



**Equinácea no tratamento de afecções respiratórias:  
Uso e aconselhamento na farmácia de oficina e  
avaliação de potencial antioxidante e composição  
química de diferentes preparações**

**Cristiana Maria Sales Pires**

**Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de  
Salamanca para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos  
Naturais**

**Orientado por**

**Ana Maria Pinto Carvalho**

**Isabel Cristina F. R. Ferreira**

**Maria José Montero**

**Bragança**

**Outubro 2014**







## **AGRADECIMENTOS**

Como este caminho não foi percorrido sozinha, gostaria de agradecer o grande apoio de todas as pessoas que tornaram possível a concretização e conclusão da minha Dissertação de Mestrado.

Antes de mais um agradecimento às minhas orientadoras Professora Doutora Ana Maria Carvalho e Professora Doutora Isabel Ferreira, por tudo o que me ensinaram, por toda a sua compreensão, pela imensa ajuda na escrita da tese e por todo o apoio, sem o qual, este trabalho não teria sido possível e à Professora Doutora Maria José Montero pela sua contribuição na pesquisa bibliográfica.

À Doutora Lillian Barros e ao resto dos elementos do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada-IPB, pela preciosa ajuda, paciência, simpatia, carinho e disponibilidade na concretização do trabalho experimental.

Ao Doutor André Novo pela receptividade e apoio na análise estatística.

Aos colegas farmacêuticos pelo tempo dispensado na resposta ao inquérito.

Resta-me um último agradecimento à minha família por todo o carinho e incentivo nesta fase da minha vida.

A todos, muito obrigada!



## RESUMO

Os estados gripais, comuns na população, são um dos principais responsáveis da recorrência a cuidados primários de saúde. A solução passa pela prevenção onde a equinácea aparece como uma boa opção, pela sua ação imunomoduladora. Esta apresenta um longo historial de utilização em infeções virais e bacterianas, desde os povos nativos da América do Norte, até à atualidade.

Com a realização deste trabalho conseguiu-se identificar e inventariar quanto à disponibilidade, níveis de procura e de aconselhamento, em farmácias de oficina, fitoterápicos que integrem na sua composição *Echinacea purpurea* (EP) tais como Echinacin Xarope ®, Echinaforce ® comprimidos, Echinaforce ® solução oral, Sinegripin ® carteiras, Vitacê ®, Arkocápsulas Equinácea ® e S.O.S Imune Kids ®, sendo estes dois últimos os mais vendidos e aconselhados.

Na análise laboratorial de diferentes preparações à base de EP avaliou-se a atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos, infusões e decocções obtidos a partir de material vegetal, produzido em modo biológico (material colhido fresco e, posteriormente liofilizado, e material previamente seco na empresa, usado para comercialização a granel), bem como de fitoterápicos com EP (comprimido e xarope).

A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios *in vitro* por determinação de efeitos captadores de radicais livres, poder redutor, inibição da descoloração do beta-caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais. Procedeu-se ainda à determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos, e tocoferóis das diferentes amostras.

A ausência de citotoxicidade foi comprovada utilizando uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2).

No geral foi o extrato hidroetanólico da planta liofilizada que revelou melhores resultados em todos os ensaios, talvez relacionados com a sua maior concentração de fenóis e flavonoides. Relativamente à atividade captadora de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), esta foi estatisticamente similar neste extrato, na infusão e decocção da planta liofilizada, extrato hidroetanólico da planta seca e no comprimido e no caso do poder redutor este foi estatisticamente equiparável ao comprimido. O xarope apresentou os piores resultados e a infusão demonstrou ter a menor capacidade de inibição da descoloração do beta-caroteno.

Em relação aos açúcares livres foram detetados frutose, glucose, arabinose nas plantas seca e liofilizada; no entanto, a planta liofilizada apresentou também sacarose. O xarope apresentou como açúcar maioritário o xilitol, como indicado no rótulo da embalagem comercial, seguido de frutose e glucose. O comprimido apresentou sorbitol e quantidades vestigiais de sacarose. Identificaram-se seis ácidos orgânicos diferentes (ácidos oxálico, quínico, málico, xiquímico, cítrico e sucínico), sendo o ácido cítrico o mais abundante na planta liofilizada e no comprimido. O ácido sucínico predominou no extrato da planta seca e xarope. A amostra de planta liofilizada apresentou quatro isoformas de tocoferóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a isoforma maioritária. Por sua vez, na amostra de planta seca foram identificadas todas as isoformas exceto o  $\delta$ -tocoferol. O comprimido continha apenas  $\alpha$ -tocoferol e o xarope não apresentou nenhuma das isoformas.

## ABSTRAT

Colds are common in general population and lead the use of primary health care resources. The solution lies in prevention where equinacea appears as a good option for its immunomodulatory action. This has a long history of use in viral infections and bacterial infections, since the Native Americans, up to the present time.

With the completion of this work, we were able to identify and inventory (regarding availability, demand and advice levels in community pharmacies), some products used in phytotherapy whose composition integrates Echinacea purpurea (EP), such as Echinacin Xarope®, Echinaforce® pills, Echinaforce® oral solution, Sinegripin® sachets, Vitacê®, Arkocápsulas Equinácea® and S.O.S Imune Kids®. The latter two were the most sold and advised.

In laboratory analysis of different preparations with EP we evaluated the antioxidant activity of hydroethanolic extracts, infusions and decoctions obtained from plant material, produced in organic farming (fresh gathered material that was subsequently freeze-dried, and industrially dried plant parts for bulk sale), as well as of phytotherapeutic preparations with EP (pills and syrup). The antioxidant activity was evaluated *in vitro* assays for the determination of scavenging effects of free radicals, reducing power, inhibition of discoloration of beta-carotene and inhibition of lipid peroxidation in brain homogenates. We also proceed to the chromatographic determination of sugars, organic acids, and tocopherols of different samples.

The absence of cytotoxicity was confirmed using a primary culture of cells of pork liver (PLP2). In general was the hydroethanolic extract of freeze-dried plant that showed better results in all tests, perhaps related to their greater concentration of phenols and flavonoids. With regard to the scavenging activity of radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazilo (DPPH), this was statistically similar in this extract, the infusion and decoction of the freeze-dried plant, hydroethanolic extract of dry plant and in pills; in case of reducing power this was statistically comparable to pills. The syrup showed the worst results and the infusion has been shown to have a lower capacity for inhibiting beta-carotene bleaching.

With respect to free sugars were detected fructose, glucoses, arabinose in dry and freeze-dried plants; however, the freeze-dried plant also presented sucrose. The syrup presented xylitol as majority sugar, as indicated on the label of the syrup commercial packaging, followed by fructose and glucose. Pills presented sorbitol and trace quantities

of sucrose. We identified six organic acids (oxalic, quinic, malic, shikimic, citric and succinic acids), being the citric acid the more abundant in freeze-dried plant and compressed. The succinic acid predominated in the dry plant extract and syrup. The sample of freeze-dried plant presented four isoforms of tocopherols, being alpha-tocopherol isoform the majority. In turn, in the sample of the dry plant were all identified isoforms except the  $\delta$ -tocopherol. Pills had only  $\alpha$ -tocopherol in its constitution and syrup had none isoform.

## ÍNDICE GERAL

Agradecimentos .....	i
Resumo .....	iii
Abstract.....	v
Índice de figuras .....	ix
Índice de tabelas .....	xi
Lista de Abreviaturas.....	xiii
1. Introdução.....	1
1.1. História da <i>Echinacea purpurea</i> .....	1
1.2. Caracterização botânica.....	3
1.3. Fitoterapia.....	4
1.3.1. Ação imunomoduladora .....	4
1.3.2. Ação antiviral .....	4
1.3.3. Ação antibacteriana e antioxidante.....	5
1.3.4. Ação anti-inflamatória e anticancerígena .....	7
1.4. Fitoquímica.....	8
1.4.1. Compostos terpenóides.....	8
1.4.2. Compostos fenólicos .....	8
1.4.3. Polissacáridos .....	9
1.4.4. Compostos azotados .....	9
1.5. Automedicação e aconselhamento farmacêutico.....	11
1.5.1. Utilização de produtos à base de plantas .....	11
1.5.2. Aconselhamento farmacêutico .....	13
1.5.3. Aconselhamento farmacêutico no uso de produtos à base de <i>Echinacea purpurea</i> .....	14
2. Objetivos.....	17
3. Material e Métodos.....	19
3.1. Inquirição relativa ao uso de formulações à base de equinácea .....	19
3.2. Amostras de equinácea analisadas laboratorialmente .....	19
3.3. Padrões e Reagentes .....	21
3.4. Avaliação da atividade antioxidante.....	22

3.4.1. Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH.....	22
3.4.2. Poder redutor .....	22
3.4.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno .....	23
3.4.4. Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	23
3.4.5. Determinação de fenóis totais .....	24
3.4.6. Determinação de flavonoides totais.....	24
3.5. Avaliação da toxicidade das amostras de equinácea .....	25
3.6. Avaliação da composição química das amostras de equinácea .....	26
3.6.1. Composição em açúcares.....	26
3.6.2. Composição em ácidos orgânicos .....	26
3.6.3. Composição em tocoferóis .....	27
3.7. Análise estatística .....	28
4. Resultados e discussão .....	29
4.1. Inquirição relativa ao uso de preparações à base de equinácea .....	29
4.1.1. Caracterização da amostra .....	29
4.1.2. Disponibilidade, aconselhamento e consumo de plantas à base de EP .....	30
4.2. Avaliação das propriedades antioxidantes das amostras de equinácea .....	34
4.3. Confirmação da não toxicidade das amostras de equinácea.....	38
4.4. Avaliação da composição química das amostras de equinácea .....	39
5. Conclusões.....	41
6. Referências .....	43
7. ANEXO I.....	51

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Meyer's Blood Purifier .....	2
<b>Figura 2.</b> a): Ouriço-do-mar b): Inflorescência central da <i>Echinacea purpurea</i> .....	3
<b>Figura 3.</b> <i>Echinacea purpurea</i> (L.) Moench.....	3
<b>Figura 4.</b> Estruturas moleculares do ácido cafeico (a) e do ácido chicórico (b) e da nicotiflorina (campferol-3-O-rutósido) (c) e equinacósido (d).....	9
<b>Figura 5.</b> Estrutura das alquilamidas.. ..	10
<b>Figura 6.</b> Estrutura química dos alcaloides tussilagina e isotussilagina.....	10
<b>Figura 7.</b> Preparações com <i>Echinacea purpurea</i> .....	14
<b>Figura 8.</b> Caracterização da amostra pela função executada na empresa.....	29
<b>Figura 9.</b> Distribuição geográfica, por NUTS II, da amostra .....	30
<b>Figura 10.</b> Produtos à base de equinácea disponíveis em stock .....	31
<b>Figura 11.</b> Tipo de venda.....	32
<b>Figura 12.</b> Percentagem de vendas após aconselhamento farmacêutico .....	32
<b>Figura 13.</b> Número de vendas mensais de produtos, à base de EP.....	33



## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atividade antioxidante e composição em compostos bioativos das diferentes preparações obtidas a partir das partes aéreas de equinácea e dos suplementos à base da mesma planta (valores médios $\pm$ SD, n = 3).....	35
<b>Tabela 2.</b> Composição química de amostras obtidas a partir das partes aéreas de equinácea e dos suplementos à base da mesma planta (valores médios $\pm$ SD, n = 3)....	39



## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ASAE	Autoridade de Segurança Alimentar e Económica
Abs	Absorvância
ACR	Atividade captadora de radicais
BHT	Butilhidroxitolueno
COX-2	Ciclooxigenase-2
DAD/ESI-MS	Detetores de díodos/Espetrometria de Massa
DMEM	Meio de cultura para células animais (Dulbecco's Modified Eagle Médium)
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
EA	<i>Echinacea augustifolia</i>
EAG	Equivalente de ácido gálico
EC	Equivalente de catequina
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50 % de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor e inibição da peroxidação lipídica
EP	<i>Echinacea purpurea</i>
EMEA	Agência Europeia do Medicamento
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GI <sub>50</sub>	Concentração de amostra correspondente a 50% de inibição máxima de proliferação celular
HBSS	Solução salina de Hank's
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-10	Interleuquina-10
INFARMED	Instituto Nacional da Farmácia e do Medicamento
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
IPB	Instituto Politécnico de Bragança
MBP	Medicamentos à base de plantas

MDA	Malonaldeído
MRSA	Methicillin-resistant and sensitive strains
MS	Espetrometria de massa
MTBP	Medicamentos tradicionais à base de plantas
nd	Não detetado
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NUTS II	7 Sub-regiões divididas a partir da Nomenclatura das Unidades Territoriais para fins estatísticos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Produtos à base de plantas
PDA	Detetor de fotodíodos
PES	Polissacáridos estimuladores do sistema imunitário
PGE2	Prostaglandina E2
PI	Padrão interno
PLP2	<i>Porcine liver primary cell culture</i>
PS1	Polissacarídeo 1 (4-O-metilglucuroarabioxilano)
PS2	Polissacarídeo 2 (Ramnoarabinogalactano ácido)
RI	Índice de refração
ROS	Espécies reativas de oxigénio
Rpm	Rotações por minuto
SA	Suplementos alimentares
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome de imunodeficiência adquirida
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
V	Vestígios
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol

## 1. INTRODUÇÃO

Os estados gripais, comuns na população, são um dos principais responsáveis da recorrência a cuidados primários de saúde, caracterizando-se por um conjunto de sintomas como rinorreia, tosse, dores de garganta e por vezes com algumas complicações, como dor de cabeça, mal-estar generalizado e febre, sendo normalmente auto limitativos (Jawad et al., 2012; Hudson, 2012).

O desenvolvimento de métodos preventivos deste tipo de patologias está limitado pela multiplicidade de vírus e a relação vírus/hospedeiro. (Jawad et al., 2012; Hudson, 2012).

A vacinação demonstrou ser um método eficiente no caso da gripe sazonal, no entanto a sua eficácia está sempre dependente do estado imunológico do recetor, que normalmente se encontra enfraquecido em pessoas com mais de 65 anos e/ou com doenças crónicas limitativas (Jawad et al., 2012; Hudson, 2012).

Outra forma de prevenção deste tipo de infeções é a modulação do sistema imunológico, recorrendo por exemplo ao uso de espécies vegetais e à fitoterapia, onde a equinácea apresenta um papel terapêutico fundamental. (Jawad et al., 2012; Hudson, 2012).

Sendo a autora deste trabalho farmacêutica, e o facto de acompanhar diariamente este tipo de infeções, tornou-se essencial estudar e perceber de que forma poderia aconselhar este tipo de fitoterápicos, neste género de situações.

### 1.1 História da *Echinacea purpurea*

A equinácea apresenta um longo historial de utilidades e aplicações ao longo dos séculos, sendo considerada, já pelos povos nativos americanos, como “anti-infeciosa”, pois era indicada para patologias de origem viral e bacteriana, desde septicemias medianas, furunculoses, abcessos, carbunculoses e úlceras (Barret, 2003; Hudson, 2010).

Entre 1830 e 1930 surgiu o movimento eclético (um ramo da medicina norte-americana que recorria ao uso de plantas), que foi o grande responsável por trazer a equinácea para a “ribalta” da fitomedicina (Hobbs, 1994; Flannery, 1999).

Um médico alemão, Dr. H.C.F. Meyer, após ter adquirido conhecimentos dos índios americanos, em 1870, desenvolveu uma fórmula baseada em *Echinacea augustifolia* DC. (EA), a qual denominou “Meyer’s Blood Purifier” (**Figura 1**), que

purificava o sangue, especificamente no caso de mordeduras de serpente, reumatismo e dor de cabeça (Hobbs, 1994; Flannery, 1999).

A fim de comprovar o efeito da sua fórmula, aceitou enviar uma amostra da planta e do produto para John King e John Uri Lloyd, dois ecléticos norte americanos de destaque, os quais, após breves análises, desvalorizaram as afirmações de Meyer. Depois de diversas controvérsias, Lloyd impressionou-se com as suas descobertas e a EA tornou-se a planta de eleição dos ecléticos para tratar infecções locais e sistêmicas, incluindo mordeduras de cobras e aranhas (Hobbs, 1994; Flannery, 1999).

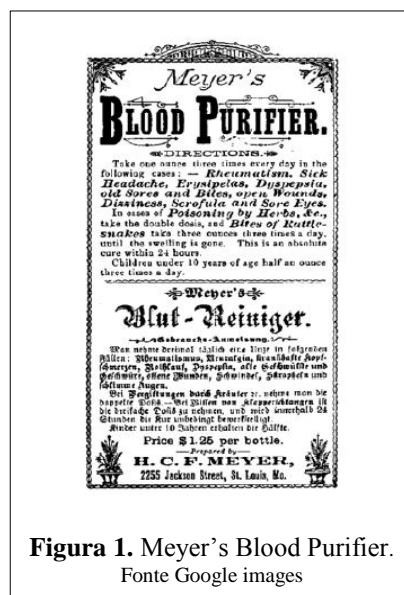


Figura 1. Meyer's Blood Purifier.  
Fonte Google images

Em 1930, o Dr. Gerhard Madaus, fundador dos laboratórios Madaus, trouxe da América as primeiras sementes de *Echinacea purpurea* (L.) Moench (EP), pensando tratar-se de EA, introduzindo assim o uso desta nova espécie na Alemanha. Cultivou-a nas margens do rio Elba, em Dresden e felizmente descobriu que esta exibia características superiores à EA, para além de estar perfeitamente adaptada ao clima alemão (Marquez, 2000).

Dos seus laboratórios surgiu o primeiro produto à base de EP, com o nome de Echinacin Líquido ®, indicado para aumentar as defesas naturais do organismo, especialmente em casos de doenças infecciosas (Hobbs, 1994; Flannery, 1999; Marquez, 2000).\*

A Comissão Alemã aprovou o uso das partes aéreas de EP no tratamento de gripes e infecções dos tratos respiratório e urinário, havendo anualmente neste país, desde 1999, mais de 2 milhões de prescrições médicas para a utilização de equinácea (Barret, 1999).

Em 2008, estimava-se que as vendas de EP, nos EUA, eram de \$15,1 milhões, o que representava um aumento de 4,5 % em relação ao ano anterior; segundo a *National Health Interview Survey*, esta planta tinha sido o terceiro produto natural mais utilizado pelos adultos americanos, o que na prática se traduzia em 4,8 milhões de pessoas (American Botanical Council, 2009; Barnes et al., 2008). No ano seguinte, 2009, e de acordo com o reportado no "Nutrition Business Journal", as vendas de produtos à base desta planta seriam de \$120 milhões anuais (Nutrition Business Journal, 2009).

## 1.2 Caracterização botânica

O género *Echinacea* pertence à família das Asteraceae ou Compositae, um grupo de plantas pratenses, silvestres e perenes, nativas da América do Norte, cujas principais características são as raízes apumadas, cilíndricas, estriadas longitudinalmente, que desprendem odor aromático e sabor adocicado provocando um discreto adormecimento na língua (Gruenwald et al., 2000).

As plantas apresentam uma altura aproximada de 100 cm, folhas ásperas, lanceoladas, de cor verde intenso e escapo com inflorescência solitária em capítulo, com sensivelmente 20 flores liguladas na periferia e tubulosas ao centro, formado um disco cónico, que aparenta um “ouriço-do-mar”, em grego “echinos”, do qual deriva o nome botânico *Echinacea* (**Figura 2**) (Gruenwald et al., 2000).

Florescem desde meados do verão até ao princípio do outono. As flores são de



diversas cores, variando de rosa a um púrpura denso, no caso específico de *Echinacea purpurea* (L.) Moench. (EP) e os frutos são aquénios tetragonais. Do aspeto e cor da inflorescência deste género deriva o termo popular, pelo qual é conhecido, “Coneflower”, sendo a EP referenciada

como somente “Purple Coneflower” ou “Eastern Purple Coneflower” (Gruenwald et al., 2000; Barnes et al., 2005).

Das onze espécies de *Echinacea*, apenas três são utilizadas com fins terapêuticos, nomeadamente, *Echinacea angustifolia* (DC.) Hell, *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt. e *Echinacea purpurea* (L.) Moench.. (**Figura 3**) (Barnes et al., 2005).



### **1.3. Fitoterapia**

Nos últimos anos, o interesse na avaliação das propriedades farmacológicas dos produtos fitoterápicos tem vindo a aumentar, incluindo os produtos à base de equinácea.

Os efeitos imunomoduladores desta planta, comprovados, tanto *in vitro*, como *in vivo*, têm sido o principal foco de investigação, embora também apresente outras ações documentadas, resultantes deste efeito principal, tais como antifúngica, antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e até anticancerígena (Hudson, 2012).

#### **1.3.1. Ação imunomoduladora**

A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou supressão de elementos do sistema imunológico (Fischer et al., 2008).

A EP tem sido utilizada pelo seu potencial imunomodulador, considerando-se uma alternativa para a prevenção e tratamento de algumas patologias. Apesar de terem sido isolados diversos compostos ativos na planta, a sua vasta complexidade química não permite identificar um só composto que seja responsável por esta ação, acreditando-se que todos atuem em sinergia (Hudson, 2012).

Uma das formas de imunomodulação pela EP ocorre através da estimulação de células “natural killer” (NK), componentes do sistema complemento e macrófagos, que desempenham um papel fundamental na defesa do organismo, através da fagocitose, geração de radicais livres, mediação de processos inflamatórios e secreção de uma variedade de substâncias bioquimicamente diferentes, como enzimas, citocinas anti e pro-inflamatórias, tais como o fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), e outras substâncias como o óxido nítrico (NO) e espécies reativas do oxigénio (ROS), o que aumenta a capacidade para diminuir tumores e eliminar bactérias e fungos, em condições *in vitro* (Rininger et al., 2000; Kapai et al., 2011; Zagumennikov et al., 2012; Fonseca et al., 2014).

#### **1.3.2. Ação antiviral**

O vírus *Influenza*, principalmente do tipo A, é responsável por mortalidade e morbidade significativas a nível mundial (Hudson, 2012).

A emergência de estirpes, resistentes à farmacoterapia existente nomeadamente, inibidores da neuraminidase, como o oseltamivir (Tamiflu®) e zanamivir (Relenza®)

constitui um grande desafio para a saúde pública. Atualmente, o controlo deste vírus é conseguido com prevenção, nomeadamente por vacinação, o que requer uma nova vacina anualmente, pois todos os anos surge uma nova estirpe do vírus (Hudson, 2012). Melhorar a compreensão da resposta imunitária ao vírus e identificação dos agentes que alteram esta resposta, constituem os objetivos da investigação científica nesta área (Tsai et al., 2012a).

Demonstrou-se que as partes aéreas e as raízes, tal como os extratos aquosos e etanólicos de EP, apresentam atividade antiviral potente contra o vírus *Influenza A*, *Herpes simplex* e coronavírus, tendo manifestado ser menos eficaz contra vírus intracelulares, pois a própria célula funciona como barreira. No entanto, atua sobre as partículas virais que se distribuem pelos fluidos extracelulares, alterando o percurso da infeção por modulação das citoquinas e não por atuação diretamente sobre o vírus (Hudson, 2012; Tsai et al., 2012a; Tsai et al., 2012b).

Numa investigação de Pleschka et al. (2009), a EP em concentrações recomendadas para administração oral, apresenta um grande potencial na interrupção da propagação das diferentes estirpes do vírus influenza, incluindo as estirpes sazonais, as estirpes aviárias altamente patogénicas, bem como, a estirpe pandémica de origem suína (Pleschka et al., 2009).

As culturas celulares infetadas com *Influenza A*, na presença de EP, resultaram em culturas não resistentes ao composto, contrariamente às culturas com antiviral Tamiflu®, que originam culturas resistentes. Pensa-se que o uso continuado da EP irá originar muito menos resistências que o Tamiflu®, ou de qualquer outro medicamento antiviral (Pleschka et al., 2009; Hudson, 2012).

### **1.3.3. Ação antioxidante e antibacteriana**

Os radicais livres produzidos pelo metabolismo das células aeróbias, maioritariamente sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS), são neutralizados por defesas antioxidantes enzimáticas ou não enzimáticas. Este equilíbrio entre ROS e antioxidantes resulta num bom funcionamento do organismo, mas quando este é alterado origina-se o chamado stresse oxidativo, responsável por alterações no ADN, lípidos, proteínas conduzindo ao seu mau funcionamento (Ferreira et al., 2009; Dogan et al., 2014).

Um estudo de Stanisavljevic et al. (2009) sugere que o extrato aquoso a 70 % e a tintura de EP são potenciais fontes de compostos naturais bioativos, como fenóis e flavonoides, com funções antibacterianas e antioxidantes, sendo que, a própria tintura apresentava um maior poder antioxidante relativamente às tinturas de Ginkgo e Ginseng; um desses fenóis, o ácido chicórico apresenta uma grande capacidade captadora de radicais livres, embora se considere que todos os compostos atuem em sinergia (Masteikova et al., 2007; Thygesen et al., 2007; Stanisavljevic et al., 2009; Nematalla et al., 2011). A capacidade captadora de elétrons do ácido chicórico está relacionada com a presença de anéis fenólicos e radicais hidroxilo, em posição *orto*, o que aumenta a eficácia antioxidante, devido a uma possível ressonância entre as estruturas levando a um aumento da estabilidade do radical antioxidante formado após captar os radicais livres (Thygesen et al., 2007; Tsai et al., 2012b).

Segundo uma investigação realizada em 2014, sobre um modelo de colite induzido por ácido acético, a EP tinha efeito protetor da mucosa, devido ao poder antioxidante do ácido cafeico e equinacósido. Neste estudo é reportado o sucesso da administração de EP em crianças com mucosite, como efeito adverso da quimioterapia (Dogan et al., 2014).

A tintura de EP teve efeito antioxidante, num rim de rato, intoxicado por tetracloreto de carbono, por ativação da catalase e glutathione transferase (Matsiopa et al., 2012).

Quanto ao poder antimicrobiano, a EP demonstrou ser seletiva, pois diferentes organismos manifestaram diferente sensibilidade, não havendo correlações entre a ação de um composto bioativo específico e a sua atividade antibacteriana, pressupondo-se que atuem em sinergia, sendo capazes de reverter a estimulação de citoquinas pró-inflamatórias, tanto em bactérias, como em vírus (Hudson, 2012; Tsai et al., 2012a).

Num estudo realizado por Sharma et al. (2010), pretendeu-se confirmar a hipótese de que a EP pode inativar certas bactérias respiratórias, responsáveis por sintomas mais comuns de infeções do trato respiratório superior, tais como dor de garganta, tosse e inflamação. Concluiu-se que a EP inativou as bactérias: *Streptococcus pyogenes* (associada a dor de garganta e infeções pulmonares mais graves), *Haemophilus influenzae* (responsável por otites, bronquites e pneumonias) e *Legionella pneumophila* (responsável por pneumonias) e inverteu completamente a suas respostas pró-inflamatórias celulares (Sharma et al., 2010).

Alguns extratos de EP demonstraram atividade antimicrobiana contra todos os microrganismos testados exceto contra *Aspergillus niger* (Thygesen et al., 2007). Uma

preparação padronizada de EP, Echinaforce<sup>®</sup>, apresenta duplo benefício contra o acne, ao inibir a proliferação da colônia bacteriana e ao reverter a inflamação provocada pela bactéria (Dalby-Brown et al., 2005).

#### **1.3.4. Ação anti-inflamatória e anticancerígena**

A inflamação corresponde a uma resposta com o fim de eliminar a causa inicial do dano celular e também as células e tecidos necróticos que resultam deste dano (Rubio-Perez et al., 2012).

As infecções e o dano tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção dos tecidos, restringindo os danos ao local da infecção, podendo, no entanto ter efeitos nocivos, quando ocorre exacerbadamente (Bilate, 2007).

A resposta inicia-se quando os danos tecidual e endotelial, originam a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, com o conseqüente extravasamento de leucócitos para os locais inflamados (Bilate, 2007).

Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória, dos quais importa realçar os mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos que participam no processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e as citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$ ) que induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas, que facilitam a migração de leucócitos (Bilate, 2007; Rubio-Perez et al., 2012).

O extrato de EP demonstrou ser eficiente em reverter as respostas pró-inflamatórias das culturas bacterianas *Streptococcus pyogenes*, *Hemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Staphylococcus aureus* (MRSA) e *Mycobacterium smegmatis* (Sharma et al., 2010).

Esta planta também apresenta características antitumorais. O extrato etanólico 50 % obtido a partir das flores e o composto ativo, ácido chicórico, induz a citotoxicidade em linhas de células tumorais do cólon HCT-116 e Caco-2 (Tsai et al., 2012b). Demonstrou também aumentar os níveis da enzima properdina, no organismo, cuja atividade está diretamente relacionada com a ação anticancerígena (Yildiz et al., 2014). A combinação terapêutica de EP com um agente imunossupressor e não tóxico, no tratamento da leucemia poderá constituir uma alternativa eficiente para a terapêutica (Saunders et al., 2007).

## 1.4. Fitoquímica

São diversos os compostos bioativos que contribuem para a atividade desta planta e daí ser necessário identificá-los e determinar a sua função, crendo-se, no entanto, que todos atuam em cooperação. Muitos destes componentes são únicos da espécie e outros são comuns do género *Echinacea* Moench. A concentração de metabolitos secundários varia com o ano e as fases de desenvolvimento da planta (Islam & Carter, 2005).

A comparação de amostras de EP de origens geográficas distintas é semelhante à comparação de extratos de duas plantas que pertencem a famílias diferentes, devido à sua variabilidade química e, conseqüentemente, às suas propriedades farmacológicas (Han L. & Zhou F., 2012).

O processo da extração dos compostos bioativos, o tipo de solvente utilizado, o protocolo adotado, a parte da planta utilizada são fatores que estão diretamente relacionados com a concentração dos diferentes compostos bioativos (e.g., fenólicos), responsáveis por grande parte da atividade farmacológica (Bilate, 2007; Thomsen et al., 2012).

Para além de compostos não específicos, ácidos gordos, óleo essencial, fitosteróis, rutósido, alcaloides pirrolizidínicos (0,006 %), possuem como compostos ativos os derivados dos ácidos dicafeico e ferúlico, os equinacósidos A e B (0,5 a 1 %), compostos alifáticos de cadeia longa e os polissacáridos (equinacinas) (Cunha et al., 2006).

### 1.4.1. Compostos terpenoides

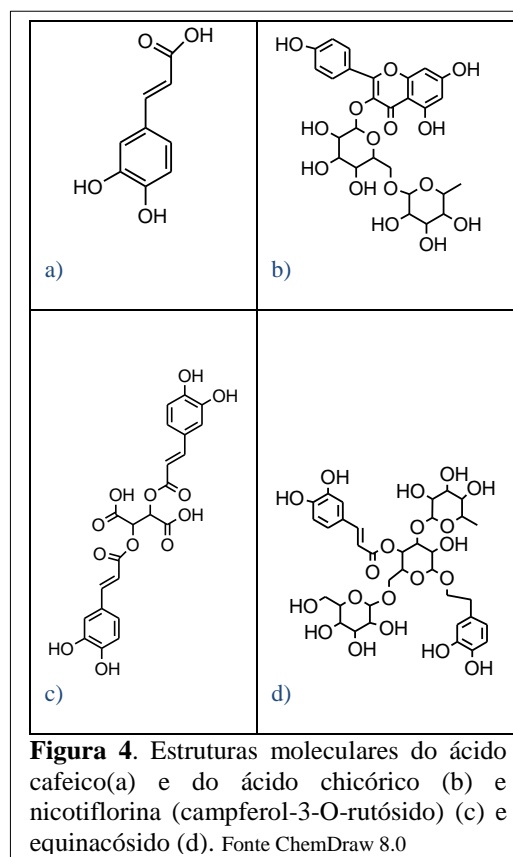
Os componentes do óleo essencial incluem borneol, bornilacetato, germacreno, cariofileno epocido, D-cariofileno e ácido palmítico (World Health Organization, 1999).

### 1.4.2. Compostos fenólicos

A planta apresenta na sua constituição fenilpropanoides derivados do ácido cafeico (**Figura 4a**), ácido chicórico (**Figura 4b**), ácido caftárico e ácido clorogénico

(Tsai et al., 2012b; Lee, 2010; Thygesen et al., 2007); e derivados dos flavonoides como a nicotiflorina (campferol-3-O-rutósido) (**Figura 4c**) e rutina, estando já descritos outros dois, a quercetina e o kaempferol e os seus glicósidos (World Health Organization, 1999; Kurkin et al., 2011).

O ácido chicórico (**Figura 4b**) constitui o componente fenólico maioritário das raízes de EP (Agatonovic-Kustrin et al., 2012) e demonstrou apresentar potentes propriedades imunoestimulantes e antioxidantes, para além de efeitos inibidores na secreção de citocinas proinflamatórias (World Health Organization, 1999; Thygesen et al., 2007; Hou et al., 2010).



**Figura 4.** Estruturas moleculares do ácido cafeico(a) e do ácido chicórico (b) e nicotiflorina (campferol-3-O-rutósido) (c) e equinacósido (d). Fonte ChemDraw 8.0

### 1.4.3. Polissacáridos

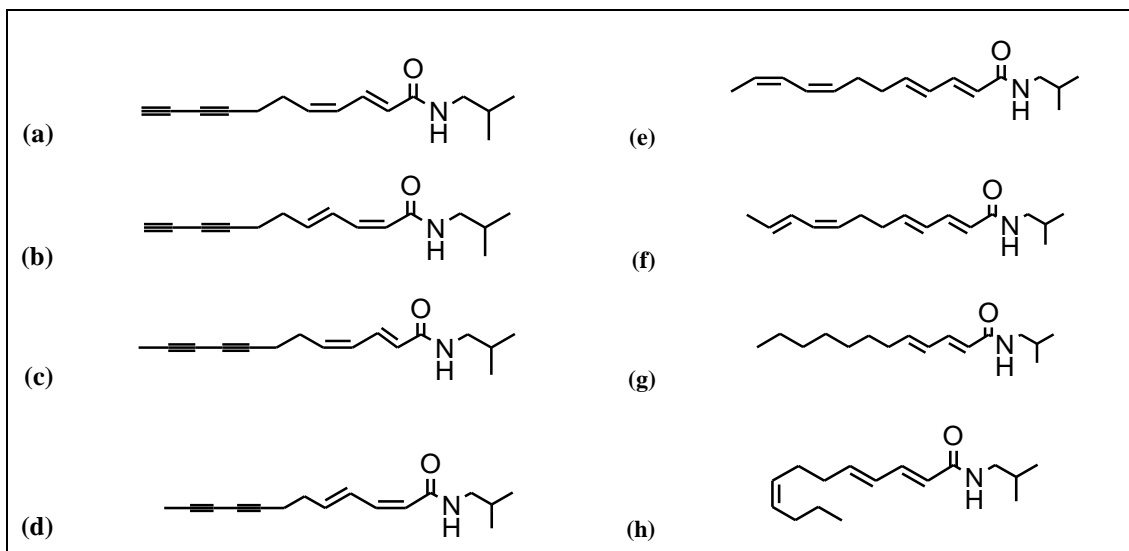
Foram isolados dois polissacáridos estimuladores do sistema imunitário (PES), PS1 (4-*O*-metilglucuroarabioxilano) e PS2 (ramnoarabinogalactano ácido) e um xiloglucano (Bauer, 1997; ESCOP, 2003; Glavač et al., 2012). Estes afetam a fagocitose e a produção de citocinas por granulócitos e macrófagos, *in vitro*. Em estudos com animais, os PES demonstraram estimular a fagocitose e resistência contra infeções sistémicas por *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans* (Glavač et al., 2012).

### 1.4.4. Compostos azotados

No grupo das alquilamidas, estão descritas quatro isobutilamidas dos ácidos dodeca-2*E*,4*E*,8*Z*,10*E*/*Z* tetraenóicos, dodeca-2*E*,4*E*,8*Z* trienóico e dodeca-2*E*,4*E* dienóico (**Figura 5**) mas, numa investigação realizada por Cech et al., em 2010, conseguiram isolar, das raízes de EP, mais quatro alquilamidas: as isobutilamidas dos ácidos undeca-2*E*/2*Z*,4*Z*/4*E*-dieno-8,10-dinóicos e dos ácidos dodeca-2*E*/2*Z*,4*Z*/4*E*-dieno-8,10-dinóicos (**Figura 5**) (World Health Organization, 1999; Cech et al., 2010).

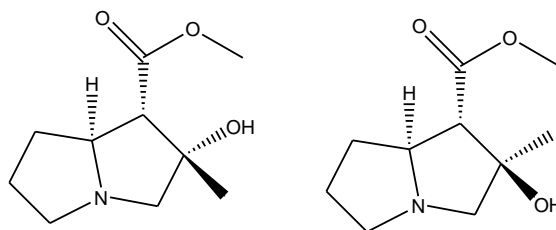
As alquilamidas demonstraram induzir uma resposta anti-inflamatória nos macrófagos, por inibição da produção de prostaglandina E2 (PGE2) e da atividade da ciclooxigenase-2 (COX-2) (Cech et al., 2010; Mudge et al., 2011).

Demonstrou-se que uma mistura de alquilamidas, isoladas a partir da EP, inibem a expressão de proteínas iNOS e COX-2, estimulam a produção de NO, IL-1, IL-10 TNF- $\alpha$ , estando todas envolvidas na resposta imunitária (Chicca et al., 2009; Hou et al., 2010).



**Figura 5.** Estrutura das alquilamidas: (a) Isobutilamida do ácido undeca-2E,4Z-dieno-8,10-dinóico; (b) Isobutilamida do ácido undeca-2Z,4E-dieno-8,10-dinóico; (c) Isobutilamida do ácido dodeca-2E,4Z-dieno-8,10-dinóico; (d) Isobutilamida do ácido dodeca-2Z,4E-dieno-8,10-dinóico; (e) Isobutilamida do ácido dodeca-2E,4E, 8Z,10Z-tetraenóico; (f) Isobutilamida do ácido dodeca-2E,4E, 8Z,10E-tetraenóico; (g) Isobutilamida do ácido-2E,4E-dienóico; (h) Isobutilamida do ácido dodeca-2E,4E,8Z trienóico. Fonte ChemDraw 8.0

Em relação aos compostos alcaloides, foram identificados a glicina betaína e alguns alcaloides pirrolizidinos, como tussilagina (0,006 %) e isotussilagina, embora em concentração mínima; são considerados não hepatotóxicos, pela ausência do anel necino 1,2-insaturado (**Figura 6**). (World Health Organization, 1999).



**Figura 6.** Estrutura química dos alcaloides tussilagina e isotussilagina. Fonte ChemDraw 8.0

## **1.5. Automedicação e aconselhamento farmacêutico**

### **1.5.1. Utilização de produtos à base de plantas**

Com o atual crescimento da utilização de produtos à base de plantas (PBP), ou apenas extratos resultantes de uma medicina tradicional caseira, como as vulgares infusões, surgem sérias dúvidas, em relação à falta de vigilância e ao alheamento do consumidor, em relação, tanto às contraindicações, como às interações deste tipo produtos com outros medicamentos (OIPM, 2013).

A premência na criação de normas específicas, de modo a que a maioria dos produtos conseguisse respeitar requisitos mínimos de eficácia e segurança semelhantes ao apresentados pelos medicamentos para obterem uma Autorização de Introdução no Mercado (AIM), é evidente (OIPM, 2013). Estes procedimentos incluem um reconhecimento mútuo, um procedimento descentralizado e um procedimento nacional, o que no fundo se traduz num dossier com informação relativa a resultados de testes físico-químicos, biológicos e microbiológicos, farmacológicos, toxicológicos e de ensaios clínicos que demonstrem a qualidade, eficácia e segurança (Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>a</sup>).

Assim sendo, segundo este decreto, entende-se por “Medicamento à base de plantas” (MBP), qualquer medicamento que tenha exclusivamente como substâncias ativas uma ou mais substâncias derivadas de plantas, uma ou mais preparações à base de plantas ou uma ou mais substâncias derivadas de plantas em associação com uma ou mais preparações à base de plantas (Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>b</sup>).

Os “Medicamentos Tradicionais à base de Plantas” (MTBP) incluem medicamentos que têm na sua constituição plantas medicinais que provem, através de literatura científica publicada, que um ou mais dos seus constituintes ativos têm um uso clínico bem estabelecido, eficácia reconhecida e um nível de segurança aceitável. Distinguindo-se dos MBP, os MTBP têm um caráter “tradicional”, ou seja, estas plantas têm que ter no mínimo 30 anos de utilização terapêutica em humanos, dos quais, no mínimo 15, no território da Comunidade Europeia (Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>c</sup>).

Aqueles que preencherem estes requisitos serão beneficiados com um registo simplificado especial que lhes permite a não apresentação de resultados de ensaios pré-clínicos e clínicos. O recurso a esta categoria de medicamento permite também assegurar a qualidade do produto final que chega ao utente (uma vez que os critérios de qualidade

são os mesmos exigidos para os outros medicamentos) e ainda que estes produtos tenham um folheto informativo para o utente onde apenas estejam constantes informações comprovadas e não sejam feitas alegações terapêuticas sem que exista fundamento para as mesmas (Campos et al., 2012).

Sendo considerados medicamentos, a farmacovigilância e supervisão, desde o processo de AIM, até e durante a sua comercialização, tanto dos MBP como dos MTBP, é da responsabilidade do INFARMED (Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>d</sup>).

Posto isto, torna-se essencial abordar o tema relacionado com os Suplementos Alimentares (SA). O Decreto-Lei n.º 136/2003, de 28 de junho, estabelece que os SA são “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, comercializadas em forma doseada, tais como cápsulas, pastilhas, comprimidos, pílulas e outras formas semelhantes, saquetas de pó, ampolas de líquido, frascos com conta-gotas e outras formas similares de líquidos ou pós que se destinam a ser tomados em unidades medidas de quantidade reduzida”, ou seja, podem apresentar na sua constituição plantas ou extratos destas que poderão influenciar direta ou indiretamente a saúde do consumidor (Decreto-Lei n.º 136/2003).

Como fruto desta liberalização dos SA, temos um mercado repleto de inúmeras preparações que, não suplementam em nada os planos alimentares, para além de serem constituídos por uma aparente ilimitável panóplia de substâncias (OIPM, 2013).

Um estudo sobre os hábitos de consumo, concretizado em 113 farmácias da Catalunha, salienta a elevada percentagem de pacientes crónicos que consomem plantas medicinais, em simultâneo, com medicamentos, para o mesmo problema de saúde (Alonso & Capdevila, 2005).

Os dados sobre a utilização de suplementos alimentares em Portugal são escassos, havendo um estudo de mercado de 2006 sobre o consumo de SA no país, desenvolvido para a Autoridade da Segurança Alimentar e Económica (ASAE), pelo Instituto Superior de Economia e Gestão que, apresenta uma vasta informação sobre a utilização de SA num grupo de 1247 portugueses, dos quais 60 % referem ser consumidores deste tipo de produtos (Felício, 2006).

Em relação à origem da informação relativa a SA, 55 % dos consumidores referem provir de profissionais (médicos, homeopatas, outros profissionais de saúde), 39 %

referem provir de amigos, 32 % de meios de comunicação social e 16 % referem que o conhecimento proveio de lojas que comercializam suplementos (Felício, 2006).

O mito de que “o que é natural, não faz mal” tem de ser extinto, pois não corresponde à realidade, tendo as plantas medicinais de ser encaradas como fontes de compostos bioativos que, por isso mesmo, podem mudar funções no organismo e até alterar a farmacocinética e a farmacodinâmica de medicamentos que cada indivíduo esteja a tomar conjuntamente, o que poderá significar uma real ameaça à saúde pública (Campos et al., 2012).

Cabe ao farmacêutico, quando possível, orientar o consumidor em relação a este tipo de produtos (Conselho Nacional da Qualidade, 2009; Campos et al., 2012).

### **1.5.2. Aconselhamento farmacêutico**

Segundo a OMS, o farmacêutico surge como um elemento essencial, na promoção da saúde pública e no uso racional do medicamento tendo, então, como responsabilidade, informar e aconselhar o utente sobre o medicamento e a sua correta utilização (Wiedenmayer et al., 2006).

De facto, o profissional com formação mais adequada atualmente para trabalhar com os produtos utilizados em Fitoterapia é o farmacêutico, pois frequenta durante a sua formação, unidades curriculares como Farmacognosia, Botânica aplicada à Farmácia, Química Orgânica e Química Farmacêutica, entre outras, que lhe garantem bases técnicas preparando-o para atuar na área, com suporte científico (Costa et al., 2010).

Assim, para uma intervenção adequada, o farmacêutico deve apoiar-se na evidência científica do uso tradicional das plantas medicinais; no caso dos MBP e MTBP, deve atender a estudos de relação entre a estrutura e a atividade, avaliações de dose-resposta, bem como, no caso dos SA, ter em conta os critérios de segurança e de dose diária recomendada, informação que deve estar associada à embalagem do produto de forma compreensível (Campos et al., 2012).

Cabe ao farmacêutico promover um uso racional dos SA e participar ativamente na vigilância da sua administração, elucidar todas as dúvidas colocadas pelos utentes, clarificando o posicionamento dos SA num regime alimentar equilibrado, como agentes promotores de saúde e não como substitutos de uma alimentação racional (Ferraz & Pinto, 2009).

A sua atuação é também essencial na informação sobre as opções disponíveis, aconselhamento sobre os modos de utilização e de administração, e as circunstâncias que requerem consulta médica. Das suas responsabilidades faz parte também a decisão de dispensa ou não dos SA, no caso de achar que a sua administração não é segura ou necessária (Campos et al., 2012).

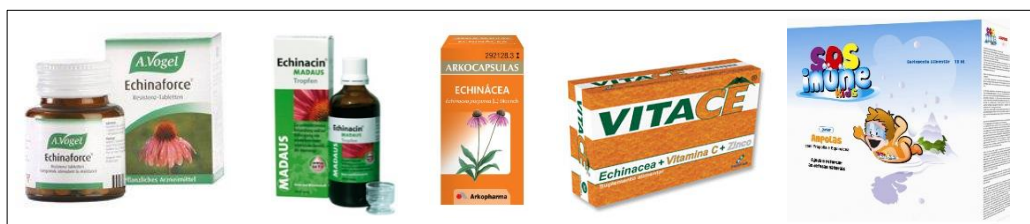
Na prática, o farmacêutico deve questionar o utente e saber o porquê da escolha desse SA, MBP ou MTBP, para que efeito vai ser utilizado, quais os sintomas, se faz medicação crónica ou se está a tomar algum medicamento no momento, alertando para as interações, e se a sintomatologia é prolongada ou recente. Deve também estar atento a estados de gravidez/amamentação, alergias ou patologias crónicas. Após obter todas as informações, cabe ao farmacêutico, utilizando os seus conhecimentos técnico-científicos e experiência, decidir quanto à necessidade e segurança para o utente na escolha daquele produto, recomendando o mais apropriado e fazendo a supervisão da sua administração (Conselho Nacional da Qualidade, 2009).

### 1.5.3. Aconselhamento farmacêutico no uso de produtos à base de equinácea

Centenas de preparações comerciais estão disponíveis em farmácias, parafarmácias entre outros pontos de venda, desde sumos até extratos hidrofílicos e etanólicos, liofilizados, folhas e flores secas em pó ou inteiras (Campos et al., 2012).

As diversas preparações com EP na sua constituição são consideradas SA, algumas por apresentarem outros elementos na sua apresentação, e outras, apesar de terem só o extrato de planta na sua constituição, talvez, por terem iniciado a sua comercialização antes de serem emitidas as diretivas que distinguem os MBP, MTBP e SA.

Numa farmácia de oficina facilmente poderemos encontrar Echinacin Xarope ®, Echinaforce ® comprimidos, Echinaforce Kids ® comprimidos, Echinaforce ® solução oral, Sinegripin ® carteiras, Arkocápsulas Equinácea ®, Vitacê ®, S.O.S Imune Kids ® ampolas (**Figura 7**).



**Figura 7.** Preparações com *Echinacea purpurea*.  
Fonte Google images

Devido ao seu efeito imunomodulador, os SA à base de EP podem ser aconselhados, no geral, para o reforço do sistema imunitário, e mais especificamente para a prevenção, a curto e longo prazo, e tratamento de constipações e gripes (Schapowal, 2013).

A administração é oral e a posologia recomendada para adultos é de 40 mg de extrato, por dia, sendo a dose máxima diária de 360 mg, estando contraindicado em situações de doença autoimune, imunodepressão. O tratamento deve ser iniciado nos primeiros sintomas de gripe (EMEA, 2009).

Segundo a Comissão Alemã, o tratamento não deve exceder três semanas, mas estudos recentes demonstraram a eficácia e segurança da administração durante quatro meses (Jawad et al., 2012; The Commission E Monographs, 1989).

O seu consumo está contra-indicado em casos de gravidez, aleitamento, hepatite e não é recomendado em casos de tuberculose, esclerose múltipla, SIDA, lúpus e outras doenças imunológicas (The Commission E Monographs, 1989).



## 2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- i) Identificar e inventariar a disponibilidade de fitoterápicos (para o tratamento de afecções respiratórias) que integrem na sua composição *Echinacea purpurea* (EP);
- ii) Avaliar os seus níveis de procura e de aconselhamento em farmácia de oficina;
- iii) Analisar, comparativamente, as propriedades antioxidantes e químicas de material vegetal, produzido em modo biológico, (material fresco e, posteriormente liofilizado, e seco pela empresa e comercializado a granel) e de fitoterápicos com EP (nas preparações de comprimido e xarope).



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Inquirição relativa ao uso de formulações à base de equinácea

Numa primeira etapa foi feito o levantamento das preparações à base de *Echinacea purpurea* (EP) ou contendo na sua composição extratos de EP, disponíveis no mercado. Em seguida, tendo por base a listagem de produtos disponíveis realizou-se um inquérito, dirigido a profissionais de farmácia de oficina, através de contato por email e redes sociais, para indagar sobre a disponibilidade, procura, aconselhamento e uso destes produtos à base de EP. Foram contactadas um total de 6073 unidades farmacêuticas, a nível nacional. A amostra utilizada neste estudo corresponde a um total de 92 empresas que responderam à nossa solicitação, onde pelo menos um profissional foi obrigatoriamente inquirido.

O questionário, elaborado via internet, esteve acessível *online* em [https://docs.google.com/forms/d/105W1zvhMzFv1419-WCvVcbKi6oYKiVs7x\\_7GfSg9eqw/viewform](https://docs.google.com/forms/d/105W1zvhMzFv1419-WCvVcbKi6oYKiVs7x_7GfSg9eqw/viewform) (ANEXO I).

O formulário de inquérito incluía duas partes distintas: (i) os dados de identificação do respondente; (ii) os dados relativos à venda de produtos à base de EP, nomeadamente disponibilidade, aconselhamento e consumo de produtos que incluem na sua composição EP. Da primeira parte constavam questões que permitiram categorizar os indivíduos participantes (profissionais a trabalhar nas empresas) quanto à idade, sexo, habilitação literária e cargo ou função na empresa. Estas variáveis possibilitaram o delineamento do perfil sociodemográfico dos respondentes. Com os dados da segunda parte foram determinados quais os produtos à base de EP com maior percentagem de vendas em território nacional, se estas ocorriam por aconselhamento técnico ou não, e se os destinatários do questionário acreditavam, ou não, nos efeitos imunomoduladores da planta.

#### 3.2. Amostras de equinácea analisadas laboratorialmente

O material vegetal de *E. purpurea* foi obtido numa empresa agrícola, o “Cantinho das Aromáticos”, que se dedica à produção de plantas aromáticas, medicinais e condimentares, em modo de produção biológica. A empresa disponibilizou dois tipos de material vegetal procedente da colheita de 2012: (i) amostras de planta fresca recém-

colhida (partes aéreas e inflorescências), que foram posteriormente liofilizadas (liofilizador FreeZone 4.5, Labconco) no Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (LQBA) do IPB; (ii) e amostras previamente processadas na empresa, secas em atmosfera aquecida e forçada e embaladas em sacos próprios para comercialização a granel. Todas as amostras foram reduzidas a pó e mantidas em condições adequadas à posterior utilização. A partir deste material reduzido a pó (que em diante será referido como amostra), prepararam-se infusões, decocções e extratos hidroetanólicos.

Para a preparação das infusões, a amostra (1 g) foi colocada em água destilada (200 ml) previamente fervida (placa de aquecimento, VELP *scientific*), deixando-se repousar durante 5 min; posteriormente, filtrou-se em papel Whatman nº 4, obtendo-se uma solução mãe de 5 mg/ml.

Para a preparação das decocções, à amostra (1 g) foi adicionada água destilada (200 ml) fria, que se levou à ebulição (placa de aquecimento, VELP *scientific*) durante 5 min e depois se deixou repousar por mais 5 min para, posteriormente, se filtrar em papel Whatman nº 4, obtendo-se uma solução mãe de 5mg/ml.

Para obtenção dos extratos hidroetanólicos, a amostra (4 g) foi submetida a uma extração sólido-líquido com 30 ml de etanol 80 % em placa de agitação (a 25 °C a 150 rpm), durante 1h e posteriormente filtrada através de papel Whatman nº 4. O resíduo sólido obtido foi reextraído sob as mesmas condições. Os extratos líquidos combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210, Flawil, Suíça) a 40 °C. O extrato obtido foi redissolvido em etanol 80 %, de forma a obter uma solução mãe com concentração de 20 mg/ml.

Para além deste material, foram também avaliados dois suplementos alimentares, nomeadamente comprimidos (Echinaforce Kids ® comprimidos, A.Vogel) e xarope (Echinacin Xarope ®, Madaus) que, apresentavam na sua constituição, extratos secos das partes aéreas da mesma planta. Estes suplementos foram selecionados a partir dos resultados da inquirição prévia realizada às empresas farmacêuticas. Contudo, não foi possível selecionar os produtos mais aconselhados ou mais consumidos, porque: (i) tinham na sua composição partes subterrâneas da EP (Arkocápsulas Equinácea ®), material que a empresa produtora de plantas não forneceu; (ii) a composição incluía além da EP uma mistura plantas e de outros produtos (S.O.S Imune Kids ®). Os suplementos escolhidos correspondem assim aos que têm maior concentração de extratos de parte aérea de EP.

Cada comprimido (300 mg) tinha na sua composição: extrato concentrado hidroetanólico (6,2 mg) de EP; excipientes: sorbitol, sílice coloidal, estereato magnésico de origem vegetal, sabor natural de laranja. Para análise da atividade antioxidante, cada comprimido foi sujeito a uma pulverização e, posteriormente, foi dissolvido em 10 ml de água destilada e filtrado por vácuo, obtendo-se uma solução mãe com concentração de 0,62 mg/ml.

O xarope (100 ml de solução) tinha na sua constituição: extrato prensado seco de EP (2,34 g); excipientes: sorbato de potássio, ácido cítrico anidro, xantano, aromas, água purificada. Para análise da atividade antioxidante, foi utilizada a concentração inicial de xarope: 23,4 mg/ml.

A partir das soluções mãe foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes, usando o método das diluições sucessivas, que foram utilizadas na realização dos diferentes ensaios de avaliação de atividade antioxidante.

### 3.3. Padrões e Reagentes

Os solventes n-hexano 95 %, acetonitrilo 99 % e acetato de etilo 99,98 %, grau HPLC, foram adquiridos à Fisher *Scientific* (Loures, Portugal). O solvente etanol, grau analítico, foi adquirido na Fisher Chemical (Lisboa, Portugal).

Os padrões de açúcares (L(+)-arabinose, D(-)-frutose, L-fucose, D(+)-galactose, D(+)-glucose anidra, lactose mono-hidratada, maltose mono-hidratada, maltulose mono-hidratada, D(+)-manitol, D(+)-manose, D(+)-melezitose, D(+)-melibiose mono-hidratada, D(+)-rafinose penta-hidratada, L(+)-ramnose mono-hidratada, D(+)-sacarose, D(+)-trealose, D(+)-turanose e D(+)-xilose), padrões de ácidos orgânicos (ácidos oxálico, quínico, málico, ascórbico, cítrico, succínico e fumárico), padrões de tocoferóis ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ -tocoferol) e os padrões utilizados nos ensaios da atividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico), ácido gálico e (+)-catequina foram adquiridos na Sigma.

O tocol racémico, 50 mg/ml foi fornecido pela Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA).

O soro fetal bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), os aminoácidos não essenciais (2 mM), a penicilina/estreptomincina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente), e o meio

de cultura DMEM foram adquiridos à Hyclone (Logan, EUA). O ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o azul tripano, o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol) foram também adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA).

Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA).

A água destilada foi tratada por um sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure Water Systems) do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada do Instituto Politécnico de Bragança- IPB.

### **3.4. Avaliação da atividade antioxidante das amostras de equinácea**

#### **3.4.1 Ensaio da atividade captadora de radicais DPPH**

Todas as diluições das amostras previamente preparadas (30 µl), foram colocadas nos diferentes poços das microplacas (96 poços) e posteriormente foram adicionados 270 µl de uma solução de DPPH ( $6 \times 10^5$  mol/l). A mistura foi colocada no escuro durante cerca de 30 min. A atividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada, por leitura da absorvância a um comprimento de onda de 515 nm, utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc, Winooski, Vermont, EUA) (Guimarães et al., 2013).

A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH recorrendo à fórmula  $\% \text{ ACR} = [(Abs_{DPPH} - Abs_s) / Abs_{DPPH}] \times 100$  onde  $Abs_{DPPH}$  corresponde à absorvância da solução de DPPH e  $Abs_s$  à absorvância da solução de DPPH na presença da amostra. O valor da concentração efetiva de amostra responsável pela captação de 50 % de radicais DPPH ( $EC_{50}$ ) foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

#### **3.4.2 Poder redutor**

As diferentes concentrações das amostras (0,5 ml) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/l, pH 6,6, 0,5 ml) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1 % w/v, 0,5 ml), com posterior incubação a 50 °C. Após 20 min, adicionou-se ácido tricloroacético

(10 % w/v, 0,5 ml). O sobrenadante (0,8 ml) foi colocado nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 ml) e cloreto de ferro (0,1 % w/v, 0,16 ml) (Guimarães et al., 2013). A absorvância foi medida a 690 nm, no leitor de microplacas descrito anteriormente.

A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância ( $EC_{50}$ ) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

### **3.4.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno**

Preparou-se uma solução por dissolução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml), transferindo 2 ml desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 ml) e agitou-se, vigorosamente. Transferiu-se, depois, uma alíquota (4,8 ml) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações das amostras (0,2 ml). Agitaram-se os tubos, homogeneizando a mistura e mediu-se, imediatamente, a absorvância a 470 nm (equipamento Analytik jena, modelo SPECORD 200) no tempo zero ( $t_0$ ), sendo depois incubados a 50 °C (2h) com agitação (50 rpm), para se fazer nova medição da absorvância ( $t_1$ ) (Guimarães et al., 2013).

A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação:  $[\beta\text{-caroteno } (t_1) / \beta\text{-caroteno } (t_0)] \times 100$ . A concentração de amostra correspondente a 50 % de atividade antioxidante ( $EC_{50}$ ) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

### **3.4.4. Inibição da formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

Utilizou-se tecido cerebral de porco, dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação, a 3000g, durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 ml) do sobrenadante com as diferentes concentrações das amostras (0,2 ml),  $FeSO_4$  (10  $\mu$ M; 0,1 ml) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 ml), a 37 °C, durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido

tricloroacético (28 % w/v; 0,5 ml), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2 %, w/v; 0,38 ml). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min (Guimarães et al., 2013). Após centrifugação, a 3000g, durante 10 min, para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA) -TBA, do sobrenadante, foi medida, através da sua absorvância a 532 nm (equipamento Analytik jena, modelo SPECORD 200).

A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula:  $[(A - B)/A] \times 100$ , onde A e B era a absorvância do controlo e da solução com a amostra, respetivamente. A concentração de extrato correspondente a 50 % de inibição da peroxidação lipídica (EC<sub>50</sub>) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão.

#### **3.4.5. Determinação de fenóis totais**

Os fenóis totais foram estimados com base no procedimento descrito por Wolfe et al. (2003) com algumas modificações. A uma alíquota da solução de cada amostra (0.5 ml), adicionou-se Folin-Ciocalteu (2.5 ml, previamente diluído em água 1:10 v/v) e carbonato de sódio (75 g/l, 2 ml). Centrifugou-se a mistura durante 15 s e deixou-se repousar durante 30 min a 40 °C para desenvolvimento da cor, sendo a absorvância medida a 765 nm (equipamento Analytik jena, modelo SPECORD 200).

O ácido gálico foi utilizado para o cálculo da curva padrão (0,05-0,8 mM:  $y = 1,683x + 0,044$ ;  $R^2 = 0,999$ ), e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de preparação.

#### **3.4.6. Determinação de flavonoides totais**

Os flavonoides totais foram determinados pelo método de Jia et al. (1999), com algumas modificações. Uma alíquota (0,5 ml) da solução de cada amostra foi misturada com água destilada (2 ml) e, posteriormente, com solução de NaNO<sub>2</sub> (5 %, 0,15 ml). Após 6 min, adicionou-se a solução de AlCl<sub>3</sub> (10 %, 0,15 ml) e deixou-se repousar mais 6 min. Adicionou-se uma solução de NaOH (4 %, 2 ml) e água destilada até perfazer o volume final de 5 ml. Depois de a solução ser completamente misturada, foi deixada repousar durante 15 min. A intensidade da cor rosa foi medida a 510 nm (equipamento Analytik jena, modelo SPECORD 200).

(+)-Catequina foi utilizada para calcular a curva padrão (0,0156-1,0 mM;  $y = 0,98766x - 0,0008$ ;  $R^2 = 0,999$ ) e os resultados foram expressos em mg de equivalentes de (+)-catequina (EC) por g de preparação.

### **3.5. Avaliação da toxicidade das amostras de equinácea**

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2 (*porcine liver primary cell culture*).

O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu et al., 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank's (HBSS), contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm<sup>3</sup>. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10 %), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio invertido (Nicon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10<sup>4</sup> células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10 % de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste da sulforodamina B (SRB). Para tal, juntou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10 %; 100 µl), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1 % em 1 % ácido acético; 100 µl) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1 %) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µl, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm no leitor de microplacas, referido anteriormente. Os resultados foram expressos em valores de GI<sub>50</sub>, que correspondem à concentração de amostra correspondente a 50% de inibição máxima de proliferação celular. Utilizou-se elipticina como padrão.

### **3.6 Avaliação da composição química das amostras de equinácea**

#### **3.6.1. Composição em açúcares**

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência, acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros et al. (2010a) com algumas modificações. Cada uma das amostras (1 g) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/ml) e foi extraída (exceto o xarope que foi analisado diretamente após diluição) com 40 ml de etanol aquoso 80 %, a 80 °C, durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion K240R-2003) a 15000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de lípidos foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 ml de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 ml.

Os açúcares foram determinados usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, Knauer, sistema Smartline) a 35 °C, equipado com um detetor de índice de refração (RI, Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH<sub>2</sub> Eurospher (4,6±250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v), com um caudal de 1 ml/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. A quantificação foi efetuada seguindo o método do padrão interno.

#### **3.6.2. Composição em ácidos orgânicos**

Os ácidos orgânicos foram determinados seguindo um procedimento previamente descrito por Pereira et al. (2013). As amostras (2 g) foram extraídas (exceto o xarope que foi analisado diretamente após diluição), por agitação com 25 ml de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) durante 45 min, seguindo-se uma filtração através de papel Whatman N ° 4. Posteriormente, efetuou-se nova filtração através de filtros de *nylon* de 0,2 µm.

A análise foi realizada utilizando um sistema de cromatografia líquida ultrarrápido (UFLC, Shimadzu 20A). A separação foi conseguida através de uma coluna de fase inversa C18 SphereClone (Phenomenex, 5 µm, 250 mm×4,6 mm), a uma temperatura de 35 °C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um

caudal de 0,8 ml/min. A detecção foi levada a cabo num detetor de fotodíodos (PDA), sendo 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) os comprimentos de onda preferenciais.

Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos seus picos, registados a 215 nm, com as curvas de calibração obtidas a partir de produtos comerciais de cada composto.

### **3.6.3. Composição em tocoferóis**

Os tocoferóis foram determinados segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros et al. (2010b). Antes do processo de extração, adicionou-se à amostra (500 mg) uma solução BHT em hexano (10 mg/ml; 100 µl) e uma solução de PI em hexano (tocol: 50 µg/ml; 400 µl), sendo, posteriormente, as amostras (exceto o xarope que foi analisado diretamente após diluição), homogeneizadas com metanol (4 ml) no vortex (1 min). Seguidamente, adicionou-se hexano (4 ml), homogeneizou-se novamente no vortex durante 1 min e juntou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 ml), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um vial. A amostra foi reextraída mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram levados à secura sob corrente de azoto, redissolvidos em 2 ml de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro descartável LC de 0,22 µm, transferidos para um vial de injeção âmbar e analisados no HPLC. O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer), um desgaseificador Smartline 5000, um amostrador automático AS-2057 2500 e um detetor de fluorescência FP-2020 (Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250×4,6 nm) YMC Waters, a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 ml/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões.

### **3.7. Análise estatística**

No tratamento dos inquéritos utilizaram-se os programas Microsoft Excel 2013 e SPSS v. 20.0. Alguns resultados foram analisados por uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com  $p = 0.05$ .

Nas análises laboratoriais, utilizaram-se três amostras de cada preparação e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios e desvios padrão correspondentes (SD) e tratados estatisticamente com SPSS v.20.0.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Inquirição relativa ao uso de preparações à base de equinácea

Do universo das 6093 empresas (farmácias) contactadas obtiveram-se apenas 92 respostas que constituíram a amostra final de respondentes através da qual se obtiveram dados relativamente a disponibilidade, aconselhamento e consumo de produtos à base de EP. Os respondentes individuais (profissionais a trabalhar nas empresas que aceitaram participar) foram caracterizados segundo o género, idade habilitação académica, função na empresa e localização geográfica em território nacional.

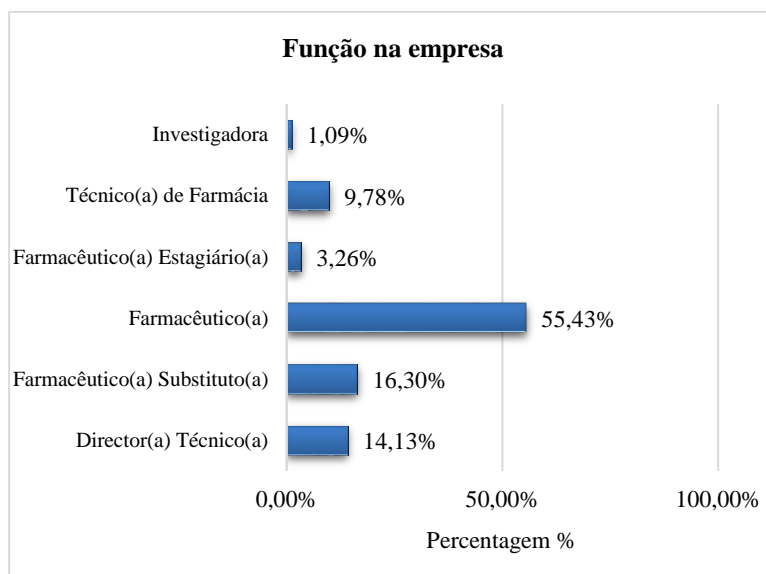
#### 4.1.1 Caracterização da amostra

Em relação ao género participaram, neste estudo, profissionais de saúde de ambos os sexos. A maior frequência constatada foi de 68 casos para o género feminino (74 % do total), sendo que os homens constituíram 26 % da amostra, num total de 24 casos.

A média de idades constatada foi de 26 anos ( $\pm 5,5$  anos), sendo o valor mínimo de 22 anos e o máximo de 47 anos. A idade que aparece com mais frequência é de 25 anos, e a mediana é 26 anos.

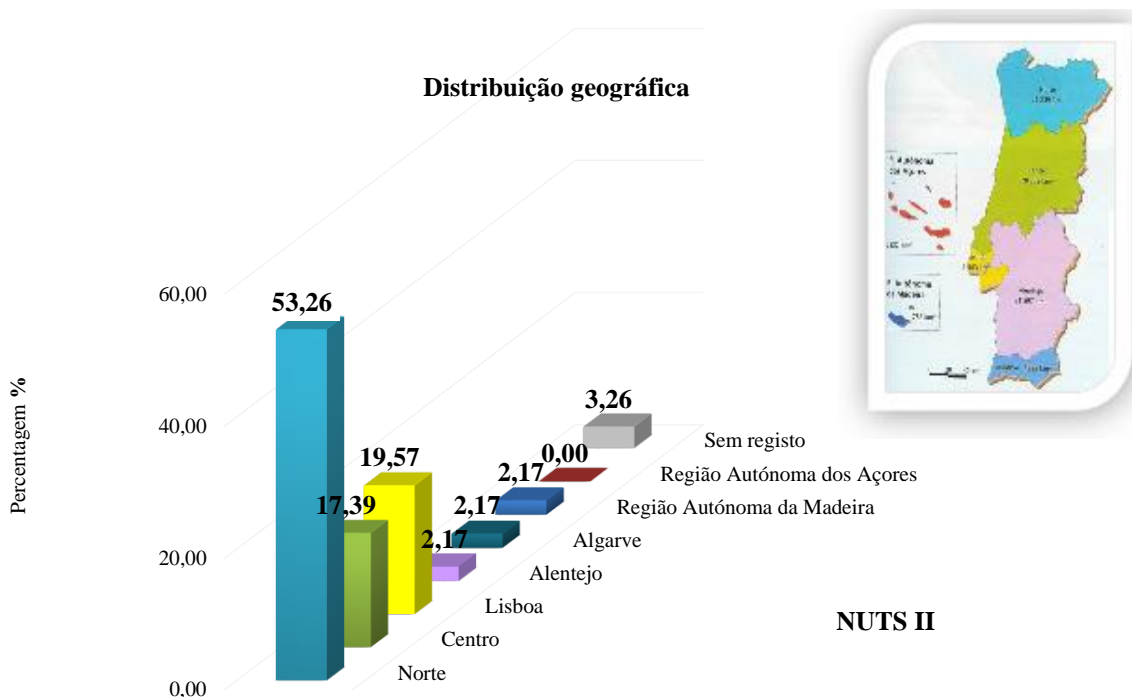
Quando se inquiriu sobre a habilitação académica dos indivíduos, verificou-se que 77,20 % eram licenciados ou mestres em Ciências Farmacêuticas e 22,80 % eram licenciados em Farmácia.

Relativamente à função desempenhada na empresa, 55,43 % eram farmacêuticos, 16,30 % farmacêuticos substitutos, 14,13 % diretores técnicos, 9,78 % técnicos, 3,26 % estagiários e 1,09 % eram investigadores (**Figura 8**).



**Figura 8.** Caracterização da amostra pela função executada na empresa.

Quanto à distribuição geográfica da amostra consideraram-se as diferentes regiões em NUTS II: Norte, Centro, Lisboa, Alentejo, Algarve e Regiões Autónomas da Madeira e Açores.

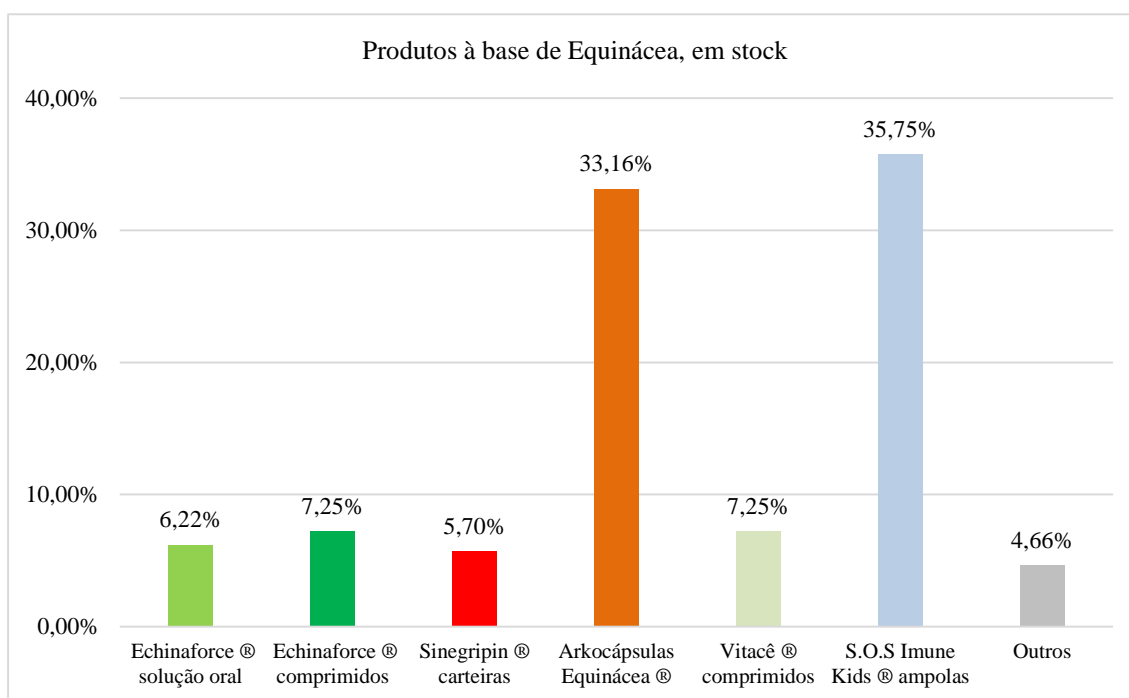


**Figura 9.** Distribuição geográfica, por NUTS II, da amostra.

Dos 92 inquiridos 49 eram do Norte (53,26 %), 16 do Centro (17,39 %), 18 de Lisboa (19,57 %), 2 do Alentejo (2,17 %), 2 do Algarve (2,17 %) e 2 da Região Autónoma da Madeira (2,17 %). Houve 4 pessoas que não responderam a esta questão (3,3 %) (**Figura 9**).

#### 4.1.2 Disponibilidade, aconselhamento e consumo de produtos à base de EP

A **figura 10** ilustra a diversidade de produtos disponíveis em stock nas empresas inquiridas, à base de EP, como Echinaforce® comprimidos, Echinaforce® solução oral, Sinigripin® carteiras, Arkocápsulas Equinácea®, Vitacê®, S.O.S Imune Kids® ampolas.



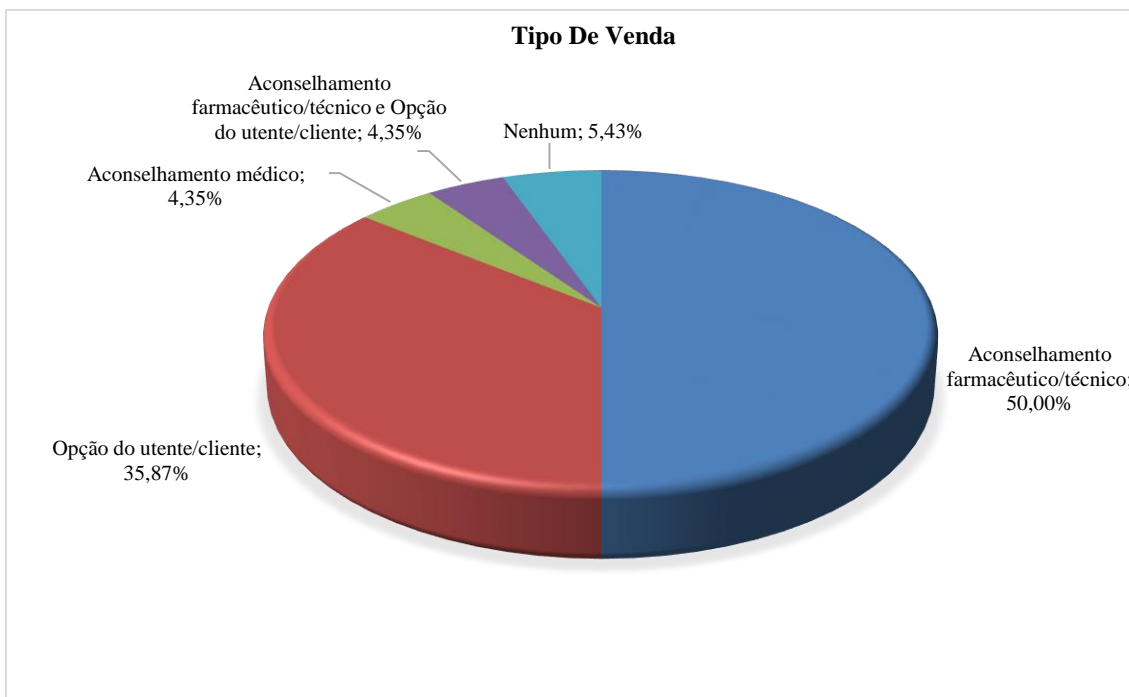
**Figura 10.** Produtos à base de equinácea disponíveis em stock.

Dentro deste grupo o produto que apresenta maior percentagem de vendas é o S.O.S Imune Kids® ampolas, com 35,75 %, logo seguido de Arkocápsulas Equinácea®, com 33,16 % de vendas.

Para além destes, de acordo com a informação dos profissionais as suas empresas apresentavam outros produtos, em *stock* como: Advancis Efervescent®, Echinacin® stick labial, Beat4Kids®, Echineeze®, Pandituss® e Sanoprotect®.

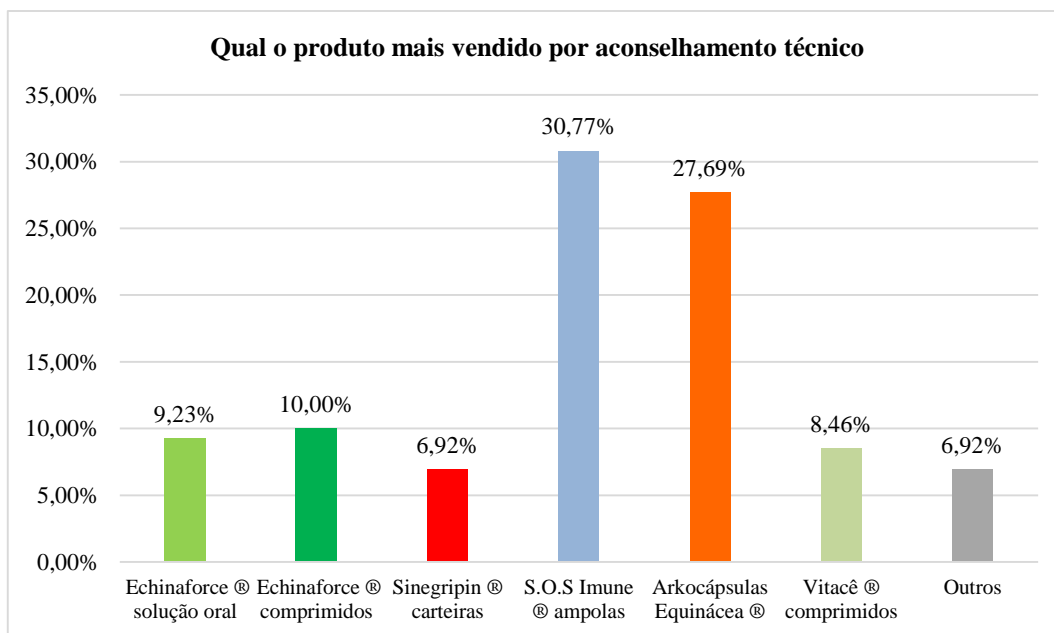
Tentou-se saber junto dos inquiridos se a venda destes produtos acontecia por aconselhamento farmacêutico/técnico, opção do utente/cliente, aconselhamento médico ou por aconselhamento farmacêutico/técnico juntamente com opção do utente/cliente.

Como representado na **figura 11**, 50,00 % das vendas acontecia por aconselhamento farmacêutico/técnico, 35,87 % por opção do utente/cliente e apenas uma pequena fatia 4,35 % por aconselhamento médico e igual para o aconselhamento farmacêutico/técnico e opção do utente/cliente.



**Figura 11.** Tipo de venda

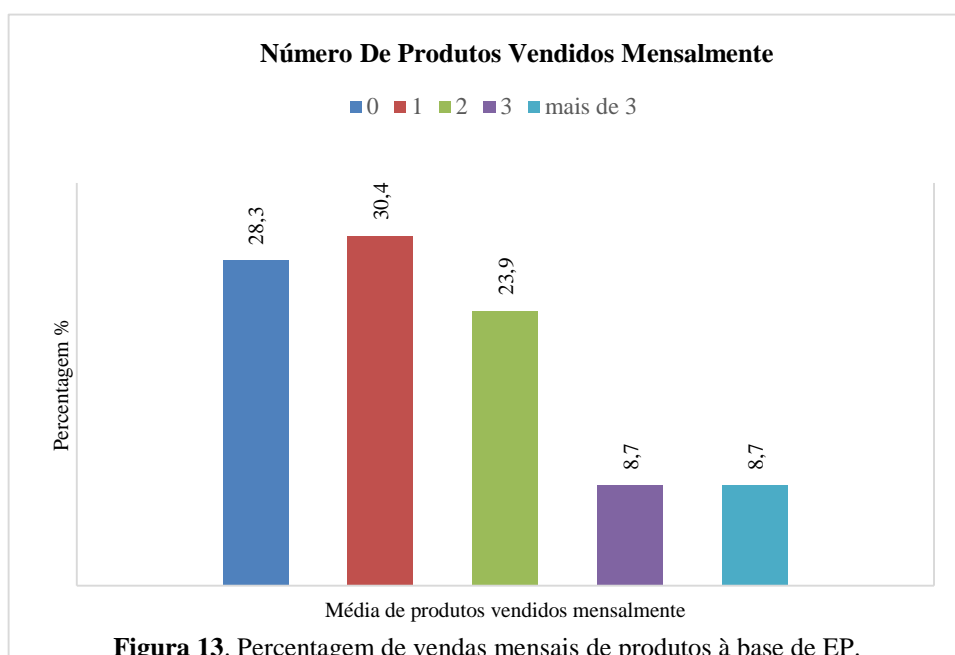
Habitualmente, as pessoas dirigem-se às farmácias, apresentam a sua sintomatologia e pedem a opinião do farmacêutico, e daí que estes produtos sejam mais recomendados do que procurados. Dos 92 inquiridos, 5,43 %, que corresponde a 5 pessoas, não responderam a esta questão.



**Figura 12.** Percentagem de vendas após aconselhamento farmacêutico

As vendas com aconselhamento são proporcionais ao número total de vendas, na **figura 12**, isto é, S.O.S Imune Kids ® ampolas, com 30,77 %, continua a liderar as vendas, seguido do Arkocápsulas Equinácea ®, como 27,69 % das vendas (**Figura 12**).

Quanto à média de vendas mensal deste tipo de produtos, dos 92 inquiridos 28,3 % não vende, 30,4 % vende uma unidade mensalmente, 23,9 % vende duas, 8,7 % vende três e a mesma percentagem apresenta uma venda superior a três unidades mensais (**Figura13**).



Uma unidade mensal representa muito pouco no universo de vendas da farmácia. Na verdade, a venda de antigripais torna-se bastante mais fácil, pois tratam de imediato a sintomatologia, e é isto que o utente pretende, para além do custo ser sempre mais reduzido do que o destes suplementos.

Relativamente à procura destes produtos, 48,91% dos respondentes afirmaram que depois de uma primeira aquisição os consumidores voltam a comprar. Dos 92 inquiridos, há 5 sem registo.

Verificou-se que a maioria dos profissionais 82,61% têm confiança nos efeitos imunomoduladores da planta na prevenção e tratamento de gripes, contudo houve 3 respondentes que não se pronunciaram.

## 4.2. Avaliação das propriedades antioxidantes das amostras de equinácea

Como referido anteriormente, no mercado encontramos uma panóplia de preparações comerciais com EP. Para além disso, a planta em si pode ser consumida sob forma de infusões e decocções. Assim, escolheram-se para análise laboratorial a planta seca e a planta fresca liofilizada, com as quais se prepararam infusões e decocções, por serem as formas mais consumidas, e extratos hidroetanólicos por serem os mais aplicados industrialmente nomeadamente em preparações à base de EP. Para além da planta, selecionaram-se as preparações comerciais Echinaforce Kids® comprimidos e Echinacin Xarope®, por serem formas farmacêuticas diferentes (comprimidos e xarope) e apresentarem as maiores concentrações de extrato de EP.

A EP é descrita como um agente antioxidante, com uma atividade similar ao ácido ascórbico, eficiente na eliminação de radicais livres produzidos por irradiação, com um efeito captador de radicais, reduzindo a citotoxicidade causada pelos peróxidos lipídicos frutos da sua oxidação (Zhai et al., 2007; Dogan et al., 2014). Os resultados da atividade antioxidante avaliada laboratorialmente nas diferentes preparações à base de EP são apresentados na **Tabela 1**.

A origem dos radicais e o mecanismo de reação dos antioxidantes é fundamental na escolha dos métodos para a avaliação da capacidade antioxidante (Prior et al., 2005; Guimarães et al., 2010). Assim, neste trabalho optou-se por realizar um ensaio de avaliação da atividade captadora de radicais livres (usando o radical sintético DPPH), um ensaio de determinação do poder redutor (pela capacidade de reduzir o ião férrico à forma ferrosa) e dois ensaios de inibição da peroxidação lipídica, um de inibição da oxidação do  $\beta$ -caroteno provocada pelo radical linoleato e outro de inibição da formação de TBARS em homogeneizados de células cerebrais de porco.

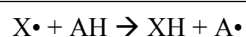
A atividade antioxidante foi expressa em valores de  $EC_{50}$  (concentração de amostra correspondente 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor ou a 50 % da atividade antioxidante nos restantes ensaios), ou seja, os valores mais elevados correspondem a menor poder redutor ou potencial antioxidante. A quantificação de compostos bioativos foi expressa em EAG e EC que significam equivalentes de ácido gálico e catequina, respetivamente. Os valores obtidos para o padrão trolox foram: 41,43  $\mu\text{g/ml}$  (poder redutor), 41,68  $\mu\text{g/ml}$  (atividade captadora DPPH), 18,21  $\mu\text{g/ml}$  (inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno) e 22,84  $\mu\text{g/ml}$  (inibição TBARS).

**Tabela 1.** Atividade antioxidante e composição em compostos bioativos das diferentes preparações obtidas a partir das partes aéreas de equinácea e dos suplementos à base da mesma planta (valores médios  $\pm$  DP, n = 3).

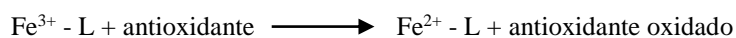
	Planta seca			Planta liofilizada			Suplementos	
	Extrato	Infusão	Decocção	Extrato	Infusão	Decocção	Comprimido	Xarope
<b>Atividade captadora de DPPH (EC<sub>50</sub>, mg/ml)</b>	0,76 $\pm$ 0,02d	2,41 $\pm$ 0,22b	1,43 $\pm$ 0,03c	0,28 $\pm$ 0,22d	0,47 $\pm$ 0,05d	0,35 $\pm$ 0,07d	0,28 $\pm$ 0,01d	26,38 $\pm$ 1,2a
<b>Poder redutor (EC<sub>50</sub>, mg/ml)</b>	0,55 $\pm$ 0,04d	1,82 $\pm$ 0,05b	0,96 $\pm$ 0,01c	0,18 $\pm$ 0,01g	0,40 $\pm$ 0,01e	0,29 $\pm$ 0,01f	0,17 $\pm$ 0,02g	2,20 $\pm$ 0,02a
<b>Inibição descoloração <math>\beta</math>-caroteno (EC<sub>50</sub>, mg/ml)</b>	5,51 $\pm$ 0,63b	7,05 $\pm$ 0,36a	4,10 $\pm$ 0,10c	0,36 $\pm$ 0,03f	1,95 $\pm$ 0,18de	2,21 $\pm$ 0,10d	Efeito pro-oxidante	1,79 $\pm$ 0,03e
<b>Inibição TBARS (EC<sub>50</sub>, mg/ml)</b>	0,84 $\pm$ 0,01c	1,64 $\pm$ 0,01b	0,72 $\pm$ 0,02d	0,04 $\pm$ 0,01g	0,45 $\pm$ 0,02e	0,30 $\pm$ 0,02f	0,07 $\pm$ 0,01h	2,27 $\pm$ 0,06a
<b>Fenóis (mg EAG/ml)</b>	49,26 $\pm$ 1,34e	13,79 $\pm$ 0,56g	24,96 $\pm$ 0,46f	229,22 $\pm$ 4,38a	55,02 $\pm$ 0,16d	73,32 $\pm$ 2,33c	154,61 $\pm$ 2,74b	9,67 $\pm$ 0,07h
<b>Flavonoides (mg EAG/ml)</b>	22,82 $\pm$ 2,06e	5,65 $\pm$ 0,30f	7,49 $\pm$ 1,30f	124,83 $\pm$ 7,47a	29,09 $\pm$ 1,76d	52,33 $\pm$ 2,45c	73,76 $\pm$ 1,13b	3,29 $\pm$ 0,06f

EAG- equivalentes de ácido gálico; EC- equivalentes de catequina. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

A atividade captadora de radicais DPPH foi estatisticamente similar no extrato hidroetanólico, infusão e decocção da planta liofilizada, extrato hidroetanólico da planta seca e no comprimido. A infusão e decocção da planta seca apresentaram menor atividade, sendo o xarope a preparação com a pior performance (**Tabela 1**). O DPPH é um radical de azoto estável, disponível comercialmente e apresenta uma coloração roxa. Neste método, os radicais de DPPH, que absorvem a 515 nm são, em parte, neutralizados pelos compostos antioxidantes, resultando uma diminuição da absorvância do sistema reacional ao referido comprimento de onda (Antolovich et al. 2002; Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al., 2010). Quando uma solução de DPPH (X•) é misturada com uma substância que pode ceder um átomo de hidrogénio (AH- antioxidante), ocorre a seguinte reação que explica a perda da cor (Guimarães et al., 2010).



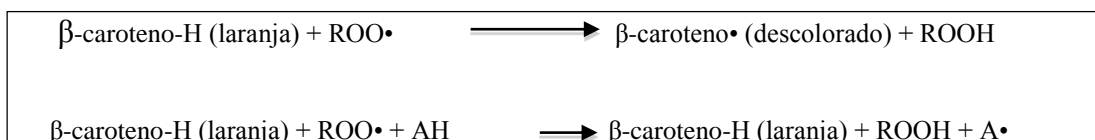
No ensaio do poder redutor foram o extrato hidroetanólico da planta liofilizada e o comprimido a apresentar os melhores resultados; pelo contrário, o xarope foi mais uma vez o que apresentou menor poder redutor (**Tabela 1**). Nesta análise foi medida a redução do  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Os antioxidantes presentes nas amostras causam a redução do  $\text{Fe}^{3+}$ /complexo ferricianeto ( $\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ) à forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ). Assim, em função do poder redutor das amostras, a coloração amarela da solução sofre alteração entre os tons de verde ou azul (Amarowicz et al. 2004; Guimarães et al. 2013), o que pode ser medido espectrofotometricamente a 700 nm. Para determinar o poder redutor (ciclo redox) das substâncias testadas, estas são postas em contato com um determinado metal responsável pela produção de radicais livres e, em alguns casos, pela regeneração dos antioxidantes:



Onde L é o ligante seletivo não ferroso cromogénico que produz a coloração (azul da prússia) da espécie  $\text{Fe}^{2+}\text{-L}$  como resultado da reação redox em questão; a espécie oxidante é  $\text{Fe}^{3+}\text{-L}$  ou  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  (quando se utiliza ferricianeto como reagente) (Guimarães et al., 2013).

O extrato hidroetanólico da planta liofilizada continuou a demonstrar a maior atividade, neste caso avaliada pela capacidade de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno. Pelo contrário, a infusão da planta seca revelou a menor capacidade (**Tabela 1**). Neste ensaio, o  $\beta$ -caroteno sofre uma descoloração rápida na ausência de um antioxidante, uma

vez que o radical livre linoleato (originado a partir do ácido linoleico) ataca a molécula do  $\beta$ -caroteno, que perde as ligações duplas e, conseqüentemente, perde a sua cor alaranjada característica. O  $\beta$ -caroteno é extremamente sensível à oxidação mediada por radicais livres linoleato ( $\text{ROO}\cdot$ ) (Gutierrez et al., 2006; Guimarães et al., 2013). Os antioxidantes (AH) podem dar átomos de hidrogénio para eliminar os radicais e impedir a descoloração de carotenoides:



Os antioxidantes presentes nas amostras podem neutralizar qualquer radical livre que se forme no sistema reacional (p.e., o radical livre linoleato), inibindo a descoloração do  $\beta$ -caroteno (Jayaprakasha et al., 2001; Amarowicz et al., 2004; Guimarães et al., 2010). Assim, a absorção diminuiu rapidamente nas amostras desguarnecidas de antioxidantes, enquanto na presença de um antioxidante, mantêm a cor mantendo, assim, a absorção por um período maior de tempo.

No ensaio TBARS, foi também o extrato hidroetanólico da planta liofilizada que revelou o melhor potencial antioxidante e o xarope originou a pior atividade (**Tabela 1**). Este ensaio mede o malonaldeído (MDA) formado a partir da oxidação de ácidos gordos insaturados. A formação de MDA a partir de ácidos gordos com menos de três duplas ligações (p.e., o ácido linoleico) ocorre através da oxidação secundária de compostos carbonílicos (p.e., non-2-enal) (Fernández et al., 1997; Guimarães et al., 2013). O MDA reage com o ácido tiobarbitúrico (TBA) para formar um pigmento rosa (representativo de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico, TBARS), que é medido espectrofotometricamente a 532 nm (Ng et al., 2000; Guimarães et al., 2013).

A peroxidação lipídica, uma consequência do stresse oxidativo, está associada à perda progressiva do potencial de membrana aumentando, assim, a permeabilidade da membrana e, conduzindo, finalmente, à morte celular. A formação de TBARS em homogeneizados de células cerebrais é uma consequência da peroxidação lipídica.

Assim, os valores de  $\text{EC}_{50}$  muito baixos (**Tabela 1**) obtidos no ensaio TBARS são bastante promitentes. De facto, o cérebro é considerado altamente suscetível aos danos oxidativos, uma vez que consome uma quantidade significativa de oxigénio, é relativamente deficiente em defesas antioxidantes, é rico em substratos oxidáveis como ácidos gordos polinsaturados e catecolaminas e é rico em iões de metais de transição

como o ferro, geralmente envolvidos em reações catalisadas por metais que levam à formação de espécies reativas de oxigênio (Ali et al., 2008; Chong et al., 2005).

A maior atividade antioxidante, demonstrada pelo extrato hidroetanólico da planta liofilizada em todos os ensaios, está certamente relacionada com o maior teor em fenóis e flavonoides observado nesta amostra (**Tabela 1**). A mesma conformidade pode ser observada entre a menor concentração de fenóis e flavonoides do xarope e a sua pior atividade antioxidante (**Tabela 1**). De referir ainda, que a infusão de planta seca apresentou os piores resultados em relação à constituição de flavonoides e à inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química, responsáveis pela neutralização de radicais livres, que ao agir tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, formam intermediários relativamente estáveis, devido à presença de anéis fenólicos e radicais hidroxilo, em posição orto, originam uma possível ressonância entre as estruturas levando a um aumento da estabilidade do radical antioxidante formado após captar os radicais livres (Thygesen et al., 2007; Tsai et al., 2012b; Maorong et al., 2013).

No geral, o xarope exibiu os piores resultados como agente antioxidante, facto também comprovado em estudos clínicos que demonstraram a ineficácia deste mesmo xarope ou de extratos secos (tal como o que existe no xarope estudado) na diminuição dos sintomas e do tempo de duração das constipações (Taylor et al., 2003; Sperber et al., 2004; Yale & Liu, 2004). Por sua vez, o extrato hidroetanólico apresentou os melhores resultados, concluindo-se que a liofilização da planta fresca permitiu manter as melhores características desta.

### **4.3. Confirmação da não toxicidade das amostras de equinácea**

Nenhuma das amostras demonstrou toxicidade para células de fígado PLP2 ( $GI_{50} > 400 \mu\text{g/ml}$ ). A ausência de anel necina 1,2 insaturado nos alcaloides pirrolizidínicos tussilagina e isotussilagina da *E. purpurea* justifica a inexistência de hepatotoxicidade. (Röder, E. et al, 1984). Num estudo realizado por Bisset et al foram administradas doses de EP acima das doses humanas recomendadas, em ratos e ratinhos não apresentando toxicidade. Para além disso foram concebidos testes de mutagenicidade e carcinogenicidade, obtendo em ambos resultados negativos (Bisset et al., 1994; Mengs, 1991).

#### 4.4. Avaliação da composição química de amostras de equinácea

Nas amostras analisadas foram identificados e quantificados seis açúcares, sete ácidos orgânicos e quatro isoformas de tocoferóis, havendo bastantes diferenças entre amostras, como se pode observar na **Tabela 2**.

**Tabela 2.** Composição química de amostras obtidas a partir das partes aéreas de Equinácea e dos suplementos à base da mesma planta (valores médios  $\pm$  SD, n = 3).

	<b>Planta seca</b>	<b>Planta liofilizada</b>	<b>Xarope</b>	<b>Comprimido</b>
<b>Açúcares</b>	<b>(g/100 g)</b>	<b>(g/100 g)</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>(g/comp)</b>
Arabinose	0,32 $\pm$ 0,01b	1,02 $\pm$ 0,03a	nd	nd
Xilitol	nd	nd	15,25 $\pm$ 0,55	nd
Frutose	0,07 $\pm$ 0,02c	3,45 $\pm$ 0,16a	0,53 $\pm$ 0,00b	nd
Glucose	1,15 $\pm$ 0,02b	4,08 $\pm$ 0,23a	0,25 $\pm$ 0,02c	nd
Sacarose	nd	4,39 $\pm$ 0,17	nd	v
Sorbitol	nd	nd	nd	0,34 $\pm$ 0,01
<b>Total</b>	<b>1,54<math>\pm</math>0,01c</b>	<b>12,94<math>\pm</math>0,59b</b>	<b>16,03<math>\pm</math>0,57a</b>	<b>0,34<math>\pm</math>0,01</b>
<b>Ácidos orgânicos</b>	<b>(g/100 g)</b>	<b>(g/100 g)</b>	<b>(g/100 mL)</b>	<b>(mg/comp)</b>
Ácido oxálico	0,32 $\pm$ 0,04a	0,36 $\pm$ 0,02a	0,25 $\pm$ 0,00b	0,17 $\pm$ 0,02
Ácido quínico	1,98 $\pm$ 0,12a	1,10 $\pm$ 0,04b	nd	v
Ácido málico	1,09 $\pm$ 0,05a	1,04 $\pm$ 0,10a	0,22 $\pm$ 0,02b	0,51 $\pm$ 0,04
Ácido xiquímico	0,02 $\pm$ 0,00a	0,01 $\pm$ 0,00b	v	0,01 $\pm$ 0,00
Ácido cítrico	1,23 $\pm$ 0,00b	5,19 $\pm$ 0,18a	0,41 $\pm$ 0,01c	1,41 $\pm$ 0,21
Ácido succínico	2,15 $\pm$ 0,07a	1,19 $\pm$ 0,04b	0,93 $\pm$ 0,01c	0,65 $\pm$ 0,03
Ácido fumárico	nd	nd	v	v
<b>Total</b>	<b>6,79<math>\pm</math>0,040b</b>	<b>8,89<math>\pm</math>0,10a</b>	<b>1,81<math>\pm</math>0,01c</b>	<b>2,75<math>\pm</math>0,20</b>
<b>Tocoferóis</b>	<b>(mg/100 g)</b>	<b>(mg/100 g)</b>	<b>(mg/100 mL)</b>	<b>(<math>\mu</math>g/comp)</b>
$\alpha$ -Tocoferol	0,14 $\pm$ 0,04**	3,84 $\pm$ 0,04**	nd	0,14 $\pm$ 0,01
$\beta$ -Tocoferol	0,15 $\pm$ 0,00**	0,49 $\pm$ 0,00**	nd	nd
$\gamma$ -Tocoferol	0,06 $\pm$ 0,00*	0,07 $\pm$ 0,01*	nd	nd
$\delta$ -Tocoferol	nd	0,15 $\pm$ 0,00	nd	nd
<b>Total</b>	<b>0,35<math>\pm</math>0,04</b>	<b>4,55<math>\pm</math>0,02</b>	<b>nd</b>	<b>0,14<math>\pm</math>0,01</b>

Comp- comprimido; nd- não detetado; v- vestígios. No caso dos tocoferóis aplicou-se um teste de t-Student, que foi utilizado para determinar a diferença significativa entre as duas amostras diferentes, com  $p=0,05$ , com resultados de \* $p=0.150$  e \*\* $p<0.001$ .

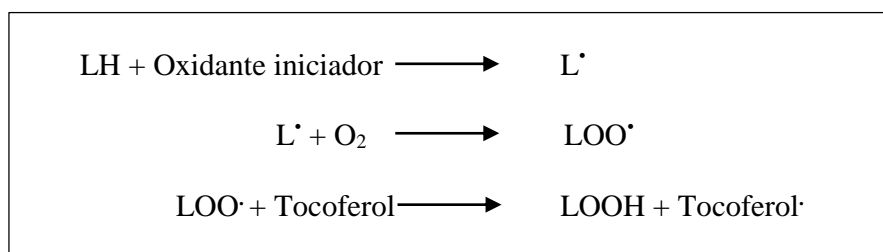
Na análise dos açúcares livres foram detetados frutose, glucose, arabinose nas plantas seca e liofilizada; no entanto, a planta liofilizada apresentou também sacarose. O xarope apresentou como açúcar maioritário o xilitol, facto que veio comprovar a

indicação da presença deste açúcar no rótulo da embalagem comercial desta preparação; também apresentou frutose e glucose. O comprimido apresentou sorbitol e quantidades vestigiais de sacarose.

Foram também identificados seis ácidos orgânicos diferentes (ácidos oxálico, quínico, málico, xiquímico, cítrico e sucínico), sendo o ácido cítrico o mais abundante na planta liofilizada e no comprimido; o ácido sucínico predominou no extrato da planta seca e xarope.

A amostra de planta liofilizada apresentou as quatro isoformas de tocoferóis, sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma maioritária. A amostra de planta seca apresentou todas as isoformas exceto o  $\delta$ -tocoferol. No comprimido apenas foi identificado o  $\alpha$ -tocoferol e o xarope não apresentou nenhuma das isoformas.

Por serem antioxidantes naturais importantes nos alimentos, especialmente nos ricos em ácidos gordos polinsaturados, os tocoferóis atuam como agentes captadores de radicais livre e protegem o nosso organismo contra anomalias degenerativas, bem como doenças cardiovasculares (Ferreira et al., 2009). Reagem com os radicais peroxilo, com origem nos ácidos gordos polinsaturados dos fosfolípidos da membrana ou lipoproteínas, produzindo um hidroperóxido lipídico estável (LOOH). Desta forma agem como antioxidantes, pois dão um átomo de hidrogénio aos radicais peroxilo das moléculas de lípidos insaturados, formando um radical hidroperóxilo e tocoferoxilo, que reage com outros radicais formando ligações estáveis (Ferreira et al., 2009).



Os tocoferóis desempenham, assim, um papel essencial a nível intracelular, já que, quando se encontram em baixas concentrações, há um aumento da fragilidade da membrana e conseqüente suscetibilidade ao ataque de radicais livres, o que justifica a sua importância, como antioxidante. O  $\alpha$ -tocoferol é a isoforma que apresenta maior atividade biológica, sendo um eficaz captador de radicais livres (Ferreira et al., 2009).

## 5. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho foi possível identificar e inventariar a disponibilidade no mercado nacional de nove fitoterápicos ou suplementos alimentares (atendendo a designação proposta na legislação portuguesa) para o tratamento de afeções respiratórias que integrem na sua composição *Echinacea purpurea* (EP) tais como Echinacin Xarope ®, Echinaforce ® comprimidos, Echinaforce ® solução oral, Sinegripin ® carteiras, Arkocápsulas Equinácea ®, Vitacê ® e S.O.S Imune Kids ®.

Para além disso, avaliaram-se os níveis de procura e de aconselhamento na farmácia de oficina, tendo-se concluindo que existe mais aconselhamento farmacêutico que procura pelos utentes, sendo os produtos mais vendidos e aconselhados Arkocápsulas Equinácea ® e SOS Imune Kids ®.

Na análise laboratorial de diferentes preparações à base de EP avaliou-se a atividade antioxidante de extratos hidroetanólicos, infusões e decocções obtidos a partir de material vegetal, produzido em modo biológico (material fresco e, posteriormente liofilizado, e seco pela empresa e comercializado a granel), bem como de fitoterápicos com EP (comprimido e xarope). A atividade antioxidante foi avaliada em ensaios *in vitro* de determinação de efeitos captadores de radicais livres, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais. A ausência de citotoxicidade foi comprovada utilizando uma cultura primária de células de fígado de porco (PLP2).

No geral foi o extrato hidroetanólico da planta liofilizada que revelou melhores resultados em todos os ensaios; relativamente à atividade captadora de radicais DPPH, esta foi estatisticamente similar neste extrato, na infusão e decocção da planta liofilizada, extrato hidroetanólico da planta seca e no comprimido e no caso do poder redutor este foi estatisticamente equiparável ao comprimido (**Tabela 1**).

O xarope apresentou os piores resultados e a infusão demonstrou ter a menor capacidade de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno (**Tabela 1**).

Todas as amostras foram ainda caracterizadas quimicamente por determinação cromatográfica de açúcares, ácidos orgânicos e tocoferóis. Relativamente aos açúcares livres foram detetados frutose, glucose, arabinose nas plantas seca e liofilizada; no entanto, a planta liofilizada apresentou também sacarose. O xarope apresentou como açúcar maioritário o xilitol, como indicado no rótulo da embalagem comercial, seguido

de frutose e glucose. O comprimido apresentou sorbitol e quantidades vestigiais de sacarose.

Identificaram-se seis ácidos orgânicos diferentes (ácidos oxálico, quínico, málico, xiquímico, cítrico e sucínico), sendo o ácido cítrico o mais abundante na planta liofilizada e no comprimido. O ácido sucínico predominou no extrato da planta seca e xarope.

A amostra de planta liofilizada apresentou quatro isoformas de tocoferóis sendo o  $\alpha$ -tocoferol a forma maioritária. Por sua vez, na amostra de planta seca foram identificadas todas as isoformas exceto o  $\delta$ -tocoferol. O comprimido continha apenas  $\alpha$ -tocoferol e o xarope não apresentou nenhuma das isoformas.

Em suma, o extrato hidroetanólico de planta fresca liofilizada revela-se o mais interessante do ponto de vista antioxidante, sendo que neste caso o processo de liofilização permitiu uma melhor conservação dos compostos bioativos. No entanto, são necessários mais estudos para comprovar o maior efeito da planta fresca relativamente às outras preparações.

A EP apresenta-se como uma boa alternativa, principalmente, em situações de debilidade do sistema imunitário, sempre que indicada tendo em atenção as características e o estado de saúde dos consumidores.

As propriedades descritas e verificadas no trabalho experimental e os seus potenciais efeitos (antiviral, antibacteriano, antioxidante, anticancerígena, anti-inflamatória) tornam a EP bastante promissora para o futuro, podendo a planta em si e os seus extratos serem utilizados em diversas preparações, nomeadamente medicamentos à base de plantas.

Com este trabalho revela-se importante a reclassificação de alguns suplementos alimentares à base EP para medicamentos à base de plantas de uso tradicional, atendendo à classificação proposta no Decreto-lei nº176/2006 de 30 de Agosto, assegurando-se assim a efetividade, qualidade e segurança deste tipo de preparações. Coloca-se também a hipótese da venda destes tipo de produtos ser exclusiva de parafarmácias e farmácias ou outros espaços de saúde com pessoal devidamente qualificado e formado.

Em conclusão, este trabalho responde às necessidades de um profissional de saúde na venda e aconselhamento de produtos à base de *Echinacea purpurea*, validando o conhecimento empírico e oferecendo uma boa base científica para o seu uso.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima, R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., Chaves, R., Queiroz, M. J. R. P. (2011). “Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno [3, 2-b] pyridine-2-carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies.” *European Journal of Medicinal Chemistry* **46**: 5800-5806.
- Agatonovic-Kustrin, S., Loescher, C. M., Singh, R. (2012). “Quantification of Phenylpropanoids in Commercial Echinacea Products Using TLC with Video Densitometry as Detection Technique and ANN for Data Modelling.” *Phytochemical Analysis* **24** (4): 1099-1565.
- Ali, S. S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., Bora, U. (2008). “Indian medicinal herbs as sources of antioxidants.” *Food Research International* **41**: 1-15.
- Alonso M. J., Capdevila C. (2005). “Estudio descriptivo de la dispensación de fitoterapia en la farmácia catalana.” *Revista de Fitoterapia* **5** (1): 31-39.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. (2004). “Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies.” *Food Chemistry* **84**: 551-562.
- American Botanical Council (2009) “Herbal Supplement Sales Experience Slight Increase in 2008.” *Herbal Gram* **82**: 58
- Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. (2002). “Methods for testing antioxidant activity.” *Analyst* **127**: 183-198.
- Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S., Phillipson, J. D. (2005). “Echinacea species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties.” *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **57** (8): 929-954.
- Barnes, P. M., Bloom, B., Nahin, R. L. (2008). “Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007.” *National Health Statistics Reports* **1**.
- Barret, B. (1999). “Assessing the risks and benefits of herbal medicine: an overview of scientific evidence.” *Alternative Therapies In Health And Medicine* **5** (4): 40.

- Barrett, B. (2003). "Medicinal properties of Echinacea: a critical review." *Phytomedicine* **10** (1): 66-86.
- Barros, L., Carvalho, A. M., Morais, J. S., Ferreira, I. C. F. R. (2010a). "Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties." *Food Chemistry* **120**: 247-254.
- Barros, L., Heleno, S. A., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2010b). "Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics." *LWT - Food Science and Technology* **43**: 544-550.
- Bauer, R., (1997). "Standardisierung von Echinacea purpurea-Presssaft auf Cichoriensäure und Alkamide." *Zeitschrift für Phytotherapie* **18**: 270-276.
- Bilate, A. M. (2007). "Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações Terapêuticas." *Temas de Reumatologia Clínica* **8** (2): 47-51.
- Bisset, N.G. (1994). "Herbal drugs and phytopharmaceuticals." *Stuttgart: Medpharm Scientific Publishers* **1994**:566.
- Campos, M. G., Costa, M. L., Falcão, A. (2012). "Intervenção Farmacêutica na determinação de Interações Planta-Medicamento." *Boletim do CIM, ROF* **103**
- Cech, N. B., Kandhi, V., Davis, J. M., Hamilton, A., Eads, D., Laster, S. M. (2010). "Echinacea and its alkylamides: Effects on the influenza A-induced secretion of cytokines, chemokines, and PGE2 from RAW 264.7 macrophage-like cells." *International Immunopharmacology* **10**: 1268-1278.
- Chicca, A., Raduner S., Pellati F., Strompen T., Altmann K. H., Schoop R., Gertsch J. (2009). "Synergistic immunopharmacological effects of N-alkylamides in *Echinacea purpurea* herbal extracts." *International Immunopharmacology* **9** (7-8): 850-858.
- Chong, Z.Z., Li, F., Maiese, K. (2005). "Oxidative stress in the brain: Novel cellular targets that govern survival during neurodegenerative disease." *Progress in Neurobiology* **75**: 207-246.
- Conselho Nacional da Qualidade, Ordem dos Farmacêuticos (2009). "Boas Práticas de Farmacêuticas para a farmácia comunitária (BPF2009)." Revisão nº3
- Costa, M. C., Nogueira, T., Ferreira, H. P., Martins, A. P. (2010). "Os suplementos alimentares e a saúde. Papel do farmacêutico na utilização de plantas." *Revista de Fitoterapia* **10** (2): 127-144.
- Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.R. (2006) "Plantas e Produtos Vegetais em

Fitoterapia, 2ª Ed." *Fundação Calouste Gulbenkian*, Lisboa

- Dalby-Brown, L., Barsett, H., Landbo, A. K., Meyer, A. S., Mølgaard, P. (2005). "Synergistic antioxidative effects of alkamides, caffeic acid derivatives, and polysaccharide fractions from *Echinacea purpurea* on *in vitro* oxidation of human low-density lipoproteins." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53** (24): 9413-9423.
- Decreto-Lei n.º 136/2003, de 28 de Junho de 2003, Artigo 3º a)
- Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>a</sup>, de 30 de Agosto de 2006, Artigos: 141º-147º.
- Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>b</sup>, de 30 de Agosto de 2006, Artigo 33º ee).
- Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>c</sup>, de 30 de Agosto de 2006, Artigo: 33º tt) e 141º
- Decreto-Lei n.º 176/2006<sup>d</sup>, de 30 de Agosto de 2006, Artigos: 166º-175º
- Dogan, Z., Ergul B., Sarikaya, M., Filik, L., Alparslan, G. M., Hucumenoglu, S., Can, M. (2014). "The antioxidant effect of *Echinacea angustifolia* and *Echinacea purpurea* in rat colitis model induced by acetic acid." *Bratislava Medical Journal* **115** (7): 411-415.
- EMEA, European Medicines Agency, (2009). "Community Herbal Monograph on *Echinacea purpurea* (L.) Moench., Radix." *Evaluation of Medicines for Human Use*.
- ESCOP, European Scientific Cooperative on Phytotherapy, (2003). "ESCOP Monographs: The Scientific Foundation for Herbal Medicinal Products, 2nd edition." *European Scientific Cooperative on Phytotherapy and Thieme*, Exeter (UK): 129-136.
- Felício, J.Á. (2006). "Estudo de Mercado - Consumo de Suplementos Alimentares em Portugal." *Centro de Estudos de Gestão do Instituto Superior de Economia e Gestão*.
- Fernández, J., Perez-Alvarez, J. A., Fernández-Lopez, J. A. (1997). "Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat." *Food Chemistry* **59**: 345-353.
- Ferraz, D., Pinto, J. (2009). "Suplementos Alimentares no Feminino." *Farmácia Prática* **22**: 1-8.
- Ferreira, I., Barros L., Abreu, R. (2009). "Antioxidants in Wild Mushrooms." *Current Medicinal Chemistry* **16**: 1543-1560.
- Fischer, G., Hübner, S. O., Vargas, G. D., Vidor, T. (2008). "Imunomodulação pela própolis." *Arquivos do Instituto Biológico* **75** (2): 247-253.

- Flannery, M. A. (1999). "From rudbeckia to echinacea: the emergence of the purple cone flower in modern therapeutics." *Pharmacy in History* (2): 52-59.
- Fonseca, F. N., Papanicolao, G., Lin, H., Lau, C. B. S., Kennelly, E. J., Cassileth B., Cunningham-Rundles S. (2014). "Echinacea purpurea (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response." *International Immunopharmacology* **19**: 94-102.
- Glavač, N. K., Košir, I. J., Rode, J., Kreft, S. (2012). "Optimization and use of a spectrophotometric method for determining polysaccharides in *Echinacea purpurea*." *Central European Journal of Biology* **7** (1): 126-131.
- Gruenwald, J., Brendler, T., Jaenicke, C. (2000). "PDR (Physicians' Desk Reference)' for Herbal Medicines: The information standard for complementary medicines, 2ª edição." *Thomas Medical Economics Montvale* **858**: 261-262. Disponível em: <http://cms.herbalgram.org/expandedE/EchinaceaPurpureaherb.html> Acesso em Julho 2014.
- Guimarães, R., Barros, L., Barreira, J. C. M., Sousa, M. J., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2010). "Targeting excessive free radicals with peels and juices of citrus fruits: grapefruit, lemon, lime and orange." *Food and Chemical Toxicology* **48**
- Guimarães, R., Barros, L., Duenas, M., Calhelha, R. C., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C. F. R. (2013). "Infusion and Decoction of Wild German Chamomile: Bioactive and Characterization of Organic Acids and Phenolic Compounds." *Food Chemistry* **136**: 947-954.
- Gutierrez, R. M. P., Luna, H. H., Garrido, S. H. (2006). "Antioxidant activity of Tagetes erecta essential oil." *Journal of the Chilean Chemical Society* **51**: 883-886.
- Han, L., Zhou, F. (2012). "The Analysis of Genetic Diversity of Introduced *Echinacea purpurea* Moench Based on ISSR and SRAP." *Journal of Sichuan Agricultural University* **4**: 439-444 .
- Hobbs, C. (1994). "Echinacea: A literature review; Botany, history, chemistry, pharmacology toxicology and clinical Uses." *HerbalGram* **30**: 33.
- Hou, C. C., Chen, C. H., Yang, N. S., Chen, Y. P., Loa, C. P., Wang, S. Y., Tiend, Y. J., Tsai, P. W., Shyur, L. F. (2010). "Comparative metabolomics approach coupled with cell- and gene-based assays for species classification and anti-inflammatory bioactivity validation of Echinacea plants." *Journal of Nutritional*

*Biochemistry* **21** (11): 1045-1059.

- Hudson, J. B. (2010). "The multiple actions of the phytomedicine Echinacea in the treatment of colds and flu." *Journal of Medicinal Plants Research* **4** (25): 2746-2752.
- Hudson, J. B. (2012). "Applications of the Phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases." *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2012**: 1-16.
- Islam, J., Carter, R. (2005). "Use of Echinacea in upper respiratory tract infection." *Southern Medical Journal* **98** (3): 311-318.
- Jawad, M., Schoop, R., Suter, A., Klein, P., Eccles, R. (2012). "Safety and Efficacy Profile of Echinacea purpurea to Prevent Common Cold Episodes: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial." *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2012**: 1-7.
- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., Sakariah, K. K. (2001). "Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro." *Food Chemistry* **73**: 285-290.
- Jia, Z., Tang, M., Wu, J. (1999). "The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals." *Food Chemistry* **64**: 555-559.
- Kapai, N. A., Anisimova, N. Y., Kiselevskii, M. V., Sitdikova, S. M., Slavetskaya, M.B. (2011). "Selective Cytokine-Inducing Effects of Low Dose Echinacea." *Byulleten' Eksperimental'noi Biologii i Meditsiny* **150** (12): 654-656.
- Kurkin, V. A., Akushskaya, A. S., Avdeeva, E. V., Velmyaikina, E. L., Daeva, E. D., Kadentsev, V. L. (2011). "Flavonoids from Echinacea purpurea." *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* **37** (7): 905-906.
- Lee, J. (2010). "Caffeic acid derivatives in dried Lamiaceae and *Echinacea purpurea* products." *Journal of Functional Foods* **2**: 158-162.
- Maorong, S., Tomihisa, O., Fumihide, T., Shouwen, J. (2013). "Bioactive phenylpropanoid glycosides from *Tabebuia avellanedae*." *Molecules* **18**: 7336-7345.
- Marquez, L. (2000). "La equinacea purpúrea. Una alternativa real para estimular el sistema inmunológico específico." *La Revista de Fitoterapia* **1**: 15-24.
- Masteikova, R., Muselik, J., Bernatoniene, J., Bernatoniene, R. (2007).

"Antioxidative activity of Ginkgo, Echinacea, and Ginseng tinctures." *Medicina-Lithuania* **43** (4): 306-309.

- Matsiopa, I. V., Grigor'eva, N. F., Meshchyshe, I. F. (2012). "Effect of *Echinacea purpurea* tincture on the rat kidney antioxidant system under carbon tetrachloride intoxication." *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **46** (7): 37 – 38.
- Mengers, U., Clare, C. B., Poiley, J. A. (1991). "Toxicity of *Echinacea purpurea*: Acute, subacute and genotoxicity studies." *Arzneim-Forsch/Drug Research*. **41**: 1076-1081.
- Mudge, E., Lopes-Lutz, D., Brown, P., Schieber, A. (2011). "Analysis of Alkylamides in *Echinacea* Plant Materials and Dietary Supplements by Ultrafast Liquid Chromatography with Diode Array and Mass Spectrometric Detection." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59** (15): 8086-8094.
- Nematalla, Kh. M., Sahar, A. A., Ghada, M. Y., Zainb, A. S., (2011). "Effect of *Echinacea* as Antioxidant on Markers of Aging." *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* **5** (2): 18-26.
- Ng, T. B., Liu, F., Wang, Z. (2000). "Antioxidative activity of natural products from plants." *Life Science* **66**: 709-723.
- Nutrition Business Journal, 2009. "U.S. Nutrition Industry Overview." *Nutrition Business Journal* **14** (6/7): 1-13.
- OIPM, Observatório de Interações Planta-Medicamento, 2013. "Utilização de produtos à base de plantas" em <http://www.oipm.uc.pt/home/index.php?target=read-news&id=13> acessado a Setembro de 2014.
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A. M., Ferreira, I. C. F. R. (2013). "Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants." *Food Analytical Methods* **6**: 1337-1344.
- Pleschka, S., Stein, M., Schoop, R., Hudson, J. B. (2009). "Anti-viral properties and mode of action of standardized *Echinacea purpurea* extract against highly pathogenic avian Influenza virus (H5N1, H7N7) and swine-origin H1N1 (S-OIV)." *Virology Journal* **6**: 197
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005). "Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 4290-4302.
- Rininger J. A., Kickner S., Chigurupati, P., McLean, A., Franck, Z. (2000).

"Immunopharmacological activity of Echinacea preparations following simulated digestion on murine macrophages and human peripheral blood mononuclear cells." *Journal of Leukocyte Biology* **68** (4): 503-510.

- Röder, E., Wiedenfeld, H., Hille, T., Britz-Kirstgen, R. (1984). "Pyrrolizidine in *Echinacea angustifolia* DC und *Echinacea purpurea* Moench- Isoleuring und Analytik." *Deutsche Apotheker-Zeitung* **124**: 2316-2317;
- Rubio-Perez, J. M, Morillas-Ruiz, J. M. (2012). "A Review: Inflammatory Process in Alzheimer's Disease, Role of Cytokines." *The Scientific World Journal* **2012**: 1-15
- Saunders, P. R., Smith, F., Schusky, R. W. (2007). "*Echinacea purpurea* L. in children: safety, tolerability, compliance, and clinical effectiveness in upper respiratory tract infections." *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **85** (11): 1195-1199.
- Schapowal, A. (2013). "Efficacy and safety of Echinaforce® in respiratory tract infections." *Wiener Medizinische Wochenschrift* **163**: 102-105.
- Sharma S. M., Anderson M., Schoop S. R., Hudson J. B. (2010). "Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized Echinacea extract (Echinaforce®): Dual actions against respiratory bacteria." *Phytomedicine* **17**: 563-568.
- Sperber, S. J., Shah, L. P., Gilbert, R. D., Ritchey, T. W., Monto, A. S. (2004). "Echinacea purpurea for prevention of experimental rhinovirus colds." *Clinical Infectious Diseases* **38** (10): 1367-71.
- Stanisavljevic, I., Stojičević, S., Veličković, D., Veljkovića, V., Lazića, M. (2009). "Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction." *Chinese Journal of Chemical Engineering* **17** (3): 478-483.
- Taylor, J. A., Weber, W., Standish, L., Quinn, H., Goesling, J., McGann, M., Calabrese, C. (2003). "Efficacy and safety of echinacea in treating upper respiratory tract infections in children: a randomized controlled trial." *The Journal of the American Medical Association* **290** (21): 2824-30.
- The Commission E Monographs (1989) "*Echinacea purpurea* herb". Disponível em <http://cms.herbalgram.org/commissione/Monographs/Monograph0088.html>, acessado no dia 2/8/14
- Thomsen, M. O., Frette, X. C., Christensen, K. B., Christensen, L. P., Grevsen, K.

- (2012). "Seasonal variations in the concentrations of lipophilic compounds and phenolic acids in the roots of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida*." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60** (49): 12131-12141.
- Thygesen, L., Thulin, J., Mortensen, A., Skibsted, L. H., Molgaard, P. (2007). "Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination." *Food Chemistry* **101** (1): 74-81.
  - Tsai, Y. L., Chiou, S. Y., Chan, K. C., Sung, J. M., Lin, S. D. (2012a). "Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts." *LWT - Food Science and Technology* **46** (1): 169-176.
  - Tsai, Y. L., Chiu, C. C., Chen, J. Y. F., Chan, K. C., Lin, S. D. (2012b). "Cytotoxic effects of *Echinacea purpurea* flower extracts and cichoric acid on human colon cancer cells through induction of apoptosis." *Journal of Ethnopharmacology* **143** (3): 914-919.
  - Wiedenmayer, K., Summers, R. S., Mackie, C. A., Gous, A. G. S., Everard, M. (2006). "Developing pharmacy practice - A focus on patient care." Disponível em <http://www.fip.org/files/fip/publications/DevelopingPharmacyPractice/DevelopingPharmacyPracticeEN.pdf> , acessado no dia 20/09/14.
  - Wolfe, K., Wu, X., Liu, R. H. (2003). "Antioxidant activity of apple peels." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**: 609-614.
  - World Health Organization, (1999). "Herba *Echinacea purpurea*." *WHO monographs on selected medicinal plants* **1**.
  - Yale, S. H., Liu, K. (2004). "Echinacea purpurea therapy for the treatment of the common cold: a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial." *Archives of Internal Medicine* **164** (11): 1237-1241.
  - Yildiz, E., Karabulut, D., Yesil-Celiktas, O. (2014). "A bioactivity based comparison of *Echinacea purpurea* extracts obtained by various processes." *Journal of Supercritical Fluids* **89**: 8-15.
  - Zagumenniko, V. B., Babaeva, E. Yu., Petrova, A. L., Malakhov, I. P. (2012). "Studies on total ash and moisture in fresh *Echinacea purpurea* herb" *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* **46** (10): 26-28.
  - Zhai, Z., Liu, Y., Wu, L., Senchina, D. S., Wurtele, E. S., Murphy, P. A., Kohut, M. L., Cunnick, J. E. (2007). "Enhancement of innate and adaptive immune functions by multiple *Echinacea* species." *Journal of Medicinal Food* **10**: 423-434.

## **ANEXO I**

### **Formulário de Inquérito distribuído via internet e de preenchimento on-line**

## Equinácea

A equinácea é uma planta muito utilizada no Norte da América, já desde os seus nativos índios, devido às suas propriedades imunomoduladoras, no tratamento de infeções bacterianas e virais. Atualmente, também é utilizada em alguns países Europeus, como Inglaterra e Alemanha. Como aluna de Mestrado em Farmácia e Química dos Produtos Naturais, da Escola Superior Agrária do Instituto Politécnico de Bragança, em parceria com a Faculdade de Farmácia da Universidade de Salamanca, escolhi esta planta, como tema de estudo. Com vista a perceber se os produtos à base de Equinácea têm muita procura nas farmácias e parafarmácias portuguesas, foi elaborado este pequeno inquérito. Peço a vossa colaboração, com os meus sinceros agradecimentos.

### Sexo \*

- Feminino
- Masculino

### Idade

### Habilitação Académica \*

- Licenciatura em Farmácia
- Licenciatura/Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
- Outra:

### Cargo/Função \*

### Empresa/Organização \*

### Localidade \*

Local de trabalho

### Tem, ou teve, produtos à base de equinácea à venda no seu local de trabalho? \*

- Não
- Sim

**Se respondeu Sim na questão anterior: Quais?**

- Echinaforce ® cápsulas
- Echinaforce ® solução oral
- Sinegripin ® carteiras
- Arkocápsulas Equinácea ®
- Vitacê ®
- S.O.S Imune Kids ® ampolas
- Outra:

**A venda ocorreu por:**

- Aconselhamento farmacêutico/técnico
- Opção do utente/cliente
- Aconselhamento médico
- Outra:

**Em geral, a média mensal de venda destes produtos é de:**

- 0
- 1
- 2
- 3
- +3

**Os utentes/clientes que experimentam pela primeira vez, voltam a adquirir? \***

- Sim
- Não
- Outra:

**Na sua opinião, acredita nos efeitos imunomoduladores da equinácea, nomeadamente na prevenção e tratamento de gripes? \***

- Sim
- Não
- Outra:

\*Obrigatório