Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica

Marina Figueiredo Ferreira de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Nutrição em Saúde Pública

Orientadora Profª Drª Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo
2009

Chá mate (*Ilex paraguariensis*): compostos bioativos e relação com atividade biológica

Marina Figueiredo Ferreira de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Nutrição em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Nutrição em Saúde Pública

Orientadora Profª Drª Deborah Helena Markowicz Bastos

São Paulo

2009

À minha mãe, principalmente,
e às pessoas que estão ao meu lado
sempre, física ou espiritualmente.

"...Do one thing everyday that scares you."

"...sometimes you're ahead, sometimes you're behind...the race is long, and in the end, it's only with yourself."

"...Get to know your parents, you never know when they'll be gone for good. Be nice to your siblings; they are the best link to your past and the people most likely to stick with you in the future. Understand that friends come and go, but for the precious few you should hold on. Work hard to bridge the gaps in geography and lifestyle because the older you get, the more you need the people you knew when you were young."

"Advice, like youth, probably just wasted on the young"* publicado no *Chicago Tribune* em 1º de junho de 1997, por *Mary Schmich

"Wear sunscreen"* gravado por *Baz Luhrmann

AGRADECIMENTOS

Ao escrever os agradecimentos, percebi quantas pessoas participaram do desenvolvimento desse trabalho. São muitas pessoas, sem as quais eu jamais teria conseguido concluí-lo. Os nomes e momentos não param de surgir na minha mente, e gostaria de poder declarar minha gratidão à todos. A contribuição de cada um foi valiosa, única e indispensável.

À Deus, por estar na minha vida todos os dias, mesmo quando não percebo Sua presença.

À Profª Dra. Deborah Helena Markowicz Bastos pela oportunidade, confiança e orientação. Obrigada por mostrar-me o caminho e fazer-me acreditar, mesmo quando estava longe. Que minha admiração por você, fique aqui registrada.

À Profª Dra. Elizabeth Aparecida Ferraz da Silva Torres por suas idéias e sugestões, e por me acolher entre os seus quando se fez necessário.

Ao Profº Dr. Rodrigo Ramos Catharino pelas sugestões e contribuições para a execução desse trabalho.

Ao Profº Dr. José Alfredo Gomes Arêas, pela gentileza em ceder o cromatógrafo líquido de alta eficiência - CLAE, utilizado nesse trabalho.

À Ms. Rosana A. Manólio Soares, amiga, excelente profissional, que me ensinou a lidar com o CLAE e participou do desenvolvimento prático deste trabalho em muitas etapas.

À Dra. Tatiana Saldanha, exigente profissional, pelas colaborações com as análises cromatográficas, validações e manutenções do CLAE e pela amizade.

À Dra. Geni Rodrigues Sampaio, que colaborou intensamente com a execução das análises, nas mais diversas e possíveis maneiras, pela amizade e conselhos.

Às colegas de grupo e amigas Julianna Shibao e Mariana Canela, pela imprescindível ajuda em diversas etapas deste trabalho, inclusive durante a exaustiva extração de melaninas.

Às queridas amigas Yara Queiroz e Marcela Monteiro pelo companheirismo, conselhos, amizade, pelos momentos sérios e descontraídos que vivemos, e, principalmente, pela ajuda prestada em diversas análises. Obrigada!

À Dra. Ana Paula Santos pelas colaborações, mesmo antes de fazer parte do grupo.

Aos amigos da Baixada Santista, que estão cada vez em maior número no laboratório: Yara Queiroz, Patrícia Antunes, Silvio Vicente e Julianna Shibao e aos que fiz durante esses dois anos e meio Liânia, Emília, Ana Paula, Érica e Vanessa, Patrícia Cravo, Maria Carol, Fellipe.

À minha mãe, *in memorian,* por ter sido grande incentivadora dos meus estudos. Ao meu irmão pelo amor e carinho.

À minha prima-irmã Koda com quem compartilhei diversos e bons momentos, por ter me acolhido durante esse período.

À minha família, pelo amor insubstituível, apoio, companhia e momentos de carinho.

Aos amigos de fora do meio acadêmico, pelos momentos de descontração.

À Empresa Leão Júnior pela doação da fita para preparo dos sachês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (processo 2007/06856-3), à Financiadora de Estudos e Projetos – FINEP (projeto 5145/06) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (auxílio financeiro 471693/2007-3).

Aos funcionários do Departamento de Nutrição da FSP.

À todas as pessoas que de alguma forma colaboraram para a realização deste estudo.

RESUMO

Introdução: A erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) é uma espécie nativa do Brasil, Paraguai e Argentina e tem importante apelo social, econômico e cultural. É utilizada na preparação de vários tipos de bebidas, como chimarrão, tererê e chá-mate, consumidas em toda a América Latina. O chá mate, assim como o chimarrão, apresenta potencial protetor à saúde devido à atividade antioxidante, ente outras, conforme demonstrado em diversos estudos. A alta concentração de compostos bioativos, como as saponinas, os compostos fenólicos e as metilxantinas respondem, em conjunto, pela sua atividade biológica. **Objetivos:** a) validar metodologia para isolar e quantificar as principais classes de compostos bioativos do chá mate (compostos fenólicos, xantinas, sapogeninas e melaninas); b) avaliar se há diferenças nos teores desses compostos nas diferentes marcas deste produto comercializado em São Paulo; c) avaliar a atividade biológica de cada classe por diferentes métodos *in vitro*. **Metodologia:** Foram analisados três lotes das três marcas de chá mate 100% presentes em hipermercados no município de São Paulo. A validação da metodologia para quantificação, empregando CLAE, consistiu no cálculo da exatidão (recuperação), repetibilidade e sensibilidade para os compostos: ácido caféico, ácido-5-cafeoilquínico, cafeína, teobromina, acido ursólico e ácido oleanólico. Foram determinados os teores de fenólicos totais por método espectrofotométrico com o reagente Folin-Ciocalteu. As frações de fenólicos e xantinas, sapogeninas e melaninas foram isoladas e testadas quanto à atividade antioxidante pelo: sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico, teste da capacidade de absorbância de oxigênio radical ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), capacidade de seqüestrar o radical DPPH, e atividade ligante de ácidos biliares (ácidos glicocólico, cólico, deoxicólico e taurocólico). **Resultados:** Os coeficientes de determinação das curvas de calibração foram maiores que 0,99. A recuperação dos compostos variou de 84,2 a 115,88% e o coeficiente de variação médio foi 5%. Uma xícara de chá mate (182 mL) apresentou, em média, 161,96 mg de fenólicos totais; 14,71 mg de ácido clorogênico (5CQA); 3,13 mg de ácido caféico ; 2,74 mg de teobromina e 15,16 mg de

cafeína. Os teores de ácido ursólico e ácido oleanólico no chá mate (sachês), foram, em média 82,60 µg/g e 54,08 µg/g, respectivamente. As concentrações dos compostos variaram significativamente entre as marcas analisadas. A atividade antioxidante do chá mate (69,2% de inibição da oxidação pelo sistema β-caroteno e ácido linoléico; DPPH (IC_{50}) = 0,014 mgSS/mL; ORAC = 9997µmolTrolox/xícara de chá), diferiu significativamente ($p<0,05$) entre as marcas apenas para o IC_{50}. Para as frações houve diferença estatística apenas para a porcentagem de inibição da oxidação do ácido linoléico para o extrato melânico. Verificou-se correlação linear ($p<0.05$) positiva ou negativa entre a atividade antioxidante e a concentração de alguns compostos bioativos. A capacidade ligante de ácidos biliares foi semelhante ao controle positivo colestiramina para o chá mate, FS e FFX. O EM demonstrou baixa ou nenhuma capacidade de si ligar aos ácidos biliares. **Conclusões:** O chá mate é uma excelente fonte de compostos bioativos com atividade biológica. Ocorreu variação da concentração de compostos bioativos em função da marca analisada. Essa variação, no entanto, não influenciou na atividade antioxidante da bebida, conforme avaliada pelos métodos ora utilizados.

Descritores: chá mate, *Ilex paraguariensis*, compostos fenólicos, saponinas, melaninas, atividade biológica, antioxidantes.

ABSTRACT

Introduction: Yerba maté (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) is a spontaneous species that grows in Brazil, Argentina and Paraguay and several beverages (chimarrão, terere, maté tea) are produced from its leaves. Maté tea, one of *I. paraguariensis* beverages present antioxidant activity and other biological effects. Compounds such as aponins, polyphenols and methylxanthines, which are present in considerable amounts, are responsible for the biological effects. **Objectives:** The aims of this work were: a) to validate analytical methodologies to evaluate the main bioactive compounds from maté tea (phenolic compounds, xanthines, sapogenins and melanins); b) to evaluate if there are differences on these compounds contents among maté tea brands commercialized in São Paulo; c) to evaluate biological activity of each class of compounds by different *in vitro* methodologies. **Methods:** Three lots from three commercial brands of maté tea present in 100% of the main supermarkets in São Paulo city were analysed. HPLC methodology validation was assessed by determining accuracy (recovery), repeatability and sensibility (linearity, limits of detection and quantitation) for caffeic acid, 5-caffeoylquinic acid, caffeine, theobromine, ursolic and oleanolic acids. Total phenolic content was assessed with the Folin-Ciolcalteu´s reagent. Maté tea phenolic and methylxanthines (FFX), sapogenins (FS) and melanins (EM) fractions were isolated and tested for theirs *in vitro* antioxidantactivity by the following methods: β-carotene and linoleic acid system, ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity), radical scavenging capacity (DPPH). The ability of binding bile acids (glycocholic, cholic, taurocholic and deoxycholic acids) was also assayed. **Results:** Calibration curves determination coefficient (r^2) were higher than 0,99 for all compounds. Recovery ranged from 84,2 to 115,88% and repeatability average was 5%. One maté tea cup (182 mL) contains in average 161,96 mg5CQA of total phenolic compounds, 14,71 mg of chlorogenic acid (5CQA), 3,13 mg of caffeic acid, 2,74 mg of theobromine and 15,16 mg of caffeine. The roasted leaves contains 82,60 and 54,08 μg/g of ursolic and oleanolic acids in average, respectively. Compounds contents varied significantly ($p<0,05$) among brands. The

antioxidant activity assays showed no significant difference ($p>0,05$) among brands to maté tea, except for DPPH (IC_{50}), and the average results for the maté tea are the following: 69,2% in β-carotene and linoleic acid system, DPPH (IC_{50}) = 0,014mgSS/mL; ORAC = 9997,7μmolTrolox/tea cup. Antioxidant activity of the isolated fractions showed significant difference only in β-carotene and linoleic acid system to melanic extract. A positive or negative correlations between the antioxidant activity and the bioactive compounds contents was observed ($p<0.05$). Maté tea, FS and FFX bile acid binding capacity were similar to the positive control cholestyramine. EM showed very little or no bile acid binding capacity. **Conclusions:** Maté tea is a source of bioactive compounds. Although concentration can vary significantly from brand to brand, this fact did not affect maté tea antioxidant activity evaluated by the methods used in this study.

Descritores: maté tea, *Ilex paraguariensis*, polyphenols, saponins, melanins, biological activity, antioxidants.

SUMÁRIO

RESUMO 6
ABSTRACT 8
LISTA DE TABELAS 13
LISTA DE FIGURAS 15
LISTA DE QUADROS 17
1. INTRODUÇÃO 18
1.1. Objetivos 20
1.2. Referências bibliográficas 22
2. CHÁ MATE: COMPOSTOS BIOATIVOS ATIVIDADE BIOLÓGICA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 25
2.1. Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT) 25
2.1.1. DCNT e Saúde Pública 25
2.1.2. Prevenção de DCNT 26
2.2.1. Radicais livres 27
2.2.2. Oxidação lipídica 29
2.2.3. Estresse oxidativo e antioxidantes 31
2.2.4. Compostos bioativos em alimentos 32
2.3. Chá mate 33
2.3.1 Substâncias bioativas da erva mate 39
2.3.1.1. Saponinas 39
2.3.1.3. Compostos fenólicos 40
2.3.1.4. Melaninas 43
2.3.1.5. Xantinas 43
2.4. Validação dos métodos 44
2.5. Métodos de avaliação da atividade biológica *in vitro* 50
2.5.1. Teste de capacidade antioxidante do radical oxigênio - ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Activity*) 51
2.5.2. Capacidade de seqüestrar o radical DPPH 52

2.5.3. Sistema de Oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico 52
2.5.4. Atividade ligante de ácidos biliares 53
2.6. Referências Bibliográficas 54
3. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS 65
3.1. Introdução 65
3.2. Materiais e métodos 66
3.2.1. Materiais 66
3.2.1.1. Solventes e reagentes 66
3.2.1.2. Amostras 67
3.2.2 Métodos 68
3.2.2.1. Preparação do chá mate 68
3.2.2.2. Determinação dos sólidos solúveis 69
3.2.2.3. Quantificação dos fenólicos totais no chá mate 69
3.2.2.4. Quantificação de compostos bioativos por CLAE 70
3.2.2.4.1. Validação dos métodos 70
3.2.2.4.2. Determinação de ácido ursólico e oleanólico 71
3.2.2.4.3. Determinação de Ácidos Fenólicos e Xantinas 72
3.2.3. Análise estatística 75
3.3. Resultados e discussão 75
3.3.1. Validação dos métodos de determinação dos compostos bioativos por CLAE 75
3.3.2. Análise do teor de fenólicos totais 80
3.3.3. Análise de ácido ursólico e oleanólico por CLAE 86
3.3.4. Análise de ácidos fenólicos e xantinas por CLAE 91
3.4. Conclusões parciais 94
3.5. Referências Bibliográficas 95
4. ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES BIOATIVAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA 99
4.1. Introdução 99

4.2. Materiais e métodos 100
4.2.1. Amostras 101
4.2.2. Separação das frações bioativas 101
4.2.2.1. Compostos Fenólicos e Xantinas 101
4.2.2.2. Sapogeninas 102
4.2.2.3. Melaninas 102
4.2.3. Preparo do chá mate 104
4.2.4. Avaliação da Atividade Biológica *in vitro* 104
4.2.4.1. Capacidade de seqüestrar o radical DPPH 104
4.2.4.2. Sistema de oxidação β-caroteno ácido linoléico 105
4.2.4.3. Teste de capacidade antioxidante do radical oxigênio - ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Activity*) 106
4.2.5. Atividade Ligante de Ácidos Biliares 107
4.2.6. Análise estatística 109
4.3 Resultados e discussão 110
4.3.1 Atividade antioxidante do chá mate 110
4.3.2 Separação das frações e atividade antioxidante 117
4.3.2.1 Compostos fenólicos e xantinas (FFX) 117
4.3.2.2. Sapogeninas 122
4.3.2.3. Melaninas 125
4.3.3. Atividade ligante de ácidos biliares 131
4.4. Conclusões Parciais 137
4.5. Referências Bibliográficas 139
5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES 144
ANEXO 1 146

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo de trabalhos sobre os efeitos já estudados da erva mate 36

Tabela 2: Quantidade de padrão adicionada à matriz antes de iniciar a extração (mg) 71

Tabela 3: Limites de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade dos métodos para os ácidos ursólico e oleanólico 77

Tabela 4: Limites de detecção e quantificação do método e recuperação dos 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína 79

Tabela 5. Valores médios ± desvio padrão (dp) da concentração de sólidos solúveis (n=54) e fenólicos totais nos dois métodos (Folin e CLAE) (n=27) 82

Tabela 6: Concentrações médias e desvio padrão de ácido ursólico, oleanólico e sapogeninas totais entre as marcas de chá mate (µg/g de peso seco) 87

Tabela 7: Concentração média e desvio padrão de 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína entre as marcas de chá mate 92

Tabela 8: Atividade antioxidante do chá mate: capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}; mgSS/mL) e atividade antioxidante por ORAC (µmolTrolox/xícara) 111

Tabela 9: Atividade antioxidante (% de inibição), concentração de fenólicos totais (mg5CQA/mL) e de sólidos solúveis (mg/mL) nas amostras analisadas 113

Tabela 10: Correlação entre os resultados da atividade antioxidante do chá mate e os teores de compostos bioativos e sólidos solúveis 114

Tabela 11. Concentração e rendimento (em relação aos SS) de compostos fenólicos e xantinas totais da fração de fenólicos e xantinas do chá mate coletada do CLAE 117

Tabela 12. Concentração média de saponinas totais e rendimento médio do extrato 117

Tabela 13: Atividade antioxidante da FFX 120

Tabela 14: Correlação entre os resultados da atividade antioxidante da FFX e 122

os teores de compostos bioativos do chá mate

Tabela 15. Concentração média de sapogeninas totais e rendimento médio da FS 122

Tabela 16. Atividade antioxidante das frações de sapogeninas 124

Tabela 17: Correlação entre a atividade antioxidante da FS (ORAC e % inibição pelo sistema de oxidação β -caroteno e ácido linoléico) e os teores de compostos bioativos do chá mate 124

Tabela 18: Concentração média±desvio padrão de sólidos solúveis (mg/mL), fenólicos totais (mg5CQA/50mL EM) e (mg5CQA/mgSS) e rendimento (%) 125

Tabela 19: Atividade Antioxidante melaninas 127

Tabela 20: Correlação entre a atividade antioxidante da EM e os teores de compostos bioativos do chá mate 127

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxograma de obtenção da erva mate tostada 34

Figura 2: Estrutura molecular dos ácidos ursólico e oleanólico 39

Figura 3: Estrutura molecular dos principais compostos fenólicos da erva mate 42

Figura 4: Estrutura molecular dos alcalóides purínicos da erva mate 44

Figura 5: Fluxograma de utilização das amostras 68

Figura 6: Espectro de absorção dos padrões de sapogeninas (ácidos ursólico e oleanólico) 72

Figura 7. Espectros de absorção dos padrões de ácidos fenólicos 74

Figura 8: Espectros de absorção dos padrões de xantinas (Teobromina e Cafeína) 74

Figura 9: Curvas de calibração, equações e coeficiente de determinação dos padrões ácido ursólico, ácido oleanólico, 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína 76

Figura 10: (1) Perfil de fenólicos de uma amostra de chá mate a 323nm; (2) Espectros de absorção (A-J) espectros de absorção dos picos de uma amostra; (L) espectro de absorção do padrão 5CQA 85

Figura 11: Gráficos de correlação entre os métodos para determinação de fenólicos totais 86

Figura 12 - Concentrações médias e desvio padrão de ácido ursólico, oleanólico e sapogeninas totais entre as marcas de chá mate (µg/g de peso seco) 89

Figura 13: Perfil cromatográfico de uma amostra das sapogeninas do chá mate a 203nm: (A) ácido oleanólico, (B) ácido ursólico (C) terceiro pico 90

Figura 14: Espectro de absorção das sapogeninas (A) amostra (tempo de retenção em minutos); (B) padrões (tempo de retenção em minutos) 90

Figura 15: Perfil cromatográfico de uma amostra de chá mate a 272nm: (1) teobromina, (2) 5CQA, (3) cafeína, (4) ácido caféico 92

Figura 16: Fluxograma de extração de melaninas do chá mate 103

Figura 17: Fluxograma da atividade ligante de ácidos biliares 109

Figura 18: Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de chá mate 112

Figura 19: Curva cinética da inibição da oxidação lipídica do chá mate, do padrão BHT e do controle 113

Figura 20: (A) Curva cinética da inibição média da oxidação lipídica pelo sistema de oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico de FFX, do padrão BHT e do controle. **(B)** Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de FFX 120

Figura 21: Curva cinética da inibição média da oxidação lipídica pelo sistema de oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico dos ácidos ursólico e oleanólico e do controle 124

Figura 22. Espectros de absorção UV: (A) do extrato melânico do chá mate; (B) do chá preto 126

Figura 23: Média da cinética das FFX, FS, EM e do chá mate em comparação ao controle e ao padrão BHT do sistema oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico 129

Figura 24: Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de chá mate, dos extratos FFX, EM e FS, Trolox e branco 129

Figura 25: Capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}) de FFX, FS, EM, chá mate e BHT 130

Figura 26: Curvas padrão dos ácidos biliares (μM): ácidos glicocólico (a), cólico (b), deoxicólico (c) e taurocólico (d) 132

Figura 27: Ligação dos ácidos glicocólico (a), cólico (b), deoxicólico (c) e taurocólico (d) pela colestiramina, saponina padrão, chá mate, FFX, FS e EM 134

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Parâmetros de desempenho, respectivas definições e método para obtenção apresentadas por INMETRO (2007) 47

1. INTRODUÇÃO

A erva mate (*Ilex paraguariensis ST Hill.)* é uma planta nativa da América do Sul, cultivada e consumida na Argentina, Paraguai, Brasil e Uruguai. Suas folhas e galhos, após o processamento dão origem a bebidas apreciadas pela população destes países. O chá mate é preparado pela da infusão de erva mate seca, cancheada e tostada, e consumido principalmente na região Sudeste do Brasil.

Os produtos e bebidas derivados da erva mate tem sido alvo de pesquisas na área de ciência de alimentos, para identificar compostos bioativos que apresentem efeitos biológicos comprovados. O crescente número de patentes relacionados aos produtos da erva mate (na área da indústria de cosméticos) demonstra o interesse na descoberta de propriedades biológicas dessa matéria prima, assim como seus derivados (BASTOS *et al.,* 2007a; CENI, 2005).

Alguns compostos bioativos já foram identificados na erva mate, como os compostos fenólicos, as saponinas e metilxantinas (CARINI *et al.,* 1998; GOSMANN e SCHENKEL 1989; ATHAYDE *et al.,* 2000). À presença desses compostos são atribuídas diversas propriedades protetoras à saúde apresentadas pelas bebidas derivadas da erva mate (BASTOS *et al.,* 2007a).

Extratos de erva mate foram testados quanto à atividade biológica. O extrato de erva mate verde (para chimarrão) inibiu a oxidação da LDL *in vitro* e *in vivo*, a expressão gênica do co-transportador de glicose no intestino SGLT-1, podendo reduzir a absorção de glicose, e inibiu a peroxidação lipídica em microssomo de fígado de rato (GUGLIUCCI e STAHL 1995; GUGLIUCCI 1996; GUGLIUCCI e MENINI 2002; OLIVEIRA *et al.,* 2008, SCHINELLA *et al.,* 2000; MATSUMOTO *et al.,* 2009).

Foi demonstrado que a erva mate atua na inibição da formação de produtos avançados da glicação (AGEs), com efeito comparável ao de drogas utilizadas para esse fim (LUNCEFORD e GUGLIUCCI 2005). O ácido clorogênico, assim como as saponinas apresentaram atividade antiglicação in vitro (GUGLIUCCI *et al.,* 2009). Os

AGEs, originados naturalmente de uma reação não enzimática entre carboidratos e proteínas acumulam no organismo com o envelhecimento e representam complicações à saúde principalmente para pessoas com diabetes, devido à hiperglicemia. A presença dos AGES contribuem para o desenvolvimento da aterosclerose, retinopatia, doenças microvasculares, nefropatias e problemas de cicatrização (TAN *et al.,* 2002; ROJAS e MORALES, 2004; NASS *et al.,* 2007).

O número de trabalhos publicados, relativamente às propriedades biológicas da erva mate é inferior ao encontrado para outras bebidas estimulantes como chá (*Camelia sinensis*) e o café. A maior parte dos estudos sobre o potencial protetor à saúde da erva mate forma conduzidos com o produto tipo chimarrão (erva mate verde), sendo em menor número as publicações a respeito das atividades biológicas da erva mate tostada, utilizada para o preparo do chá mate.

LIMA e MELO, 2004 estudaram o conteúdo de fenólicos totais em chás brasileiros, incluindo o chá mate, que apresentou o segundo maior teor de fenólicos, com variação de 42,96 a 98,15 mgEC/g. BASTOS *et al.,* (2006) avaliaram a atividade antioxidante pelo método do tiocianato férrico e o conteúdo de fenólicos totais nas infusões de erva mate verde e tostada. Os resultados demonstraram que apesar de haver diferença no conteúdo de fenólicos totais entre as amostras, a atividade antioxidante é equivalente, ou seja, as mudanças que ocorrem com a erva mate na etapa de torra não influenciam sua atividade antioxidante.

BASTOS *et al.,* (2007b) avaliaram os extratos alcoólicos e aquosos de erva mate verde e tostada e chá verde (*Camelia sinensis*) quanto à capacidade de seqüestrar o radical DPPH e ao teor de fenólicos totais. Os resultados demonstraram que os extratos etanólicos apresentaram uma elevada capacidade de seqüestrar o radical livre (88%), independente das concentrações de fenólicos totais, que foram menores para os extratos de erva mate. Os autores também analisaram o perfil de fenólicos por ESI-MS (*Electrospray Insertion Mass Spectrometry*) e identificaram dois compostos na erva mate torrada que não aparecem no perfil da erva mate: ácido cafeoilxiquímico e ácido dicafeoilxiquíkimico.

O consumo de chá mate solúvel influenciou positivamente os parâmetros relacionados ao estresse oxidativo de mulheres saudáveis. Resultou na diminuição da peroxidação lipídica do plasma e no aumento da expressão gênica de enzimas antioxidantes (glutationa peroxidase, superóxido dismutase e catalase), indicando que seu consumo regular melhora a defesa oxidativa por múltiplos mecanismos (MATSUMOTO *et al.,* 2009).

O número de estudos a respeito da erva mate aumentou nos últimos anos, mas ainda há poucos dados publicados sobre os compostos bioativos do chá mate e sua atividade antioxidante. Frente aos resultados obtidos com os extratos de erva mate tostada e o chá mate (LIMA e MELO, 2004; BASTOS *et al.,* 2006; BASTOS *et al.,* 2007b; MATSUMOTO *et al.,* 2009), demonstrando sua capacidade de proteção à saúde humana, dados sobre o intervalo de variação do teor de compostos bioativos em chá mate poderão ser empregados para a determinação do nível de consumo de substâncias bioativas a partir deste alimento. A avaliação da atividade antioxidante do chá mate e das classes de compostos bioativos isoladas irão esclarecer a contribuição de cada composto para a atividade antioxidante da bebida.

1.1. Objetivos

Separar e quantificar diferentes classes de compostos bioativos (saponinas, compostos fenólicos e melaninas) de amostras de diferentes marcas de chá mate comercializadas na cidade de São Paulo no período de Julho a Agosto de 2008, identificar alguns de seus constituintes e correlacionar cada uma dessas classes com a atividade antioxidante, assim como analisar o teor e perfil de metilxantinas e atividade ligante de ácidos biliares.

Os objetivos específicos foram:

a) Validar metodologia para quantificar os compostos fenólicos, xantinas e sapogeninas presentes nas amostras de chá mate

b) Avaliar a atividade antioxidante das amostras de chá mate e das frações isoladas de fenólicos e xantinas, sapogeninas e melaninas

c) Correlacionar os resultados da atividade antioxidante com os compostos bioativos estudados

d) Avaliar a atividade ligante de ácidos biliares do chá mate e frações isoladas de fenólicos e xantinas, sapogeninas e melaninas

O presente trabalho foi dividido em capítulos de acordo com os objetivos propostos. Cada capítulo contempla um ou mais objetivos, apresentando introdução, metodologia, resultados, discussão e conclusões parciais pertinentes.

O capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre o chá mate, reunindo os trabalhos mais relevantes e recentes acerca do seu potencial antioxidante e outros benefícios à saúde humana, e uma breve revisão a respeito dos métodos utilizados nesse trabalho. A determinação dos compostos fenólicos, xantinas e sapogeninas e a validação dos métodos cromatográficos utilizados são os tópicos abordados no Capítulo 3. O capítulo 4 apresenta o estudo da atividade biológica do chá mate e frações isoladas. As conclusões e considerações finais são encontradas no capítulo 5.

1.2. Referências bibliográficas

Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. Phytochem 2000; 55: 853-857.

Bastos DHM, Ishimoto EY, Marques MOM, Ferri AF, Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (Ilex paraguariensis) infusions. J Food Composit Anal 2006; 19: 538-543.

Bastos DHM, Oliveira, DM, Matsumoto RLT, Oliveira PC, Ribeiro ML. Yerba mate: Pharmacological Properties Research ad Biotechnology. Med Arom Plant Sci Biotec 2007a; 1(1) 37-46.

Bastos DHM, Saldanha LAS, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea *(Camelia sinensis*) extracts. Molecules 2007b; 12: 423-432.

Carini M, Facino RM, Aldino G, Calloni M e Colombo L. Characterization of Phenolic Antioxidants from Maté (Ilex Paraguariensis) by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 1998; 12: 1813-1819.

CENI G.C. Oxidases da erva mate (*Ilex paraguariensis* St Hill) extração, estabilidade térmica e influência da exposição ao microondas. (2005) Dissertação de Mestrado URI – Departamento de Ciências Agrárias.

Gosmann G, Schenkel EP. A new saponin from mate, Ilex paraguariensis. J Nat Prod 1989; 52: 1367-1370.

Gugliucci A, Stahl AJ. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of Ilex paraguariensis. Biochem and Molec Biol Int 1995; 35: 47-56.

Gugliucci A. Antioxidant effects of Ilex paraguariensis: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. Biochem and Biophys Res Commun 1996; 2: 338-344 .

Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited in vitro by water extracts of the medicinal herb Achyrocline satureoides. Life Sci 2002; 71: 693-705.

Gugliucci A, Bastos DHM. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. Fitoterapia. 2009; 80: 138-142.

Lima VLAG, Melo EA. Nota Prévia: Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. Braz J of Food Technol 2004; 7(2):187-190.

Lunceford N, Gugliucci A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. Fitoterapia 2005, 76: 419-427.

Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. J Agric Food Chem 2009; 57 (5): 1775-1780.

Nass N, Bartling B, Santos AN, Scheubel RJ, Borgermann J, Silber RE, Simm A. Advanced glycation end products, diabetes and ageing. Gerontol Geriat. 2007; 40:349–356.

Oliveira DM, Freitas H, Souza MFF, Ribeiro ML, Carvalho PO, Araçatri DP, Bastos DHM. Yerba maté (Ilex paraguariensis) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. J Agric Food Chem 2008; 56: 10527-10532.

Rojas A, Morales MA. Advanced glycation and endothelial functions: A link towards vascular complications in diabetes. Life Sci 2004; 76: 715–730.

Schinella GR, Troiani G, Davilla V, Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidants effects of an aqueous extract of *Ilex paraguariensis.* Biochem. and Biophys Res Commun 2000; 269: 357-360.

Tan KCB, Chow WS, Ai VHG, Metz C, Bucala R, Lam K. Advanced Glycation End Products and Endothelial Dysfunction in Type 2 Diabetes. Diabetes Care. 2002*;* 25:1055–1059.

2. CHÁ MATE: COMPOSTOS BIOATIVOS ATIVIDADE BIOLÓGICA - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Doenças Crônicas Não Transmissíveis (DCNT)

2.1.1. DCNT e Saúde Pública

Nas últimas décadas a taxa de mortalidade por DCNT passou a frente dos óbitos por doenças infecciosas e parasitárias (DIP). As DCNT, principalmente as cardiovasculares, diabetes, cânceres e doenças crônicas respiratórias causaram aproximadamente 35 milhões de mortes em 2005, o que representa quase 60% de todas as mortes no mundo, 80% delas aconteceram em países de baixa e média rendas. As mortes por DCNT devem aumentar em 17% nos próximos 10 anos, mas as DCNT são doenças de fácil prevenção. Aproximadamente 80% das doenças cardíacas, derrames, e diabetes tipo 2, e até 1/3 dos casos de cânceres poderiam ser prevenidos eliminando fatores de risco em comum, principalmente uso de cigarro, dietas não saudáveis, intividade física e abuso do álcool (WHO, 2008 e 2009).

Para os próximos 20 anos, a projeção para população idosa no país indica a duplicação do número de indivíduos acima dos 60 anos, devido à queda na taxa de fertilidade e de mortalidade como um todo. A esperança de vida ao nascer subiu de 67 anos em 1991 para 71,7 anos em 2004, e para 73 em 2007 (OPAS, 2007 e WHO, 2009). Com o aumento da esperança de vida e duplicação da população idosa existe a preocupação em procurar meios de prevenção das DCNT a fim de melhorar a qualidade de vida da população (BRASIL, 2005).

A OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde (2005) define as DCNT como doenças de etiologia incerta, múltiplos fatores de risco, longos períodos de latência, curso prolongado, origem não infecciosa e que estão associadas a deficiências e incapacidades funcionais. Entre as mais importantes estão a hipertensão arterial, o

diabetes, as neoplasias, as doenças cérebro vasculares e as doenças pulmonares obstrutivas crônicas (DPOC).

A prevalência de algumas DCNT auto-referidas Brasil, de acordo com estudo epidemiológico realizado em 16 capitais brasileiras em 2002 e 2003, chega a 42% para hipertensão arterial e 16% para diabetes (BRASIL, 2005). A Organização Mundial da Saúde (2009) estima que as mortes por DCNT sejam responsáveis por aproximadamente 60% das óbitos mundiais e por 50% da carga mundial de morbidade, expressa por anos saudáveis perdidos.

Por serem de longa duração, as DCNT estão entre as doenças que mais demandam ações, procedimentos e serviços de saúde. Uma estimativa do Sistema Único de Saúde (SUS) calculou que os gastos em 2002 estiveram acima dos 7 bilhões de reais.

A prevenção e controle das DCNT e seus fatores de risco são fundamentais para evitar um crescimento epidêmico dessas doenças e suas conseqüências nefastas para a qualidade de vida e o sistema de saúde no país (BRASIL, 2005).

2.1.2. Prevenção de DCNT

As estratégias de prevenção das DCNT são bastante amplas e passíveis de serem alcançadas. Como as doenças são multicausais, ou seja, ocorrem devido à um grupo de fatores de risco associados, o combate a esses fatores é o alvo da prevenção. Os fatores de risco modificáveis que estão associados ao desenvolvimento dessas doenças são: tabagismo, consumo excessivo de álcool, excesso de peso, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, baixo consumo de frutas e hortaliças e inatividade física (WHO, 2008).

As mudanças de estilo de vida ocorridas na dieta e atividade física nas últimas 5 décadas foram cruciais para o aumento da prevalência das doenças crônicas. A alimentação rica em alimentos de origem vegetal deu lugar a dietas carregadas em gorduras saturadas, açúcares e alimentos densamente energéticos. A inatividade física é resultado de mais uma mudança no estilo de vida da população, para hábitos de vida sedentários (MATSUDO *et al.,* 2002).

Cerca de 80% das doenças cardiovasculares, 90% do diabetes mellitus tipo 2 e 30% dos cânceres poderiam ser evitados por mudanças na dieta e estilo de vida (WHO/FAO, 2002).

O estresse oxidativo (tema que será abordado mais adiante nesta revisão) está claramente associado a uma ampla gama de processos ligados a doenças agudas e crônicas, e, apesar de serem necessários estudos mais longos e consistentes, dados epidemiológicos em geral indicam benefícios em se manter dietas com maiores quantidades de antioxidantes, mais especificamente com elevadas quantidades de frutas e vegetais. (WILLCOX *et al.,* 2004).

2.2. Estresse oxidativo e sistema de defesa antioxidante

2.2.1. Radicais livres

Radicais livres (RL) são átomos ou moléculas altamente reativos que contêm um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, o que confere ao átomo ou molécula alta reatividade. São formados por reações de óxido redução, após cederem ou receberem um elétron de outras moléculas instáveis (FERREIRA E MATSUBARA *et al.,* 1997).

Nos sistemas biológicos, os radicais livres ocorrem naturalmente, pois resultam, em sua maioria, das reações do metabolismo celular aeróbio, que envolvem o oxigênio molecular (O_2), localizado na membrana interna da mitocôndria para a produção de energia (ATP). Nesse caso os radicais livres são chamados de "espécies reativas do metabolismo do oxigênio" (EROs). Estas também podem ser espécies que não são radicais livres, mas que são derivadas do oxigênio e capazes de gerar radicais livres (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

As principais EROs são:

(1) radical superóxido (O^{-}_{2}) – a adição de um elétron na molécula de O_2 em seu estado fundamental ocorrerá em um de seus orbitais resultando na formação do radical superóxido com apenas um elétron não pareado, podendo gerar outras espécies de maior

reatividade como o peróxido de hidrogênio, hidroxila e o peroxinitrito (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2000).

$$O_2 + e^- \rightarrow O^-_2$$

(2) peróxido de hidrogênio (H_2O_2) – resultante da redução com 2 elétrons do O_2, (O_2^{2-}):

$$O_2 + 2\ e^- + 2H^+ \rightarrow H_2\,O_2$$

O H_2O_2 não apresenta a característica de radical livre, pois em seus orbitais os elétrons estão pareados (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Esta espécie torna-se importante devido à sua característica hidrossolúvel, permitindo sua permeabilidade através de membranas biológicas; e também devido à produção de outros radicais de maior reatividade, como o radical hidroxila (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

(3) radical hidroxila (OH^-) – sua formação *in vivo* pode estar relacionada com a decomposição do peroxinitrito, do peróxido de hidrogênio ou superóxido, e com a presença ou não da ação catalítica de metais de transição (ferro), conhecidas como reações de Fenton e Haber-Weiss, conforme esquema abaixo:

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot$$

$$Fe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{2+} + HO_2^\cdot + H^+$$

Este é o radical de maior reatividade entre as espécies de oxigênio, e reage rapidamente com inúmeras biomoléculas, danificando o alvo mais próximo do local (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

(4) oxigênio singlete ($^1O_2$) – é a forma excitada do oxigênio molecular e não possui elétrons desemparelhados em sua última camada. O $^1O_2$ é excitado por moléculas previamente excitadas pela luz (fotessensibilização), e pode ser produzido por reações envolvendo enzimas sem a ação da luz (ABDALLA, 2006). Possui alta reatividade, sendo um poderoso agente oxidante.

Também existem as “espécies reativas do metabolismo de nitrogênio” (ERN), como o óxido nítrico e peroxinitrito.

(1) óxido nítrico (NO^-): é gerado *in vivo* a partir do aminoácido arginina, possui um potencial tóxico e está relacionado à formação de outras espécies altamente reativas, como o radical hidroxila e o peroxinitrito (HALLIWELL *et al.,* 1995).

(2) peroxinitrito ($ONOO^-$): este sofre protonação em pH fisiológico e pode se decompor, gerando radical hidroxila e dióxido de nitrogênio em uma quebra homolítica dessa molécula, conforme esquema abaixo (HOOG *et al*., 1992):

$ONOO^- + H^+ \rightarrow {}^{\cdot}OH + NO_2{}^{\cdot}$

O peroxinitrito é também uma espécie potencialmente tóxica, agindo diretamente sobre moléculas biológicas, podendo ser encontrado na fumaça gerada pela queima do cigarro e de materiais orgânicos (HALLIWELL *et al.,* 1995).

Os macrófagos e neutrófilos produzem RL como defesa contra micro-organismos invasores, causando lesões a esses seres. Além do metabolismo celular, fatores exógenos são capazes de gerar os RL, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, tabaco, substâncias tóxicas presentes no ar e em alimentos (aditivos, toxinas e hormônios), consumo excessivo de gordura saturada e medicamentos.

Entretanto, os RL quando em excesso estão associados à danos à macromoléculas, como os lipídeos, proteínas e DNA, desencadeando envelhecimento e diversas doenças, como aterosclerose, diabetes, câncer, doença de Parkinson e Alzheimer (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 2000).

2.2.2. Oxidação lipídica

Todos os componentes celulares encontram-se propensos ao ataque dos radicais livres, mas a membrana celular, rica em lipídios insaturados, é uma das mais susceptíveis (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; NAWAR 1996). Conseqüentemente,

há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomos, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular.

As lesões causadas pelo processo oxidativo *in vivo* induzidas por radicais livres podem estar associadas a várias condições clínicas, como lesões das fibras cardíacas, iniciação e progressão da carcinogênese, inflamações crônicas, diabetes, doenças auto-imunes e relacionadas ao processo de envelhecimento (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

Em alguns processos a oxidação lipídica é desejável, como na resposta inflamatória, em que participa da formação de prostaglandinas e de outras vias de transduções de sinais. Porém, o excesso dos produtos gerados por esse processo pode ser prejudicial (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000).

A oxidação lipídica pode ocorrer por duas vias: a via enzimática, que envolve lipoxigenase e cicloxigenases na oxigenação dos ácidos graxos polinsaturados; e a via que envolve a participação de EROs e ERNs, metais de transição e outros (LIMA e ABDALLA, 2006).

O mecanismo de liperoxidação é uma reação em cadeia, iniciada frequentemente pelo radical hidroxila (OH^-) representado pelas etapas de iniciação, propagação e terminação. Essas etapas estão descritas a seguir, onde L representa o lipídeo:

(1) Iniciação: $LH + OH^{\cdot}$ (ou $LO^{\cdot}$) $\rightarrow L^{\cdot} + H_2O$ (ou LOH).

Ácidos graxos insaturados (LH) são convertidos, via abstração de hidrogênio ($H^{\cdot}$) da membrana celular, em radicais livres lipídicos ($L^{\cdot}$). Tal seqüestro pode ser realizado pelo $OH^{\cdot}$ (radical hidroxila) ou pelo $LO^{\cdot}$ (radical alcoxila), formados inicialmente pela reação de moléculas de lipídeos com o O_2 catalisada por algum agente como a luz, o calor ou íons metálicos.

(2) Propagação: $L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$

$LH + LOO^{\cdot} \rightarrow L^{\cdot} + LOOH$

Os radicais livres gerados são oxidados pelo oxigênio molecular (O_2), originando radicais peroxila ($LOO^{\cdot}$), que por sua vez seqüestram novo hidrogênio do ácido graxo insaturado, formando novamente o $L^{\cdot}$ (radical livre lipídico) na segunda equação da propagação.

(3) Terminação: $LOO^{\cdot} + L^{\cdot} \rightarrow LOOL$

$LOO^{\cdot} + LOO^{\cdot} \rightarrow LOOL + O_2$

A fase de terminação é resultado da reação em cadeia entre os próprios radicais formados durante todo o processo, formando produtos não radicais como os aldeídos. (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os principais produtos finais da oxidação lipídica compreendem os derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. O malonaldeído é o maior produto secundário da oxidação lipídica, apresentando efeito citotóxico, carcinogênico, mutagênico (FERRARI, 1998).

Uma vez iniciada, a reação de oxidação lipídica segue em cadeia, e somente termina quando estiverem esgotadas as reservas de ácidos graxos insaturados e o oxigênio do meio (KIRK, 1984, citado por FERRARI, 2000).

Por esta razão, os fatores que desencadeiam, bem como os que previnem a oxidação lipídica são amplamente discutidos e documentados, sendo objeto de estudo nas últimas décadas (FERRARI e TORRES, 2000).

2.2.3. Estresse oxidativo e antioxidantes

O estresse oxidativo consiste em um estado de desequilíbrio entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e defesa antioxidante. Ocorre quando há insuficiência das defesas antioxidantes do organismo, ou excesso de produção de EROs, resultando em danos oxidativos como aumento no nível de peroxidação lipídica de membranas, aumento da carbonilação de proteínas e danos ao DNA (FERREIRA e MATSUBARA, 1997, SIES *et al.,* 2005).

Existem muitos trabalhos que relacionam o excesso de oxidantes com doenças, como diabetes, fibrose cística, catarata e infecções (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000, WILLCOX *et al.,* 2004). Entretanto, LEVANDER *et al.,* (1995) identificou que esse estado pode também ser protetor no caso de algumas infecções parasitárias, como na malária, em que o excesso de oxidantes é mais danoso ao parasita do que ao organismo.

Para prevenir a sobrecarga de EROs o organismo possui mecanismos de defesa, os antioxidantes não enzimáticos (β-caroteno, selênio, α-tocoferol, vitamina C e compostos fenólicos), e os enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutationa peroxidase – GPX) (YU, 1994; SIES *et al.,* 2005). Estudos epidemiológicos relatam que o aumento da ingestão de antioxidantes na dieta está associado à diminuição no risco de DCNT (HUNG *et al.,* 2004).

Antioxidante é definido como uma molécula capaz de prevenir ou desacelerar a oxidação de outras, enquanto que antioxidante biológico foi definido como qualquer substância que em concentrações baixas quando comparada a concentração de substâncias oxidáveis retarda ou atrasa significativamente a oxidação do substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2000). Os antioxidantes naturais, presentes em plantas e alimentos, são alvo de pesquisas para investigar seu possível uso na prevenção das doenças citadas (MOON e SHIBAMOTO, 2009).

2.2.4. Compostos bioativos em alimentos

Os compostos bioativos presentes em alimentos são coadjuvantes nos mecanismos de proteção contra DCNT e melhoria do estado de saúde que estão além de suas funções nutricionais básicas (LOLIGER, 1991, SHI *et al.,* 2002). Essa ação protetora é atribuída, em parte, à ação antioxidante de determinadas substâncias presentes nos alimentos que auxiliam no combate ao estresse oxidativo.

Nos últimos anos, um crescente número de evidências foi apresentado a respeito da influência de compostos bioativos isolados ou em conjunto na expressão gênica humana. Doenças extremamente complexas, como as DCNT, poderão com o auxílio das

ferramentas de nutrigenômica e nutrigenética (que visam identificar diferentes respostas de genes às substâncias bioativas entre os indivíduos) serem reguladas pela ingestão de alimentos com componentes que ativam ou inativam seus respectivos genes (EVANS *et al.,* 2006).

Revisões recentes indicam a necessidade de estabelecimento da concentração de compostos bioativos de diferentes dietas numa abordagem de manutenção de saúde (BASTOS *et al.,* 2007a). O teor destes compostos, normalmente oriundos do metabolismo secundário das plantas é extremamente variável, o que dificulta a indicação de um teor de ingestão diário na dieta que possa trazer benefícios à saúde. Ainda assim, existe um esforço na identificação de intervalos de concentração que possam ser utilizados com esta finalidade, a exemplo do que já foi feito para a cafeína e flavonóides (USDA, 2003; FILIP *et al.,* 2001).

2.3. Chá mate

A erva mate (produto constituído exclusivamente de folhas e galhos moídos e secos de *Ilex paraguariensis,* de acordo com a legislação brasileira e argentina) é uma planta originária da América do Sul, encontrada em herbais nativos ou adensados, explorados por pequenos produtores, que se reúnem em cooperativas para processá-la e comercializá-la com grandes empresas produtoras da erva. O maior produtor é a Argentina, seguido pelo Brasil (IBGE, 2005).

As folhas da erva mate (*Ilex paraguariensis)* são utilizadas na preparação de bebidas consumidas em larga escala na Argentina, Paraguai, Uruguai e Brasil. A erva mate é consumida sob a forma de chá-mate (infusão da erva mate tostada) e chimarrão ou tererê (elaborados com a erva mate verde seca e cancheada) (BASTOS *et al.,* 2005).

Até se transformar em chá mate tostado, a erva mate sofre vários processamentos: sapeco, secagem, cancheamento, peneiramento e torra. O sapeco consiste na passagem dos ramos com folhas sobre as chamas do sapecador, essa etapa inativa enzimas (peroxidase e polifenoloxidase) e retira a umidade superficial para evitar a oxidação que causa o escurecimento indesejado da erva. A próxima etapa, a secagem, irá desidratar a

erva por completo, com uma perda de peso de aproximadamente 60%. O cancheamento é a trituração das folhas e talos secos para posteriormente serem peneirados, separando talos, folhas, pó, goma e palito. A erva mate destinada ao chá mate é então submetida a um forno semelhante ao de torrefação de café para dar origem a erva mate tostada. Na figura 1 está o fluxograma de preparação do chá mate tostado (EMBRAPA, 2008).

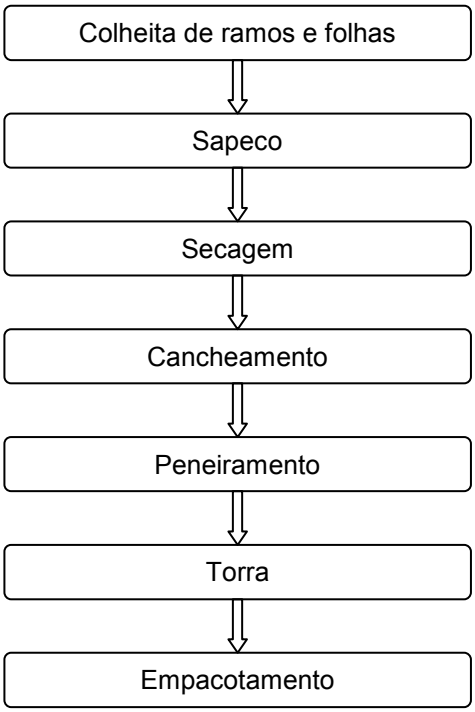


Figura 1: Fluxograma de obtenção da erva mate tostada **Fonte:** EMBRAPA, 2008

Os efeitos benéficos do uso de bebidas à base de erva mate já foram descritos pela medicina popular e por herboristas. Artrite, dor de cabeça, constipação, reumatismo, hemorróidas, obesidade e fadiga, retenção de líquido, hipertensão, digestão lenta e desordens hepáticas são os problemas de saúde para os quais o uso de erva mate é recomendado na medicina popular.

Entretanto, a relação entre o consumo do chimarrão e a alta incidência de câncer de esôfago em populações que tradicionalmente consomem esta bebida, em volumes superiores a 1L por dia, foi objeto de estudos epidemiológicos entre os anos 70 e 90 do

século passado. Os resultados indicam que a alta temperatura de ingestão do chimarrão, e não algum componente específico desta bebida origina lesões que propiciam a instalação da neoplasia (PINTO *et al.,* 1994, GOLDENBERG, 2002).

Já os primeiros estudos sobre efeitos benéficos à saúde da erva mate (chimarrão), resultado de atividade antioxidante, foram publicados em meados da década de 90 (GUGLIUCCI e STAHL 1995; GUGLIUCCI, 1996; SCHINELLA *et al.,* 2000). Estes trabalhos despertaram o interesse da comunidade científica para este alimento com potencial de proteger a saúde (Tabela 1).

Efeitos benéficos do consumo das bebidas derivadas da erva mate foram demonstrados em diversos estudos experimentais, e envolvem prevenção dos fatores de risco para doenças cardiovasculares, como inibição da progressão da aterosclerose (MOSIMANN *et al.,* 2005), ação hipocolesterolêmica (STEIN *et al.,* 2005; GORGEN *et al.,* 2005) e atividade vasodilatadora (BAISH *et al*., 1998).

Além de proteção contra as doenças cardiovasculares, outras pesquisas *in vitro* e *in vivo* demonstraram efeitos contra o diabetes (LUNCEFORD e GUGLIUCCI, 2005; HEMMERLE *et al.,* 1997), melhora na digestão (GORZALCZANY *et al.,* 2001) e como coadjuvante no tratamento da obesidade (MARTINET *et al.,* 1999; ARÇARI *et al.,* 2009). De acordo com SCHINELLA *et al.,* (2000) a ingestão de mate pode ser um meio econômico e efetivo de melhorar o sistema protetor antioxidante ao ajudar o organismo a combater o estresse oxidativo.

Na tabela 1 estão destacados alguns dos principais estudos sobre os efeitos benéficos da erva mate.

Tabela 1: Resumo de trabalhos sobre os efeitos já estudados da erva mate

Amostra	Metodologia analítica	Resultados	Referência
In vitro	Produção de TBARS	Inibiu oxidação da LDL	Gugliucci e Stahl (1995)
In vivo – plasma humano (indivíduos saudáveis)	Produção de TBARS	Inibiu oxidação da LDL	Gugliucci (1996)
In vitro - Lipossomos	Produção de TBARS	Inibiu oxidação da LDL	Filip *et al*. (2000)
In vivo – Fígado e hemácias de ratos	Indução da peroxidação lipídica, peroxidação da membrana do eritrócito e geração de radicais livres	Inibiu oxidação da LDL, propriedade de seqüestro de radicais livres	Schinella *et al*. (2000)
In vivo- Plasma humano	Produção de TBARS, formação de dienos conjugados e fenólicos totais	Inibiu oxidação da LDL	Gugluicci e Menini (2002)
In vivo – Saccharomyces cerevisiae e plasma humano	Determinação de lesões nas fitas de DNA (TAFE), produção de TBARS, formação de dienos conjugados e capacidade de seqüestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil),	Reduz dano ao DNA, inibiu oxidação da LDL	Bracesco *et al*. (2003)
In vitro – células HepG2 e *Saccharomyces cerevisiae*	Citotoxicidade, TPA-induced ornithine decarboxilase, atividades da quinona-redutase e topoisomerase	Atividade citotóxica, inibiu atividade da topoisomerase	Ramirez-Mares *et al*. (2004)
In vitro – células hepáticas de roedores	Atividade antioxidante (ORAC) e atividade da quinona-redutase	Atividades antioxidante e quimioprotetora	Chandra e Mejia 2004
In vitro –macrófagos RAW264.7 de roedores	Capacidade de seqüestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil), nitração de BSA, e citotoxicidade de LDH	Inibiu da nitração de proteínas e efeitos citoprotetores	Bixby *et al*. 2005
In vivo - Coelhos	Perfil lipídico, produção de TBARS e enzimas antioxidantes	Reduziu lesão aterosclerótica	Mosimann *et al*. 2006
In vitro	Atividade antioxidante (tiocianato férrico)	Atividade antioxidante	Bastos *et al.,* 2006

Amostra	Metodologia analítica	Resultados	Referência
Ex-vivo – Glândula submandibular de *Wistar*	Secreção da peroxidase	Prevenção de patologias orais e potencial ação quimioprotetora da cavidade oral	Filip *et al*. 2007
In vitro	Capacidade de seqüestrar o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)	Atividade antioxidante	Bastos *et al.,* 2007b
In vivo – ratos *Wistar*	Glicemia e insulinemia, atividade de glicose-6-fosfatase e expressão gênica de SGLT1	Inibiu expressão gênica de SGLT1	Oliveira *et al.,* 2008
In vivo – indivíduos saudáveis	Oxidação da LDL e plasma, agregação plaquetária e coagulação sanguínea	Inibiu oxidação da LDL, não inibe agregação plaquetária ou cogulação sanguínea	Silva *et al.,* 2008
In vivo - camundongos	Dano ao DNA de células do fígado, rins e bexiga induzido por H2O2	Ausência de efeito genotóxico e aumentou da resistência e reparo do DNA	Miranda *et al.,* 2008
In vivo – mulheres saudáveis	Produção de TBARS e formação de dienos conjugados, perfil antioxidante do plasma (TAS), expressão gênica de enzimas antioxidantes	Inibibiu oxidação da LDL, melhorou a capacidade antioxidante plasmática e aumentou a expressão de genes de enzimas antioxidantes	Matsumoto *et al.,* 2009
In vivo - camundongos	Produção de TBARS nos rins e fígado, composição de ácidos graxos nos tecidos	Aumentou concentração de MUFA e PUFA e inibiu produção de TBARS	Martins *et al.,* 2009

Em estudo recente realizado por OLIVEIRA *et al.,* (2008), com ratos *Wistar* induzidos ao diabetes por aloxana verificou-se que o extrato de erva mate verde solúvel reduziu significativamente a expressão gênica do transportador de glicose no intestino (SGLT1), indicando que os compostos bioativos da erva mate são capazes de reduzir a absorção de glicose.

Estudos epidemiológicos correlacionam o elevado consumo de flavonóides com baixa incidência de doença cardíaca coronariana (GELEIJNSE *et al.,* 1999; HERTOG *et al.,* 1995). Porém, resultados controversos de estudos *in vivo* mostraram aumento da mortalidade por esse tipo de doença em homens consumidores de chá, provavelmente devido à adição de leite na bebida, diminuindo a absorção de flavonóides ou devido a outros fatores de confusão não identificados (SERAFINI *et al.,* 1996; HERTOG *et al.,* 1997).

Muitos autores identificaram na erva mate e seus derivados, as xantinas (cafeínas e teobrominas) (ATHAYDE *et al.,* 2000), os compostos fenólicos, como ácidos clorogênicos e o ácido caféico (MAZZAFERA, 1997; CARINI *et al.,* 1998, FILIP *et al.,* 2001, BASTOS e TORRES, 2003; CHANDRA e MEJIA, 2004) e as saponinas (GNOATTO *et al.,* 2005) aos quais foram atribuídos os efeitos benéficos acima citados. Além disso, os autores MALIK *et al.,* (2008) verificaram que a erva mate verde é uma importante fonte de minerais, contendo altas concentrações de B, Ca, Cu, Mg, Mn e Zn.

As bebidas derivadas da erva mate são ricas em compostos fenólicos antioxidantes (BASTOS *et al.,* 2005; BASTOS *et al.,* 2006) e vários estudos recentes mostram o seu potencial como coadjuvante da manutenção de saúde (tabela 1).

A partir de uma pesquisa bibliográfica realizada nas principais bases de dados científicas foi verificado a que o número de trabalhos com informações sobre o chá mate é pequeno quando comparado à erva mate verde, chimarrão, tererê e principalmente aos chás verde ou preto (*Camelia sinensis*).

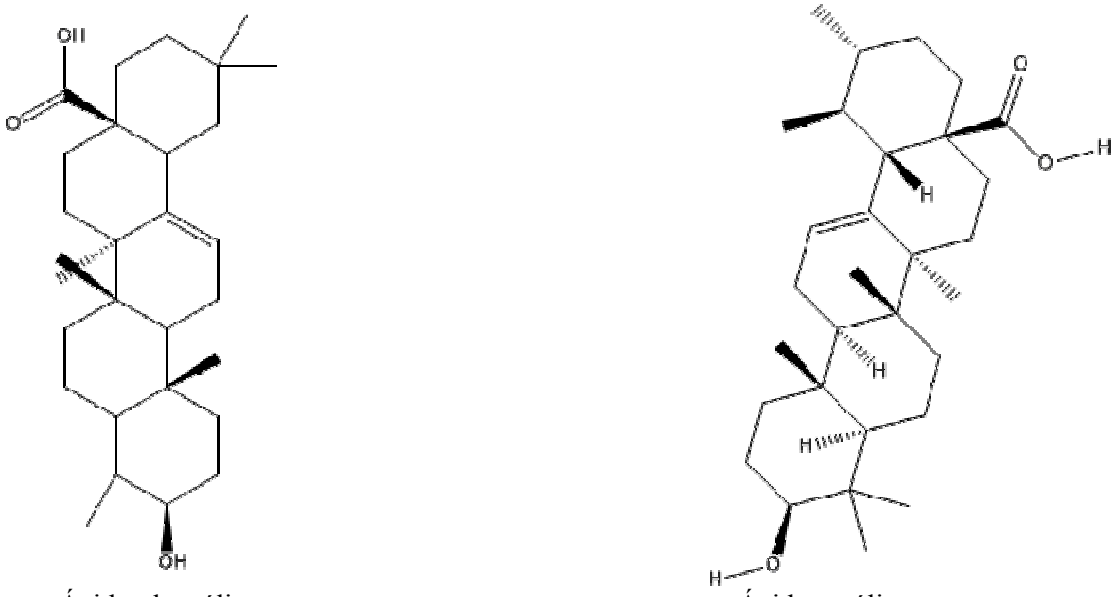
O *United States Department of Agriculture* (USDA, 2003) elaborou uma base de dados do conteúdo de flavonóides em diversos alimentos, mas não há dados para os polifenóis e saponinas. Informações sobre o conteúdo de compostos bioativos nas

bebidas derivadas da erva mate são de grande importância em estudos epidemiológicos para que se possa quantificar a ingestão de seus compostos bioativos em populações consumidoras de chá mate, chimarrão e tererê, a fim de avaliar o impacto do seu consumo na saúde humana.

2.3.1 Substâncias bioativas da erva mate

2.3.1.1. Saponinas

As saponinas fazem parte de um grupo de compostos amplamente distribuídos nas plantas, caracterizadas pela presença de uma aglicona triterpenóide ou esteroidal e uma ou mais cadeias glicosídicas. São altamente solúveis em água, propriedade que confere às bebidas à base de erva mate o gosto amargo e a formação de espuma (SPARG *et al.,* 2004). A porção aglicona das saponinas da erva mate é composta por dois triterpenóides, os ácidos ursólico e oleanólico (Figura 2). Essas substâncias são responsáveis pela estabilização de membranas e formação de grandes micelas mistas com esteróides e ácidos biliares (GOSMANN e SCHENKEL, 1989).



Ácido oleanólico Ácido ursólico

Figura 2: Estrutura molecular dos ácidos ursólico e oleanólico. **Fonte:** BASTOS *et al.,* (2007a)

Em uma revisão feita por SPARG *et al.,* (2004) outras atividades biológicas das saponinas foram verificadas, como atividade hipocolesterolêmica, anti-hemolítica, anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antimicrobiana, antiparasítica, antitumoral e atividade antiviral.

LIU (1995) publicou em uma revisão estudos sobre o efeito farmacológico dos ácidos oleanólico e ursólico. Esses compostos apresentaram efeito hepatoprotetor em ratos com lesão hepática induzida. Os ácidos ursólico e oleanólico das saponinas apresentaram ainda efeito anti-inflamatório, anti-arritmico, anti-tumoral e propriedades estabilizantes em membranas.

Em um ensaio com ratos hipercolesterolemizados, MATSUI *et al.,* (2006) verificaram que o extrato livre de catequinas (rico em saponinas e cafeína) de chá verde (*Camelia sinensis*) tem efeito hipocolesterolemizante e aumenta a excreção de colesterol nas fezes. Os autores atribuíram este último efeito às saponinas, uma vez que a cafeína foi referida como hipercolesterolemizante em outros estudos.

Estudos que tiveram como objetivo desvendar os mecanismos de atuação das saponinas na redução do colesterol verificaram que por meio da inibição da lipase pancreática as saponinas atuam positivamente no metabolismo e absorção de colesterol e gorduras (HOSTETTMANN e MARSTON, 1995 e HAN *et al.,* 2002). A formação de grandes micelas com os ácidos biliares, não reabsorvidas pelo intestino delgado, é outro mecanismo de redução do colesterol pelas saponinas. Essas micelas são eliminadas nas fezes, tornando necessária a síntese de ácidos biliares a partir do colesterol plasmático (SIDHU e OAKENFULL, 1986).

2.3.1.3. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são substâncias naturalmente presentes na maioria dos vegetais e são, portanto, parte da dieta humana. Englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO *et al.,* 1998), aparecem nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídios) e proteínas (CROFT *et al.,* 1998). São

formados por anéis aromáticos ligados à um ou mais grupo hidroxila, subdivididos em grupos pelo número de anéis (HAN *et al.,* 2007):

1) Ácidos fenólicos com as subclasses derivadas do ácido hidroxibenzóico como o ácido gálico e do ácido hidroxicinâmico, contendo caféico, ferrúlico e cumárico;

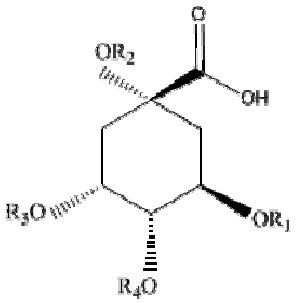
2) Flavonóides que incluem os flavonóis, as flavonas, as isoflavonas, as flavanonas, as antocianidinas e flavanóis;

3) Estilbenos;

4) Lignanas e ligninas poliméricas;

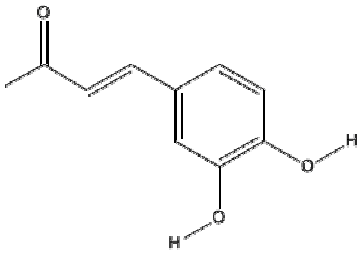
Os ácidos fenólicos estão subdivididos em dois grupos, a saber: derivados do ácido hidroxicinâmico e derivados do ácido hidroxibenzóico. Os derivados do ácido hidroxicinâmico são a principal classe desses compostos, possuem um anel aromático com uma cadeia carbônica, constituída por 3 carbonos ligada ao anel. Os ácidos p-cumárico, ferúlico, caféico e sináptico são os mais comuns na natureza. Estes ácidos existem nas plantas, usualmente na forma de ésteres, a exemplo dos ácidos clorogênicos, formados pela esterificação do ácido quínico com um desses derivados (DEGÁSPARI E WASZCZYNSKYJ, 2004).

Os ácido 5-O-cafeoilquínico (ácido quínico esterificado ao ácido caféico) é o mais relatado desta classe de compostos, sendo também o mais abundante na erva mate (CLIFFORD, 2000; CARINI *et al.,* 1998; BASTOS *et al.,* 2007a). Na figura 3 está a estrutura molecular dos ácidos clorogênicos.



Derivados do ácido dicafeoilquínico
$R^1 = R^4 = H$; $R^2 = R^3$ = cafeoil
$R^1 = R^2 = H$; $R^3 = R^4$ = cefeoil
$R^1 = R^3 = H$; $R^2 = R^4$ = cefeoil
$R^2 = R^3 = H$; $R^1 = R^4$ = cefeoil

Cafeoil=



Derivados do ácido cafeoilquínico
$R^2 = R^3 = R^4 = H$; R^1 = cafeoil (ácido clorogênico)
$R^1 = R^3 = R^4 = H$; R^2 = cafeoil (ácido neo-clorogênico)
$R^1 = R^2 = R^4 = H$; R^3 = cafeoil (ácido cripto-clorogênico)

Figura 3: Estrutura molecular dos principais compostos fenólicos da erva mate. **Fonte:** BASTOS *et al*. (2007a)

Segundo estudos realizados em humanos os ácidos clorogênicos são absorvidos pelo intestino após a metabolização por bactérias, (OLTOFF *et al.,* 2000 e 2003). Em um trabalho recentemente publicado, MARQUES e FARAH (2009) avaliaram a composição de ácidos clorogênicos de 14 plantas secas medicinais encontrando a maior concentração na erva mate verde, seguida da tostada.

De acordo com LIMA e MELO (2004), a erva mate verde tem grande quantidade de fenólicos (98,15 mg/g, enquanto *o Peumus boldus* – boldo-do-Chile apresenta 65,96 mg/g). Em uma comparação entre chá verde, vinho tinto e erva mate verde, BIXBY *et al.,* (2005) encontraram a maior concentração de polifenóis e melhor atividade antioxidante na erva mate. BASTOS *et al.,* (2006) ao compararem as capacidades antioxidantes da erva mate e do chá mate pelo método do ferrotiocianato não observaram diferença significativa.

Em estudo recente demonstrou-se que o ácido clorogênico (5CQA), em concentrações iguais às relatadas em seres humanos, inibe a inativação da paraoxonase-1 (PON-1), enzima provavelmente envolvida no mecanismo de proteção da HDL sobre a oxidação da LDL (GUGLIUCCI e BASTOS, 2009).

A maioria dos efeitos benéficos da erva mate são atribuídos aos compostos fenólicos presentes, a quantidade dessas substâncias na erva ou em suas bebidas pode variar consideravelmente devido a inúmeros fatores, como técnicas agrícolas, processamento, local e época de colheita e meio de preparo (BASTOS *et al.,* 2007a).

Algumas atividades biológicas já observadas foram: propriedade quelante de metal de transição (CARINI *et al.,* 1998), sequestro de radicais livres (RICE-EVANS, 1996), inibição da oxidação da LDL colesterol (SALAH *et al.,* 2005, VINSON *et al.,* 1995) e a melhora de parâmetros do diabetes mellitus tipo 2 em humanos atribuída aos ácidos fenólicos (JOHNSTON *et al.,* 2003 e 2004). Resultados de outros estudos sobre a atividade biológica da erva mate foram reunidos na tabela 1, no item 2.2 deste capítulo.

2.3.1.4. Melaninas

As melaninas são pigmentos escuros de elevado peso molecular formados pela oxidação ou polimerização dos polifenóis (COULTATE, 2004), responsáveis pela coloração de plantas, frutos, animais, flores, pele ou cabelo humanos.

As melaninas naturais de animais e plantas apresentam diversos papéis biológicos, como o efeito imunoestimulador, conforme verificado por SAVA *et al.,* (2001), ao estudarem melaninas isoladas do chá preto. HUNG *et al.,* (2006) observaram que as melaninas do chá preto possuem efeito antioxidante em ratos induzidos à oxidação. Segundo HALDER *et al.,* (1998) a formação das melaninas ocorre provavelmente devido à abundância de polifenóis presentes e enzimas específicas, como a polifenoloxidase. A erva mate, como a maioria dos vegetais possui a enzima, e, portanto pode formar melaninas.

2.3.1.5. Xantinas

A cafeína, a teofilina e a teobromina (figura 4) são alcalóides purínicos presentes na erva mate. Dentre esses compostos a cafeína é o mais abundante e está relacionada com

os efeitos estimulantes no sistema nervoso central (SNC), com funções musculares, cardíacas e renais. O efeito no SNC melhora as funções psíquicas e cerebrais, e consequentemente melhora a vigilância e atividades mentais (BOKUCAHA e SKOBELEVA, 1980).

Alguns autores indicam que a principal fonte de cafeína entre os adultos é o café (BARONE e ROBERTS, 1996; MANDEL, 2002). Porém, esses estudos não levam em consideração o consumo de bebidas da erva mate. Talvez não seja incorreto afirmar que uma das principais fontes de cafeína de algumas regiões da América do Sul seja a erva mate.

BASTOS *et al.,* (2005), ao analisarem o teor de cafeína em diferentes marcas de chá-mate comercializados em São Paulo verificaram que há uma grande variação do teor deste composto bioativo entre diferentes marcas e entre os lotes de uma mesma marca.

Cafeína Teobromina

Figura 4: Estrutura molecular dos alcalóides purínicos da erva mate. **Fonte:** BASTOS *et al.,* (2007a)

2.4. Validação dos métodos

O termo validação possui diversas definições na literatura, por não se tratar de um termo específico. De acordo com o INMETRO (2007), a EAL (1997), EC (2002) e ISO (2005), validação é a comprovação, pelo fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso pretendido foram atendidos. Segundo Horwitz

(2003), validação é o processo de verificação ou demonstração de certeza ou correção (*correctness*).

Medidas analíticas são realizadas todos os dias em milhões de laboratórios pelo mundo. As razões para se fazer essas medidas são inúmeras, incluindo desde checar a qualidade de alimentos e bebidas para fins de consumo e comércio até analisar fluidos biológicos presentes em cenas de crimes. A partir dos resultados de análises como estas, decisões serão tomadas, gerando aplicação de mais recursos financeiros, multas e/ou punições. A importância da validação está na responsabilidade do resultado da análise ser correto para evitar uma aplicação injusta ou inapropriada do recurso ou punição (INMETRO, 2007).

De acordo com BRUCE *et al.,* (1998), o processo de validação pode ser dividido nas etapas de desenvolvimento, otimização, validação, aplicação e revalidação do método, e a passagem de uma etapa para outra acontece suavemente. Entretanto, outros pesquisadores consideram a separação das etapas do processo analítico algo fora da realidade (GREEN, 1996; HUBER, 1998; EURACHEM, 1998). Em resumo, esses autores consideram que a validação do método está intimamente ligada ao desenvolvimento, isto porque muitos parâmetros associados à validação são normalmente avaliados durante o desenvolvimento.

Existem diversas formas que um método pode ser desenvolvido, desde a partir de um método já existente, envolvendo adaptações, até a partir de um delineamento experimental para a criação de um novo método. Esta última forma é mais trabalhosa e parte também de uma dúvida inicial a respeito do sucesso do método desenvolvido (EURACHEM, 1998). Segundo WOOD (1999) em ambos os casos o método deve ser validado.

Segundo o INMETRO (2007), a validação compreende diversos parâmetros:

- Especificidade e Seletividade
- Linearidade
- Faixa de trabalho e Faixa linear de trabalho
- Sensibilidade

- Limite de detecção
- Limite de quantificação
- Exatidão e tendência (*bias*)
- Precisão
- Robustez
- Incerteza de medição

Um método pode ser validado intralaboratorialmente ou interlaboratorialmente. No próprio laboratório, a validação pode ser feita por teste de recuperação e por utilização de uma ou duas das opções apresentadas: por meio da comparação com um método independente ou com o uso de um material de referência certificado. Interlaboratorialmente, a validação pode ser realizada por meio de um estudo colaborativo, envolvendo 2 ou mais laboratórios (SOARES, 2001).

Cabe ao laboratório decidir quais parâmetros de validação serão avaliados, de acordo com a necessidade. A validação de um método tem um elevado custo e requer tempo para ser concluída (EURACHEM, 1998).

Existem diversas definições e métodos para a validação de um procedimento, para este trabalho o documento de "Orientação sobre validação de métodos e ensaios químicos" do INMETRO foi tomado como guia para a execução do trabalho. No quadro 1 estão as definições e os métodos para obtenção dos parâmetros de validação, segundo o documento do INMETRO (2007).

Quadro 1. Parâmetros de desempenho, respectivas definições e método para obtenção apresentadas por INMETRO (2007)

Parâmetro de desempenho	Definição	Método para obtenção do parâmetro*
Linearidade	Habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração	Por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. O coeficiente de determinação (r^2) é utilizado para indicar a adequação da reta
Faixa de trabalho/ Faixa linear de trabalho	Faixa de trabalho é a faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. Faixa linear de trabalho é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio	O limite superior da faixa de trabalho pode ser expresso como o valor mais elevado de concentração da curva analítica, e, o limite mais baixo é o limite de quantificação. A faixa linear de trabalho pode ser representada pelo intervalo de concentração da curva analítica preparada.
Sensibilidade	Parâmetro que demonstra a variação da resposta em função da concentração do analito. Depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada	Pode ser expresso pela inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinado simultaneamente aos testes de linearidade
Seletividade/ Especificidade	Parâmetros relacionados ao evento da detecção. Um método específico produz resposta para apena um analito. Um método seletivo produz respostas para vários analitos, mas pode distinguir a resposta de um analito da de outros.	Para verificação da especificidade de técnicas cromatográficas, além das comparações visuais dos cromatogramas, calcula-se a resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos. Para verificação da seletividade preparam-se amostras testes com a mesma concentração do analito, uma com a matriz sem o analito e outra sem a matriz. Os resultados obtidos são testados estatisticamente, se forem diferentes indica que a matriz afeta o ensaio. Com detector de arranjo de diodos a verificação da seletividade pode ser feita pela comparação do espectro de absorção do pico obtido com o de um padrão puro, e pelo cálculo da pureza dos picos

Exatidão e tendência (*bias*)	Concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência)	Pode ser expresso pelo cálculo do erro relativo (%) do resultado obtido no laboratório e do certificado do material de referência
Precisão	Dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas. É normalmente determinada para circunstâncias específicas de medição.	As duas formas mais comuns de expressar são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão
Repetitividade	Grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo mensurando, efetuada sob as mesmas condições de medição: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo.	Expressa quantitativamente em termos de característica de dispersão dos resultados, pelo cálculo do desvio padrão dos resultados das concentrações obtidas de uma mesma amostra adicionada de um padrão.
Precisão Intermediária	Precisão sob condições de reprodutibilidade em que os resultados dos ensaios são obtidos com o mesmo método, variando-se laboratórios, operador ou equipamentos. Precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos e diferentes tempos	As duas formas mais comuns de expressar são por meio da repetitividade e a reprodutibilidade, sendo usualmente expressa pelo desvio padrão
Reprodutibilidade	Grau de concordância entre os resultados de medições de um mesmo mensurando, efetuadas sob condições variadas de medição (comparação entre resultados obtidos em dois ou mais laboratórios)	Expressa quantitativamente em termos de característica de dispersão dos resultados, pelo cálculo do desvio padrão dos resultados obtidos de uma mesma amostra nos laboratórios participantes
Recuperação	Relação entre o valor observado e o valor esperado de uma medição	Adicionam-se concentrações conhecidas de padrão à matriz com ou sem o analito, realiza-se todos os procedimentos até a obtenção dos resultados (essa amostra deve sofrer as mesmas condições que as

		demais amostras analisadas). Expresso como porcentagem de recuperação.
Limite de detecção	Limite de detecção do equipamento é a concentração do analito que produz um sinal de 3 a 5 vezes a razão ruído/sinal do equipamento. Limite de detecção do método é a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. Este valor é determinado por meio de análise completa de uma dada matriz contendo o analito.	Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 3 desvios-padrão. Ou corresponde a 3 vezes o desvio padrão dos resultados obtidos do padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco)
Limite de quantificação/ determinação	Menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de exatidão e precisão.	Pode ser considerado como sendo a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios-padrão. Ou corresponde a 10 vezes o desvio padrão dos resultados obtidos do padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco)
Robustez	Mede a sensibilidade que o método apresenta face a pequenas variações	Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*.

* para obtenção da validação o número de replicatas deve ser $\geq$ 7.

2.5. Métodos de avaliação da atividade biológica *in vitro*

Há um grande interesse no estudo da atividade biológica dos alimentos, principalmente daqueles que têm potencial protetor à saúde, prevenindo a formação ou ação deletéria dos radicais livres no corpo humano, ou que previnem a oxidação lipídica ou de outros constituintes dos alimentos. Paralelo a esse crescente interesse pelos antioxidantes, está o aumento do uso de métodos para avaliar a eficiência das substâncias em proteger a oxidação (MOLYNEUX, 2004).

Os testes de atividade antioxidante em alimentos e sistemas biológicos podem ser divididos em dois grupos. Aqueles usados para avaliar a peroxidação lipídica, em que um substrato lipídico ou uma lipoproteína em condições padrão são usados e o grau de inibição da oxidação é medido (sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico, determinação de malonaldeído, formação do ácido tio-barbitúrico etc). E aqueles usados para medir a capacidade de sequestrar radicais livres (capacidade de seqüestrar o radical DPPH, teste da capacidade antioxidante do radical oxigênio - ORAC, poder redutor do íon ferro/ ensaio do poder antioxidante - FRAP) (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; MOON *et al.,* 2009). Segundo OU *et al.,* (2001) não é possível medir a atividade antioxidante total usando apenas um método.

Uma busca no portal de literatura científica ISI *Web of knowledge,* com as palavras-chave *antioxidant activity* (atividade antioxidante em inglês), excluindo as patentes, apenas com artigos publicados em 2009, resultou 1704 documentos, ao fazer a mesma busca para o ano de 2008, apareceram 4694 trabalhos. Isso demonstra a relevância do assunto e o interesse para o público em geral, comunidade médica, especialistas em nutrição e cientistas e pesquisadores de alimentos e em saúde em saber a capacidade antioxidante dos alimentos que consumimos.

Foi demonstrado que alimentos que contêm saponinas e saponinas isoladas de alimentos podem reduzir a concentração de colesterol plasmático *in vivo* (MALINOW *et al.,* 1981; KOZUHAROV *et al.,* 1986).

No presente trabalho, foram utilizados quatro métodos de avaliação da biológica *in vitro:* um que avalia a peroxidação lipídica, dois que avaliam a capacidade de seqüestrar radicais livres e a avaliação da atividade ligante de ácidos biliares.

Os itens a seguir são pequenos resumos dos métodos utilizados no presente estudo para a avaliação da atividade biológica do chá mate e frações isoladas.

2.5.1. Teste de capacidade antioxidante do radical oxigênio - ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Activity*)

Esse método foi originalmente desenvolvido por CAO *et al., (*1993), utilizando a β-ficoeritrina (β-PE, uma proteína fluorescente) como indicador para avaliar a atividade antioxidante de sangue. No ensaio, o decaimento da fluorescência (FL) do β-PE frente ao gerador de radicais livres AAPH (2,2′-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorida, é medido ao longo do tempo, utilizando como padrão antioxidante o Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) análogo hidrossolúvel da vitamina E.

O método não mede apenas a capacidade do antioxidante em seqüestrar os radicais livres, mas leva em consideração o tempo de inibição da oxidação (TABART *et al.,* 2009).

OU *et al.,* (2001) descobriram que a proteína utilizada como indicador apresentava desvantagens como grande variação de FL entre lotes, sensibilidade em leitor de placas, e as proteínas interagem com os polifenóis, perdendo FL mesmo sem a adição do gerador de radicais livres. Para resolver esse problema os autores substituíram a proteína β-PE por fluoresceína (3′,6′-dihidroxispiro[isobenzofurano-1[3*H*], 9′[9*H*]-xantina]-3-ona), um indicador fluorescente não-protéico que supera as limitações do β-PE. O método foi validado intra-laboratorialmente e reconhecido pela indústria, sendo o atual método de escolha para quantificar a capacidade de seqüestrar o radical peroxila de uma amostra (OU *et al.,* 2001).

2.5.2. Capacidade de seqüestrar o radical DPPH

Introduzido há aproximadamente 50 anos pelo pesquisador da Universidade de Stanford, Mardsen Blois em 1958 (MOLYNEUX, 2004), o método recentemente se tornou popular no estudo de antioxidantes naturais, devido à simplicidade e elevada sensibilidade (MOON *et al*., 2009).

O método consiste na reação entre a solução de compostos a serem testados com o radical estável DPPH (2,2-Difenil-picrilhidrazil) em solução metanólica. A redução do radical DPPH é monitorada pela redução da absorbância no comprimento de onda específico, quando em contato com uma substância que pode doar hidrogênio. Em seu estado estável, o radical DPPH tem absorbância máxima a 517nm, apresentando coloração violeta, mas na medida em que é reduzido por um antioxidante a absorbância diminui, e a solução se torna amarelo claro. O decaimento da absorbância é proporcional à concentração de DPPH estável restante no meio, em conformidade com a lei de Lambert-Beer (MOLYNEUX, 2003).

O meio de reação é mantido em temperatura ambiente durante todo o ensaio. No esquema abaixo está representada a reação, sendo $Z^{\cdot}$ o radical e AH o antioxidante que tem o hidrogênio:

$$Z^{\cdot} + AH = ZH + A^{\cdot}$$

Durante a reação os antioxidantes se transformam em radicais livres que reagem entre si terminando a reação:

$$A^{\cdot} + A^{\cdot} = A - A$$

2.5.3. Sistema de Oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico

Há muito tempo se sabe que o β-caroteno reage com o radical peroxila produzindo epóxidos, portanto ele foi estudado como antioxidante ou sequestrante de radicais. Mais tarde, um ensaio utilizando-o em conjunto com lipídeos, como o ácido

linoléico, foi desenvolvido (MARCO, 1968). Este método foi modficado por MILLER em 1971, tornando-o mais simples e funcional.

O método se baseia na seguinte reação: na presença de ROS e O_2 os lipídeos formam o radical peroxila ($LOO^{\cdot}$), na solução, o radical reage com o β-caroteno, formando um radical estável, diminuindo a quantidade de β-caroteno. Se um antioxidante é adicionado no meio, este reage competitivamente com o radical, inibindo consequentemente a reação do último com o β-caroteno. Logo, o efeito antioxidante é medido, monitorando a velocidade de decaimento da absorbância a 470nm, comprimento de onda típico do β-caroteno (TSUCHIHASHI *et al.,* 1995; MOON *et al*. 2009)

2.5.4. Atividade ligante de ácidos biliares

A atividade ligante de ácidos biliares *in vitro* é um método utilizado para verificar o potencial hipocolesterolemizante de alimentos, pois esse é o mecanismo de redução do colesterol de fibras dietéticas, proteínas e saponinas.

Esse mecanismo foi estudado por SIDHU e OAKENFULL, (1986), que observaram a formação de micelas entre as saponinas isoladas da planta *Quillaia saponaria* e ácidos biliares no intestino. As micelas não são reabsorvidas pelo intestino, levando o organismo à síntese de ácidos biliares por meio da utilização do colesterol plasmático.

No ensaio, os ácidos biliares são conjugados primeiramente a ácidos-3-oxo-biliares em uma reação catalisada pela enzima 3 α-hidroxisteroide-desidrogenase (3α-HSD). Nesta reação de oxidação, uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH. Na continuação, o NADH é oxidado a NAD seguido da redução simultânea do NBT a formazan pela ação catalítca da diaforase. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração dos ácidos biliares na amostra.

2.6. Referências Bibliográficas

Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. Phytochemistry. 2000; 55: 853-857.

Abdalla DSP. Estresse oxidativo e alimentação. In: Tirapegui J. Nutrição – Fundamentos e aspectos atuais. 2ª Ed. São Paulo: Atheneu; 2006, p. 181- 197.

Arçari DP, Bartchewsky W, Santos TW, Oliveira KA, Funck A, Pedrazzoli J, Souza MFF, Saad MJ, Bastos BHM, Gambero A, Carvalho, PO, Ribeiro, ML. Antiobesity effects of yerba mate extract (*Ilex paraguariensis)* in High-fat diet-induced obese mice. Obesity, 2009. doi:10.1038/oby.2009.158

Baisch ALM, Johnston KB, Stein FLP. Endothelium-dependent vasorelaxing activity of aqueous extracts of Ilex paraguariensis on mesenteric arterial bed of rats. Journal of Ethnopharmacology. 1998; 60: 133-139.

Barone JJ, Roberts HR. Caffeine consumption. Food and Chemical Toxicology .1996; 34: 119-129.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté. Acta Farm. Bonaerense 2005; 24 (1): 95-5.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAFS. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (Ilex paraguariensis) Leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology 2006; 49 (3): 399-404.

Bastos DHM, Oliveira, DM, Matsumoto RLT, Oliveira PC, Ribeiro ML. Yerba mate: Pharmacological Properties Research ad Biotechnology. Med Arom Plant Sci Biotec. 2007a; 1(1) 37-46.

Bastos DHM, Saldanha LAS, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (Ilex paraguariensis) and green tea (Camelia sinensis) extracts. Molecules. 2007b; 12: 423-432.

Bastos DHM e Torres EAFS. Bebidas a base de erva mate (Ilex paraguariensis) e saúde pública. Nutrire: rev. Soc. Bras. Alim. Nutr., 2003; 26: 77-19.

BRASIL. Ministério da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não-transmissíveis : DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde brasileiro/ Brasil. Ministério da Saúde – Brasília : Organização Pan-Americana da Saúde, 2005.

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. Nutrition Reviews. 1998; 56: 317–333.

Bixby M, Spieler L, Menini T, Gugliucci A. Ilex paraguariensis extracts are potent inhibitors of nitrosative stress: A comparative study with green tea and wines using a protein nitration model and mammalian cell cytotoxicity. Life sciences. 2005; 77: 345-358.

Bokuchava MA, Skobeleva NI (1980) The biochemistry and technology of tea manufacture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 1980; 12: 303-307

Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtas S, Menini T, Gugliucci A, Nunes E. Antioxidant activity of a botanical extract preparation of *Ilex paraguariensis*: prevention of DNA double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* and human low-density lipoprotein oxidation. The J of Altern Complement Med 2003; 9: 379-387.

Bruce B, Minkkinen P, Riekkola ML. Practical method validation: validation sufficient for an analysis method. Mikrochim. Acta. 1998; 128: 93-106.

Carini M, Facino RM, Aldino G, Calloni M e Colombo L. Characterization of Phenolic Antioxidants from Maté (Ilex Paraguariensis) by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1998; 12: 1813-1819.

Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free rad. Biol. Med. 1993; 14(3): 303-311.

Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of Ardisia compressa in Comparison to Mate (Ilex paraguariensis) and Green (Camellia sinensis) Teas. Journal of Agriculture Food Chemistry. 2004; 52: 3583-3589.

Clifford MN. Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurence, dietary burden, absorption and metabolism. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000; 80: 1033-1043.

Coelho GC, Rachwal MFG, Dedecek RA, Curcio GR, Nietsche K, Schenkel EP. Effect of light intensity on methylxanthine contents of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. Biochem System Ecol 2007; 35: 75-80.

Coultate TP. Alimentos: a Química de seus Componentes. 3ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2004.

Croft KD. The chemistry and biological effects of flavonoidsand phenolic acids. Annals of the New York academic of Science. 1998; 854:435-442.

Degáspari CH, Waszczynsky JN. Propriedades antioxidants de compostos fenólicos. Visão Acadêmica. 2004; 5(1): 33-40.

EAL (European Cooperation for Acreditation of Laboratories). EAL-P11. Validation of test methods: general principles and concepts. Paris: EAL, 1997: 13p.

EC (European Commission). Commission directive number 1442/95. Official Journal of the European Communities, 1995, L 143:26-30.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: Cultivo da erva mate. Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Erva mate/CultivodaErvaMate/index.htm. Acesso em: 08 de dezembro de 2008.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods, a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington: LGC, 1998, 61p.

Evans DA, Hirsch JB, Dushenkov S. Phenolics, inflamation and nutrigenomics. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2006; 86: 2503-2509.

Ferrari CKB. Oxidação lipídica em alimentos e sistemas biológicos: mecanismos gerais e implicações nutricionais e patológicos. Rev Nutr Campinas 1998; 11(1): 3-14.

Ferrari CKB, Torres EAFS. Fatores físicos e bioquímicos da industrialização, preparo e armazenamento de alimentos e sua relação com radicais livres e a oxidação lipídica em alimentos. Hig Aliment 2000; 14(68/69): 19-25.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Ver Ass Med Brasil. 1997; 43(1): 61-8.

Filip R, López P, Gilberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. Fitoterapia. 2001; 72: 774-778.

Filip R, Sebastian T, Ferraro G, Anesini C. Effect of *Ilex* extracts and isolated compounds on peroxidase secretion of rat submandibulary glands. Food Chem Toxicol 2007; 45: 649-655.

Geleijnse JM, Lauber LJ, Hofman A, Pols HAP, Witteman JCM. Tea flavonoids may protect against atherosclerosis. The Rotterdam Study. Archives of International Medicine. 1999;159:2170–2174.

Gnoatto SC, Schenkel, EP, Bassani VL. HPLC Method to Assay in Ilex paraguariensis Aqueous Extract. J. Barz. Chem. Soc. 2005; 16 (4): 723-726.

Goldenberg MDD. Maté: a risk factor for oral and oropharyngeal cancer. Oral oncology. 2002; 38: 646-649.

Gorgen M, Turatti K, Medeiros AR, Buffon A, Bonan CD, Sarkis JJ, Pereira GS. Aqueous extract of *Ilex paraguariensis* decreases nucleotide hydrolysis in rat blood serum. Journal of Ethnopharmacology 2005; 97, 73-77

Gorzalczany S, Filip R, Alonso MR. Choleretic effect and intestinal propulsion of 'mate' (Ilex paraguariensis) and its substitutes or adulterants. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 75: 291-294.

Gosmann G, Schenkel EP. A new saponin from mate, Ilex paraguariensis. Journal of Natural Products. 1989; 52: 1367-1370.

Green JM. A practical guide to analytical method validation. Anal. Chem. 1996; 68: 305A-309A.

Gugliucci A. Antioxidant effects of Ilex paraguariensis: induction of decreased oxidability of human LDL in vivo. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996; 2: 338-344.

Gugliucci A, Menini T. Three different pathways for human LDL oxidation are inhibited *in vitro* by water extracts of the medicinal herb *Achyrocline satureoides*. Life Sci 2002; 71: 693-705.

Gugliucci A, Stahl AJ. Low-density lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of Ilex paraguariensis. Biochemistry and Molecular Biology International . 1995; 35: 47-56.

Gugliucci A, Bastos DHM. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. Fitoterapia. 2009; 80: 138-142.

Halder J, Tamuli P, Bhaduri AN. Isolation and characterization of polyphenol oxidase from Indian tea leaf (Camelia sinensis). Journal of Nutritional Biochemistry. 1998; 9: 75-80.

Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI. Free radicals and antioxidants in food and in vivo: what they do and how they work. Crit Rev Food Sci Nutr 1995; 35(172): 7-20.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in medicine and biology. 3ª ed. London; Claredon Press 2000; 543.

Han LK, Zheng YN, Xu B, Okuda H, KimuraY. Saponins from *Platycodi radix* ameliorate high fat diet-induced obesity in mice. Journal of Nutrition. 2002; 132: 2241-2245.

Han X, Shen T, Lou H. Dietary Polyphenols and Their Biological Significance. Int. J. Mol. Sci. 2007; 8: 950-988.

Hemmerle H, Burger HJ, Below P, Schubert G, Rippel R, Schindler PW, Paulus E, Herling AW. Chlorogenic acid and synthetic chlorogenic acid derivatives: novel inhibitors of hepatic glucose-6-phosphate translocase. Journal of Medicinal Chemistry.1997; 17: 137-145.

Heinrichs R, Malavolta E. Composição mineral do produto comercial da erva mate (Iliex paraguariensis St. Hil.). Ciência rural 2001;31 (5): 781-785.

Hertog MGL, Kromhout D, Aravanis C, et al. Flavonoid intake and long-term risk of coronary heart disease and cancer in the Seven Countries Study. Arch Intern Med 1995:155:381-6.

Hertog MGL, Sweetnam PM, Fehilv AM, Elwood PC, Kromhout D. Antioxidant flavonols and ischemic heart disease in a Welsh population of men: the Caerphilly Study. The American Journal of Clinical Nutrition. 1997; 65: 1489-94.

Hostettmann KK, Marston AA. Saponins. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 1995.

Hoog N, Darley-Usmar VM, Wilson MT, Moncada S. Production of hydroxyl radicals from the simultaneous generation of superoxide and nitric oxide. Biochem J 1992; 281: 419-24.

Huber L. Validation of analytical methods: review and satrategy. LC/GC Int. 1998: 96-105.

Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. J. Natl. Cancer Inst. 2004; 96: 1577–1584.

Hung YC, Huang GS, Sava VM, Bagodarsky VA, Hong MY. Protective Effects of Tea Melanin against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity: Antioxidant Activity and Aryl Hydrocarbon Receptor Suppressive Effect. Biol. Pharm. Bull. 2006; 29(11): 2284—2291.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 1841-1856.

IBGE - Brasil (2005) Produção da extração vegetal e da silvicultura – 2005. Disponível na internet: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/pevs/2005/default.shtm

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 35p.

ISO (International Standard Organization). ISO/IEC 17025. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. Geneva: ISO, 2005. 28p

Johnston K, Sharp P, Clifford M, Morgan L. Dietary polyphenols decrease glucose uptake by human intestinal Caco-2 cells. FEBS Letters. 2004; 579: 1653-1657.

Johnston KL, Clifford MN, Morgan LM. Coffee acutely modifies gastrointestinal hormone secretion and glucose tolerance in humans: glycemic effects of chlorogenic acid and caffeine. The American Journal of Clinical Nutrition. 2003; 78: 728.

Kirk JR. Biological availability of nutrients in processed foods. J Chem Educ 1984; 61(4): 364-7. *in*: Ferrari CKB. Fatores bioquímicos e físicos pró e antioxidantes, relacionados à oxidação lipídica em alimentos. Higiene Alimentar. 2000; 14 (78/79): 37-44.

Kozuharov S, Oakenfull DG, Sidhu GS. Navy beans and navy bean saponins lower plasma cholesterol concentrations in rats. Proc Nutr Soc Aust 1986; 11: 162.

Levander, OA, Fontela, R, Morris, VC, Ager, AL, Jr. Protection against murine cerebral malaria by dietary-induced oxidative stress. J.Parasitol. 1995; 81: 99–103.

Lima ES, Abdalla DSP. Peroxidação lipídica:mecanismos e avaliação em amostras biológicas. Rev Bras CIên Farm. 2001; 37:294-303.

Lima VLAG, Melo EA. Nota Prévia: Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. Brazilian Journal of Food Technology. 2004; 7(2):187-190.

Liu J, Liu Y, Klaassen CD Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1995; 16: 97-102.

Loliger J. The use of antioxidant in food. In: Aruoma OI, Halliwell B. Free radicals and food additives. 1991; 121-50.

Lunceford N, Gugliucci A. Ilex paraguariensis extracts inhibit AGE formation more efficiently than green tea. Fitoterapia. 2005; 76: 419-427.

Malik J, Szakova J, Drabek O, Balik J, Kokoska L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. Food Chemistry. 2008; 111: 520–525.

Malinow MR, Connor WE, McLaughlin P, Stafford C, Lin DS, Livingston L, Kohler GO, McNulty WP. Cholesterol and bile acid balance in *Macaca fascicularis* 1981; 67:156-162.

Mandel HG. Update on caffeine consumption, disposition and action. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40: 1231-1234.

Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DHM, Carvalho PO. Consumption of mate tea (Ilex paraguariensis) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. British Journal of Nutrition . 2009; 101: 527–532.

Marco G I. A rapid method for evaluation of antioxidants. Journal of American Oil Chemistry Society. 1968; 45:594.

Marques V, Farah A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. Food Chemistry. 2009; 113: 1370–1376.

Martinet A, Hostettmann K, Schutz Y. Thermogenic effects of commercially available plant preparations aimed at treating human obesity. Phytomedicine. 1999; 6: 231–238.

Matsudo V, Matsudo S, Andrade D, Araujo T, Oliveira LCE, Braggion G. Promotion of physical activity in a developing country: The Agita São Paulo experience. Public Health Nutr. 2002; 5: 253-261.

Matsui Y, Kumagai H, Masuda H. Antihypercholesterolemic activity of catechin-free saponin-rich extract from green tea leaves. Food Science and Technology Research. 2006, 12 (1): 50-54.

Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effects of Maté Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. J. Agric. Food Chem. 2009; 57(5): 1775-1780.

Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. Food Chemistry. 1997; 60: 67-71.

Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1971; 48: 91.

Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (Ilex paraguariensis) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. Mutagenesis. 2008; 23(4): 261–265.

Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2004; 26(2): 211-219.

Mosimann ALP, Wilhelm-Filho D, Silva EL. Aqueous extract of Ilex paraguariensis attenuates the progression of atherosclerosis in aholesterol-fed rabbits. Bio Factors. 2005; 23: 9-20.

Moon JM, Shibamoto T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. J. Agric. Food Chem. 2009; 57 (5): 1655-1666.

Nawar WW. Lipids. In: Fennema OR (Ed) Food Chemistry. New York: Marcel Dekker, Inc. 1996; 49: 653-67.

Oliveira, DM, Freitas, H, Souza, MFF, Ribeiro, ML, Carvalho, PO, Araçatri, DP, Bastos, DHM. Yerba maté (Ilex paraguariensis) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56, 10527:10532.

Olthof MR, Hollman PCH, Katan MB. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorved in humans. Journal of Nutrition. 2000; 131: 66-71.

Olthof MR, Hollman PCH, Buijsman MCNP, Amelsvoort JMM, Katan MB. Chlorogenic acid, quercetin-3-rutinoside and black tea phenols are extensively metabolized in humans. The Journal of Nutrition. 2003; 133: 1806-1814.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. Saúde nas Américas: 2007. Publicação Científica e Técnica No. 622. Washington (DC); 2007.

OPAS/OMS – Organização Pan-Americana da Saúde/Organização Mundial da Saúde. A vigilância, o controle e a prevenção das doenças crônicas não transmissíveis: DCNT no contexto do Sistema Único de Saúde Brasileir. Brasília (DF); 2005.

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

Pinto J, Franco E L, Oliveira BV, Kowalski L P, Curado MP, Dewar R. Mate, coffe and tea comsumption and risk of cancers of the upper aerodigestive tract in southern Brazil. Epidemiology. 1994; 5(6): 583:90.

Prior R L, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca, Howard L, Hampsh-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, 51:3273-3279.

Ramirez-Mares MV, Chandra S, de Mejia EG. *In vitro* chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. Mut Res 2004; 554: 53-65.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. Free Radical Biology and Medicine. 1996; 20: 933-956.

Salah N, Miller NJ, Paganga G, Tijburg L, Bolwell GP, Rice-Evans C. Polyphenolic flavanols as scavengers of aqueous phase radicals and as chain-breaking antioxidants. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1995; 322: 339-346.

Sánchez-Moreno C. Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. Food Science and Technology International. 2002; 8: 121-137.

Sava VM, Yang SM, Hong MY, Yang PC, Huang GS. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. Food Chemistry. 2001; 73: 177 – 184.

Schinella GR, Troiani G, Davilla V, Buschiazzo PM, Tournier HA. Antioxidants effects of an aqueous extract of Ilex paraguariensis. Biochem. and Biophy. Res. Commun. 2000; 269: 357-360.

Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. European Journal Clinical Nutrition. 1996;50:28–32.

Shi J, Mazza G, Maguer ML (2002). Foods: biochemical and processing aspects. CRC, Boca Ratón V2.

Sies H, Wilhelm S, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. The Journal of Nutrition. 2005; 135:969-972.

Sidhu GS, Oakenfull DG. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. Br J Nutr 1986; 55: 643-649.

Silva EL, Neiva TJC, Shirai M, Terao J, Abdalla DSP. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. Food Res Int 2008; 41: 973-979.

Soares LMV. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. Rev. Inst. Adolfo Lutz. 2001; 60(1): 79-84.

Sparg SG, Lighat ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 94: 219-243.

Stein FLP, Schimidt B, Furlong EB. Vascular responses to extractable fractions of Ilex paragiuariensis in rats fed standard and high-chloesterol diets. Biological Research for Nursing. 2005; 7: 146-156.

Streit NM, Hecktheuer LHR, Canto MW, Mallmann CA, Streck L, Parodo TV, Canterle LP. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (Ilex paraguariensis). Food Chemistry. 2007; 102: 560-564.

Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne JO, Dommes J. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. Food Chem 2009; 113:1226–1233.

Tsuchihashi H, Kigoshi M, Iwatsuki M, Niki E. Action of b-Carotene as an Antioxidant against Lipid Peroxidation. Archives of biochemistry and biophysics. 1995; 323 (1):137-147.

USDA – United States Department of Agricultura. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods. March 2003. Maryland, United States of America.

Vinson JA, Jang J, Dabbagh YA, Serry MM, Cai S. Plant polyphenols exhibit lipoprotein-bound antioxidant activity using an in vitro oxidation model for heart disease. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1995; 43: 2798-2799.

WHO/FAO - World Health Organization/ Food and Agriculture Organization. Joint WHO/FAO Expert Consultation on Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases, 2002.

WHO - World Health Organization. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. Geneva; 2003.

WHO - World Health Organization. Action Plan for the Global Strategy for the Prevention ad Control of Noncommunicable Diseases. Geneva, 2008.

WHO – World Health Organization. World Health Statistics 2009. Geneva, 2009.

Willcox, Joye K., Ash, Sarah L. and Catignani, George L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease.,Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2004; 44:4,275 — 295.

Wood R. How to validate analytical methods. Trends Anal.Chem. 1999; 18:624-632.

Yu BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Physiol Rev. 1994; (74):139:162.

3. DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

O presente capítulo tem como objetivo apresentar a composição do chá mate, relativamente aos compostos bioativos, e verificar se há diferença entre as marcas de chá mate comercializadas no município de São Paulo em 2008. Foram determinados os sólidos solúveis por gravimetria, fenólicos totais por espectrofotometria e os compostos fenólicos, xantinas e sapogeninas por CLAE.

3.1. Introdução

O interesse nos mecasnismos de ação de substâncias antioxidantes frente à prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, e o papel dos antioxidantes da alimentação na prevenção de doenças tem despertado o interesse da comunidade científica por mais de 20 anos (HALLIWELL, 2000; WILLCOX *et al.,* 2004; SIES *et al.,* 2005; GUGLIUCCI e BASTOS, 2009; DUDONNÉ *et al.,* 2009). Uma ampla gama de compostos bioativos parece estar relacionada aos benefícios de dietas ricas em frutas e hortaliças. Esses compostos variam em estrutura química e, conseqüentemente, na função biológica. Entretanto eles apresentam algumas características em comum: pertencem a alimentos do reino vegetal, são substâncias orgânicas e geralmente de baixo peso molecular, nem sintetizados pelo organismo humano e apresentam ação protetora na saúde humana quando presentes na dieta em quantidades significativas (HORST e LAJOLO, 2007).

A erva mate é consumida há séculos, mas estudos científicos conduzidos com a planta são recentes, cerca de 2 décadas (HECK e MEJIA, 2007). Resultados de estudos sobre sua ação biológica parecem apoiar os populares efeitos terapêuticos da erva. Diversos compostos bioativos já foram encontrados na erva mate, aos quais foram atribuídos os efeitos biológicos apresentados (BASTOS *et al.,* 2007): compostos fenólicos, como os ácidos clorogênicos (CARINI *et al.,* 1998; BASTOS *et al.,* 2005 e 2006), saponinas (GOSMANN e SCHENKELL, 1989; GNOATTO, 2005),

metilxantinas, principalmente cafeína e teobromina (ATHAYDE *et al.,* 2000, GNOATTO *et al.,* 2007), além de minerais (MALIK *et al.,* 2008). A maioria desses estudos foi realizada apenas com a erva mate verde (seca e cancheada, usada para o chimarrão e tererê), e aparentemente não há estudos com dados de saponinas na erva mate tostada.

Este trabalho visa fornecer dados sobre o conteúdo de compostos bioativos no chá mate, a saber, compostos fenólicos totais, ácido clorogênico (5CQA), ácido caféico, sapogeninas (ácidos ursólico e oleanólico) e xantinas (cafeína e teobromina) e verificar se há diferença na concentração destes compostos entre marcas comercializadas em hipermercados da cidade de São Paulo no ano de 2008. Para tanto, as metodologias para determinação dos compostos bioativos por CLAE foram validadas de acordo com as recomendações do INMETRO e AOAC (INMETRO 2007; AOAC, 2002).

3.2. Materiais e métodos

3.2.1. Materiais

3.2.1.1. Solventes e reagentes

Os solventes e reagentes foram de grau analítico ou cromatográfico, dependendo da análise. Solventes e reagentes (P.A.) como: álcool etílico, álcool metílico, clorofórmio, acetato de etila, álcool butílico, ácido clorídrico foram adquiridos das empresas Casa Americana (CAAL) e Labsynth.

Os reagentes grau cromatográfico, acetonitrila, metanol, ácido acético, foram adquiridos da Carlos Erba Brasil (CER Brasil) e Sigma Aldrich.

Os padrões e reagentes 5-cqa (C3878), ácido caféico (C0625), teobromina (88304), cafeína (27600), ácido ursólico (89797), ácido oleanólico (O5504) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Alemanha).

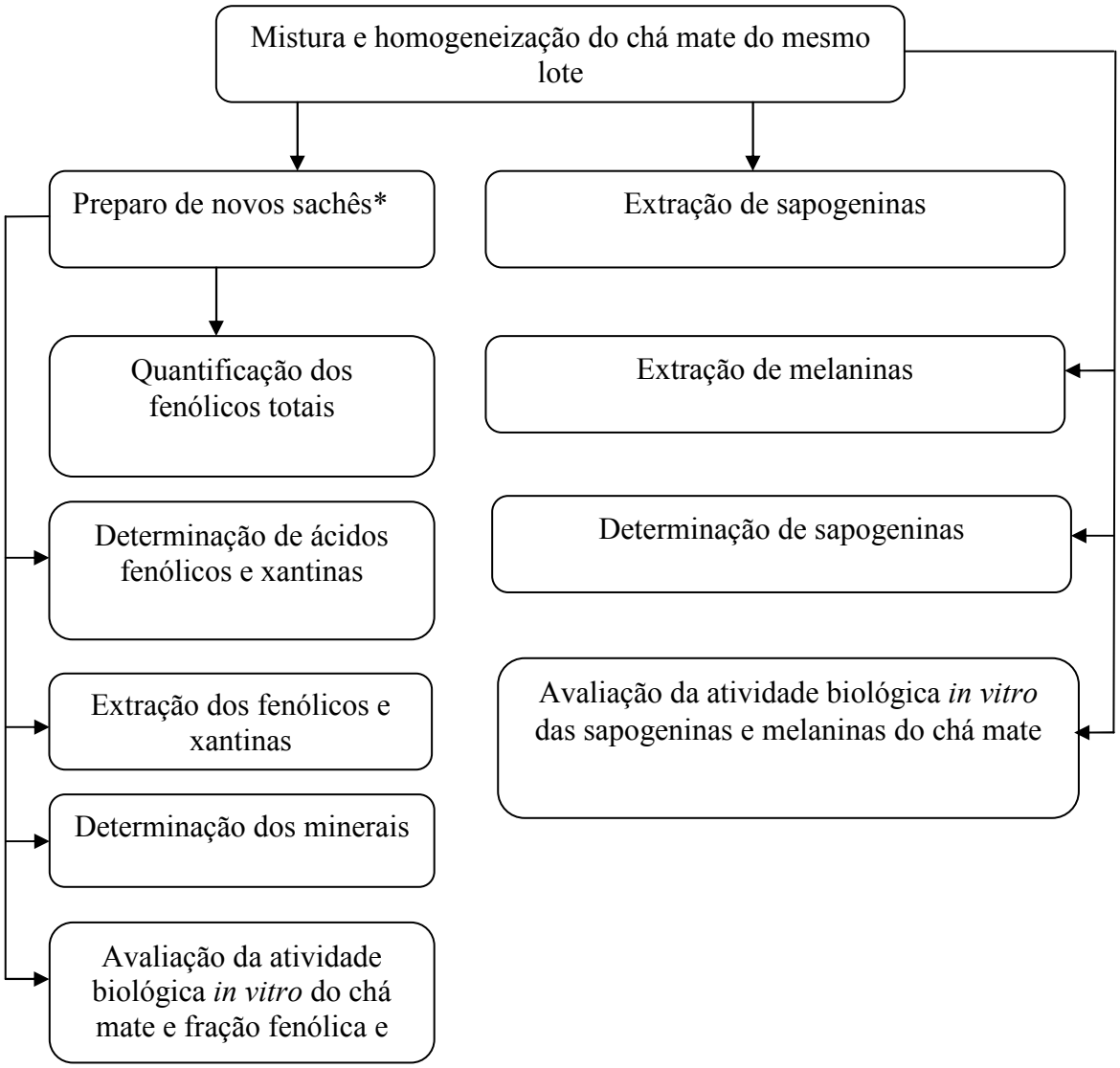
3.2.1.2. Amostras

A amostragem foi composta por três lotes de três diferentes marcas de chá mate em sachê comercializadas na cidade de São Paulo. As marcas escolhidas estavam presentes em 100% dos hipermercados visitados. Para este trabalho, as marcas foram denominadas X, Y e Z.

Segundo ASTILL *et al.,* (2001), além das condições de crescimento e manufatura da planta e do tamanho da partícula, o material do sachê e o método de preparo (quantidade de chá e água, tempo de infusão e agitação) são os principais determinantes da composição da infusão de chás. Portanto, a fim de eliminar interferências do material do sachê e do método de preparo, as amostras foram homogeneizadas, pesadas e embaladas em sachês do mesmo material, e o método de preparo do chá foi padronizado.

Para a determinação dos ácidos fenólicos, xantinas e determinação da atividade antioxidante por ORAC, sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico e capacidade de seqüestrar o radical DPPH, o conteúdo dos sachês individuais do mesmo lote e marca foi homogeneizado em um recipiente e embalado em novos sachês, os quais foram selados por termossoldagem. Cada novo sachê continha 1,6g de chá mate (mesma massa da embalagem original). Para a determinação de sapogeninas e isolamento das melaninas foi utilizada a erva a granel, sem a confecção de novos sachês.

O fluxograma de preparo das amostras encontra-se na Figura 5.



* após a abertura das caixas, as amostras foram armazenadas de 2 a 8ºC;

Figura 5: Fluxograma de utilização das amostras

3.2.2 Métodos

3.2.2.1. Preparação do chá mate

Para as análises de compostos fenólicos e xantinas, e avaliação da atividade biológica, o chá mate foi preparado em triplicata com a adição de 182,5mL (1 xícara de

chá) de água fervente (~97ºC) sobre o sachê por 5 minutos. Cada sachê foi agitado por 10 vezes com o auxílio de uma pinça no início e aos 3 minutos durante o tempo de infusão (para simular o chá preparado em casa). Após os 5 minutos o sachê foi removido da infusão. Ao atingir temperatura ambiente o volume foi ajustado para 182,5 mL,

3.2.2.2. Determinação dos sólidos solúveis

Os sólidos solúveis foram determinados por gravimetria. Tubos de ensaio identificados foram colocados em estufa a 105ºC por 5 horas, retirados, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica. Após a pesagem foram adicionados 3 mL de chá mate. Os tubos foram colocados novamente em estufa 105ºC e deixados por 12h ou mais (*ovenight)* para total evaporação da água. No dia seguinte os tubos foram retirados da estufa, resfriados em dessecador e pesados em balança analítica. A diferença entre o valor da pesagem final e a inicial corresponde ao peso dos sólidos solúveis do chá mate contidos em 3 mL do extrato. O resultado está expresso em mg/mL de chá mate.

3.2.2.3. Quantificação dos fenólicos totais no chá mate

A determinação do teor de fenólicos totais foi realizada de acordo com método descrito por GENOVESE *et al.,* (2003). O método consiste em uma reação colorimétrica que utiliza como reagente o Folin-Ciocalteu e solução saturada de carbonato de sódio. O Folin-Ciocalteau reage quantitativamente com os compostos fenólicos da amostra e a absorbância é medida espectrofotometricamente no comprimento de onda de 750 nm.

A quantificação foi feita por curva de calibração do padrão 5CQA de 5 pontos e o resultado dado em mgE5CQA (Equivalente de 5CQA)/mL, todas as análises foram feitas em triplicata.

Foi utilizado um espectrofotômetro UV1650PC (Shimadzu – Japão).

3.2.2.4. Quantificação de compostos bioativos por CLAE

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, modelo LC-10ATvp equipado com bomba quaternária FCV-10ALvp, injetor manual Rheodyne com loop de 20µL, controlador SCL10Avp, detector de arranjo de diodos SPD M10Avp e software Class-vp versão 6.1.

3.2.2.4.1. Validação dos métodos

As metodologias para a determinação de ácidos fenólicos, xantinas e saponinas foram validadas. Foram determinados a exatidão, pelo método de recuperação, os limites de detecção e de quantificação e a precisão, pelo cálculo da repetibilidade sobre quantidades conhecidas de padrão (tabela 2), foram adicionadas em uma amostra antes do início do preparo. A porcentagem da recuperação foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ recuperação} = \frac{X_c - X}{C} \times 100$$

Sendo: X_c = média dos resultados de amostras contaminadas

X = média dos resultados de amostras não contaminadas

C = padrão adicionado

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados para cada analito. A amostra adicionada de cada padrão (entre 40 e 100% do valor encontrado) (tabela 3) e foi diluída até o menor teor mensurável pelo método (n=10). Foi calculado o desvio padrão e o coeficiente de variação dos resultados. LD é 3 e o LQ é 10 vezes o desvio padrão. A repetibilidade foi expressa pelo desvio padrão relativo das réplicas.

Tabela 2: Quantidade de padrão adicionada à matriz antes de iniciar a extração (mg)

Teobromina	Cafeína	5CQA	Ácido caféico	Ácido ursólico	Ácido Oleanólico
2,8	5,8	5,4	1,9	0,84	0,80

3.2.2.4.2. Determinação de ácido ursólico e oleanólico

A determinação de ácidos ursólico e oleanólico foi realizada segundo metodologia descrita por GNOATTO *et al.,* (2005) com modificações. Quinze gramas de erva mate tostada foram fervidas em 100mL de água deionizada por 10min, filtrada em papel de filtro qualitativo (1:11µm) e o volume do extrato (EX) foi ajustado para 100mL. O EX foi refluído por 2h a 130°C com 15mL de HCl (12M) para a hidrólise das saponinas. Após esfriar, o EX hidrolisado foi submetido a extração com 50mL de clorofórmio (4x). O extrato clorofórmico foi evaporado até secura em rotaevaporador e o resíduo foi redissolvido com 25mL de acetonitrila (grau cromatográfico) – fração saponínica (FS). A FS foi filtrada em membrana 0,45µm (Millipore, PVDF) e 20µL injetados no cromatógrafo em triplicata. Foi utilizada coluna de fase reversa C18 SGE (250x4,6mm, 5µ), fase móvel isocrática composta por acetonitrila:água deionizada (95:5) filtrada em membrana (Millipore, PVDF) e fluxo de 1mL/min.

A quantificação foi realizada por padronização externa utilizando solução padrão de ácido ursólico e oleanólico em uma curva de calibração com 5 pontos (12,9 a 147,8µg/mL; r^2= 0,9992; e 11 a 126µg/mL; r^2= 0,9997, respectivamente). A identificação foi feita pela comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção, relativamente aos padrões e a comparação dos espectros de absorção no comprimento de onda de 203nm (Figura 6).

Os resultados de saponinas totais foram calculados pela soma das concentrações obtidas nos picos eluídos pela aplicação da equação da curva padrão de ácido ursólico. Quando presente, a concentração referente ao pico eluído após os ácidos ursólico e oleanólico também foi somada.

A similaridade foi verificada pela comparação dos espectros dos picos da amostra e dos padrões tomado pelo detector de arranjo de diodos, a similaridade foi maior que 0,99 para todos os analitos.

A pureza dos picos foi determinada de acordo com descrição no Anexo 1. O valor da pureza foi maior que 0,99 para os analitos determinados (ácidos ursólico e oleanólico), e maior que 0,90 para os demais picos utilizados para o cálculo das sapogeninas totais por CLAE.

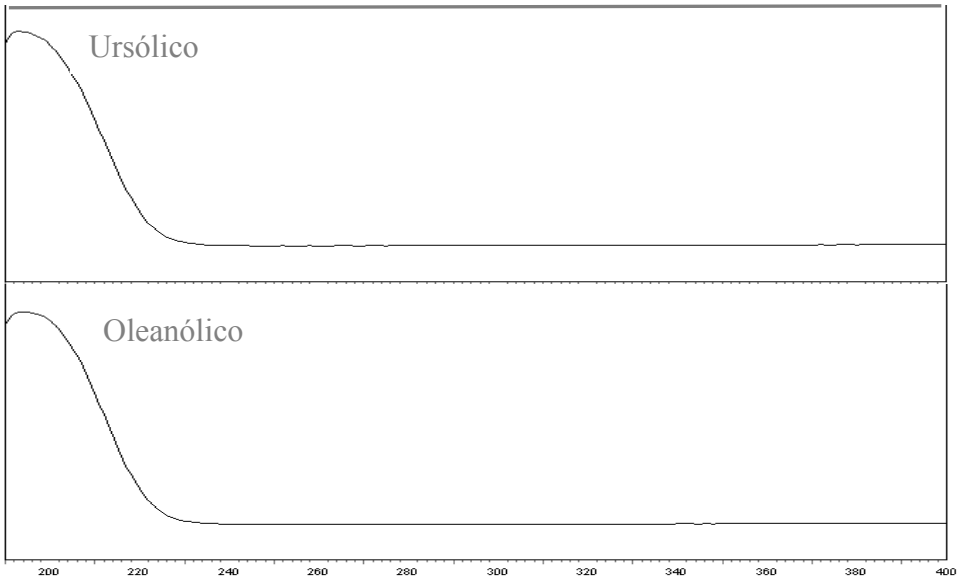


Figura 6: Espectro de absorção dos padrões de sapogeninas (ácidos ursólico e oleanólico)

3.2.2.4.3. Determinação de Ácidos Fenólicos e Xantinas

Os ácidos fenólicos e xantinas foram determinados segundo metodologia de BASTOS *et al.,* (2005) com modificações. O chá mate foi preparado em triplicata com a adição de 182,5mL (1 xícara de chá) de água fervida sobre o sachê por 5 minutos. Cada sachê foi agitado 10 vezes com o auxílio de uma pinça no início e aos 3 minutos durante

o tempo de infusão (para simular o chá preparado em casa). Após os 5 minutos o sachê foi removido da infusão. Ao atingir temperatura ambiente o volume foi ajustado para 182,5 mL, uma alíquota da amostra foi filtrada em membrana (Millipore, PVDF) e 20 µL foram injetados. Foi utilizada coluna de fase reversa C18 Phenomenex (250mm x 4,6mm, 5um), a fase móvel isocrática é composta por 45%B (metanol:ácido acético, 99:1) e 55% de A (água deionizada: ácido acético, 99:1), fluxo de 0,6mL/min.

A quantificação dos ácidos clorogênicos foi feita por padronização externa, utilizando os padrões 5CQA e o ácido caféico e curva com 5 pontos (14,5 a 201,2µg/mL; r^2=0,9940; e 1,2 a 12µg/mL; r^2=0,9982, respectivamente). A identificação foi feita pela comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção dos ácidos fenólicos com os padrões a 323nm (Figura 7).

As xantinas teobromina e cafeína foram quantificadas por padronização externa, utilizando os padrões teobromina e cafeína em curva com 5 pontos (4,6 a 92,8µg/mL; r^2=0,9992 e 36,4 a 151,5µg/mL; r^2=0,9946, respectivamente). A identificação foi feita pela comparação do tempo de retenção e do espectro de absorção dos picos de xantinas das amostras com os padrões a 272nm (Figura 8).

Para o cálculo do teor de fenólicos totais por CLAE a equação do 5CQA foi aplicada para todos os picos apresentados no comprimento de onda de 323nm, e os resultados somados. As xantinas totais foram obtidas pela soma dos resultados de cafeína e teobromina de cada amostra.

A similaridade foi verificada pela comparação dos espectros dos picos da amostra e dos padrões tomado pelo detector de arranjo de diodos, a similaridade foi maior que 0,99 para todos os analitos.

A pureza dos picos foi determinada de acordo com descrição no Anexo 1. O valor da pureza foi maior que 0,99 para os analitos determinados (5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína), e maior que 0,90 para os demais picos utilizados para o cálculo dos fenólicos totais por CLAE.

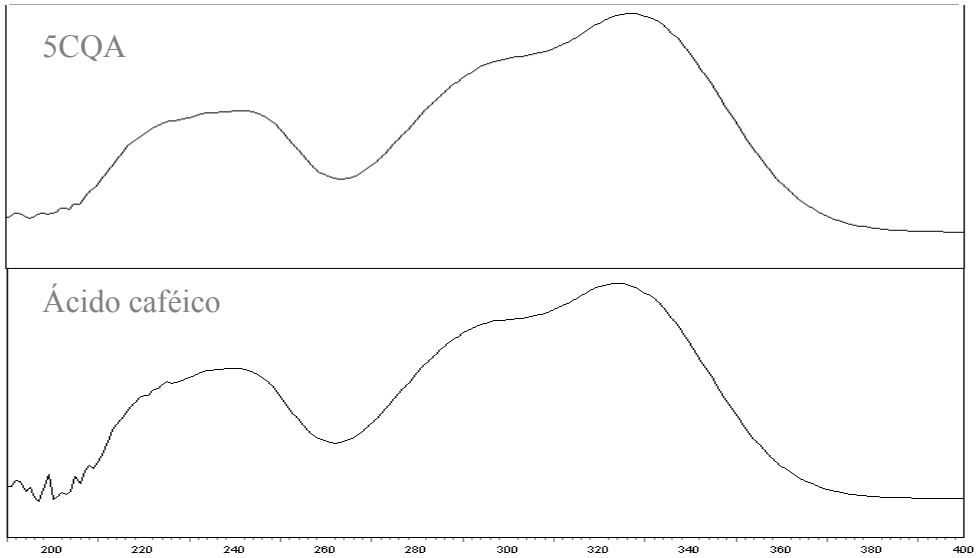


Figura 7. Espectros de absorção dos padrões de ácidos fenólicos

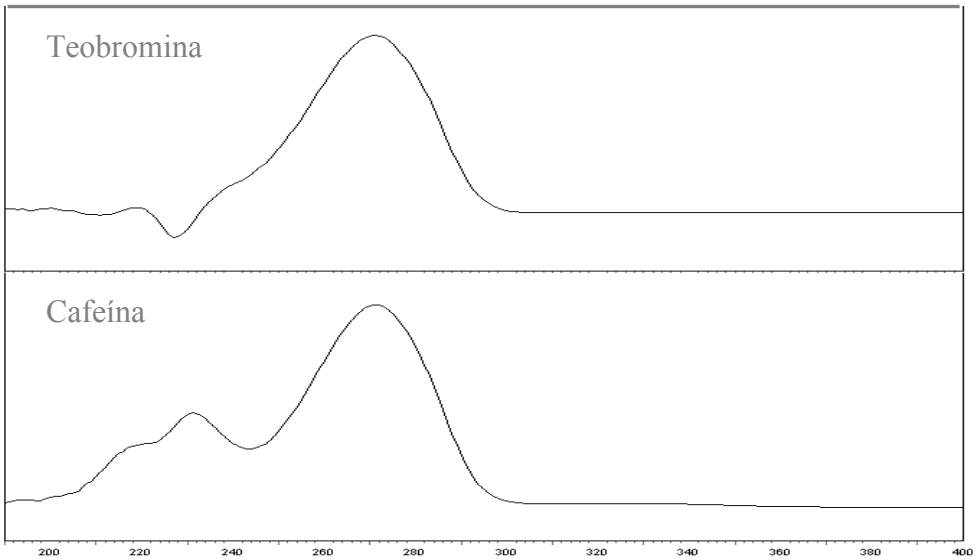


Figura 8: Espectros de absorção dos padrões de xantinas (Teobromina e Cafeína)

3.2.3. Análise estatística

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão. Para todas as análises realizadas os resultados estão expressos por marcas (X, Y e Z) e para o chá mate (obtido pela média dos resultados de todas as marcas).

Foram utilizados ANOVA e teste de *Tukey*, com nível de significância de 5% para avaliar se houve diferença no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante das diferentes frações entre as marcas de chá-mate analisadas. Para as distribuições não normais, foi utilizado teste não-paramétrico *Kruskal-Wallis*.

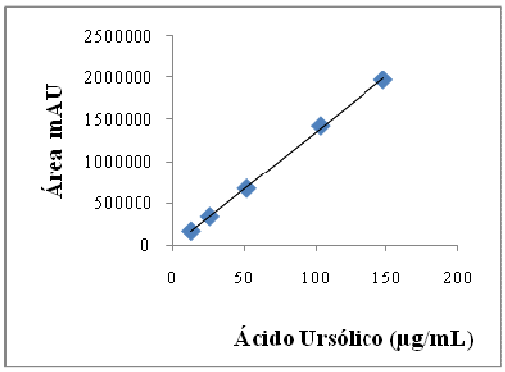
A correlação entre o teor de compostos bioativos nas diferentes frações e as atividades biológicas foi avaliada.

Foram utilizados os programas *Microsoft Excel* para a tabulação dos dados e o programa SPSS 16.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para a execução dos testes estatísticos.

3.3. Resultados e discussão

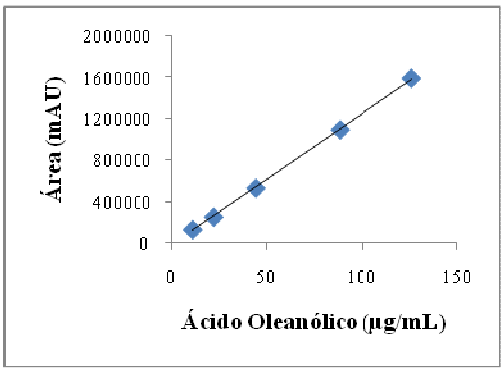
3.3.1. Validação dos métodos de determinação dos compostos bioativos por CLAE

Na figura 9 estão as curvas de calibração obtidas para os padrões, as equações e o coeficiente de determinação (r^2) nas condições deste estudo. Os dados da validação do método: limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), recuperação e repetibilidade, estão descritos nas tabelas 4 e 5.



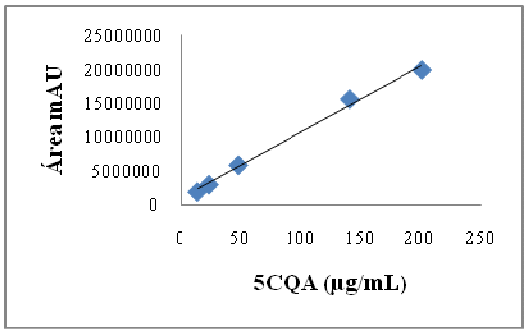
y = 13598,11x - 15208,26

r^2= 0,9992



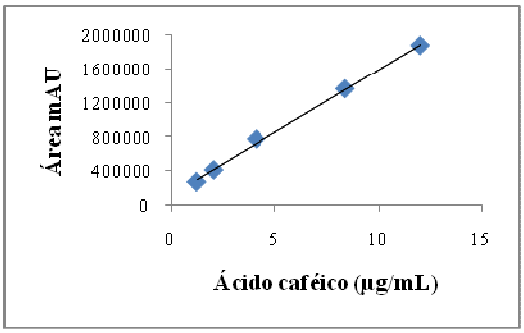
y = 12687,5086x - 13906,9128

r^2= 0,9997



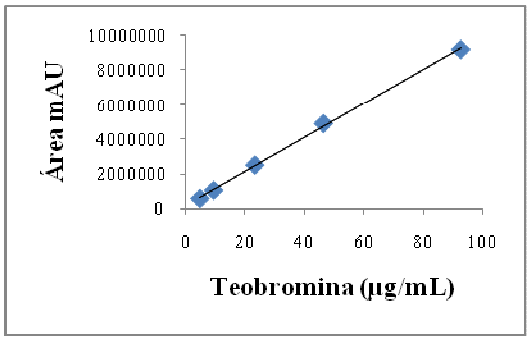
y = 97647,51x + 869669,20

r^2= 0,9940



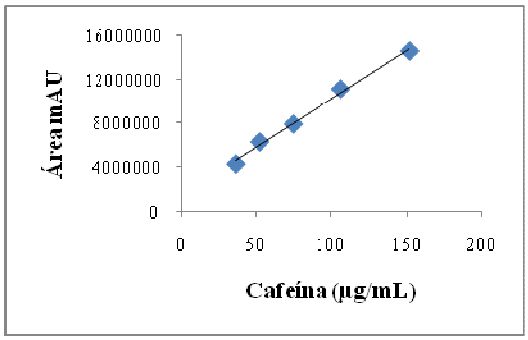
y = 147358,42x + 120079,97

r^2= 0,9982



y = 98252,18x + 200883,62

r^2=0,9992



y = 88311,79x + 1434862,07

r^2=0,9946

Figura 9: Curvas de calibração, equações e coeficiente de determinação dos padrões ácido ursólico, ácido oleanólico, 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína

A faixa de trabalho foi de 12,9 a 147,8 µg/mL e 11 a 126 µg/mL para os ácidos ursólico e oleanólico. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de determinação da

curva de calibração dos analitos, conforme demonstrado na figura 9, os valores estiveram acima de 0,99 para ambos os analitos, indicando uma boa linearidade.

Segundo o documento do AOAC (2002), a recuperação dos ácidos ursólico e oleanólico está dentro do limite aceitável, que varia de 80 a 115% para a faixa de concentração de 10 ppm (µg/g). Os valores de repetibilidade de 1,69 e 3,26% se encontram dentro do limite proposto pela AOAC, de até 6%.

LD e LQ foram menores do que 1,35 µg/mL e 4,1 µg/mL, respectivamente, valores encontrados por GNOATTO *et al.,* (2005) que desenvolveram metodologia para determinação de ácido ursólico em extrato aquoso de *Ilex paraguariensis*. A repetibilidade demonstrada pelos autores foi de 2,38%, valor próximo ao apresentado pelo presente estudo e a recuperação do método variou entre 94,5 e 99,2%, valores maiores que os aqui encontrados.

PAVEI *et al.,* (2007) validaram um método cromatográfico para determinar as saponinas (matesaponina- 3) de frutos de *Ilex paraguariensis* e encontraram limites de detecção e quantificação de 0,362 e 1,09 µg/mL, respectivamente. A reprodutibilidade, avaliada por testes inter e intra-dia foi 1,03% (pico 1) e 3,86% (soma dos picos). A precisão intermediária (testes realizados em três dias diferentes) foi de 4,99% (pico 1) e 7,63% (soma dos picos). Os valores encontrados pelos autores são similares aos encontrados neste estudo, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3: Limites de detecção e quantificação, recuperação e repetibilidade dos métodos para os ácidos ursólico e oleanólico

	Ácido Ursólico	Ácido Oleanólico
Limites de detecção (µg/g chá mate)	0,83	0,62
Limites de quantificação (µg/g chá mate)	2,78	2,08
Recuperação (%)	84,2±13,25	87,19±3,99
Repetibilidade (CV)	1,69	3,26

CV= coeficiente de variação; (n=10)

A repetibilidade obtida por LIAO *et al.,* (2005) variou entre 2,1 e 4,1%, na validação de um método para determinar sete triterpenóides e saponinas triterpênicas de *Ilex purpúrea* (tradicional erva medicinal chinesa) por cromatográfica líquida de alta eficiência com detecção por evaporação por espalhamento de luz (HPLC-ELSD: *High pressure liquid chromatography - evaporative light scattering detection*). Dentre os analitos estão os ácidos ursólico e oleanólico que apresentaram variação inter-dia de 3,6 e 4,1%, respectivamente, valores pouco maiores do que os encontrados por este trabalho.

Para os compostos 5CQA e ácido caféico a faixa de trabalho foi de 14,5 a 201,2 µg/mL e 1,2 a 12 µg/mL. De 4,6 a 92,8 µg/mL e de 36,4 a 147,8 µg/mL foram as faixas de trabalho para a cafeína e teobromina, respectivamente. A linearidade foi expressa pelo coeficiente de determinação da curva de calibração dos analitos, maior do que 0,99 em todos os casos, conforme está demonstrado na figura 9.

Para a determinação dos ácidos clorogênico e caféico, teobromina e cafeína, os LD e LQ variaram de 0,16 a 0,28 µg/mL e 0,53 a 0,94 µg/mL, respectivamente, o que demonstra a capacidade do método de quantificar os analitos na matriz estudada (tabela 4). PROESTOS *et al.,* (2006) analisaram fenólicos (ácido gálico, ácido caféico, rutina e outros) em ervas aromáticas e o LD para o ácido caféico foi 0,5 µg/mL, valor próximo do LQ obtido no presente estudo (0,53 µg/mL), ressaltando a sensibilidade do atual método.

Os resultados do presente estudo são próximos aos encontrados por STREIT *et al.,* (2007), que determinaram ácido caféico, 5CQA, cafeína e outros compostos em erva mate, e obtiveram 0,8 µg/mL, 1,0 µg/mL e 0,8 µg/mL de LQ, respectivamente. Os autores obtiveram porcentagens de 93 a 110% de recuperação, similar à obtida por este estudo: 92,12 a 115,88%.

Se analisarmos os dados de validação com base nas recomendações da AOAC (2002) os resultados de recuperação da teobromina (em média 101,45%) estão conforme o recomendado, que é de 90 a 108%, na faixa de concentração do analito. Já a porcentagem de recuperação do ácido caféico (em média 115,88%) encontra-se acima da recomendação para sua faixa de concentração (a mesma da teobromina). Para a cafeína e

o 5CQA, as médias de recuperação estão adequadas, o documento recomenda valores entre 92 e 105% para a faixa de concentração encontrada.

Tabela 4: Limites de detecção e quantificação do método e recuperação dos 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína

	5CQA	Ácido Caféico	Teobromina	Cafeína
Limites de detecção (µg/mL)	0,23	0,16	0,24	0,28
Limites de quantificação (µg/mL)	0,78	0,53	0,79	0,94
Recuperação (%)	92,75±3,05	115,88±1,53	101,45±4,76	92,12±10,76
Repetibilidade (%)	6,19	6,18	4,09	6,63

CV= coeficiente de variação; (n=10)

HARRIS *et al.,* (2007) encontraram coeficientes de variação intra-dia foi de 6,4 a 14,32% e inter-dia de 21,71% para o ácido caféico, ao validarem um método para a quantificação de compostos fenólicos em folhas, caule, raiz e fruto de mirtilo. Já para o ácido clorogênico os autores obtiveram de 0,14 a 13,02% e 9,83% de variação intra e inter-dia respectivamente. Os valores descritos como variação intra e inter-dia são denominados no presente estudo como repetibilidade, que foi de 6,16 e 6,19% para o ácido caféico e o 5CQA, respectivamente.

Os mesmos autores calcularam a recuperação do ácido clorogênico, que variou de 84 a 107,7%, dependendo da quantidade de analito adicionada.

Para as xantinas cafeína e teobromina, os valores de repetibilidade estiveram acima do encontrado na literatura, 0,44 e 0,64%, respectivamente (BISPO *et al.,* 2002), e acima dos critérios recomendados pela AOAC (2002), 2 e 3%.

GNOATTO *et al.,*(2007) verificaram LD de 0,03 e 009 µg/mL e LQ de 0,09 e 0,3 µg/mL para a cafeína e teobromina, respectivamente. Os limites verificados pelo presente estudo ficaram acima dos encontrados pelos autores (tabela 6).

De acordo com os resultados aqui apresentados os métodos validados foram considerados adequados e foram utilizados para a quantificação dos compostos propostos.

3.3.2. Análise do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais foi determinado por dois métodos, pelo método espectrofotométrico com o reagente Folin-Ciocalteu e por CLAE (soma das áreas dos picos correspondentes aos ácidos fenólicos). Na tabela 5 estão os teores de fenólicos totais pelos dois métodos, e a variação de sólidos solúveis entre as marcas.

Os fenólicos totais foram expressos em mg5CQA/g de sólidos solúveis (SS). Esse valor foi ajustado para o conteúdo de SS do chá; e em mg5CQA/xícara de chá, representado a quantidade de fenólicos encontrada em uma xícara.

Os teores de fenólicos totais variaram de 354,04 a 487,59 mg5CQA/g SS pelo método espectrofotométrico e de 160,43 a 249,17 mg5CQA/g SS por CLAE.

Quando comparamos o conteúdo de fenólicos totais por espectrofotometria em uma xícara de chá, as três marcas diferem entre si, sendo a marca Z a que apresenta a maior concentração (193,98 mg5CQA/xícara; $p<0,001$) seguida da marca Y e X respectivamente.

Ao observarmos os resultados obtidos pele mesmo método, a marca Z foi a que apresentou a maior quantidade de fenólicos em relação aos SS (487,59mg5CQA/g SS; $p<0,001$). Não houve diferença entre as marcas X e Y ($p=0,258$) .

Os resultados de fenólicos totais por xícara não acompanham os resultados por grama de SS devido a diferença de concentração de SS entre as marcas. A marca Y apresentou 1,92 mg/mL de SS, diferente significativamente da marca X (2,08 mg/mL; $p<0,001$). Portanto, apesar das marcas X e Y serem diferentes significativamente nos valores de fenólicos totais expressos em mg5CQA/xícara, ao ajustar o valor por SS, os resultados se aproximam e a diferença estatística desaparece ($p=0,258$). Não houve diferença significativa na concentração de SS entre as marcas X e Z ($p=0,837$). Em média, o chá mate utilizado neste trabalho contém 2,02 mgSS/mL.

Os valores de SS encontrados nesse estudo foram semelhantes ao encontrado por BASTOS *et al.,* (2005). Os SS dos chás mate estudados pelos autores variaram de 1,9 a 2,7 mg/mL, com valor médio de 2,2 mg/mL.

DUDONNÉ *et al.,* (2009) encontraram 202,6 mgEAG/g no extrato aquoso de erva mate verde. Esse valor é inferior ao encontrado no presente estudo, podendo ser explicado por fatores como: diferente método de extração e análise, padrão diferente utilizado para cálculo da concentração (Ácido gálico) e por se tratar de erva mate verde e não tostada.

Já MATSUMOTO *et al.,* (2009) estudaram chá mate solúvel, e obtiveram 350 mg5CQA/g SS pelo método de Folin. Nesse caso, apesar da amostra não ser exatamente igual à do presente estudo (chá mate sachê) o valor encontrado foi próximo. Fato que pode ser explicado pelo método utilizado ser o mesmo, assim como o padrão para cálculo da concentração (5CQA).

Tabela 5. Valores médios ± desvio padrão (dp) da concentração de sólidos solúveis (n=54) e fenólicos totais nos dois métodos (Folin e CLAE) (n=27)

Marcas	Sólidos solúveis (mg5CQA/mL)	Fenólicos totais (mg5CQA/g sólidos solúveis)		Fenólicos totais (mg5CQA/xícara 182,5mL)	
		Folin	CLAE	Folin	CLAE
X	$2,08 \pm 0,19^{b}$	$354,04 \pm 47,68^{aB}$	$160,43 \pm 56,82^{aA}$	$141,77 \pm 13,67^{aB}$	$59,43 \pm 21,02^{aA}$
Y	$1,92 \pm 0,17^{a}$	$379,71 \pm 66,23^{aB}$	$187,03 \pm 25,5^{bA}$	$150,11 \pm 11,58^{bB}$	$67,83 \pm 12,67^{bA}$
Z	$2,06 \pm 0,17^{b}$	$487,59 \pm 69,48^{bB}$	$249,17 \pm 49,35^{cA}$	$193,98 \pm 27,22^{cB}$	$96,33 \pm 19,01^{cA}$
Chá mate	2,02 ± 0,19	407,11 ± 84,4	201,04 ± 55,77	161,95 ± 29,60	75,30 ± 22,89

n = número de amostras

Para os valores em mg5CQA/g sólidos solúveis - CLAE e mg5CQA/xícara - Folin e letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre as médias. Nos valores de mg5CQA/g sólidos solúveis - Folin e mg5CQA/xícara - CLAE letras minúsculas diferentes na mesma coluna indicam que logaritmo neperiano (ln) das médias diferem significativamente ($p<0,05$). Letras maiúsculas diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias ($p<0,05$)

O efeito das condições de crescimento e secagem da erva mate no conteúdo de fenólicos foi avaliado por HECK *et al.,* (2008). Os autores concluíram que os extratos de erva mate provenientes de plantações (com elevada exposição ao Sol) apresentaram maior conteúdo de fenólicos totais, quando comparados ao extrato de erva mate obtida de florestas (com baixa exposição ao Sol). A concentração de fenólicos totais desse trabalho variou de 346,2 a 505,3 mg5CQA/g de extrato (extrato aquoso liofilizado).

Os fenólicos totais por CLAE variaram de 160,43 a 249,17 mg5CQA/g e de 59,43 a 96,33 mg5CQA/xícara. Em média, o chá mate apresentou por este método 201,04 mg5CQA/g e 75,30 mg5CQA/xícara.

A marca X resultou na maior concentração de fenólicos totais por xícara sendo diferente significativamente de Y ($p=0,018$) e Z ($p<0,001$). As marcas Y e Z diferiram significativamente entre si tanto na concentração por xícara quanto por grama SS ($p<0,001$). A concentração de fenólicos totais por xícara apresentou diferença significativa entre as marcas X e Y ($p=0,033$) e X e Z ($p<0,001$)

CARINI *et al.,* (1998) compararam o conteúdo de fenólicos totais de extratos de erva mate verde pelo método de Folin e por CLAE. Os autores encontraram resultados parecidos com os do presente estudo. Os extratos estudados apresentaram 458 mg5CQA/g pelo método de Folin e 177 mg5CQA/g por CLAE. Este estudo encontrou 407,11mg5CQA/g SS pelo método de Folin, e 201,04 mg5CQA/g SS por CLAE.

A diferença entre as concentrações de fenólicos totais por Folin e por CLAE é significativa tanto quando expresso por mg5CQA/g SS quanto por mg5CQA/xícara ($p<0,001$, $n=81$). Pelo método de Folin, o chá mate possui mais do que o dobro da concentração de fenólicos calculada pelo método cromatográfico.

O método para determinação dos fenólicos totais por Folin é baseado na redução do reagente Folin-Ciocalteu por transferência de elétrons em meio alcalino, tendo como conseqüência a formação da coloração azul. A reação não ocorre exclusivamente com os compostos fenólicos, podendo sofrer interferência de ascorbato e sulfito, superestmando a quantidade dos compostos fenólicos (HUANG *et al.,* 2005; STEVANATO *et al.,* 2004).

Em revisão, DE MARIA e MOREIRA (2004) destacam as vantagens do método de cromatografia líquida de alta eficiência com uso de um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), como a possibilidade de isômeros serem analisados no comprimento de onda em que ocorre o máximo de absorção (λ máximo). O uso de uma coluna apolar com micropartículas permite a separação e quantificação de cada isômero. Essas vantagens explicam a maior especificiade do método CLAE-DAD em relação ao de Folin, esclarecendo a diferença entre os resultados de fenólicos totais pelos dois métodos apresentados no presente estudo.

Na figura 10 estão os espectros de absorção dos picos encontrados em uma amostra de chá mate e do padrão 5CQA.

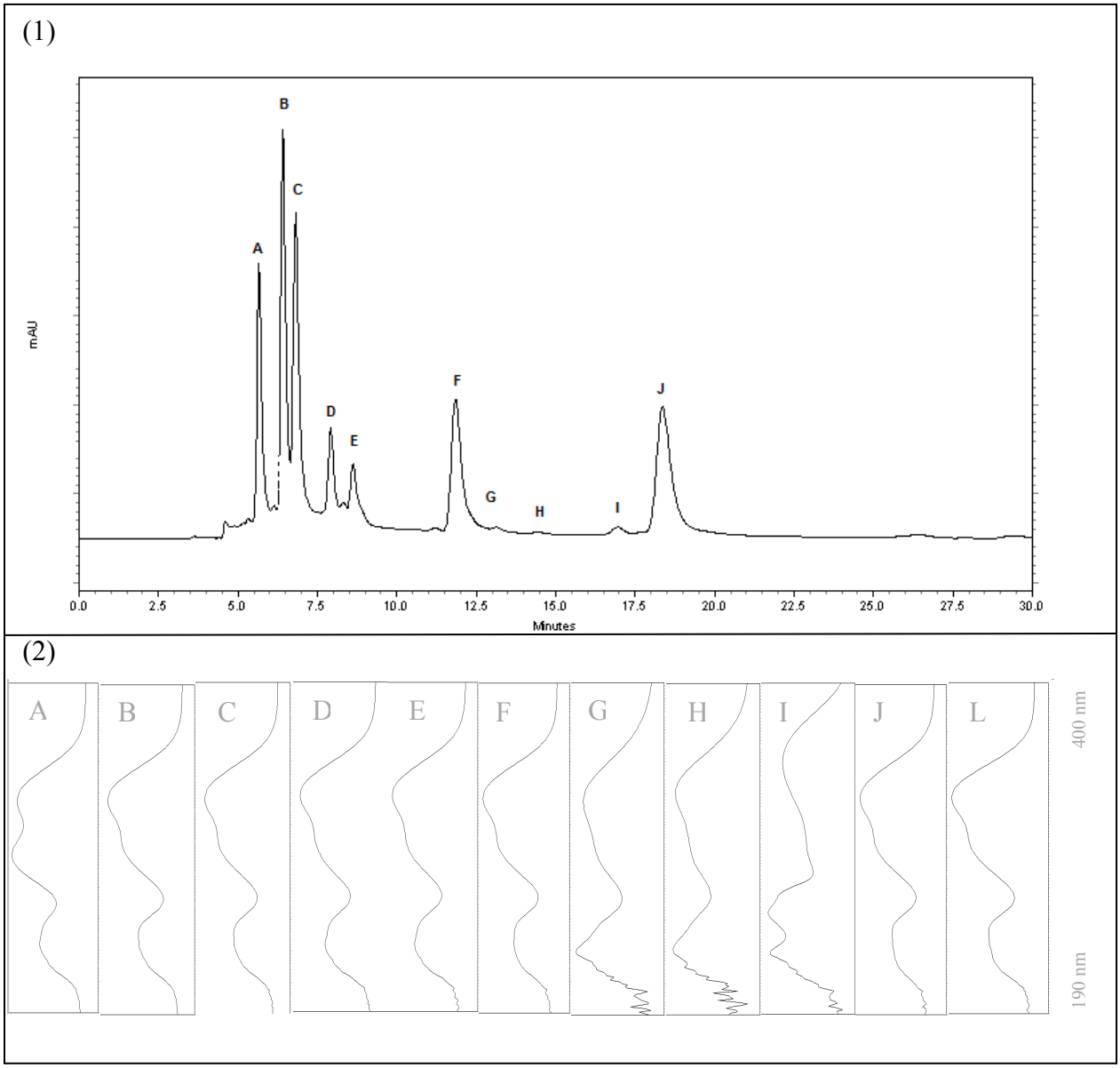


Figura 10: (1) Perfil de fenólicos de uma amostra de chá mate a 323nm; (2) Espectros de absorção (A-J) espectros de absorção dos picos de uma amostra; (L) espectro de absorção do padrão 5CQA

Os métodos apresentaram correlação positiva significativa para as duas maneiras de expressar, porém a correlação foi maior quando expresso em mg5CQA/xícara ($r = 0,753$; $p<0,000$) do que em mg5CQA/g SS($r = 0,460$; $p<0,001$). Na figura 11 estão os

gráficos de correlação entre os métodos. A diferença de correlação pode ser explicada pela variação de sólidos solúveis entre as marcas (tabela 5).

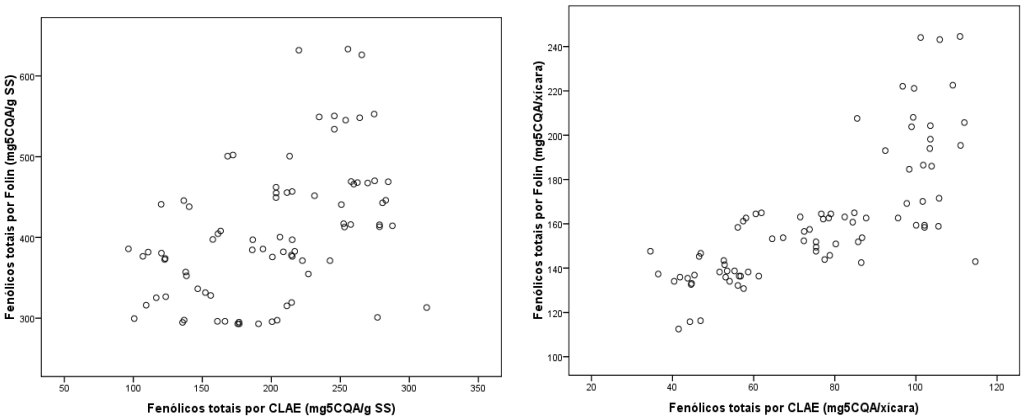


Figura 11: Gráficos de correlação entre os métodos para determinação de fenólicos totais (A) em mg5CQA/g SS, coeficiente de correlação r = 0,460, p<0,001; (B) em mg5CQA/xícara, coeficiente de correlação r = 0,753, p<0,001

3.3.3. Análise de ácido ursólico e oleanólico por CLAE

Os ácidos ursólico e oleanólico são compostos isoméricos triterpênicos que ocorrem em plantas, alimentos e ervas como ácidos livres ou agliconas de saponinas triterpênicas (LIU 1995). Saponinas já foram isoladas da erva mate, todas contendo ácidos ursólico e oleanólico (GOSMANN e SCHENKEL, 1989; GOSMANN *et al.,* 1995; KRAEMER *et al.,* 1996; MARTINET *et al.,* 2001). Às saponinas é atribuído o efeito hipocolesterolêmico da erva mate, pela inibição da difusão passiva do ácido cólico e formação de micelas que não podem ser reabsorvidas e são, portanto, excretadas (HECK e MEJIA, 2007). As concentrações de ácido ursólico e oleanólico foram determinadas a partir da erva mate tostada, e estão dispostas na tabela 6 e na figura 12 em µg/g de erva mate tostada.

O chá mate apresentou em média 82,60 µg/g de ácido ursólico e 54,08 µg/g de ácido oleanólico, conforme mostra a tabela 4. A marca Z obteve a maior concentração de

ácido ursólico (135,80 µg/g) e de ácido oleanólico (98,04 µg/g) em relação às marcas X ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente) e Y ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente). As menores concentrações de ácidos ursólico e oleanólico foram encontradas na marca X.

Tabela 6: Concentrações médias e desvio padrão de ácido ursólico, oleanólico e sapogeninas totais entre as marcas de chá mate (µg/g de peso seco)

Marcas	Ácido Ursólico µg/g chá mate	Ácido Oleanólico µg/g chá mate	Concentração de sapogeninas totais (µgEAU/g)
X*	43,54±35,73[a]	26,72±24,01[a]	299,73±117,42[a]
Y*	69,42±28,09[b]	37,62±14,94[b]	337,90±180,09[a]
Z*	135,80±56,70[c]	98,04±66,96[c]	268,42±83,59[a]
Chá mate**	82,60±56,89	54,08±52,05	305,24±140,26

Letras diferentes na mesma coluna indicam que ln das médias diferem significativamente ($p < 0,05$)

*Médias±desvio padrão, n=27 **Médias±desvio padrão, n=81

O ácido ursólico foi determinado em erva mate verde (para chimarrão) por GNOATTO *et al.,* (2005). Os autores não separaram os ácidos ursólico e oleanólico, quantificando as agliconas presentes na erva mate verde como ácido ursólico. De acordo com esses autores a erva mate verde contém 46,93 µgEAU/g, valor próximo ao encontrado na marca X analisada.

Assim como em um trabalho realizado com saponinas, a análise demonstrou que alguns picos detectados no comprimento de onda 203nm (entre 0 e 6 minutos, figura 13) não são os ácidos ursólico, oleanólico ou seus isômeros, pois os picos continuam presentes nos comprimentos de onda 272 e 323 nm, em que tipicamente as sapogeninas não possuem absorbância (PAVEI *et al.,* 2007).

O conteúdo de sapogeninas totais foi calculado no presente estudo pela somatória das concentrações referentes às áreas dos picos eluídos após os 6 min (figura 13). Na figura 14 estão os espectros de absorção das sapogeninas em comparação com o espectro de absorção dos padrões. Em algumas amostras ocorreu um pico após a eluição dos ácidos ursólico e oleanólico, que foi identificado, pela comparação do espectro e pureza,

como uma sapogenina. Sua área foi utilizada no cálculo das sapogeninas totais, expresso em µg Equivalente de Ácido Ursólico/g.

As concentrações médias de sapogeninas na erva mate tostada variaram de 268,42 a 337,90 µgEAU/g com média de 305,24 µgEAU/g. Não houve diferença significativa entre as marcas (tabela 6).

Existem poucos trabalhos publicados com a determinação dos triterpenóides da erva mate. PAVEI *et al.,* (2007) determinaram o conteúdo de saponinas totais no extrato etanólico concentrado dos frutos da erva mate. Os frutos se mostraram excelentes fontes das substâncias, apresentando em média 304,8mg/g (base seca), expresso como matesaponina-3 (saponina isolada dos frutos de *Ilex paraguariensis* utilizada como padrão externo).

Em uma recente publicação GNOATTO *et al.,* (2008) isolaram e hidrolisaram as saponinas de folhas moídas de erva mate verde. Os autores obtiveram 100mg/g de equivalente de ácido ursólico. O rendimento encontrado no presente estudo são muito menores do que os autores obtiveram. Esta discrepância pode ser atribuída à diferença de matéria prima, método de extração e de determinação.

Quando analisamos os resultados da determinação dos triterpenos ácido ursólico e oleanólico e das sapogeninas totais é possível observar variação de concentração entre marcas apenas para os triterpenos. Assim, concluímos que o pico que eluiu em algumas amostras após os ácidos ursólico e oleanólico pode ter influenciado os resultados obtidos. Outro fator a ser considerado é a grande variação intra marcas (entre amostras de um mesmo lote), representada pelo desvio padrão.

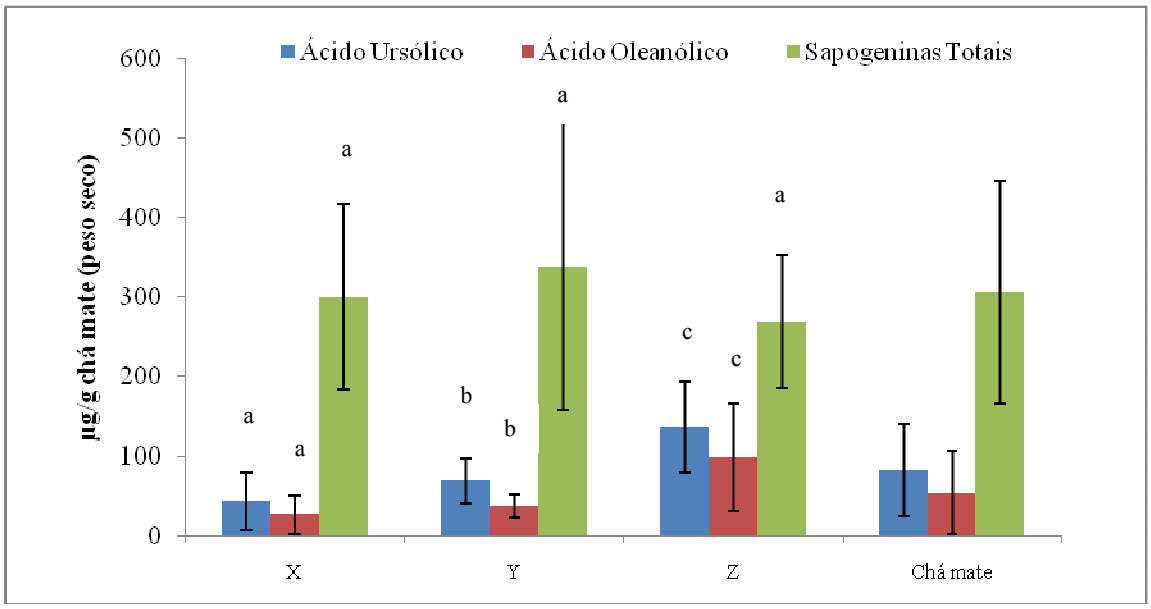


Figura 12: Concentrações médias e desvio padrão de ácido ursólico, oleanólico e sapogeninas totais entre as marcas de chá mate (µg/g de peso seco)
Letras diferentes na mesma amostra indicam que ln das médias diferem significativamente ($p < 0,05$)
Para X, Y e Z n=27. Para Chá mate n=81

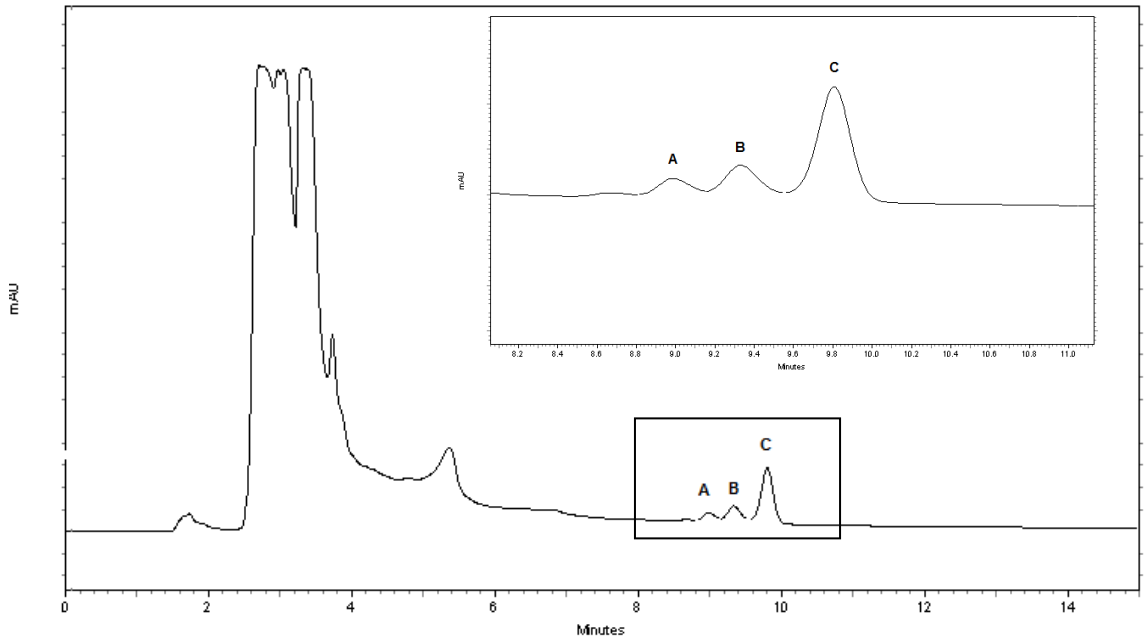


Figura 13: Perfil cromatográfico de uma amostra das sapogeninas do chá mate a 203nm: (A) ácido oleanólico, (B) ácido ursólico (C) terceiro pico.

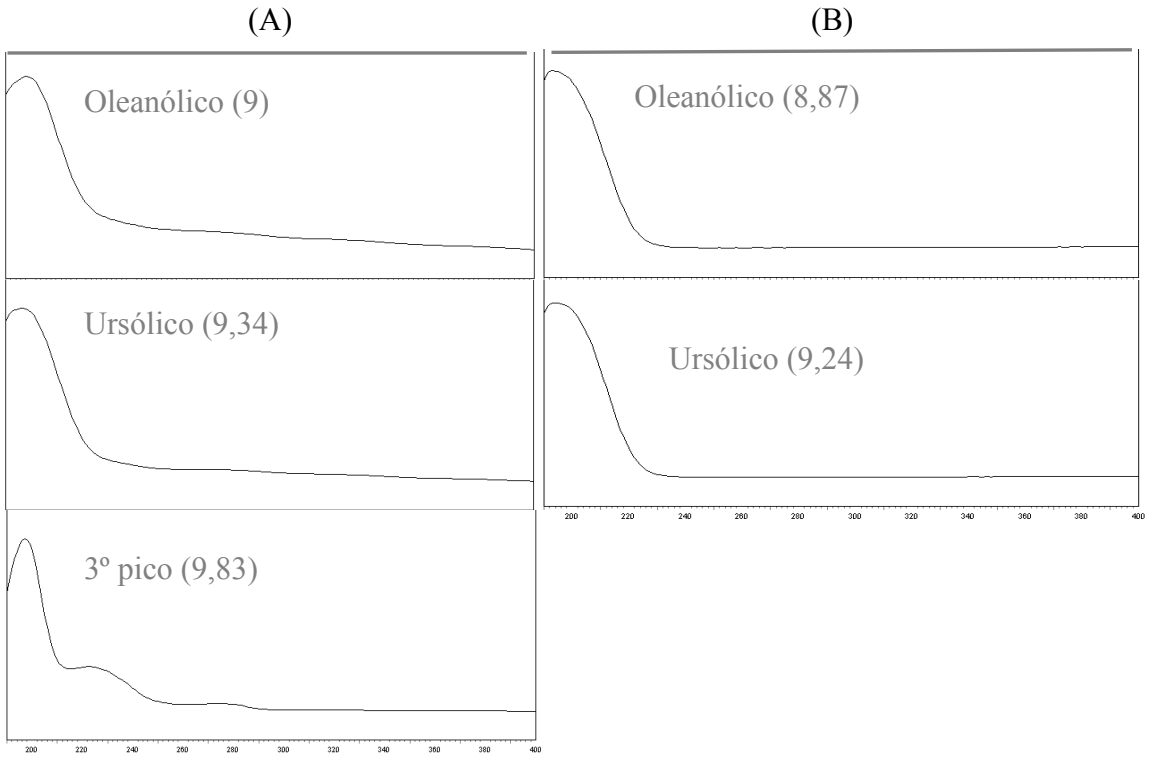


Figura 14: Espectro de absorção das sapogeninas (A) amostra (tempo de retenção em minutos); (B) padrões (tempo de retenção em minutos)

3.3.4. Análise de ácidos fenólicos e xantinas por CLAE

Os teores de 5CQA e ácido caféico para as três marcas analisadas, expressos em μg/mL e em mg/xícara (182,5mL) encontram-se na tabela 7. O perfil cromatográfico de uma amostra de chá mate está na figura 15. Os valores variaram significativamente ($p<0,05$) para todas as marcas, sendo que a marca Z apresentou a maior quantidade de 5CQA e ácido caféico, com média de 18,35 e 4,15 mg/xícara, respectivamente ($p<0,001$). A menor concentração foi encontrada na marca X, com 12,13mg/xícara de 5CQA ($p<0,001$) e 2,39 mg/xícara de ácido caféico ($p<0,05$).

BASTOS *et al.,* (2005) determinaram o conteúdo de 5CQA em 4 marcas chá mate e encontraram de 11 a 23 mg/xícara, a marca com o maior conteúdo (23 mg/xícara) apresentou diferença significativa em relação às demais. A média de 5CQA no chá mate foi 16 mg/xícara. No mesmo trabalho também foi analisado o conteúdo de 5CQA em chimarrão e tererê, os autores encontraram em média 226 mg e 85 mg da substância em uma cuia (500mL), respectivamente. Embora o valor médio de 5CQA deste trabalho seja inferior, os valores encontrados para as marcas estão dentro da faixa de variação daqueles mostrados pelos autores.

Em outro trabalho, BASTOS *et al.,* (2006) encontraram 170,85 mg de 5CQA em uma cuia de chimarrão. No presente estudo, a concentração média de 5CQA e ácido caféico no chá mate foi 14,71 e 3,13mg/xícara respectivamente.

Para os teores de teobromina foi encontrada diferença estatística apenas entre as marcas X e Z ($p<0,028$), e as amostras X e Y e Y e Z são estatisticamente iguais ($p=0,093$ e $p=0,871$, respectivamente). Para cafeína, a marca X foi a que apresentou o maior teor (17,61mg/xícara, $p<0,001$), as marcas Y e Z não apresentaram diferença estatística ($p=0,844$) (tabela 7).

A concentração média de teobromina e cafeína para o chá mate foi 2,74 mg e 15,16 mg por xícara, respectivamente. BASTOS *et al.,* 2005 analisaram o conteúdo de cafeína de chá mate e encontraram resultados semelhantes. Em média, uma xícara de chá mate contém 13mg de cafeína. Nas quatro marcas analisadas, apenas uma apresentou diferença estatisticamente significante ($p<0,05$).

Tabela 7: Concentração média e desvio padrão de 5CQA, ácido caféico, teobromina e cafeína entre as marcas de chá mate

Marcas	5CQA		Ácido Caféico		Teobromina		Cafeína	
	µg/mL	mg/xícara (182,5mL)	µg/mL	mg/xícara (182,5mL)	µg/mL	mg/xícara (182,5mL)	µg/mL	mg/xícara (182,5mL)
X	66,49±14,91^{a}	12,13±2,72^{a}	13,10±1,26^{a}	2,39±0,23^{a}	17,09±5,12^{b}	3,12±0,94^{b}	96,50±19,16^{b}	17,61±3,50^{b}
Y	74,75±10,87^{b}	13,64±1,98^{b}	15,66±4,93^{b}	2,86±0,90^{b}	14,08±0,85^{ab}	2,57±0,16^{ab}	76,28±4,18^{a}	13,92±0,88^{a}
Z	100,56±1,80^{c}	18,35±0,33^{c}	22,75±1,94^{c}	4,15±0,36^{c}	13,94±2,41^{a}	2,54±0,44^{a}	76,43±6,35^{a}	13,95±1,16^{a}
Chá mate	80,60±17,77	14,71±3,24	17,17±5,00	3,13±0,91	15,04±1,78	2,74±0,32	83,07±11,63	15,16±2,12

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Médias±desvio padrão, n=9

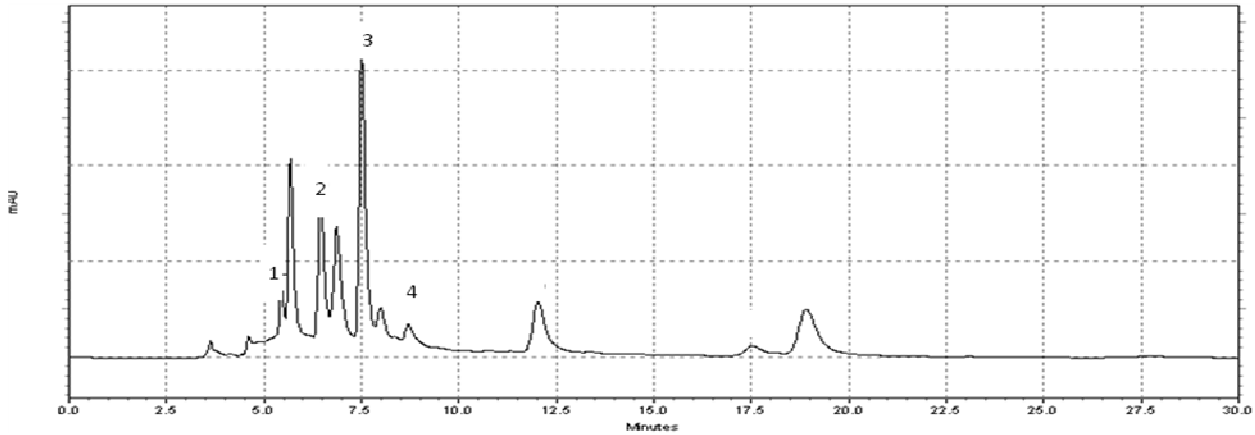


Figura 15: Perfil cromatográfico de uma amostra de chá mate a 272nm: (1) teobromina, (2) 5CQA, (3) cafeína, (4) ácido caféico

Os autores também analisaram o conteúdo de cafeína de chimarrão e tererê, e encontraram 135mg e 85mg em uma cuia, respectivamente. Uma porção de chá mate (1 xícara com 182,5mL) analisado no presente estudo contém em média, cerca de 89% e 82% menos cafeína do que uma porção (cuia de 500mL) de chimarrão e tererê analisados por BASTOS *et al.,* (2005), respectivamente.

FILIP *et al.,* (2001) ao analisarem fenólicos de espécies de *Ilex,* encontraram em *Ilex paraguariensis*, em média 2,8% de ácido clorogênico e 0,023% de ácido caféico, num total de 9,61% de derivados do cafeoil. No presente estudo foram encontrados 4,02% de 5CQA, 0,85% de ácido caféico e 20,10% de fenólicos totais por CLAE (derivados do cafeoil). As diferenças entre as concentrações de ácido caféico e de fenólicos totais entre os dois trabalhos são notáveis. Este fato se deve, provavelmente, à diferença da matriz, pois o autor usou erva mate verde, e às diferenças nas metodologias utilizadas.

A influência da luz no cultivo da erva mate na produção de cafeína e teobromina foi avaliada por COELHO *et al.,* (2007). Os autores encontraram na erva mate cultivada na sombra, concentrações maiores de cafeína do que na cultivada sob luz do Sol, mas não houve diferença nas concentrações de teobromina. A erva cultivada na sombra obteve 3,5 mg/g (peso seco) de teobromina e 14,31 mg/g (peso seco) de cafeína, ressaltando que os autores fizeram extração com solventes para a análise. Para a erva cultivada sob o Sol, os valores foram de 4,24 e 2,94 mg/g (peso seco) de teobromina e cafeína, respectivamente. No presente estudo, as concentrações de teobromina e cafeína no chá mate foram em média 7,56 e 7,18 mg/g (sólidos solúveis).

Segundo os autores, a erva mate é frequentemente cultivada sob o Sol, podendo isso influenciar no conteúdo de cafeína da planta, e consequentemente das bebidas.

3.4. Conclusões parciais

- A concentração de fenólicos totais, avaliada pelos dois métodos (Folin e CLAE), resultou em diferença entre as marcas e entre os métodos. A marca Z apresentou a maior quantidade de fenólicos totais, sendo maior no método de Folin.
- Os métodos de quantificação de sapogeninas e de fenólicos e xantinas por CLAE foram validados e considerados adequados para a quantificação dos compostos bioativos propostos. Os parâmetros avaliados mostraram exatidão, linearidade e precisão.
- A concentração de ácido ursólico e oleanólico foi diferente entre as marcas, sendo a marca Z a que apresentou amior teor desses compostos. Quanto às sapogeninas totais, não houve diferença entre as marcas.
- Em relação ao 5CQA e ácido caféico, houve diferença entre as marcas, a maior concentração foi encontrada na marca Z. Para a concentração de cafeína e teobromina, houve diferença entre as marcas, sendo a marca Y e as marcas X e Y, respectivamente as mais concentradas.

3.5. Referências Bibliográficas

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. AOAC requirements for single laboratory validation of chemical methods. Washington (DC) 2002.

Astill C, Birch MR, Dacombe C, Humphrey PG, Martin PT. Factors Affecting the Caffeine and Polyphenol Contents of Black and Green Tea Infusions. J Agric Food Chem 2001; 49: 5340-5347.

Athayde ML, Coelho GC, Schenkel EP. Caffeine and theobromine in epicuticular wax of Ilex paraguariensis A. St.-Hil. Phytochem 2000; 55: 853-857.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The Chlorogenic Acid and Caffeine Content of Yerba Maté. Acta Farm. Bonaerense 2005; 24 (1): 95-5.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Torres EAFS. Bioactive Compounds Content of Chimarrão Infusions Related to the Moisture of Yerba Maté (Ilex paraguariensis) Leaves. Brazilian Archives of Biology and Technology 2006; 49 (3): 399-404.

Bastos DHM, Oliveira, DM, Matsumoto RLT, Oliveira PC, Ribeiro ML. Yerba mate: Pharmacological Properties Research ad Biotechnology. Med Arom Plant Sci Biotec. 2007; 1(1) 37-46.

Bispo MS, Veloso MCC, Pinheiro HLC, Oliveira RFS, Reis JON, Andrade JB. Simultaneous Determination of Caffeine, Theobromine and Theophylline by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Chromatographic Science. 2002; 40: 45-48.

Carini M, Facino RM, Aldino G, Calloni M e Colombo L. Characterization of Phenolic Antioxidants from Maté (Ilex Paraguariensis) by Liquid Chromatography/ Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1998; 12: 1813-1819.

De Maria CAB, Moreira RFA. Métodos para análise de ácido clorogênico. Quím. nova. 2004; 27(4): 586-592.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J. Agric. Food Chem. 2009; 57 (5): 1768-1774.

Filip R, López P, Gilberti G, Coussio J, Ferraro G. Phenolic compounds in seven South American Ilex species. Fitoterapia. 2001; 72: 774-778.

Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. Ver Bras Cien Farm 2003, 39: 167-169.

Gnoatto SC, Schenkel, EP, Bassani VL. HPLC Method to Assay in Ilex paraguariensis Aqueous Extract. J. Barz. Chem. Soc. 2005; 16 (4): 723-726.

Gnoatto SCB, Bassani VL, Coelho GC, Schenkel EP. Influência do método de extração nos teores de metilxantinas em erva mate (*Ilex paraguariensis* A. ST.-HIL., Aquifoliaceae). Quim. Nova. 2007; 30(2): 304-307.

Gnoatto SCB, Dassonville-Klimpt A, Nascimento S, Galéra P, Boumediene K, Gosmann G, Sonnet P, Moslemi S. Evaluation of ursolic acid isolated from Ilex paraguariensis and derivatives on aromatase inhibition. European Journal of Medicinal Chemistry. 2008; 43: 1865-1877.

Gosmann G, Schenkel EP. A new saponin from mate, Ilex paraguariensis. Journal of Natural Products. 1989; 52: 1367-1370.

Gosmann G, Guillaume D. Triterpenoids saponinas from *Ilex paraguariensis*. Journal of Natural Products. 1995; 58(3): 438-441.

Gugliucci A, Bastos DHM. Chlorogenic acid protects paraoxonase 1 activity in high density lipoprotein from inactivation caused by physiological concentrations of hypochlorite. Fitoterapia. 2009; 80: 138-142.

Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radical in medicine and biology. 3ª ed. London; Claredon Press 2000; 543.

Harris CS, Burt AJ, Saleem A, Maile P, Martineau LC, Haddad PS, Bennett SAL, Arnasoni JT. A Single HPLC-PAD-APCI/MS Method for the Quantitative Comparison of Phenolic Compounds Found in Leaf, Stem, Root and Fruit Extracts of Vaccinium angustifolium. *Phytochem. Anal.* 2007; 18: 161–169.

Heck CI, Mejia EG. Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): A comprehensive review on chemistry, health implication, and technological consideration. Journal of Food Science. 2007; 72: R138–R151.

Heck CI, Schmalko M, Mejia EG. Effect of Growing and Drying Conditions on the Phenolic Composition of Mate Teas (*Ilex paraguariensis*). J. Agric. Food Chem. 2008; 56: 8394–8403

Horst MA, Lajolo FM. Biodisponibilidade de compostos bioativos de alimentos. In: Cozzolino SMF (org). Biodisponibilidade de nutrientes. 2 ed. São Paulo: Manole, 2007.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005, 53: 1841-1856.

INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial). DOQ-CGCRE-008. Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro: INMETRO, 2007. 35p.

Kraemer KH, Taketa ATC, Schenkel EP, Gosmann G. Matesaponin 5, a highly polar saponin from Ilex paraguariensis. Phytochemistry. 1996; 42(4): 1119-1122.

Liao LP, Li SL, Li P. Simultaneous determination of seven triterpenoids and triterpenoid saponins in *Folium Ilicis Purpureae* by high performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection. J. Sep. Sci. 2005; 28: 2061–2066.

Liu J, Liu Y, Klaassen CD Protective effect of oleanolic acid against chemical-induced acute necrotic liver injury in mice. Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1995; 16: 97-102.

Malik J, Szakova J, Drabek O, Balik J, Kokoska L. Determination of certain micro and macroelements in plant stimulants and their infusions. Food Chem 2008; 111: 520–525.

Martinet A, Ndjoko1 K, Terreaux1 C, Marston1 A, Hostettmann K, Schutz Y. NMR and LC-MSn Characterisation of Two Minor Saponins from *Ilex paraguariensis*. Phytochem. Anal. 2001; 12: 48–52.

Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effects of Maté Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. J. Agric. Food Chem. 2009; 57(5): 1775-1780.

Pavei C, Guzatto P, Petrovick PR, Gosmann G, González-Ortega G. Development and Validation of an HPLC Method for the characterization and Assay of the Saponins from *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (Mate) Fruits. J Liq Chrom Rel Technol 2007;30: 87–95.

Proestos C, Sereli D, Komaitis M. Determination of phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS. Food Chemistry. 2006; 95:44–52.

Sies H, Wilhelm S, Sevanian A. Nutritional, dietary and postprandial oxidative stress. J Nutr 2005; 135:969-972.

Stevanato R, Fabris S, Momo F. New Enzymatic Method for the determination of Total Phenolic Content in Tea and Wine. J Agric Food Chem 2004; 52(20): 6287–6293.

Streit NM, Hecktheuer LHR, Canto MW, Mallmann CA, Streck L, Parodo TV, Canterle LP. Relation among taste-related compounds (phenolics and caffeine) and sensory profile of erva-mate (Ilex paraguariensis). Food Chem 2007; 102: 560-564.

Willcox, Joye K., Ash, Sarah L. and Catignani, George L. Antioxidants and Prevention of Chronic Disease.,Crit Rev Food Sci Nut 2004; 44:4,275 — 295.

4. ISOLAMENTO DAS FRAÇÕES BIOATIVAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Este capítulo tem como objetivo apresentar os resultados relativos ao isolamento das frações de compostos bioativos do chá mate (fração fenólica e de xantinas; fração de sapogeninas; e fração melânica) bem como os resultados dos ensaios de atividade biológica das frações e da infusão do chá mate.

4.1. Introdução

Hoje em dia, a procura por alimentos comuns na dieta que contenham compostos bioativos, como os compostos fenólicos, as saponinas, as melaninas e as metilxantinas, é de grande interesse da comunidade científica e da saúde pública visto que dietas ricas nesses compostos previnem as DCNT (LEE *et al.,* 2000; SAVA *et al.,* 2001; SPARG *et al.,* 2004; BASTOS *et al.,* 2007a). O desenvolvimento de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, mal de Alzheimer e doença de Parkinson, é associadoo, em alguma extensão, com o estresse oxidativo (AMES *et al.,* 1993 e 1995; CHRISTEN, 2000; DIAZ *et al.,* 1997; LANG e LOZANO,1998).

A erva mate, além de suas propriedades estimulantes conhecidas de longa data pelos povos indígenas, aparentemente preenche os requerimentos necessários como bebida funcional. A presença de saponinas, compostos fenólicos e metilxantinas (SPARG *et al.,* 2004; BASTOS *et al.,* 2007a) nesta planta, respondem por estas propriedades.

A maioria dos estudos publicados acerca da erva mate foi realizada com a erva mate verde (para chimarrão). Recentemente pesquisas realizadas com a erva mate tostada (para chá mate) indicam que este produto preserva os compostos fenólicos, e as atividades biológicas como: atividade antioxidante, de prevenção ao diabetes e melhoria dos processos inflamatórios relacionados à obesidade (BASTOS *et al.,* 2007b;

OLIVEIRA *et al.,* 2008; MIRANDA *et al.,* 2008; MATSUMOTO *et al.,* 2009; MARTINS *et al.,* 2009).

GUGLIUCCI *et al.,* (2009), verificaram o efeito antiglicação de substâncias presentes na erva mate, como os ácidos clorogênico, caféico e oleanólico, indicando que a erva mate contém uma combinação de diferentes classes de substâncias que pode agir sinergisticamente para explicar seu efeito antiglicação. A exemplo do que foi realizado por estes autores, o presente estudo isolou os compostos bioativos do chá mate (fenólicos e xantinas, sapogeninas e melaninas) e testou a atividade biológica de cada classe de compostos por diferentes métodos *in vitro*.

A atividade antioxidante total dos fitoquímicos, baseada somente em uma propriedade, ou seja, em um método, como sua capacidade de seqüestrar radicais livres sintéticos, não fornece dados sobre os possíveis mecanisnos de ação. A atividade antioxidante dos fitoquímicos é multifuncional, assim é importante sua avaliação por mais de um método (FRANKEL e MEYER, 2000).

No caso deste trabalho, os métodos utilizados estão relacionados tanto à inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico (sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico) quanto à capacidade de transferir elétrons de um composto antioxidante (amostra) para um oxidante (capacidade de seqüestrar o radical DPPH e teste de capacidade antioxidante do radical oxigênio - ORAC). A avaliação da atividade ligante de ácidos biliares foi testada a fim de se verificar um provável mecanismo de redução do colesterol.

4.2. Materiais e métodos

Os solventes e reagentes utilizados foram de perfil analítico (P.A.) ou cromatográfico, dependendo da análise. Solventes e reagentes (P.A.) como: álcool etílico, álcool metílico, clorofórmio, acetato de etila, álcool butílico, ácido clorídrico, hidróxido de amônio, tampão fosfato, carbonato de sódio foram adquiridos da Casa Americana (CAAL) e Labsynth.

Os reagentes grau cromatográfico, acetonitrila, metanol, ácido acético, foram adquiridos da Carlos Erba Brasil (CER Brasil) e Sigma Aldrich (Alemanha).

Os padrões e reagentes 5-cqa (C3878), ácido caféico (C0625), teobromina (88304), cafeína (27600), ácido ursólico (89797), ácido oleanólico (O5504), ácido linoléico, Tween 40, β-caroteno, DPPH, AAPH, fluoresceína (Fluka, EUA), Folin-Ciocalteu, os ácidos biliares (cólico C1129, deoxicólico D2510, glicocólico G2878 e taurocólico T4009), resina Colestiramina (C4650), pancreatina (P8096) foram adquiridos da Sigma Aldrich (Alemanha). O kit Diazyme (DZ092-A) foi adquirido da Diazyme (EUA).

As análises espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível Shimadzu 1650PC.

4.2.1. Amostras

As amostras utilizadas no experimento estão descritas no item 3.2.1.2.

4.2.2. Separação das frações bioativas

4.2.2.1. Compostos Fenólicos e Xantinas

Os fenólicos e xantinas (FFX – fração de fenólicos e xantinas) foram coletados após eluição, diretamente do cromatógrafo, conforme descrito em 3.2.2.4.3. Para determinar o momento do início da coleta do analito, o volume do *flow cell* do detector (10µl) foi somado ao volume da tubulação de saída do detector de 750 x 0,5mm (147µl), resultando em atraso de 18s desde a detecção até a saída para coleta da fração. A fração coletada foi re-cromatografada para a confirmação do tempo de atraso de saída a partir da detecção. O tempo de coleta total de cada fração foi de 30 minutos a fim de garantir a coleta total dos compostos eluídos. As frações foram coletadas em frascos âmbar e posteriormente armazenadas sob refrigeração a -20ºC até o momento das análises.

4.2.2.2. Sapogeninas

Para a avaliação da atividade biológica *in vitro* das sapogeninas foram utilizados os extratos (FS) obtidos conforme descrito no item 3.2.2.4.2.

O teor de sapogeninas totais foi calculado somando-se a concentração relativa à área de cada pico identificado como sapogeninas, caracterizado pelo tempo de retenção e pelo o espectro de absorção a 203nm comparado ao dos padrões (ácido oleanólico e ácido ursólico).

4.2.2.3. Melaninas

O método para a obtenção do extrato melânico (EM) do chá mate foi o descrito por HUNG *et al.,* (2002) e HUNG *et al.,* (2007) com modificações, conforme ilustra a Figura 16. Resumidamente, 20g de erva mate foram extraídas com água em ebulição (~97ºC) por 10 minutos para a remoção dos polifenóis. As folhas úmidas foram alcalinizadas com NH_4OH (10%) e incubadas a 40ºC/12h. Em seguida o extrato foi filtrado e centrifugado a 15000g/30min. O sobrenadante contendo o extrato melânico (EM) foi submetido à hidrólise ácida (HCl) para eliminar proteínas e carboidratos. Em seguida, realizou-se extração de compostos apolares por meio da partição com diferentes solventes orgânicos (clorofórmio e acetato de etila) com a finalidade de remover lipídeos. O sobrenadante foi submetido 4 vezes à hidrólise ácida com HCl 2N para a eliminação de polifenóis de baixo peso molecular.

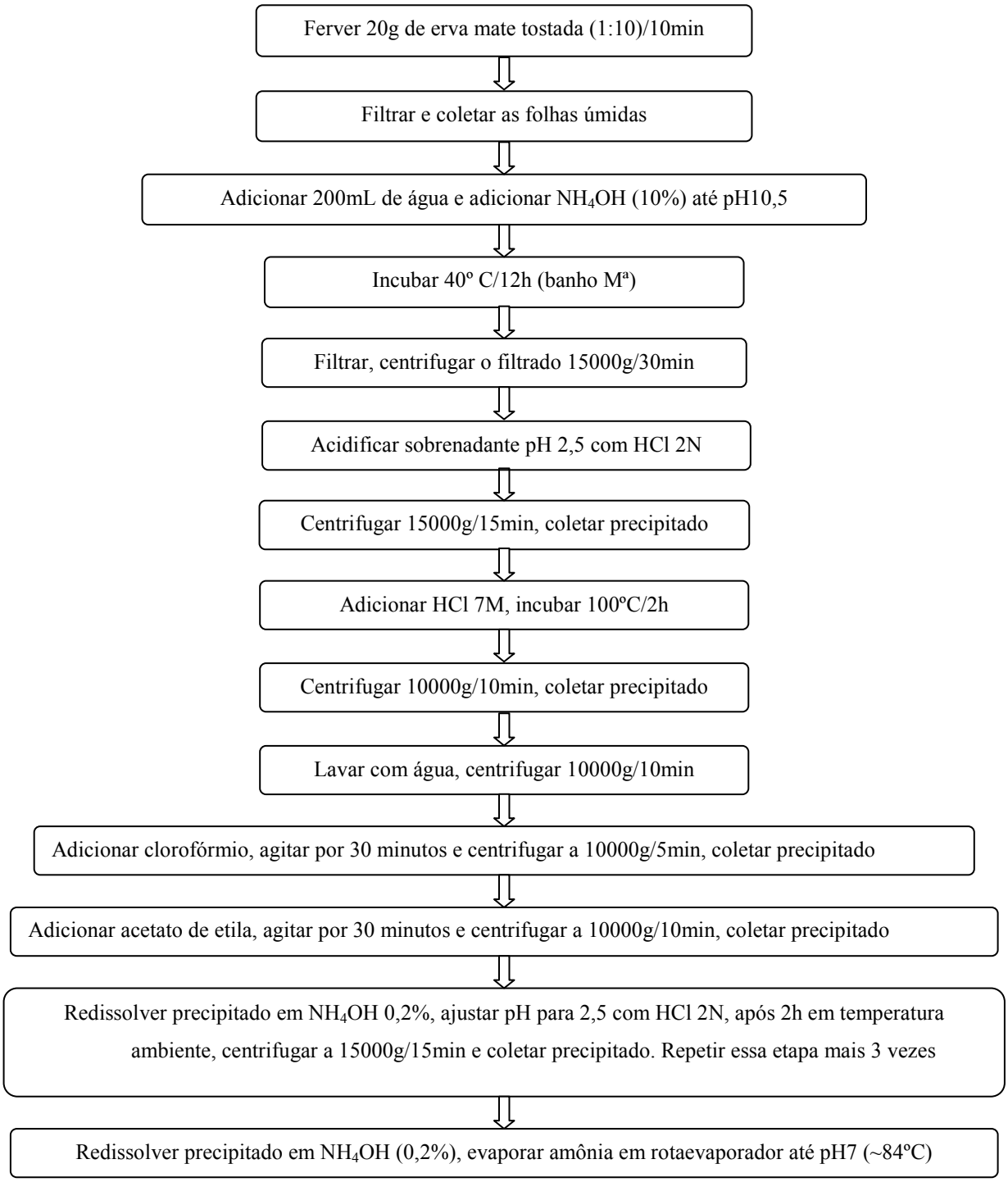


Figura 16: Fluxograma de extração de melaninas do chá mate

O conteúdo de melaninas foi avaliado por espectrofotometria empregando-se o reagente Folin-ciocalteu e o 5CQA como padrão, conforme descrito no item 7.1. Para a caracterização da fração melânica, o espectro de absorção de UV-VIS entre 190 e 800nm foi obtido e comparado com o da literatura (SAVA *et al.,* 2001).

4.2.3. Preparo do chá mate

Para a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* o chá mate foi preparado conforme descrito no item 3.2.2.1.

4.2.4. Avaliação da Atividade Biológica *in vitro*

As amostras de chá mate, as frações de compostos fenólicos e xantinas, sapogeninas e melaninas foram testadas pelos métodos de avaliação da atividade biológica *in vitro* descritos a seguir.

4.2.4.1. Capacidade de seqüestrar o radical DPPH

A capacidade de seqüestrar radicais livres pelo chá mate e suas diferentes classes de compostos bioativos foi analisada empregando-se o radical estável DPPH (2,2-difenil l-2-picrilhidrazil) conforme descrito por BRAND-WILLIAMS *et al.,* (1995) adaptado por YAMAGUCHI *et al.,* 1998. Alíquotas dos extratos (750µL) nas seguintes concentrações: chá mate: de 2,7 a 44,2µg/mL; FS: de 0,06 a 3,7µg/mL ; EM: de 1,3 a 46,1 µg/mL foram adicionadas de 1,5mL de solução DPPH na concentração de 20mg/mL em metanol.

Ao reagir com os antioxidantes do meio, o DPPH muda de coloração, podendo passar de violeta escuro para amarelo claro. Após 20 minutos de reação na ausência de luz verificou-se a absorbância no comprimento de onda de 517nm. O antioxidante

padrão BHT (concentrações de 9,2 a 46 µg/mL) e o padrão 5CQA (concentrações de 3,7 a 11,2 µg/mL) foram testados para comparação.

A porcentagem da atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ AA} = [1 - (\underline{\text{abs. da amostra} - \text{abs. do branco da amostra}})] \times 100$$
$$\text{abs. do branco do ensaio DPPH}$$

onde:

abs. = absorbância

branco da amostra = 0,75mL de amostra + 1,5mL de metanol

branco do ensaio = 0,75mL de metanol + 1,5mL de solução DPPH

O IC_{50} foi calculado e definido como a concentração de sólidos solúveis (chá mate) ou de compostos (sapogeninas e melaninas) que obteve 50% de atividade antioxidante.

4.2.4.2. Sistema de oxidação β-caroteno ácido linoléico

A avaliação foi feita conforme método descrito por MARCO (1968) e adaptado por MILLER (1971). O método consiste na avaliação da co-oxidação de substratos, por meio de ensaio espectrofotométrico, baseado na descoloração (oxidação) do β-caroteno induzida por produtos da degradação do ácido linoléico.

A degradação do β-caroteno na presença de O_2 a 50ºC foi avaliada pela diminuição da absorbância do meio de reação a 470nm, em intervalos de 30 minutos por 120 minutos, indicando a velocidade de transformação desse composto sob condições oxidantes (O_2 e temperatura 50ºC). Uma emulsão de β-caroteno e ácido linoléico é o substrato dessa reação. Vinte e oito microlitros de ácido linoléico foram adicionados a 28µL da solução de β-caroteno (20mg/mL de clorofórmio) e 200mg de *Tween 40* (emulsificante). Após a evaporação do clorofórmio sob nitrogênio, 140mL de água oxigenada (água destilada, tratada com O_2 durante 30 minutos) foram adicionados e agitados, para formar uma mistura homogênea.

Para o ensaio, 5mL desse substrato foram adicionados aos tubos com 1mL da amostra ou padrão diluídos adequadamente (concentração determinada por meio de testes) ou metanol (para o controle), homogeneizados e submetidos à leitura imediata a 470nm. Após a leitura, os tubos foram colocados em banho-maria (50ºC), e a absorbância medida a cada 30 minutos, por 120 minutos. O BHT foi usado como padrão.

A porcentagem da inibição da oxidação lipídica (IOL) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ IOL} = \left(\frac{\text{decaimento da abs*. do controle} - \text{decaimento da abs. da amostra}}{\text{decaimento da abs. do controle}}\right) \times 100$$

* abs. = absorbância

Controle = 1mL de metanol

4.2.4.3. Teste de capacidade antioxidante ao radical oxigênio - ORAC (*Oxygen Radical Antioxidant Activity*)

O teste de capacidade antioxidante ao radical oxigênio (ORAC) é baseado na inibição de radical peróxido induzido (PRIOR *et al.,* 2003). As amostras são homogeneizadas com fluoresceína (FL), 3',6'-dihidroxi[isobenzofurano-1[3H],9'[9H]-xanten]-3-ona e adicionadas da solução geradora de radicais livres 2,2′-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorida (AAPH). A temperatura do meio é mantida a 37^{o}C e o pH = 7,4, pelo emprego do tampão fosfato. A reação com os radicais livres consome a FL e o decaimento da fluorescência é medido espectrofotometricamente. O antioxidante Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E, foi utilizado como padrão.

Em uma cubeta de quartzo, 2,7mL de tampão fosfato (pH 7,4), 15 µL da solução de FL (2,93mg/L), 300 µL de amostra devidamente diluída e 300 µL da solução de AAPH (60g/L) foram adicionados, homogeneizados suavemente e submetidos a leitura a 493nm de excitação e 515nm de emissão, em espectrofluorímetro Perkin Elmer, com temperatura mantida a 37ºC durante todo o ensaio. A leitura foi realizada a cada 5

minutos por 65 minutos, resultando em uma curva de decaimento da fluorescência. O valor de ORAC foi avaliado como a área abaixo da curva (AUC) e calculado, considerando-se a AUC do antioxidante padrão Trolox, pela equação abaixo. Os resultados foram expressos como μmol equivalente de Trolox/mL ou xícara.

$$ORAC = 20 \times \text{diluição da amostra} \times \frac{(AUC_{amostra} - AUC_{branco})}{(AUC_{Trolox} - AUC_{branco})}$$

4.2.5. Atividade Ligante de Ácidos Biliares

A atividade ligante de ácidos biliares do chá mate, FS, EM e FFX foi determinada por método descrito por CAMIRE e DOUGHERTY (2003) e MASTIGE *et al,* (1981). O princípio do método se baseia na reação enzimática abaixo:

Ácidos biliares 3α-hidroxi + NAD $\xrightarrow{3\alpha\ HSD}$ ácidos 3-oxo-biliares + NADH

NADH + NBT $\xrightarrow{Diaforase}$ Formazan

Os ácidos biliares são conjugados primeiramente a ácidos-3-oxo-biliares em uma reação catalisada pela enzima 3 α-hidroxisteroide-desidrogenase (3α-HSD). Nesta reação de oxidação, uma quantidade equimolar de NAD é reduzida a NADH. Na continuação, o NADH é oxidado a NAD seguido da redução simultânea do NBT a formazan pela ação catalítca da diaforase. A intensidade da cor produzida é diretamente proporcional à concentração dos ácidos biliares na amostra.

Para cada ácido biliar (glicocólico, cólico, deoxicólico e taurocólico) foi elaborada uma curva de calibração utilizando-se o kit Diazyme (DZ092A), nas concentrações de 0 a 150μM diluídos em tampão fosfato (pH 7,4).

A reação colorimétrica foi realizada conforme o procedimento do kit: 300μL do reagente R3 (diaforase, NAD^- , NBT, ácido oxâmico) com 40μL do padrão, amostra ou água (para o branco), são incubados a 37ºC, após 4 minutos, adicionar o R2 (3α-HSD em tampão Tris), agitar suavemente, medir a absorbância a 540nm (A_1) e incubar a 37ºC

novamente por 5 minutos e ler novamente a absorbância (A_2) . Foi calculado o Δ540nm pela subtração da absorbância de A_1 de A_2 (Δ540nm= A_2 - A_1). Uma curva de calibração foi elaborada para cada ácido biliar, plotando-se o Δ540nm contra a correspondente concentração. As análises foram realizadas em duplicata. A concentração de ácidos biliares não captados pelas amostras foi calculada. A atividade ligante de ácidos biliares foi expressa como porcentagem de captação de ácidos biliares, subtraindo-se a concentração de ácido biliar do branco da concentração das amostras:

$$\% \text{ captação} = \frac{C_{branco} - C_{amostra} \times 100}{C_{branco}}$$

Em que:

C_{branco} = concentração de ácido biliar do branco

$C_{amostra}$ = concentração de ácido biliar da amostra

Para a avaliação da atividade ligante das amostras, foi seguido o protocolo de Camire e Dougherty (2003) com modificações, descrito na figura 17. Para o branco do ensaio foi utilizado tampão fosfato (pH 7,4).

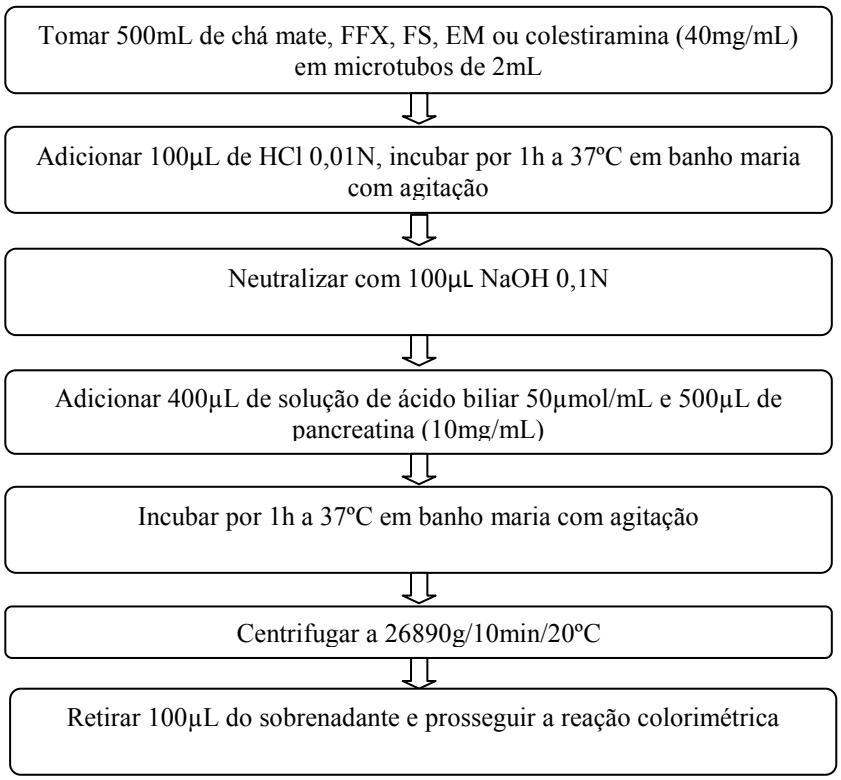


Figura 17: Fluxograma da atividade ligante de ácidos biliares

4.2.6. Análise estatística

Os resultados das diferentes análises foram apresentados como média e desvio padrão.

Foram calculados os valores de Kurtosis e Skewness e os respectivos desvios padrão para verificar se os resultados obtidos apresentavam distribuição normal. A distribuição é considerada normal quando, ao dividir-se o valor calculado para Kurtosis e Skewness pelo respectivo desvio padrão, o resultado situar-se entre -2 e +2. Utilizou-se ANOVA e teste post hoc Tukey, com nível de significância de 5% para avaliar se há diferença no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante das diferentes frações das marcas de chá mate analisadas, quando a distribuição dos resultados foi normal.

Os resultados que não apresentaram distribuição normal foram transformados em logaritmo neperiano (ln) e o teste reaplicado. Para os dados que não apresentaram

distribuição normal, testes não-paramétricos foram utilizados, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney (os teste foram executados entre as marcas X e Y, X e Z e Y e Z).

A correlação linear de *Pearson* entre o teor de compostos bioativos nas diferentes frações e as atividades biológicas foi avaliada.

Foram utilizados os programas *Microsoft Excel* para a tabulação dos dados e o programa SPSS 16.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*) para a execução dos testes estatísticos.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Atividade antioxidante do chá mate

A atividade antioxidante do chá mate foi testada por três métodos com diferentes mecanismos: capacidade de seqüestrar o radical DPPH, teste da capacidade de absorbância ao oxigênio radical (ORAC) e sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico.

A captação do radical DPPH (IC_{50}) do chá mate no ensaio com o radical DPPH variou de 11,9 a 16,7µg/mL, sendo a marca X a que apresentou o maior valor médio ($p<0,05$) e, portanto, a pior atividade antioxidante por este método. Não houve diferença entre as demais marcas ($p>0,05$) (tabela 8).

RIVELLI *et al.,* (2007) testaram os extratos hidroalcoólicos de erva mate verde com o radical DPPH e encontraram de 14,7 e 15,1 µg/mL, valores condizentes com os encontrados no chá mate neste trabalho, apesar das diferenças na matéria prima e métodos de extração. SAMARTH *et al.,* (2008) ao avaliarem a atividade antioxidante de extratos de cinco diferentes plantas (*A. vasica*, *A. paniculatus*, *Brassica compestris*, *M. piperita* e *S. fusiformis*), encontraram IC_{50} maiores que no presente trabalho: de 273 a 620µg/mL de extrato.

O chá mate apresentou atividade antioxidante média de 9997,7 µmolTrolox/xícara pelo método ORAC. A variação dos resultados foi de 9771,7 a

10403,5 µmolTrolox/xícara, e não apresentou diferença estatisticamente significante entre marcas (p>0,05). Na figura 18 está o gráfico com a curva de decaimento da fluorescência, ao longo do tempo, de uma amostra de chá mate.

A atividade antioxidante de cápsulas com extrato isolado de chá verde (*Camelia sinensis*) avaliada por ORAC situou-se entre 166 a 13690µmol Trolox/g (cada cápsula contém 1g de extrato) (SEERAM *et al.,* 2006). O chá mate avaliado no presente estudo apresentou elevada atividade antioxidante, se compararmos com a das cápsulas.

O suco de uva, bebida reconhecidamente com potencial protetor à saúde pela sua atividade antioxidante, apresentou 11,4 µmolTrolox/mL de atividade antioxidante pelo método ORAC (PRIOR *et al.,* 2003), enquanto o chá mate apresentou, neste trabalho 54,8µmolTrolox/mL.

O extrato aquoso de *Ilex paraguariensis* esteve entre os 5 melhores, dentre os 30 extratos de plantas avaliados quanto à capacidade antioxidante por ORAC (DUDONNÉ *et al.,* 2009). A atividade antioxidante da erva mate foi 592µmolTrolox/g, quase 5 vezes menor do que o observado no presente estudo (2822µmolTrolox/g de sólidos solúveis), sugerindo que o chá mate é um potente seqüestrador de radicais livres.

Tabela 8. Atividade antioxidante do chá mate: capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}; µg/mL) e atividade antioxidante por ORAC (µmolTrolox/xícara)

Marcas	Capacidade de sequestrar o radical DPPH (IC_{50}) (µg/mL)	Atividade antioxidante por ORAC (µmol Trolox/xícara)
X	$16,7\pm1,2^{b}$	$9771,7\pm1603,7^{a}$
Y	$13,4\pm2,2^{a}$	$9818\pm1392,8^{a}$
Z	$11,9\pm1,8^{a}$	$10403,5\pm3131,3^{a}$
Média chá mate	14,0±2,6	9997,7±352,2

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Médias±desvio padrão, n=9 para marcas e n=27 para chá mate

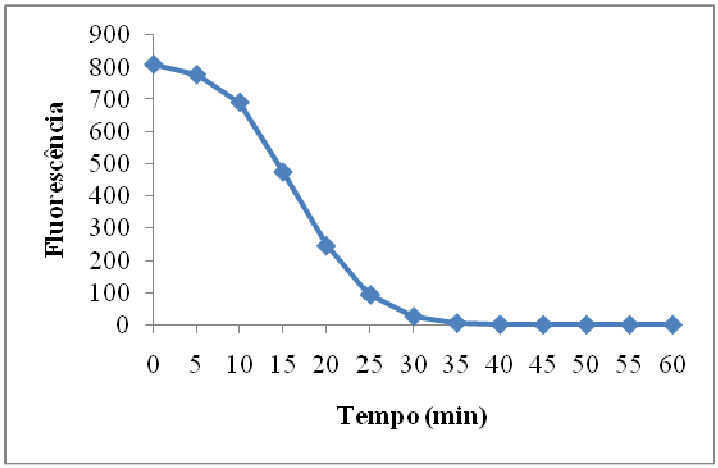


Figura 18: Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de chá mate

O chá mate apresentou em média 69,2% de inibição da oxidação no sistema testado (tabela 9). A concentração média de fenólicos totais e sólidos solúveis do chá mate para o ensaio foi de 187,5mg5CQA/mL e 0,5mg/mL, respectivamente. Não houve diferença estatisticamente significante entre as médias das marcas estudadas.

A atividade antioxidante do chá mate é equivalente à do BHT (figura 19), que apresentou 81,2 e 76,1% de inibição da oxidação em concentrações de 1 e 0,5mg/mL, respectivamente.

BASTOS *et al.*, (2007) testaram os extratos aquosos de erva mate para chimarrão (verde) e para chá mate (tostada) e verificou que a inibição da oxidação lipídica foi 78,3 e 86,2%, respectivamente (concentração de 0,5mg/mL). Os resultados foram estatisticamente significativos, indicando que a erva mate tostada apresenta maior atividade antioxidante por este método do que a erva mate verde.

MORAES-DE-SOUZA (2007) avaliou a atividade antioxidante do chá mate pelo mesmo método, verificando inibição superior ao descrito neste trabalho, na ordem de 77,5%. A diferença poderia ser explicada por diferenças na metodologia, como a proporção da erva mate/água utilizada para o preparo dos extratos.

Tabela 9: Atividade antioxidante (% de inibição), concentração de fenólicos totais (mg5CQA/mL) e de sólidos solúveis (mg/mL) das marcas de chá mate X, Y e Z

Marcas	% inibição	Fenólicos totais (mg5CQA/mL)	Sólidos solúveis (mg/mL)
X	73,4±9,4[a]	178,2±117,6	0,51±0,09
Y	65,84±10,6[a]	169,4±39,2	0,46±0,10
Z	68,5±10[a]	214,9±28,9	0,48±0,14
Chá mate	69,2±3,84	187,5±25	0,48±0,11

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Médias±desvio padrão, n=9 para marcas e n=27 para chá mate

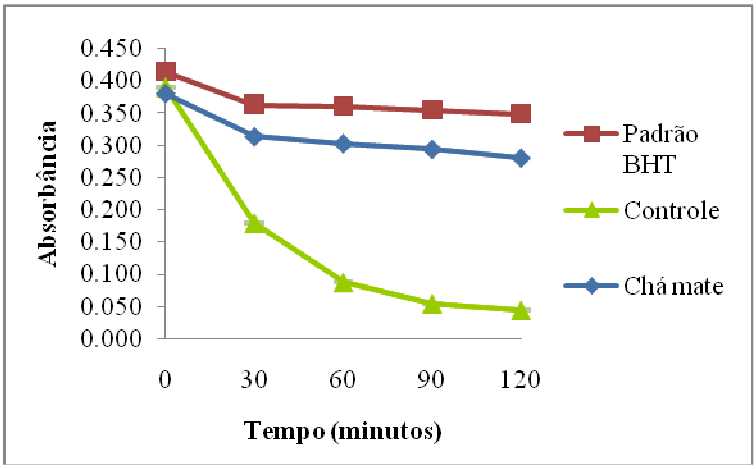


Figura 19: Curva cinética da inibição da oxidação lipídica do chá mate, do padrão BHT e do controle

Na tabela 10, estão os resultados dos testes de correlação entre a atividade antioxidante e os compostos bioativos determinados e sólidos solúveis.

Não houve correlação entre a % de inibição do ácido linoléico e a concentração de fenólicos totais ($p>0,05$). Já a correlação entre a proteção ao ácido linoléico e a concentração de sólidos solúveis mostrou-se significante estatisticamente ($p<0,05$).

Tabela 10: Correlação entre os resultados da atividade antioxidante do chá mate e os teores de compostos bioativos e sólidos solúveis

n=27		Sólidos solúveis	Fenólicos totais[1]	Fenólicos Totais[2]	5CQA	Ácido Caféico	Teobro-mina	Cafeína	Ácido ursólico	Ácido oleanólico
ORAC	CP	-0,326	0,083	0,300	0,239	0,078	-0,505	-0,570	0,390	0,501
	Sig.	0,097	0,680	0,128	0,222	0,700	0,007*	0,002*	0,044*	0,008*
% inibição	CP	0,405	-0,273	-0,051	-0,099	0,038	-0,084	-0,067	-0,128	-0,241
	Sig.	0,036*	0,169	0,802	0,623	0,853	0,677	0,740	0,524	0,225
DPPH	CP	0,486	-0,372	-0,662	0,349	0,471	-0,657	-0,609	-0,668	-0,667
	Sig.	0,010*	0,056	0,000**	0,074	0,013*	0,000**	0,001*	0,000**	0,000**

CP= correlação de Pearson; Sig.= significância; Fenólicos totais[1]: por Folin; Fenólicos Totais[2]: por CLAE;
*p<0,05; **p<0,001

A atividade antioxidante determinada pelo método ORAC não apresentou correlação estatisticamente significativa relativamente com o teor de 5CQA ou de ácido caféico ($p>0,05$). Em relação ao ácido ursólico e ao oleanólico a correlação foi estatisticamente significativa positiva ($p<0,05$) (tabela 11). A correlação com o conteúdo de teobromina e cafeína foi negativa ($p<0,05$), ou seja, quanto menor a quantidade de teobromina e cafeína, maior a atividade antioxidante por ORAC.

DUDONNÉ *et al.,* (2009) avaliaram a correlação entre a atividade antioxidante de extratos de plantas pelos métodos ORAC, capacidade de seqüestrar o radical DPPH e conteúdo de fenólicos totais por Folin e encontraram correlações estatisticamente significantes ($cP\geq0,852$). Entretanto, a mesma correlação não foi encontrada pelo presente estudo, indicando que a atividade antioxidante do chá mate não pode ser atribuída exclusivamente à presença dos compostos fenólicos.

No presente trabalho a captação do radical DPPH apresentou correlação positiva estatisticamente significativa com a concentração de sólidos solúveis e de ácido caféico ($p<0,05$), resultado que pode ser encontrado na tabela 10. Embora positiva a correlação, esse resultado esconde uma proporção inversa, pois no caso do IC_{50} quanto menor o resultado, melhor a atividade antioxidante. Contudo, em outro estudo, o ácido caféico apresentou atividade antioxidante pelo método, demonstrando ser um excelente doador de hidrogênios, e, portanto seqüestrador de radicais livres (VON GADOW *et al,.* 1997).

Para a concentração de fenólicos totais, de metilxantinas e de sapogeninas, a correlação com a atividade antioxidante pelo método foi negativa ($p<0,05$). Não foi observada correlação significativa entre o conteúdo de 5CQA com a atividade antioxidante ($p>0,05$).

TABATA *et al.,* (2008) encontraram excelente correlação entre a atividade antioxidante pelo método de captação do radical DPPH de *Mallotus japonicus,* erva utilizada para preparo de infusões no Japão, e o conteúdo de compostos fenólicos totais ($cP=0,975$; $p<0,05$), mas não encontraram correlação entre a atividade antioxidante pelo método e o conteúdo de outros fenólicos determinados, incluindo o ácido clorogênico, como no presente trabalho.

Segundo HUANG *et al.,* (2005) alguns compostos fenólicos, como a tirosina por exemplo, reagem com o reagente de Folin, mas não apresentam atividade antioxidante. Portanto, pode não haver necessariamente uma boa correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antioxidante de uma amostra (HUANG *et al.,* 2005).

A atividade antioxidante não depende apenas da quantidade de fenólicos, mas também dos tipos de compostos, posição de hidroxilas e anéis aromáticos. Existem diversos mecanismos propostos pelos quais os fenólicos seqüestram radicais livres, incluindo deslocalização de elétrons e formação de ligações de hidrogênio intra-moleculares. O potencial de óxido-redução dos compostos fenólicos está relacionado à reatividade química, como um doador de elétron, e, portanto a função antioxidante (BASTOS *et al.,*2007b; SOUSA *et al.,* 2004).

O chá mate apresentou atividade antioxidante pelos métodos estudados. Estes resultados podem ser atribuídos em parte à presença de compostos fenólicos. Outras substâncias presentes no chá mate, não avaliadas neste trabalho como aminoácidos, vitaminas e flavonóides, podem ter influenciado os resultados obtidos (HECK e MEJIA, 2007).

De maneira geral, os métodos correlacionaram-se bem entre si (tabela 11). A correlação negativa encontrada entre a capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}) e a atividade antioxidante por ORAC têm uma conotação positiva, uma vez que na captação do radical DPPH os valores menores representam melhores resultados. A % de inibição da oxidação do ácido linoléico correlacionou-se com a capacidade de seqüestrar radicais DPPH, mas não com a atividade antioxidante por ORAC.

Esses resultados não concordam com os de DUDONNÉ *et al.,* (2009), que encontraram correlações significativas positivas entre os métodos utilizados para avaliar extratos de 30 plantas.

Tabela 11: Correlação entre os métodos

Métodos		ORAC	% inibição
% inibição	CP	-0,375	
	Sig.	0,054	
DPPH	CP	-0,473	0,493
	Sig.	0,013*	0,009*

CP= correlação de Pearson; Sig.= significância; * p<0,05

4.3.2 Separação das frações e atividade antioxidante

4.3.2.1 Compostos fenólicos e xantinas (FFX)

A concentração e rendimento de fenólicos e xantinas totais nas FFX coletadas do cromatógrafo estão descritas na tabela 12. O rendimento foi calculado em relação à concentração de sólidos solúveis no chá mate. Os resultados foram expressos em µg de fenólicos ou xantinas totais por mL de extrato coletado (µg/mL).

Tabela 12. Concentração e rendimento de compostos fenólicos e xantinas totais da fração de fenólicos e xantinas do chá mate

Marcas	Compostos fenólicos totais		Xantinas totais	
	µg/mL	Rendimento (%)	µg/mL	Rendimento (%)
X	0,36±0,11[a]	6,2±2,0[a]	0,13±0,04[b]	2,2±0,5[c]
Y	0,41±0,07[b]	7,3±0,9[b]	0,10±0,01[a]	1,8±0,3[b]
Z	0,62±0,12[c]	10,3±1,0[c]	0,10±0,01[a]	1,7±0,2[a]
FFX Chá mate	0,46±0,14	7,9±2,2	0,11±0,02	1,9±0,4

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante (p<0,005)
Médias±desvio padrão, n=9 para marcas e n=27 para média frações

FFX apresentou 0,46 e 0,11 µg/mL de fenólicos e xantinas totais, respectivamente. O rendimento de fenólicos variou de 6,2 a 10,3% e de xantinas de 1,7 a 2,2% entre as marcas. Há diferença estatisticamente significante entre as marcas X, Y e Z para o conteúdo de fenólicos totais (p<0,05), sendo a marca Z a que apresentou o

maior teor. Para o teor de xantinas, a marca X foi mais concentrada ($p<0,05$), não houve diferença estatisticamente significante entre as marcas Y e Z.

Assim como na composição de fenólicos e xantinas do chá mate, houve diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) entre todas as marcas, exceto entre Y e Z para o conteúdo de xantinas. Esse resultado é justificado pelo maior percentual de cafeína do que de teobromina no chá mate e, portanto, na FFX (aproximadamente 15% de teobromina e 85% de cafeína no total de xantinas).

Atividade Antioxidante

A tabela 13 apresenta os resultados da atividade antioxidante realizada pelos métodos de ORAC e sistema de oxidação β-caroteno e Ácido linoléico.

Não foi possível realizar o ensaio de captação do radical DPPH devido, provavelmente, à baixa concentração de fenólicos no extrato e à presença de xantinas. O IC_{50} do padrão 5CQA é 0,5 µg/mL, porém, apesar da concentração média de fenólicos totais nas FFX ser 0,46 µg/mL, a mesma não apresentou atividade antioxidante pelo método.

Não houve diferença estatisticamente significante entre as marcas para a atividade antioxidante avaliada pelo método ORAC e de inibição da oxidação do ácido linoléico da fração fenólica ($p>0,05$) (tabela 13). A atividade antioxidante por ORAC variou de 22461,8 a 44573,8µmolTrolox/mg5CQA e foi em média 30275 µmolTrolox/mg5CQA.

A % de inibição da oxidação lipídica foi em média 32,2%, variando de 27,1 a 37,8% entre as marcas, pior do que a do padrão BHT na mesma concentração (72,1%). Não houve diferença estatisticamente significante entre a atividade antioxidante pelo método ($p>0,05$). Foi realizado um ensaio com os padrões 5CQA, teobromina e cafeína, nas proporções e concentrações encontradas nos extratos. Quando isolados os compostos não inibiram a oxidação e quando, combinados, ou seja, solução de 5CQA, teobromina e cafeína, os resultados foram expressivos 78,7% indicando ação sinérgica.

O gráfico (A) (figura 20) mostra a curva cinética das absorbâncias médias da oxidação lipídica pelo sistema de oxidação de β-caroteno e ácido linoléico da fração de fenólicos e xantinas, mostrando que a atividade antioxidante da fração é um pouco menor do que do padrão BHT. O decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de FFX (Figura 20 B).

Tabela 13: Atividade antioxidante da FFX

Marcas	Sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico			Atividade antioxidante por ORAC (µmol Trolox/mg5CQA)
	% inibição	Concentração de fenólicos no ensaio (µg/mL)	Concentração de Xantinas totais no ensaio (µg/mL)	
X	37,8±7,7[a]	0,22±0,05	0,09±0,06	22461,8±12548,7[a]
Y	34,5±13,4[a]	0,27±0,09	0,07±0,03	23791,2±10093,2[a]
Z	27,1±8,7[a]	0,31±0,03	0,05±0,01	44573,8±30236,7[a]
FFX	32,2±10,5	0,23±0,07	0,07±0,04	30275,6±21623,2

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p < 0,05$). Médias±desvio padrão, n=9 para marcas e n=27 para média frações

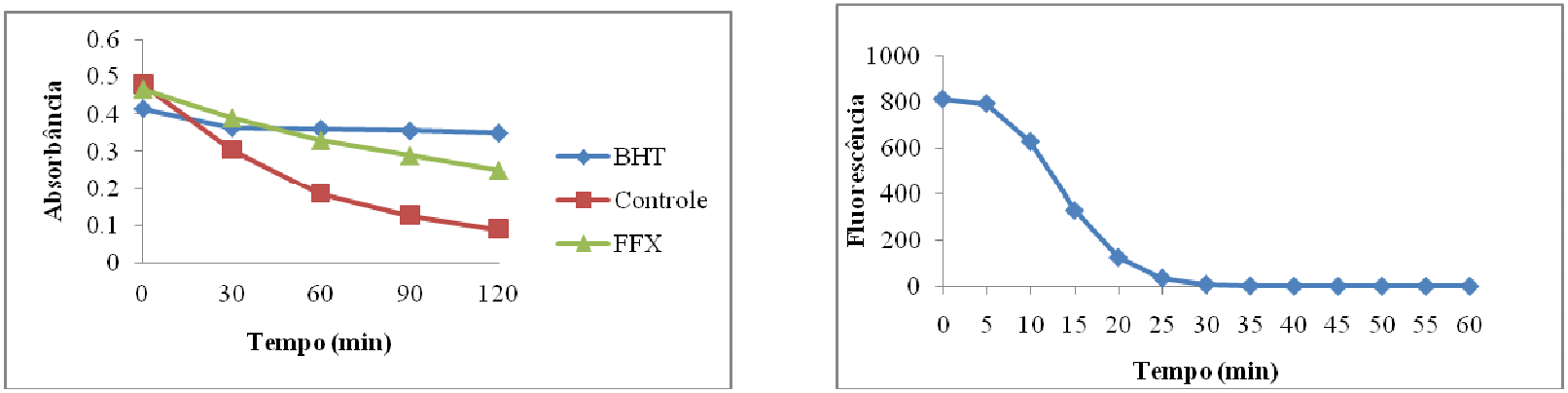


Figura 20: (A) Curva cinética da inibição média da oxidação lipídica pelo sistema de oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico de FFX, do padrão BHT e do controle. **(B)** Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de FFX

Assim como ocorreu para o chá mate, a atividade antioxidante por ORAC da FFX apresentou correlação negativa estatisticamente significante com o conteúdo de teobromina, cafeína e xantinas totais (tabela 14). Esses resultados são condizentes com LEE (2000), que testou a cafeína pelo método ORAC e não verificou atividade antioxidante da substância.

O teor de 5CQA e ácido caféico correlacionaram-se com a atividade antioxidante pelo método ORAC ($p<0,05$ e $p<0,001$, respectivamente), como verificado por XU e CHANG (2008). ZHANG *et al.,* (2006) verificaram que o ácido clorogênico e o caféico apresentam atividade antioxidante pelo método, sugerindo que os compostos são capazes de seqüestrar radicais livres.

A correlação foi negativa entre a % de inibição da oxidação do ácido linoléico e o conteúdo de 5CQA, ácido caféico e fenólicos totais ($p<0,05$). Não houve correlação entre os métodos ($p>0,05$).

As correlações negativas entre as % de inibição e as concentrações de 5CQA, ácido caféico e fenólicos totais encontradas nesse trabalho podem ser explicadas pela baixa solubilidade dos antioxidantes lipofílicos (compostos fenólicos) no meio aquoso (substrato), conforme foi relatada por VON GADOW *et al.,* (1997). Os autores testaram o ácido caféico dentre outros ácidos fenólicos pelo método, resultando em atividade pró-oxidante. Ao contrário do que foi observado no presente estudo com a fração isolada de fenólicos e xantinas, os autores verificaram forte atividade antioxidante do ácido caféico pelo método de seqüestro do radical DPPH, demonstrando ser bom doador de hidrogênio para radicais livres,

Tabela 14: Correlação entre os resultados da atividade antioxidante da FFX e os teores de compostos bioativos do chá mate

n=27		5CQA	Ácido Caféico	Teobro-mina	Cafeína	Fenólicos totais	Xantinas totais	% de inibição
ORAC	CP	0,610	0,803	-0,564	-0,486	0,577	-0,481	-0,184
	Sig.	0,001*	0,000**	0,002*	0,010*	0,002*	0,011*	0,358
% inibição	CP	-0,480	-0,433	0,042	0,093	-0,478	0,054	
	Sig.	0,011*	0,024	0,836	0,644	0,012*	0,788	

CP= correlação de Pearson; Sig.= significância. * p<0,05; ** p<0,001

4.3.2.2. Sapogeninas

A tabela 15 apresenta o conteúdo de sapogeninas totais na FS obtida a partir da hidrólise e purificação da erva mate tostada. A concentração foi expressa em µg de equivalente de ácido ursólico por mL de FS e foi calculado o rendimento de sapogeninas totais em relação a erva mate tostada (peso seco).

A concentração média foi de 171,7µg/mL de sapogeninas totais. Não houve diferença significativa de concentração entre as marcas, apesar do rendimento da extração ter sido diferente entre as marcas X e Z (p<0,05).

Tabela 15. Concentração média de sapogeninas totais e rendimento médio da FS

Marcas	Sapogeninas totais	
	(µgEAU/mL)	Rendimento %
X	169,0±65,3[a]	0,028±0,011[a]
Y	192,7±105,6[a]	0,032±0,017[ab]
Z	153,2±48,7[a]	0,046±0,025[a]
FS	171,7±77,8	0,035±0,020

Letras diferentes na mesma coluna indicam que ln das médias diferem significativamente (p<0,05)
Médias±desvio padrão, n=9 para marcas e n=27 para média frações

Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante da FS pelos três métodos utilizados encontram-se na tabela 16. Nenhum dos métodos apresentou diferença estatisticamente significante de atividade antioxidante entre as marcas ($p>0,05$).

O sequestro do radical DPPH (IC_{50}) da FS foi em média 1,1mgEAU/mL, variando de 0,9 a 1,4mgEAU/mL. O ácido oleanólico foi testado em diversas concentrações com o radical DPPH, mas a absorbância não sofreu alteração. O padrão BHT apresentou IC_{50} = 23,8mg/mL, valor 20 vezes maior do que o obtido pelo extrato de sapogeninas, sendo a FS antioxidante mais potente do que o BHT. Apesar do padrão ácido oleanólico não ter apresentado capacidade de seqüestrar os radicais do meio, saponinas extraídas de pepino japonês e batata doce apresentaram forte atividade antioxidante pelo método DPPH (HUSNI *et al.,* 2009; DINI *et al.,* 2009). O ácido oleanólico é uma sapogenina (resultado da hidrólise das saponinas, que separa a fração aglicona do açúcar), fato que pode explicar a diferença de resultados nos ensaios.

A atividade antioxidante pelo método ORAC foi de 71,1 µmol Trolox/µgEAU, com variação de 53,8 a 80,6 µmol Trolox/µgEAU.

A % de inibição pelo sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico variou de 60,3 a 69,9%, com média de 66,2%. Foram testados os padrões ácidos ursólico e oleanólico pelo método, nas concentrações 1 e 0,1mg/mL, respectivamente (não foi possível testar ambos nas duas concentrações devido às quantidades reduzidas dos padrões). O ácido ursólico apresentou 48,18% de inibição, enquanto o ácido oleanólico se mostrou pró-oxidante relativamente ao controle, ou seja, o resultado foi negativo (figura 21). A FS apresentou, portanto melhor atividade antioxidante do que os padrões testados, demonstrando um possível efeito sinergístico das sapogeninas.

Tabela 16. Atividade antioxidante das frações de sapogeninas

Marcas	Capacidade de sequestrar o radical DPPH (IC_{50}) (mgEAU/mL)	% inibição pelo sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico (%) (0,1mg/mL)	ORAC (µmol Trolox/µgEAU)
X	1,1±0,6[a]	69,9±9,2[a]	53,8±29,4[a]
Y	1,4±1,0[a]	60,3±12,1[a]	60,1±13,2[a]
Z	0,9±0,3[a]	68,3±8,0[a]	80,1±27,4[a]
Média FS	1,1±0,2	66,2±10,4	71,1±26,7

Letras diferentes na mesma coluna indicam que ln das médias diferem significativamente (p<0,05)

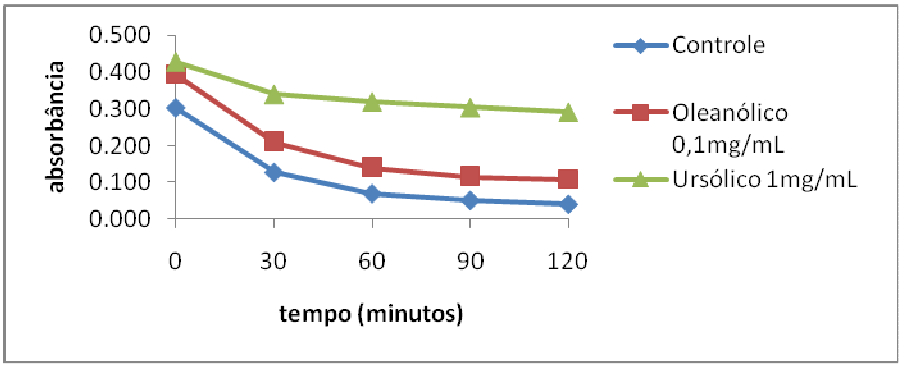


Figura 21: Curva cinética da inibição média da oxidação lipídica pelo sistema de oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico dos ácidos ursólico e oleanólico e do controle

Tabela 17: Correlação entre a atividade antioxidante da FS (ORAC e % inibição pelo sistema de oxidação β -caroteno e ácido linoléico) e os teores de compostos bioativos do chá mate

n=27		Sapogeninas Totais	Ácido Ursólico	Ácido oleanólico	ORAC	% de inibição
ORAC	CP	-0,486	-0,109	-0,161		
	Sig.	0,016*	0,613	0,453		
DPPH	CP	0,896	-0,095	-0,095	-0,320	0,160
	Sig.	0,001*	0,809	0,808	0,935	0,681
% inibição	CP	-0,571	0,073	0,002	-0,238	
	Sig.	0,002*	0,717	0,991	0,262	

CP= correlação de Pearson; Sig.= significância. * p<0,05

Na tabela 17 encontram-se as correlações entre o conteúdo de sapogeninas e a atividade antioxidante avaliada pelos diferentes métodos. Apenas o conteúdo de

sapogeninas totais correlacionou-se com a atividade antioxidante por ORAC e pelo sistema de oxidação do ácido linoléico ($p<0,05$). Como essas correlações foram negativas, é possível que as sapogeninas presentes na fração isolada não sejam responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pela FS.

4.3.2.3. Melaninas

O teor de melaninas do extrato melânico (EM) foi avaliado pela complexação com o reagente de Folin-Ciocalteu e os resultados foram expressos de duas maneiras: em mg de equivalente de 5CQA por 50mL do extrato ; e em mg de equivalente de 5CQA por mg de sólidos solúveis (SS) do EM. O rendimento (%) dos fenólicos totais do EM em relação à erva mate tostada (peso seco) foi calculado. Esses resultados, assim como a concentração de sólidos solúveis do EM estão na tabela 18.

Tabela 18: Concentração média±desvio padrão de sólidos solúveis (mg/mL), fenólicos totais (mg5CQA/50mL EM) e (mg5CQA/mgSS) e rendimento (%)

Marcas	Sólidos Solúveis EM (mg/mL)	Rendimento da extração (%)	Fenólicos totais EM (mg5CQA/50mL EM)	Fenólicos totais (mg5CQA/mg)
X	$4,3±0,8^{a}$	$1,0±0,2^{ab}$	$187,8±29,9^{ab}$	$0,9±0,1^{c}$
Y	$6,8±2,5^{b}$	$1,2±0,6^{b}$	$229,4±112,8^{b}$	$0,8±0,1^{b}$
Z	$5,2±0,4^{a}$	$0,9±0,1^{a}$	$159,6±11,5^{a}$	$0,6±0^{a}$
EM	5,7±2,0	1,0±0,4	192,3±72,8	0,8±0,1

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$)

A média de fenólicos totais obtida no EM foi 192,3mg5CQA. O intervalo de variação observado foi de 159,6 a 229,4mg5CQA, com diferença estatisticamente significante ($p<0,05$) entre as marcas Y e Z.

O rendimento médio obtido do chá mate (1%) foi menor que o obtido do chá preto (2%) por SAVA *et al.,* (2001). O rendimento variou estatisticamente entre as marcas ($p<0,05$).

Para a confirmação da identidade do extrato melânico, o espectro de absorção UV foi obtido e comparado com o espectro de melanina sintética da literatura (SAVA *et al.,* 2001). O espectro do EM apresentou um "ombro" característico da substância, sendo similar ao da melanina sintética, mas não idêntico. Os espectros estão na figura 22.

(A) (B)

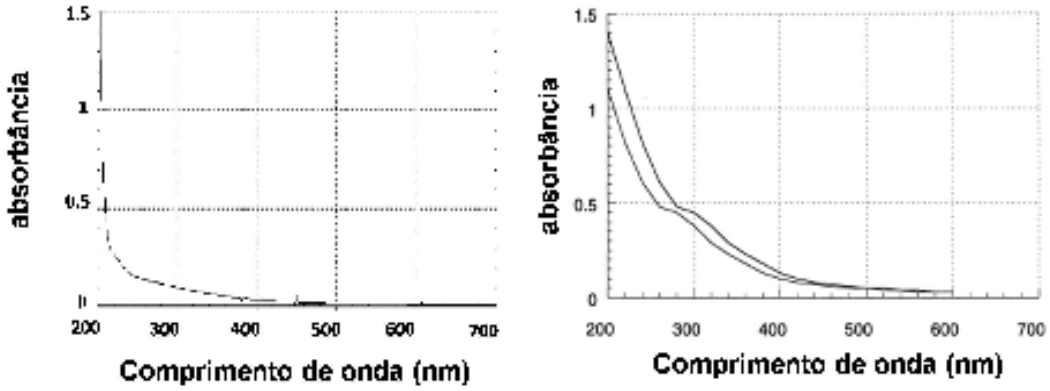


Figura 22. Espectros de absorção UV: (A) do extrato melânico do chá mate; (B) do chá preto. **Fonte:** SAVA *et al.,* (2001)

Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante do EM estão dispostos na tabela 19.

A capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}) variou de 10,4 a 11,1µg/mL com média de 10,9µg/mL. A atividadade antioxidante por ORAC foi, em média, 73,1µMolTrolox/mg5CQA, variando de 65,7 a 85,7µMolTrolox/mg5CQA. Não houve diferença entre marcas para a atividade antioxidante do EM, exceto pelo sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico ($p<0,05$).

A % inibição do EM na concentração de 1mg/mL variou de 61,1 a 80,2%, com média de 70%. Os resultados foram diferentes entre marcas ($p<0,05$), sendo a marca X a que apresentou a melhor % de inibição.

O potencial efeito preventivo das melaninas foi observado em outros estudos. A atividade antioxidante *in vivo* e efeito hepatoprotetor das melaninas de chá preto foram verificados após a administração do extrato em ratos (HUNG *et al.,* 2004). Utilizando o

ensaio *in vitro* de formação de células plaquetárias, o pigmento melânico extraído das folhas de chá preto apresentou atividade imuno-moduladora (SAVA *et al.,* 2001).

Tabela 19: Atividade Antioxidante melaninas

Marcas	IC_{50} (µg/mL)	% inibição pelo sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico (%) (1mg/mL)	ORAC* (µMolTrolox/mg5CQA)
X	10,4±1,6[a]	80,2±3,2[c]	65,7±13,9[a]
Y	11,1±0,7[a]	68,7±5,2[b]	68,0±24,3[a]
Z	11,1±1,3[a]	61,1±4,0[a]	85,7±26,7[a]
EM	10,9±1,2	70±9	73,1±23,3

* Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença estatisticamente significante entre as médias de ln.

Na tabela 20 estão os resultados das correlações entre a atividade antioxidante do EM pelos três métodos e o conteúdo de sólidos solúveis e fenólicos totais, e entre métodos.

Não houve correlação estatisticamente significante entre nenhum dos métodos realizados e os conteúdos de fenólicos totais e sólidos solúveis ($p>0,05$), bem como entre os métodos. Indicando que a atividade antioxidante apresentada pelo EM não está relacionada ao teor de sólidos solúveis ou melaninas do extrato.

Tabela 20: Correlação entre a atividade antioxidante da EM e os teores de compostos bioativos do chá mate

		Fenólicos totais	Sólidos solúveis	ORAC	% de inibição
ORAC (n=27)	CP	-0,187	-0,056		
	Sig.	0,349	0,787		
DPPH (n=9)	CP	0,153	0,357	-0,512	-0,453
	Sig.	0,695	0,346	0,159	0,221
% inibição (n=27)	CP	0,172	0,033	-0,210	
	Sig.	0,390	0,874	0,293	

CP= correlação de Pearson; Sig.= significância. * p<0,05

As figuras abaixo (23, 24 e 25) ilustram a atividade antioxidante medida pelo sistema de oxidação β-caroteno e ácido linoléico, ORAC e DPPH do chá mate e suas frações (FFX, EM, FS). É possível observar, nos três casos que a FS apresentou elevada capacidade de inibição da oxidação, acima dos padrões (BHT e Trolox), demonstrando seu potencial contra a oxidação lipídica e captação de radicais livres. A capacidade de seqüestro do radical DPPH (IC_{50}) de FS é inferior aos demais. O extrato melânico também demonstrou excelente atividade antioxidante por todos os métodos empregados neste estudo.

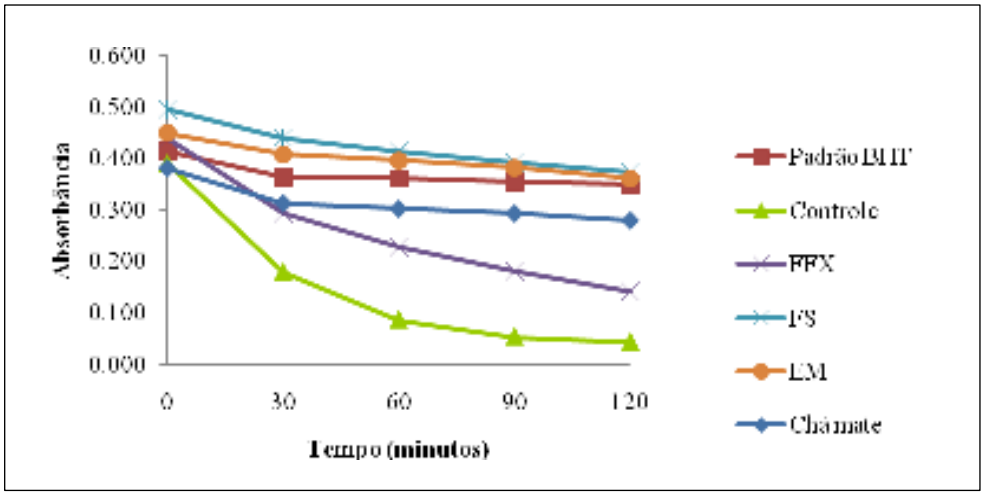


Figura 23: Média da cinética das FFX, FS, EM e do chá mate em comparação ao controle e ao padrão BHT do sistema oxidação de β-caroteno e Ácido linoléico

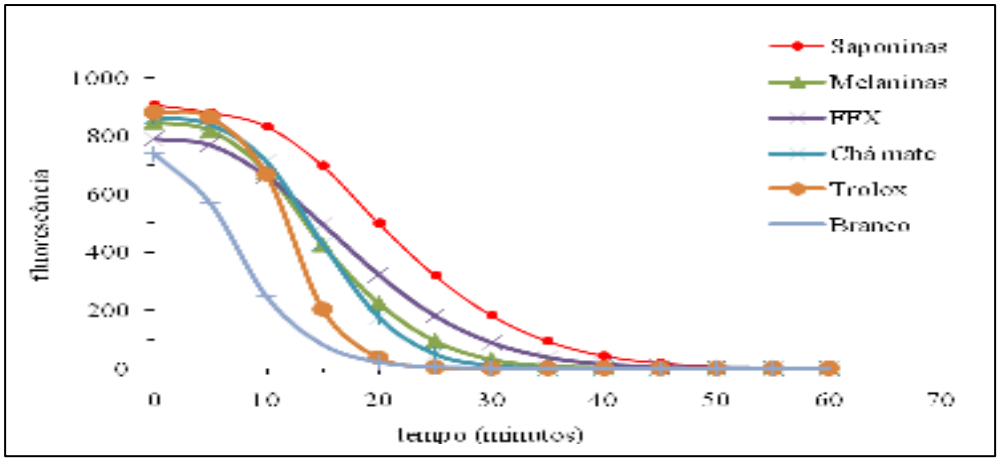


Figura 24: Gráfico do decaimento da fluorescência ao longo do tempo de uma amostra de chá mate, dos extratos FFX, EM e FS, Trolox e branco

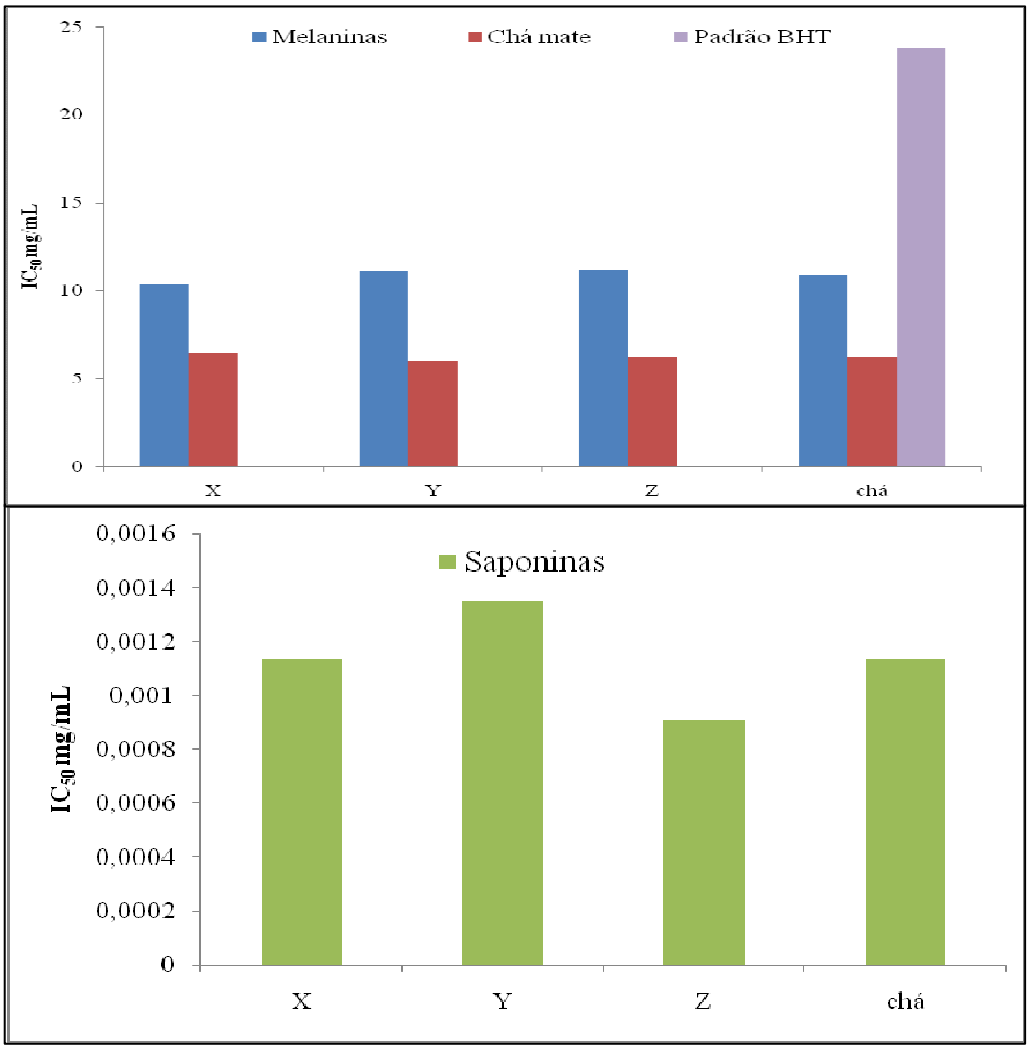


Figura 25: Capacidade de seqüestrar o radical DPPH (IC_{50}) de FFX, FS, EM, chá mate e BHT

4.3.3. Atividade ligante de ácidos biliares

O ensaio da atividade ligante de ácidos biliares *in vitro* é um método mais rápido e barato relativamente a ensaios *in vivo,* que visam avaliar o potencial hipocolesterolemiante de alimentos, por ser este o mecanismo de ação de fibras dietéticas, proteínas e saponinas (SIDHU e OAKENFULL, 1986; TIENGO, 2007). Entretanto o método não mimetiza todas as etapas da digestão, como a mastigação, sendo necessário simular por meio da trituração dos alimentos sólidos antes do ensaio (CAMIRE e DOUGHERTY, 2003).

O ensaio da atividade ligante de ácidos biliares foi realizado para a colestiramina (sequestrante padrão de ácidos biliares), padrão puro de saponinas, chá mate, FFX, FS e EM. Foram utilizados, no experimento, quatro ácidos biliares, testados individualmente: ácido glicocólico, ácido cólico, ácido deoxicólico e ácido taurocólico. As curvas de calibração para o teste para os ácidos biliares testados encontram-se na figura 26.

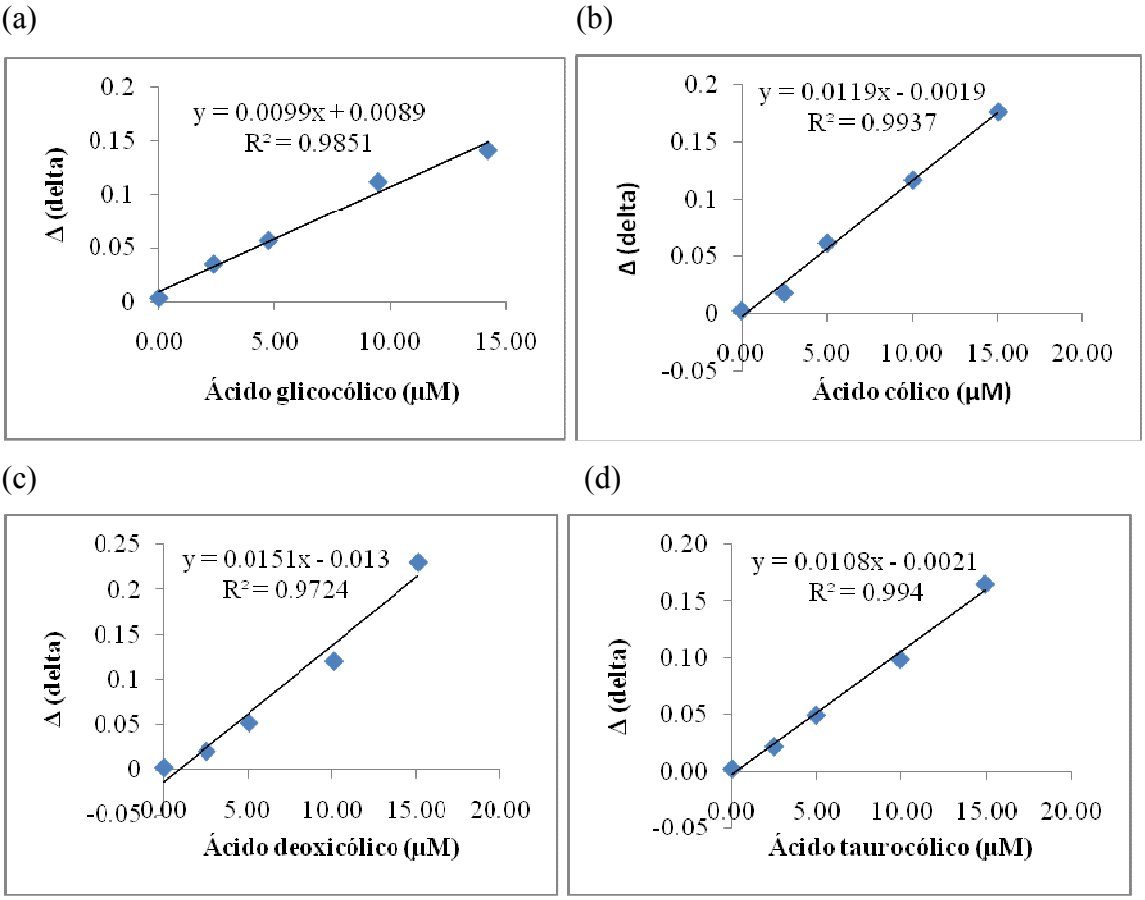


Figura 26: Curvas padrão dos ácidos biliares (µM): ácidos glicocólico (a), cólico (b), deoxicólico (c) e taurocólico (d)

A porcentagem de captação apresentou-se diferente para cada ácido biliar testado (figura 27). A colestiramina apresentou a maior atividade ligante para o ácido glicocólico e deoxicólico (187,5% e 58,8%), mas a diferença não foi significativa em relação à todas as amostras. CAMIRE e DOUGHERTY (2003) e TIENGO (2007) também relataram maior atividade da colestiramina em relação às suas amostras ($p>0,05$). YOSHIE-STARK e WASCHE (2004) observaram menor atividade ligante da colestiramina para o ácido glicocólico (25%) e não observaram diferença para o deoxicólico, comparado as suas amostras.

Em relação aos ácidos cólico e taurocólico, a colestiramina não apresentou diferença estatisticamente significante em comparação às amostras estudadas ($p>0,05$).

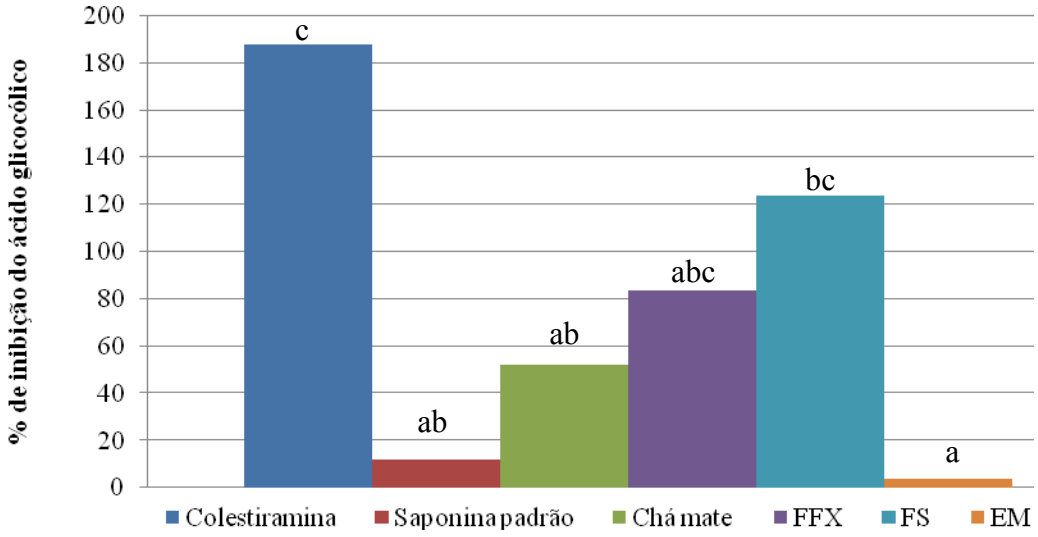
A atividade ligante de ácido glicocólico da colestiramina foi maior do que da saponina padrão, do chá mate e do EM ($p<0,05$). Dentre as amostras estudadas, a FS e FFX foram as que apresentaram os melhores percentuais de inibição, (123,7 e 83,3%, respectivamente), sendo comparáveis à da resina colestiramina, utilizada como controle.

O chá mate demonstrou capacidade de ligação para todos os ácidos biliares, sendo menor que a colestiramina apenas quanto ao ácido glicocólico ($p<0,05$). Este comportamento, semelhante à colestiramina, sugere que o chá mate possui potencial de reduzir colesterol por meio da ligação com ácidos biliares.

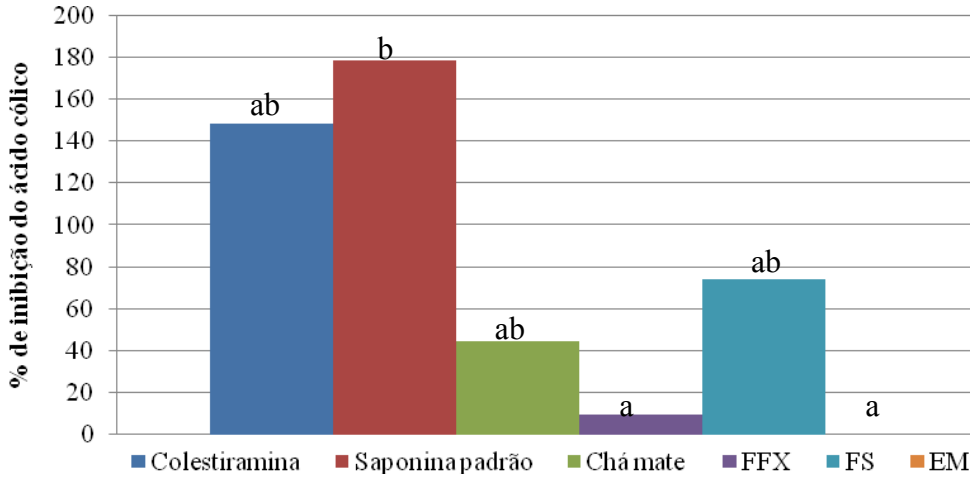
O mecanismo de ação hipocolesterolemizante de saponinas foi estudado frente ao ácido cólico por SIDHU e OAKENFULL (1986), que verificaram formações de grandes micelas entre os compostos, reduzindo a absorção do ácido biliar pelo intestino delgado. Como demonstrado por estes autores, a saponina padrão apresentou elevada atividade ligante para este ácido biliar no presente estudo. Contudo, não apresentou o mesmo comportamento para os demais ácidos estudados ($p<0,05$). A fração de sapogeninas (FS) apresentou atividade ligante frente à todos os ácidos biliares, não apresentando diferença estatística entre cada um ($p>0,05$).

A ligação de ácidos biliares pelo EM não foi observada, exceto para o ácido glicocólico, em que a % de inibição foi menor do que da colestiramina e da FS ($p<0,05$). A FFX não apresentou diferença estatisticamente significante em relação à colestiramina de se ligar aos ácidos glicocólico, cólico e taurocólico. Quanto ao ácido deoxicólico, a fração demonstrou baixa capacidade de ligação (2,5%; $p<0,05$).

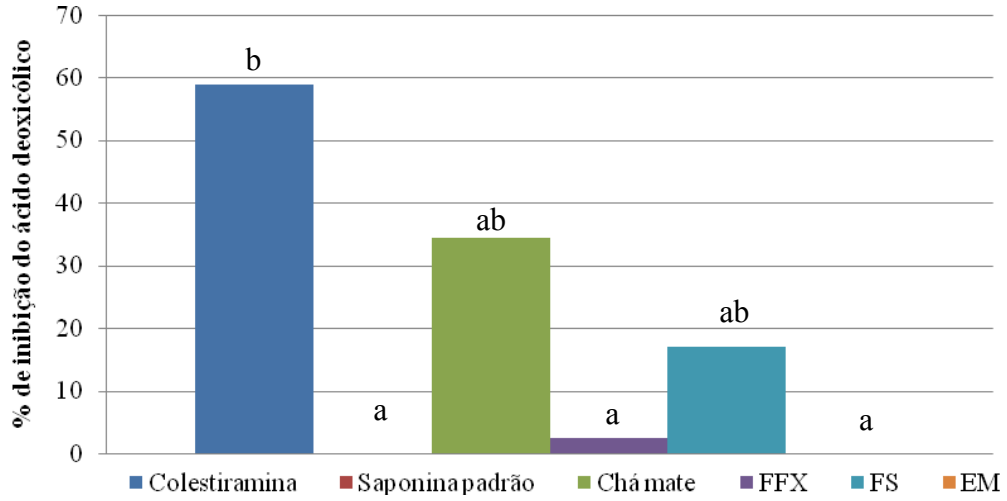
(a)


% de inibição do ácido glicocólico
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
c
ab
ab
abc
bc
a
Colestiramina
Saponina padrão
Chá mate
FFX
FS
EM

(b)


% de inibição do ácido cólico
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
ab
b
ab
a
ab
a
Colestiramina
Saponina padrão
Chá mate
FFX
FS
EM

(c)



(d)

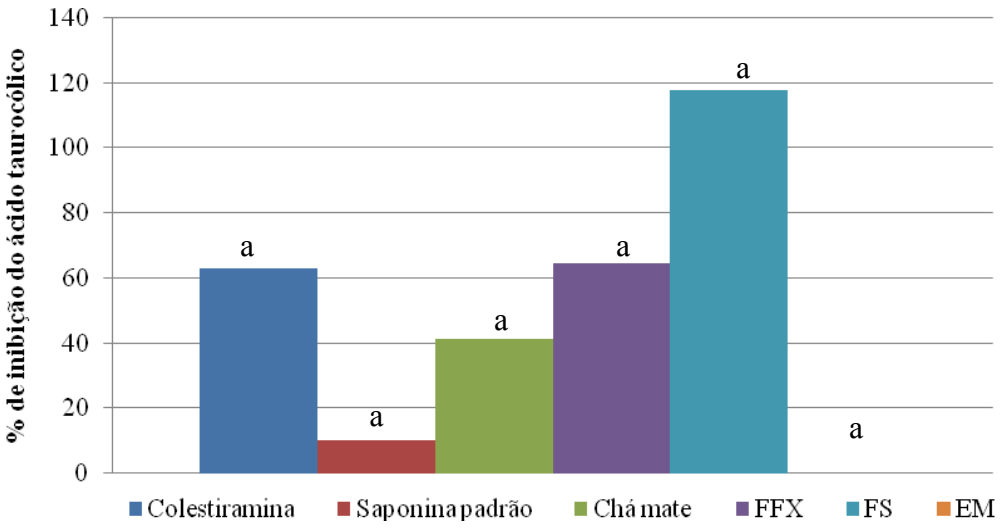


Figura 27: Ligação dos ácidos glicocólico (a), cólico (b), deoxicólico (c) e taurocólico (d) pela colestiramina, saponina padrão, chá mate, FFX, FS e EM. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significante ($p<0,05$)

Dentre as amostras testadas, houve variação da captação para cada ácido biliar. Essa variação foi observada por outros autores (TIENGO, 2007; STORY e KRITCHEVSKY, 1976) e parece estar relacionada à anfifilicidade e à estrutura química dos componentes envolvidos na formação das micelas (SIDHU e OAKENFULL, 1986).

As fibras dietéticas dos alimentos ligam-se aos ácidos biliares no intestino, aumentando sua excreção fecal, levando à necessidade de síntese de ácidos biliares, reduzindo , dessa forma, o colesterol sérico (DONGOWSKI, HUTH e GEBHARDT, 2003). O mecanismo de ação hipocolesterolemizante das saponinas é semelhante ao das fibras. A formação de grandes micelas mistas entre saponinas e ácidos biliares no intestino delgado é a explicação molecular para a ação das saponinas no metabolismo de ácidos biliares e colesterol. As micelas formadas não são reabsorvidas e são, portanto, excretadas nas fezes. Consequentemente a ingestão de alimentos que contenham saponinas levariam ao aumento da excreção de ácidos biliares e poderia diminuir o colesterol plasmático em indivíduos hipercolesterolêmicos.

YOSHIE-STARK e WASCHE (2004) estudaram a atividade ligante de ácidos biliares do isolado protéico e fração desengordurada de semente de linhaça, fração desengordurada de soja e colestiramina *in vitro*. A captação dos ácidos biliares testados variou de 14 a 58%, redução atribuída às fibras insolúveis e peptídeos hidrolisados presentes nesses alimentos.

CAMIRE e DOUGHERTY (2003) avaliaram a capacidade de uvas passa e farelo de trigo de se ligarem aos ácidos biliares. A propriedade ligante das uvas passa variou de 0 a 22% e do farelo de trigo de 22 a 45%, os autores relacionaram o melhor desempenho do farelo de trigo à maior concentração de fibras insolúveis neste alimento.

A atividade ligante de ácidos biliares observada pelo presente estudo é semelhante ou superior aquelas apresentadas por diversos tipos de alimentos ricos em fibras solúveis e insolúveis e isolados protéicos, reconhecidos pelo seu potencial hipocolesterolemizante, indicando que o chá mate e fração de sapogeninas ligam-se aos ácidos biliares podendo levar ao aumento de sua excreção fecal, agindo indiretamente na redução do colesterol.

4.4. Conclusões Parciais

- Os métodos utilizados neste estudo demonstraram capacidade antioxidante do chá mate *in vitro*. Houve diferença estatisticamente significante entre marcas analisadas para a capacidade de captação do radical livre DPPH.

- A atividade antioxidante do chá avaliada por ORAC correlacionou-se negativamente com os teores de xantinas, e positivamente como teor de sapogeninas. Há correlação positiva entre os métodos ORAC e captação do radical livre DPPH.

-As frações isoladas (FFX, FS e EM) apresentaram, de maneira geral atividade antioxidante por todos os métodos, exceto pela capacidade de sequestrar o radical DPPH, provavelmente devido à baixa concentração de fenólicos e de xantinas. Apenas o EM apresentou diferença estatisticamente significante entre marcas para a % de inibição da oxidação do ácido linoléico. Os demais testes e frações resultaram em atividade antioxidante igual entre marcas.

- Houve correlação positiva entre a atividade antioxidante da FFX por ORAC e as concentrações dos compostos 5CQA, ácido caféico, fenólicos totais por CLAE, e negativa para as concentrações de teobromina, cafeína e xantinas totais. A correlação foi mais forte com o teor de ácido caféico. Em relação à % de inibição da oxidação do ácido linoléico, houve correlação negativa com a concentração de 5CQA e fenólicos totais por CLAE.

- A atividade antioxidante da FS pelos três métodos correlacionou-se com o teor de sapogeninas totais.

- A atividade antioxidante do EM não está correlacionada com os teores de fenólicos totais e sólidos solúveis por nenhum dos métodos utilizados, e não houve correlação dos métodos entre si, indicando que a atividade antioxidante do EM não está relacionada aos valores teores de melaninas encontrados;

- O chá mate, a FFX e a FS apresentaram capacidade de ligação com os ácidos glicocólico, cólico, deoxicólico e taurocólico que mostrou-se variável para cada fração e bioativos e para cada ácido biliar. O EM demonstrou baixa ou nenhuma capacidade de se ligar aos ácidos biliares.

4.5. Referências Bibliográficas

Ames BN, Gold LS, Willet WC. The causes and prevention of cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92:5258-5265.

Ames BN, Shigenaga, MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1993; 90: 7915-

7922.

Bastos DHM, Oliveira, DM, Matsumoto RLT, Oliveira PC, Ribeiro ML. Yerba mate: Pharmacological Properties Research ad Biotechnology. Med Arom Plant Sci Biotec. 2007a; 1(1) 37-46.

Bastos DHM, Saldanha LAS, Catharino RR, Sawaya ACHF, Cunha IBS, Carvalho PO, Eberlin MN. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (Ilex paraguariensis) and green tea (Camelia sinensis) extracts. Molecules. 2007b; 12: 423-432.

Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. Lebensm.-Wiss. u.-Technol. 1995; 28: 25-30.

Camire ME, Dougherty MP. Raisin dietary fiber composition and in vitro bile acid binding. J Agric Food Chem 2003; 51: 834-837.

Christen Y. Oxidative stress and Alzheimer disease. Am. J. Clin. Nutr.2000; 71: 621S-629S.

Diaz MN, Frei B, Keaney J F Jr. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. New Eng. J. Med. 1997; 337: 408-416.

Dini I, Tenore GC, Dini A. Saponins in Ipomoea batatas tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. Food Chem 2009; 113: 411-419.

Dongowski G, Huth M, Gebhardt. Steroids in the intestinal tract of rats are affected by ditary-fiber-rich barley-based diets. Br J Nutr 2003; 90: 895-906.

Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon JM. Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays. J. Agric. Food Chem. 2009; 57 (5): 1768-1774.

Frankel EN, Meyer AS. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. J Sci Food Agric. 2000; 80:1925-1941.

Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. Ver Bras Cien Farm. 2003, 39: 167-169.

Gugliucci A , Bastos DHM, Shculze J, Souza MFF,. Caffeic and chlorogenic acids in *Ilex paraguariensis* extracts are the main inhibitors of AGE generation by methylglyoxal in model proteins. Fitoterapia. 2009; 80: 339-344.

Heck CI, Mejia EG. Yerba mate tea (Ilex paraguariensis): A comprehensive review on chemistry, health implication, and technological consideration. J Food Sci 2007; 72: R138–R151.

Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J Agric Food Chem 2005, 53: 1841-1856.

Hung YC, Sava VM, Makan SY, Chen THJ, Hong MY e Huang GS. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states. Food Chemistry. 2002; 78: 233-240.

Hung HC, Joshipura KJ, Jiang R, Hu FB, Hunter D, Smith-Warner SA, Colditz GA, Rosner B, Spiegelman D, Willett WC. Fruit and vegetable intake and risk of major chronic disease. J. Natl. Cancer Inst. 2004; 96: 1577–1584.

Hung YC, Huang GS, Sava VM, Bagodarsky VA, Hong MY. Protective Effects of Tea Melanin against 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-Induced Toxicity: Antioxidant Activity and Aryl Hydrocarbon Receptor Suppressive Effect. Biol. Pharm. Bull. 2006; 29(11): 2284—2291.

Hung YC, Guewha SHLin LW, Hong MY, Se PS. Thea sinensis melanin prevents cisplatin-induced nephrotoxicity in mice. Food and Chemical Toxicology. 2007, 45 1123-1130.

Husni A, Shin IS, You S, Chung D. Antioxidant Properties of Water and Aqueous Ethanol Extracts and Their Crude Saponin Fractions from a Far-eastern Sea Cucumber, Stichopus japonicas. J. Food Sci Biotech 2009; 18(2): 419-424.

Lang AE, Lozano AM. Parkinson's disease. First of two parts. N. Eng. J. Med. 1998; 339: 111-114.

Lee C. Antioxidant ability of caffeine and its metabolites based on the study of oxygen radical absorbing capacity and inhibition of LDL peroxidation. Clin Chim Acta. 2000; 295: 141–154.

Marco G I. A rapid method for evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1968; 45:594.

Martins F, Suzan AJ, Cerutti SM, Arçari DP, Ribeiro ML, Bastos DHM, Carvalho PO. Consumption of mate tea (Ilex paraguariensis) decreases the oxidation of unsaturated fatty acids in mouse liver. Br J Nutr 2009; 101: 527–532.

Mashige F, Tanaka N, Maki A, Kamel S, Yamanaka M. Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. Clin Chem 1981; 27(8): 1352-1356.

Matsumoto RLT, Bastos DHM, Mendonça S, Nunes VS, Bartchewsky Jr W, Ribeiro ML, Carvalho PO. Effects of Maté Tea (*Ilex paraguariensis*) Ingestion on mRNA Expression of Antioxidant Enzymes, Lipid Peroxidation, and Total Antioxidant Status in Healthy Young Women. J Agric Food Chem 2009; 57(5): 1775-1780.

Miller HE. A simplified method for the evaluation of antioxidants. J Am Oil Chem Soc 1971; 48: 91.

Miranda DDC, Arçari DP, Pedrazzoli Jr J, Carvalho PO, Cerutti SM, Bastos DHM, Ribeiro ML. Protective effects of mate tea (Ilex paraguariensis) on H2O2-induced DNA damage and DNA repair in mice. Mutagenesis. 2008; 23(4): 261–265.

Moraes-de-Souza, RA. Potencial antioxidante e composição fenólica de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado. USP – ESALQ. Piracicaba, 2007 59p

Oliveira DM, Freitas H, Souza MFF, Ribeiro ML, Carvalho PO, Araçari DP, Bastos, DHM. Yerba maté (Ilex paraguariensis) aqueous extract decreases intestinal SGLT1 gene expression but does not affect other biochemical parameters in alloxan-diabetic Wistar rats. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56, 10527:10532.

Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca, Howard L, Hampsh-Woodill M, Huang D, Ou B, Jacob R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity ($ORAC_{FL}$) of plasma and other biological and food samples. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003, 51:3273-3279.

Rivelli DP, Silva VV, Ropke CD, Miranda DV, Almeida RL, SAWADA TCH, Barros SBM. Simultaneous determination of chlorogenic acid, caffeic acid and caffeine in hydroalcoholic and

aqueous extracts of *Ilex paraguariensis* by HPLC and correlation with antioxidant capacity of the extracts by DPPH· reduction. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences. 2007; 43(2).

Saldanha LA. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e de chá verde (*Camelia sinnensis*). Dissertação de Mestrado. USP – FSP. São Paulo, 2005, 120p.

Samarth RM, Panwar M, Kumar M, Soni A, Kumar M, Kumar A. Evaluation of antioxidant and radical-scavenging activities of certain radioprotective plant extracts. Analytical, Nutritional and Clinical Methods - Food Chemistry . 2008; 106: 868–873.

Sava VM, Yang SM, Hong MY, Yang PC, Huang GS. Isolation and characterization of melanic pigments derived from tea and tea polyphenols. Food Chemistry 2001; 73: 177 – 184.

Seeram NP, Henning SM, Niu Y, Lee R, Scheuller HS, Heber D. Catechin and caffeine content of green tea dietary supplements and correlation with antioxidant capacity. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2006, 54: 1599-1603.

Sidhu GS, Oakenfull DG. A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. Br J Nutr 1986; 55: 643-649.

Sousa WR, Rocha C, Cardoso CL, Silva DHS, Zanoni MVB. Determination of the

relative contribution of phenolic antioxidants in orange juice by voltammetric methods. *J. Food Comp. Anal.* 2004, *17* (5): 619-633.

Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros DS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinaia. *Quim. Nova,* Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007

Sparg SG, Lighat ME, van Staden J. Biological activities and distribution of plant saponins. Journal of Ethnopharmacology. 2004; 94: 219-243.

Story JA, Kritchevsky D. Comparison of the binding of various bile acids and biles salts in vitro by several types of fiber. J Nutr 1976; 106: 1292-1294.

Tiengo A. Bioatividade do grão de amaranto: Avaliação in vitro da atividade ligante de ácidos biliares e inibidora da enzima conversora de angiotensina. [Dissertação Mestrado].Campinas: UNICAMP; 2007.

Tabata H, Katsube T, Tsuma T, Ohta Y, Imawaka N, Utsumi T. Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicus*. Food Chemistry. 2008; 109: 64–71.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. Comparison of the Antioxidant Activity of Aspalathin with That of Other Plant Phenols of Rooibos Tea (*Aspalathus linearis*), r-Tocopherol, BHT, and BHA. J. Agric. Food Chem. 1997, 45, 632-638

Xu B, Chang SKC. Total Phenolics, Phenolic Acids, Isoflavones, and Anthocyanins and Antioxidant Properties of Yellow and Black Soybeans As Affected by Thermal Processing. J. Agric. Food Chem. 2008; 56: 7165–7175.

Yamaguchi T, Takamura H, Matoba T, Terao J. HPLC method for evalution of the radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. Bioscience, Biotechnology, and biochemistry, 1998; 62: 1201-1204.

Yoshie-Stark Y, Wasche A. In vitro binding of bile acid by lupin protein isolates and their hydrolisates. Food Chem 2004; 88(2): 179-184.

Zhang J, Stanley RA, Adaim A, Melton LD, Skinner MA. Free radical scavenging and cytoprotective activities of phenolic antioxidants.Mol. Nutr. Food Res. 2006, 50: 996 – 1005.

5. CONCLUSÕES E SUGESTÕES

- Os compostos bioativos do chá mate, ácidos fenólicos, xantinas e sapogeninas, foram determinados por CLAE, por métodos validados neste trabalho.
- O chá mate e suas frações apresentaram atividade antioxidante por diferentes métodos *in vitro*.
- Foi verificada associação entre os teores de ácidos ursólico e oleanólico e a atividade antioxidante pelos métodos de seqüestro de radicais livres, sugerindo que os compostos atuam por esse mecanismo de proteção.
- O teor de fenólicos totais, o 5CQA e o ácido caféico contribuíram significativamente para a atividade antioxidante da FFX pelo método ORAC, enquanto as xantinas apresentaram efeito inverso. Na FS a concentração de sapogeninas totais também apresentou efeito inverso na atividade antioxidante pelos três métodos.
- A ausência de correlação entre a atividade antioxidante e os teores de fenólicos totais e sólidos solúveis no EM, bem como o efeito inverso das sapogeninas na atividade antioxidante da FS, sugerem que a atividade antioxidante apresentada pelas frações não pode ser atribuída aos fenólicos totais e sapogeninas determinados nas respectivas frações.
- Diante das considerações apresentadas acima e que, ao contrário do chá mate, a atividade antioxidante da FFX apresentou correlação com o conteúdo de fenólicos totais e ácido fenólicos, conclui-se que as interações ocorridas entre os compostos bioativos do chá mate são antagônicas.
- O chá mate, a FFX e a FS apresentaram capacidade de ligação com os ácidos glicocólico, cólico, deoxicólico e taurocólico que mostrou-se variável para cada fração e bioativos e para cada ácido biliar. O EM demonstrou baixa ou nenhuma capacidade de se ligar aos ácidos biliares.
- Os resultados apresentados nesse trabalho reforçam a hipótese de que o chá mate é potencialmente benéfico à saúde, a exemplo do que já foi demonstrado em estudos *in vitro* e *in vivo*.

- A quantificação dos compostos bioativos do chá mate e o estudo da atividade biológica por diferentes métodos *in vitro*, realizados no presente estudo poderão contribuir para a elaboração de bancos de dados de alimentos com potencial de proteger a saúde, bem como para a determinação do nível de consumo de compostos bioativos a partir deste alimento.
- Ainda são necessários estudos *in vivo* que esclareçam os caminhos que os compostos presentes no chá mate percorrem desde a ingestão até a eliminação, a fim de se determinar a biodisponibilidade de tais compostos.

ANEXO 1

PDA Peak Purity Plot

This window graphically and numerically displays the degree of purity for an integrated chromatographic peak. The Peak Purity display is a graphical representation of the similarity of the spectra in a chromatographic peak.

How to Use the Peak Purity Pane

1. From the Contour map pane of the Mixed View, drag the y-axis graph handle to select a wavelength of interest. The chromatogram corresponding to that wavelength is automatically displayed in the chromatogram pane.
2. Check to ensure that the method has a valid noise spectrum (Method > PDA Setup > Purity) and an appropriate integration events table (Method > Integration Events).
3. Select the Analysis > Analyze menu item to integrate the chromatogram.

4. While holding down the Ctrl key, click on a peak in the chromatogram to update the peak purity pane and display the purity curve for that peak.
5. In its default display mode, the purity graph consists of a single trace plotting purity index over the retention time range of the peak. Portions of the plot where the purity index is greater than zero indicate pure regions of the peak. In the same way, portions of the plot where the purity index is less than zero indicate impurities.

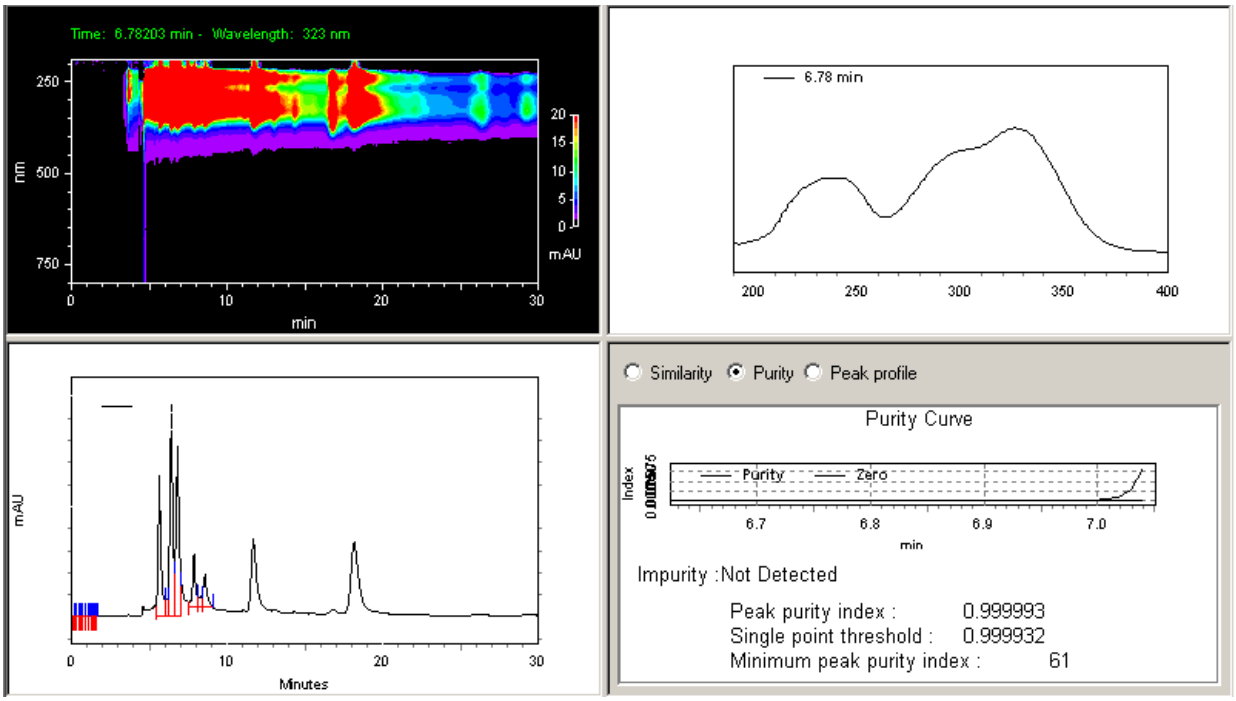



Figura – Análise da pureza de um pico de 5CQA.