

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de
extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e
tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**

Luciane Arias Saldanha

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública
para obtenção do título de Mestre em
Saúde Pública.

Área de concentração: Nutrição
Orientadora: Prof. Dr^a Deborah H.
Markowicz Bastos

São Paulo

2005

**Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de
extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e
tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**

Luciane Arias Saldanha

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Saúde Pública da
Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Nutrição

Orientadora: Prof Dr^a Deborah H.
Markowicz Bastos

São Paulo

2005

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução parcial ou total desta dissertação, por processos fotocopiadores.

Assinatura:

Data:

RESUMO

Saldanha LA. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*).** São Paulo: 2005. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública USP.

Objetivo. Diversos produtos de origem vegetal vêm sendo estudados por serem fontes de antioxidantes, podendo ser uma alternativa aos antioxidantes sintéticos. Este trabalho avaliou a atividade antioxidante *in vitro* de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e de chá verde (*Camellia sinensis*). **Métodos.** Extratos aquosos, etanólicos e etéreos foram analisados quanto ao teor de sólidos solúveis, fenólicos totais e atividade antioxidante por dois métodos: captação do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e inibição da oxidação sistema β -caroteno/ácido-linoléico. A análise estatística foi efetuada pela estimativa do erro-padrão dos intervalos de confiança das diferenças das médias. **Resultados.** Extratos aquosos e etanólicos apresentaram os maiores teores de sólidos solúveis. Em relação aos fenólicos totais, o extrato etanólico de chá verde apresentou o maior teor (13,0mg/mL/EAC), enquanto o extrato etanólico de erva-mate tostada apresentou o menor (3,4mg/mL/EAC). Em relação à porcentagem de captação do DPPH, todos os resultados obtidos foram similares ou superiores aqueles encontrados para o BHT. No teste de inibição da oxidação, o extrato aquoso de erva-mate tostada (1,0mg/mL) apresentou resultado médio 10,1% maior do que o extrato aquoso de erva-mate verde e o extrato etanólico da erva-mate tostada (1,0mg/mL) resultado médio 11,7% maior do que o extrato de erva-mate verde. Apenas os extratos aquoso e etéreo de chá verde apresentaram resultados inferiores ao BHT. **Conclusão.** Evidenciou-se a elevada atividade antioxidante de diferentes extratos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde, indicando o potencial uso dessas ervas como antioxidantes alimentícios.

Descritores: chá verde, erva-mate, atividade antioxidante

SUMMARY

Saldanha LA. *In vitro* antioxidant activity of extracts of green and roasted mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*). São Paulo (BR): 2005. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública-USP.

Objective. Different products from vegetal origin have been studied due to the fact that they are known as sources of antioxidants, which could be an alternative to the synthetic antioxidants. This research investigated *in vitro* antioxidant activity of extracts of green and roasted mate (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camellia sinensis*). **Methodology.** Soluble solid, total phenolics and antioxidant activity were analyzed in aqueous, ethanolic and etheric extracts. Two methods were used: free radical DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) quenching assay and β -carotene/linoleic-acid oxidation model system. Data were analysed by the standard error estimative of the confidence intervals from average differences. **Results.** Aqueous and ethanolic extracts presented the highest content of soluble solids. Ethanolic extracts of green tea had the highest phenolic content (13,0mg/mL/EAC), while ethanolic extracts of roasted mate presented the lowest (3,4mg/mL/EAC). All results from DPPH quenching assay were similar or superior to those found for BHT (synthetic antioxidant). The β -carotene/linoleic acid oxidation model system showed that the aqueous extract of roasted mate (1,0mg/mL) had an average value 10.1% higher than aqueous extract of green mate, and the roasted mate ethanolic extract (1,0mg/mL) showed higher values (11.7%) than green mate ethanolic extract. Only aqueous and etheric green tea extracts presented lower values when compared to the BHT. **Conclusion.** It was evident the high antioxidant activity of different extracts from mate (green and roasted) and green tea, indicating the potential use of these herbs as natural antioxidants in food systems.

Descriptors: green mate, mate-tea , antioxidant activity

DEDICATÓRIA

“Acima de tudo, na vida, temos necessidade de alguém que nos incentive a realizar aquilo de que somos capazes”.

Dedico este trabalho ao meu amor e companheiro Carlos Augusto Saldanha, pela motivação inicial e constante, me fazendo acreditar que ter um objetivo é o passo mais importante para se cumprir uma tarefa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade da vida e por tudo o que não posso comprar, mas tenho de graça dado por Ele: saúde, amor, amizade, paz, alegria, que são as coisas mais nobres que se pode ter.

Aos meus pais, Wagner e Emidia, que sempre fizeram o melhor por mim e que me deram algo que terei para sempre, mesmo que esquecer tudo o que me foi ensinado: a educação.

Ao meu marido, Carlos, por toda a paciência, companheirismo e capacidade de motivação, me dando força diariamente para que eu pudesse prosseguir.

À minha irmã, Alessandra, que, além de toda a assessoria prestada, me deu muito mais do que apenas o descanso de tela mais precioso que eu poderia ter: meu querido sobrinho Léozinho.

Aos meus sogros, Adérito e Maria Helena, por toda a fé, força e carinho nos momentos mais importantes.

À professora Deborah Markowicz Bastos, que me aceitou como sua aluna e, de um forma muito especial, acreditou em mim, depositando força e confiança. Sempre disposta a transmitir seus conhecimentos, teve o dom de ensinar muitas coisas que jamais imaginei que pudesse aprender.

Ao professor José Alfredo Gomes Arêas, que sempre foi muito atencioso e que, graças à sua experiência e ponderação, ajudou muito em diversos momentos.

Às professoras Renata Cintra e Nágila Damasceno, que muito contribuíram para a apresentação deste trabalho.

À FAPESP, pela concessão da verba necessária à execução do projeto.

À empresa Leão Jr, que forneceu parte do material utilizado para as análises.

Aos meus queridos amigos de laboratório: Renata, Rosana, Yara, Carla e Guilherme, que me seguraram pelas mãos e me ajudaram a dar os primeiros passos em um mundo até então desconhecido. À Karen, Liania, Emília e Carol, pessoas pelas quais tenho grande consideração.

Ao Marcel, que me fez entender a importância da estatística.

Agradeço a todos que, de forma direta ou indireta, contribuíram em algum ou em diversos momentos da execução deste trabalho, inclusive aos amigos de msn.

“A maior recompensa do nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.”

(John Ruskin)

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	v
1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1 Radicais livres: Formação de EROs e oxidação	14
2.2 Lipídeos e auto-oxidação	16
2.3 Antioxidantes em alimentos	19
2.4 Compostos fenólicos como antioxidantes	23
2.5 Erva-mate	27
2.6 Atividade antioxidante da erva-mate	31
2.7 Chá verde	32
2.8 Atividade antioxidante do chá verde	35
3 JUSTIFICATIVA	37
4 OBJETIVOS	38
4.1 Objetivo Geral	38
4.2 Objetivos Específicos	38

5 MATERIAIS E MÉTODOS	39
5.1 Materiais	39
5.1.1 Amostra vegetal	39
5.2 Métodos	39
5.2.1 Obtenção dos extratos	39
5.2.2 Avaliação do teor de sólidos solúveis (resíduo seco)	42
5.2.3 Avaliação do teor de fenólicos totais	43
5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante	44
5.2.5 Análise estatística	50
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
6.1 Estudo da metodologia de extração	51
6.1.1 Efeito da metodologia de extração (a frio e a quente) sobre o teor de sólidos solúveis (resíduo seco) para extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada)	51
6.1.2 Efeito do tempo de extração (10 minutos e 4 horas) para extratos aquosos de chá verde e de erva-mate (verde e tostada) sobre os teores de sólidos solúveis (resíduo seco) e fenólicos totais	52
6.1.3 Efeito do solvente sobre os teores de sólidos solúveis (resíduo seco) e fenólicos totais	56
6.2 Atividade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada) e chá verde obtidos a partir da extração por 4 horas	60
6.2.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH)	60
6.2.2 Inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)	65

6.2.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante	71
6.2.4 Estabilidade oxidativa (método do Rancimat®)	78
7. CONCLUSÕES	82
8. REFERÊNCIAS	84

ANEXOS

Anexo 1. Modelos de análise de variância utilizados para estimativa do erro-padrão dos intervalos de confiança das diferenças das médias

Anexo 2. Intervalos de confiança das médias

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Limite máximo para o uso de alguns aditivos (antioxidantes e sinérgicos) em alimentos no Brasil	21
Tabela 2. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco mg/mL) e fenólicos totais (mg/g de resíduo seco) de extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde	56
Tabela 3. Resíduo seco (mg/mL) e fenólicos totais de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde	59
Tabela 4. Atividade antioxidante (% de captação do DPPH) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (Lote 1)	61
Tabela 5. Atividade antioxidante (% de captação do DPPH) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (Lotes 1 e 2)	62
Tabela 6. Atividade antioxidante (% de inibição da oxidação sistema β -caroteno/ácido-linoléico) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde	67
Tabela 7. Índice de atividade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde e erva mate-tostada (método do Rancimat®)	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da catequina (ECGC)	24
Figura 2. Estrutura química do ácido caféico (I) e do ácido clorogênico (II)	25
Figura 3. Fluxograma de produção da erva-mate	29
Figura 4. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco) de extratos de erva-mate (verde e tostada) obtidos por extração a frio (maceração-24 horas) e por extração a quente (extrator tipo Soxhlet-4horas)	52
Figura 5. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco mg/mL) e fenólicos totais (mg/mL) de extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde	53
Figura 6. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) em relação à captação do radical livre DPPH	64
Figura 7. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) em relação à captação do radical livre DPPH	65
Figura 8. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) em relação à inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)	68
Figura 9. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) em relação à inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)	68

- Figura 10.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 72
- Figura 11.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 73
- Figura 12.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 73
- Figura 13.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 74
- Figura 14.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 74
- Figura 15.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 75
- Figura 16.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 75

- Figura 17.** Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2) 76
- Figura 18.** Fenólicos totais (mg/mL x 100) em cada concentração de extrato (0,5 e 1,0 mg/mL) e porcentagem de captação do DPPH 77
- Figura 19.** Fenólicos totais (mg/mL) em cada concentração de extrato (0,5 e 1,0 mg/mL) e porcentagem de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) 78
- Figura 20.** Período de indução de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde e erva-mate tostada na proporção de 1,0 mg de resíduo seco para 3g de banha de porco (método do Rancimat®) 80

1 INTRODUÇÃO

O alimento pode ser definido como sendo “toda substância que se ingere em estado natural, semi-industrializada ou industrializada, destinada ao consumo humano, incluídas as bebidas e qualquer outra substância que se utilize em sua elaboração, preparação ou tratamento” (SALINAS 2002). Os alimentos são constituídos por um conjunto de nutrientes (carboidratos, lipídeos, proteínas, fibras, água, vitaminas e minerais) que, depois de absorvidos, participam de uma série de reações metabólicas. Sabe-se atualmente que outras substâncias presentes nos alimentos, embora não classificadas como nutrientes, podem desempenhar funções importantes. Os probióticos, prebióticos e compostos fenólicos são exemplos dessas substâncias (DE ANDELIS 2001).

Uma grande variedade de produtos alimentícios apresentam em sua constituição os lipídeos, que constituem parte importante da alimentação humana e costumam proporcionar de 35 a 40% do valor calórico total da alimentação nos países industrializados. Além de serem fonte de energia, os lipídeos transportam algumas vitaminas, como a A, D, E e K, e também pró-vitaminas, como os carotenóides. Constituem fontes de ácidos graxos essenciais (ácidos linoléico e linolênico, por exemplo) e contribuem também para as características sensoriais dos alimentos, tais como: sabor, cor e textura (SALINAS 2000; SILVA et al. 1999). A prevenção da oxidação durante o processamento e armazenamento de alguns alimentos e/ou preparações é essencial para a manutenção da qualidade e segurança dos mesmos (BUCKLEY et al. 1995). Os processos oxidativos são os principais responsáveis pela redução da “vida de prateleira” de produtos alimentícios de matérias-primas em geral.

As reações oxidativas que envolvem os lipídeos (peroxidação lipídica) constituem a principal causa de deteriorização, podendo desta forma promover importantes alterações sensoriais através do desenvolvimento de notas aromáticas desagradáveis, genericamente denominadas ranço (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ 2004).

Quando os lipídeos sofrem alguma alteração, como a oxidação ocasionada pelo ataque de radicais livres, podem comprometer a qualidade dos alimentos. A oxidação pode ser muito prejudicial devido à sua continuidade como uma reação em cadeia. Segundo PAPAS (1999), os lipídeos, particularmente os que contém ácidos graxos poliinsaturados, são mais propensos ao ataque de radicais livres e à deterioração oxidativa, sendo frequentemente utilizados para se verificar a eficácia de antioxidantes (WANASUNDARA e SHADI 1998). Na ausência de antioxidantes adequados, os ácidos graxos poliinsaturados formam radicais livres, sendo estes responsáveis por diversas alterações nos alimentos, como a queda na qualidade nutricional pela possibilidade de interagirem com outras moléculas (NAWAR 1996).

A alteração na qualidade de um produto é o principal parâmetro de controle físico-químico que define o prazo de validade de diversos produtos alimentícios processados, principalmente quando estes apresentam valores de atividade de água inferiores a 0,3, onde se atinge a zona de adsorção primária ou monocamada, propiciando assim a ação catalítica de metais, que favorecem o desenvolvimento da peroxidação lipídica (FENNEMA 1993).

Algumas medidas são tomadas com o objetivo de prevenir a rancidez oxidativa e os *off-flavors* em diversos alimentos e preparações, como a adição de nitritos, agentes quelantes de metais e antioxidantes sintéticos. Uma substância antioxidante pode ser definida como sendo uma substância química que inibe o processo de oxidação, ou

qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada a do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação daquele substrato. Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas de estruturas celulares (ABDALLA 2000).

Dentre os principais antioxidantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos estão o hidroxibutiltolueno (BHT), o hidroxibutilanisol (BHA), galatos de propila (PG) e a terciobutilhidroquinona (TBHQ). A adição de antioxidantes em alimentos processados, principalmente àqueles que contêm lipídeos, é uma prática comum, razão esta pela qual justifica-se o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com propriedades antioxidantes (HEINONEN et al. 1997). Desde o início da década de 80, o interesse em utilizar antioxidantes naturais para prevenir a oxidação lipídica aumentou em função dos possíveis efeitos tóxicos ao organismo em decorrência do uso de antioxidantes sintéticos, como o potencial efeito carcinogênico, aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (YIIDRIM et al. 2002; ZHENG e WANG 2001).

Recentemente, diversos produtos de origem vegetal, como frutos, folhas, sementes e óleos, receberam atenção por serem fontes de substâncias biologicamente ativas (antioxidantes, por exemplo). Dentre os principais antioxidantes naturais estão os compostos fenólicos, o ácido ascórbico, o α -tocoferol e os carotenóides.

Objetivando-se investigar novas fontes de antioxidantes naturais, este trabalho avaliou extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e de chá-verde (*Camellia sinensis*). Os parâmetros avaliados foram os seguintes:

- teor de sólidos solúveis;
- teor de fenólicos totais;
- atividade antioxidante por dois diferentes métodos (ensaio do DPPH e sistema β -caroteno/ácido-linoléico). Complementarmente, apenas para os extratos de erva-mate (verde e tostada), foi determinada a estabilidade oxidativa através do método do Rancimat®.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Radicais livres: Formação de EROs e oxidação

Os primeiros estudos a respeito de radicais livres ocorreram por volta de 1924, sendo que apenas nos anos setenta os trabalhos relatando a importância dos radicais livres para os seres vivos, particularmente os aeróbios, começaram a surgir (BAST et al. 1991). O interesse pelos radicais livres e por antioxidantes tem se intensificado cada vez mais. A associação entre a presença de radicais livres e a patogênese de certas doenças, bem como a proteção de certas substâncias antioxidantes, têm despertado o interesse à pesquisa, sendo objeto de estudo de diversos trabalhos (GUTTERIDGE e HALLIWELL 1994; HALLIWELL 1996; DREOSTI 2000).

Radical livre é qualquer espécie química que contenha um ou mais elétrons não pareados ocupando orbitais atômicos ou moleculares. Um elétron não pareado é aquele que ocupa um orbital atômico ou molecular isoladamente. Em geral, estas espécies são instáveis, tem uma meia vida muito curta (podendo variar de nanossegundos a alguns minutos) e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares, como proteínas, lipídeos, e DNA (ABDALLA 2000). Esta peculiaridade química os tornam muito reativos e forma a base de sua possível toxicidade. Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma substância não radical. Eles podem ser formados quando uma ligação covalente é quebrada e um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo, em processo chamado fissão homolítica. A energia necessária para dissociar a ligação covalente pode ser fornecida pelo calor, radiação eletromagnética ou outras fontes (HALLIWELL et al.

1992). A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular (respiração aeróbia, por exemplo) e pela exposição a fatores exógenos, como ozônio, radiações gama e ultravioleta, tabaco e certos medicamentos (CERUTTI 1991; 1994).

Entre as várias espécies de radicais livres estão principalmente os metais de transição (ferro, cobre, vanádio, cromo, manganês, cobalto, níquel e molibdênio) e as espécies derivadas do oxigênio. Em sua maioria, os radicais livres derivam do oxigênio e denominam-se genericamente “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) ou “Radicais Livres de Oxigênio” (RLOs) (GOMEZ-CABRERA et al. 2000). As EROs também podem se referir às espécies que não são radicais livres, e sim algumas moléculas derivadas de O_2 capazes de gerar radical livre, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2000). As principais EROs são: radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^\cdot) e oxigênio singlete (1O_2) (GOLDFARB 1993; JENKINS 1993; FERREIRA e MATSUBARA 1997). Essas formas de oxigênio são muito prejudiciais aos constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídeos, os ácidos graxos e as proteínas (STORZ et al. 1987).

A deterioração de materiais orgânicos e alimentos expostos ao ar se dá principalmente pelo oxigênio atmosférico (O_2). Essas moléculas, susceptíveis ao ataque do O_2 , terminam formando hidroperóxidos e são eles os responsáveis pela perda da função de membranas celulares e das próprias células, bem como pela deterioração (LARSON 1988).

In vivo, os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio, são continuamente produzidos. No entanto, os organismos desenvolvem sistemas de defesas antioxidantes para a proteção e também sistemas de

reparação, limitando assim o acúmulo de moléculas alteradas pela oxidação (HALLIWELL e GUTTERIDGE 1999).

Os radicais livres causam lesões em praticamente todas as matérias orgânicas, especialmente nas membranas lipídicas. Segundo VANNUCCHI et al. (1997), as principais alterações oxidativas nos alimentos são:

- oxidação de lipídeos (óleos vegetais e produtos de panificação, cárneos e lácteos);
- escurecimento enzimático (vegetais *in natura*);
- oxidação de pigmentos e de compostos aromáticos.
- perdas nutricionais, principalmente pela oxidação de vitaminas e ácidos graxos insaturados essenciais.

2.2 Lipídeos e auto-oxidação

Qualquer composto biológico que seja solúvel em solventes orgânicos, como éter, clorofórmio e hexano, pode ser designado lipídeo. Moléculas que contêm ácidos graxos, como triglicerídeos e fosfolipídeos, e moléculas que contêm estruturas de hidrocarbonetos cíclicos, como o colesterol, hormônios esteróides e algumas vitaminas lipossolúveis, são denominadas lipídeos (NAWAR 1996).

Quimicamente, os lipídeos são constituídos por misturas de glicerídeos. Os glicerídeos são estruturas formadas pela associação química entre o glicerol e uma, duas ou três moléculas de ácidos graxos. A maioria dos lipídeos contém uma ou mais moléculas de ácidos graxos como parte da sua estrutura química básica (SALEM Jr. 1999). Frequentemente, os ácidos graxos são nomeados na forma abreviada, de acordo

com suas estruturas químicas e classificam-se como saturados ou insaturados (monoinsaturados ou poliinsaturados), dependendo do número de duplas ligações. Predominantemente, os ácidos graxos saturados encontram-se em alimentos de origem animal, como carnes, ovos, queijos, leites, manteigas e, em alguns de origem vegetal, como óleos de coco e de palma. Dos ácidos graxos monoinsaturados, o ácido oléico é o mais comum e é encontrado na maioria das gorduras animais e alimentos de origem vegetal, como azeitonas, sementes e nozes. Os ácidos graxos poliinsaturados, também designados PUFAs (*Poly Unsaturated Fatty Acids*) classificam-se principalmente nas séries ômega 6 (ω -6) e ômega 3 (ω -3), que se diferenciam na posição da primeira dupla ligação. Da série ω -6, o ácido linoléico é o mais importante e está presente abundantemente nos óleos vegetais, como os de girassol, milho, soja e algodão. O ácido linolênico, da série ω -3, é encontrado em quantidades maiores em sementes oleaginosas, tais como: canola, soja e linhaça (DZIEZAK 1989). Outros ácidos graxos com maior número de carbonos e com maior quantidade de duplas ligações, também pertencentes à série ω -3, são encontrados em vegetais (algas, microalgas e fitoplâncton) e em alguns animais marinhos, como peixes e crustáceos. Esses ácidos graxos são chamados “ácidos graxos de cadeia muito longa”, superior a 18 carbonos e são representados pelos ácidos eicosapentaenóico (EPA, C20:5, ω -3) e docosahexaenóico (DHA, C22:6, ω -3).

O processo de oxidação de lípideos depende de mecanismos reacionais diversos e altamente complexos, que estão relacionados com o tipo de estrutura lipídica e com o meio onde os lípideos se encontram. Embora os mecanismos para explicar a ocorrência dos processos de deterioração em lípideos não estejam totalmente elucidados, sabe-se porém que os mesmos podem oxidar-se através de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos. São fatores que determinam a estabilidade oxidativa dos lípideos: o

número e a natureza das insaturações presentes na molécula, o tipo de interface entre os lipídeos e o oxigênio, a exposição à luz e ao calor e a presença de agentes pró-oxidantes ou antioxidantes (SILVA 1999). Dentre os lipídeos presentes nos alimentos têm-se uma mistura de mono, di e triglicerídeos, ácidos graxos livres, glicolipídeos, fosfolipídeos, esteróis, entre outros. A maioria desses constituintes são oxidáveis em diferentes graus. Quando lipídeos poliinsaturados sofrem ataque do oxigênio (O_2), ou seja, sofrem deterioração oxidativa, há destruição das moléculas lipídicas. A esse processo dá-se o nome de peroxidação lipídica ou auto-oxidação (SPATZ e BLOOM 1992).

Embora seja um processo contínuo, o mecanismo de auto-oxidação dos lipídios pode ser dividido didaticamente em três etapas:

1ª Etapa – Iniciação:

As EROs são formadas a partir da reação de moléculas de lipídios com o oxigênio (O_2) na presença de algum agente catalisador, como a luz e o calor. Ao sofrer o ataque das EROs, a cadeia poliinsaturada perde um átomo de hidrogênio, formando assim um radical livre.

2ª Etapa – Propagação:

Nesta etapa, os radicais livres reagem com o oxigênio para formar os radicais peroxila, os quais reagem posteriormente com moléculas de lipídios formando os hidroperóxidos, que, ao se decomporem formam novos radicais livres. Os hidroperóxidos são chamados de produtos de primeira oxidação e podem ser usados como indicadores da qualidade e estabilidade dos óleos. A velocidade da peroxidação lipídica é limitada pela etapa de propagação (SPITELLER e SPITELLER 1998).

3^a Etapa –Terminação:

Nesta última etapa, ocorre a reação em cadeia entre os próprios radicais, originando produtos não radicais, como dímeros e polímeros. O processo de combinação de dois radicais requer baixa energia de ativação. Tal ocorrência é limitada pela concentração de radicais quando esses são requeridos para interagir num centro ativo específico das moléculas (WHEATLEY 2000).

2.3 Antioxidantes em alimentos

A inibição completa da oxidação em preparações e alimentos não é possível, mas pode ser inibida por vários meses através da adição de antioxidantes. De forma geral, existem duas categorias básicas de substâncias antioxidantes: os naturais e os sintéticos (BRENNAN e PAGLIARINI 2001; ZHENG e WANG 2001). O emprego de substâncias antioxidantes visando aumentar o prazo de validade de produtos alimentícios, bem como preservar as características sensoriais dos mesmos, é uma constante na área da tecnologia de alimentos. A deterioração dos alimentos com o tempo é inevitável. Durante a produção, processamento, distribuição e armazenamento, os alimentos estão susceptíveis à deterioração, tanto provocada por microorganismos normalmente encontrados no meio ambiente, assim como pelas próprias mudanças químicas e bioquímicas intrínsecas do alimento. A velocidade de reação (oxidação) é diretamente proporcional:

- ao número de insaturações;

- à temperatura (durante o aquecimento, a cada 10°C, a velocidade da reação dobra);
- à incidência de luz;
- à quantidade de oxigênio presente;
- à quantidade de metais presentes, como íons cobre e ferro.

No Brasil, a regulamentação para o emprego de antioxidantes em alimentos é controlada pela Resolução do Conselho Nacional de Vigilância Sanitária (CNS) n° 04/88, de 24 de Novembro de 1988, publicada no Diário Oficial da União de 19 de Dezembro de 1988, que relaciona os aditivos permitidos que podem ser adicionados em aproximadamente 40 a 50 alimentos. Na tabela 1 estão relacionados os aditivos classificados como antioxidantes e os limites máximos de segurança permitidos para o uso.

Tabela 1. Limite máximo para o uso de alguns aditivos (antioxidantes e sinérgicos) em alimentos no Brasil

Tipo de aditivo	Denominação	Alimentos nos quais podem ser adicionados	Limite máximo g/100g - g/100mL
antioxidante	Hidroxibutilanisol (BHA)	Margarinas	0,02
		Óleos e Gorduras	0,02
antioxidante	Hidroxibutiltolueno (BHT)	Margarinas	0,02
		Óleos e Gorduras	0,01
antioxidante	Galato de Propila, de Duodecila ou de Octil	Margarinas	0,01
		Óleos e Gorduras	0,01
antioxidante	Terci-Butil-Hidroquinona (TBHQ)	Óleos e Gorduras	0,02
antioxidante	Tocoferóis	Margarinas	0,03
		Óleos e Gorduras	0,03
sinérgico	Ácido Cítrico	Margarinas	q.s.p
		Óleos e Gorduras	q.s.p
sinérgico	Ácido Fosfórico	Gorduras e Compostos Gordurosos	0,01
		Margarinas	0,01
sinérgico	Citrato de Monoisopropila	Margarinas	0,01
		Óleos e Gorduras	0,01
sinérgico	Palmitato de Ascorbila e Estearato de Ascorbila	Margarinas	0,02
		Óleos e Gorduras	0,05

Fonte: Adaptado de SALINAS, 2002

Há inúmeros compostos (naturais e sintéticos) que apresentam atividade antioxidante. Devido à importância que esses compostos apresentam tanto *in vitro* como *in vivo*, muitas pesquisas vêm sendo realizadas com a finalidade de identificar substâncias e/ou compostos com propriedades antioxidantes. Entre os principais antioxidantes lipídicos utilizados em alimentos, os fenóis monohídricos com variadas

substituições nos anéis se destacam. Para melhorar sua eficiência, estes “antioxidantes primários” são utilizados combinados a outros antioxidantes fenólicos ou a agentes sequestradores de metais (DONNELI e ROBINSON 1995). O hidroxibutilanisol (BHA), o hidroxibutiltolueno (BHT) e o propilgalato (PG) são os antioxidantes sintéticos mais eficientes em vários sistemas alimentícios, apresentando alta estabilidade e baixo custo. A possibilidade de que esses antioxidantes sejam nocivos ao organismo somada à rejeição por parte dos consumidores em relação aos aditivos sintéticos, abrem campo para a pesquisa de novos antioxidantes naturais. Os derivados do tocoferol e o ácido ascórbico são utilizados como alternativa aos antioxidantes sintéticos. Entre os antioxidantes naturais também estão os compostos fenólicos, antocianinas e antoxantinas, por exemplo. Os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais (SHAHIDI et al. 1992). Alguns outros compostos, como as melanoidinas (produtos finais da reação de Maillard), também vêm sendo investigados pelas suas possíveis propriedades antioxidantes (MANZOCCO et al. 2001; MORALES e JIMÉNEZ-PÉREZ 2001).

De forma geral, os antioxidantes alimentícios podem ser:

- doadores de hidrogênio ou elétrons;
- agentes sequestradores de radicais e quelante de metais;
- sinergistas.

2.4 Compostos fenólicos como antioxidantes

A classe de compostos fenólicos engloba desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (BRAVO 1998). Estão presentes nos vegetais na forma livre ou ligados a açúcares (glicosídeos) e proteínas (CROFT 1998). São conhecidos mais de 8000 compostos e têm sido associados à várias funções, dentre elas à atividade antioxidante (DREOSTI 2000). Podem ser encontrados em diversas partes das plantas (comestíveis e não comestíveis), como nas sementes, frutos, folhas, casca do caule e também na raiz. Os compostos fenólicos de fontes vegetais podem ser divididos em dois grupos, ambos metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais:

- os flavonóides e seus derivados;
- os ácidos fenólicos, como ácidos benzóico, cinâmico e seus derivados e as cumarinas.

Os flavonóides possuem uma estrutura básica formada por $C_6-C_3-C_6$, sendo estes os compostos mais diversificados no reino vegetal. Neste grupo estão as antocianidinas, flavonas, flavonóis, catequinas (figura 1) e taninos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ 2004) e, menos frequentemente, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula.

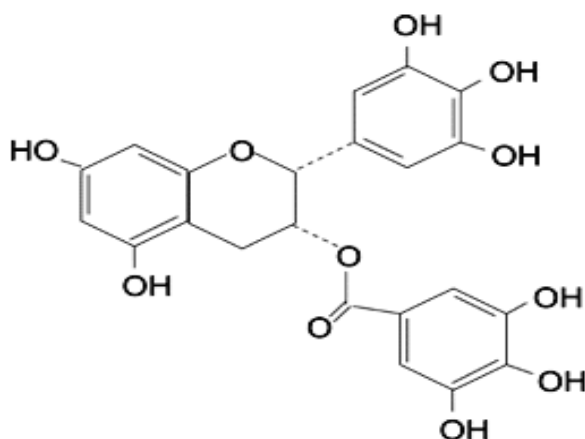


Figura 1. Estrutura química da catequina (ECGC)

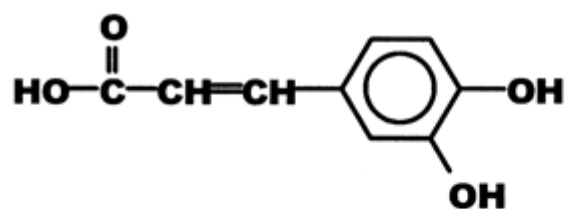
Os ácidos fenólicos são divididos em três grupos:

1º- este primeiro grupo é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C_6-C_1) e são os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza;

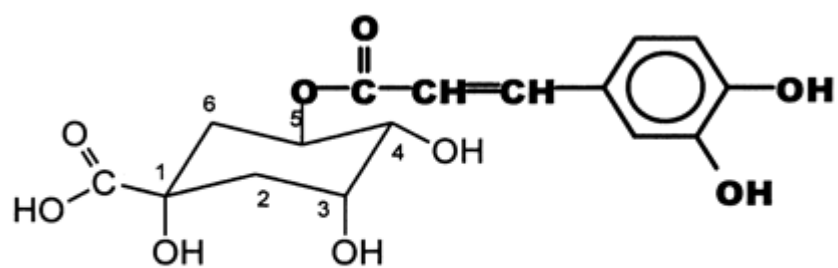
2º- este grupo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C_6-C_3), sendo sete os mais comumente encontrados no reino vegetal;

3º- neste terceiro grupo estão os ácidos fenólicos que, além de se apresentarem sob sua forma natural, podem ligar-se entre si ou com outros compostos.

Destas combinações, a mais importante ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico (ácido quínico), dá origem ao ácido clorogênico (figura 2) (SOARES 2002).



(I)



(II)

Figura 2. Estrutura química do ácido cafêico (I) e do ácido clorogênico (II)

A presença de compostos fenólicos em plantas tem sido extensivamente estudada por sua ação antioxidante, tanto *in vitro* (FILIP et al. 2000; SCHINELLA et al. 2000; ALESSIO et al. 2002; BRACESCO et al. 2003) como também *in vivo* (GUGLIUCCI 1996; HODGSON et al. 2000; YOKOZAWA et al. 2002). A atividade antioxidante de compostos fenólicos é devida principalmente às suas propriedades de oxido-redução podendo assim absorver e neutralizar radicais livres, quelando o oxigênio singlete e triplete ou decompondo peróxidos (DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ 2004).

Em pesquisas realizadas com vários ácidos fenólicos, o ácido caféico e o ácido clorogênico demonstraram uma elevada ação inibitória sobre a peroxidação de células, como eritrócitos e monócitos, enquanto os ácidos cinâmico, *p*-cumárico, ferúlico, protocatequínico e vanílico não apresentaram atividade quando induzidos pelo H₂O₂ (OHNISHI et al. 1994; NARDINI et al. 1998).

Considerando-se que a oxidação lipídica induzida pelos radicais livres (GOTTO 1995) funciona como um iniciador importante da aterosclerose (GUGLIUCCI 1996), vários autores utilizaram o modelo de oxidação da LDL *in vitro* para verificar o potencial antioxidante dos ácidos fenólicos (GUGLIUCCI 1995; VINSON e DABBAGG 1998). Alguns deles, como os ácidos caféico e clorogênico, apresentaram um elevado poder antioxidante neste sistema, sendo comparado ao poder encontrado para a vitamina E, C e β-caroteno (LARANJINHA et al. 1996; VINSON e DABBAGG 1998). YANISHLIEVA e MARINOVA (1995) verificaram que os ácidos fenólicos participam mais efetivamente na fase de iniciação da oxidação e que, os ácidos caféico, ferúlico e sinápico, também participam na etapa de propagação, possibilitando assim a elucidação da ação desses antioxidantes nas fases que compõem o processo oxidativo.

2.5 Erva-mate

Ilex paraguariensis ou *Ilex paraguayensis* (Aquifoliaceae) também conhecida por erva-mate, mate, chá paraguaio, chá dos jesuítas, chá de São Bartolomeu e *Saint Hilaire*, é tradicionalmente empregada na medicina popular para a fadiga, depressão nervosa, dor reumática e dor de cabeça associada à fadiga (STAGG e MILLIN 1975) e também reconhecida por suas propriedades estimulante, tônica, diurética, imunomoduladora, anti-reumática e fracamente analgésica. Tem sua origem na América do Sul e ocorre naturalmente na Argentina, Brasil e Paraguai, tendo a maior ocorrência (80%) no Brasil, principalmente na região Sul do país. Sendo a erva-mate uma planta de composição química complexa, além das atribuições que apresenta, poderia ainda ser alvo de muitas aplicações, ocasionando assim um aumento do seu consumo e, por consequência, do mercado para esta matéria-prima (DESER 2001).

Os estudos acerca da erva-mate indicam como constituintes os seguintes compostos: água, celulose, gomas, dextrina, mucilagem, glicose, pentose, substâncias graxas, resinas aromáticas, legumina, albumina, cafeína, cefearina, cafamarina, ácido matetânico, ácido fólico, ácido caféico, ácido virídico, clorofila, colessterina e óleos essenciais (Da CROCE 2002).

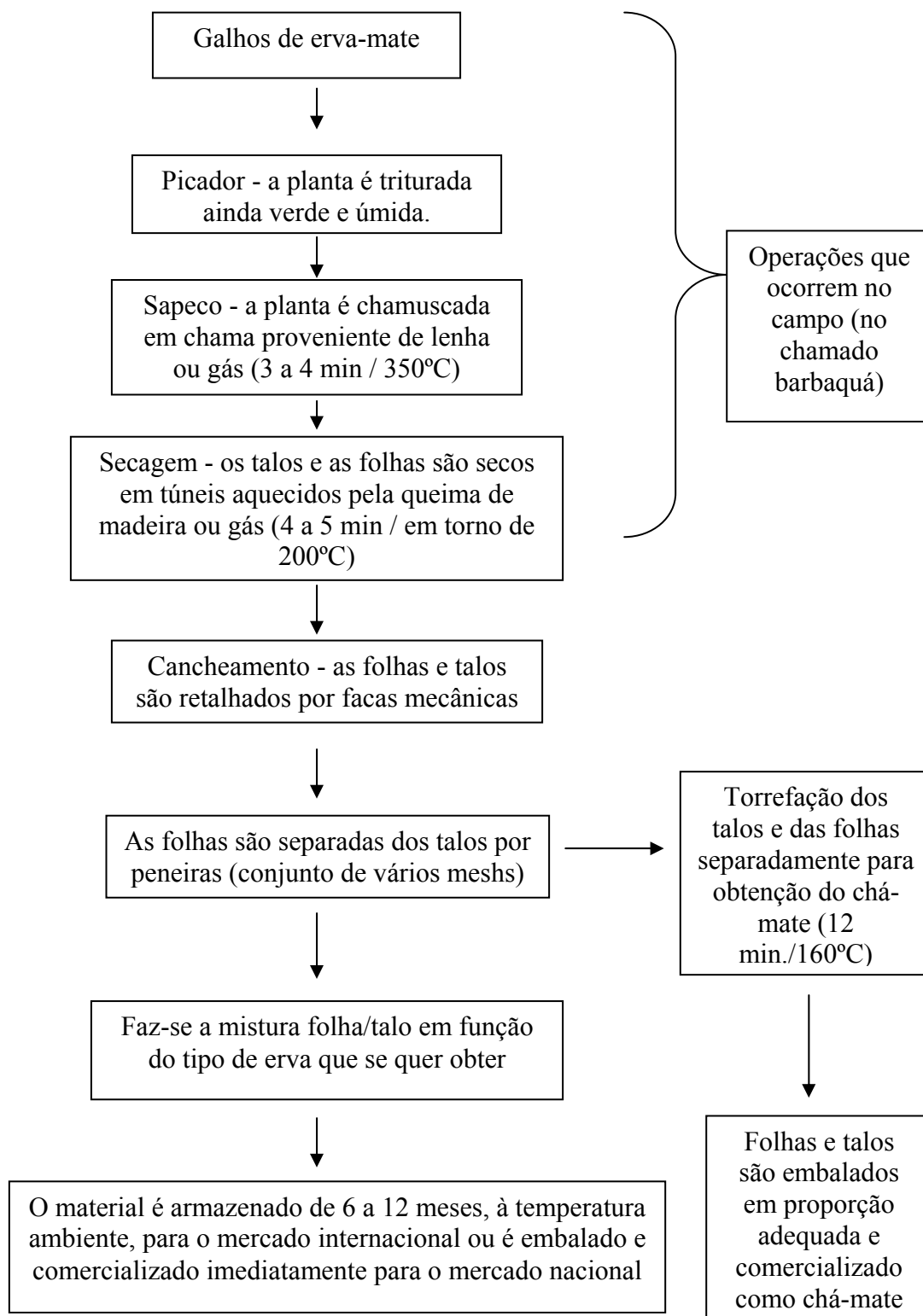
A erva-mate é o produto constituído exclusivamente pelas folhas e ramos das variedades de *Ilex paraguariensis*, na forma inteira ou moída, obtida através de tecnologia apropriada (Resolução RDC nº. 302 de 07/11/2002). O fluxograma da produção de erva-mate pode ser descrito em etapas, conforme figura 3.

A erva-mate será classificada como chimarrão quando for cancheada, padronizada, moída e preparada para consumo com água quente e, será classificada

como tererê, quando for cancheada, padronizada, moída e preparada para consumo com água fria. A padronização da erva-mate se dá em função da porcentagem de folhas presentes após peneiramento (BRASIL 1998).

O chá mate, obtido a partir da erva-mate tostada, deve seguir o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Chás - plantas destinadas à preparação de infusões ou decocções - da Secretária de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde (Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998) que define chás como produtos constituídos por partes de vegetais (inteiras, fragmentadas ou moídas) obtidos por processos tecnológicos adequados à cada espécie, utilizados exclusivamente na preparação de bebidas por infusão ou decocção em água potável, não podendo ter finalidades farmacoterapêuticas. Quanto à designação, o produto, quando simples, produzido a partir da *Camellia sinensis*, deve conter a expressão “chá” seguida dos termos “verde” ou “preto” e quando produzido a partir de *Ilex paraguariensis*, deve conter a expressão: “chá mate” seguida dos termos “verde”, “tostado” ou “queimado” (BRASIL 1998).

Figura 3. Fluxograma de produção da erva-mate



Fonte: KORMANN 2003, Comunicação oral.

O chá mate é obtido a partir da torrefação da erva-mate sem passar por processo de fermentação, podendo ser denominada erva-mate tostada. Somados aos fatores naturais que interferem diretamente nos componentes físico-químicos da erva-mate, estão os sistemas de processamento, que, além de interferir na sua composição, ainda determinam a qualidade da erva, bem como suas características sensoriais (DONADUZZI et al 2000).

O processo de torrefação leva à modificações importantes em produtos de origem vegetal, como a formação de produtos característicos da reação de Maillard e, conseqüentemente, a formação de melanoidinas, assim como a possível diminuição do teor de polifenólicos. Essas mudanças refletem-se na atividade antioxidante desses produtos, conforme já relatado para o café e cacau por exemplo, produtos em que frações isoladas com diferentes solventes mostraram atividades antioxidantes distintas (FLAMENT 1991; CHYAU et al. 2002; SAKANAKA et al. 2005).

Plantas contendo alto teor de fenólicos podem ser fontes de antioxidantes naturais. Condimentos, assim como seus respectivos extratos alcoólicos, são os vegetais mais estudados com essa finalidade. Essa mudança visa atender à exigência de consumidores adeptos de produtos naturais. Além dos condimentos, outros vegetais utilizados na medicina popular mostram potencial para a produção de extratos ricos em antioxidantes, que poderiam ser utilizados pela indústria de alimentos. Trabalhos recentes procuraram isolar determinadas classes de substâncias presentes em condimentos e ervas medicinais, utilizando a extração com solventes de diferentes polaridades e/ou diferentes métodos para avaliar a fração mais indicada como antioxidante, assim como prever os benefícios à saúde advindos de seu consumo

(MANCINI-FILHO et al. 2003; PIZZALE et al. 2002; CHYAU et al. 2002; ALIGIANNIS et al. 2003; BRAGA 2003).

2.6 Atividade antioxidante da erva-mate

Investigar a atividade antioxidante e quimioprotetora de infusões de erva-mate verde foi objeto de alguns estudos publicados recentemente. A infusão de erva-mate mostrou importante atividade antioxidante *in vitro e in vivo* (GUGLIUCCI e STAHL 1995; GUGLIUCCI 1996; GUGLIUCCI e MENINI 2002; SCHINELLA et al. 2000; FILIP et al. 2000; BRACESCO et al. 2003; CHANDRA et al. 2004; RAMIREZ-MARES et al. 2004). Os trabalhos verificaram que a erva-mate apresenta atividade antioxidante equivalente ou superior à vitamina C, vitamina E e ao Trolox®, substâncias consideradas como padrão para essa propriedade. O mecanismo proposto relaciona-se com a presença de substâncias (principalmente ácidos fenólicos) capazes de seqüestrarem radicais livres formados no início do processo de oxidação. BASTOS e TORRES (2004) apresentam uma revisão com esses dados.

A erva-mate apresenta altas concentrações de ácidos clorogênicos e concentrações baixas de flavonóides que passam para a bebida durante o processo de infusão da erva (CLIFFORD e RAMIREZ 1990; MAZZAFERA 1997; CHANDRA e MEJIA 2004). Vários fatores irão determinar a concentração dessas substâncias nessas bebidas, como: o tempo e temperatura da infusão, relação massa de erva/volume de água, granulometria da erva, composição da erva (porcentagem de talos e de folhas) e presença de outras espécies de *Ilex* que são adulterantes. BASTOS et al. (2005) ao estudarem os teores de ácido clorogênico em bebidas à base de erva-mate, preparadas

conforme são consumidas, encontraram para uma xícara de chá-mate, uma cuia de chimarrão e para o tererê (1,5g de erva para 60mL de água), respectivamente: 16mg, 27mg e 20mg de ácido-5-cafeoilquínico (5-ACQ), um dos isômeros principais do ácido clorogênico.

Apenas um trabalho estudou a atividade antioxidante *in vitro* da infusão aquosa (5 minutos, a 95°C) de erva-mate tostada, que mostrou a mesma eficiência para retardar a formação de peróxidos, avaliada pelo método do ferrotiocianato, quando comparada à infusão de erva-mate verde e ao BHT (BASTOS et al. 2005).

2.7 Chá verde

O chá, como é genericamente denominada a infusão feita a partir da *Camellia sinensis*, é consumido no mundo há mais de cinquenta séculos. Depois da água, o chá é a bebida não alcoólica mais consumida no mundo atualmente (CHANTRE e LAIRON 2002). Todo “chá” é proveniente dos arbustos da *Camellia sinensis*. Quando colhidas e picadas, as folhas podem ser processadas para obtenção do chá verde, do chá *oolong* e do chá preto. A principal diferença entre os tipos está baseada no processo de auto-oxidação, catalizado pela enzima polifenol-oxidase (PFO). Basicamente, a oxidação é o processo onde as folhas de chá, após sofrerem algum processamento (ao serem picadas ou esmagadas, por exemplo), interagem com o oxigênio, ocorrendo assim o escurecimento enzimático. O chá verde não é oxidado, o chá *oolong* é semi-oxidado e o chá preto é oxidado. A literatura antiga refere-se ao processo de oxidação do chá como sendo “fermentação”, mas este é um termo incorreto. De maneira simplificada, pode-se dizer que eles são obtidos da seguinte forma (McKAY e BLUMBERG 2002):

Chá verde – para ser obtido, as folhas são brevemente aquecidas após picadas, para a inativação enzimática (polifenol-oxidase), impedindo assim que a oxidação ocorra antes de serem secas;

Chá *oolong* – como este tipo é semi-oxidado, as folhas ficam em repouso por duas a quatro horas, sendo depois aquecidas para que o processo oxidativo seja interrompido. O tempo de oxidação irá afetar o sabor e a aparência do chá. Um tempo mais prolongado (em torno de quatro horas) irá dar origem ao chá *oolong* escuro, mais semelhante ao chá preto. Um período mais curto de oxidação (em torno de duas horas) irá dar origem ao *oolong* mais similar ao chá verde;

Chá preto – neste, as folhas são levemente esmagadas para ficarem mais susceptíveis à oxidação. Após descansarem por várias horas, as folhas de chá são aquecidas para que se interrompa o processo oxidativo. Seu peso final, após aquecido e desidratado corresponde há apenas 55% do peso original das folhas.

De todo o chá produzido e consumido no mundo, de 76% a 78% corresponde ao chá preto, 20% a 22% ao chá verde e menos do que 2% ao *oolong*.

O chá é uma rica fonte de polifenólicos (constituem aproximadamente 30% do peso bruto total do chá fresco), particularmente flavonóides. A maioria dos flavonóides presentes no chá verde (folhas e extratos) são as catequinas (GRAHAM 1992). As quatro principais catequinas presentes no chá verde são: epicatequina (EC), epicatequina-3-galato (ECG), epigalocatequina (EGC) e epigalocatequina-3-galato (EGCG).

Durante o processo de oxidação que ocorre para a aquisição do chá preto, as catequinas são convertidas à teaflavinas e tearrubinas, diminuindo conseqüentemente o

teor de catequinas. Enquanto o chá verde é produzido a partir de folhas frescas, prevenindo a oxidação dos flavonóides, o processo ao qual é submetido o chá preto resulta em um alto grau de oxidação aeróbica enzimática dos flavonóides.

Apesar dos benefícios atribuídos ao chá para a saúde desde o início da sua história, as investigações científicas a seu respeito surgiram há aproximadamente trinta anos. Muitos estudos têm demonstrado que o chá verde e preto têm várias propriedades farmacológicas, tais como: anti-hipertensivo (HENRY e STEPHENS-LARSON 1984), antioxidante (LEUNG et al. 2001), anticarcinogênico (SHI et al. 1994) e hipocolesterolêmico (YANG et al. 2001), dentre outras. A maioria dos estudos sobre os possíveis benefícios do chá à saúde tem investigado seus efeitos quimiopreventivos contra o câncer. Os estudos epidemiológicos até agora são inconclusivos (KATIYAR e MUKHTAR 1996). Uma revisão de YANG e WANG (1993) mostrou que, de cem estudos epidemiológicos realizados, aproximadamente dois terços deles não encontraram nenhuma relação entre o consumo de chá e o risco de câncer, vinte encontraram uma relação positiva e somente catorze mostraram que o consumo de chá reduzia o risco de câncer. Mais recentemente outra revisão (de estudos epidemiológicos prospectivos de câncer de estômago, cólon e pulmão) verificou que não há comprovação do efeito protetor da ingestão de chá verde no risco total de desenvolvimento dos tipos de câncer avaliados e, nos poucos estudos que este benefício é sugerido, os mesmos são restritos à ingestão muito elevada de chá e apenas em populações de alto risco para o desenvolvimento de câncer (KOHLMEIER et al. 1997). Esta hipótese reforça os achados de que o consumo de cinco ou mais xícaras de chá verde por dia estaria associado à diminuição da recorrência do câncer de mama de estágio I e II em mulheres japonesas (NAKACHI et al. 1998).

Em contraste aos resultados dos estudos epidemiológicos, inconclusivos até o momento, achados de pesquisa em animais de laboratório sustentam um efeito quimiopreventivo dos componentes do chá contra o câncer. DREOSTI et al. (1997) declarou que "nenhum outro agente testado para possíveis efeitos quimiopreventivos em modelos animais havia evocado uma atividade tão forte quanto o chá e seus componentes nas concentrações normalmente consumidas pelos humanos".

Há evidências de que o consumo de chá também pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares (HERTOG et al. 1993). Ainda que vários outros estudos prospectivos tenham demonstrado uma redução significativa no risco de doenças cardiovasculares com o consumo de chá, a evidência não é conclusiva (TIJBURG et al. 1997).

2.8 Atividade antioxidante do chá verde

O chá verde tem sido extensivamente estudado devido às suas propriedades, ligadas principalmente à presença de seus principais constituintes, os flavonóides (HARBOWY e BALENTINE 1997). Os flavonóides são amplamente reconhecidos por suas propriedades antioxidantes (WISEMAN 1997; CROFT 1998; DREOSTI 2000). As catequinas, presentes no chá, demonstraram ter uma variedade de funções fisiológicas. Diversos estudos comprovaram a atividade antioxidante *in vitro* das catequinas (NANJO et al. 1996; LANGLEY-EVANS 2000) e *in vivo* (SERAFINI et al. 1994; LEAN et al. 1999; FREEZE et al. 1999). De forma geral, a atividade antioxidante está relacionada à prevenção de várias doenças, incluindo aterosclerose, doenças do fígado e vários tipos de câncer. Os flavonóides presentes no chá têm a propriedade de eliminar as EROs e quelar íons metálicos, como o ferro e o cobre, prevenindo assim suas

participações em algumas reações de oxidação (MILLER et al. 1996). A atividade antioxidante do chá e de seus polifenólicos tem sido avaliada por diversos métodos (CAO et al. 1996; LANGLEY-EVANS 2000; MILLER et al. 2000). Utilizando o método ORAC (capacidade de absorção de radicais de oxigênio), CAO et al.(1996) constataram que tanto o chá verde quanto o chá preto possuíam maior atividade antioxidante contra radicais peróxidos do que alguns vegetais, como alho, espinafre e couve de Bruxelas. Utilizando o método FRAP (poder antioxidante pela redução do íon ferroso), LANGLEY-EVANS (2000) encontraram uma maior capacidade antioxidante total no chá verde quando comparado ao chá preto. HODGSON et al. (2000) demonstraram que o chá preto apresenta menor atividade antioxidante *ex-vivo*, quando comparado ao chá verde.

O processo de produção do chá preto, que envolve uma etapa de oxidação na qual ocorre a polimerização das catequinas à teaflavinas, não ocorre na produção do chá mate (erva-mate tostada) que, por sua vez, também não contém catequinas ou teaflavinas, e sim ácidos fenólicos.

3 JUSTIFICATIVA

A atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos aquosos de chá verde e de erva-mate verde já foi demonstrada e o mecanismo de ação está provavelmente relacionado à atividade seqüestrante de radicais livres exercida pelos compostos fenólicos presentes. O processo de torrefação, necessário para a obtenção da erva-mate tostada, causa modificações importantes na erva-mate. A formação de produtos característicos da reação de Maillard, como as melanoidinas, pode ocorrer em consequência da torrefação. Não há trabalho que compare a atividade antioxidante de extratos de chá verde, erva-mate verde e erva-mate tostada obtidos com solventes de diferentes polaridades. Este trabalho pretende verificar se os teores de fenólicos totais e a atividade antioxidante se mantêm semelhantes após a torrefação da erva-mate, comparando os resultados aos encontrados para o chá verde. Essa determinação possibilitaria verificar se há diferenças entre os mecanismos de atividade antioxidante dos extratos antes e pós torrefação, assim como a possível utilização desses extratos como antioxidantes naturais.

Extratos de menor polaridade (lipossolúveis) seriam mais facilmente utilizados pela indústria de alimentos, sendo uma alternativa aos antioxidantes sintéticos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antioxidante de extratos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde, obtidos com solventes de diversas polaridades.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar o teor de sólidos solúveis e o teor de fenólicos totais em extratos aquosos obtidos a partir de dois tempos diferentes de extração (10 minutos e 4 horas);
- Avaliar o teor de sólidos solúveis de extratos de erva-mate (verde e tostada) e chá verde por solventes de diversas polaridades;
- Avaliar e comparar o teor de compostos fenólicos nesses extratos;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos por dois métodos: capacidade de seqüestrar radicais livres (método do DPPH) e inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico);
- Estudar a associação entre a quantidade de fenólicos totais e a atividade antioxidante nos diversos extratos.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Amostra vegetal

As amostras de erva-mate verde e tostada e de chá verde foram cedidas pela empresa Leão Júnior (PR-Brasil). Foram utilizados dois lotes diferentes para cada erva, sendo que a erva-mate verde e a tostada pertenciam aos mesmos lotes, garantindo assim a única variação em função do processamento. O Lote 1 foi obtido em dezembro/2004 e o Lote 2 em março/2005. Os reagentes foram de grau analítico ou espectrofotométrico, dependendo da etapa analítica.

5.2 Métodos

5.2.1 Obtenção dos extratos

O processo de extração de substâncias pode ocorrer de diversas maneiras. Uma diferença entre esses processos pode ser em relação à temperatura de extração, que pode ser a frio ou a quente. A extração a frio tem como vantagem a preservação de princípios ativos termolábeis. Um dos tipos de extração a frio é a maceração, na qual coloca-se o produto contendo as substâncias em contato com o solvente, mantendo-se assim por um determinado período de tempo, à temperatura ambiente e em recipiente fechado. No caso da extração a quente, a desvantagem é a perda de princípios ativos termolábeis. A extração com aparelho do tipo Soxhlet é um dos tipos de extração a quente, podendo considerar-se uma extração sob refluxo, pois utiliza o refluxo do solvente. Nesse

método submete-se o material vegetal à extração com um solvente em ebulição em um aparelho, como o extrator do tipo Soxhlet, dotado de um recipiente, onde será colocado o material com o solvente acoplado a um condensador, de forma que o solvente evaporado durante o processo seja recuperado e retorne ao conjunto. Apesar de apresentar algumas desvantagens, a extração a quente em extrator do tipo Soxhlet ainda é utilizada pela sua simplicidade e eficiência (GRIGONIS et al. 2004).

No presente trabalho, foram testadas inicialmente duas abordagens de extração (a frio e a quente) baseadas em trabalhos com objetivos semelhantes (CHYAU et al. 2002; CUNHA et al. 2004; SAKANAKA et al. 2004), com algumas modificações, para se determinar qual a metodologia seria adotada:

- extração simples a frio, por maceração 24 horas;
- extração exaustiva a quente, em extrator do tipo Soxhlet, por 12 horas.

Nesta fase, apenas amostras de erva-mate verde e tostada (pertencentes ao lote 1) foram testadas, escolhidas em função da disponibilidade das mesmas. Foram obtidos extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde e tostada. No caso da extração a quente por 12 horas, ao final do tempo estabelecido, notaram-se grandes alterações no aspecto e odor das ervas/extratos, indicando assim uma inadequação para a realização dos extratos, sendo todo o material descartado. Posteriormente, foi realizada outra extração, seguindo a mesma metodologia (a quente), porém com um tempo menor de extração (4 horas), para que os dados de resíduo seco fossem comparados aos dos extratos obtidos a partir da maceração por 24 horas. Em função dos resultados obtidos, a metodologia de extração a quente foi escolhida (teores mais elevados de sólidos solúveis foram encontrados na maioria dos extratos).

Após estabelecido o método de extração (a quente, em extrator tipo Soxhlet) e tempo de extração (4 horas), optou-se por testar na mesma metodologia outro tempo de extração (10 minutos) para que pudesse ser estudado o efeito do tempo, apenas para os extratos aquosos de chá verde, erva-mate verde e tostada, conforme descrito por LIMA et al. (2004). A partir dos resultados, optou-se finalmente pela extração por 4 horas para a obtenção dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos. Os extratos obtidos foram avaliados quanto ao teor de sólidos solúveis, teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante pelo método do DPPH e Sistema β -caroteno-ácido linoléico. Complementarmente, os extratos de erva-mate verde e tostada foram avaliados quanto a estabilidade oxidativa pelo método do Rancimat®.

Para o preparo de cada extrato, foram utilizadas 5 gramas (peso seco) da respectiva erva desidratada (erva-mate verde e chá verde) e tostada (erva-mate tostada) e 100mL do respectivo solvente (água, etanol ou éter), na proporção de 1:20 (folha:solvente). A erva foi acondicionada em papel filtro (porosidade: 3 μ m) e então permaneceu submersa no solvente a partir do ponto de ebulição de cada solvente: água - 97° C, etanol - 76° C e éter - 34° C. No caso da extração por 4 horas, o papel filtro contendo a erva permaneceu submerso durante as duas primeiras horas e depois suspenso por mais duas horas. Para os extratos aquosos, obtidos a partir da extração por 10 minutos, o papel filtro que continha a erva permaneceu durante todo o tempo submerso, a partir do ponto de ebulição da água (97° C).

Após a extração, o volume de solvente foi ajustado para 100mL e os extratos armazenados em frascos âmbar, os quais, após aplicação de um fluxo de nitrogênio,

foram fechados e mantidos sob congelamento, em freezer (-18°C), até o momento das análises. Todos os extratos foram feitos em triplicata.

5.2.2 Avaliação do teor de sólidos solúveis (resíduo seco)

O objetivo dessa avaliação foi verificar o teor de sólidos solúveis presente nos extratos. O resíduo seco foi determinado através da gravimetria. Cápsulas de porcelana foram colocadas na estufa 105 °C por 2 horas e depois de retiradas foram resfriadas no dessecador. Foram pesadas em balança analítica (Metler-Toledo AB204-S). Após a pesagem foram adicionados 5mL de cada extrato. As cápsulas foram colocadas novamente na estufa a 105°C para a total evaporação do solvente e, no dia seguinte (após 12 horas), as cápsulas foram retiradas e novamente resfriadas no dessecador antes da nova pesagem (até que o peso constante fosse atingido). A diferença entre o valor da pesagem final e o valor da pesagem inicial corresponde ao peso de sólidos contidos em 5mL do extrato. O resultado está expresso em mg/mL de extrato (adaptado das normas do Instituto Adolfo Lutz 1976).

5.2.3 Avaliação do teor de fenólicos totais

A análise do teor de fenólicos totais em cada extrato foi feita de acordo com ZIELISKI e KOZOWSKA (2000) modificado por GENOVESE et al. (2003). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,25mL da diluição adequada dos extratos (1:50 para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde; 1:25 para extratos etanólicos de erva-mate verde e erva-mate tostada e 1:100 para o extrato etanólico de chá verde), 2mL de água destilada e 0,25mL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após 3 minutos à temperatura ambiente, adicionaram-se 0,25mL de uma solução saturada de Carbonato de sódio (75g/L). Os tubos foram colocados em banho-maria a 37°C durante 30 minutos para desenvolvimento da cor. A leitura da absorbância no comprimento de onda de 765nm foi feita em espectrofotômetro UV-visível. O ácido clorogênico foi utilizado como padrão. Para o preparo da curva de calibração foram utilizadas alíquotas (0,25mL) de uma solução metanólica de ácido clorogênico nas seguintes concentrações: 0,01; 0,02; 0,03; 0,04 e 0,05 mg/mL. A metodologia foi a mesma realizada para os extratos, descrita acima. O conteúdo total de fenólicos nos extratos foi calculado segundo a seguinte equação obtida a partir da curva padrão:

$$y = 9.6x + 0.0126 \quad (R^2 = 0,9972)$$

onde: y = leitura da absorbância

x = teor de fenólicos totais em 0,25mL

R²= coeficiente de correlação linear

Os resultados foram expressos em mg/mL e em mg/g (de resíduo seco), ambos em equivalente de ácido clorogênico (respectivamente mg/mL/EAC e mg/g/EAC). Essa análise ficou impossibilitada de ser feita no caso do extrato etéreo, pois o solvente não se solubilizou aos demais reagentes.

5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante

5.2.4.1 Avaliação da atividade sequestrante de radicais livres (DPPH)

A avaliação da atividade antioxidante do DPPH é feita em sistema aquoso. Designado como “ensaio de armadilha”, é um teste rápido que não envolve condições drásticas de temperatura e oxidação (SILVA et al. 1999).

A capacidade de seqüestrar radicais livres foi determinada utilizando-se o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH), obtido através da Sigma-Aldrich Química (Steinheim, Alemanha), de acordo com o método de BRAND-WILLIAMS et al. (1995), com modificações. Aos extratos (750 μ L), em diferentes concentrações, foi adicionado 1,5mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 20mg/mL (preparado diariamente). O meio de reação foi mantido em temperatura ambiente durante os 20 minutos do ensaio. Quando o DPPH reage com um antioxidante, que pode doar hidrogênio, ele é reduzido. As mudanças na coloração (de violeta escuro para amarelo claro) são medidas em espectrofotômetro UV-visível a 517 nm. A leitura do decréscimo da absorbância foi feita a diferentes intervalos de tempo (0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 e 20 min.). O antioxidante BHT foi utilizado como padrão. A fórmula utilizada para o cálculo do percentual de captação do DPPH foi a seguinte:

$$\% \text{ de Captação} = \frac{[(\text{Abs. do branco do DPPH}) - (\text{Abs. final da amostra} - \text{abs. do branco da amostra})] \times 100}{\text{do DPPH} \quad \text{Abs. do branco do DPPH}}$$

onde:

- Abs: absorbância
- Branco do DPPH: 0,75mL metanol + 1,5mL da solução de DPPH
- : Branco da amostra: 0,75mL da amostra + 1,5mL de metanol

Ambos os valores de leitura de absorbância foram feitos imediatamente após o preparo dos brancos, não sendo necessárias várias medidas durante o tempo de leitura da absorbância da amostra. Os resultados foram expressos em % de captação do DPPH.

5.2.4.2 Avaliação da inibição da oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico

A avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico é realizada através de um ensaio espectrofotométrico baseado na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa de um ácido graxo (como o linoléico). Apesar de ser um método simples e sensível, não é específico, pois substâncias oxidantes ou redutoras interferem no ensaio. A falta de reprodutibilidade pode ser apontada como uma desvantagem pois, como é realizado em um meio emulsionado (aquoso-lipídico), muitas vezes não se consegue reproduzir os valores de

absorbância (VON GADOW et al. 1997). Apesar disso, é um método amplamente utilizado. Nele, a atividade antioxidante é medida pela habilidade que a amostra a ser testada tem em minimizar a completa oxidação do ácido-linoléico e β -caroteno em um sistema aquoso-lipídico emulsificado, que perde sua coloração alaranjada quando reage com radicais (ROSA-ROMERO et al. 1999).

A determinação da atividade antioxidante foi realizada segundo MARCO (1968) e modificada por MANCINI-FILHO (1989). Foi utilizado como substrato a emulsão de β -caroteno/ácido linoléico. Vinte e oito microlitros da solução de β -caroteno (preparada na proporção 20mg de β -caroteno/mL de clorofórmio) foi adicionada de 28 μ L de ácido linoléico e 200mg de *Tween* 40 (utilizado como emulsificante). Após o clorofórmio ter sido evaporado sob atmosfera de nitrogênio, 140mL de água oxigenada (água destilada tratada com O₂ durante 30 minutos) foi adicionada. No tubo de ensaio, 5mL desta emulsão foi adicionada a 1mL da diluição adequada dos extratos (obtidas baseadas nas concentrações a serem testadas: 0,5 e 1,0 mg de resíduo seco/mL, tendo os volumes ajustados para 1mL). Após cada solução, contendo os respectivos extratos, ser homogeneizada, a leitura foi feita em espectrofotômetro a 470nm, sendo a primeira leitura do tempo 0 (tempo inicial). Os tubos foram então colocados no banho-maria (50°C) e as próximas leituras foram feitas a cada 15 minutos, durante 2 horas. O BHT foi utilizado como padrão. Para o cálculo das porcentagens de inibição da oxidação, foi utilizada a seguinte fórmula:

100% da oxidação = absorbância inicial do controle– absorbância final do controle

onde:

controle - emulsão sem o extrato e sem BHT

Correlacionou-se a queda na leitura da absorbância das amostras com o controle e foi estabelecida a porcentagem de inibição da oxidação a partir da subtração da porcentagem da oxidação de cada amostra de 100, segundo a fórmula abaixo:

$$\%AA = 100 - \frac{(\text{decaimento da absorbância da amostra})}{(\text{decaimento da absorbância do controle})} \times 100$$

onde:

%AA= porcentagem de inibição da oxidação

Todas as soluções e emulsões foram preparadas diariamente. Os resultados foram expressos em % de inibição da oxidação.

5.2.4.3 Avaliação do período de indução da oxidação pelo método do Rancimat®

Após testar a atividade antioxidante de todos os extratos pelo método do DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, optou-se por testar complementarmente apenas os extratos de erva-mate (verde e tostada), em sistema lipídico, pelo método do Rancimat®. Foi utilizado o aparelho Rancimat® 743, marca *Metrohm*, conectado ao programa PC: 743 Rancimat 1.0. Nesse aparelho, o fluxo de ar passa através do substrato (neste trabalho o substrato foi a banha de porco) mantida sob aquecimento (em temperatura de 110°C), depois borbulha em água deionizada arrastando os ácidos carboxílicos voláteis (principalmente ácido fórmico), gerados no processo de oxidação. Estes ácidos se solubilizam aumentando a condutividade elétrica da água. A partir da curva de condutividade elétrica *versus* tempo, constroem-se duas paralelas que se interceptam em um ponto que corresponde na escala de tempo ao período de indução ou índice de estabilidade oxidativa. Abaixo desse ponto, praticamente não ocorre a formação de compostos secundários de oxidação, enquanto que, acima do mesmo, ocorre rápido aumento da taxa de oxidação, do índice de peróxido, da absorção de oxigênio e da formação de voláteis. O Rancimat® apresenta o resultado já calculado do período de indução.

A atividade antioxidante foi determinada através da medida do tempo de indução da banha de porco (sem antioxidante) e da banha de porco contendo os respectivos extratos a serem testados. Os volumes dos extratos foram previamente calculados baseados nos respectivos resíduos secos, obtendo-se assim a proporção de 1mg de resíduo seco para 3 g de banha.

Foram medidos os volumes de cada extrato e colocados separadamente nos tubos do Rancimat®. Os solventes dos extratos foram evaporados com nitrogênio. Adicionou-se os 3g de banha de porco. A mistura foi homogeneizada em aparelho de ultra-som por 15 minutos. Em seguida, os tubos foram colocados no Rancimat® até a curva de condutividade pelo tempo de reação se completar. O cálculo do período de indução foi obtido com a seguinte programação:

- temperatura 110°C;
- $\Delta T=1,5^\circ\text{C}$;
- fluxo de ar de 20L/h.

Para que fosse possível a comparação, foram realizados testes sem adição dos extratos, apenas com a banha de porco, servindo assim de controle para o ensaio. As análises foram feitas em duplicata. Os resultados foram expressos como: Período de indução e Índice de Atividade Antioxidante (IAA), calculado pela fórmula:

$$\mathbf{IAA} = \text{PI}_{\text{amostra}} / \text{PI}_{\text{controle}}$$

onde:

$\text{PI}_{\text{amostra}}$ = período de indução (h) da banha de porco + extrato da amostra

$\text{PI}_{\text{controle}}$ = período de indução (h) da banha de porco

5.2.5 Análise estatística

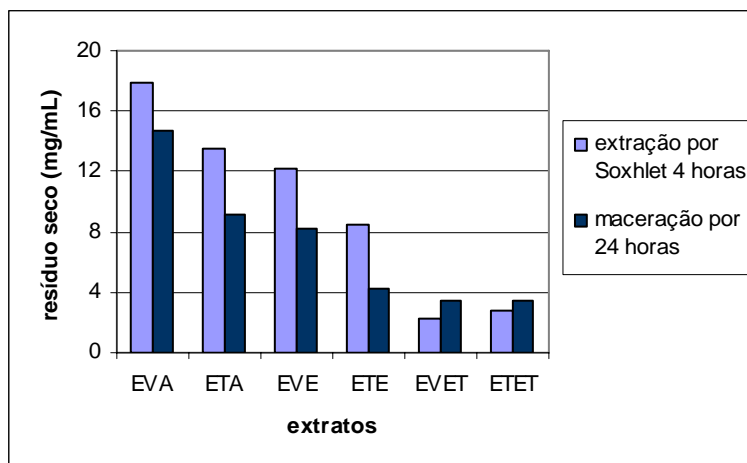
Para comparar os tipos de ervas foram ajustados dois modelos de análise de variância. O primeiro tipo, denominado modelo 1, foi utilizado para estimar o erro-padrão dos intervalos de confiança das diferenças das médias entre extratos de erva-mate verde e extratos de erva-mate tostada. O segundo tipo, denominado modelo 2, foi utilizado para estimar o erro-padrão dos intervalos de confiança (nível de confiança de 95%) das diferenças entre extratos de chá verde e de erva-mate verde e entre extratos de chá verde e de erva-mate tostada (ANEXO 1). Todos os intervalos de confiança construídos estão apresentados no ANEXO 2. Para estudar a associação entre a quantidade de fenólicos totais (mg/g/EAC de resíduo seco) e a atividade antioxidante (% de captação do DPPH e % de inibição da oxidação) foram feitos gráficos de dispersão.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Estudo da metodologia de extração

6.1.1 Efeito da metodologia de extração (a frio e a quente) sobre o teor de sólidos solúveis (resíduo seco) para extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada)

Nos extratos obtidos a partir de um único lote de erva-mate (verde e tostada), por duas metodologias de extração diferentes (extração a quente por 4 horas - em extrator tipo Soxhlet- e extração a frio – maceração por 24 horas) foram avaliados os teores de sólidos solúveis (resíduo seco). Das seis amostras obtidas a partir da maceração por 24 horas, quatro apresentaram teores de sólidos solúveis inferiores aos obtidos na extração a quente por 4 horas. Baseado nestes resultados, considerou-se a extração a quente mais eficiente, sendo escolhida para ser submetida à avaliação dos demais parâmetros selecionados neste estudo (figura 4).



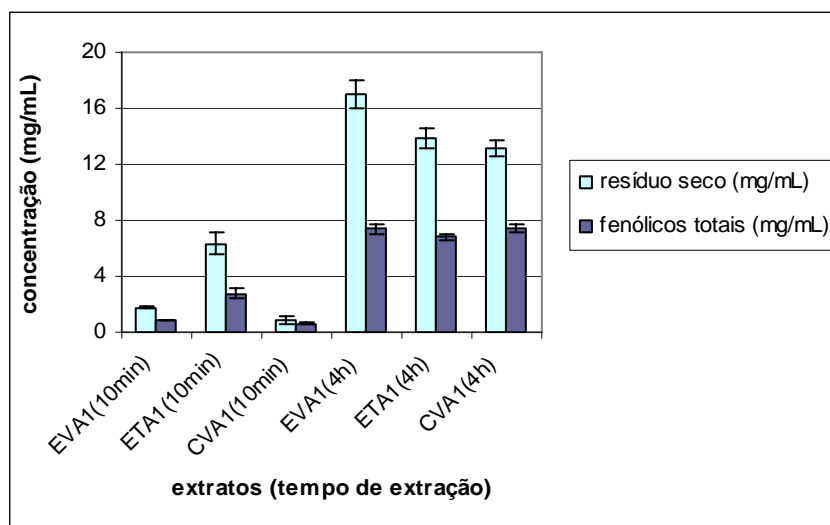
EVA- extrato aquoso de erva-mate verde; ETA- extrato aquoso de erva-mate tostada; EVE-extrato etanólico de erva-mate verde; ETE- extrato etanólico de erva-mate tostada; EVET- extrato etéreo de erva-mate verde; ETET- extrato etéreo de erva-mate tostada

Figura 4. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco) de extratos de erva-mate (verde e tostada) obtidos por extração a frio (maceração-24 horas) e por extração a quente (extrator tipo Soxhlet-4horas)

6.1.2 Efeito do tempo de extração (10 minutos e 4 horas) para extratos aquosos de chá verde e de erva-mate (verde e tostada) sobre os teores de sólidos solúveis (resíduo seco) e fenólicos totais

Após terem sido realizadas extrações por dois tempos diferentes, pôde-se observar que a extração aquosa por 4 horas foi mais eficiente do que a extração por 10 minutos. LIMA et al. (2004) ao avaliarem o teor de fenólicos totais em chás brasileiros, obtidos por extração aquosa a quente em três tempos diferentes de extração (3, 5 e 10 minutos), encontraram os maiores teores de fenólicos totais na erva-mate tostada nos

extratos obtidos pela extração por 10 minutos (98,15mg/g de erva). A avaliação desses parâmetros em extratos obtidos a partir de dois tempos de extração diferentes possibilitou verificar se haveria aumento dos teores de sólidos solúveis e fenólicos totais para extratos obtidos a partir de um tempo maior de extração. Os resultados estão representados graficamente (figura 5).



EVA- extrato aquoso de erva-mate verde; ETA- extrato aquoso de erva-mate tostada; CVA- extrato aquoso de chá verde.

* Os resultados expressam graficamente a média das triplicatas \pm desvio padrão

Figura 5. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco mg/mL) e fenólicos totais (mg/mL) dos extratos aquosos de erva-mate verde, erva mate-tostada e chá verde.

Observa-se que o resíduo seco relativo ao tempo de extração de 4 horas apresentou valores superiores aos relativos ao tempo de 10 minutos. Quando comparados, pode-se afirmar que os valores médios de resíduo seco para a extração de 10 minutos corresponderam a 10,5 % (erva-mate verde), 45,7% (erva-mate tostada) e

6,2% (chá verde) dos valores médios totais encontrados para a extração de 4 horas nos respectivos extratos. Em relação aos fenólicos totais (mg/mL) os teores obtidos na extração por 4 horas também foram muito superiores aos encontrados para os obtidos nas extrações por 10 minutos, demonstrando nesse caso a maior eficiência da extração por 4 horas.

Ao se comparar o teor de sólidos solúveis e de fenólicos totais (mg/mL) dos extratos de diferentes tipos de ervas, considerando o mesmo tempo de infusão (10 minutos), observa-se que o extrato de erva-mate tostada apresenta valores muito superiores a erva-mate verde (350% a mais de sólidos solúveis e de fenólicos totais), não sendo mantido o mesmo comportamento para o tempo de 4 horas (tabela 2). Como a erva-mate tostada já foi previamente submetida à temperaturas mais elevadas do que a erva-mate verde, quando exposta a um tempo de extração menor, indica apresentar maior facilidade de extração de seus compostos, não significando assim que possui maior quantidade de substâncias solúveis em água na erva-mate tostada e sim uma maior eficiência na extração por um período mais curto de tempo.

CHANDRA e MEJIA (2004) ao avaliarem o teor de fenólicos totais de extratos aquosos obtidos a partir de 2,7g de erva desidratada para 250mL de água fervente (10 minutos de infusão) obtiveram resultados superiores para o extrato de chá-verde (2,22mg/mL) em comparação ao extrato de erva-mate verde (1,33mg/mL) em equivalente de ácido gálico. Já BIXBY et al. (2005) ao estudarem extratos aquosos de erva-mate verde (5g/100mL) e chá verde (2,5g/100mL) encontraram resultados superiores (aproximadamente três vezes maior) para o extrato de erva-mate verde. No presente estudo o teor de fenólicos foi levemente superior para extratos aquosos de

erva-mate verde em comparação ao de chá verde, sendo que a proporção de erva/solvente foi a mesma para todos os extratos (5g de erva/100mL de solvente).

Quando o teor de fenólicos totais foi analisado em relação ao resíduo seco (mg/g de resíduo seco), pôde-se observar que, em relação ao tempo de extração, não houve grande diferença nos teores para os extratos de erva-mate verde e tostada. No caso do chá verde, com um maior tempo de extração (4 horas) houve proporcionalmente uma diminuição no valor médio de fenólicos totais, embora tenham apresentado uma variabilidade maior, que poderia ser explicada por uma maior diferença nos dois lotes de chá verde utilizados no presente estudo (tabela 2). O procedimento para a obtenção dos extratos empregado, pode ter promovido maior degradação dos fenólicos presentes no chá verde (ESMELINDRO et al. 2002) relativamente aos presentes na erva-mate, uma vez que o processamento da erva-mate já envolve altas temperaturas, enquanto o processamento do chá verde envolve apenas secagem em temperaturas amenas (McKAY e BLUMBERG 2002).

Tabela 2. Teor de sólidos solúveis (resíduo seco mg/mL) e fenólicos totais (mg/g de resíduo seco) de extratos aquosos de erva-mate verde, erva mate-tostada e chá verde

Extrato/tempo	Tipo de erva	Resíduo seco (mg/mL)	Fenólicos totais (mg/mL/EAC)	Fenólicos totais (mg/g/EAC)
Aquoso (10 min)	Erva-mate verde	1,8 ± 0,1a	0,8 ± 0,0a	467,4 ± 13,8a
	Erva-mate tostada	6,3 ± 0,8b	2,8 ± 0,3b	440,5 ± 16,2b
	Chá verde	0,9 ± 0,2a	0,6 ± 0,1c	726,8 ± 129,3a
Aquoso (4 horas)	Erva-mate verde	17,0 ± 1,0a	7,4 ± 0,4a	437,1 ± 13,7a
	Erva-mate tostada	13,9 ± 0,7b	6,8 ± 0,2a	490,5 ± 11,4b
	Chá verde	13,9 ± 0,4a,b	7,4 ± 0,3a	565,1 ± 45,6a,b

* Os resultados expressam a média das triplicatas ± desvio padrão

Para cada tempo de extração e para cada parâmetro avaliado, letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa

6.1.3 Efeito do solvente sobre os teores de sólidos solúveis (resíduo seco) e fenólicos totais

Baseado nos resultados comparativos em relação ao tempo de extração (10 minutos e 4 horas) para extratos aquosos, optou-se por realizar a extração de 4 horas para extratos aquosos, etanólicos e etéreos, possibilitando assim o estudo do solvente em relação aos sólidos solúveis, fenólicos totais e a avaliação da atividade antioxidante dos mesmos.

A utilização de três solventes de diferentes polaridades possibilitou a extração de compostos mais polares (extrato aquoso), de polaridade intermediária (extrato etanólico) e apolares (extrato etéreo) das ervas estudadas. Em relação ao teor de sólidos solúveis,

os extratos aquosos apresentaram resultados superiores aos demais para a erva-mate (verde e tostada) e igual ao etanólico para o chá verde, mostrando assim a eficácia de solventes mais polares (tabela 3). De acordo com JULKUNEN-TIITO (1985), a predominância de compostos fenólicos em vegetais, em sua maioria solúveis em solventes mais polares, poderia explicar os resultados.

Pode-se afirmar que o processo de torrefação da erva-mate ocasiona uma perda de compostos inicialmente presentes no material, visto que, após 4 horas de extração, o rendimento da erva-mate verde é superior ao da erva-mate tostada, assim como acontece no processo de torrefação do café, onde há perda de alguns compostos (fenólicos, por exemplo) em relação ao café verde (FUSTER et al. 2000). É possível observar também que os teores de sólidos solúveis (resíduo seco) dos extratos etéreos foram muito inferiores aos demais para todas as ervas, porém o extrato de chá verde apresentou o menor resíduo seco dentre eles, indicando assim que apresenta uma menor quantidade de substâncias apolares quando comparado à erva-mate (verde e tostada).

Como os fenólicos constituem um dos maiores grupos de compostos presentes em plantas, atuando como antioxidantes primários ou captadores de radicais livres, justifica-se a importância de se avaliar o teor desses compostos nos extratos. MELO et al. (2003) avaliaram o teor de fenólicos totais de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de coentro (*Coriandrum sativum* L.), sendo que para esse último foi detectada a ausência de compostos fenólicos, embora esses extratos tenham exibido atividade antioxidante similar ao extrato aquoso.

No presente trabalho, a determinação de fenólicos totais no extrato etéreo foi impossibilitada pela não miscibilidade entre os solventes e reagentes, tornando a solução turva.

Dentre os extratos avaliados, o extrato etanólico de chá verde apresentou o maior teor de fenólicos totais ($13,0 \pm 0,5$ mg/mL/EAC), representando 93,5% do total de substâncias extraídas.

Para a erva-mate (verde e tostada) os maiores teores de fenólicos foram encontrados nos extratos aquosos, correspondendo respectivamente a 43,5% e 48,9% do total de compostos extraídos. De acordo com os achados de BASTOS et al. (2005) que avaliaram o teor de fenólicos totais em extratos aquosos de erva-mate verde e tostada, aproximadamente 25% do total de sólidos solúveis correspondiam a compostos fenólicos. Como os extratos foram obtidos por extração a quente (infusão por 5 minutos), na proporção de 3 g de erva-mate para cada 250mL de água quente, o tempo de extração e temperatura do solvente poderiam explicar os resultados inferiores aos obtidos no presente trabalho. Segundo CAMPOS et al. (1996) a erva-mate é rica em polifenólicos hidrossolúveis, como os ácidos isoclorogênico, caféico e clorogênico. BIXBY et al. (2005) ao avaliarem os teores de fenólicos totais de diferentes bebidas (da forma como são usualmente ingeridas) encontrou o maior teor para a infusão aquosa de erva-mate verde, seguidos pelo vinho tinto e pelo chá verde.

No caso dos extratos de erva-mate (verde e tostada), os extratos aquosos apresentaram valores superiores de fenólicos totais quando comparados aos extratos etanólicos, ocorrendo o inverso para o chá verde, cujo extrato etanólico apresentou valor superior ao extrato aquoso. Esses resultados indicam a presença de compostos fenólicos mais polares na erva-mate (verde e tostada) e de polaridade intermediária no chá verde, como as catequinas.

Tabela 3. Resíduo seco (mg/mL) e fenólicos totais (mg/mL/EAC) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva mate-tostada e chá verde

Extrato	Tipo de erva	Resíduo seco (mg/mL)	Fenólicos totais (mg/mL/EAC)	Fenólicos totais/resíduo seco x 100
Aquoso	Erva-mate verde	17,0 ± 1,0a	7,4 ± 0,4a	43,5%
	Erva-mate tostada	13,9 ± 0,7b	6,8 ± 0,2a	48,9%
	Chá verde	13,9 ± 0,4a,b	7,4 ± 0,3a	53,2%
Etanólico	Erva-mate verde	13,9 ± 1,9a	4,1 ± 0,3a	29,5%
	Erva-mate tostada	10,1 ± 1,8b	3,4 ± 0,6b	24,5%
	Chá verde	13,9 ± 0,9a	13,0 ± 0,5c	93,5%
Etéreo	Erva-mate verde	2,5 ± 0,2a	NA	--
	Erva-mate tostada	2,8 ± 0,2a	NA	--
	Chá verde	1,5 ± 0,2a	NA	--

* Os resultados expressam a média das triplicatas ± desvio padrão

NA – Não avaliado

Para cada solvente e para cada parâmetro avaliado, letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significante

6.2 Atividade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada) e chá verde obtidos a partir da extração por 4 horas

6.2.1 Atividade sequestrante de radicais livres (DPPH)

Inicialmente, a determinação da atividade sequestrante do radical livre DPPH foi conduzida para os extratos aquosos, etanólicos e etéreos em quatro diferentes concentrações (0,05- 0,1- 0,5- 1,0mg/mL de resíduo seco) a partir de um único lote, para todas as ervas, a fim de se avaliar os melhores intervalos de concentração.

Os extratos etéreos de erva-mate verde e tostada em menor concentração (0,05 e 0,1 mg/mL) apresentaram resultados muito inferiores aos demais, variando a capacidade de captação do DPPH entre 29,47 e 44,50 %. Os demais extratos apresentam capacidade de captação do DPPH acima de 87,78% (tabela 4).

MILIAUSKAS et al. (2003) discutem que extratos que apresentam alta capacidade de captação de DPPH (superiores a 90%) correspondem praticamente a totalidade de captação deste radical livre em função do método, pois o mesmo apresenta uma absorção residual permanente podendo equivaler até aproximadamente 7% da absorção total final.

Tabela 4. Atividade antioxidante (% de captação do DPPH) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (Lote 1)

Solvente	Erva	Captação do radical livre DPPH (%)			
		0,05 mg/mL	0,1 mg/mL	0,5 mg/mL	1,0 mg/mL
Água	Erva-mate verde	90,46 ± 0,22 a,b	90,98 ± 0,48 b,c	93,66 ± 0,24 c,d	94,50 ± 0,55 c,e
	Erva-mate tostada	87,78 ± 0,76 a,b	89,33 ± 0,32 b,c	94,08 ± 1,78 b,d	94,50 ± 0,33 d,e
	Chá verde	88,36 ± 0,76 a,b	91,12 ± 0,00 b,c	91,60 ± 0,32 c,d	91,32 ± 0,38 b,d
Etanol	Erva-mate verde	88,94 ± 0,22 a,b	95,07 ± 0,51 c,d	95,12 ± 0,60 d,e	94,29 ± 0,90 d,f
	Erva-mate tostada	92,05 ± 0,60 a,b	93,46 ± 0,52 b,c	94,42 ± 0,90 b,d	95,76 ± 0,35 c,d
	Chá verde	92,20 ± 0,52 a,b	94,92 ± 0,20 c,d	95,78 ± 0,36 d,e	96,44 ± 0,35 d,f
Éter	Erva-mate verde	29,47 ± 3,82 a,b	30,14 ± 2,81 b,c	94,68 ± 1,30 d,e	96,89 ± 0,35 e,f
	Erva-mate tostada	35,38 ± 3,10 a,b	44,50 ± 2,04 b,c	95,75 ± 0,73 d,e	96,52 ± 0,52 e,f
	Chá verde	91,74 ± 0,47 a,b	92,86 ± 2,04 b,c	92,79 ± 1,74 b,d	99,55 ± 0,23 c,d

Os resultados expressam a média das triplicatas ± desvio padrão

Para cada solvente e para cada tipo de erva, no mínimo uma letra igual na mesma linha, em colunas diferentes, representa que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores das respectivas concentrações

Em função destes resultados, as concentrações 0,5 e 1,0mg/mL foram escolhidas para as subseqüentes análises (incluindo os extratos provenientes de ambos os lotes, 1 e 2) (tabela 5).

Tabela 5. Atividade antioxidante (% de captação do DPPH) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (Lotes 1 e 2)

Extrato	Erva	% de captação do DPPH	
		0,5 mg/mL	1,0mg/mL
Aquoso	Erva-mate verde	93,05 ± 0,70a	93,59 ± 1,09a
	Erva-mate tostada	92,67 ± 1,91a	93,68 ± 0,98a
	Chá verde	90,95 ± 0,84a	91,54 ± 0,36a
Etanólico	Erva-mate verde	95,06 ± 0,50a	95,67 ± 1,67a
	Erva-mate tostada	94,00 ± 0,78a	95,82 ± 0,56a
	Chá verde	95,70 ± 0,25a	95,88 ± 0,72a
Etéreo	Erva-mate verde	94,61 ± 0,85a	96,60 ± 0,57a
	Erva-mate tostada	94,48 ± 1,47a	94,68 ± 2,05b
	Chá verde	92,53 ± 1,18a	97,07 ± 2,77a,b

*Os resultados expressam a média das triplicatas ± desvio padrão

Valor da porcentagem de captação do DPPH para o BHT do ensaio, respectivamente para as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL: 92,23% e 91,90%

Para cada solvente e para cada concentração, letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significante

Os valores de captação do DPPH, para todos os extratos, foram bastante elevados, sendo que os extratos etanólicos de erva-mate verde e chá verde e o extrato etéreo de erva-mate verde apresentaram resultados superiores ao do BHT, segundo os intervalos de confiança (tabelas 6 e 8 do ANEXO 2). Todos os demais extratos apresentaram desempenho similar ao do BHT. BIXBY et al. (2005) ao estudarem a atividade antioxidante (captação de radicais livres pelo método do DPPH) de vinhos e

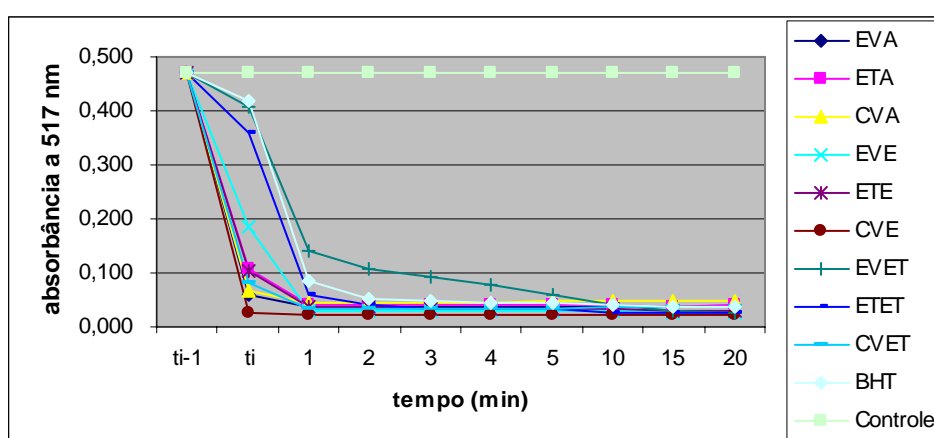
extratos aquosos de marcela (*Achyrocline satureoides*), chá verde, chá preto e erva-mate verde, encontraram os melhores resultados para o extrato de erva-mate verde quando comparado aos demais.

Para uma melhor ilustração do mecanismo de ação antioxidante foram construídas curvas cinéticas da captação do DPPH para cada concentração (0,5 e 1,0 mg/mL) de todos os extratos durante os 20 minutos de ensaio. Os resultados estão apresentados comparados ao controle e ao BHT (figuras 6 e 7). Para a construção dos gráficos considerou-se como o valor de t_{i-1} (tempo inicial - 1) o valor de leitura da solução do DPPH, pois no momento t_i (tempo inicial) que foi o momento de adição dos extratos à solução de DPPH, a velocidade da reação não permitiu a leitura da absorbância antes do início da reação. É possível observar que, para todos os extratos, em ambas as concentrações (0,5 e 1,0mg/mL), a atividade antioxidante foi muito elevada, em alguns casos atingindo a estabilidade no primeiro minuto do teste. Esses resultados mostram a eficiência de captação do radical livre DPPH dos extratos testados. Segundo CARINI et al. (1998), a capacidade de captação do radical livre DPPH pela erva-mate verde é determinada pela habilidade de transferência do hidrogênio para o radical livre estável DPPH.

Outras pesquisas confirmam que os extratos aquosos de erva-mate verde são potentes captadores de radicais livres (BIXBY et al. 2005), com igual ou superior atividade antioxidante, quando comparados ao ácido clorogênico puro, ao ácido ascórbico e à vitamina E (CARINI et al. 1998). BRACESCO et al. (2003) estudaram o efeito da concentração de extratos aquosos de erva-mate verde sobre a captação do DPPH e encontraram um efeito dose-dependente. Além disso, ao construírem a curva cinética de captação do DPPH, tanto para a erva-mate verde, quanto para o chá verde,

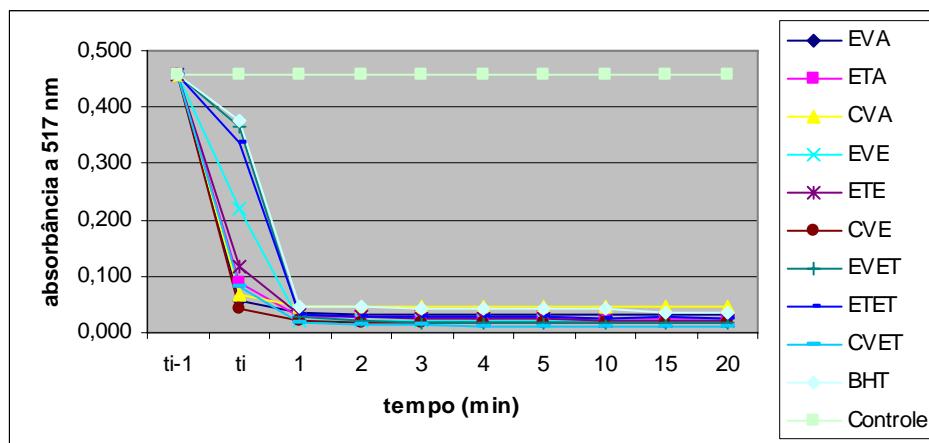
pôde-se observar a queda acentuada da absorvância (interação com o DPPH) no primeiro minuto, de acordo com os resultados encontrados neste trabalho.

Alguns trabalhos demonstraram a atividade antioxidante de óleos essenciais, como do eucalipto e sálvia (LEE e SHIBAMOTO 2001; TEPE et al. 2005). No presente estudo, os extratos etéreos apresentaram elevada atividade antioxidante. A presença de óleos essenciais com tais propriedades poderiam explicar os resultados.



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá verde); EVET (extrato etéreo de erva-mate verde); ETET (extrato etéreo de erva-mate tostada); CVET (extrato etéreo de chá verde)

Figura 6. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) em relação à captura do radical livre DPPH



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá verde); EVET (extrato etéreo de erva-mate verde); ETET (extrato etéreo de erva-mate tostada); CVET (extrato etéreo de chá verde)

Figura 7. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) em relação à captação do radical livre DPPH

6.2.2 Inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)

Segundo GUGLIUCCI e STAHL (1995), a maioria dos compostos polifenólicos presentes na erva-mate é composta pelos ácidos clorogênicos e apesar da erva-mate verde conter ácido ascórbico, a quantidade presente seria muito pequena para que pudesse exercer atividade antioxidante. Os mesmos autores sugerem que deve haver uma ação conjunta dos polifenólicos presentes na erva-mate, pois quando testado isoladamente, o ácido clorogênico não apresenta o mesmo desempenho do que os extratos de erva-mate verde. Segundo CAMPOS et al. (1996) tanto a erva-mate verde quanto o vinho tinto, apresentam alta concentração de antioxidantes, sendo uma parte constituída por compostos de alta reatividade frente a radicais livres e outra menos

reativa, constituindo assim uma situação ideal para a proteção, já que poderiam modular um estado de equilíbrio na concentração de radicais livres por períodos mais prolongados.

O sistema β -caroteno/ácido-linoléico é constituído por uma emulsão, sendo considerado assim um sistema aquoso-lipídico. Nesse método, a atividade antioxidante é avaliada pela capacidade de um extrato ou antioxidante isolado inibir o processo de oxidação no sistema, avaliado em um período de duas horas. Diferentemente do que ocorre no método do DPPH, os antioxidantes deverão apresentar maior estabilidade para garantir maior atividade antioxidante. Os resultados obtidos para os extratos estão apresentados na tabela 6 e as curva cinéticas, que possibilitam verificar o comportamento dos extratos durante os 120 minutos do teste, nas figuras 8 e 9. Não foi possível a avaliação nos extratos na concentração de 1,0mg/mL pois o ponto de ebulição do éter (34°C) é inferior à temperatura do banho-maria no qual as soluções deveriam permanecer após a primeira leitura e, como estava presente em um volume maior, além de alterar a concentração dos extratos, impossibilitavam a leitura no primeiro minuto.

Tabela 6. Atividade antioxidante (% de inibição da oxidação sistema β -caroteno/ácido linoléico) de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde

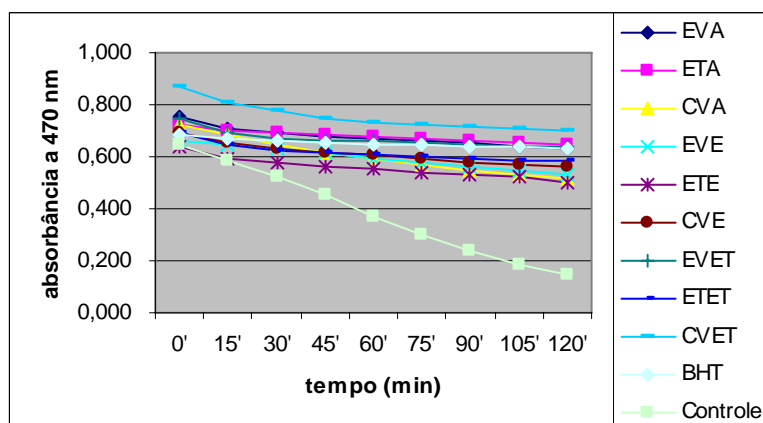
Extrato	Tipo de erva	% de inibição da oxidação	
		0,5 mg/mL	1,0mg/mL
Aquoso	Erva-mate verde	78,31 \pm 3,90a	81,74 \pm 1,95a
	Erva-mate tostada	86,23 \pm 1,87b	90,02 \pm 1,24b
	Chá verde	62,53 \pm 8,01a,b	73,17 \pm 11,04a,b
Etanólico	Erva-mate verde	73,70 \pm 6,51a	74,62 \pm 3,46a
	Erva-mate tostada	72,27 \pm 5,92a	83,32 \pm 7,91b
	Chá verde	74,17 \pm 4,86a	82,88 \pm 1,23a,b
Etéreo	Erva-mate verde	75,72 \pm 7,71a	NA
	Erva-mate tostada	76,91 \pm 6,53a	NA
	Chá verde	62,55 \pm 12,30a	NA

* Os resultados expressam a média das triplicatas \pm desvio padrão

Valor da porcentagem de inibição da oxidação para o BHT do ensaio, respectivamente para as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/mL: 89,61% e 90,73%

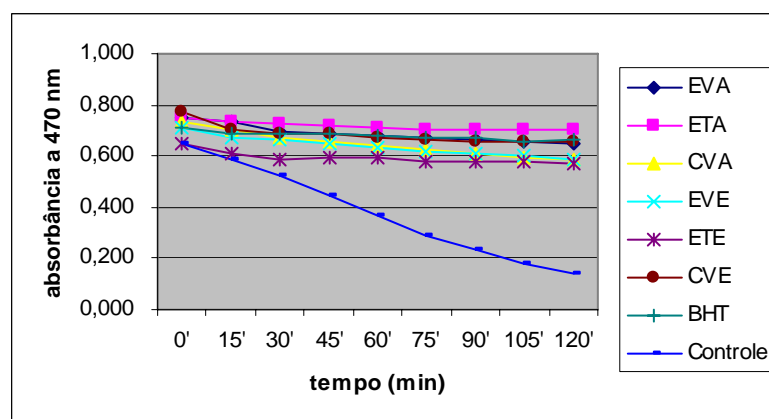
Para cada solvente e para cada concentração, letras diferentes na mesma coluna representam diferença estatisticamente significativa

NA – Não avaliado



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá-verde); EVET (extrato etéreo de erva-mate verde); ETET (extrato etéreo de erva-mate tostada); CVET (extrato etéreo de chá verde)

Figura 8. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) em relação à inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá-verde); EVET (extrato etéreo de erva-mate verde); ETET (extrato etéreo de erva-mate tostada); CVET (extrato etéreo de chá verde)

Figura 9. Curva cinética do potencial antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) em relação à inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico)

Exceto os extratos aquosos e etéreos de chá verde (0,5mg/mL), todos os demais apresentaram resultados superiores aos do BHT. Os maiores valores de inibição da oxidação foram encontrados para extratos aquosos de erva-mate tostada, sendo que foi estatisticamente significante maior (10,11%) do que aqueles encontrados para a erva-mate verde, ambos na concentração de 0,5mg/mL (tabela 6). Para a concentração de 1,0mg/mL os extratos aquosos e etanólicos de erva-mate tostada também apresentaram resultados superiores aos de erva-mate verde, apresentando diferenças estatisticamente significantes, sendo respectivamente 10,12% e 11,66% maiores.

Assim como os extratos de erva-mate tostada no sistema β -caroteno/ácido-linoléico (1,0mg/mL) apresentaram atividade antioxidante superior aos respectivos extratos de erva-mate verde, é possível verificar que o mesmo comportamento ocorre no caso do café, onde grãos torrados apresentam maior atividade antioxidante quando comparados a grãos verdes (crus), que por sua vez contêm maiores concentrações de antioxidantes polifenólicos (NICOLI et al. 1997; DAGLIA et al. 2000), sugerindo assim que outros compostos, que não os fenólicos, poderiam ser responsáveis pela atividade antioxidante em grãos de café submetidos à torrefação.

Paralelamente à perda de nutrientes, os alimentos podem sofrer alterações químicas durante tratamentos térmicos. As reações de escurecimento não-enzimático representam um dos maiores fenômenos que podem ocorrer durante processos térmicos muito intensos, como ocorre durante a torrefação dos grãos de café, por exemplo. A perda da atividade antioxidante dos antioxidantes naturais (principalmente representados pelos polifenólicos) pela progressiva degradação térmica, pode ser minimizada pela formação de produtos a partir da reação de Maillard (MPRs-Maillard reaction products). Dessa forma, as propriedades antioxidantes poderiam ser mantidas

ou mesmo aumentadas a partir do processo de torrefação (NICOLI et al. 1997; DAGLIA et al. 2000).

A reação de Maillard é uma conhecida reação de escurecimento não enzimático que envolve inicialmente um açúcar redutor (aldeído) e grupos amina (de aminoácidos, peptídeos e/ou proteínas) finalizando com a formação do pigmento escuro (melanoidina). Lipídeos também podem participar da reação. O principal requisito é a presença de grupos redutores, como grupos carbonila, que são formados durante a oxidação de lipídeos insaturados (MANZOCCO et al. 2001).

No caso da reação de Maillard, a elevada atividade antioxidante é geralmente associada à formação de melanoidinas (produtos finais da reação), que representam apenas uma das centenas de estruturas formadas a partir dessa reação (MANZOCCO et al. 2001). Substâncias de alto peso molecular, como as melanoidinas, são provavelmente os maiores produtos com propriedades antioxidantes formados através das reações de escurecimento não-enzimático (YAMAGUCHI 1986).

A capacidade antioxidante dos produtos formados a partir da reação de Maillard foi observada pela primeira vez por FRANZKE e IWAINSKY (1954) e algumas frações foram citadas por possuírem forte atividade antioxidante, comparáveis à de compostos comumente utilizados como antioxidantes alimentícios (LINGNERT e HAAL 1986). Além disso, agem como excelentes sinergistas junto aos antioxidantes fenólicos usados na indústria de alimentos, atuando como captadores de metais pesados e promovendo a decomposição de hidroperóxidos (POKORNY 1991). NICOLI et al. (1997) ao estudarem o efeito do processamento e armazenamento de alimentos (tomates e café) relataram que, apesar da concentração dos antioxidantes naturais ter sido significativamente reduzida em consequência dos tratamentos térmicos, as propriedades

antioxidantes dos alimentos estavam preservadas ou mesmo aumentadas pelo desenvolvimento dos produtos originados a partir da reação de Maillard.

PRATT e MILLER (1984) estudaram o efeito antioxidante de melanoidinas do chá utilizando o sistema β -caroteno/ácido linoléico e constataram que a presença dessas substâncias retardavam a oxidação. MORALES e BABEL (2002) testaram a atividade antioxidante de diversas melanoidinas em meio aquoso e, de acordo com suas observações, concluíram que esses pigmentos exerciam significativa atividade antioxidante, maior do que àquela exercida por componentes antioxidantes clássicos (ácidos tânico, caféico, gálico e também Trolox®). Embora haja fortes indícios da presença de melanoidinas e consequente atividade antioxidante nos extratos de ervamate tostada testados, novos estudos são necessários a fim de investigar essa hipótese.

6.2.3 Fenólicos totais e atividade antioxidante

Antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais e também como quelantes de metais (SHAHIDI et al. 1992), apresentam ação tanto na etapa de iniciação, como de propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários formados através da ação desses antioxidantes, são relativamente estáveis (NAWAR 1986). Sendo assim, os compostos fenólicos e alguns de seus derivados são eficazes para prevenir a oxidação lipídica. Diversos trabalhos estudaram a associação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante (PAREJO et al. 2003; VON GADOW et al. 1997; DEGÁSPARI e WASZCZYNSKYJ 2004).

Para estudar a associação entre a quantidade de fenólicos totais (mg/g de resíduo seco) e a atividade antioxidante (DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico), foram

feitos os gráficos de dispersão para os extratos aquosos (figuras 10, 11, 12 e 13) e etanólicos (figuras 14, 15, 16 e 17). Foram analisados separadamente os dois lotes de cada erva. Na maioria dos casos foi possível perceber que não há associação entre as variáveis estudadas. A pequena quantidade de amostras limitou a análise. Os casos que poderiam indicar a existência de associação, ocorreram muito mais em função da diferença entre os tipos de erva.

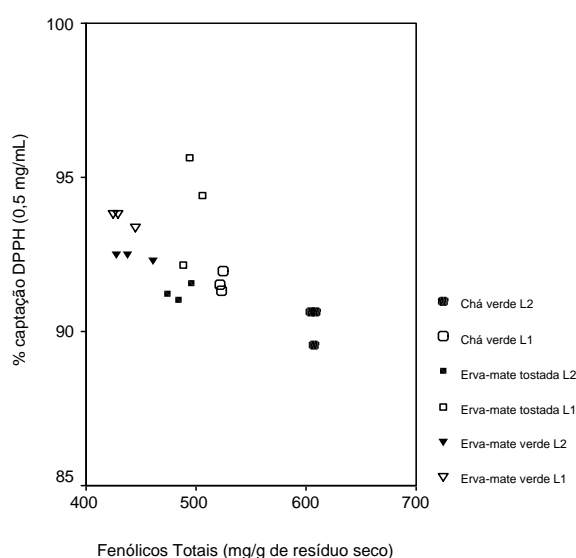


Figura 10. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

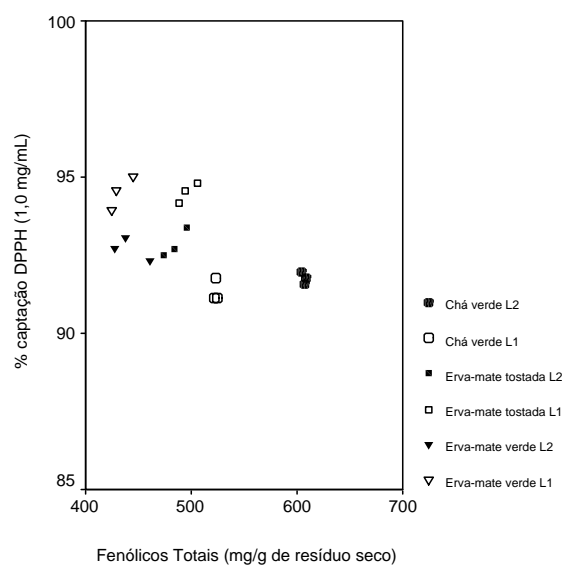


Figura 11. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

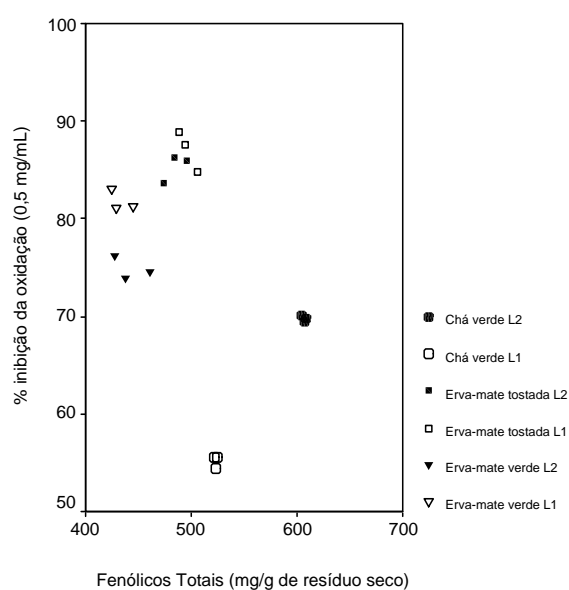


Figura 12. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linolólico) para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

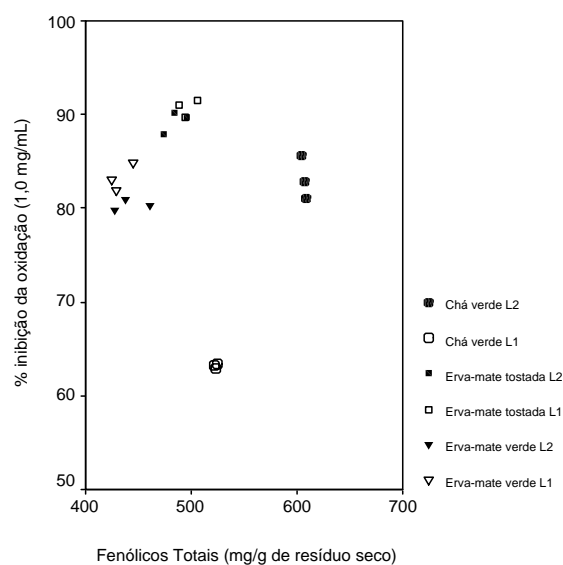


Figura 13. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

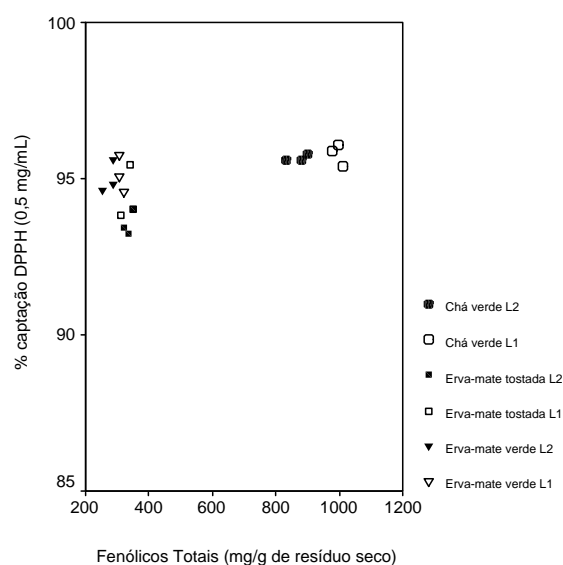


Figura 14. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

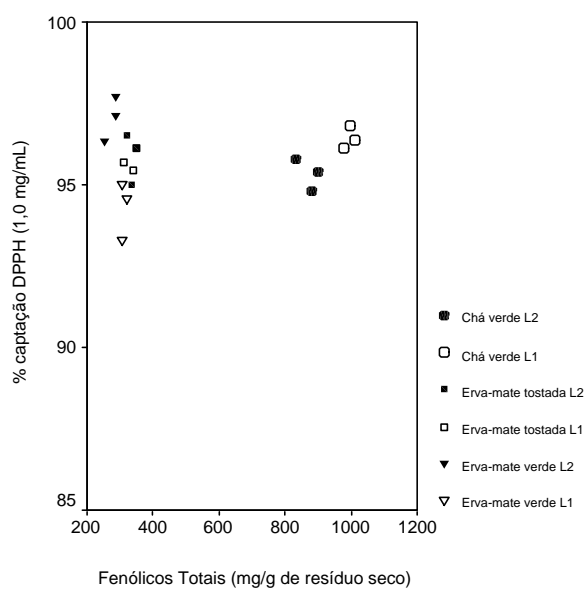


Figura 15. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de captação do DPPH para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

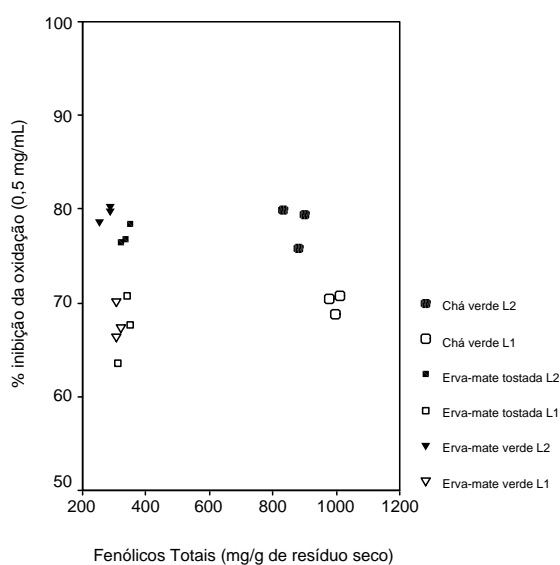


Figura 16. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 0,5 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

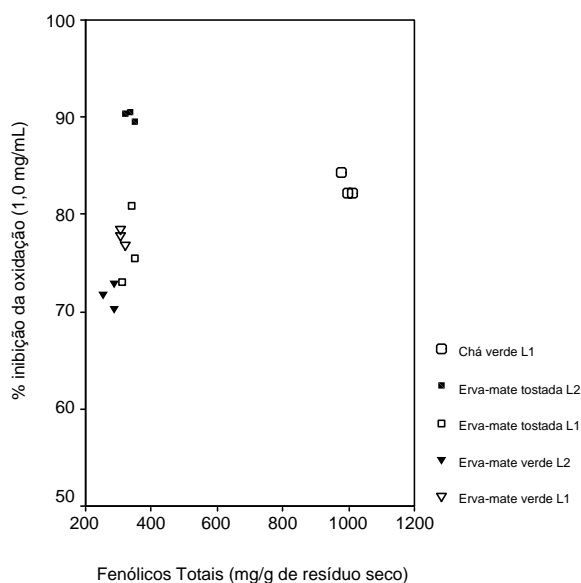
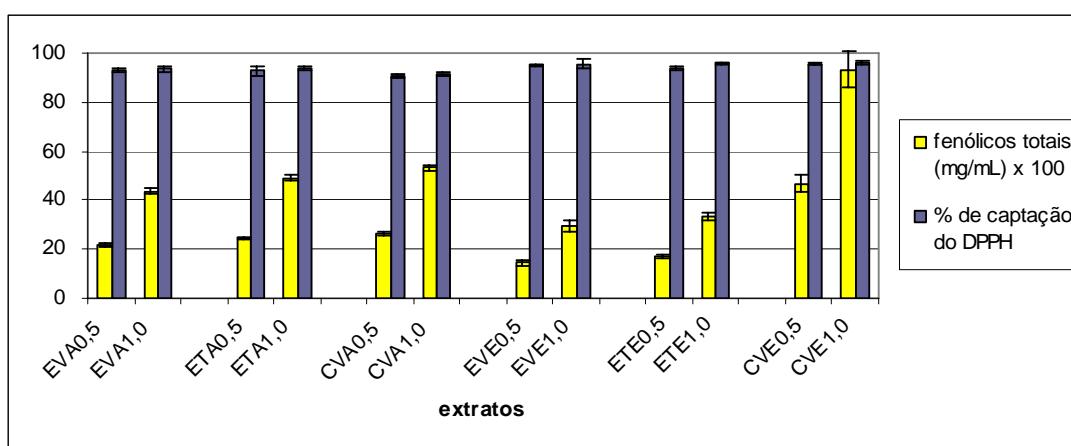


Figura 17. Correlação entre quantidade de fenólicos e % de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido-linoléico) para extratos etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (concentração de 1,0 mg/mL) para o lote 1 (L1) e lote 2 (L2)

As figuras 18, 19, 20 e 21 apresentam o teor de fenólicos e a respectiva atividade antioxidante (captação do DPPH e inibição da oxidação). Os valores de fenólicos totais (mg/mL) foram multiplicados por 100 para possibilitar a construção dos gráficos.

É possível observar que, mesmo com o aumento da concentração de fenólicos totais, não há aumento significativo na atividade antioxidante, tanto pelo método do DPPH quanto pelo sistema do ácido-linoléico/ β -caroteno. PAREJO et al. (2003), ao estudarem a atividade antioxidante de plantas bolivianas, encontraram baixa correlação entre teor de fenólicos e a captação de radicais livres pelo método do DPPH. Pode-se observar que, embora haja um aumento (em dobro) para a quantidade de fenólicos, a atividade antioxidante, medida pelos métodos do DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico, permanece praticamente a mesma para a maioria dos casos. Isso pode ser reflexo de uma limitação dos métodos utilizados, visto que os mesmos apresentam

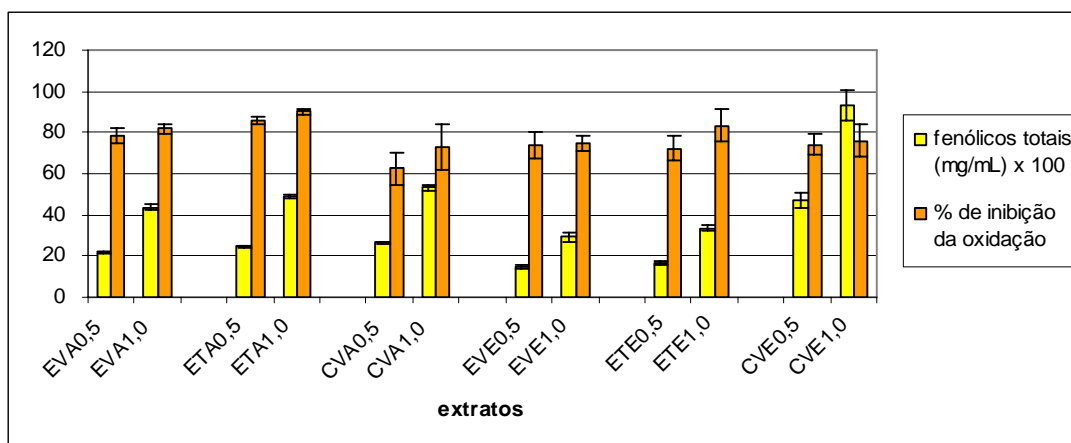
intervalos de resposta máxima que foi atingida já em baixas concentrações de fenólicos. Extratos aquosos de erva-mate tostada, contendo menor quantidade de fenólicos, quando testada no sistema β -caroteno/ácido linoléico apresentaram atividade antioxidante superior aos extratos aquosos de erva-mate verde, apontando novamente a evidência de que outros compostos estariam agindo em sinergia para conferir a capacidade antioxidante.



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá verde)

* Os resultados expressam graficamente a média das triplicatas \pm desvio padrão

Figura 18. Fenólicos totais (mg/mL x 100) em cada concentração de extrato (0,5 e 1,0 mg/mL) e porcentagem de captação do DPPH



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); CVA (extrato aquoso de chá verde); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); CVE (extrato etanólico de chá verde)

* Os resultados expressam graficamente a média das triplicatas \pm desvio padrão

Figura 19. Fenólicos totais (mg/mL x 100) em cada concentração de extrato (0,5 e 1,0 mg/mL) e porcentagem de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico)

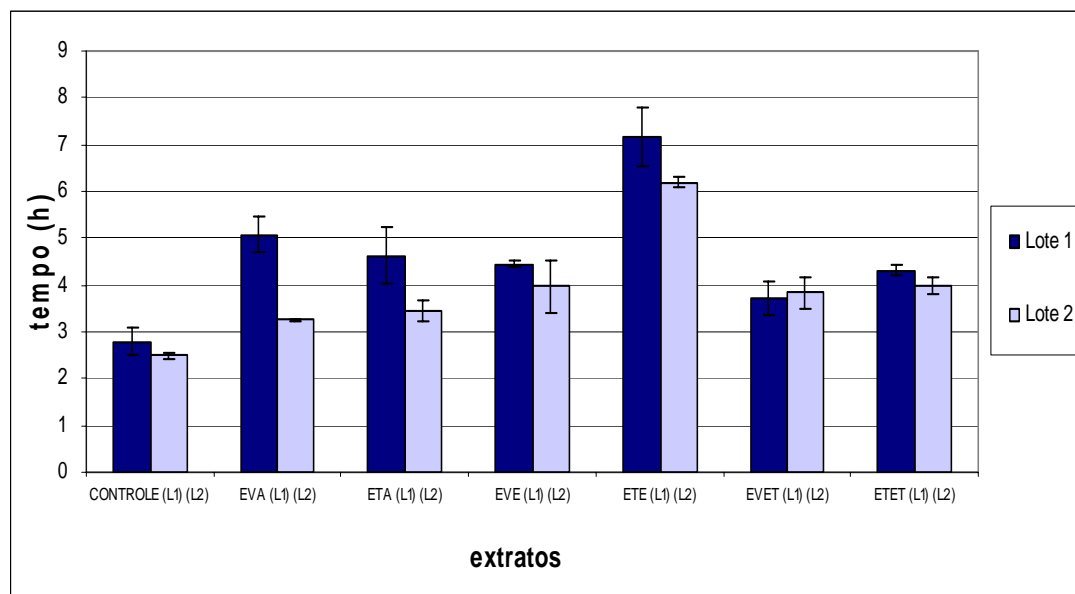
6.2.4 Estabilidade oxidativa (método do Rancimat®)

Extratos de erva-mate (verde e tostada) foram testados pelo método do Rancimat®. Na tabela 7 encontram-se os resultados relativos ao índice de atividade antioxidante dos extratos adicionadas à banha de porco. O período de indução da oxidação de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada) estão apresentados na figura 20. Em função do pequeno número de amostras testadas, os dados não foram submetidos a análise estatística.

Tabela 7. Índice de atividade antioxidante de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate verde e erva mate-tostada (método do Rancimat®)

Extrato	Tipo de erva	Índice de atividade antioxidante	
		Lote 1	Lote 2
Aquoso	Erva-mate verde	1,85 ± 0,14	1,30 ± 0,01
	Erva-mate tostada	1,69 ± 0,23	1,38 ± 0,08
Etanólico	Erva-mate verde	1,62 ± 0,03	1,59 ± 0,22
	Erva-mate tostada	2,61 ± 0,23	2,46 ± 0,04
Etéreo	Erva-mate verde	1,35 ± 0,13	1,52 ± 0,14
	Erva-mate tostada	1,57 ± 0,04	1,58 ± 0,07

* Os resultados expressam a média das duplicatas ± desvio padrão



EVA (extrato aquoso de erva-mate verde); ETA (extrato aquoso de erva-mate tostada); EVE (extrato etanólico de erva-mate verde); ETE (extrato etanólico de erva-mate tostada); EVET (extrato etéreo de erva-mate verde); ETET (extrato etéreo de erva-mate tostada)

* Os resultados expressam graficamente a média das duplicatas \pm desvio padrão

Figura 20. Período de indução de extratos aquosos, etanólicos e etéreos de erva-mate (verde e tostada) na proporção de 1,0 mg de resíduo seco para 3g de banha de porco (método do Rancimat®)

Todos os extratos testados apresentaram atividade antioxidante superior ao controle, sendo que o extrato etanólico de erva-mate tostada (ETE) apresentou o melhor resultado para ambos os lotes.

DZIEDZIC e HUDSON (1984) avaliaram a atividade antioxidante de alguns ácidos fenólicos através do Rancimat ®. Esses autores observaram que os ácidos protocatequínico, caféico, ferúlico, gálico e sináptico apresentaram boa atividade antioxidante, apesar desses e dos demais ácidos fenólicos possuírem baixa solubilidade nesse sistema, limitando parcialmente sua avaliação no meio lipídico (PRATT 1992). Uma alternativa seria a alquilação ou esterificação com ácidos graxos de cadeia longa ou álcoois para tornar esses ácidos fenólicos lipossolúveis (SOARES 2002). A elevada

atividade antioxidante do extrato etanólico de erva-mate tostada comparada ao extrato etanólico de erva-mate verde, obtida nesse método, poderia indicar novamente a presença de outras substâncias com propriedades antioxidantes formadas durante o processo de torrefação.

7 CONCLUSÕES

- A extração aquosa a quente, por um período de 4 horas, resultou em extratos com maiores teores de sólidos solúveis e de fenólicos totais, sendo considerada mais eficiente quando comparada à extração por 10 minutos;
- Solventes mais polares (água e etanol) extraíram maior quantidade de substâncias para todas as ervas, sendo que, para extratos de erva-mate verde e erva-mate tostada, a água conseguiu extrair maior teor de fenólicos (mg/mL) quando comparada ao etanol;
- Extratos aquosos e etanólicos de erva-mate (verde e tostada) e de chá verde e o extrato etéreo de chá verde nas concentrações de 0.05 / 0.1 / 0.5 e 1,0mg/mL, apresentam elevada atividade antioxidante no método do DPPH (captação de radicais livres);
- No sistema β -caroteno/ácido linoléico, apenas extratos aquosos e etéreos de chá verde, na concentração de 0,5mg/mL, apresentaram resultados inferiores ao BHT, sendo que os demais, para ambas as concentrações (0,5 e 1,0mg/mL) apresentaram boa inibição da oxidação, semelhante ao padrão. Extratos aquosos (0,5 e 1,0mg/mL) e o extrato etanólico (1,0mg/mL) de erva-mate tostada apresentaram resultados superiores àqueles encontrados para a erva-mate verde, sugerindo assim a que houve a formação de novos compostos com propriedades antioxidantes durante o processo de torrefação;

- Devido ao pequeno número de amostras e as limitações dos métodos escolhidos, não foi possível verificar se houve associação entre o teor de fenólicos e a atividade antioxidante no método do DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoléico;
- Extratos de diferentes polaridades demonstraram elevada atividade antioxidante para todas as ervas, sugerindo que outros compostos que não apenas os fenólicos, como as melanoidinas ou aqueles presentes em óleos essenciais, conferem aos extratos essa capacidade;
- Extratos de erva-mate (verde e tostada) apresentaram atividade antioxidante similar à do chá verde, podendo ser uma excelente alternativa como fonte de antioxidantes como substituto aos antioxidantes sintéticos;
- O processo de torrefação não ocasionou perda nas características antioxidantes da erva-mate e, possivelmente, contribuiu para a formação de novas substâncias com propriedades semelhantes.

8 REFERÊNCIAS

Abdalla, D.S.P. Estresse oxidativo e alimentação. In: TIRAPEGUI J, coordenador. **Nutrição: fundamentos e aspectos atuais**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2000. p.179-200.

Alessio, HM. Exercise-induced oxidative estresse. **Med Sci Sports Exerc** 1993; 25: 218-224.

Alligiannis N, Mitaku S, Tsitsa-Tsardis E, Harvala C, Tsaknis I, Lalas S, Haroutounian S. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 7308-7312.

Bast A et al. Oxidants and antioxidants: State of the art. **Am J Med** 1991; 91: 2-13.

Bastos DHM, Fornari AC, Queiroz YS, Soares RAM, Torres EAFS. The chlorogenic acid and caffeic content of Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) beverages. **Acta Farm Bonaerense** 2005; 24(1): 91-95.

Bastos DHM, Ishimoto E, Marques MOM, Ferri AF, Torres EAFS. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **J Food Comp and Analy** 2005.

Bastos DHM, Santos N, Ishimoto EY, Marques MO, Ferri AF, Torres EAF. Essential oil and antioxidant activity of green matté and matté-tea (*Ilex paraguariensis*) infusions

In: **XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición**; 2003; Acapulco: Libro de Memorias XIII Congreso Latinoamericano de Nutrición. Sociedad Latinoamericana de Nutrición; 2003. p. 218 – 218.

Bastos DHM, Torres EAF. Bebidas à base de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) e saúde pública. **Nutrire** 2004; 26: 77-89.

Berset C, Cuvelier ME. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidant activity. **Sci Aliments** 1996; 16: 219-245.

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.

Bracesco N, Dell M, Rocha A, Behtash 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* an human Low-Density Lipoprotein Oxidation. **J Altern Complem Med** 2003; 9: 379-387.

Braga MEM et al. Comparison of Yield, composition, and antioxidant activity of Turmeric (*Curcuma longa L.*) extracts obtained using various techniques. **J Agric Food Chem** 2003; 51: 6604-6611.

Brand-Willians W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technol** 1995; 28: 25-30.

Brasil. **Ministério da Saúde** –Portaria n° 234 de 25 de Março de 1998, publicada no Diário Oficial da União de 26 de março de 1998, seção 1-E, p.7.

Brasil. **Ministério da Saúde** – Portaria n ° 519, de 26 de junho de 1998,publicada no Diário Oficial da União de 29 de junho de 1998.

Brasil. Resolução – RDC n° 302, de 07 de novembro de 2002. **Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de Erva Mate.**

Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews** 1998; 56(11): 317-333.

Brenna OV, Pagliarini E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **J Agric Food Chem** 2001; 49(10):4841-4.

Buckley DJ, Morissey PA, Gray, JI. Influence of dietary vitamin E on the oxidative satability and quality of pig meat. **J Animal Science** 1995; 73: 3122-3130.

Campos AM, Escobar J, Lissi EA. The total reactive antioxidant potential (TRAP) and total antioxidant reactivity (TAR) of Ilex paraguariensis extracts and red wine. **J Braz Chem Soc** 1996; 7(1): 43-49.

Cao G, Sofic E, Prior R. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. **J Agri Food Chem** 1996; 44: 3426-3431.

Carini M, Facino RM, Aldini G, Calloni M, 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.

Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation** 1991, 21 (1),1-5.

Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. **Lancet** 1994, 344 (8926), 862-863.

Chandra S, Mejia EG. Polyphenolic compounds, antioxidant capacity and quinone reductase activity of aqueous extract of *Ardisia compressa* in comparison to mate (*Ilex paraguariensis*) and green (*Camellia sinesnsis*) teas. **J Agric Food Chem** 2004; 52: 3583-3589.

Chantre P, Lairon D. Recent findings of green tea extract AR25 (Exolise) and its activity for the treatment of obesity. **Phytomedicine** 2002; 9 (1): 3-8.

Chyau CC, Tsai SY, Ko PT, Mau JL. Antioxidant properties of solvent extracts from *Terminalia catappa* leaves. **Food Chem** 2002; 78:483-488.

Clifford MN, Ramirez-Martinez JR. Chlorogenic acids and purine alkaloids contents on maté (*Ilex paraguariensis*) leaf and beverage. **Food Chem** 1990; 35: 13-21.

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

Cunha IBS, Sawaya ACHF, Caetano FM, Shimizu MT, Marcucci MC, Drezza FT, Povia GS, Carvalho PO. Factors that Influence the Yield and Composition of Brazilian Propolis Extracts. **J Braz Chem Soc** 2004; 15(6): 964-970.

Da Croce DM. Características físico-químicas de extratos de erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hill) no estado de Santa Catarina. **Ciência Florestal** 2002; 12(2): 107-113.

Daglia M, Papetti A, Gregotti C, Berte F, Gazzani G. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 1449-1454.

De Andelis RC. **Importância de alimentos vegetais na proteção da saúde: fisiologia da nutrição protetora e preventiva de enfermidade degenerativas**. São Paulo: Editora Atheneu; 2001.

Degáspari CH, Waszczyński JN. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos.

Visão Acadêmica 2004; 5(1): 33-40.

Deser – Departamento de Estudos Socioeconômicos Rurais. Informativo de conjuntura agrícola e comercialização do alto Uruguai: **A cadeia produtiva da erva mate**. no. 3, setembro / outubro, 2001.

Donaduzzi CM, Coelho SRM, Cardoso EL, Gallo AG, Huppes GK, Kuhn IMV, Schichel C. Teores de cafeína, polifenóis totais e taninos em amostras de erva-mate comercializadas na região de Toledo, Paraná. **II Congresso Sul Americano de Erva-mate** 2000; 1(1): 158-161.

Donnelli JK, Robinson DS. Invited review: Free radical in foods. **Free Radical Res** 1995; 22(2): 147-176.

Dreosti JE. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition** 2000; 16(7/8): 692-694.

Dreosti JE, Wargovich MJ, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by tea: The evidence from experimental studies. **Crit Rev Food Sci Nutr** 1997; 37: 761-770.

Dziedzic SZ, Hudson B.J.F. Phenolic acids and related compounds as antioxidants for edible oils. **Food Chemistry**, Oxford, v.14, p.45-51, 1984.

Dziezak J. Fats, oils and fat substitutes. **Food Technol** 1999; 43: 66-74.

Esmelindro MC, Toniazzo G, Waczuk A, Dariva C, Oliveira D. Caracterização físico-química da erva-mate: Influência das etapas do processamento industrial. **Cienc Tecnol Aliment** 2002; 22(2): 193-204.

Fennema OR. **Química de los alimentos**. 2.ed. Zaragoza: Acribia, 1993.

Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Rev Assoc Med Bras** 1997; 43(1): 61-68.

Filip R, Lotito SB, Ferraro G, Fraga CG. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutr Res** 2000; 20(10):1437-1446.

Flament I. Coffee, cocoa and, tea. In: Maarse H (ed.). **Volatile Compounds in Food and Beverages**. Nova York: Marcel Dekker, 1991, p.617-669.

Franzke C, Iwainsky H. Zur antioxydativen Wirksamkeit der Melanoidine. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau** 1954; 50: 251-154.

Freese R, Basu S, Hietanen E, Nair J, Nakachi K, Bartsch H, Mutanen M. Green tea extract decreases plasma malondialdehyde concentration but does not affect other indicators of oxidative stress, nitric oxide production, or hemostatic factors during a high-linoleic acid diet in healthy females. **Eur J Nutr** 1999; 38: 149-157.

Fuster MD, Mitchell AE, Ochi H, Shibamoto T. Antioxidative activities of heterocyclic Compounds Formed in Brewed Coffee 2000; 48: 5600-5603.

Genovese MI, Santos RJ, Hassimoto NMA, Lajolo FM. Determinação do conteúdo de fenólicos totais em frutas. **Revista de Ciências Farmacêuticas** 2003; 39: 167-69.

Goldfarb AH. Antioxidants: role of supplementation to prevent exercise induced oxidative estresse. **Med Sci Sports Exerc** 1993; 25: 232-236.

Gomes-Cabrera MC, Gimeno A, Lloret A, Miñana JB, Márquez R. Deporte de alta competición y dano oxidativo: papel de los nutrientes antioxidantes. 2000. **Revista on-line Antioxidante y calidad de vida**. Disponível em: <URL: <http://www.antioxidantes.com.ar/12/home2.htm>> [2004 abr 19].

Gotto A. Extending the benefit of lipid-regulating therapy to primary prevention. **Am J Cardiol** 1995; 76(9): 118C-121C.

Graham HN. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev Med** 1992; 21:334-350.

Grigonis D, Venskutonis PR, Sivik B, Sandahl M, Eskilsson CS. Comparison of different extraction techniques for isolation of antioxidants from sweet grass (*Hierochloe odorata*). **J of Supercritical Fluids** 2004. Disponível em: <URL: <http://www.sciencedirect.com>> [2004 jun 06].

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

Gugliucci A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: Induction of decreased oxidability of human LDL in Vivo. **Biochem Biophys Res Comm** 1996; 224: 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.

Gutteridge JMC, Halliwell B. **Antioxidants in nutrition, health and disease**. New York: Oxford University, 1994.

Halliwell B, Gutteridge JC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J Lab Clin Med** 1992; 119: 568-620.

Halliwel B. Free radicals antioxidants: a personal view. **Nutr Rev New York** 1994; 52(8): 253-261.

Halliwel B. Oxidative stress, nutrition and health: experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radical Res** 1996; 25: 57-74.

Halliwel B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 3^a ed. Oxford: Claredon, 1999.

Heinonen M, Haila K, Lampi AM, Pironen V. Inhibition of oxidation in 10% oil-in-water emulsions by β -carotene with α - and γ -tocopherols. **J Am Chem Oil Soc** 1997; 74(9): 1047-1052.

Henry JP, Stephens-Larson P. Reductions of chronic psychosocial hypertension in mice by decaffeinated tea. **Hypertension** 1984; 6: 437-444.

Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Krumhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: The Zutphen Elderly Study. **The Lancet** 1993; 342: 1007-1011.

Hodgson JM, Pudney IB, Burke V, Mori TA, Cacetta RAA, Beilin L. Acute effects of ingestion of black and green tea on lipoprotein oxidation **Am J Clin Nutr** 2000; 71: 1103-1107.

Jeffery GH, Bassett J, Mendham J, Denney RC. **Análise química quantitativa**, 5^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.

Jenkins RR. Exercise, oxidative estresse and antioxidant: a review. **Int J Sports Nutr** 1993; 3: 356-375.

Julkunen-Tiito R. Phenolic constituents in the leaves in the northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J Agric Food Chem** 1985; 33(2): 213-217.

Katiyar SK, Mukhtar H. Tea in chemoprevention of cancer: Epidemiologic and experimental studies (review). **Int J Oncol** 1996; 8: 221-238.

Kohlmeier L, Weerings KGC, Steck S, Kok FJ. Tea and cancer prevention - An evaluation of the epidemiologic literature. **Nutr Cancer** 1997; 27: 1-13.

Langley-Evans S. Antioxidant potential of green and black tea determined using the ferric reducing power (FRAP) assay. **Int J Food Sci Nutr** 2000; 51: 181-188.

Laranjinha J, Vierira O, Almeida L, Madeira V. Inhibition of metmyoglobin/H₂O₂ dependent LDL lipid peroxidation by naturally occurring phenolic acids. **Biochem Pharmacology** 1996; 51(4): 395-402.

Larson RA. The antioxidant of higher plants. **Phytochemistry** 1988; 27: 969-978.

Lean M, Norrozi M, Kelly I, Burns J, Talwar D, Sattar N, Crozier A. Dietary flavonols protect diabetic human lymphocytes against oxidative damage to DNA. **Diabetes** 1999; 48: 176-181.

Leung LK, SU Y, Chen R, Zhang Z, Huang Y, Chen ZY. Theafalvins in black tea and catechins in green tea are equally effective antioxidants. **J Nutr** 2001; 131: 2248-2251.

Lima VLAG, Mélo EA. Teor de compostos fenólicos totais em chás brasileiros. **Bras J Food Technol** 2004; 7 (2): 187-190.

Lingnert H, Hall G. Formation of antioxidative Maillard reaction products during food processing. In Fujimaki M, Namiki M, Kato E. **Amino-carbonyl reactions in food and biological systems** 1986. Tokyo:Elsevier; 273-279.

Mancini-Filho J, Cintra, RMGC. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos in vitro e in vivo. **Nutrire** 2001; .22: 49-62.

Mancini-Filho J, Melo EA, Bion FM, Guerra NB. In vivo antioxidant effect of aqueous and etheric coriander (*Coriandrum sativum* L.) extracts. **Eur J Lipid Sci Technol** 2003; 105: 483-487.

Manzocco L, Calligaris S, Mastrocola D, Nicolo MC, Lericri CR. Review of non-enzymatic browning and antioxidant capacity in processed foods. **Trends in Food Science & Technol** 2001; 11: 340-346.

Marco GJA. Rapid method for evaluation of antioxidants. **J Am Oil Chem Soc** 1968; 45: 594-598.

Mazzafera P. Maté drinking: caffeine and phenolic acid intake. **Food Chem** 1997, 60(1): 67-71.

McKay DL, Blumberg JB. The role of tea in human health: An update. **J Am Coll Nutr** 2002; 21 (1): 1-13.

Melo MSOM, Mancini-Filho J. Antioxidantes naturais do fruto do dendezeiro (elaeis guinensis, jacq). **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo** 1989, 25(2): 147-157.

Miliauskas G, Venskutonis, PR, Van Beek TA. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts **Food Chem** 2004; 85: 231-237.

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

Miller N, Casteluccio C, Tijburg L, Rice-Evans C. The antioxidant properties of theaflavins and their gallate esters-radical scavengers or metal chelators. **FEBS Letters** 1996; 392: 40-44.

Morales FJ, Babbel MB.J. Melanoidins exert a weak antiradical activity in watery fluids. **Agric Food Chem** 2002; 50(16):4657-4661.

Morales FJ, Jimenez-Perez S. Free radical scavenging capacity of Maillard reactions products as related to colour and fluorescence. **Food Chem** 2001; 72: 119-125.

Nakachi K, Suemasu K, Suga K, Takeo T, Imai K, Higashi Y. Influence of drinking green tea on breast cancer malignancy among Japanese patients. **Jap J Cancer Res** 1998; 89: 254-261.

Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl radical. **Free Rad Biol & Med** 1996; 6: 895-902.

Nardini M, Pisu P, Gentili V, Natella F, Di Felice M, Piccolella E, Scaccini C. Effect of caffeic acid on tert-butyl hydroperoxide induced oxidative stress in U937. **Free Radic Biol Med** 1998; 25(9): 1098-1105.

Nawar WW. Lipids. In: FENNEMA O.R. **Food chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker, 1996. p.225-310.

Nicoli MC, Anese M, Parpinel NT. Loss and/or formation of antioxidants during food processing and storage. **Cancer Lett** 1997; 114:71-74.

Ohnishi M, Morishita H, Iwahashi H, Toda S, Shirataki Y, Kimura M, Kido R. Inhibitory effects of chlorogenic acids on linoleic acid peroxidation and hemolysis. **Phytochemistry** 1994; 36(3): 579-583.

Papas AM. Diet and antioxidants status. **Food Chem Toxicol** 1999; 37: 999-1007.

Parejo I, Viladomat F, Bastida J, Rosas-Romero A, Saavedra G, Murcia MA, Jiménez M, Codina C. Investigation of Bolivian plant extracts for their radical scavenging activity and antioxidant activity. **Life Sciences** 2003; 73: 1667-1681.

Pizzale L, Bortolomeazzi R, Vichi S, Uberegger E, Lanfranco SC. Antioxidant activity of sage (*Salvia officinalis* and *S. fruticosa*) and oregano (*Origanum onitius* and *O. onites*) extracts related to their phenolic compound content. **J Sci Food Agric** 2002; 82: 1645-1651.

Pokorny J. Natural antioxidant for food use. **Trends in Food Science and Technol** 1991; 9: 223-227.

Pratt DE. Natural antioxidants from plant material. In: Huang MT, Ho CT, Lee CY. **Phenolic compounds in food and their effects on health**. Washington: American Chemical Society; 1992. p.54-71.

Pratt DE, Miller EE. A flavonoid antioxidant in Spanish peanuts (*Arachia hypogoea*). **J Am Oil Chem Soc** 1984; 61: 1064-1067.

Ramirez-Mares M, Chandra S, Mejia EG. In vitro chemopreventive activity of *Camelia sinesnsis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research** 2004; 554: 53-65.

Sakanaka S, Tachibana Y, Okada, Y. Preparations and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (*kakinoha-cha*). **Food Chem** 2004; 89: 569-575.

Salinas RD. **Alimentos e Nutrição – Introdução à bromatologia**. 3ª ed. São Paulo: Artmed; 2002.

Salem Jr N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Backgrounder** 1999; 3(1): 1-8.

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

Serafini M, Ghiseli A, Ferro-Luzzi A. Red wine, tea and antioxidants. **Lancet** 1994; 344: 626.

Shahidi F, Janitha PK, Wanasundara, PD. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 1992; 32(1): 67-103.

Shi ST, Wang ZY, Smith TJ, Hong JY, Chen WF, Ho CT, Yang CS. Effects of green tea and black tea on 4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone biactivation, DNA methylation and lung tumorigenesis in A/J mice. **Cancer Res.** 1994; 54: 4641-4647.

Shibamoto T, Lee KG. Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extracts and aroma components isolated from clove and eucalyptus. **Food Chem Toxicol** 2001; 39: 1199-1204.

Silva FAM, Borges MFM, Ferreira MA. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Quimica Nova** 1999; 22(1): p.94-103.

Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutrição – Campinas* 2002; 15(1): 71-81.

Spatz I, Bloom AD.(eds). **Biological consequences of oxidative stress: implications for cardiovascular disease and carcinogenesis.** New York: Oxford University, 1992. 270p.

Spiteller P, Spiteller G. Strong dependence of lipid peroxidation product spectrum whether Fe_2^+/O_2 or Fe_3^+/O_2 is used as antioxidant. **Biochim Biophys Acta** 1998, 1392: 23-40.

Stagg GV, Millin DJ. The nutritional and therapeutic value of tea – a review. **J Sci Food Agric** 1975; 26: 1439-59.

Storz G, Christman MF, Sies H, Ames BN. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Science** 1987; 84: 8917-8921.

Tepe B, Daferera D, Sokmen A, Sokmen M, Polissiou M. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chem** 2005; 90: 333-340.

Tijburg LBM, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular diseases: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr** 1997; 37: 771-785.

Vannucchi H, Jordao Junior AA, Iglesias AC, Morandi MV, Chiarello PG. Effect of different dietary levels of vitamin E on lipid peroxidation in rats. **Arch Latinoam Nutr** 1997;47: 34-37.

Vison JA, Dabbagg YA. Tea phenols: antioxidant effectiveness of teas, tea components, tea fractions and their binding with lipoproteins. **Nutrition Research** 1998; 18(6):1067-1075.

Vinson J, Dabbagh Y, Serry M, Jang J. Plant flavonoids, especially tea flavonols, are powerful antioxidants using an in vitro oxidation model for hearth disease. **J Agri Food Chem** 1995; 43: 2800-2802.

Von Gadow A, Joubert E, Hansmann CF. **J Agric Food Chem** 1997; 45:632

Wanasundara UN, Sahidi F. Antioxidant e pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chem** 1998; 63(3): 335-342.

Wheatley RA. Some trends and the analytical chemistry of lipid peroxidation. **Trends in analytical chemistry** 2000; 19(10):617-28.

Wiseman SA, Balentine DA, Frei B. Antioxidants in tea. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition** 1997; 37: 705-718.

Yamaguchi N. Antioxidative activity of the oxidation products prepared from melanoidns. In **Proceedings of the 3rd International Symposium on the Maillard Reaction**. Fujimaki M, Namiki M, Kato H, Eds. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1986: 291-299.

Yang MH, Wang CH, Chen HL. Green, oolong and black tea extracts modulate lipid metabolism in hyperlipidemic rats fed high-sucrose diet. **J Nutr Biochem** 2001; 12: 14-20.

Yang CS, Wang ZY. Tea and cancer. **J. Natl Cancer Inst** 1993; 85: 1038-1049.

Yanishlieva NV, Marinova NV, Marinova EM. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. **Food Chem** 1995; 54:377-382.

Yildrin A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **J Agric Food Chemistry** 2001; 19: 4083-4089.

Yokosawa T, Nakagawa T, Kitani K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. **J agric Food Chem** 2002; 50: 3549-3552.

Zambiasi C. Oxidation reactions of vegetables oils and fats. **Ciência e tecnologia de alimentos**, Campinas 1999; 33(1):1-7.

Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **J Agric Food Chemistry** 2001; 49: 5165-5170.

Zieliski H, Kozowska H. Antioxidant activity and total phenolics in selected cereal grains and their different morphological fractions. **J Agric Food Chem** 2000; 48: 2008-2000.

ANEXOS

Anexo 1. Modelos de análise de variância utilizados para estimativa do erro-padrão dos intervalos de confiança das diferenças das médias

Modelo 1 – Comparação da erva-mate verde e tostada

O modelo utilizado neste caso foi:

$$Y_{ijkl} = \mu_{....} + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(i)} + \varepsilon_{ijkl}$$

$i=1, \dots, a;$

$j=1, \dots, b;$

$k=1, \dots, c;$

$l=1, \dots, n$

y_{ijkl} : resposta obtida do i -ésimo solvente do j -ésimo tipo de chá do k -ésimo lote

da l -ésima triplicata

$\mu_{....}$: constante

α_i : efeito do i -ésimo solvente sujeitos – constantes sujeitos à restrição $\sum_i \alpha_i = 0$

$\beta_{j(i)}$: efeito do j -ésimo tipo de erva (mate verde e tostada apenas) – constantes

sujeitas à restrição $\sum_j \beta_{j(i)} = 0, i=1, \dots, a$

$\gamma_{k(i)}$: variáveis aleatórias independentes representando o efeito de bloco do lote,

com distribuição normal $N(0, \sigma_\gamma^2)$

ε_{ijkl} : variáveis aleatórias independentes $N(0, \sigma^2)$

$\gamma_{k(i)}$ e ε_{ijkl} independentes

Com isso a tabela de análise de variância ficou:

Tabela 1: ANOVA do modelo 1

Fonte de variação	SQ	gl	EQM
Solvente	$bcn \sum_i (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{....})^2$	a-1	$\frac{\sum \alpha_i^2}{a-1} + bn\sigma_\gamma^2 + \sigma^2$
Tipo de erva (Solvente)	$cn \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij..} - \bar{y}_{i...})^2$	a(b-1)	$cn \frac{\sum \beta_j^2}{b-1} + \sigma^2$
Lote (Solvente)	$bn \sum_i \sum_k (\bar{y}_{i.k.} - \bar{y}_{i...})^2$	a(c-1)	$bn\sigma_\gamma^2 + \sigma^2$
Erro	$\sum_i \sum_j \sum_k \sum_l (\bar{y}_{ijkl} - \bar{y}_{ijk.})^2$	abc(n-1)+a(b-1)(c-1)	σ^2
Total		abcn-1	

Que corresponde a um modelo de análise de variância em blocos (bloco como fator aleatório, Neter et al, 1996) hierárquico ao fator solvente. Com isso, foi possível estimar o desvio-padrão σ^2 , e consequentemente o erro-padrão para comparar a diferença média entre a erva-mate verde e a erva-mate tostada.

Modelo 2 – Comparação do chá verde com a erva-mate verde ou erva-mate tostada

O modelo utilizado neste caso foi baseado no modelo de sub-amostas num estudo completamente aleatorizado com um fator (Neter et al, 1996). No nosso caso, é

um modelo de sub-amostras com dois fatores fixos (Lote e Solvente). Dessa forma o modelo ficou:

$$y_{ijkl} = \mu_{....} + \alpha_i + \beta_{j(i)} + \gamma_{k(ij)} + \eta_{ijkl}$$

$i=1, \dots, a;$

$j=1, \dots, b;$

$k=1, \dots, c;$

$l=1, \dots, n$

y_{ijkl} : resposta obtida do i -ésimo solvente do j -ésimo tipo de chá do k -ésimo lote

da l -ésima triplicata

$\mu_{....}$: constante

α_i : efeito do i -ésimo solvente – constantes sujeitos à restrição $\sum_i \alpha_i = 0$

$\beta_{j(i)}$ ¹: efeito do j -ésimo tipo de erva (chá verde e erva-mate verde ou chá verde e erva-mate tostada) – constantes sujeitas à restrição $\sum_j \beta_{j(i)} = 0, i=1, \dots, a$

$\gamma_{k(ij)}$: variáveis aleatórias independentes representando o efeito aleatório do lote, com distribuição normal $N(0, \sigma_\gamma^2)$

η_{ijkl} : variáveis aleatórias independentes $N(0, \sigma_\eta^2)$

$\gamma_{k(ij)}$ e η_{ijkl} : independentes

Tabela 2: ANOVA do modelo 2

Fonte de variação	SQ	gl	EQM
-------------------	----	----	-----

Solvente	$bcn \sum_i (\bar{y}_{i...} - \bar{y}_{...})^2$	a-1	$bcn \frac{\sum_i \alpha_i^2}{a-1} + n\sigma_\gamma^2 + \sigma_\eta^2$
Tipo de chá (Solvente)	$cn \sum_i \sum_j (\bar{y}_{ij..} - \bar{y}_{i...})^2$	a(b-1)	$cn \frac{\sum_j \beta_j^2}{b-1} + n\sigma_\gamma^2 + \sigma_\eta^2$
Lote (Tipo de Erva (Solvente))	$n \sum_i \sum_k (\bar{y}_{ijk.} - \bar{y}_{ij..})^2$	ab(c-1)	$n\sigma_\gamma^2 + \sigma_\eta^2$
Erro	$\sum_i \sum_j \sum_k \sum_l (\bar{y}_{ijkl} - \bar{y}_{ijk.})^2$	abc(n-1)	σ_η^2
Total		abcn-1	

¹ Neste caso foram realizados dois ajustes separados: um para comparar o chá verde com a erva-mate verde e outro para comparar o chá verde com a erva-mate tostada.

Observe que neste caso temos que considerar o erro quadrático médio do fator Lote hierárquico ao fator Solvente (Lote(Solvente)) para estimar as diferenças médias entre os tipos de ervas.

Anexo 2. Intervalos de confiança das médias

Tabela 1. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias dos resíduos secos (mg/g) de cada extrato aquoso, conforme o tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde) e o tempo de extração (10 minutos e 4 horas)

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água (10 min)	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-5,32	-3,78
	Erva-mate verde - Chá verde	-2,29	4,10
	Erva-mate tostada - Chá verde	2,45	8,47
Água (4 h)	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	2,33	3,87
	Erva-mate verde - Chá verde	-0,17	6,22
	Erva-mate tostada - Chá verde	-3,08	2,93

* Com correção de Bonferroni

Tabela 2. Intervalos de confiança das diferenças das médias dos valores de fenólicos totais (mg/g de resíduo seco) em equivalente de ácido clorogênico (EAC) para os extratos aquosos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (tempo de extração 10 minutos e 4 horas)

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água (10 min)	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	5,14	48,64
	Erva-mate verde - Chá verde	-525,34	6,36
	Erva-mate tostada - Chá verde	-550,32	-22,45
Água (4 h)	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-74,78	-31,28
	Erva-mate verde - Chá verde	-393,45	138,25
	Erva-mate tostada - Chá verde	-338,50	189,37

* Com correção de Bonferroni

Tabela 3. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias dos resíduos secos (mg/g) dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos (tempo de extração 4 horas), conforme o tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde)

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	2,33	3,87
	Erva-mate verde - Chá verde	-0,17	6,22
	Erva-mate tostada - Chá verde	-3,08	2,93
Etanol	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	3,03	4,56
	Erva-mate verde - Chá verde	-3,22	3,17
	Erva-mate tostada - Chá verde	-6,82	-0,81
Éter	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-1,14	0,39
	Erva-mate verde - Chá verde	-2,27	4,11
	Erva-mate tostada - Chá verde	-1,71	4,30

* Com correção de Bonferroni

Tabela 4. Intervalos de confiança das diferenças das médias dos valores de fenólicos totais (mg/g de resíduo seco) em equivalente de ácido clorogênico (EAC) para os extratos aquosos e etanólicos de erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde (tempo de extração 4 horas)

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-74,78	-31,28
	Erva-mate verde - Chá verde	-393,45	138,25
	Erva-mate tostada - Chá verde	-338,50	189,37
Etanol	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-62,72	-19,22
	Erva-mate verde - Chá verde	-906,23	-374,53
	Erva-mate tostada - Chá verde	-863,34	-335,47

* Com correção de Bonferroni

Tabela 5. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias das porcentagens de captação do DPPH dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas), para cada tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde) na concentração de 0,5 mg/mL

Solvente	Diferença		Intervalo de confiança (95%) *	
			LI	LS
Água	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-0,80	1,55
	Erva-mate verde	- Chá verde	-0,71	4,92
	Erva- mate tostada	- Chá verde	-2,18	5,64
Etanol	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-0,12	2,24
	Erva-mate verde	- Chá verde	-3,46	2,17
	Erva- mate tostada	- Chá verde	-5,61	2,20
Éter	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-1,05	1,31
	Erva-mate verde	- Chá verde	-0,74	4,89

Tabela 6. Intervalos de confiança das médias de porcentagem de captação do DPPH para os extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas) com os valores de referência de BHT, ambos na concentração de 0,5mg/mL

Solvente	Substância	Média	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Metanol	BHT	92,23		
Água	Erva-mate verde	93,05	91,1	95,0
	Erva-mate tostada	92,67	89,9	95,4
	Chá verde	90,95	88,2	93,7
Etanol	Erva-mate verde	95,06	93,1	97,0
	Erva-mate tostada	94,00	91,2	96,8
	Chá verde	95,70	92,9	98,5
Éter	Erva-mate verde	94,61	92,6	96,6
	Erva-mate tostada	94,48	91,7	97,2
	Chá verde	92,53	89,8	95,3

Tabela 7. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias das porcentagens de captação do DPPH dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas), para cada tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde) na concentração de 1,0 mg/mL

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-1,28	1,10
	Erva-mate verde - Chá verde	-3,08	7,17
	Erva- mate tostada - Chá verde	-3,53	7,81
Etanol	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-1,35	1,03
	Erva-mate verde - Chá verde	-5,33	4,92
	Erva- mate tostada - Chá verde	-5,72	5,62
Éter	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	0,73	3,11
	Erva-mate verde - Chá verde	-5,60	4,65
	Erva- mate tostada - Chá verde	-8,06	3,27

* Com correção de Bonferroni

Tabela 8. Intervalos de confiança das médias de porcentagem de captação do DPPH para os extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas) com os valores de referência de BHT, ambos na concentração de 1,0mg/mL

Solvente	Substância	Média	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Metanol	BHT	91,90		
Água	Erva-mate verde	93,59	90,0	97,2
	Erva-mate tostada	93,68	89,7	97,7
	Chá verde	91,54	87,5	95,5
Etanol	Erva-mate verde	95,67	92,0	99,3
	Erva-mate tostada	95,82	91,8	99,8
	Chá verde	95,88	91,9	99,9
Éter	Erva-mate verde	96,60	93,0	100,0
	Erva-mate tostada	94,68	90,7	98,7
	Chá verde	97,07	93,1	100,0

Tabela 9. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias das porcentagens de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico) dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas), conforme o tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde) na concentração de 0,5 mg/mL

Solvente	Diferença		Intervalo de confiança (95%) *	
			LI	LS
Água	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-10,38	-5,47
	Erva-mate verde	- Chá verde	-12,02	43,57
	Erva-mate tostada	- Chá verde	-2,63	50,03
Etanol	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-1,02	3,89
	Erva-mate verde	- Chá verde	-28,26	27,34
	Erva-mate tostada	- Chá verde	-28,23	24,44
Éter	Erva-mate verde	- Erva-mate tostada	-3,64	1,27
	Erva-mate verde	- Chá verde	-14,63	40,97
	Erva-mate tostada	- Chá verde	-11,98	40,69

* Com correção de Bonferroni

Tabela 10. Intervalos de confiança das médias de porcentagem de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico) para os extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas) com os valores de referência de BHT, ambos na concentração de 0,5mg/mL.

Solvente	Substância	Média	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Metanol	BHT	89,61		
Água 4 horas	Erva-mate verde	78,31	58,6	98,0
	Erva-mate tostada	86,23	67,6	100,0
	Chá verde	62,53	42,9	82,2
Etanol 4 horas	Erva-mate verde	73,70	54,0	93,4
	Erva-mate tostada	72,27	53,6	90,9
	Chá verde	74,17	54,5	93,8
Éter 4 horas	Erva-mate verde	75,72	56,1	95,4
	Erva-mate tostada	76,91	58,3	95,5
	Chá verde	62,55	42,9	82,2

Tabela 11. Intervalos de confiança das diferenças entre as médias das porcentagens de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico) dos extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas), conforme o tipo de erva (erva-mate verde, erva-mate tostada e chá verde) na concentração de 1,0 mg/mL

Solvente	Diferença	Intervalo de confiança (95%) *	
		LI	LS
Água	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-13,91	-2,65
	Erva-mate verde - Chá verde	-22,20	39,32
	Erva-mate tostada - Chá verde	-17,23	50,93
Etanol	Erva-mate verde - Erva-mate tostada	-14,33	-3,07
	Erva-mate verde - Chá verde	-45,93	29,41
	Erva-mate tostada - Chá verde	-41,30	42,18

* Com correção de Bonferroni

Tabela 12. Intervalos de confiança das médias de porcentagem de inibição da oxidação (sistema β -caroteno/ácido linoléico) para os extratos aquosos, etanólicos e etéreos (4 horas) com os valores de referência de BHT, ambos na concentração de 1,0mg/mL

Solvente	Substância	Média	Intervalo de confiança (95%)	
			LI	LS
Metanol	BHT	90,73		
Água 4 horas	Erva-mate verde	81,74	60,0	100,0
	Erva-mate tostada	90,02	65,9	100,0
	Chá verde	73,17	49,1	97,3
Etanol 4 horas	Erva-mate verde	74,62	52,9	96,4
	Erva-mate tostada	83,32	59,2	100,0
	Chá verde	82,88	48,8	100,0