutas, cereais e algumas sementes. Por isso, o desenvolvimento de tecnologias de alimentos tem criado produtos enriquecidos com fitosteróis como forma de atingir a dose recomendada.

Actualmente encontram-se no mercado variados produtos enriquecidos com fitosteróis, tanto em margarinas, iogurtes, leites, sumos, barras de cereais como em formas farmacêuticas (comprimido ou cápsula). Os fitosteróis por serem de origem natural podem ser apresentados ao consumidor sem revelar os efeitos adversos e, na publicidade, destacam

estudos clínicos para incentivar o seu consumo, não revelando de forma concreta os resultados evidenciados. Assim, com a crescente oferta deste mercado importa alertar os riscos inerentes com o consumo indiscriminado deste tipo de produtos e também controlar a qualidade e possível adulteração dos mesmos, de modo a garantir um elevado nível de protecção da saúde humana e dos interesses dos consumidores.

Por esse motivo, é essencial desenvolver metodologias para a análise de fitosteróis em diferentes matrizes alimentares, uma vez que cada matriz é única e as condições a ser seleccionadas para otimizar a precisão e o rendimento dos compostos analisados diferem para cada tipo de amostra.

A determinação qualitativa e quantitativa de fitosteróis encontra-se bem documentada em várias matrizes alimentares como em legumes, vegetais, óleos, frutas, cereais, pão, margarinas e mais recentemente, em leites e iogurtes (Santos *et al*, 2007; Saraiva *et al.*, 2011a). Contudo, em matrizes sob a forma de comprimido não existem dados publicados, no que diz respeito a esta temática.

Neste contexto, pareceu-nos importante abordar o tema da qualidade e segurança dos fitosteróis em matrizes sob a forma de comprimido, contribuindo para o desenvolvimento de produtos hipocolesterolemiantes seguros.

O objectivo principal deste trabalho consiste no desenvolvimento e validação de uma metodologia analítica para a determinação de fitosteróis num suplemento alimentar sob a forma de comprimido.

Com este trabalho, pretende-se responder a pontos de investigação que ainda se encontram em aberto, sendo desenvolvido e validado um novo método cromatográfico para a determinação de fitosteróis, o qual foi comparado com métodos descritos na literatura científica. Outro objectivo deste trabalho consiste na eventual aplicação do método em processos de controlo de qualidade, assegurando que a quantidade rotulada é semelhante à quantidade determinada.

A presente dissertação encontra-se estruturada em duas partes principais, designadas por Parte I e Parte II. Na Parte I encontra-se uma revisão da literatura sobre o tema, enquanto a Parte II se refere ao estudo efectuado no laboratório.

Sendo assim, para uma melhor leitura e compreensão, a Parte I está dividida em três capítulos: o capítulo I apresenta uma breve referência aos fitosteróis, o capítulo 2 aborda a

questão da segurança alimentar dos suplementos alimentares com fitosteróis e o capítulo 3 mostra uma revisão das metodologias analíticas desenvolvidas para a determinação de fitosteróis, destacando os métodos cromatográficos. A Parte II encontra-se dividida em dois capítulos, em que no capítulo I se descreve o método desenvolvido e no capítulo II apresentam-se e discutem-se os resultados obtidos na aplicação do método ao suplemento alimentar analisado.

CAPÍTULO I

Os Fitosteróis na alimentação

I. FITOSTERÓIS

Os fitosteróis são constituintes naturais das plantas que exercem diversas funções essenciais nas suas células, como a regulação da fluidez e da permeabilidade das membranas celulares e, ainda, actuam como precursores de compostos biogénicos envolvidos no crescimento das plantas, como é o caso dos brassinosteróides. Além disso, são também substratos para a síntese de numerosos metabolitos secundários das plantas, como glicoalcalóides e saponinas (Soupas, 2006; Ramos e Saraiva, 2009).

Segundo Johnsson (2004), o primeiro fitosterol foi descrito há cerca de 150 anos por Beneke, que descobriu um composto esteróide em ervilhas e falsamente assumiu que era o colesterol, por apresentar uma estrutura semelhante. No entanto, passado 50 anos foi estabelecido que o composto que Beneke identificou era, de facto, o sitosterol. Foi em 1897, que referiram que todos os esteróis de origem vegetal deveriam ser classificados como fitosteróis.

O colesterol é o esterol mais abundante nos humanos, assumindo um papel fundamental no organismo, uma vez que é o constituinte de todas as membranas celulares e das lipoproteínas do plasma, especialmente das lipoproteínas de baixa densidade (LDL). No entanto, elevados níveis de colesterol levam ao desenvolvimento precoce de doenças cardiovasculares, que actualmente representam uma das principais causas de morte nos países desenvolvidos (Saraiva *et al.*, 2011a).

Os fitosteróis têm sido alvo de investigação no desenvolvimento de novos produtos por apresentarem capacidade para reduzir os níveis de LDL e colesterol total, logo, é essencial compreender toda a sua estrutura e interacção que será desenvolvido na secção que se segue.

I.1. Estrutura Química e Nomenclatura

O esqueleto básico dos fitosteróis é o ciclopentanoperidrofenantreno, sendo muito semelhante à estrutura do colesterol, por apresentarem um núcleo esteróide, um grupo 3 β -hidroxilo e uma ligação dupla entre os carbonos 5 e 6. As principais diferenças encontram-se na cadeia lateral, pela presença ou ausência do grupo metilo ou etilo, e a posição da ligação dupla (Abidi, 2001; Lutjohann, 2004; Lagarda *et al.*, 2006; Trautwein e Demonty, 2007; Silva *et al.*, 2008), como se verifica na figura 1.

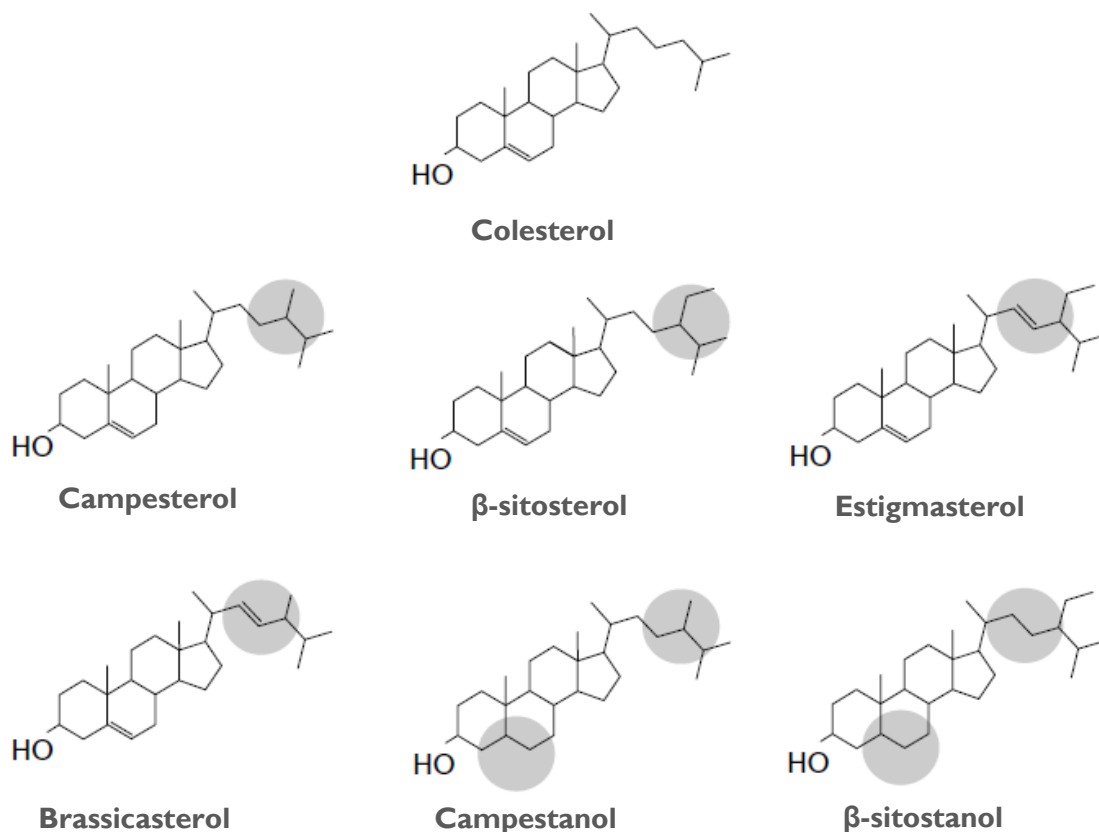


Figura 1 - Estrutura química dos fitosteróis mais relevantes (retirado de Trautwein e Demonty, 2007).

A designação de fitosteróis refere-se a mais de 200 compostos diferentes que são encontrados em várias plantas e materiais marinhos (Trautwein e Demonty, 2007), sendo classificados em dois subgrupos: os esteróis e estanois vegetais.

De acordo com a sua estrutura e biossíntese, os fitosteróis podem ser divididos em três grupos: 4-desmetil, 4 α -monometil e 4,4-dimetil. Os 4-desmetilesteróis são o grupo que assume maior importância, podendo existir como esteróis livres (na forma de álcool) ou podem estabelecer, através do hidroxilo no carbono 3, ligações éster com ácidos gordos ou mais raramente com ácidos hidrocínâmicos ou ainda ligações éteres com açúcares (Clifton, 2004; Lagarda *et al.*, 2006).

Os esteróis vegetais mais representativos pertencem ao grupo 4-desmetil, que são o β -sitosterol (24 α -etilcolest-5en-3 β -ol), campesterol (24 α -metilcolest-5en-3 β -ol) e estigmasterol (24 α -etilcolest-5,22-en-3 β -ol)) que representam, respectivamente, cerca de 45–95%, 30% e 25% do total dos fitosteróis presentes em plantas (Lutjohann, 2004; FAO, 2008). Relativamente aos estanois vegetais, que podem ser produzidos através da hidrogenação dos esteróis (FAO, 2008), apresentam-se na forma saturada e sem ligações

duplas. Os compostos deste subgrupo encontram-se em menor abundância na natureza, sendo os mais comuns o β -sitostanol e o campestanol (Katan *et al.*, 2003; Bernardes, 2010).

A literatura disponível sobre as propriedades físicas e químicas dos fitosteróis não é muito vasta. Contudo, sabe-se que são substâncias insolúveis em água, mas solúveis em acetona e em acetato de etilo (FAO, 2008), apresentando pontos de fusão muito elevados (Srinivasan *et al.*, 2008), pois existem em forma de cristais lipídicos nas temperaturas comuns à maioria dos alimentos. Para minimizar a cristalização são esterificados com ácidos gordos insaturados para aumentar a solubilidade em lípidos (Srinivasan *et al.*, 2008). Os fitosteróis esterificados são compostos líquidos ou semi-líquidos, que apresentam características físicas e químicas comparáveis às gorduras e óleos comestíveis, permitindo assim que sejam adicionados a vários alimentos (FAO, 2008).

Os fitosteróis são compostos muito estáveis à temperatura ambiente, mas a temperaturas elevadas (acima de 100°C) podem sofrer oxidação (FAO, 2008). Os estanois por serem compostos saturados são mais resistentes à oxidação, no entanto, de acordo He *et al.* (2013), a sua aplicação tem sido limitada por apresentarem fraca solubilidade em óleo e insolubilidade em água. Desse modo, muitos estudos têm-se concentrado na modificação da estrutura química dos fitosteróis na presença de enzimas, catalisadores químicos ou líquidos iônicos para melhorar a sua solubilidade em óleo.

2. ORIGEM E OCORRÊNCIA

2.1. Fontes naturais

Os fitosteróis existem naturalmente em todos os alimentos de origem vegetal encontrando-se na sua forma livre ou na sua forma de ésteres (Ramos e Saraiva, 2009).

Independentemente da origem dos fitosteróis são compostos que têm sido utilizados em várias aplicações de saúde e alimentícias.

As fontes naturais mais importantes dos fitosteróis na dieta humana são os óleos e as margarinas, embora também estejam presentes numa variedade de sementes, leguminosas, vegetais e óleos vegetais não refinados (Piironen *et al.*, 2000; Lagarda *et al.*, 2006; Trautwein e Demonty, 2007), como se confirma na tabela I. É importante mencionar que, a composição de fitosteróis em certos óleos vegetais tem sido utilizada para a sua identificação, sendo assim, são muitas vezes usados como marcadores para avaliar a autenticidade dos óleos (Abidi, 2001).

Tabela I - Teor de fitosteróis em alguns alimentos seleccionados (retirado de Abidi, 2001; Ramos e Saraiva, 2009).

Alimentos		Total Fitosteróis (mg/ 100g)
Óleos Vegetais	Óleo de farelo de arroz	1190
	Óleo milho	968
	Óleo de sésamo	865
	Óleo de girassol	444
	Óleo de soja	250
	Azeite	221
	Óleo de amendoim	207
Sementes e Nozes	Sementes de sésamo	404
	Sementes de girassol	322
	Sementes de linhaça	213
	Amêndoas	143 - 208
	Amendoins	116 - 220
	Avelãs	138
	Nozes	128
Cereais	Milho	178
	Centeio	91 - 110
	Cevada	59 - 83
	Trigo	60 - 69
	Aveia	33 - 52
Frutas e Vegetais	Maracujá	44
	Laranja	24
	Banana	14
	Maçã	12
	Pêra	8
	Couves de Bruxelas	43
	Brócolos	39
	Cenoura	16
	Tomate	7

Os cereais, apesar de possuírem uma menor quantidade de esteróis em relação aos óleos, são os que contribuem mais significativamente na dieta, por serem geralmente mais

consumidos (Lagarda *et al.*, 2006). Ao analisar os teores de fitosteróis em diferentes cereais, verifica-se que o centeio é uma melhor fonte que a aveia (Piironen *et al.*, 2000). As frutas e os vegetais não são as melhores fontes naturais de fitosteróis comparando com os óleos e os cereais, no entanto, a sua contribuição na ingestão diária através da dieta é relevante (Piironen *et al.*, 2000).

Segundo Phillips *et al.* (2005), as nozes e as sementes têm sido constantemente associadas em estudos epidemiológicos e ensaios clínicos, com redução dos níveis de colesterol e diminuição da incidência de doenças cardiovasculares, afirmando então que são ricas fontes de fitosteróis.

Os estanois vegetais podem também ser encontrados em determinados alimentos, mas em concentrações muito mais baixas, como em alguns cereais (centeio, milho, trigo) e em óleos não hidrogenados (Piironen *et al.*, 2000; Trautwein e Demonty, 2007).

O conteúdo de fitosterol na planta não é constante, uma vez que diversos factores como os genéticos, as condições da cultura, o período da colheita e o processamento de alimentos influenciam significativamente a sua concentração no produto final (Ramos e Saraiva, 2009).

2.2. Ingestão Diária Média

Numa alimentação normal, ou seja, com alimentos não enriquecidos, o consumo de fitosteróis varia de uma população para outra, uma vez que depende do país e do tipo de alimentação (Bernardes, 2010).

Os vegetarianos podem consumir 1 g/dia de fitosteróis, enquanto outras dietas podem consumir menor quantidade (Lagarda *et al.*, 2006), como é o exemplo da dieta ocidental que contribui com uma ingestão diária entre 150 – 400 mg por pessoa (EFSA, 2008).

Conforme o parágrafo anterior, a ingestão de esteróis vegetais varia entre 150 a 400 mg/ dia (Lagarda *et al.*, 2006; Trautwein e Demonty, 2007), com uma média de 65% de consumo como β -sitosterol, 30% de campesterol e 5% de estigmasterol (Trautwein e Demonty, 2007). Relativamente aos estanois, a ingestão diária média corresponde a 10% do total de fitosteróis ingeridos, o que se deve à sua menor disponibilidade na natureza (Ramos e Saraiva, 2009).

Contudo, a ingestão média estimada que ocorre naturalmente na dieta constitui apenas cerca de 10 – 20% da ingestão recomendada de 2g/ dia para reduzir a hipercolesterolemia (Saraiva *et al.*, 2011a). Pela análise da tabela 1, para um consumo de 2g de fitosteróis em

alimentos é necessário uma quantidade substancial de alimentos, ou seja, 4,6 Kg de couve-de-bruxelas, 1,4 Kg de avelãs ou 621g de sementes de girassol. Por esse motivo, o enriquecimento de determinados alimentos e a formulação de suplementos alimentares com fitosteróis apresenta um grande interesse.

2.3. Fitosteróis como suplementos alimentares

Como se referiu anteriormente, a esterificação de fitosteróis aumentou a solubilidade em lípidos, permitindo assim a sua incorporação em variados alimentos.

Apesar dos fitosteróis serem consumidos diariamente através de alimentos, os valores não são significativos para uma redução de colesterol (Tasan *et al.*, 2006), sendo por isso, uma oportunidade de comércio, tanto na indústria alimentar como na indústria farmacêutica.

A utilização de fitosteróis com fins terapêuticos tem sido efectuada através da ingestão de alimentos funcionais, produtos industrializados com a adição desses compostos ou através da ingestão de formas farmacêuticas (Breda, 2010).

As margarinas foram os primeiros produtos alimentares enriquecidos com fitosteróis, porém não são um produto indicado pelas orientações de saúde propostas para o tratamento de doenças cardiovasculares (Jones e AbuMweis, 2009). Desse modo, com o desenvolvimento de novas técnicas sem afectar a textura e o sabor, introduziram outros alimentos com baixo teor de gordura, como iogurtes, leite, creme de queijo para barrar, barras de cereais ou sumos de fruta.

A indústria farmacêutica introduziu no mercado fitosteróis na forma de comprimido (como é exemplo, o Centrum Cardio®) ou em cápsula, que podem ser uma melhor opção para pessoas que não consomem os alimentos atrás mencionados todos os dias, sendo as formas de dosagem mais convenientes (Sorrentino, 2008).

Conforme será abordado mais à frente neste capítulo, o colesterol – LDL é afectado de maneira diferente quando os fitosteróis são incorporados em diferentes matrizes alimentares, isto é alto teor *versus* baixo teor de gordura e forma sólida *versus* líquida. No entanto, as diferentes directrizes alimentares que recomendam a ingestão de fitosteróis para reduzir os níveis elevados de colesterol – LDL não fazem a distinção entre a ingestão de margarina, comprimidos ou outras matrizes (Jones e AbuMweis, 2009; Ottestad *et al.*, 2013).

De facto, verifica-se uma substituição gradual de alimentos ricos em gordura para alternativas mais saudáveis e facilmente introduzidas na dieta diária. Tal desenvolvimento é um desafio para a investigação científica, uma vez que envolve a produção de fitosteróis com

maior solubilidade no sistema gastrointestinal de modo a obter uma redução de colesterol mais eficiente (Ramos e Saraiva, 2009).

3. PROPRIEDADES DOS FITOSTERÓIS

A pesquisa e o desenvolvimento dos fitosteróis têm atraído muita atenção devido às suas propriedades benéficas, incluindo principalmente os efeitos na redução do colesterol (Cherif, 2012; Ottestad *et al.*, 2013), efeitos anti-inflamatórios (Li *et al.*, 2007; He *et al.*, 2013), antiaterogénicos (Trautwein e Demonty, 2007; He *et al.*, 2013), actividades antioxidantes (Berger *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007) e propriedades anticancerígenas (Awad e Fink, 2000; Lagarda *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007), que seguidamente serão analisadas.

Estes compostos são úteis na indústria farmacêutica, uma vez que são utilizados na produção de medicamentos hormonais e, ainda, na indústria cosmética, por serem emulsionantes (Abidi, 2001; Fernandes e Cabral, 2007; Cherif, 2012).

Recentemente, o Painel da EFSA (European Food Safety Agency) sobre Aditivos Alimentares e de Fontes de Nutrientes adicionados a Alimentos, concluiu que o estigmasterol pode ser utilizado como um emulsionante, para gerar e manter a presença de dispersões de gelo num cocktail alcoólico congelado (EFSA, 2012).

O fitosterol mais intensamente investigado é o β -sitosterol e, segundo Cherif (2012), apresenta propriedades anti-inflamatórias, antineoplásicas e actividades imunomoduladoras. Além disso, os fitosteróis mais abundantes na natureza apresentam também efeitos antioxidantes. Segundo aquele autor, estes compostos podem contribuir para a oxidação de óleos durante o aquecimento, a exposição a radiação ionizante, luz, catalisadores químicos ou enzimáticos.

Apesar do impacto benéfico que apresentam na área da saúde, a probabilidade do aparecimento de efeitos adversos aumenta com o crescente consumo dos alimentos enriquecidos e a formulação de suplementos alimentares com fitosteróis presentes no mercado. Ainda que, esses efeitos sejam raros importa referi-los neste trabalho.

3.1. Efeitos Benéficos

3.1.1. Efeito Hipocolesterolemizante

O benefício mais importante dos fitosteróis é o efeito redutor do colesterol no sangue (Trautwein e Demonty, 2007).

A ligação entre os fitosteróis e o efeito redutor do colesterol já vem desde a década de 1950. O primeiro estudo em humanos foi em 1953, por Pollak, que observou o efeito após a administração de 5-10 g/dia de β -sitosterol durante 8 meses. No entanto, ao realizar um estudo semelhante em coelhos, Pollak observou que o β -sitosterol era pouco absorvido e se presente em excesso bloqueava a absorção de colesterol (Bernardes, 2010), sendo portanto, necessárias doses elevadas até 50 g/dia para atingir um efeito significativo de redução do colesterol. Contudo, na década de 1980, descobriu-se que a esterificação dos fitosteróis com ácidos gordos a partir de óleos vegetais poderia facilitar a incorporação numa variedade de produtos alimentares. Desde daí, que vários estudos foram feitos em humanos, demonstrando que, quando adicionados em alimentos, apresentam significativamente valores menores de colesterol total e LDL (Trautwein e Demonty, 2007).

O efeito da redução do colesterol – LDL foi estabelecido com uma ingestão diária de 2g de fitosteróis pelo National Cholesterol Education Program (NCEP), em 2002, o que veio mais tarde a ser confirmado pela meta-análise de Katan *et al.* (2003). Segundo os mesmos autores, a ingestão diária ideal de fitosteróis é de 2 g para uma redução de 10% do colesterol – LDL.

Num estudo conduzido por Acuff *et al.* (2007), observou-se que a ingestão de 1,3 g/dia de fitosteróis em cápsulas foram efectivos na melhoria do perfil lipídico de indivíduos hipercolesterolemicos, uma vez que após 3 semanas de tratamento houve redução de 7% nos níveis de colesterol – LDL e um aumento de 9% nos níveis de colesterol – HDL.

Maki *et al.* (2013) num estudo semelhante ao anterior verificaram, também, que a ingestão de 1,8 g/dia de um suplemento alimentar com fitosteróis em cápsulas reduziram o colesterol – LDL em 9,2% e o colesterol total em 7,4% e, ainda foram efectivos na redução dos triacilgliceróis em cerca de 9,1% em indivíduos com hipercolesterolemia primária.

Porém, Ottestad *et al.* (2013) também investigaram o efeito da ingestão diária de 2g/dia de fitosteróis em cápsulas, durante 4 semanas, nos níveis plasmáticos do colesterol – LDL, e

verificaram que não são uma estratégia eficiente em doentes com hipercolesterolemia leve a moderada, uma vez que apenas observaram uma redução de 2,7%.

Muitos estudos foram realizados para comparar a eficiência dos esteróis vegetais e os estanois vegetais, concluindo que a sua capacidade para diminuir o colesterol é idêntica (FAO, 2008; Saraiva *et al.*, 2011a). Apesar de alguns investigadores considerarem que, os estanois são mais eficientes por não apresentarem praticamente nenhuma absorção e, por isso permanecerem por mais tempo no lúmen intestinal, onde interferem constantemente e de forma mais eficaz com a absorção do colesterol (Santos *et al.*, 2007).

Os fitosteróis têm mostrado um efeito aditivo, tanto através do consumo de suplementos alimentares com fitosteróis, como com o tratamento através de estatinas (Ottestad *et al.*, 2013). Goldberg *et al.* (2006) verificaram que comprimidos com estanois/lecitina produzem uma redução adicional de colesterol – LDL em indivíduos que já se encontrem em tratamento com estatinas. Nesse estudo, tomaram uma dose diária de 1,8 g de estanois, além de uma estatina, verificando uma diminuição adicional de 9,1% nos níveis de colesterol – LDL.

Um outro estudo recente que realça o efeito hipocolesterolemizante dos compostos em estudo, conduzido por Awaisheh *et al.* (2013) em que avalia o efeito de suplementos probióticos e suplementos de fitosteróis sobre o perfil lípido sérico e hepático em ratos hipercolesterolemicos, verificou que, quer individualmente, quer em associação, são benéficos na redução do colesterol sérico e hepático e, ainda nos níveis de triglicédeos, mostrando a possibilidade de reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

O efeito hipocolesterolemizante dos fitosteróis está bem comprovado cientificamente em modelos humanos e em animais, demonstrando que são seguros por meio século (He *et al.*, 2013). No entanto, o mecanismo de acção dos fitosteróis na redução do colesterol, ainda não foi bem estabelecido, uma vez que existem vários mecanismos propostos para tal efeito, como será descrito no ponto 5 deste capítulo.

3.1.2. Efeito anti aterosclerótico

A regressão do desenvolvimento da placa aterosclerótica foi comprovada, sugerindo um impacto benéfico no risco de doenças cardiovasculares.

Foram efectuados diversos estudos para verificar o efeito dos fitosteróis em modelos de aterosclerose experimental em diferentes animais, verificando uma redução nos ateromas

e, como tal, uma redução no desenvolvimento da aterosclerose (Trautwein e Demonty, 2007).

Berger *et al.* (2004) referem que os fitosteróis podem reduzir o desenvolvimento da aterosclerose, não só pela redução dos níveis de colesterol no sangue, mas também por possuir actividade antiaterogénica.

3.1.3. Efeito imunitário

Recentemente foi descoberto que os fitosteróis, especialmente o β -sitosterol, podem ter efeitos no sistema imunitário do Homem. Estudos mostram que doses a partir de 60 mg/dia de β -sitosterol em combinação com quantidades insignificantes de esterolinas melhoram a função imunitária de indivíduos afectados por várias patologias, como a tuberculose pulmonar, vírus da imunodeficiência humana (VIH), reacções alérgicas e artrite reumatóide (Berger *et al.*, 2004; Trautwein e Demonty, 2007). O mecanismo pelo qual o β -sitosterol e as esterolinas melhoram a resposta imune deve-se ao facto, de estimularem a actividade das células T auxiliares: Th1 e Th2. (Trautwein e Demonty, 2007).

No entanto, o mecanismo pelo qual os fitosteróis exibem a sua actividade imunitária ainda não está totalmente esclarecido e mais investigação neste tema é necessária.

3.1.4. Efeito antioxidante

Os fitosteróis podem apresentar outras propriedades biológicas importantes relacionadas com a redução de espécies reactivas de oxigénio que são produzidas (Duarte, 2011).

Segundo Berger *et al.* (2004), a ingestão de éster de estanol pode proteger as partículas de colesterol-LDL contra a oxidação. Assim, com base em estudos *in vitro* e estudos em humanos existe uma possibilidade dos fitosteróis possuírem propriedades antioxidantes.

3.1.5. Efeito anticancerígeno

Segundo um estudo conduzido por Awad e Fink (2000) foram observados efeitos antitumorais dos fitosteróis, mais concretamente do β -sitosterol em células cancerígenas provenientes do cancro da próstata, cólon e da mama.

É importante referir que a protecção para os vários tipos de cancro proporcionados pelo consumo de fitosteróis ocorre com os mesmos níveis utilizados para baixar o colesterol no sangue (Awad e Fink, 2000).

Os fitosteróis têm sido associados com a inibição do crescimento de células cancerígenas, angiogénese e a apoptose de células do cancro no pulmão, do estômago, da próstata, do ovário e da mama (Berger *et al.*, 2004; Sosinska *et al.*, 2013).

A importância dos fitosteróis no tratamento do cancro é limitada e mais pesquisa é necessária, uma vez que as evidências disponíveis até ao momento, quer *in vitro*, quer *in vivo* sugerem que estes compostos são efectivos, não apenas como agentes preventivos, mas também no tratamento do cancro.

3.2. Efeitos Adversos

Os fitosteróis são recomendados por várias organizações como forma terapêutica para reduzir o colesterol, com ingestão diária de 2 g. Desse modo, se consumidos na dose recomendada são bem tolerados, não apresentando efeitos adversos, conforme admite a EFSA (2008), sendo por isso classificados como um produto “geralmente reconhecido como seguro” (GRAS) pela FDA – Food and Drugs Administration dos Estados Unidos da América.

Com o aumento progressivo de produtos enriquecidos com fitosteróis torna-se provável que os consumos recomendados não sejam seguidos, levando à ingestão de doses elevadas.

Uma preocupação relevante no consumo elevado de fitosteróis é a redução da absorção de algumas vitaminas lipossolúveis, especialmente o α -tocoferol e o α e β -caroteno. Como os carotenóides e os tocoferóis são transportados pelas lipoproteínas (especialmente as LDL), as suas concentrações podem estar afectadas pela diminuição da concentração plasmática do colesterol LDL. Estudos randomizados demonstraram que os fitosteróis diminuem a concentração sanguínea de β -caroteno em cerca de 25%, a de α -caroteno em cerca de 10% e a vitamina E em cerca de 8% (Trautwein e Demonty, 2007; Jones e AbuMweis, 2009). A EFSA (2012) também mostra que com a ingestão de margarina enriquecida com 3g/ dia de fitosteróis durante um ano, as concentrações dos carotenóides no sangue reduziram 33%. Sendo assim, o Comité Científico da Alimentação Humana (CCAH) da União Europeia recomenda o consumo de fontes naturais destas vitaminas, ou seja, vegetais ricos em carotenóides e frutas (EFSA, 2008).

Este estudo centrou-se num multivitamínico que contém esteróis vegetais, possuindo também as vitaminas que podem estar afectadas, sendo por isso, um efeito que pode estar minimizado com o consumo deste produto. Porém para comprovar tal afirmação, seria necessário fazer um ensaio clínico.

Outro efeito negativo dos fitosteróis é a sitosterolemia ou fitosterolemia, que é uma doença autossómica recessiva rara, que se caracteriza por uma absorção excessiva de fitosteróis e níveis baixos de excreção biliar (Ramos e Saraiva, 2009), resultando na acumulação destes compostos no plasma e nos tecidos (Bernardes, 2010). Esta doença caracteriza-se por xantomias nos tendões, doença coronária prematura, artrite e artralhas. Segundo Patel (2008), os doentes têm mutações nos transportadores ABCG5 e ABCG8, resultando numa diminuição do transporte de fitosteróis dos enterócitos para o lúmen intestinal e numa redução da secreção destes compostos na biliar. Assim sendo, os indivíduos com sitosterolemia apresentam valores de fitosteróis muito superiores aos valores normais, uma vez que absorvem 25-60% de 2g/dia e apenas excretam uma pequena percentagem através dos ácidos biliares (Eussen *et al.*, 2010). É indicado que os doentes com esta alteração metabólica evitem o consumo de produtos enriquecidos com fitosteróis, uma vez que apresentam um risco aumentado de sofrer de doenças cardiovasculares e aterosclerose precoce (Katan *et al.*, 2003; IFST, 2011). Outros sinais e sintomas importantes da sitosterolemia são as manifestações extra-vasculares – alteração da forma dos eritrócitos, trombocitopenia e anemia hemolítica (Bernardes, 2010). Segundo este autor, aqueles efeitos estão relacionados com o conteúdo anormal de esteróis na membrana dos eritrócitos, tendo os fitosteróis facilidade em integrar-se nas membranas celulares. Contudo, ainda não se sabe se estes efeitos são devidos à ingestão de fitosteróis ou a uma diminuição da concentração de colesterol.

Portanto, os consumidores devem evitar o consumo excessivo ou inadequado de produtos enriquecidos com fitosteróis, tal como os fabricantes destes produtos devem ser vigiados de modo a que não ponham em causa a saúde humana. Nesse sentido, no capítulo II do presente trabalho será abordada a questão da segurança alimentar destes produtos.

4. METABOLISMO

No início do presente capítulo, referiu-se que os fitosteróis e o colesterol são estruturalmente semelhantes, no entanto a sua utilização pelo organismo é diferente.

Os humanos absorvem 55% a 60% do colesterol ingerido, enquanto a absorção intestinal de fitosteróis é muito menor (Katan *et al.*, 2003; Lagarda *et al.*, 2006; Trautwein e Demonty, 2007; Ellegard *et al.*, 2007; Gonzalez-Larena *et al.*, 2011; Christie, 2012).

Segundo Trautwein e Demonty (2007), as taxas de absorção para os principais fitosteróis são 3,1 – 4,5% para o β -sitosterol, 9,4 – 14,8% para o campesterol, aproximadamente 4% para o estigmasterol e para o sitostanol e campestanol apresentam valores ainda mais baixos (0,1 – 2%). Estas diferenças de absorção dependem da estrutura molecular destes compostos (Ellegard *et al.*, 2007), isto é, o comprimento da cadeia lateral e a presença da dupla ligação podem ser considerados factores interferentes e, dessa forma, os compostos que apresentam cadeias laterais de maior comprimento são os menos absorvidos, devido à sua natureza hidrofóbica (Breda, 2010).

A absorção dos fitosteróis ocorre sob as mesmas condições que as do colesterol e outros lípidos, uma vez que têm que ser incorporados nas micelas para serem absorvidos. As micelas interagem com a membrana da bordadura intestinal, facilitando a absorção dos esteróis pelos enterócitos. No entanto, tanto o colesterol como os fitosteróis, para serem absorvidos necessitam da proteína Niemann- Pick C-1 like-1 (NPC1L1), um transportador localizado na membrana apical (Trautwein e Demonty, 2007). Para além desta proteína responsável pelo influxo dos esteróis, o enterócito contém ainda uma classe de proteínas de membrana designadas como Adenosina trifosfato-*binding cassette* (ATP – *binding cassette* – ABCG5, ABCG8 e ABCI), que promovem o efluxo activo do colesterol e dos fitosteróis para o lúmen intestinal (Rodrigues, 2009).

Uma vez nos enterócitos, o colesterol e os fitosteróis são esterificados pela acetil-coenzima A (ACAT) antes de ser incorporado nas quilomícron. O colesterol é depois libertado na membrana basolateral, por exocitose, e deixa o intestino através dos vasos linfáticos em direcção ao fígado, enquanto os esteróis vegetais são lançados na corrente sanguínea. Porém, estes últimos são pobres em ACAT e por isso, apenas uma pequena parte é esterificada, o que pode explicar a sua reduzida absorção e a sua baixa concentração sanguínea (Trautwein e Demonty, 2007; Bernardes, 2010). Os esteróis e estanois não esterificados podem ser transformados pela flora intestinal produzindo metabolitos como o coprostanol e a coprostanona (Khalf, 2007).

Estudos sobre a absorção, distribuição, metabolismo e excreção têm mostrado que os fitosteróis são fracamente absorvidos a partir do intestino e a quantidade que é absorvida é rapidamente eliminada através da bÍlis, conforme se assegura na tabela 2.

Tabela 2 - Resumo do metabolismo dos esteróis vegetais e animal (retirado de Koschutnig, 2009).

	Colesterol	Esteróis	Estanóis
Ingestão alimentar	300 – 500 mg/d	150 – 450 mg/d	10 – 60 mg/d
Fontes alimentares	Carne, gema de ovo, produtos lácteos	Óleos vegetais, cereais, frutas, vegetais, bagas	Trigo, centeio, milho
Síntese endógena	800 – 1200 mg/d	Não sintetizados	Não sintetizados
Absorção	30 – 60 %	5 – 15 %	0,1 – 2 %
Concentração plasmática	140 – 320 mg/dL	0,3 – 1,7 mg/ dL	0,01 mg/ dL
Excreção	40 – 60 %	85 – 95 %	>98 %

5. MECANISMO DE ACÇÃO

Como se mencionou nas propriedades, os fitosteróis quando ingeridos uma vez por dia reduzem os níveis de colesterol – LDL. Tal efeito pode sugerir vários mecanismos de acção que, até ao momento, ainda não estão totalmente esclarecidos.

Na década de 1960 acreditava-se que os fitosteróis competiam com o colesterol pela incorporação nas micelas mistas. Desde então, tem sido sugerido que os fitosteróis interferem com a incorporação do colesterol nas quilomícrons, por esse motivo, actualmente, supõe-se que regulam vários genes envolvidos na homeostase do colesterol (He *et al.*, 2013).

Eussen *et al.* (2010), também acredita que o principal efeito da redução do colesterol deve-se à competição entre os fitosteróis e o colesterol da dieta pela solubilização nas micelas. Uma vez que os fitosteróis são mais lipofílicos do que o colesterol, apresentam maior afinidade pela micela, resultando num deslocamento do colesterol (biliar e dietético) do interior das micelas para o lúmen intestinal, inibindo assim a absorção intestinal do colesterol (Eussen *et al.*; 2010; Ottestad *et al.*, 2013).

Contudo, outros possíveis mecanismos de acção são propostos, como a interferência no processo de hidrólise dos ésteres do colesterol, uma vez que, sendo semelhantes estruturalmente, os ésteres dos fitosteróis podem ser utilizados como substratos,

diminuindo a actividade da esterase e originando uma menor absorção do colesterol (Eussen *et al.*; 2010).

Um diferente mecanismo de acção proposto é a estimulação da expressão dos transportadores ATP – *binding cassette* – pelos fitosteróis, uma vez que estes transportadores, principalmente o ABCI, não distinguem o colesterol dos fitosteróis, ou seja, não são selectivos, podendo promover o efluxo dos fitosteróis para o lúmen intestinal (Trautwein e Demonty, 2007; Eussen *et al.*; 2010).

CAPÍTULO II

**A segurança alimentar em suplementos
alimentares com fitosteróis**

Os efeitos benéficos que os fitosteróis mostram na área da saúde têm levado ao desenvolvimento de novos produtos. A indústria alimentar tem apostado grandemente no enriquecimento de alimentos com estes esteróis, denominando-se como alimentos funcionais, por possuírem a função de melhorar a saúde e reduzirem o risco de contrair uma doença. A indústria farmacêutica, averiguando a ênfase destes alimentos, apostou também na formulação de suplementos alimentares com a adição de fitosteróis.

O consumo de suplementos alimentares, por vezes é feito tendo o objectivo da melhoria do estado de saúde do consumidor, através das propriedades atribuídas ao consumo de algumas espécies vegetais. Contudo, o seu consumo pode levantar questões relativas à segurança alimentar, sendo analisado neste capítulo, os riscos inerentes com a má utilização destes produtos e a legislação aplicável aos suplementos alimentares e igualmente aos produtos enriquecidos com fitosteróis.

I. A UTILIZAÇÃO DE SUPLEMENTOS ALIMENTARES E FITOSTERÓIS

O consumidor tende a cometer erros no uso dos suplementos alimentares por não ter conhecimento da importância da adequação da Dose Diária Recomendada (DDR). Sendo assim, o consumidor pode exceder a toma diária indicada sem saber as consequências que lhe surgem, como também pode sofrer efeitos adversos inerentes a uma determinada planta sem perceber a sua origem (Costa *et al.*, 2012).

Os suplementos alimentares são géneros alimentícios e não medicamentos, por isso, não apresentam na embalagem, a lista de reacções adversas ou contra-indicações. A sua utilização pode estar dependente apenas do consumidor (Fernandes, 2009), sendo por isso, indispensável um controlo e vigilância deste mercado, uma vez que qualquer pessoa pode adquirir livremente este tipo de produtos através de farmácias, parafarmácias, supermercados e Internet (Costa *et al.*, 2012).

Para compreender a posição dos suplementos alimentares em Portugal, em 2006, a Autoridade de Segurança Alimentar e Económica (ASAE) efectuou um questionário, verificando que a maioria da população entrevistada já consumiu ou ainda consome este tipo de produtos. A informação que lhes é concedida é, geralmente, através de profissionais de saúde ou pela experiência do consumo de amigos ou familiares e também pelos meios de

comunicação. Relativamente à utilização, os suplementos multivitamínicos e multiminerais são os maioritários, seguido dos suplementos à base de plantas, sendo consumidos por períodos irregulares e limitados no tempo, apesar de algumas pessoas referirem que consomem durante todo o ano (Fernandes, 2012).

A utilização de suplementos multivitamínicos, regra geral, é considerada segura e necessária em certas situações pelo efeito de uma avaliação nutricional adequada. No entanto, de acordo a Conferência do *National Institutes of Health* (NIH) sobre a suplementação multivitamínica e multimineral na prevenção de doenças crónicas é importante efectuar mais estudos sobre a sua eficácia e segurança para chegar a conclusões firmes ou para elaborar recomendações a favor ou contra destes suplementos (NIH, 2006). Além disso, não se pode esquecer do efeito cumulativo dos suplementos e alimentos enriquecidos, por serem excedidos os limites superiores para alguns nutrientes. É, por isso, importante assegurar que as concentrações dos agentes bioactivos se situam entre limites seguros, sendo fundamental as indicações do fabricante para garantia de uma cadeia de responsabilidades na colocação do produto no mercado (Costa *et al.*, 2012).

O suplemento alimentar em estudo, para além de conter vitaminas e minerais, essenciais para uma melhoria de qualidade de vida, possui também fitosteróis. Como se referenciou, estes últimos derivam das plantas, e segundo Durão (2008), são inúmeros os extractos de plantas utilizados em suplementos alimentares que contêm fitoquímicos com actividade biológica que pode ter efeitos terapêuticos nesta área, como por exemplo, a semente de linhaça, o feno-grego, o *Saw Palmetto* a quem são atribuídas actividades hipocolesterolemiantes.

A utilização apropriada de suplementos alimentares à base de plantas é perfeitamente seguro e pode trazer benefícios, mas o seu uso indiscriminado ou excessivo pode ser perigoso, tais como, a interacção com medicamentos, uma vez que muitas vezes os médicos não tem conhecimento que o seu paciente toma este tipo de produtos, e ainda a falta de consistência na composição, adulteração ou contaminação com metais pesados, por exemplo (Durão, 2008).

Os suplementos alimentares com a adição de fitosteróis poderão ser prescritos, uma vez que a eficácia dos fitosteróis está bem estabelecida (Durão, 2008). Além disso, a EFSA (2008), autorizou a colocação em todos os produtos com fitosteróis a seguinte alegação de saúde: “ Os esteróis vegetais reduzem o colesterol no sangue. A diminuição de colesterol no sangue pode reduzir o risco de doença arterial coronariana.”

Com o crescente aumento de suplementos alimentares e produtos enriquecidos com fitosteróis, tornou-se relevante adoptar medidas que protejam a saúde dos consumidores e que garantam o direito à informação, o que se analisa no ponto seguinte.

2. LEGISLAÇÃO

2.1. Suplementos Alimentares

Como se referiu no tópico anterior, os suplementos alimentares são géneros alimentícios, estando por isso enquadrados na legislação aplicada aos alimentos. Logo, a responsabilidade de assegurar que a rotulagem representa justamente o conteúdo do produto e que os ingredientes são seguros fica a cargo do produtor (Durão, 2008).

A União Europeia fixou as normas relativas ao fabrico e comercialização dos suplementos alimentares na Directiva nº 2002/46/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. Em 28 de Junho de 2003, Portugal transpôs esta Directiva no Decreto de Lei nº 136/2003, onde define suplementos alimentares como “géneros alimentícios que se destinam a complementar e ou suplementar o regime alimentar normal e que constituem fontes concentradas de determinadas substâncias, nutrientes ou outras com efeito nutricional ou fisiológico, estemes ou combinadas, comercializada 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 medidas de quantidade reduzida”.

O Decreto de Lei nº 296/2007, de 22 de Agosto veio alterar o artigo 3.º do Decreto de Lei nº 136/2003, onde define como “autoridade competente” o Gabinete de Planeamento e Políticas do Ministério da Agricultura, sendo este o organismo responsável pelas medidas de política relativas à qualidade e segurança alimentar. Para colocar um suplemento alimentar no mercado, o fabricante tem de notificar previamente a autoridade competente, enviando obrigatoriamente um modelo do rótulo com que será comercializado o produto.

Um suplemento alimentar, para além da legislação relativa à rotulagem dos géneros alimentícios, é obrigado a conter as menções adicionais descritas no artigo 6º do Decreto de Lei nº 136/2003, tal como não é permitida qualquer menção na rotulagem ou publicidade que atribua aos suplementos propriedades profilácticas, de tratamento ou curativas de doenças humanas, bem como não é permitido declarar, expressa ou implicitamente, que uma

alimentação equilibrada e variada não constitui uma fonte suficiente de nutrientes. Por esse motivo, no suplemento alimentar em estudo apenas indicam que se destina a todos os adultos que querem manter sob controlo os níveis de colesterol plasmático, não referindo que pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares.

A inclusão de informação nutricional é uma fonte importante para o consumidor. Desse modo, o teor de nutrientes ou substâncias com efeito nutricional ou fisiológicos presentes no produto devem ser declarados no rótulo sob forma numérica, através de uma rotulagem completa e de fácil compreensão.

Apesar de existir legislação para os suplementos alimentares pode, em certos casos, não ser suficiente, e por esse motivo a Europa tem-se juntado com associações e empresas desse tipo de produtos como forma de assegurar que a futura legislação e políticas europeias reflectirão a importância do papel que este sector desempenha na saúde dos consumidores.

2.2. Produtos enriquecidos com fitosteróis

Relativamente aos fitosteróis, a sua aplicação é controlada pelo Regulamento da Comissão Europeia (CE) nº258/97, de 27 de Janeiro, que se refere a novos alimentos e ingredientes alimentares. Para um novo alimento ou ingrediente alimentar ser colocado no mercado, necessita de uma autorização específica, envolvendo um processo de avaliação de segurança rigoroso. Como se referiu no capítulo anterior, em 1999, os fitosteróis foram classificados como um ingrediente seguro, sendo no ano seguinte aprovado na Europa, pelo CCAH, a sua utilização em margarinas. Segundo o Comité de Especialistas da FAO/WHO em Aditivos Alimentares (JECFA), em 2008, diversas aprovações foram concedidas para diferentes tipos de alimentos. É importante referir que, os produtos enriquecidos só com estanois não necessitam de cumprir este Regulamento, uma vez que já estavam no mercado como alimento antes da introdução desta legislação.

De acordo o Regulamento (CE) nº1924/2006, de 20 de Dezembro, os alimentos e suplementos alimentares com fitosteróis são autorizados a conter a menção: “redução do colesterol”. No entanto, este tipo de produtos não requer uma avaliação de eficácia, por isso, os consumidores podem ser iludidos a comprar cápsulas de fitosteróis, com efeitos menos comprovados que as margarinas (Ottestad *et al.*, 2013).

Contudo, é evidente que os fabricantes devem seguir a ingestão diária recomendada de 1,5 – 3,0 g para um adulto individual com características de tamanho médio, segundo a EFSA

(2008), ou como o National Cholesterol Education Program, que recomenda a ingestão diária de 2g de fitosteróis para diminuir elevados níveis de colesterol LDL (NCEP, 2002).

Nesse sentido, a CE emitiu o Regulamento n° 608/2004, de 31 de Março, relativo à rotulagem de alimentos e ingredientes alimentares aos quais foram adicionados fitosteróis, ésteres de fitosterol, fitostanóis e/ou ésteres de fitostanol. Tal como os suplementos alimentares, os produtos enriquecidos com fitosteróis devem seguir a legislação relativa à rotulagem dos produtos alimentares, e ainda devem conter as seguintes informações:

- A menção visível e legível “com adição de esteróis/estanóis vegetais”;
- A quantidade de fitosteróis, ésteres de fitosterol, fitostanóis ou ésteres de fitostanol adicionados (expressa em % ou g de esteróis/estanóis vegetais livres por 100 g ou 100 ml do produto alimentar) tem que constar na lista de ingredientes;
- A indicação de que o produto se destina exclusivamente a pessoas que desejam reduzir os níveis de colesterol no sangue, não excedendo um consumo superior a 3g/dia de fitosteróis adicionados;
- A indicação de que os pacientes com medicação para reduzir o nível de colesterol só deve consumir o produto sob vigilância médica;
- A indicação, facilmente visível e legível, de que o produto pode não ser adequado do ponto de vista nutritivo para mulheres grávidas ou lactantes e crianças de idade inferior a cinco anos;
- A recomendação do consumo do produto integrado numa dieta equilibrada e variada, que inclua o consumo frequente de frutas e produtos hortícolas para ajudar a manter os níveis de carotenóides;
- E uma definição de dose do alimento ou ingrediente alimentar em causa (de preferência em g ou ml) com a declaração da quantidade de esteróis/estanóis vegetais contida em cada dose.

Após pesquisa do enquadramento legal, e ao analisar o rótulo do suplemento alimentar em estudo verificou-se que o mesmo cumpre as regras impostas pelos Regulamentos acima mencionados.

Para finalizar este capítulo, tem-se assistido a um interesse crescente na análise qualitativa e quantitativa de fitosteróis, de modo a assegurar que os produtos presentes no mercado apresentam as quantidades recomendadas para reduzir os níveis de colesterol.

CAPÍTULO III

**Metodologias analíticas para a
determinação de fitosteróis**

A análise de fitosteróis é essencial para a avaliação analítica da qualidade e possível adulteração dos produtos comercializados. A determinação analítica dos fitosteróis constitui quase sempre uma tarefa complexa, devido à polaridade destas substâncias, ao baixo teor e à disponibilidade em que se encontram nas matrizes alimentares.

Inicialmente, os fitosteróis foram determinados através de métodos enzimáticos e espectrofotométricos, porém, os problemas de interferências e falta de especificidade para determinarem a quantidade total de fitosteróis levou a adopção de métodos cromatográficos (Silva *et al.*, 2008; Ramos e Saraiva, 2009). Contudo, de acordo os últimos autores deve ser utilizado uma metodologia validada, de modo a minimizar certas variações na determinação de fitosteróis.

Actualmente, não existem métodos de referência desenvolvidos para análise de fitosteróis em géneros alimentícios enriquecidos. Existem apenas alguns métodos de referência internacional aprovados pelas organizações como Association of Official Analytical Chemists (AOAC), American Oil Chemist's Society (AOCS), e International Organization for Standardization (ISO) para a análise de fitosteróis em óleos e gorduras (Ramos e Saraiva, 2009).

A determinação de fitosteróis é normalmente realizada por cromatografia gasosa (GC), contudo, na literatura pesquisada existem também métodos de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) (Lagarda *et al.*, 2006) e por espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FTIR) (Yan *et al.*, 2011). No entanto, por se tratar de moléculas complexas, a GC acoplada a ionização de chama (GC-FID) e, sobretudo, a espectrometria de massa (GC-MS) constitui a melhor e mais utilizada opção para a separação, identificação e quantificação dos fitosteróis (Saraiva *et al.*, 2011b; Winkler-Moser, 2011).

Tipicamente, a análise de fitosteróis livres inclui a extracção lipídica após homogeneização da amostra, saponificação alcalina e/ou hidrólise ácida, extracção dos compostos insaponificáveis, separação/purificação do resíduo, derivatização dos fitosteróis e análise por cromatografia gasosa (Lagarda *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2011b).

I. PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

A primeira etapa e a mais relevante na análise de fitosteróis é a preparação da amostra. Os objectivos nesta fase são isolar a fracção dos ésteres de esterol e de converter todos os fitosteróis conjugados ou esterificados em fitosteróis livres para serem analisados por cromatografia. Este processo depende da matriz e da forma original do fitosterol na amostra (Lagarda *et al.*, 2006; Winkler-Moser, 2011).

I.1. Extracção

Os fitosteróis presentes nas plantas ou em óleos vegetais podem ser extraídos através dos solventes clorofórmio-metanol, clorofórmio-metanol-água, *n*-hexano, diclorometano ou acetona (Lagarda *et al.*, 2006).

Para além da extracção de fitosteróis, outras substâncias não saponificáveis podem ser extraídas, como ceras e álcoois alifáticos, e outras substâncias que actuem como interferentes, o que pode causar uma incorrecta quantificação das substâncias de interesse. Desse modo, a extracção em fase sólida (SPE) ou por fluidos supercríticos (SFE) também pode ser aplicada em fitosteróis livres e esterificados a partir de óleos ou de gorduras (Cunha, 2007).

Na extracção por SFE, o solvente extractor é o dióxido de carbono usado em condições de temperatura e pressão supercríticas e apesar de permitir uma rápida extracção, não é muito comum por exigir investimentos elevados com a aquisição do equipamento.

Segundo Lagarda *et al.* (2006), ao comparar a extracção por solventes com a extracção por SPE, esta última é a que proporciona um fraccionamento mais rápido com menor perdas dos analitos e que utiliza menores volumes de solvente.

I.2. Saponificação

A saponificação é uma etapa crucial para a conversão dos fitosteróis, de modo a que sejam solúveis em solventes apolares.

Segundo Lagarda *et al.* (2006), a hidrólise ácida com ácido clorídrico, saponificação alcalina com hidróxido de potássio e extracção com tolueno tem sido utilizadas para a

determinação dos fitosteróis em produtos cerealíferos. No entanto, referem também que as saponificações são bastante incómodas para a análise de rotina e que a hidrólise ácida não é aplicável a todas as estruturas de fitosteróis, nomeadamente os Δ^7 -fitosteróis, como o Δ^7 -avenasterol e Δ^7 -estigmastanol, por se decomporem ou sofrerem isomerização após um curto período de hidrólise ácida.

Vários autores referem que a saponificação com hidróxido de potássio etanólico com a adição de um padrão interno, quer à temperatura ambiente ou por aquecimento, seguido da extracção do material insaponificável, tem sido adequada para a maioria das matrizes (Lagarda *et al.*, 2006; FAO, 2008).

1.3. Extracção da fracção insaponificável

Após a saponificação, adiciona-se um solvente ou mistura de solventes para a extracção das substâncias de interesse.

Geralmente, em matrizes alimentares, a fracção insaponificável dos fitosteróis é extraída através de um solvente apolar, designadamente por *n*-hexano (Ahmida *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2008; Saraiva *et al.*, 2011a e b). No entanto, outros solventes podem ser aplicáveis, como o heptano, éter dietílico, clorofórmio, ou as suas misturas (Lagarda *et al.*, 2006; Winkler-Moser, 2011).

2. DETERMINAÇÃO

2.1. Métodos Cromatográficos

Na literatura, encontram-se para a análise de fitosteróis tanto técnicas de GC como de Cromatografia Líquida (LC), apesar das primeiras serem mais frequentemente utilizadas, devido aos níveis de sensibilidade proporcionados pelos detectores associados. De seguida, aborda-se cada uma das técnicas.

2.1.1. Cromatografia Gasosa

Numa análise por GC, a volatilidade é um requisito imprescindível, uma vez que os fitosteróis são substâncias pouco voláteis e relativamente lábeis a temperaturas elevadas, pelo que a sua conversão química a éteres trimetilsilílicos ou a derivados acetilados é uma

etapa indispensável (Abidi, 2001; Lagarda *et al.*, 2006). Porém, os derivados trimetilsilílicos são mais simples e rápidos de se formarem, além de serem substâncias analogamente mais voláteis, menos polares e com maior massa molecular, logo apresentam um melhor comportamento cromatográfico do que os derivados acetilados (Abidi, 2001).

Os reagentes de derivatização mais utilizados na análise de fitosteróis, de acordo Lagarda *et al.* (2006), são o N,O-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) e o N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) em piridina, no entanto, Saraiva *et al.* (2011b) mostram que a mistura N-metil-N-trimetilsililtrifluoroacetamida (MSTFA) / 1,4-ditioeritritol (DTE) / trimetilliodosilano (TMIS) apresenta também uma boa opção, sendo adicionados ao resíduo da amostra, previamente seca em atmosfera de azoto.

Relativamente às colunas cromatográficas, as colunas capilares de sílica fundida tem sido largamente aceites como colunas de eleição por apresentarem tempos curtos de análise, menos interferências nos picos, uma melhoria na resolução e uma alta estabilidade térmica, além de possuírem uma grande durabilidade e flexibilidade (Abidi, 2001; Ahmida *et al.*, 2006).

Neste tipo de metodologia, a adição de um padrão interno (PI) à amostra é necessário para se compensar perdas durante o procedimento analítico e, portanto, uma correcção na quantificação dos compostos (Abidi, 2001). O padrão interno é tipicamente adicionado à amostra antes da hidrólise ácida ou alcalina, submetendo-se às mesmas condições de extracção que a amostra. No entanto, também pode ser adicionado depois da extracção, mas antes da derivatização. O PI mais comum para quantificar os fitosteróis é o colestano, uma vez que possui um tempo de retenção curto, apresentando pouca probabilidade de interferir com os outros esteróis e a sua resposta é muito semelhante à maioria dos fitosteróis (Winkler-Moser, 2011). No entanto, outros padrões internos podem ser adicionados, tais como, a betulina, o coprostanol e o colestanol (Lagarda *et al.*, 2006).

Conforme referido no início deste capítulo, a técnica GC-MS é a mais apropriada na identificação dos fitosteróis, uma vez que permite a análise por monitorização selectiva de iões (SIM) ou uma análise completa de todos os iões (SCAN), bem como permite a avaliação da pureza do pico eluído (Abidi, 2001). Por outro lado, também se pode utilizar a cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como já foi referido atrás. Porém, a GC-MS permite a análise de matrizes mais complexas do que a GC-FID.

2.1.2. Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) comparada com a metodologia anterior possui a vantagem de trabalhar a temperaturas de coluna muito mais baixas, em regra mesmo à temperatura ambiente, podendo, portanto ser adequada para a análise de compostos termicamente instáveis, nomeadamente, os fitosteróis. Contudo, a alta lipofilicidade destes compostos pode tornar a preparação da amostra e a sua análise cromatográfica difícil (Abidi, 2001; Lagarda *et al.*,2006). Além disso, esta metodologia pode não apresentar selectividade suficiente na separação de esteróis e estanois (Ramos e Saraiva, 2009) e assim, pode haver um possível risco de interferência de outros compostos que não os de interesse (Ahmida *et al.*, 2006).

A análise por HPLC pode ser realizada em colunas de fase reversa (RP), que permitem uma separação mais selectiva das substâncias homólogas e dos análogos insaturados (Lagarda *et al.*,2006). Existem outras possibilidades de detecção como o ultravioleta (UV), detector de díodos (DAD), detector evaporativo de dispersão de luz (ELSD) e detecção de massa (MS), porém, a RP-HPLC combinada com a detecção UV ou ELSD tem-se mostrado útil na análise molecular de ésteres de glicosídeos e glicosídeos acilados (Lagarda *et al.*,2006).

Desse modo, até ao momento, não existe uma técnica de LC tão eficaz na determinação de fitosteróis como a GC acoplada a espectrometria de massa (Ahmida *et al.*, 2006), por esse motivo, esta metodologia irá ser a eleita na análise deste tipo de compostos.

Assim, neste trabalho foi implementada e validada uma metodologia de GC-MS para a determinação de fitosteróis num suplemento alimentar sob a forma de comprimido, sendo descrita detalhadamente a explicação do trabalho efectuado, bem como os resultados obtidos na parte II.

PARTE II

ESTUDO EXPERIMENTAL

CAPÍTULO I

Determinação Analítica Laboratorial

I. AMOSTRAGEM

A investigação baseou-se num multivitamínico completo que combina num só produto os benefícios das vitaminas e minerais com os dos esteróis vegetais – Centrum Cardio®, cuja fotografia da embalagem se pode observar na figura 2.



Figura 2 - Embalagem do Centrum Cardio® (Pfizer, 2012).

O Centrum Cardio®, produzido nos laboratórios da Pfizer, é um suplemento alimentar com vitaminas, minerais e com adição de fitosteróis (Tabela 3), especialmente formulado para adultos que desejam manter saudáveis os níveis de colesterol no sangue. Comparando a fórmula do Centrum® com a composição do Centrum Cardio®, neste suplemento, foram adicionados uma mistura de esteróis vegetais de origem natural e aumentados os níveis de vitaminas B6, B12 e de ácido fólico, para manter o coração saudável, e de vitamina C e cobre, para manter níveis saudáveis de colesterol (Pfizer, 2012).

Tabela 3 - Composição do Centrum Cardio ® em dois comprimidos (retirado da embalagem).

VITAMINAS		MINERAIS	
Vitamina A (25% como β-Caroteno)	800 µg	Cálcio	162 mg
Vitamina D	5 µg	Fósforo	125 mg
Vitamina E	15 mg	Magnésio	100 mg
Vitamina K	30 µg	Ferro	5 mg
Vitamina C	120 mg	Iodo	100 µg
Vitamina B1	1,4 mg	Cobre	1000 µg
Vitamina B2	1,75 mg	Manganésio	2 mg
Vitamina B6	4 mg	Crómio	40 µg
Vitamina B12	3 µg	Selénio	30 µg
Ácido Fólico	400 µg	Zinco	5 mg
Biotina	62,5 µg		
Niacina	20 mg		
Ácido Pantoténico	7,5 mg		
ESTERÓIS VEGETAIS			
1000 mg			

Este suplemento alimentar entrou no mercado em Junho de 2010 e apresenta-se ao consumidor em embalagens de 60 comprimidos revestidos, com um consumo recomendado de 2 comprimidos uma vez ao dia, durante ou após as refeições, conforme o folheto informativo do produto (ver Anexo I).

O suplemento alimentar em estudo foi comercialmente adquirido em farmácias e parafarmácias localizadas na cidade de Coimbra, Portugal. Foram adquiridos dois lotes diferentes do Centrum Cardio® (ITE020A e 2VA007) e um lote do Centrum® (ITT060), isento dos compostos de interesse.

Para a realização deste estudo, procedeu-se à trituração de 10 comprimidos Centrum Cardio® (Figura 3) e 10 comprimidos Centrum®, com a ajuda de um almofariz, de modo a homogeneizar a amostra e facilitar a sua análise laboratorial.

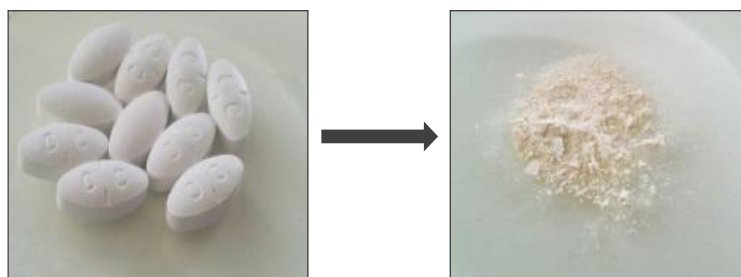


Figura 3 - A amostra em comprimido e após ser triturada.

As amostras foram devidamente identificadas e colocadas num local seco, com temperatura inferior a 25°C num frasco fechado de vidro âmbar, de modo a estarem protegidas da luz e do oxigénio atmosférico.

2. MATERIAIS

2.1. Reagentes Químicos e soluções padrão

Os padrões dos fitosteróis em estudo foram o campesterol, campestanol, estigmasterol, β -sitosterol e β -sitostanol que, assim como o colestano, utilizado como padrão interno, foram obtidos através da Sigma-Aldrich (Madrid, Espanha). O padrão de α -tocoferol foi também adquirido na Sigma.

Hidróxido de potássio, etanol absoluto e tolueno foram adquiridos na Merck (Darmstadt, Alemanha) e o *n*-hexano foi adquirido na Sigma-Aldrich. A água utilizada foi destilada. O azoto e o hélio foram obtidos à Sogafer (Coimbra, Portugal). Os reagentes utilizados para a mistura do derivatizante foram o N-metil-N-trimetilsilil-trifluoroacetamida

(MSTFA), que foi adquirido na Sigma, o 1,4-ditioeritritol (DTE) obtido na Merck e o Trimetilliodosilano (TMIS) que, também, foi adquirido na Sigma.

A solução de hidróxido de potássio (KOH) 2,5 M foi preparada, dissolvendo 14 g de KOH em 10 ml de água destilada num balão volumétrico de vidro âmbar de 100 mL. Depois de estar dissolvida a solução, aferiu-se com etanol absoluto.

O reagente de derivatização MSTFA:DTE: TMIS foi preparado misturando 5 mL de MSTFA, 10 mg de DTE e 10 μ L de TMIS.

As soluções *stock* de fitosteróis foram preparadas em etanol absoluto, com uma concentração de 2mg mL⁻¹, excepto β -sitosterol e β -sitostanol que foram preparadas com uma concentração de 10 mg mL⁻¹. As soluções de trabalho foram feitas a concentrações de 0,84 mg mL⁻¹ para o campesterol, 0,73 mg mL⁻¹ para o campestanol, 0,22 mg mL⁻¹ para o estigmasterol, 2,45 mg mL⁻¹ para o β -sitosterol e 3,0 mg mL⁻¹ para o β -sitostanol, preparadas em etanol absoluto, através da diluição das respectivas soluções *stock*. A solução de trabalho do padrão interno (PI), colestano, foi preparada a uma concentração de 2 mg mL⁻¹. A solução padrão do α -tocoferol foi preparada a uma concentração de 5 mg mL⁻¹.

Todas as soluções de trabalho foram armazenadas em recipientes âmbar a -20°C \pm 2°C, para evitar a sua deterioração.

2.2. Materiais e equipamento

No trabalho experimental foi usado o seguinte material e equipamento:

- Banho de ultra-sons Bandelin Sonorex RK100 (Berlim, Alemanha);
- Misturador vórtex Retsh (Haan, Alemanha);
- Bloco de aquecimento com sistema de evaporação de azoto (Reagente 5, Porto, Portugal);
- Balança analítica Mettler Toledo modelo AG 285 (Toledo, Suíça);
- Micropipetas da Gilson (Middleton, Estados Unidos da América);
- Estufa Memmert (Schwabach, Alemanha);
- Viais e cápsulas da Chromacol (Dias de Sousa, Lisboa, Portugal).

O equipamento de cromatografia gasosa com detecção por massa (GC-MS) da Agilent Technologies (AT) (Soquímica, Lisboa, Portugal) consistiu em:

- Cromatógrafo AT6890N;
- Injector automático AT 7683B;

- Coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento × 250 µm Ø × 0,25 µm de espessura);
- Detector de massa AT5975 acoplado ao cromatógrafo utilizado;
- Software da Agilent Technologies “Enhanced ChemStation” para análise de dados;
- Computador Eurosys GFC-01051.

3. PROCEDIMENTO ANALÍTICO

O procedimento analítico aplicado à análise de fitosteróis num suplemento alimentar sob a forma de comprimido baseou-se nos métodos desenvolvidos por Santos *et al.* (2007) e Saraiva *et al.* (2011b).

3.1. Saponificação

Para um tubo de ensaio graduado de 15 mL, pesaram-se $10,0 \pm 0,2$ mg de Centrum Cardio®, adicionou-se 2,5 mL da solução de hidróxido de potássio (2,5M) e, de seguida, agitou-se no vórtex até dissolução parcial da amostra. Terminada esta etapa, colocou-se o ensaio na estufa durante 1 hora à temperatura de 60°C.

3.2. Processo de extracção da fracção insaponificável

Após a saponificação alcalina, deixou-se arrefecer a amostra à temperatura ambiente, adicionou-se 1 mL *n*-hexano e agitou-se no vórtex. De seguida, adicionou-se 2 mL de água destilada e agitou-se no vórtex.

Transferiu-se 100 µL da fracção insaponificável para um vial de derivatização e adicionou-se 50 µL de padrão interno, colestano. Posteriormente colocou-se a solução orgânica a evaporar, suavemente, sob corrente de azoto à temperatura de 60°C.

3.3. Derivatização

Ao resíduo seco, adicionou-se 50 µL de MSTFA:DTE:TMIS agitou-se no vórtex ligeiramente de forma a promover a completa dissolução do resíduo e procedeu-se à

derivatização dos fitosteróis por aquecimento a 60 °C durante 30 minutos. Depois de concluída a reacção de derivatização, colocou-se a injectar no sistema cromatográfico.

3.4. Condições cromatográficas

A determinação das substâncias em estudo foi efectuada por GC-MS. No sistema GC-MS a injeção efectuou-se automaticamente com um volume de injeção de 1 µL, em modo de “*splitless*”, em 1 minuto, com o injector à temperatura de 250 °C. Para a separação cromatográfica usou-se uma coluna capilar, como referido no ponto 2.2. A temperatura inicial da coluna foi de 200 °C, mantida durante 1 minuto. Após esse período aumentou 20°C /min, até que se atingiu uma temperatura de 300 °C, a qual permaneceu durante 10 min (Santos *et al.*, 2007). O hélio foi usado como gás vector com um fluxo constante de 1 mL/min, com uma pressão inicial de 16.07 psi.

A temperatura do detector foi de 280 °C. O espectrómetro de massas funcionou com um impacto electrónico a 70 eV em modo “SCAN” numa gama de massas de 50 *m/z* a 550 *m/z* nos ensaios de identificação e quantificação das substâncias em análise, bem como, na caracterização dos respectivos espectros de massa. O tempo de cada injeção foi de 16 minutos. Entre cada injeção, a seringa foi sempre lavada, em modo automático, duas vezes com tolueno.

A identificação dos fitosteróis foi efectuada, comparando os tempos de retenção dos picos cromatográficos obtidos na amostra com os dos padrões referidos no ponto 2.1., bem como comparando os correspondentes espectros de massa. Os resultados foram analisados equiparando os rácios obtidos das áreas dos picos dos fitosteróis da amostra com os do padrão interno de cada cromatograma. Todas as corridas GC-MS foram realizadas em triplicado.

3.5. Quantificação

Para a quantificação das substâncias em estudo construíram-se curvas de calibração a partir de soluções padrão com cinco níveis de concentração. Para tal, a um vial de derivatização adicionaram-se 20 µl, 40 µl, 60 µl, 80 µl e 100 µl da solução padrão campesterol, campestanol, estigmasterol e β-sitostanol e 50 µl, 100 µl, 150 µl, 200 µl e 250 µl da solução padrão β-sitosterol. Após essa adição, colocou-se 50 µl de colestano (PI) e

procedeu-se à evaporação do solvente até resíduo seco, em corrente de azoto a 60 °C, seguindo o tratamento igual ao das amostras.

4. VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DE FITOSTERÓIS NUM SUPLEMENTO ALIMENTAR SOB A FORMA DE COMPRIMIDO

De modo a garantir que, o método analítico desenvolvido forneça resultados fiáveis e representáveis sobre a amostra procedeu-se à validação.

A validação do método foi efectuada através da determinação da selectividade, linearidade, precisão e exactidão.

4.1. Selectividade

Segundo Ribani *et al.* (2004), a selectividade de um método é a capacidade de avaliar de forma inequívoca o analito na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação, ou seja, sem interferências de nenhum outro composto presente na amostra.

Neste ensaio, analisou-se a amostra Centrum® utilizando a mesma metodologia descrita no ponto anterior, de modo a verificar se possui interferentes que comprometessem a identificação e quantificação dos compostos em análise.

4.2. Linearidade

A capacidade de obter, dentro de uma gama determinada, resultados directamente proporcionais à concentração da substância na amostra define a linearidade do método (Ribani *et al.*, 2004).

A linearidade atesta a proporcionalidade entre as áreas obtidas dos cromatogramas e as concentrações existentes nas amostras, sendo esta relação maior, quanto mais próximo de 1,0 for o valor do coeficiente de determinação (r^2).

Neste estudo, procedeu-se à avaliação da linearidade através de soluções padrão com diferentes e conhecidos níveis de concentração de fitosteróis (campesterol, campestanol, estigmasterol, β -sitosterol e β -sitostanol). O estudo da linearidade processou-se durante 3 dias.

4.3. Precisão

A precisão define-se como o grau de concordância dos resultados obtidos numa série de análises de uma mesma amostra, sendo usualmente, expressa através do desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) (Bressolle *et al.*, 1996; Ribani *et al.*, 2004).

Neste estudo, a precisão do método analítico foi avaliada através da repetibilidade e precisão inter-dia, de acordo as recomendações da *International Conference on Harmonization* (ICH, 2005). A repetibilidade foi avaliada analisando a amostra (Centrum Cardio®), em triplicado, para o mesmo dia e a precisão inter-dia foi avaliada sobre as mesmas amostras, utilizando as mesmas condições analíticas, mas em três dias diferentes (nove repetições). Com base no modelo da ICH (2005), a reprodutibilidade dos resultados não foi avaliada, uma vez que requer o envolvimento de diferentes laboratórios.

4.4. Exactidão

A exactidão corresponde ao grau de concordância entre os resultados de um determinado ensaio e um valor de referência aceite como verdadeiro (Ribani *et al.*, 2004; ICH, 2005).

A exactidão do método determinou-se através dos ensaios de recuperação das substâncias em análise. A recuperação está relacionada com a exactidão, pois mostra a quantidade de determinado composto recuperado no procedimento, em relação à quantidade real presente na amostra.

Para avaliar este parâmetro, foram fortificadas três amostras de Centrum® com as soluções de trabalho mencionadas no ponto 2.1. deste capítulo, em triplicado, com três níveis diferentes apresentados na tabela 4.

Tabela 4 - Os diferentes níveis de fortificação para cada composto.

Fortificação	Campesterol	Campestanol	Estigmasterol e β -sitostanol	β -sitosterol
Nível 1	300 μ l	200 μ l	200 μ l	500 μ l
Nível 2	600 μ l	300 μ l	400 μ l	1000 μ l
Nível 3	900 μ l	400 μ l	600 μ l	1500 μ l

Os ensaios de recuperação foram analisados nas mesmas condições analíticas e a exactidão foi avaliada através das percentagens de recuperação para os 3 níveis de fortificação.

4.5. Limite de Detecção

O limite de detecção (LOD) define-se como a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, sob condições experimentais estabelecidas. O LOD indica a concentração que a substância pode ser detectada com cerca de 99% de confiança (Ahmida *et al.*, 2006). No entanto, uma leitura inferior ao limite de detecção não significa a ausência da substância em análise, apenas se pode afirmar que a concentração do analito em questão é inferior a um determinado valor.

A determinação do LOD baseada no sinal-ruído pode ser aplicada apenas aos processos analíticos que apresentam ruído de linha de base. A determinação da relação sinal-ruído é efectuada por comparação dos sinais medidos a partir de amostras com baixas concentrações conhecidas do analito com as amostras em branco e que estabelece a concentração mínima para a qual a substância a analisar pode ser detectada com fiabilidade (ICH, 2005). De acordo esta última referência, a relação sinal-ruído entre 3:1 é usualmente considerada aceitável para calcular o limite de detecção.

Assim, neste estudo, o LOD foi determinado pela razão sinal – ruído (S/R), de 3:1, comparando o sinal obtido de amostras brancas com o sinal obtido da melhor curva analítica de cada composto analisado.

4.6. Limite de Quantificação

O limite de quantificação (LOQ) define-se como a menor concentração de substância que pode ser quantificada na amostra, com exactidão e precisão aceitáveis, em condições analíticas idênticas às utilizadas nas amostras (Ribani *et al.*, 2004).

Os critérios utilizados para o cálculo do LOD foram também os seleccionados para a determinação do LOQ, no entanto, segundo ICH (2005) a razão sinal-ruído típica utilizada é de 10:1.

Nesse caso, o LOQ foi determinado como sendo a concentração que produziu uma relação sinal-ruído de 10 vezes nos cromatogramas de cada composto, analisado seguindo o mesmo procedimento analítico do limite de detecção.

5. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO

Foram ensaiados diferentes critérios analíticos durante o processo de determinação dos fitosteróis no suplemento alimentar sob a forma de comprimido, de forma a desenvolver um método simples que usasse o mínimo de solvente possível e fornecesse bons rendimentos extractivos e uma precisão elevada.

5.1. Optimização da saponificação e da extracção

A saponificação é o passo fundamental neste tipo de análise, uma vez que permite a transformação de compostos lipossolúveis em compostos solúveis em água, o que facilita a extracção de fitosteróis por um solvente apolar.

Neste estudo, optou-se por uma saponificação alcalina (solução KOH em etanol), pelo facto de usar solventes capazes de dissolver lípidos e de quebrar as ligações de esterificação existentes entre os fitosteróis e os ácidos gordos.

Para avaliar a concentração e volume do reagente de saponificação, bem como a temperatura e o tempo desta etapa tomou-se como base o estudo efectuado por Santos *et al.* (2007). Como tal, testaram-se os parâmetros abaixo mencionados, tendo-se obtido os melhores resultados com as seguintes condições:

- Concentração do reagente de saponificação: 2,5 M KOH;
- Volume do reagente de saponificação: 2 500 μ l;
- Temperatura de saponificação: 60 °C;
- Tempo de saponificação: 60 minutos.

Como estes critérios foram os melhores para a análise de leite e de iogurte (Santos *et al.*, 2007), optou-se por utilizar as mesmas condições para a matriz em estudo, conseguindo-se obter bons resultados.

Após o processo de hidrólise alcalina, a mistura foi dissolvida com um solvente ou uma mistura de solventes, apropriados para as substâncias de interesse, imiscíveis em água. Neste estudo, a fracção insaponificável foi isolada com *n*-hexano puro, de forma a aumentar o rendimento extractivo.

Com base nos estudos para o desenvolvimento do método analítico, como referido anteriormente, o volume utilizado do solvente foi de 1 mL e acrescentou-se 2 mL de água destilada, para se obter uma melhor separação das fases saponificável e insaponificável.

5.2. Optimização da derivatização

Os reagentes sililantes apresentam-se como os agentes derivatizantes de primeira escolha relativamente à análise de fitosteróis por cromatografia gasosa (Cunha, 2007).

As condições de derivatização foram seleccionadas, segundo o estudo de Saraiva *et al.* (2011b), que comparou três reagentes: *N*-(*terc*-butildimetilsilil)-*N*-metiltrifluoroacetamida (MTBSTFA) e iodeto de amónio (NH₄I) na proporção de 1000 µl: 4mg; *N,O*-bis-trimetilsililtrifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilclorosilano (TMCS) e *N*-metil-*N*-trimetilsilil-trifluoroacetamida (MSTFA) / 1,4-ditioeritritol (DTE) / trimetilliodosilano (TMIS) na proporção de 5mL:10mg:10µL.

Assim, no desenvolvimento desta etapa utilizou-se a mistura do MSTFA:DTE:TMIS por ser a mais adequada, simples, rápida e sensível e a reacção de derivatização efectuou-se por aquecimento a 60 °C durante 30 minutos.

5.3. Optimização das condições cromatográficas

No que respeita ao processo cromatográfico, este baseou-se na proposta de Santos *et al.* (2007) e Saraiva *et al.* (2011b). A coluna HP-5MS mostrou-se adequada para a separação das substâncias em estudo. O modo “*splitless*” e o programa de temperatura estabelecidos permitiram obter uma separação eficiente dos fitosteróis.

5.3.1. Optimização da quantidade de amostra

A escolha de uma amostra não representativa pode originar equívocos que podem não ser compensados nas etapas seguintes do procedimento e que causam forçosamente erros de quantificação.

No decorrer desta investigação, testou-se várias quantidades de amostra, entre 5 e 50 mg. Concluindo que, a quantidade óptima seria de 10 mg, uma vez que com 5 mg apenas se conseguiu detectar dois compostos, conforme figura 4 e com 50 mg obteve-se muitos interferentes, não tendo capacidade para ser totalmente hidrolisada, como se verifica na figura 5.

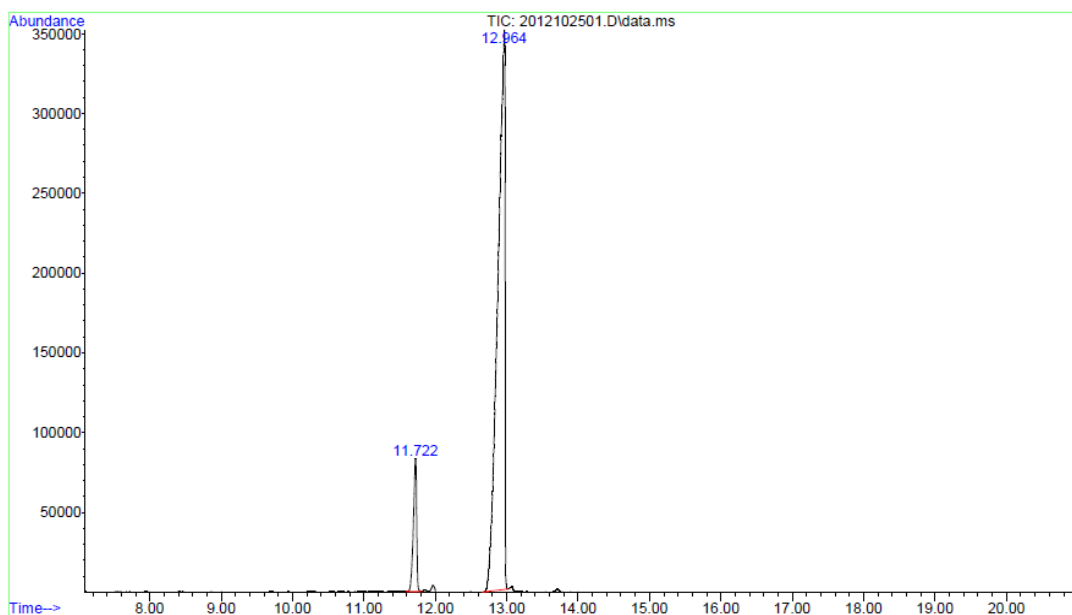


Figura 4 - Cromatograma da quantidade de 5 mg da amostra, isenta de padrão interno.

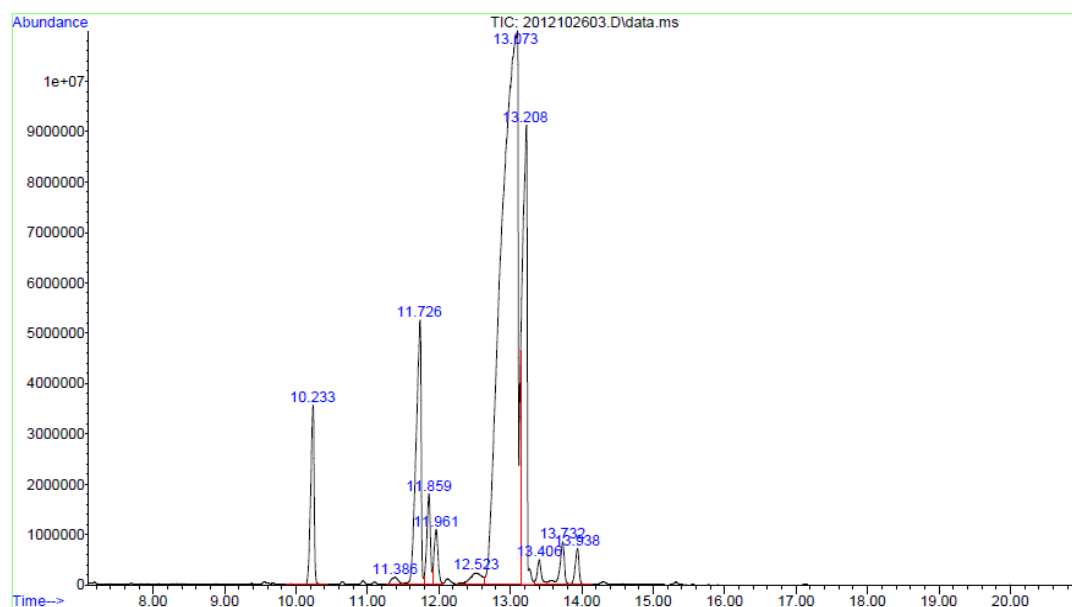


Figura 5 - Cromatograma da quantidade de 50 mg da amostra, isenta de padrão interno.

5.3.2. Estudo do padrão interno

O padrão interno (PI) é frequentemente utilizado em análises cromatográficas, sendo adicionado numa concentração conhecida a todas as amostras a serem analisadas que, preferencialmente deve ser colocado antes do início do processo extractivo.

Conforme referido na revisão da literatura, no capítulo III, um padrão interno é uma substância que apresenta um comportamento químico e resposta analítica idêntica ao composto em análise. Qualquer factor que afecte o composto em estudo irá também afectar o padrão interno ao mesmo nível, permitindo uma melhoria na extracção das substâncias de interesse.

Atendendo às características intrínsecas das substâncias em análise, procurou-se usar um padrão interno que tivesse um comportamento extractivo e cromatográfico idêntico aos fitosteróis em estudo e que tivesse ausente na amostra. Por esse motivo, e perante o limitado número de padrões comercialmente disponíveis, a escolha recaiu no colestano.

Ao quantificar os compostos presentes na amostra, verificou-se após vários ensaios efectuados, que a adição do colestano teria que ser no momento da extracção da fracção insaponificável. Tal facto ter-se-á ficado a dever, a que o colestano, durante o processo de saponificação da amostra em pó, ser consideravelmente afectado resultando numa quantificação deficiente em modo SCAN, como é visível analisando os cromatogramas com a adição do padrão interno no início (figura 6) e no final da saponificação (figura 7), conforme identificado na tabela 5.

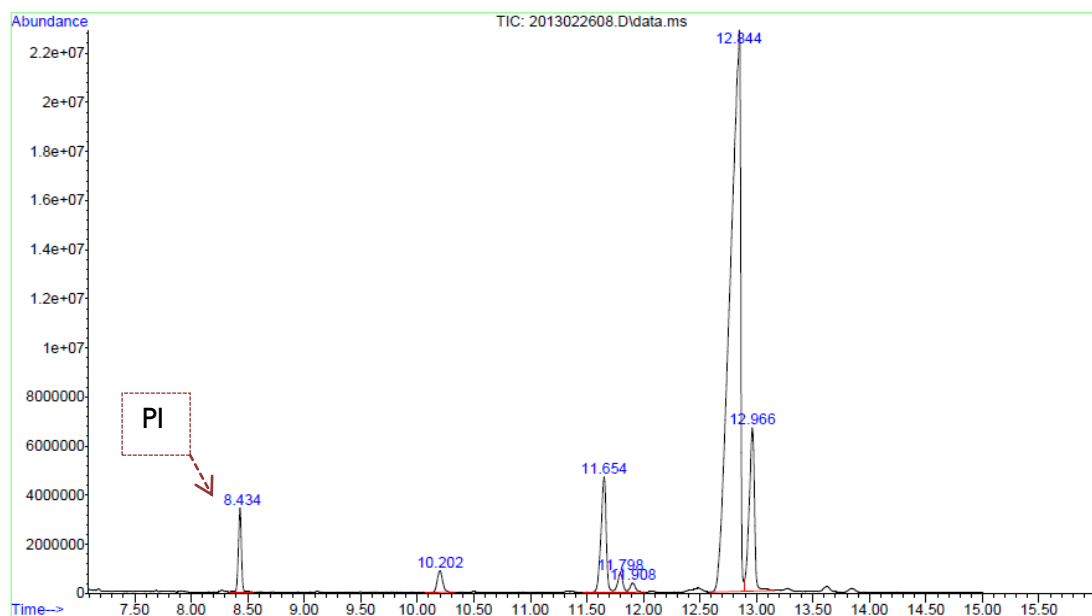


Figura 6 - Cromatograma da quantidade de 10 mg da amostra, com a adição de 50 μ l de padrão interno (PI) antes da saponificação.

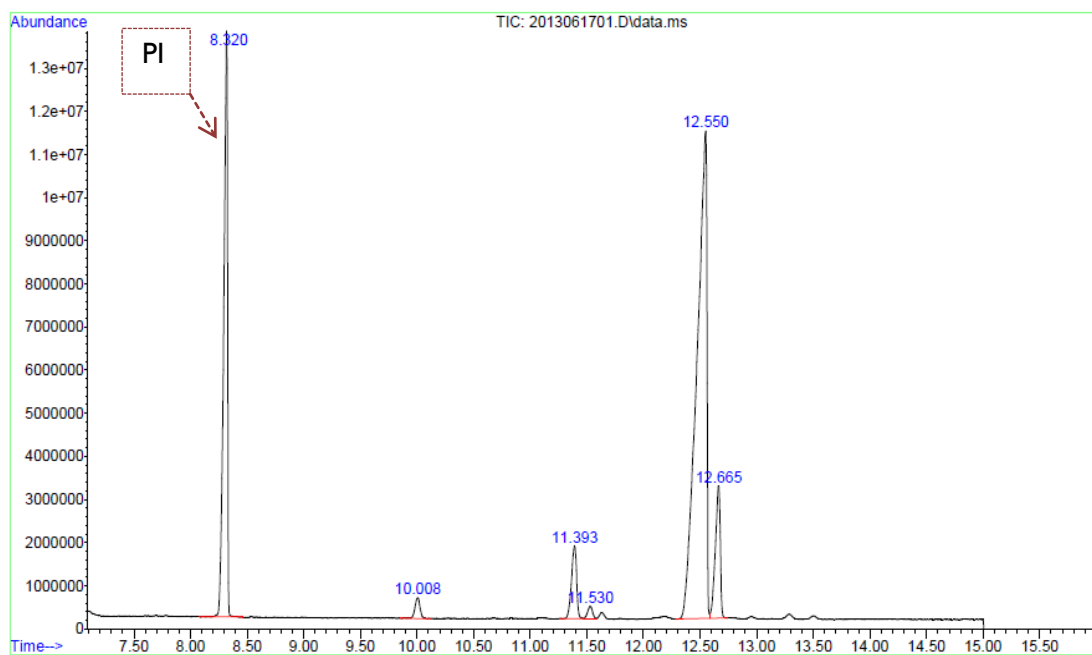


Figura 7 - Cromatograma da amostra (10 mg), com a adição de 50 μ l do colestano (PI) no momento da extracção da fracção insaponificável.

CAPÍTULO II

Resultados e Discussão

I. IDENTIFICAÇÃO DOS FITOSTERÓIS

O método desenvolvido permitiu a identificação de cinco fitosteróis e uma vitamina, conforme a figura 8, tendo-se verificado, em geral, um perfil qualitativo idêntico em todas as amostras analisadas.

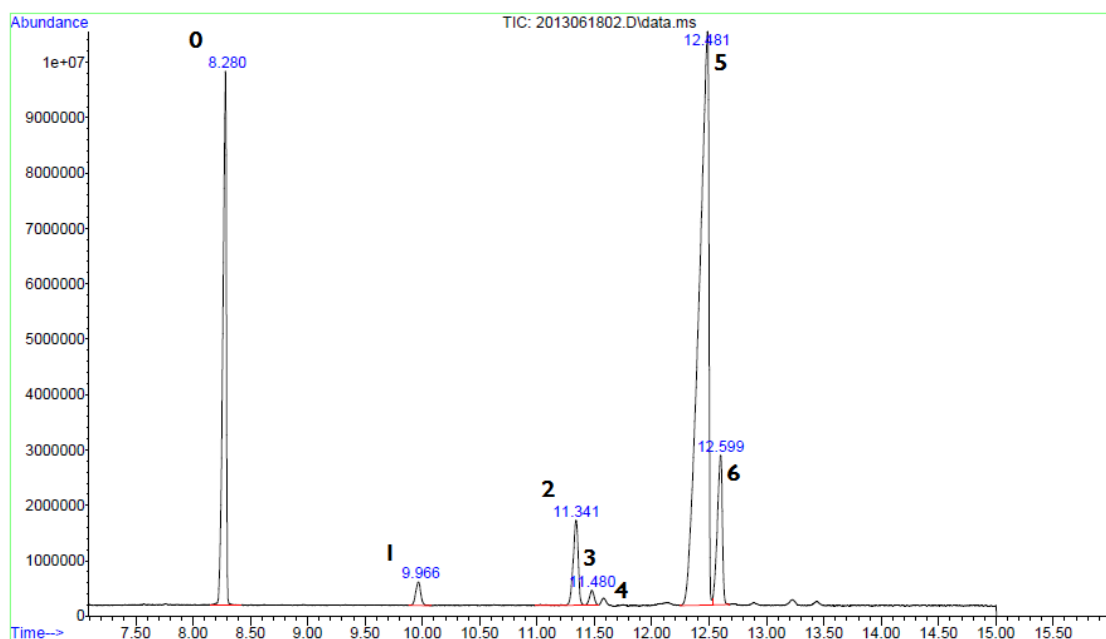


Figura 8 - Cromatograma obtido após o procedimento analítico descrito da amostra.

Na tabela 5, pode observar-se o nome do composto identificado, o tempo de retenção e os principais íões de fragmentação (m/z).

Tabela 5 - Tempos de retenção (RT) e fragmentação dos íões para identificação dos fitosteróis presentes no suplemento alimentar.

Pico	Nome	RT	Principais íões de fragmentação, m/z					Outros
			$[M]^+$	$[M-15]^+$	$[M-90]^+$	$[M-105]^+$	$[M-129]^+$	
0	Colestano (PI)	8,280	372	357				217
1	α -tocoferol	9,966	502	487				237;277
2	Campesterol	11,341	472	457	382	367	343	129;145;255; 343
3	Campestanol	11,480	474	459	384	369	345	215 ;305;417
4	Estigmasterol	11,579	484	469	394	379	355	129 ;255
5	β -sitosterol	12,481	486	471	396	381	357	129;255
6	β -Sitostanol	12,599	488	473	398	383	359	215 ; 305; 431

Nota: Em bold estão os íões com maior abundância (lão diagnóstico)

Como se referiu anteriormente, a identificação dos fitosteróis e da vitamina foi efectuada, comparando os tempos de retenção dos picos cromatográficos obtidos na amostra com os dos padrões e os respectivos espectros de massa, como se verifica no Anexo II.

Conforme indica o folheto informativo do suplemento alimentar, os fitosteróis adicionados provêm de uma marca registada (CoroWise® da Cargill, Estados Unidos da América) que produz como um único ingrediente uma mistura de esteróis vegetais de origem natural. Por esse motivo, é perceptível que os compostos identificados correspondam aos mais abundantes na natureza.

Os cinco fitosteróis detectados foram quantificados. Contudo a vitamina identificada na amostra, não foi quantificada devido ao tempo reduzido em que decorreu este estudo e por não ser um composto de destaque neste estudo. No entanto, deve ter-se em conta a sua detecção com a metodologia analítica desenvolvida para a análise de fitosteróis, uma vez que pode também ser apropriada para o estudo do α -tocoferol.

2. VALIDAÇÃO DO MÉTODO

2.1. Selectividade

A amostra Centrum® analisada, isenta das substâncias de interesse, não apresentou nenhum interferente no tempo de retenção esperado, como se pode observar na figura 9.

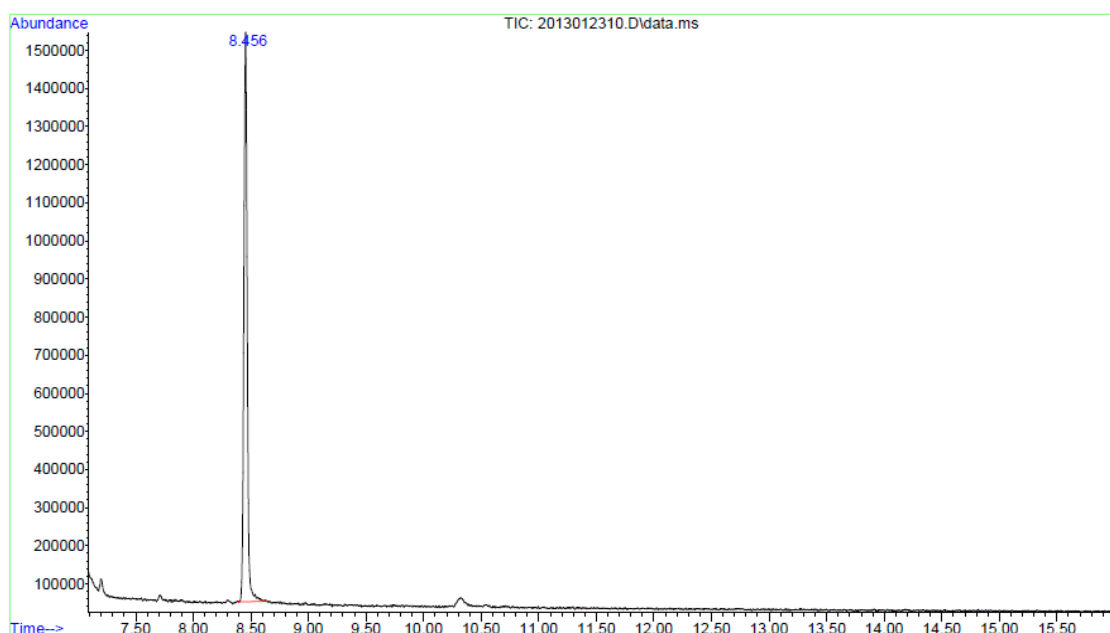


Figura 9 - Cromatograma de uma amostra isenta de fitosteróis (Centrum®) com a adição do PI.

2.2. Linearidade

A avaliação da linearidade do método foi efectuada com soluções padrão. Cada curva de calibração foi elaborada com cinco níveis de concentração para cada substância, conforme as indicações da ICH (2005). O intervalo de linearidade foi concordante com a quantidade de fitosteróis prevista na amostra, nomeadamente: 0,3 – 0,7 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para o campesterol; 0,3 – 1,5 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para o campestanol; 0,09 – 0,45 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para o estigmasterol; 2,5 – 12,3 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para o β -sitosterol e 1,2 – 6,0 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para o β -sitostanol.

Os resultados da avaliação da linearidade do método analítico foram apropriados, obtendo-se coeficientes de determinação (r^2) de 0,9966; 0,9984; 0,9968; 0,9939 e 0,9951, respectivamente para o campesterol, campestanol, estigmasterol, β -sitosterol e β -sitostanol, como revelam as figuras seguintes (figura 10,11,12,13 e 14).

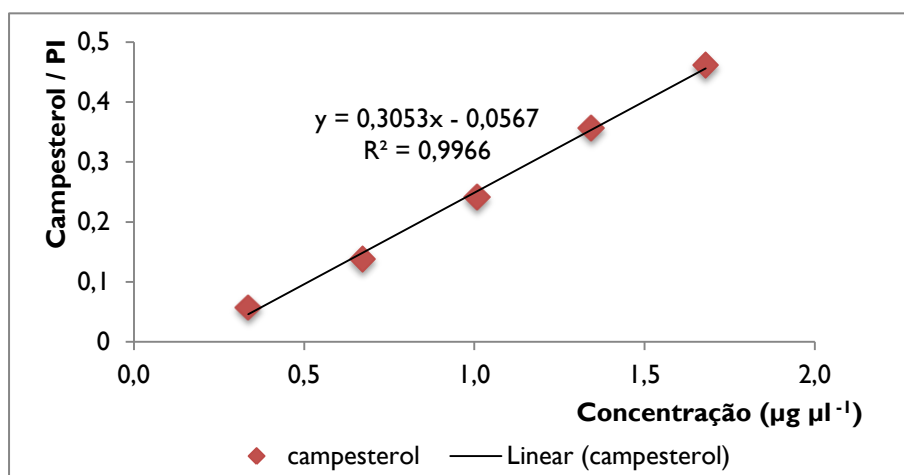


Figura 10 - Curva de calibração para o campesterol.

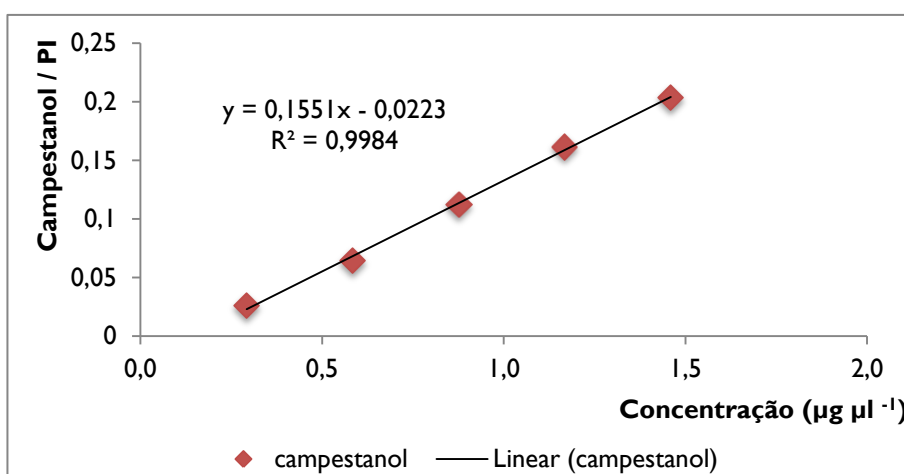


Figura 11 - Curva de calibração para o campestanol.

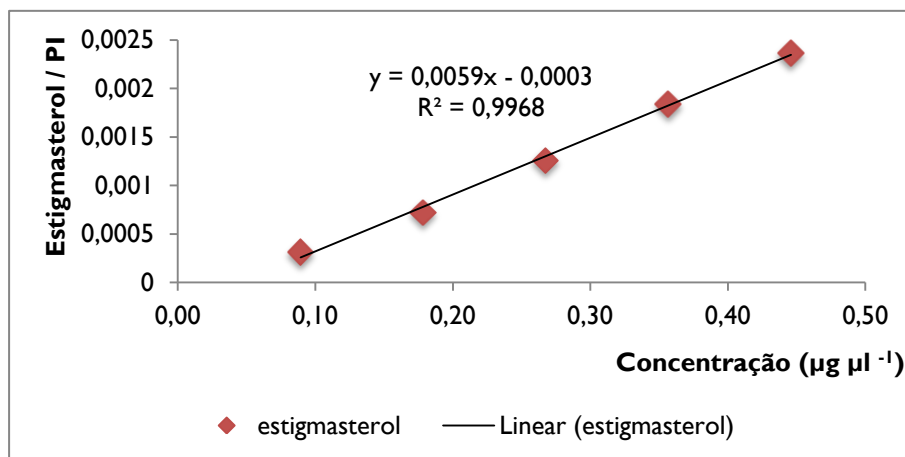


Figura 12 - Curva de calibração para o estigmasterol.

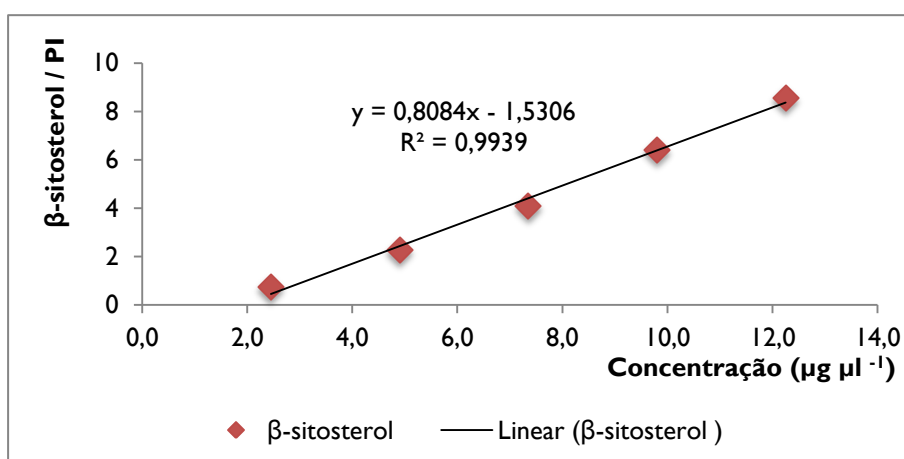


Figura 13 - Curva de calibração para o β-sitosterol.

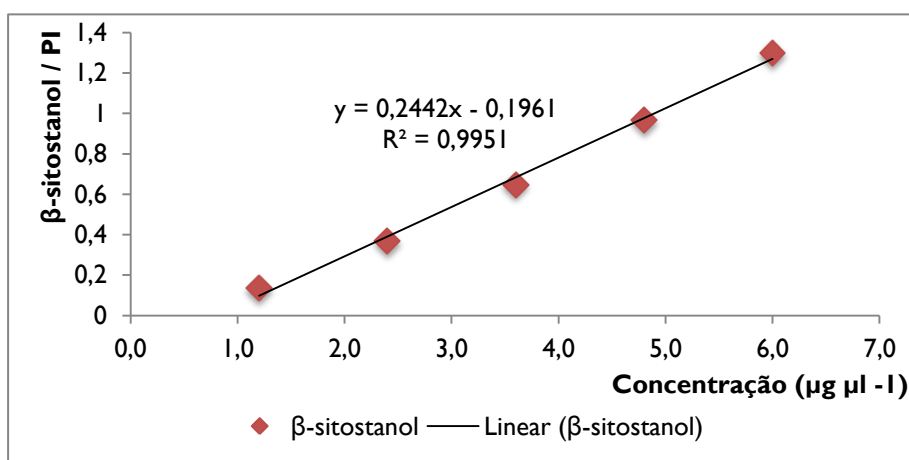


Figura 14 - Curva de calibração para o β-sitostanol.

2.3. Precisão e Exactidão

Os resultados obtidos para a precisão encontram-se na tabela 6. Os valores obtidos para a repetibilidade e precisão inter-dia, expressos pelo coeficiente de variação podem considerar-se aceitáveis (CV <15%) para todas as substâncias em análise, segundo Bressolle *et al.* (1996).

Tabela 6 - Valores obtidos para a precisão do método na amostra.

	Campesterol	Campestanol	Estigmasterol	β -sitosterol	β -sitostanol
Repetibilidade CV (%) $n=3$	2,15	1,16	1,29	2,76	2,81
Precisão inter-dia CV (%) $n=9$	7,69	5,97	4,71	7,11	8,07

O valor da repetibilidade mais elevado, 2,81%, foi obtido para o β -sitostanol, sendo o valor mais baixo, 1,16%, para o campestanol. Relativamente à precisão inter-dia, o campesterol e o β -sitostanol apresentam os valores maiores, 7,69% e 8,07%, respectivamente, enquanto o estigmasterol apresenta um menor valor (4,71%).

Comparando os valores obtidos para a precisão pela metodologia analítica desenvolvida com os descritos na literatura científica com um método cromatográfico semelhante, pode-se constatar que os valores são similares com outros estudos (Ahmida *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2011b).

Relativamente à exactidão, a recuperação foi calculada através da razão entre a quantidade de substância adicionada e a quantidade de substância recuperada (Ahmida *et al.*, 2006), expressa em percentagem, como se apresenta na tabela 7.

Tabela 7 - Valores relativos à exactidão do método para os fitosteróis presentes na amostra.

	Campesterol	Campestanol	Estigmasterol	β -sitosterol	β -sitostanol	
Recuperação média $n=3$ (%)	Nível 1	82,86 \pm 10,83	97,60 \pm 14,86	104,52 \pm 8,81	101,16 \pm 1,40	108,90 \pm 4,77
	Nível 2	70,84 \pm 2,05	95,72 \pm 3,20	97,52 \pm 0,28	71,30 \pm 4,07	101,47 \pm 5,52
	Nível 3	67,05 \pm 2,86	88,16 \pm 1,25	87,58 \pm 3,43	66,52 \pm 12,13	93,22 \pm 18,53

Analisando a tabela 7, os resultados obtidos foram adequados, tendo os níveis de recuperação variado entre 60% e 110% para as substâncias em análise. O campesterol é o que apresenta percentagens mais baixas, nos níveis 1 e 2 de fortificação, enquanto o β -sitosterol mostra a percentagem mais baixa para o nível 3. Para o β -sitostanol foram obtidos os valores de recuperação mais elevados.

As percentagens de recuperação obtidas para o campesterol e β -sitosterol, nos níveis de fortificação 2 e 3, foram muito próximas, no entanto, o campesterol apresenta uma menor variabilidade. Relativamente ao campestanol, mostra uma recuperação de 97,60% para o nível 1, mas com uma significativa variabilidade (14,86%), apresentando percentagens próximas ao estigmasterol, nos outros dois níveis de fortificação. No que respeita, ao β -sitostanol, o composto que apresenta maiores percentagens de recuperação, a sua variabilidade é também elevada, nomeadamente no último nível de fortificação.

Ao confrontar as recuperações obtidas dos diferentes níveis com outros estudos, verifica-se um claro decréscimo à medida que as quantidades aumentam (Ahmida *et al.*, 2006; Saraiva *et al.*, 2011b). Tal facto pode ser causado pelo “efeito da matriz”, uma vez que a matriz pode interferir no modo de preparação de amostra e na qualidade dos resultados obtidos. Sendo assim, para compensar este efeito deveria ter-se construído uma curva de calibração idêntica às anteriores, mas com a adição do padrão da substância em diversas concentrações numa matriz similar à da amostra, (Centrum®), que não apresenta os compostos de interesse (Ribani *et al.*, 2004).

2.4. Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A tabela 8 mostra os limites de detecção e quantificação para os diferentes compostos quantificados.

Tabela 8 - Valores obtidos para o limite de detecção e quantificação de cada composto.

Composto	LOD ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de amostra)	LOQ ($\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de amostra)
Campesterol	0,05	2,57	0,08	4,00
Campestanol	0,1	5,44	0,2	9,51
Estigmasterol	0,04	2,11	0,09	4,56
β -sitosterol	3,10	155,04	3,12	156,07
β -sitostanol	0,3	14,52	0,5	25,44

Como a determinação dos fitosteróis foi efectuada numa matriz em forma de comprimido, os resultados obtidos não podem ser comparáveis com estudos que determinaram em soro humano ou em leites e iogurtes. Contudo, os valores obtidos do limite de detecção e quantificação para cada composto são suficientes para quantificar os fitosteróis na amostra em causa.

3. TEOR DE FITOSTERÓIS NO SUPLEMENTO ALIMENTAR SOB A FORMA DE COMPRIMIDO

O principal objectivo desta investigação consiste no desenvolvimento de um método que permita a identificação e quantificação de fitosteróis numa matriz em forma de comprimido, uma vez que até ao momento não existe um procedimento.

Como se verificou, a metodologia analítica desenvolvida permitiu a identificação de cinco fitosteróis, sendo então, quantificados neste ponto.

A tabela 9 mostra os resultados obtidos para os fitosteróis identificados no suplemento alimentar sob a forma de comprimido (Centrum Cardio®). A concentração dos fitosteróis é apresentada em $\mu\text{g mg}^{-1}$, indicando-se o valor médio e o desvio padrão obtido em 9 amostras analisadas individualmente em triplicado.

Tabela 9 - Teor de fitosteróis ($\mu\text{g mg}^{-1}$) no suplemento alimentar sob a forma de comprimido.

Teor de fitosteróis ($\mu\text{g mg}^{-1}$ de amostra)				
Campesterol	Campestanol	Estigmasterol	β -sitosterol	β -sitostanol
49,87 \pm 3,83	19,76 \pm 1,18	7,71 \pm 0,36	298,26 \pm 21,26	133,29 \pm 10,75
Total do teor de fitosteróis ($\mu\text{g mg}^{-1}$)				
509,58				

O β -sitosterol é a substância maioritária no suplemento alimentar sob a forma de comprimido. Como se pode verificar pela tabela 9, o teor quantificado foi de 298,26 $\mu\text{g mg}^{-1}$, representando 58,67% do total de fitosteróis (Figura 15). Como referido anteriormente, este composto é o que se encontra em maior abundância na natureza, como tal, seria de esperar que fosse também o mais significativo na amostra.

O β -sitostanol foi o segundo composto mais abundante, apresentando um teor médio de 133,29 $\mu\text{g mg}^{-1}$. O elevado teor deste composto no suplemento alimentar pode basear-se em alguns estudos que sugerem, que os estanois vegetais são mais eficazes na redução do

colesterol quando comparados com os esteróis vegetais (Saraiva *et al.*, 2011a). Contudo, como se analisou na revisão da literatura, esta eficácia tem-se mostrado idêntica em ambos os esteróis.

O campesterol foi o terceiro composto quantificado que apresentou um teor de 49,87 $\mu\text{g mg}^{-1}$. De seguida, aparece o campestanol com um teor de 19,76 $\mu\text{g mg}^{-1}$ presentes no suplemento alimentar analisado.

O último composto presente no suplemento alimentar foi o estigmasterol, por ser o composto menos abundante e apresentar um pico cromatográfico indefinido foi integrado no equipamento GC-MS pelo modo Extracted Ion Chromatogram (EIC). Dessa forma, determinou-se um teor de 7,71 $\mu\text{g mg}^{-1}$, representando apenas 1,51% do total de esteróis vegetais quantificados na amostra. Apesar de ser o composto menos abundante no suplemento alimentar, a sua presença é importante por possuir uma capacidade simultânea na inibição da absorção e síntese endógena do colesterol, uma vez que o β -sitosterol e o campesterol apenas parecem inibir a absorção do colesterol (Saraiva *et al.*, 2011a).

Por não existirem estudos com uma matriz similar à analisada, os resultados obtidos serão comparados com outros ensaios que utilizaram uma metodologia semelhante em matrizes como leite e iogurtes.

Assim, pela observação da figura 15, verifica-se que o suplemento alimentar examinado apresenta uma proporção similar à descrita por Saraiva *et al.* (2011a) para leites enriquecidos com fitosteróis, nomeadamente os esteróis vegetais β -sitosterol e campesterol, pois foram os que apresentaram maior quantidade. Já em relação aos esteróis vegetais saturados, vulgo estanois verifica-se que o β -sitostanol foi o mais abundante seguido do campestanol.

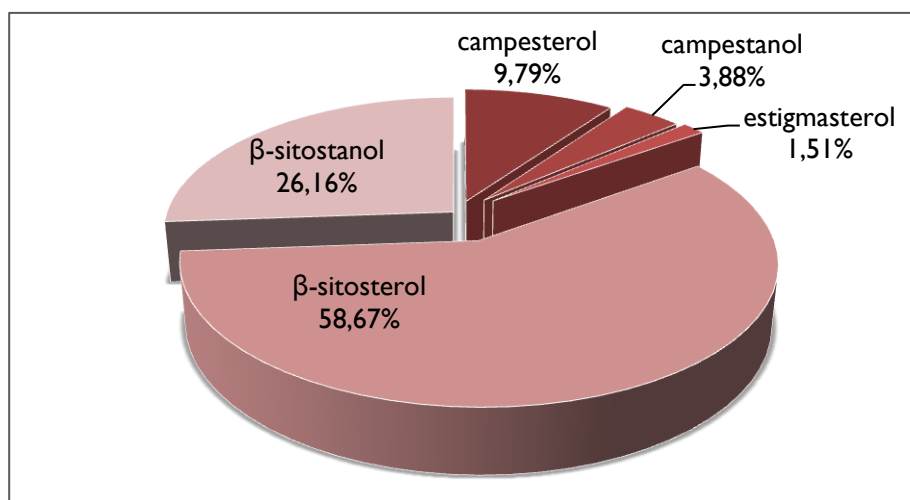


Figura 15 - Percentagem do teor total dos fitosteróis quantificados na amostra.

Ao analisar a figura 15 com as Decisões n.º 2004/333, 2004/334, 2004/335 e 2004/336/CE, de 31 de Março, que descrevem os perfis de esteróis e estanois vegetais em alimentos funcionais que podem ser colocados no mercado, referindo que uma mistura que contenha 99% de fitosteróis de origem natural deverá ser constituída por β -sitosterol (<80%), β -sitostanol (< 15%), campesterol (< 40%), campestanol (< 5%), estigmasterol (<30%), brassicasterol (< 3%) e outros (< 3%), verifica-se então, que a composição percentual determinada dos fitosteróis no suplemento alimentar não está de acordo o especificado pela União Europeia para os alimentos funcionais. Dado que, a percentagem do teor de β -sitostanol se apresenta superior ao referido (> 15%), tal facto, pode não ser considerado relevante, uma vez que no mercado existem produtos que só possuem estanois vegetais (como é exemplo o Benecol®), e também não há nenhuma evidência científica que seja prejudicial para a saúde se essa dose for superior.

Como se referenciou na identificação, os compostos analisados provém de uma mistura da CoroWise®, sendo um ingrediente que foi autorizado em variados produtos alimentares, segundo a EFSA (2008). No entanto, não foi possível verificar se a quantidade determinada estava de acordo com a quantidade autorizada para essa mistura, por não estar acessível a notificação destes produtos.

No início deste projecto planeou-se o estudo de dois lotes diferentes do suplemento alimentar, com a finalidade de controlar a sua qualidade. Porém, devido ao reduzido tempo de investigação não foi possível comparar quantitativamente os dois lotes, no entanto, numa análise qualitativa não se verificaram diferenças na abundância dos compostos de interesse.

De modo a verificar se a quantidade rotulada coincide com a quantidade determinada, pesaram-se 10 comprimidos Centrum Cardio®, em triplicado, averiguando que um comprimido pesa, em média, 1389,2 mg. Através dos resultados obtidos com o procedimento analítico desenvolvido, confirma-se que dois comprimidos de Centrum Cardio® apresentam, em média, 1415,79 mg de esteróis vegetais. Assim, a quantidade determinada foi relativamente superior à quantidade rotulada, uma vez que indicam que dois comprimidos apresentam 1000 mg de esteróis vegetais.

Com a metodologia analítica desenvolvida, verifica-se então, que dois comprimidos de Centrum Cardio® correspondem ao consumo diário recomendado de cerca de 1,4 g de esteróis vegetais, uma quantidade segura, uma vez que não ultrapassa o máximo de 3 gramas.

Além da quantidade determinada ser considerada segura, o produto analisado pode também ser eficaz na redução dos níveis de colesterol – LDL com a dose diária

recomendada, conforme indica na embalagem. No entanto, para verificar a eficácia do suplemento teria que se efectuar um ensaio clínico com indivíduos hipercolesterolemicos.

Conforme comentado na revisão da literatura, a eficácia na redução do colesterol com fitosteróis em forma de comprimido ou em cápsulas não está ainda bem documentada. Segundo Ottestad *et al.* (2013), não mostram uma diferença significativa na redução do colesterol – LDL, enquanto outros apresentam essa eficácia (Acuff *et al.*,2007; Maki *et al.*, 2013). Por esse motivo, são necessários mais estudos para compreender se a dose diária recomendada dos fitosteróis é afectada quando ingerida noutras matrizes, de modo a obter uma redução significativa de colesterol – LDL.

CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

Com esta dissertação pretendeu-se contribuir para a determinação qualitativa e quantitativa de fitosteróis em matrizes sob a forma de comprimido. Como tal, este trabalho centrou-se no desenvolvimento, optimização e validação de uma metodologia para analisar os fitosteróis de um suplemento alimentar sob a forma de comprimido, podendo a sua utilização ser vantajosa ao nível de outras matrizes em controlos de qualidade e em estudos de desenvolvimento para a elaboração de outros suplementos e alimentos funcionais hipocolesterolemiantes.

Relativamente à metodologia de GC-MS desenvolvida para a quantificação de fitosteróis no suplemento alimentar sob a forma de comprimido e aos resultados obtidos podem destacar-se as seguintes conclusões:

- A metodologia mostrou ser simples, rápida, sensível e selectiva para determinar os compostos estudados na forma livre ou esterificada.
- Por se tratar de um método simples e rápido, detém todos os requisitos para ser um instrumento importante para o estudo de rotina de fitosteróis na matriz analisada.
- A utilização do detector de massa permitiu obter elevados níveis de sensibilidade e selectividade, possibilitando a detecção da vitamina E, na forma de α -tocoferol.
- Apesar dos resultados na validação se considerarem adequados, uma vez que apresentou elevados níveis de precisão e de recuperação, bons limites de detecção e quantificação, este método mostrou ser susceptível aos efeitos de matriz, um aspecto que merece ser aprofundado.
- Na generalidade, todas as amostras analisadas do suplemento alimentar apresentaram um perfil qualitativo de fitosteróis idêntico, constituído por três esteróis vegetais (β -sitosterol, campesterol e estigmasterol) e dois estanois vegetais (β -sitostanol e campestanol).
- A adição do padrão interno (colestano) após a saponificação, mostrou ser a melhor opção para a quantificação de fitosteróis no suplemento alimentar investigado, sendo que o estudo sobre os efeitos de matriz também merece ser alargado ao PI, nomeadamente quanto à sua adição antes do processo de saponificação.

- O suplemento alimentar analisado mostrou ser um produto seguro relativamente aos fitosteróis adicionados, uma vez que não ultrapassa os 3 gramas de consumo diário.

A evidência científica tem demonstrado que o controlo da qualidade dos produtos alimentares comercializados para a prevenção de doenças cardiovasculares tem sido fundamental, na possível adulteração destes produtos pondo em risco a saúde do consumidor. É por isso fundamental, assegurar a segurança alimentar dos produtos enriquecidos com fitosteróis inovando com procedimentos adaptados às exigências do mercado e preferências do consumidor.

Como conclusão final, o presente estudo atingiu o objectivo principal a que se propôs (identificação e quantificação de fitosteróis num suplemento alimentar sob a forma de comprimido), contribuindo, assim, directamente para a melhoria do controlo de qualidade deste tipo de produtos, bem como para a segurança alimentar dos consumidores, numa área importante de fronteira entre alimentação e saúde.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza dos seus sonhos”

Eleanor Roosevelt

BIBLIOGRAFIA

- ABIDI S.L. (2001) – Review: Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography A*, 935, pp. 173 – 201.
- ACUFF R.V., CAI D. J., DONG Z-P., DORIS B. (2007) – The lipid lowering effect of plant sterol ester capsules in hypercholesterolemic subjects. *Lipids in Health and Disease*, 6 – 11.
- AHMIDA H.S.M., BERTUCCI P.; FRANZÒ L., MASSOUD R., CORTESE C., LALA, A., FREDERICI G. (2006) – Simultaneous determination of plasmatic phytosterols and cholesterol precursors using gas chromatography –mass spectrometry (GC–MS) with selective ion monitoring (SIM). *Journal of Chromatography B*, 842, pp. 43 – 47.
- AWAD A., FINK C. (2000) – Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *American Society for Nutritional Sciences* [Em linha] 130 (2000), 2127 – 2130 [Acedido a 07 de Julho de 2012]. Disponível na Internet: <http://jn.nutrition.org/>
- AWAISHEH S.S., KHALIFEH M.S., AL-RUWAILI M.A., KHALIL O.M., AL-AMERI O.H., AL-GROOM R. (2013) – Effect of supplementation of probiotics and phytosterols alone or in combination on serum and hepatic lipid profiles and thyroid hormones of hypercholesterolemic rats. *Journal of Dairy Science*, 96, 9 – 15.
- BERGER A., JONES P. JH., ABUMWEIS S.S. (2004) – Plant sterols: factors affecting their efficacy and safety as functional food ingredients. *Lipids in Health and Disease*, 3:5. [Acedido a 4 de Novembro de 2012]. Disponível na Internet: <http://lipidworld.com/content/3/1/5>
- BERNARDES P. (2010) – Dieta mediterrânica: Esteróis e Estanóis. Porto: Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Artigo de Revisão Bibliográfica.
- BREDA M.C. (2010) – Fitosesteróis e os benefícios na prevenção de doenças: Uma Revisão. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia. Trabalho de Conclusão de Curso.

- BRESSOLLE F., BROMET-PETIT M., AUDRAN M. (1996) – Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods: Applications to pharmacokinetics. *Journal of Chromatography B*, 686, pp. 3–10.
- CHERIF A. A. (2012) – Phytochemicals Components as Bioactive Foods, Bioactive Compounds in Phytomedicine, Prof. Iraj Rasooli (Ed.) *InTech*. ISBN: 978-953-307-805-2.
- CHRISTIE W.W. (2012) – Sterols and their conjugates from plants and lower organisms: structure, occurrence, biochemistry and analysis. *The Lipid Library*. [Em linha]. Sterols 3. [Acedido a 28 de Junho de 2012]. Disponível na Internet: <http://lipidlibrary.aocs.org/>
- CLIFTON P.M., NOAKES M., SULLIVAN D., ERICHSEN N., ROSS D., ANNISON G., FASSOULAKI A., CEHUN M., NESTEL P. (2004) – Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters differ in milk, yoghurt, bread and cereal. *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 503 – 509.
- COSTA M.C., MARQUES A., RESENDES I., SANTOS I., LIMA A., ROSÁRIO N., COSTA L., MONTEIRO C., PEREIRA P., NOGUEIRA T. (2012) – Estudos de suplementos alimentares à base de plantas no mercado português. *ASAE: Riscos e Alimentos*, 3, 11 – 18.
- CUNHA S.C.S (2007) – Autenticidade e Segurança de Azeites e Azeitonas: Desenvolvimento de metodologias cromatográficas para o doseamento de triacilgliceróis, fitosteróis, tocoferóis/tocotrienóis e pesticidas. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor.
- DECISÃO DA COMISSÃO (CE) 2004/333/CE de 31 de Março de 2004 relativa à autorização de colocação no mercado de produtos gordos para barrar de cor amarela, guarnições para salada, produtos de tipo lácteo, produtos de tipo lácteo fermentado, bebidas à base de soja e produtos tipo queijo com adição de fitoesteróis/fitoestanois, enquanto novos alimentos ou novos ingredientes alimentares, nos termos do Regulamento (CE) n° 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L105, 40 – 42.
- DECISÃO DA COMISSÃO (CE) 2004/334/CE de 31 de Março de 2004 relativa à autorização de colocação no mercado de produtos gordos para barrar de cor amarela, produtos de tipo lácteo, produtos de tipo iogurte e molhos à base de especiarias com adição de fitoesteróis/fitoestanois, enquanto novos alimentos ou novos ingredientes alimentares,

nos termos do Regulamento (CE) n° 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L105, 43 – 45.

DECISÃO DA COMISSÃO (CE) 2004/335/CE de 31 de Março de 2004 relativa à autorização de colocação no mercado de produtos de lácteo e de produtos de tipo iogurte com adição de ésteres de fitoesterol, enquanto novos alimentos ou novos ingredientes alimentares, nos termos do Regulamento (CE) n° 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L105, 46 – 48.

DECISÃO DA COMISSÃO (CE) 2004/336/CE de 31 de Março de 2004 relativa à autorização de colocação no mercado de produtos gordos para barrar de cor amarela, bebidas de frutas à base de leite, produtos de tipo iogurte e produtos de tipo queijo de pasta mole com adição de fitoesteróis/fitoestanois, enquanto novos alimentos ou novos ingredientes alimentares, nos termos do Regulamento (CE) n° 258/97 do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L105, 49 – 51.

DIÁRIO DA REPÚBLICA – I SÉRIE – N°167, 22 de Agosto de 2007, Decreto-lei n° 296/2007 de 22 de Agosto.

DIÁRIO DA REPÚBLICA – I SÉRIE A – N°157, 28 de Junho de 2003, Decreto-lei n° 136/2003 de 28 de Junho.

DUARTE C. (2011) – *Extracção e Encapsulamento de Compostos Bioactivos do Bagaço de Azeitona*. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, Instituto Superior de Agronomia. Dissertação de candidatura ao grau de Mestre.

DURÃO C.R. (2008) – *Suplementos Alimentares – Legislar é Suficiente?* Revista *Alimentação Humana*, Vol. 14, 2, 77 – 87.

EFSA (2008) – *Consumption of Food and Beverages with Added Plant Sterols in the European Union*. *The EFSA Journal*, 133, 1 – 21.

EFSA (2012) – *Opinion of the Scientific Panel on Food additives and Nutrient Sources added to Food (ANS) on a request from the Commission on the safety of stigmasterol-rich plant sterols as food additive*. *EFSA Journal*, 10, 1 – 39.

ELLEGARD L.H, ANDERSSON S.W., NORMÉN A.L., ANDERSSON H.A (2007) – *Dietary Plant Sterols and Cholesterol Metabolism*. *Nutrition Reviews*, Vol. 65, N°1, pp. 39 – 45.

- EUSSEN S., KLUNDEL O., GARSSEN J., VERHAGEN H., KRANEN V. H., LOVEREN V.H., ROMPELBERG C. (2010) – Support of drug therapy using functional foods and dietary supplements: focus on statin therapy. *The British Journal of Nutrition*, 103, 9, 1260 – 1277.
- FAO (2008) – Phytosterols, phytostanols and their esters: chemical and technical assessment. [Em linha]. [Acedido a 28 de Maio de 2012]. Disponível na Internet: <http://www.fao.org/>
- FERNANDES P. (2009) – Comportamento do consumidor face aos suplementos alimentares. *Sequali: Segurança e Qualidade Alimentar*, 9, 12 – 13.
- FERNANDES P., CABRAL J.M.S. (2007) – Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresource Technology*, 98, 2335 – 2350.
- GOLDBERG A.C., OSTLUND R.E., BATEMAN J.H., SCHIMMOELLER L., MCPHERSON T. B., SPILBURG C.A. (2006) – Effect of Plant Stanol Tablets on Low-Density Lipoprotein Cholesterol Lowering in Patients on Statin Drugs. *The American Journal of Cardiology*, 97, 376 – 379.
- GONZÁLEZ-LARENA M., GARCÍA-LLATAS G., VIDAL M.C., SÁNCHEZ-SILES L.M., BARBERÁ R., LAGARDA M.J. (2011) – Stability of Plant Sterols in Ingredients Used in Functional Foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 3624 – 3631.
- HE W.S., WANG M.G., PAN X.X., LI J.J., JIA C.S., ZHANG X.M., FENG B. (2013) – Role of plant stanol derivatives in the modulation of cholesterol metabolism and liver gene expression in mice. *Food Chemistry*, Volume 140, 9 – 16.
- ICH (2005) – International Conference on Harmonization: Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Q2 (R1): Text on Validation of Analytical Procedures.
- IFST (2011) – Phytosterol Esters (Plant Sterol and Stanol Esters). Institute of Food Science and Technology, Information Statement.
- JOHNSSON L. (2004) – Phytosterol oxidation products: Formation, Analysis and Occurrence. Uppsala: University of Agricultural Sciences. Dissertation to obtaining a Doctoral Degree.

- JONES P.J.H., ABUMWEIS S. S. (2009) – Phytosterols as functional food ingredients: linkages to cardiovascular disease and cancer. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 12, 147–151. ISSN 1363 – 1950.
- KATAN M.B, GRUNDY S.M., JONES P., LAW M., MIETTINEN T., PAOLETTI R. (2003) – Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. *Mayo Clin Proc.*Vol.78, pp. 965 – 978.
- KHALF A.M.M. (2007) – Analysis of Plant Sterols and Oxysterols in the Serum of Patients with Sitosterolemia under different Drug Treatments. University Bonn: Faculty of Mathematics and Natural Sciences. Dissertation to obtaining a Doctoral Degree.
- KOSCHUTNIG K. (2009) – Safety assessment of phytosterol oxidation products. Wien: University Wien. Dissertation to obtaining a Doctoral Degree.
- LAGARDA M.J, GARCIA-LLATAS G., FARRÉ R. (2006) – Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1486 – 1496.
- LI T.S.C., BEVERIDGE T.H.J., DROVER J.C.G. (2007) – Phytosterol content of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil: Extraction and identification. *Food Chemistry*, 101, 1633 – 1639.
- LUTJOHANN D. (2004) – Sterol autoxidation: from phytosterols to oxyphytosterols. *British Journal of Nutrition* 91, 3 – 4.
- Maki K.C., Lawless A.L., Reeves, M.S., Kelley K.M., Dicklin M.R., Jenks B.H., Shneyvas E., Brooks J.R. (2013) – Lipid effects of a dietary supplement softgel capsule containing plant sterols/stanols in primary hypercholesterolemia. *Nutrition*, 29, 1, 96 – 100.
- NCEP (2002). National Health, Heart, Lung, and Blood Institute, Health. Third Report of the *National Cholesterol Education Program* (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterols in Adults (Adult Treatment Panel III) Final Report. NIH Publication. 02 –5215.
- NIH (2006) – Multivitamin/Mineral Supplements and Chronic Disease Prevention. *National Institute of Health, State-of-the-Science Conference Statement*, Vol.23, no.2.

- OTTESTAD I., OSE L., WENNERSBERG M.H., GRANLUND L., KIRKHUS B., RETTERSTØL K. (2013) – Phytosterol capsules and serum cholesterol in hypercholesterolemia: A randomized controlled trial. *Atherosclerosis*, 228, 421 – 425.
- PATEL S.B. (2008) – Plant Sterols and Stanols: Their Role in Health and Disease. *Journal of Clinical Lipidology*, 2 (2), S11 – S19.
- PFIZER (2012) – Centrum Cardio®: Apresentação. [Em linha]. [Acedido a 09 de Julho de 2013]. Disponível na Internet: <http://www.centrumvitaminas.com.pt/>
- PHILLIPS K. M., RUGGIO D. M., ASHRAF-KHORASSANI M. (2005) – Phytosterol composition of nuts and seeds commonly consumed in the United States. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 53, 9436 – 9445.
- PIIRONEN V., TOIVO J.; LAMPI A.M. (2000): Natural sources of dietary plant sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 13, 619 – 624.
- RAMOS F., SARAIVA D. (2009) – Milk consumption and health. Nova Science, New York. ISBN: 978- 1-60741-459-9
- REGULAMENTO DA COMISSÃO EUROPEIA (CE) – N° 608/2004 de 31 de Março de 2004 relativo à rotulagem de alimentos e ingredientes alimentares aos quais foram adicionados fitoesteróis, ésteres de fitoesterol, fitoestanóis e/ou ésteres de fitoestanol. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 97/44 – L 97/45.
- REGULAMENTO DO PARLAMENTO E DO CONSELHO EUROPEU (CE) – N° 1924/2006 de 20 de Dezembro de 2006 relativo às alegações nutricionais e de saúde sobre os alimentos. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 404, 9 – 25.
- REGULAMENTO DO PARLAMENTO E DO CONSELHO EUROPEU (CE) – N° 258/97 de 27 de Janeiro de 1997 relativo a novos alimentos e ingredientes alimentares. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 043, 1 – 7.
- RIBANI M., BOTTOLI C.B.G., COLLINS C.H., JARDIM I.C.S.F., MELO L.F.C. (2004) – Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, Vol. 27, 5, 771 – 780.
- RODRIGUES H. (2009) – Prescrição dietética dos fitoesteróis nas dislipidemias. *Revista Factores de Risco: Publicação da Sociedade Portuguesa de Cardiologia*. ISSN 1646-4834. N° 12 (2009), p. 58 – 64.

- SANTOS R., LIMAS E., SOUSA M., CASTILHO M.C., RAMOS F., NORONHA DA SILVEIRA M.I. (2007) – Optimization of analytical procedures for GC–MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Food Chemistry*, 102, 113 – 117.
- SARAIVA D., CASTILHO M.C., MARTINS M.R., NORONHA DA SILVEIRA M.I., RAMOS F. (2011a) – Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. *Food Anal. Methods*, 4, 28 – 34.
- SARAIVA D., SEMEDO R., CASTILHO M.C., SILVA J.M., RAMOS F. (2011b) – Selection of the derivatization reagent: The case of human blood cholesterol, its precursors and phytosterols GC–MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 879, 3806 – 3811.
- SILVA K.I., BAGGIO S.R., ALMEIDA C.A.S. (2008) – Comparação de dois métodos analíticos para a determinação de fitosteróis e quantificação simultânea de fitosteróis e colesterol em óleos vegetais. [s.l.] [Acedido a 04 de Junho de 2012]. Disponível na Internet: <http://www.iac.br/>
- SORRENTINO A.P. (2008) – OTC Product: Centrum Cardio. *Journal of the American Pharmacists Association*, 48, e103 – e104.
- SOSIŃSKA E., PRZYBYLSKI R., HAZENDONK P., ZHAO Y-Y., CURTIS J.M. (2013) – Characterization of non-polar dimers formed during thermo-oxidative degradation of β -sitosterol. *Food Chemistry*, 139 (1– 4), 464 – 474.
- SOUPAS L. (2006) – Oxidative stability of phytosterols in food models and foods. Finland: University of Helsinki, Faculty of Agriculture and Forestry. Academic dissertation.
- SRINIVASAN D., PARKIN K. L., FENNEMA O.R. (2008) – Fennema’s Food Chemistry. In MCCLEMENTS D. J., DECKER E. A. – Lipids. 4ª edição. Londres: Taylor & Francis Group. ISBN 9780824723453.
- TASAN M., BILGIN B., GEÇGEL U., DEMIRCI A.S. (2006) – Phytosterols as Functional Food Ingredients. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 3 (2), 153 – 159.
- TRAUTWEIN E., DEMONTY I. (2007) – Phytosterols: natural compounds with established and emerging health benefits. *Oléagineux, Corps Gras, Lipides*. [Em linha]. 14, N° 5, 259 – 66 [Acedido a 10 de Junho de 2012]. Disponível na Internet: <http://www.jle.com/>

WHO (2007) – Prevention of cardiovascular disease: Guidelines for assessment and management of cardiovascular risk. World Health Organization: Geneva, Switzerland.

WINKLER-MOSER J.K. (2011) – Gas chromatographic analysis of plant sterols. *AOCS Lipid Library*. [Acedido a 28 de Outubro de 2012]. Disponível na Internet: <http://lipidlibrary.aocs.org/>

YAN F., YANG H., WU D., HUO M., LI J. (2011) – Recovery of Phytosterols from Waste Residue of Soybean Oil Deodorizer Distillate, Soybean - Applications and Technology, Prof. Tzi-Bun Ng (Ed.) *In Tech*. ISBN: 978-953-307-207-4.

ANEXOS

ANEXO I

FOLHETO INFORMATIVO DO PRODUTO

Centrum® Cardio

CENTRUM CARDIO é um multivitáminico completo que combina num só produto os benefícios das Vitaminas e Minerais, característicos da gama Centrum, com os dois Esteróis vegetais.

CENTRUM CARDIO, apresenta-se numa embalagem de 60 comprimidos revestidos.

Dois comprimidos apresentam a seguinte composição:

Vitaminas	Quantidade	Minerais	Quantidade
Vitamina A (RE) (25% como Beta-Caroteno)	800 µg	Cálcio	162 mg
Vitamina D	5 µg	Fósforo	125 mg
Vitamina E (α-TE)	15 mg	Magnésio	100 mg
Vitamina K	30 µg	Ferro	5 mg
Vitamina C	120 mg	Iodo	100 µg
Vitamina B ₁	1,4 mg	Cobre	1000 µg
Vitamina B ₂	1,75 mg	Manganésio	2 mg
Vitamina B ₆	4 mg	Crómio	40 µg
Vitamina B ₁₂	3 µg	Selénio	30 µg
Ácido Fólico	400 µg	Zinco	5 mg
Biolina	62,5 µg	Esteróis Vegetais	1000 mg
Niacina (NE)	20 mg		
Ácido Pantoténico	7,5 mg		

A fórmula de CENTRUM CARDIO proporciona benefícios, tais como:

LIBERTAÇÃO DE ENERGIA



Contém Vitaminas do Complexo B e Ferro que, tomados diariamente, desempenham um papel importante na conversão metabólica das proteínas, lípidos e hidratos de carbono em energia. O Ferro contribui também para o transporte normal do oxigénio no organismo.

IMUNIDADE



A capacidade de defesa do organismo é influenciada por factores como o stress e o cansaço, pelo que uma nutrição adequada assume um papel determinante na manutenção das defesas naturais. CENTRUM CARDIO contém Vitamina C e Selénio que apresentam propriedades antioxidantes, importantes para o normal funcionamento do sistema imunitário.

NÍVEIS SAUDÁVEIS DE COLESTEROL



Os esteróis vegetais são substâncias estruturalmente semelhantes ao colesterol, presentes de forma natural e em pequenas quantidades em alguns vegetais. Os esteróis vegetais contribuem para a manutenção de níveis normais de colesterol no sangue.

FUNCIONAMENTO DO CORAÇÃO



Com Vitamina B₁ que contribui para o funcionamento normal do coração, dado que tem um papel importante no metabolismo energético de todas as células do organismo, incluindo as células do músculo cardíaco.

O magnésio é um elemento chave na transmissão nervosa e na contração muscular, incluindo a contração do músculo cardíaco.

O COLESTEROL

- **O que é:** O colesterol é uma substância essencial para o organismo, pois é um constituinte importante das membranas celulares e participa na síntese de algumas hormonas e da vitamina D.
- **Qual a sua origem:** O colesterol pode ser produzido pelo organismo no fígado, e também ser obtido através dos alimentos. Chega às células através do sangue.
- **Como é transportado no sangue:** Para poder ser transportado pelo sangue até às células, o colesterol tem de se encontrar na forma solúvel e para isso necessita de umas proteínas específicas, denominadas LDL e HDL. O colesterol associado às proteínas LDL é vulgarmente conhecido como "mau colesterol" enquanto que, o que se encontra ligado às proteínas HDL é habitualmente denominado como "bom colesterol".

OS ESTERÓIS VEGETAIS

- **O que são:** Os esteróis vegetais são substâncias estruturalmente semelhantes ao colesterol, presentes de forma natural em vegetais.
- **Onde se encontram:** Alguns alimentos contêm esteróis vegetais em pequenas quantidades. Os alimentos mais ricos são os óleos vegetais, cereais e nozes. Para além de uma dieta variada e equilibrada com um adequado aporte de frutas e legumes, pode ser útil o consumo de produtos contendo esteróis vegetais adicionados. CENTRUM CARDIO contém CoroWise™ uma mistura de esteróis vegetais de origem natural.

AS VITAMINAS ENGORDAM?

Não. As vitaminas não provocam aumento de peso, dado que não têm valor calórico.

QUANDO E COMO SE DEVE TOMAR CENTRUM CARDIO?

Como parte de uma alimentação adequada e de um estilo de vida saudável, a toma de Centrum Cardio ajuda-o a manter níveis saudáveis de colesterol.

Tome 2 comprimidos uma vez ao dia, durante ou após as refeições com o auxílio de um copo de água. Os comprimidos devem ser engolidos inteiros ou divididos em duas metades, para facilitar a toma.

Não exceda o consumo diário recomendado. O consumo diário de esteróis vegetais adicionados não deve ultrapassar os 3 g. O efeito benéfico obtém-se com uma dose diária mínima de 0,8 g de esteróis vegetais. Dois comprimidos de CENTRUM CARDIO, correspondem ao consumo diário recomendado e contêm 1 g de esteróis vegetais. Não há limitações quanto à duração da toma.

Se está a tomar outros suplementos leia a composição, uma vez que estes podem conter os mesmos ingredientes. Este produto pode não ser adequado do ponto de vista nutritivo para mulheres grávidas ou lactantes e crianças de idade inferior a cinco anos. Se está grávida ou a amamentar, Centrum tem uma fórmula específica para si – Centrum Materna. Deve por isso, aconselhar-se com o seu médico ou farmacêutico antes de começar a tomar.

Em caso de sobredosagem acidental, contacte imediatamente o seu médico ou o Centro de Informação Anti-Venenosa. Este produto contém Ferro, que pode ser nocivo para as crianças se tomado, acidentalmente, em doses elevadas.

COMO SE DEVE GUARDAR CENTRUM CARDIO?

As vitaminas são sensíveis à luz, ao oxigénio atmosférico e ao calor. Após cada utilização, certifique-se de que o frasco se encontra bem fechado e guarde-o dentro da embalagem, num local seco e com temperatura inferior a 25°C.

Não guarde CENTRUM CARDIO no frigorífico, na casa de banho ou próximo de fontes de calor.

Consumir de preferência antes do fim de: ver data inscrita na embalagem e no frasco.

Mantenha CENTRUM CARDIO num local seguro e fora da vista e do alcance das crianças.

Não esqueça:

- Centrum Cardio, destina-se exclusivamente a adultos que desejam reduzir os níveis de colesterol no sangue
- Tome 2 comprimido uma vez ao dia
- Não há limitações quanto à duração da toma
- Se necessário, pode dividir o comprimido em duas metades, para facilitar a toma
- Se estar a tomar medicação para reduzir o nível de colesterol só deve consumir o produto sob vigilância médica
- Em caso de dúvidas aconselhe-se na sua farmácia ou consulte o seu médico

ANEXO II

IDENTIFICAÇÃO DOS FITOSTERÓIS

1. α -TOCOFEROL

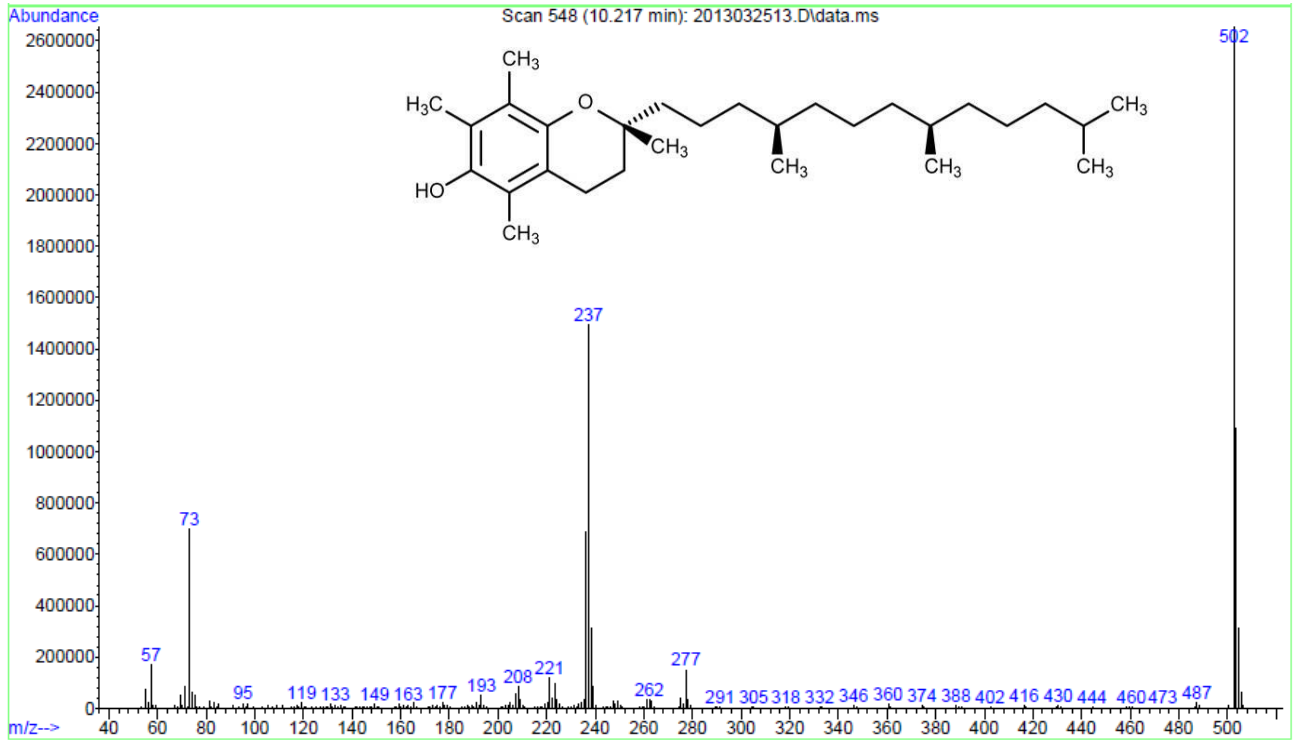


Figura 1 – Espectro de massa da fragmentação do padrão α -tocoferol, com RT = 10.217 min e a estrutura química correspondente.

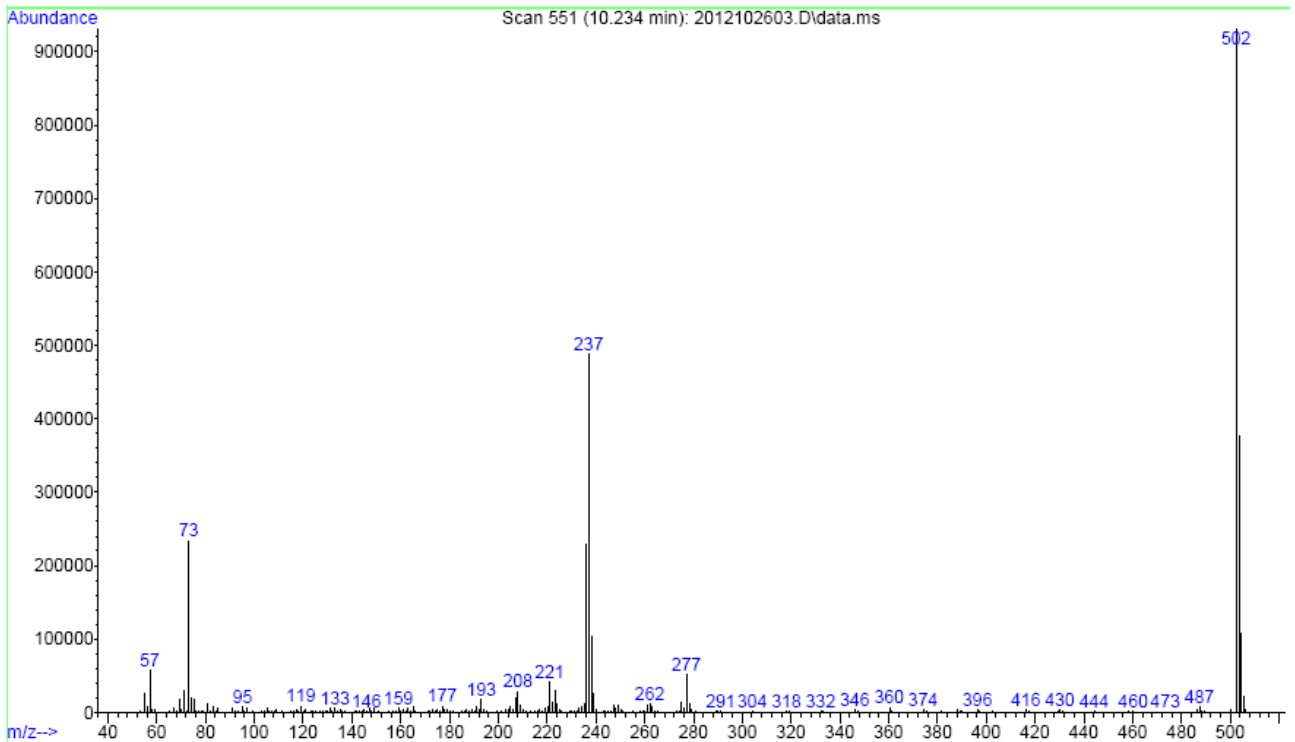


Figura 2 – Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como α -tocoferol (pico I) na amostra em análise, com RT = 10.234 min.

2. CAMPESTEROL

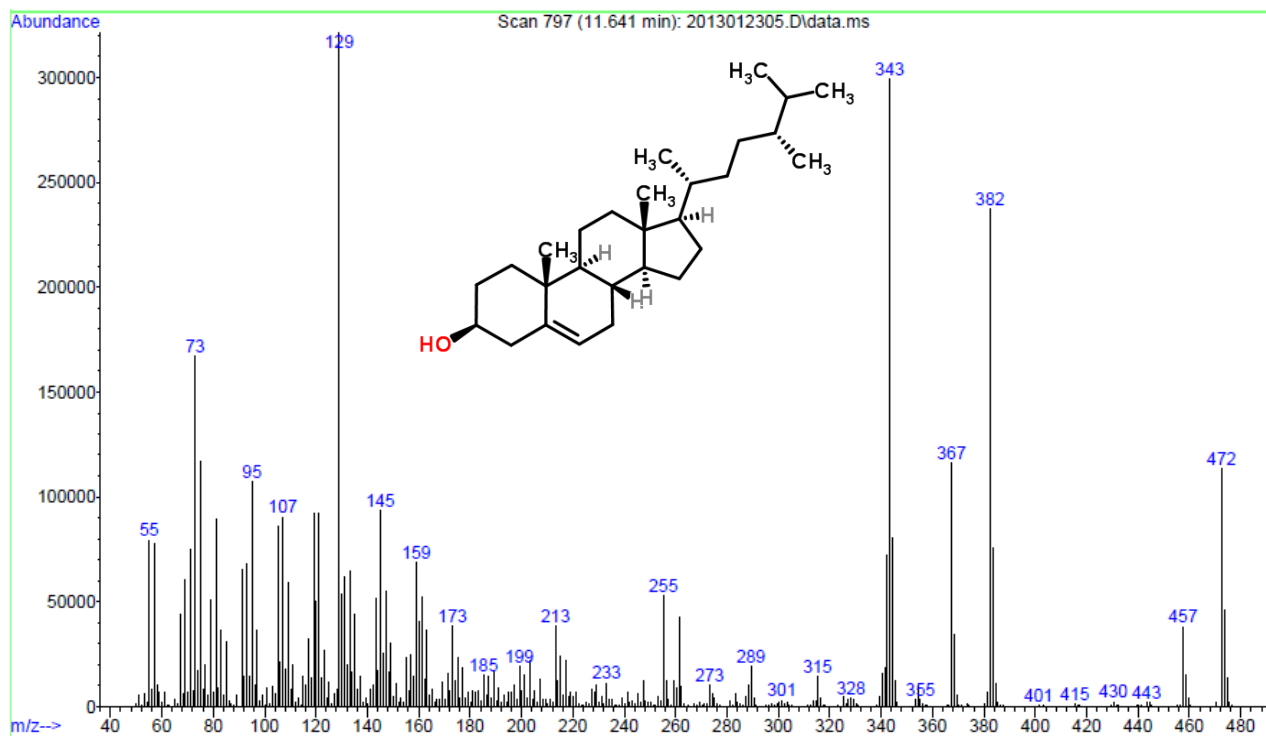


Figura 3 - Espectro de massa da fragmentação do padrão campesterol, com RT = 11.641 min e a estrutura química correspondente.

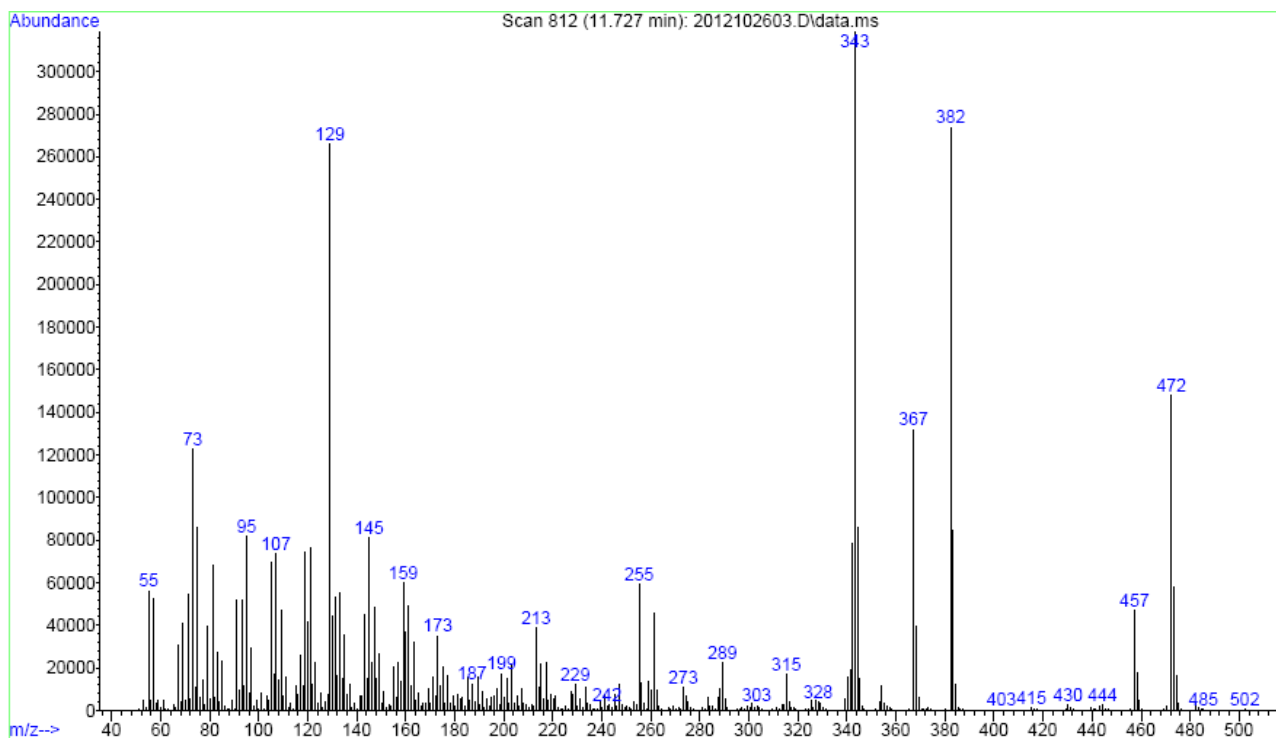


Figura 4 - Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como campesterol (pico 2) na amostra em análise, com RT = 11.727 min.

3. CAMPESTANOL

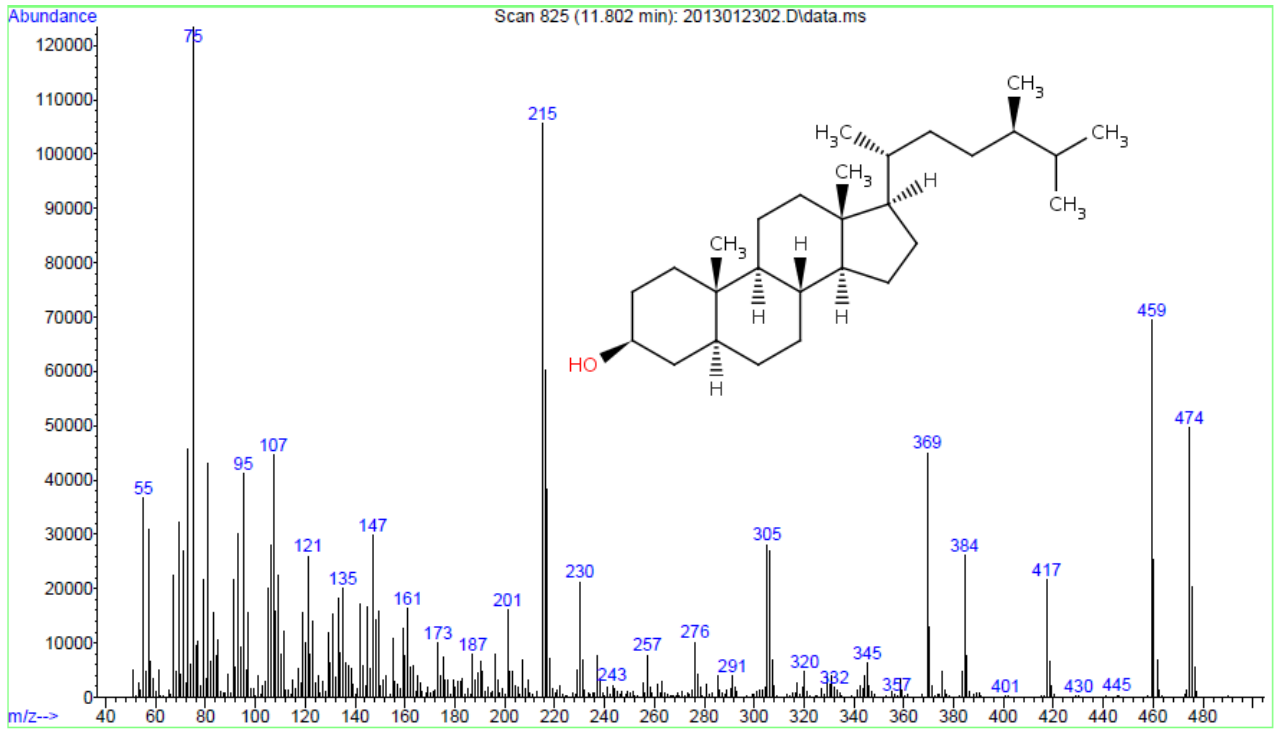


Figura 5 - Espectro de massa da fragmentação do padrão campestanol, com RT = 11.802 min e a estrutura química correspondente.

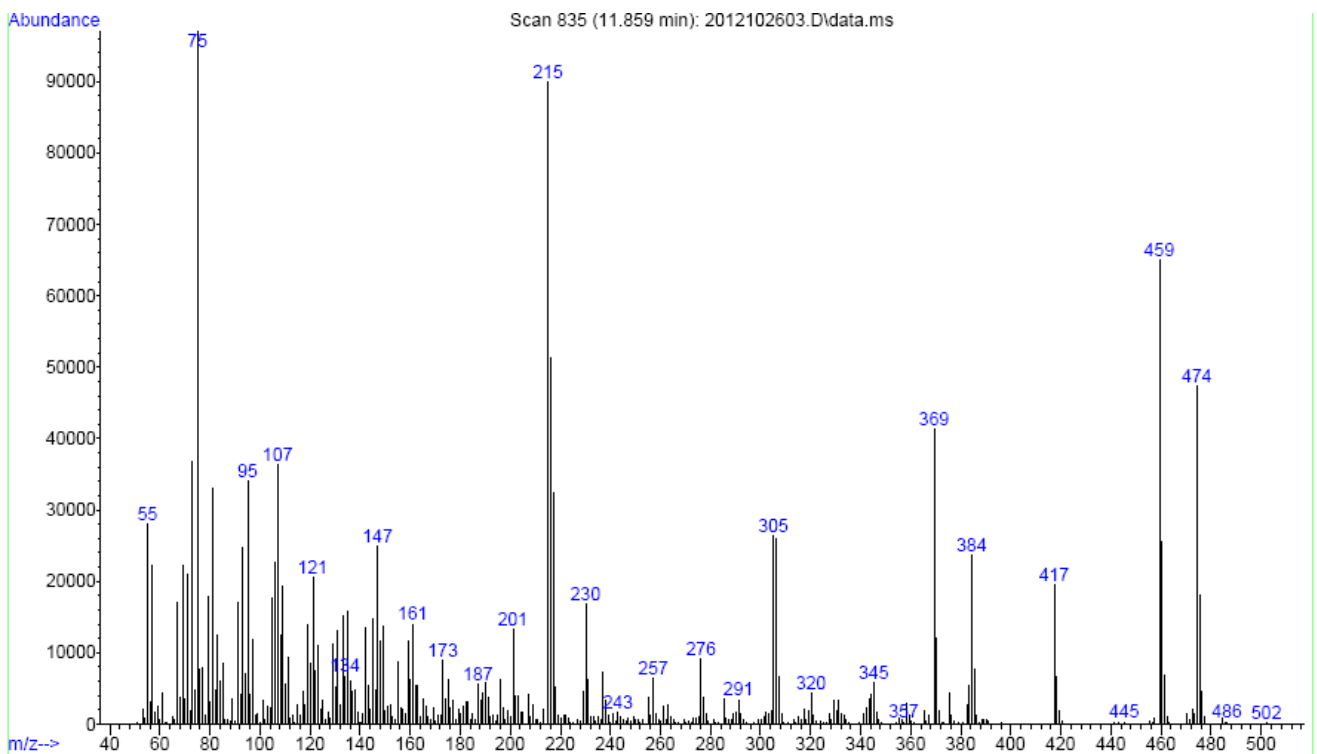


Figura 6 - Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como campestanol (pico 3) na amostra em análise, com RT = 11.859 min.

4. ESTIGMASTEROL

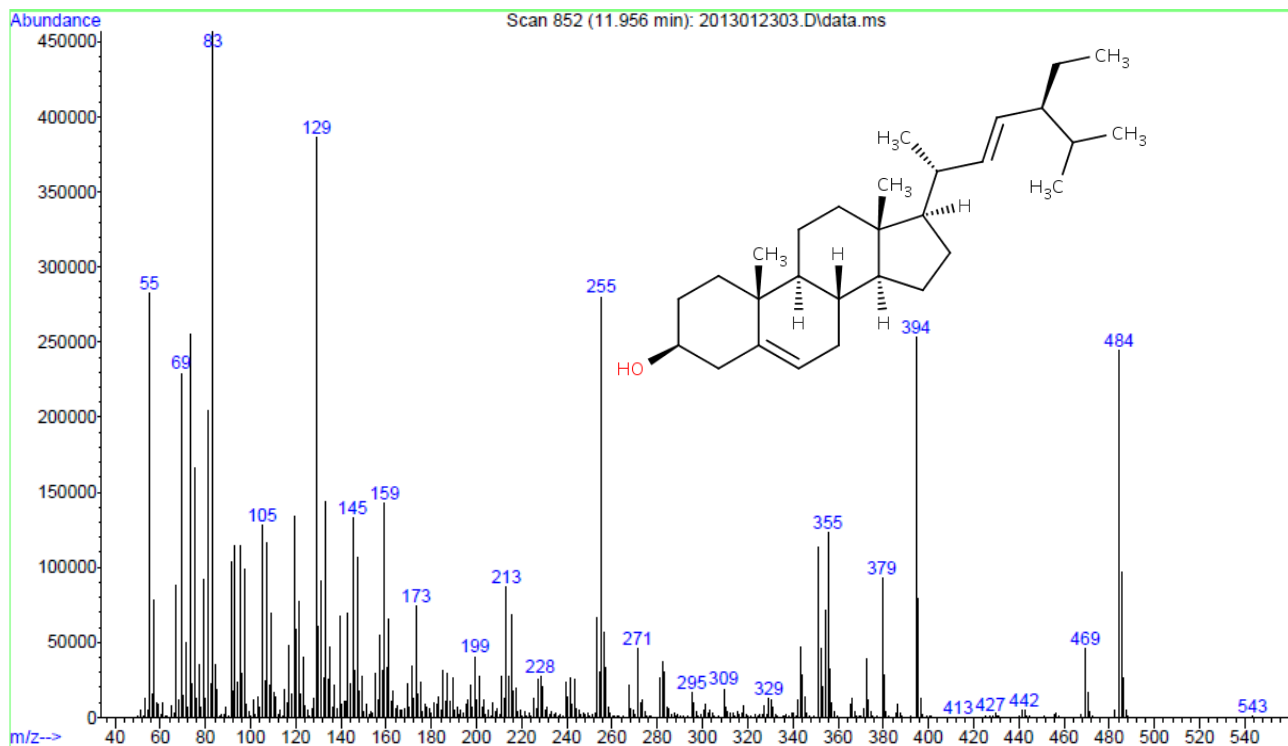


Figura 7 - Espectro de massa da fragmentação do padrão estigmasterol, com RT = 11.956 min e a estrutura química correspondente.

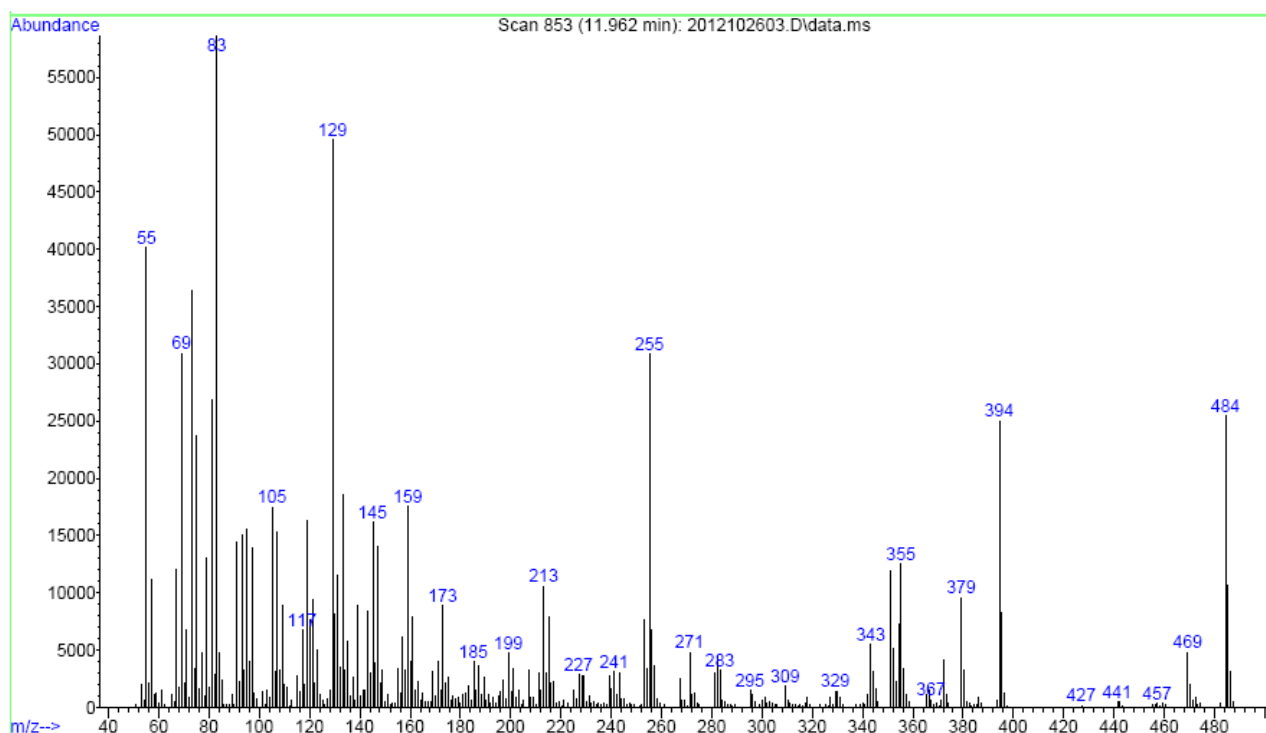


Figura 8 - Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como estigmasterol (pico 4) na amostra em análise, com RT = 11.962 min.

5. β -SITOSTEROL

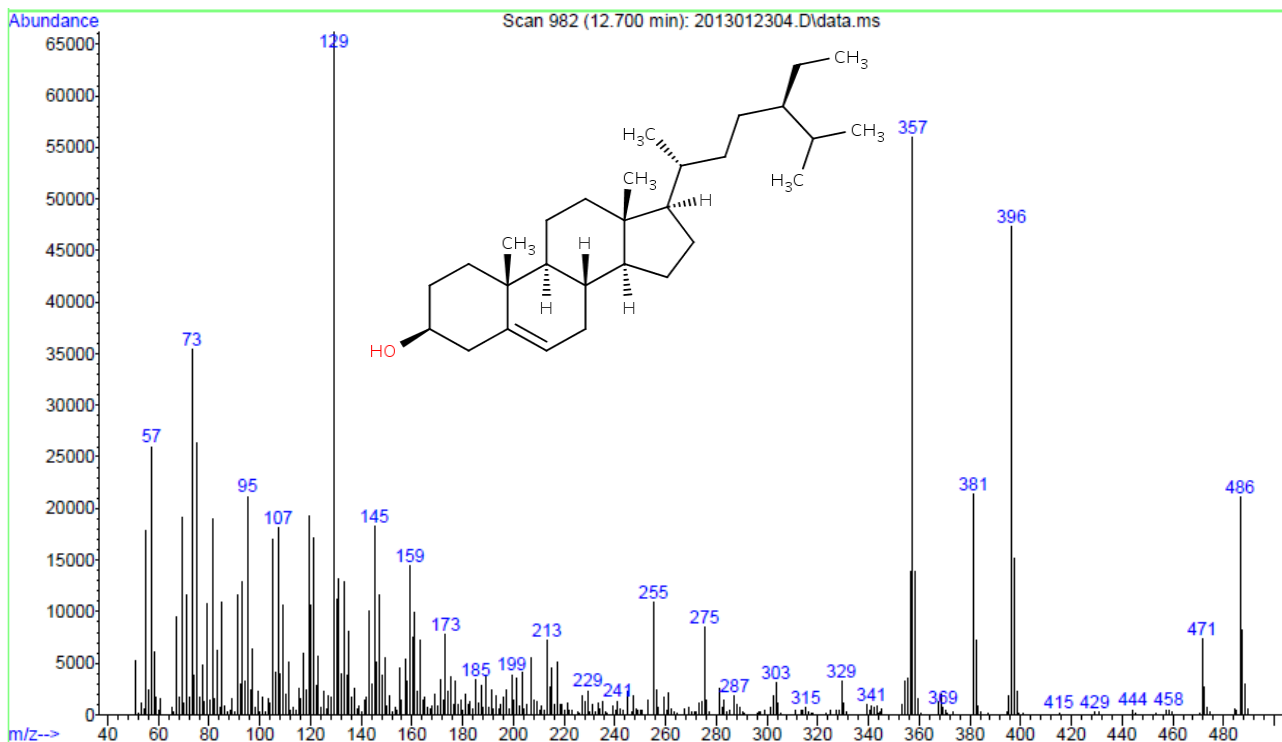


Figura 9 - Espectro de massa da fragmentação do padrão β -sitosterol, com RT = 12.700 min e a estrutura química correspondente.

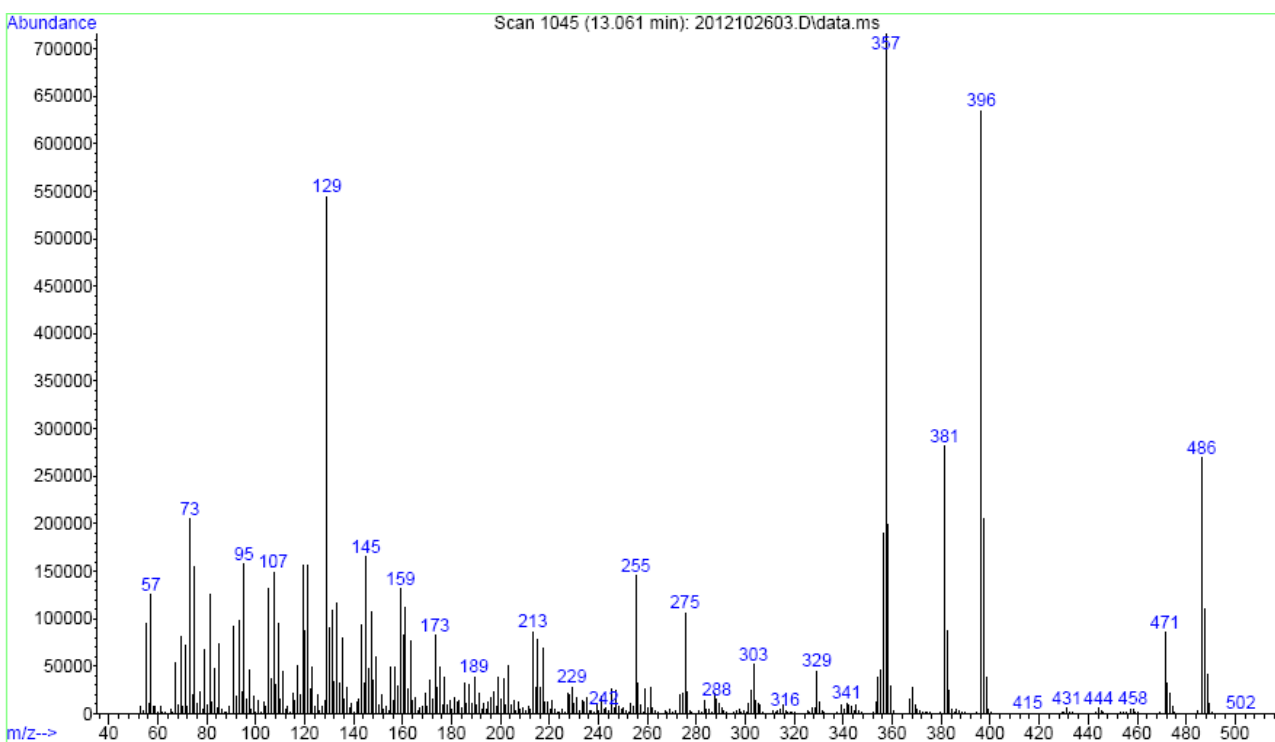


Figura 10 - Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como β -sitosterol (pico 5) na amostra em estudo, com RT = 13.061 min.

6. β -SITOSTANOL

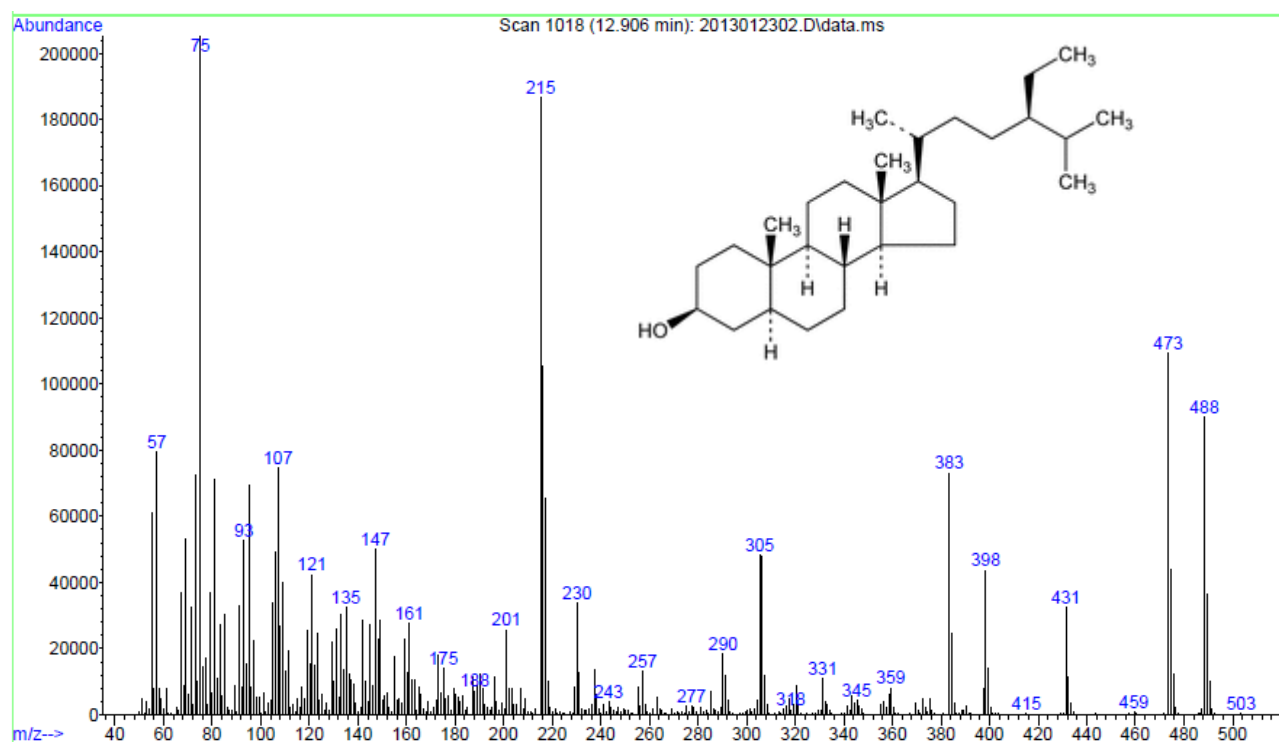


Figura 11 - Espectro de massa da fragmentação do padrão β -sitostanol, com RT = 12.906 min e a estrutura química correspondente.

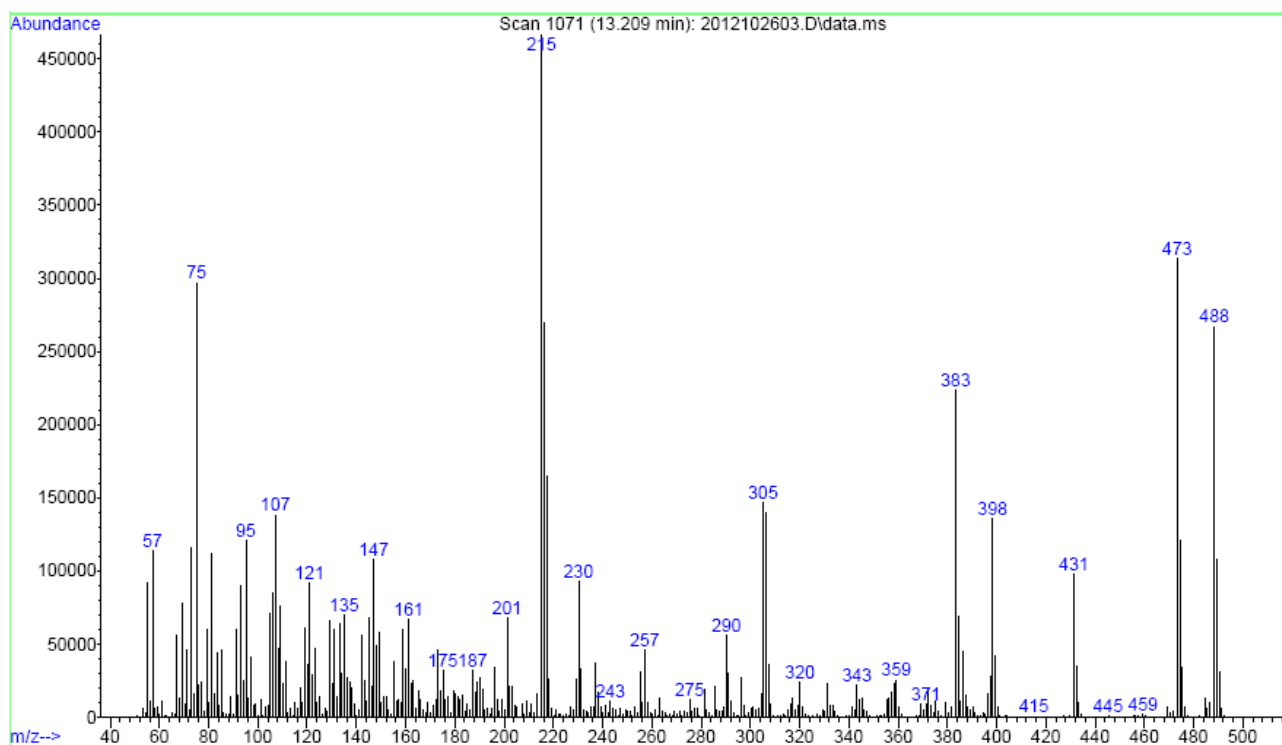


Figura 12 - Espectro de massa da fragmentação da molécula identificada como β -sitostanol (pico 6) na amostra em estudo, com RT = 13.209 min.