

Brunna Cristina Bremer Boaventura

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CRIOCONCENTRAÇÃO DOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO  
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Renata Dias de Mello Castanho Amboni

Florianópolis  
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Boaventura, Brunna Cristina Bremer  
Atividade antioxidante e criocconcentração dos compostos  
bioativos do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex*  
*paraguariensis* A. St. Hil.) / Brunna Cristina Bremer  
Boaventura ; orientador, Renata Dias de Mello Castanho  
Amboni - Florianópolis, SC, 2015.  
135 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. *Ilex paraguariensis* . 3.  
Potencial antioxidante. 4. Fitocquímicos. 5.  
Criocconcentração. I. Amboni, Renata Dias de Mello Castanho  
. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de  
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos. III. Título.

Brunna Cristina Bremer Boaventura

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E CRIOCONCENTRAÇÃO DOS  
COMPOSTOS BIOATIVOS DO EXTRATO AQUOSO  
DE ERVA-MATE (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 09 de fevereiro de 2015.

---

Prof.<sup>a</sup> Roseane Fett, Dr.<sup>a</sup>  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof.<sup>a</sup> Renata Dias de Mello  
Castanho Amboni, Dr.<sup>a</sup>  
Orientadora  
UFSC

---

Prof. Edson Luiz da Silva, Dr.  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Patricia Faria Di Pietro, Dr.<sup>a</sup>  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Rosemary Hoffmann  
Ribani, Dr.<sup>a</sup>  
UFPR

---

Prof.<sup>a</sup> Elane Schwinden  
Prudêncio, Dr.<sup>a</sup>  
UFSC

---

Prof.<sup>a</sup> Deborah Helena  
Markowicz Bastos, Dr.<sup>a</sup>  
USP

---

Prof.<sup>a</sup> Edna Regina Amante, Dr.<sup>a</sup>  
UFSC



Este trabalho é dedicado a todos que acreditaram em mim e que me apoiaram para concretizá-lo.



## AGRADECIMENTOS

Ao meu Querido Deus, por me fazer permanecer firme na justiça e no temor, fazendo-me compreender e acolher Suas palavras e Seus ensinamentos com sabedoria e paciência.

Aos meus pais José Dionísio e Katy Christine por me ensinarem e pelo incentivo a sonhar e buscar a realização dos meus sonhos. Aos meus irmãos Paulo e Patrícia que sempre estiveram ao meu lado, dando-me força e amor incondicional. Ao meu marido e melhor amigo, Filipe, que acompanhou e me apoiou incessantemente e amavelmente por toda a minha trajetória de formação acadêmica.

À minha querida orientadora, Professora Renata Dias de Mello Castanho Amboni, que acreditou em mim e no meu potencial para a realização deste doutorado. Agradeço do fundo do meu coração todo o carinho, a atenção, o respeito, a dedicação, os incentivos, os elogios, as críticas, as alegrias e as tristezas compartilhadas. Foi e sempre será uma honra trabalhar e conviver com uma pessoa tão amável, formidável e admirável.

À Professora Elane que, com seu jeito único de ser, cativa-me desde os tempos em que era minha professora de graduação. É um prazer indescritível conviver, trabalhar e aprender com uma pessoa tão querida, espontânea, engraçada, inteligente, otimista e carinhosa.

Ao Professor Edson Luiz da Silva que foi um dos grandes responsáveis pelo meu amadurecimento científico, incentivando-me desde a iniciação científica até hoje. Seus ensinamentos serão eternos e, sem dúvida, foram imprescindíveis à minha formação pessoal e profissional. Além disso, agradeço por ter cedido o Laboratório de Lipídios, Antioxidantes e Aterosclerose para a realização de algumas análises.

À Professora Patricia Faria Di Pietro, minha orientadora durante o mestrado, que foi a responsável por me introduzir no “mundo acadêmico”. Sempre me incentivou e me apoiou a correr atrás dos meus sonhos, independentemente de quaisquer obstáculos. Sou e sempre serei grata por todo o aprendizado, incentivo, carinho e amizade.

Ao Professor Rui Hai Liu, que me recebeu tão alegremente em seu laboratório na Cornell University durante o período de doutorado sanduíche, proporcionando-me experiências inesquecíveis. Agradeço imensamente toda a sua disponibilidade, atenção e dedicação ao analisar e discutir os meus resultados.

À Professora Edna Regina Amante, por incentivar e vibrar com o nosso trabalho, além de ceder o seu Laboratório de Frutas e Hortaliças para a realização de algumas análises.

Ao Professor Marcelo Maraschin, pela disponibilidade em auxiliar nas discussões de algumas análises deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina, a CAPES e ao CNPq, por fomentarem esta pesquisa, disponibilizando auxílio financeiro durante todo o período de doutoramento, inclusive no exterior. À Professora Roseane Fett, Coordenadora da Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e ao Secretário Sergio de Souza por toda a atenção e disponibilidade para todas as questões.

À empresa Materva, em especial ao Sr. Zanelato e à Jozeane, por fornecerem tão gentilmente as folhas de erva-mate utilizadas para a realização de todo o trabalho.

Aos queridos voluntários do nosso estudo *in vivo* que, literalmente, deram o sangue pelo nosso trabalho, participando de todas as etapas de tratamento com muito entusiasmo e compromisso. Agradeço também à querida Cris Sabel, que foi impecável em todas as coletas sanguíneas e cativou os voluntários por sua sensibilidade e profissionalismo.

À querida colega Aline Becker, que me ensinou tão pacientemente e amavelmente a análise de novos parâmetros laboratoriais.

A todas as colegas do Laboratório de Leite e Derivados, que sempre torceram por mim e estiveram disponíveis para me ajudar.

Aos colegas do Laboratório de Food Chemistry da Cornell University e, principalmente, a minha querida amiga Renata Polinatti, que foi a minha luz e meu anjo da guarda.

As minhas queridas amigas Carla Luiza Purim, Fernanda de Andrade e Francilene Graciele Kunradi Vieira, que sempre me ampararam, apoiaram e torceram por mim.

Ao meu amigo Dietrich Knorr, que acompanha e incentiva o meu trabalho, sempre torcendo pela minha evolução enquanto Jovem cientista.

A todas as outras pessoas, dentre familiares e amigos de longa data, que conheci durante esta jornada e que, indiretamente, apoiaram-me e me incentivaram neste processo.



Menor que meu sonho não posso ser.”

Lindolf Bell



## RESUMO

A atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate está relacionada principalmente ao seu alto teor de compostos fenólicos, particularmente dos ácidos clorogênicos. Com o objetivo de aumentar o teor dos compostos bioativos e possibilitar a otimização da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, a tecnologia de crioc concentração foi aplicada no extrato aquoso de erva-mate. Verificou-se que os teores de compostos fenólicos totais e isolados, de metilxantinas e a atividade antioxidante foram significativamente maiores no extrato crioc concentrado quando comparado ao extrato inicial. Além disto, a atividade antioxidante apresentou significativa correlação positiva com os teores de compostos fenólicos do extrato. Ao avaliar a ingestão aguda após uma hora da infusão de erva-mate crioc concentrada por seres humanos saudáveis, verificou-se aumento significativo nos valores dos parâmetros antioxidantes glutathiona reduzida e capacidade antioxidante do soro, como também nas atividades das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathiona peroxidase nos eritrócitos. Por outro lado, a ingestão aguda da infusão de erva-mate não crioc concentrada proporcionou apenas aumento significativo nos valores de glutathiona reduzida dos indivíduos do estudo. Ressalta-se que nenhuma das infusões de erva-mate provocou toxicidade ou atividade pró-oxidante, a partir da peroxidação lipídica, nos participantes. Adicionalmente, este estudo também avaliou o efeito da digestão gastrointestinal simulada no teor de compostos fenólicos, na atividade antioxidante do extrato de erva-mate e nas atividades antioxidante celular, antiproliferativa e citotóxica em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Após a digestão simulada do extrato de erva-mate, observou-se diminuição significativa nos teores de compostos fenólicos totais, ácidos fenólicos isolados e flavonoides totais; na atividade antioxidante do extrato; na atividade antioxidante celular; e na inibição da proliferação celular em células HepG2. Não foi observada diferença significativa na atividade citotóxica do extrato digerido em relação ao extrato não digerido. Por fim, a técnica de crioc concentração se mostrou uma alternativa para preservar a qualidade nutricional do extrato aquoso de erva-mate e possibilitou concomitante aumento na atividade antioxidante *in vitro* e em seres humanos. Apesar da digestão gastrointestinal simulada favorecer à diminuição dos fitoquímicos do extrato de erva-mate, os achados deste estudo sugerem uma possível atividade quimiopreventiva do extrato digerido, a qual deve ser investigada a partir de estudos com animais e seres humanos.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Potencial antioxidante. Fitoquímicos. Crioconcentração.

## ABSTRACT

Antioxidant potential of aqueous extract of yerba mate is mainly attributed to its phenolic compounds content, particularly chlorogenic acids. With the purpose of increasing the content of bioactive compounds and to optimize *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity, this study applied the freeze concentration technology in the aqueous extract of yerba mate. Total and isolated phenolic compounds content, methylxanthines content, and antioxidant activity increased significantly in the freeze concentrated extract in relation to initial extract. Antioxidant activity showed significant positive correlation with the contents of phenolic compounds and methylxanthines. Besides, one hour after acute consumption of freeze concentrated infusion of yerba mate by healthy individuals, it was observed significant enhancement of the antioxidant biomarkers such as reduced glutathione and serum antioxidant capacity, and the activities of antioxidant enzymes catalase, superoxide dismutase, and glutathione peroxidase in erythrocytes. On the other hand, acute intake of non-freeze concentrated extract promoted significant increase only in reduced glutathione parameter. None of the yerba mate extracts induced toxicity or pro-oxidant activity through lipid peroxidation in the studied individuals. Additionally, this study also evaluated the effect of simulated gastrointestinal digestion of yerba mate extract in phenolic compounds content, antioxidant activity of the extract, cellular antioxidant activity, inhibition of cell proliferation, and cytotoxicity of liver hepatocellular carcinoma cells (HepG2). After simulated digestion, the extract of yerba mate showed significant decrease of the contents of total phenolic compounds, isolated phenolic acids and total flavonoids; of antioxidant activity of the extract; of cellular antioxidant activity; and of inhibition of proliferation in HepG2 cells. No difference was observed in cytotoxicity of the digested extract when compared to the non-digested extract. Finally, freeze concentration proved to be an alternative technique to preserve the nutritional quality of the aqueous extract of yerba mate and allowed concomitant increase in *in vitro* and human's antioxidant activity. Despite of the simulated gastrointestinal digestion favoured the decrease of phytochemicals content of yerba mate extract, our findings suggest a possible chemopreventive activity of digested extract, which should be investigated from studies with animals and humans.

**Keywords:** *Ilex paraguariensis*. Antioxidant potential. Phytochemicals. Cryoconcentration.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais ácidos clorogênicos encontrados nas folhas de erva-mate. ....	36
Figura 2 – Estruturas químicas da cafeína e da teobromina. ....	37
Figura 3 – Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico. ....	37
Figura 4 – Métodos de cristalização por suspensão e crioconcentração progressiva. ....	44
Figura 5 – Esquema do procedimento de crioconcentração aplicado....	57
Figura 6 – Evolução do teor de sólidos totais dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da crioconcentração. ....	61
Figura 7 – Cromatograma representativo dos ácidos fenólicos e metilxantinas do extrato aquoso de erva-mate. ....	66
Figura 8 – Concentrações de FRAP (A), GSH (B), e LOOH (F), e atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), GPx (D) e CAT (E) de indivíduos saudáveis antes e após uma hora do consumo de infusão de erva-mate tradicional (MT), infusão de erva-mate crioconcentrada (MC) e controle. ....	89
Figura 9 – Correlações entre as variações dos valores percentuais de LOOH e FRAP (A), GPx e GSH (B), GPx e CAT (C) e GPx e SOD (D) após a ingestão de infusão de erva-mate crioconcentrada (MC). ....	90
Figura 10 – Citotoxicidade e inibição da proliferação celular em células HepG2 do extrato de erva-mate antes (A) e após (B) a digestão simulada. ....	110





## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos totais (CFT) do extrato inicial, dos concentrados e dos gelos de cada estágio da criocentralização e a eficiência do processo em relação ao teor de CFT. .... 62
- Tabela 2 – Compostos fenólicos, metilxantinas e atividade antioxidante do extrato inicial e dos fluidos concentrados de cada estágio da criocentralização..... 65
- Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos em 200 mL de infusão de erva-mate tradicional (MT) e criocentralizada (MC) ingeridas pelos voluntários do estudo. .... 83
- Tabela 4 – Teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e de ácidos fenólicos isolados e atividade antioxidante do extrato de erva-mate antes e após a digestão simulada. .... 106
- Tabela 5 – Atividade antioxidante celular (CAA) do extrato de erva-mate antes e após a digestão simulada. .... 108



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABAP – 2,2-Azobis(2-amidinopropano)  
AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O – Cloreto de alumínio  
ANOVA - Análise de variância  
AOAC – *Association of Official Analytical Chemists*  
ATCC – *American Type Culture Collection*  
AUC – Área abaixo da curva (em inglês *area under the curve*)  
BHT – Butil hidroxi tolueno  
C1 – Fluido concentrado obtido do primeiro estágio da crioconcentração  
C2 – Fluido concentrado obtido do segundo estágio da crioconcentração  
C3 – Fluido concentrado obtido do terceiro estágio da crioconcentração  
C4 – Fluido concentrado obtido do quarto estágio da crioconcentração  
C5 – Fluido concentrado obtido do quinto estágio da crioconcentração  
CAA – Atividade antioxidante celular (em inglês *cellular antioxidant activity*)  
CAT – Catalase  
CC<sub>50</sub> – Concentração de extrato tóxica para diminuir 50% das células  
CFT – Compostos fenólicos totais  
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência  
CO<sub>2</sub> – Gás carbônico  
DAD – Detector de diodo (em inglês *detector diode array*)  
DCFH-DA – 2',7'-diacetado de diclorofluoresceína  
DMSO – Dimetilsulfóxido  
DNA – Ácido desoxirribonucléico (em inglês *deoxyribonucleic acid*)  
DP – Desvio padrão da média  
DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil  
DTNB – ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)  
EC<sub>50</sub> – Concentração de extrato necessária para diminuir 50% das células ou dos radicais  
EGCG – Epigallocatequina galato  
EP – Erro padrão da média  
EQ – Equivalente de quercetina  
EROs – Espécies reativas de oxigênio  
EtOH – Etanol  
FBS – Soro bovino fetal (em inglês *fetal bovine serum*)  
FeCl<sub>3</sub> – Cloreto férrico  
FOX2 – Oxidação do ferro com o alaranjado de xilenol (em inglês *ferrous oxidation in xylene orange*)  
FRAP – Potencial antioxidante redutor férrico (em inglês *ferric reducing antioxidant potential*)

G1 – Gelo obtido do primeiro estágio da crioconcentração  
G2 – Gelo obtido do segundo estágio da crioconcentração  
G3 – Gelo obtido do terceiro estágio da crioconcentração  
G4 – Gelo obtido do quarto estágio da crioconcentração  
G5 – Gelo obtido do quinto estágio da crioconcentração  
GAE – Equivalente de ácido gálico (em inglês *gallic acid equivalent*)  
GPx – Glutathione peroxidase  
GSH – Glutathione reduzida  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de hidrogênio  
HBSS – Solução salina tamponada de Hank (em inglês *Hank's balanced salt solution*)  
HCl – Ácido hidrocloreto  
HepG2 – Linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano  
HO<sup>•</sup> – Radical hidroxila  
IMC – Índice de massa corpórea  
LDL – Lipoproteína de baixa densidade (em inglês *low density lipoprotein*)  
LOOH – Hidroperóxidos lipídicos  
MeOH – Metanol  
MC – Infusão de erva-mate crioconcentrada  
MT – Infusão tradicional de erva-mate  
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (em inglês *messenger ribonucleic acid*)  
Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> – Carbonato de sódio  
NaBH<sub>4</sub> – Boridreto de sódio  
NaCl – Cloreto de sódio  
NADPH – Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (em inglês *reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)  
NaHCO<sub>3</sub> – Bicarbonato de sódio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> – Ânion superóxido  
ORAC – Capacidade de absorção do radical oxigênio (em inglês *oxygen radical absorbance capacity*)  
PBS – Tampão fosfato salino (em inglês *phosphate buffered saline*)  
PSC – Capacidade de sequestro do radical peroxil (em inglês *peroxyl radical scavenging capacity*)  
QE – Equivalente de quercetina  
SOD – Superóxido dismutase  
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (em inglês *thiobarbituric acid-reactive substances*)  
THF – Tetrahidrofurano  
TPP – Trifenilfosfina

TPTZ – 2,4,6-tri(2-pyridil)-s-triazina

Trolox – ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico

UV – Radiação ultravioleta

WME – *Williams' medium E*



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
REFERÊNCIAS .....	31
<b>CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica</b> .....	<b>35</b>
1 ERVA-MATE.....	35
2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE.....	35
3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE .....	38
<b>3.1 Atividade antioxidante da erva-mate <i>in vitro</i></b> .....	<b>38</b>
<b>3.2 Atividade antioxidante da erva-mate <i>in vivo</i></b> .....	<b>39</b>
4 DIGESTÃO DA ERVA-MATE .....	40
5 CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE ..	42
<b>5.1 Crioconcentração</b> .....	<b>43</b>
REFERÊNCIAS .....	46
<b>CAPÍTULO 2 – Efeito da crioconcentração no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.)</b> .....	<b>53</b>
RESUMO .....	53
1 INTRODUÇÃO.....	54
2 MATERIAL E MÉTODOS .....	55
<b>2.1 Material</b> .....	<b>55</b>
<b>2.2 Preparação do extrato aquoso de erva-mate</b> .....	<b>55</b>
<b>2.3 Aplicação do protocolo de crioconcentração</b> .....	<b>55</b>
<b>2.4. Determinação dos sólidos totais</b> .....	<b>57</b>
<b>2.5 Avaliação do processo de crioconcentração</b> .....	<b>57</b>
<b>2.6 Determinação do teor dos compostos bioativos</b> .....	<b>58</b>
2.6.1 Compostos fenólicos.....	58
2.6.2 Metilxantinas .....	59
<b>2.7 Determinação da atividade antioxidante</b> .....	<b>59</b>
2.7.1 Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) .....	59
2.7.2 Atividade do sequestro do radical DPPH.....	59
<b>2.8 Análise estatística</b> .....	<b>60</b>
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	60
<b>3.1 Teor de sólidos totais e fator de concentração</b> .....	<b>60</b>
<b>3.2 Eficiência da crioconcentração</b> .....	<b>61</b>
<b>3.3 Concentração dos compostos bioativos</b> .....	<b>63</b>
<b>3.4 Avaliação da atividade antioxidante</b> .....	<b>67</b>
4 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS .....	70

<b>CAPÍTULO 3 – Avaliação da atividade antioxidante da infusão de erva-mate crioconcentrada (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) em indivíduos saudáveis.....</b>	<b>75</b>
RESUMO.....	75
1 INTRODUÇÃO.....	76
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
2.1 Reagentes químicos.....	77
2.2 Erva-mate e preparo das infusões.....	77
2.3 Sujeitos e desenho do estudo.....	78
2.4 Análises bioquímicas.....	79
2.5 Atividade antioxidante sérica e eritrocitária.....	79
2.6 Atividade antioxidante enzimática.....	80
2.7 Peroxidação lipídica.....	81
2.8 Análise estatística.....	82
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	83
3.1 Teor de compostos fenólicos nas infusões.....	83
3.2 Potencial antioxidante das infusões.....	84
4 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS.....	92

<b>CAPÍTULO 4 – Efeito da digestão simulada do extrato de erva-mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) na atividade antioxidante celular, citotoxicidade e inibição da proliferação de células HepG2.....</b>	<b>97</b>
RESUMO.....	97
1 INTRODUÇÃO.....	98
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	99
2.1 Reagentes químicos.....	99
2.2 Preparação do extrato de erva-mate.....	100
2.3 Digestão gastrointestinal simulada.....	100
2.4 Análise do perfil de compostos fenólicos do extrato de erva-mate.....	101
2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais.....	101
2.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais.....	101
2.4.3 Determinação dos compostos fenólicos por CLAE.....	102
2.5 Atividade antioxidante total do extrato de erva-mate.....	102
2.5.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	102
2.5.2 Capacidade de sequestro do radical peróxido (PSC).....	103
2.6 Cultura celular.....	103
2.7 Atividade antioxidante celular (CAA).....	103
2.8 Avaliação da citotoxicidade.....	104
2.9 Avaliação da inibição da proliferação celular.....	105
2.10 Análise estatística.....	105
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	105
3.1 Perfil fenólico da erva-mate.....	105
3.2 Atividade antioxidante total.....	107



<b>3.3 Atividade antioxidante celular</b> .....	<b>107</b>
<b>3.4 Citotoxicidade e proliferação celular</b> .....	<b>108</b>
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>111</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>112</b>

<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>117</b>
-----------------------------------	------------

<b>APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)</b> .....	<b>119</b>
<b>APÊNDICE B – Orientações gerais</b> .....	<b>121</b>
<b>ANEXO A – Artigo original “Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) through freeze concentration technology”</b> .....	<b>123</b>
<b>ANEXO B – Trabalho parcial apresentado no 16º IUFoST em Foz do Iguaçu-PR/Brasil</b> .....	<b>125</b>
<b>ANEXO C – Comprovante de solicitação de depósito da patente do processo de criocongelamento do extrato aquoso de erva-mate</b> .....	<b>127</b>
<b>ANEXO D – Artigo original “Effect of yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i> A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals”</b> .....	<b>129</b>
<b>ANEXO E – Trabalho parcial apresentado no IFT 2013 <i>Annual Meeting and Food Expo</i>® em Chicago, IL/EUA</b> .....	<b>131</b>
<b>ANEXO F – Parecer do comitê de ética em pesquisas com Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC)</b> .....	<b>133</b>
<b>ANEXO G – Trabalho parcial apresentado no “<i>First International Workshop: Innovation in Food Science</i>” em Florianópolis, SC/Brasil</b> .....	<b>135</b>



## INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., também conhecida como erva-mate, é uma planta importante da região subtropical da América do Sul. O extrato aquoso de erva-mate, obtido a partir da infusão em água quente das folhas da planta, é amplamente consumido por um grande número de pessoas nos países sul-americanos, particularmente na Argentina, Brasil, Paraguai e Uruguai (DE MEJIA et al., 2010; BRACESCO et al., 2011). Considerando o seu crescente consumo, a disponibilidade comercial e os benefícios à saúde, bebidas à base de erva-mate tornaram-se populares também na Europa e na América do Norte (DE MEJIA et al., 2010).

As propriedades farmacológicas atribuídas à erva-mate estão relacionadas ao seu alto teor de compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos, metilxantinas e saponinas (HECK; DE MEJIA, 2007; DE MORAIS et al., 2009). A significativa atividade antioxidante do extrato aquoso da erva-mate é derivada principalmente do seu alto teor de polifenóis, particularmente os ácidos clorogênicos (FILIP et al., 2000; HECK; DE MEJIA, 2007; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; ANESINI et al., 2012). Em estudos anteriores, há relatos sobre a elevada atividade antioxidante proporcionada pelo consumo da infusão de erva-mate em indivíduos dislipidêmicos e diabéticos (DA SILVA et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013).

O extrato aquoso de erva-mate também possui atividades antiproliferativa e citotóxica em células cancerígenas (RAMIREZ-MARES et al., 2004; DE MEJIA et al., 2005; DE MEJIA et al., 2010). Entretanto, ainda não foi investigado o efeito antioxidante do extrato em células cancerígenas. A análise da atividade antioxidante celular (CAA) rastreia os antioxidantes contidos no extrato que estão envolvidos na captação, distribuição e eficiência da proteção contra os radicais peróxil em células de carcinoma hepatocelular em condições fisiológicas (WOLFE; LIU, 2007). Apesar de a biodisponibilidade dos compostos bioativos da erva-mate ser ainda pouco estudada, especula-se que, após a metabolização, os compostos bioativos presentes na erva-mate podem ter a sua atividade antioxidante diminuída. Desta maneira, torna-se também necessário investigar a atividade antioxidante e quimiopreventiva do extrato aquoso de erva-mate após a digestão.

Além disto, considerando que há relação direta entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antioxidante do extrato de erva-mate (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; ZIELINSKI et al., 2014), estudos de concentração dos compostos bioativos do extrato da planta se

tornam interessantes do ponto de vista nutricional. Murakami et al. (2011) e Prudêncio et al. (2012) concentraram os compostos fenólicos presentes no extrato aquoso de folhas e casca de erva-mate usando a tecnologia de nanofiltração. Outra tecnologia considerada promissora para a concentração de bio-ingredientes em produtos alimentares naturais é a crioc Concentração (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Por ser processada em baixas temperaturas, a crioc Concentração minimiza a perda de componentes termolábeis, tais como os compostos fenólicos (AIDER; DE HALLEUX, 2009; SÁNCHEZ et al., 2010). Apesar da crioc Concentração apresentar aspectos positivos em relação à concentração de compostos bioativos, não há relatos sobre a sua aplicabilidade no extrato aquoso de erva-mate e sobre uma possível otimização do efeito antioxidante *in vitro* e *in vivo* do extrato crioc Concentrado.

A fim de contemplar todos os aspectos supracitados, esse trabalho está apresentado e estruturado da seguinte forma:

- Capítulo 1: Revisão Bibliográfica.

Estão abordados, neste capítulo, os principais temas que serão avaliados e considerados no decorrer deste trabalho. Dessa forma, são descritos, detalhadamente, os tópicos relacionados à erva-mate, seus constituintes químicos, suas atividades farmacológicas, seu potencial antioxidante e sua digestão, além da concentração do extrato de erva-mate, com enfoque especial sobre a crioc Concentração, tecnologia que foi pioneiramente aplicada no presente estudo.

- Capítulo 2: Efeito da crioc Concentração no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.).

Neste estudo, objetivou-se verificar os efeitos da crioc Concentração do extrato aquoso de folhas de erva-mate no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante *in vitro*.

Para a realização dos experimentos deste capítulo, consideraram-se os trabalhos publicados anteriormente por nosso grupo de pesquisa, em que foi utilizada outra tecnologia para concentrar (nanofiltração) os compostos bioativos do extrato aquoso de erva-mate. Dessa forma, optou-se por avaliar a aplicabilidade e a efetividade da crioc Concentração por ser uma

tecnologia já empregada em nosso grupo de pesquisa. Considerou-se ainda que, nesta tecnologia de concentração, são utilizadas baixas temperaturas de operação, fato que deve ser analisado ao se objetivar a concentração de compostos fenólicos. Além disto, o efeito da utilização dessa tecnologia sobre a atividade antioxidante *in vitro* foi avaliado, a fim de identificar uma possível otimização do potencial antioxidante relacionada ao aumento do teor dos fitoquímicos.

- Capítulo 3: Avaliação da atividade antioxidante da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) crioconcentrada em indivíduos saudáveis.

Objetivou-se neste estudo avaliar se o consumo agudo de infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) crioconcentrada promove melhora nos parâmetros antioxidantes e de peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis, quando comparado ao consumo da infusão de erva-mate tradicional.

A investigação descrita foi embasada nos resultados obtidos no estudo anterior (Capítulo 2), onde foi observada relação positiva entre a concentração do extrato aquoso de erva-mate e a atividade antioxidante *in vitro*. Contudo, apesar de já ter sido demonstrado que o extrato aquoso de erva-mate crioconcentrado apresenta elevado teor de compostos fenólicos e significativa atividade antioxidante *in vitro*, torna-se ainda necessário avaliar se esse comportamento também acontece *in vivo*, não induzindo efeitos tóxicos e/ou pró-oxidantes.

- Capítulo 4: Efeito da digestão simulada do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na atividade antioxidante celular, citotoxicidade e inibição da proliferação de células HepG2.

O objetivo neste estudo foi avaliar a influência da digestão gastrointestinal simulada do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na atividade antioxidante celular (CAA), citotoxicidade e proliferação de células HepG2.

Os resultados derivaram do estudo realizado durante o período de estágio sanduíche no Laboratório de Food Chemistry da Cornell University, sob a supervisão do Dr. Rui Hai Liu. Diversas metodologias aplicadas nesse estudo foram desenvolvidas e validadas em seu próprio laboratório como, por exemplo, a CAA, que é uma das principais atividades descritas na

literatura capazes de mensurar a atividade antioxidante nas células. Igualmente, o desenho desse trabalho, com a aplicação da digestão simulada, assemelhou-se a outros estudos publicados pelo supervisor no exterior, utilizando outras espécies vegetais.

- Considerações Finais

## REFERÊNCIAS

AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.

ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT- Food Science and Technology**, v. 45, n.2, p. 299-304, 2012.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.

BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, 1057-1064, 2013.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

DA SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

DE MEJIA, E. G. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.

DE MEJIA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

SÁNCHEZ, J. et al. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644-651, 2010.

SÁNCHEZ, J. et al. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 147-155, 2011.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907, 2007.



ZIELINSKI, A. A. F. et al. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.



## CAPÍTULO 1 – Revisão bibliográfica

### 1 ERVA-MATE

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma espécie arbórea da família Aquifoliaceae, originária das regiões subtropicais da América do Sul, presente no sul do Brasil, norte da Argentina, Paraguai e Uruguai. Ela é consumida por grande parte da população desses países, apresentando importância cultural, econômica e social para essas regiões (DE MEJIA et al., 2010; BRACESCO et al., 2011).

No ano de 2012, foram produzidas no Brasil 253.700 toneladas de folhas de erva-mate (BRASIL, 2012). A região sul foi a principal produtora de folhas de erva-mate no país durante o ano de 2012, sendo o estado do Paraná o maior produtor com 76,6% da produção, Santa Catarina com 14,3% e Rio Grande do Sul com 9,0% (BRASIL, 2012).

A partir das folhas de erva-mate são produzidos diferentes tipos de bebida, tais como o chimarrão e o tererê, preparados com as folhas verdes, e o chá mate, preparado com as folhas tostadas (BASTOS et al., 2007; BRACESCO et al., 2011). As bebidas derivadas da erva-mate são muito apreciadas pelo seu gosto amargo característico e propriedades estimulantes. Durante séculos, a erva-mate foi usada empiricamente, como estimulante pelos indígenas da América do Sul, especialmente os índios Guarani. Esse hábito, que foi incorporado pelas sociedades colonizadoras, permanece até os dias atuais. Estima-se que milhões de pessoas consomem cerca de um a dois litros por dia de infusão de erva-mate, constituindo-se na principal alternativa para o café ou chá preto (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007).

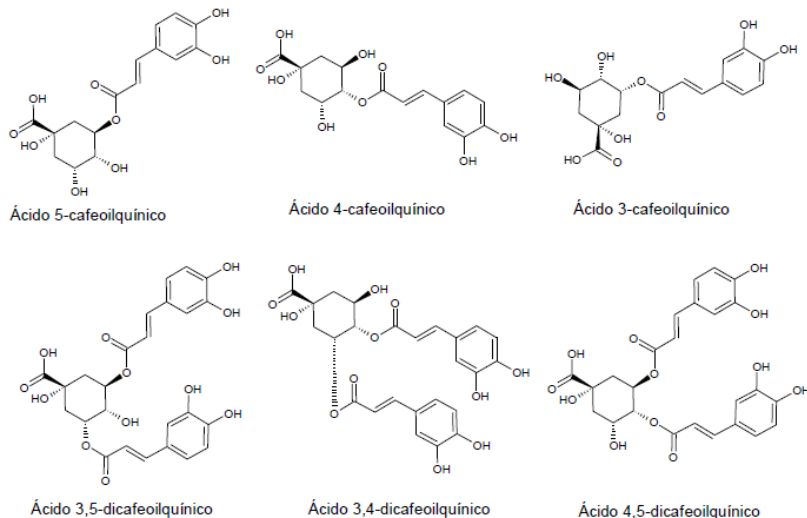
O processamento industrial das folhas de erva-mate envolve os estágios de colheita, sapeco, secagem, trituração, maturação e empacotamento (ISOLABELLA et al., 2010). Durante o processamento industrial, especialmente nos estágios de colheita, sapeco, secagem e maturação, as folhas de erva-mate sofrem alterações no perfil e na concentração dos compostos bioativos presentes na planta, os quais podem modificar suas atividades biológicas (ISOLABELLA et al., 2010; TURNER et al., 2011).

### 2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA ERVA-MATE

A erva-mate possui, em sua composição química, alguns compostos bioativos que vêm sendo estudados devido às suas propriedades biológicas. Os compostos fenólicos são os constituintes

mais abundantes e mais estudados da erva-mate. Essas moléculas são metabólitos secundários e estão geralmente envolvidas na defesa contra a radiação ultravioleta ou contra a agressão de patógenos (MANACH et al., 2004). Os compostos fenólicos estão presentes na erva-mate, principalmente, na forma de ácidos fenólicos e, em menor proporção, na forma de flavonoides (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). Dentre os ácidos fenólicos, os ácidos clorogênicos estão presentes em maiores quantidades na planta. Marques e Farah (2009) identificaram nove ésteres de ácidos clorogênicos nas amostras verde e tostada de erva-mate, sendo os principais o ácido 5-cafeoilquínico, o ácido 4-cafeoilquínico, o ácido 3-cafeoilquínico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, o ácido 3,4-dicafeoilquínico e o ácido 4,5-dicafeoilquínico (Figura 1). A atividade antioxidante é a principal atividade biológica relacionada ao teor de compostos fenólicos presentes na erva-mate (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007).

Figura 1 – Estruturas químicas dos principais ácidos clorogênicos encontrados nas folhas de erva-mate.

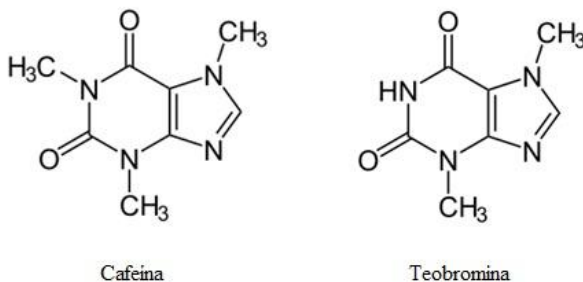


Fonte: Chemblink (2012).

As metilxantinas, como cafeína e teobromina (Figura 2), são os principais alcaloides purínicos encontrados nas folhas de erva-mate (MEINHART et al., 2010). Esses constituintes, presentes na planta, são responsáveis principalmente pela atividade estimulante ao sistema

nervoso central e pelo aumento da utilização de gordura como fonte energética (SILVA et al., 2011). Silva et al. (2011) observaram que o teor de cafeína presente na erva-mate pode ter sido responsável pela redução do peso corporal e da gordura abdominal de ratos.

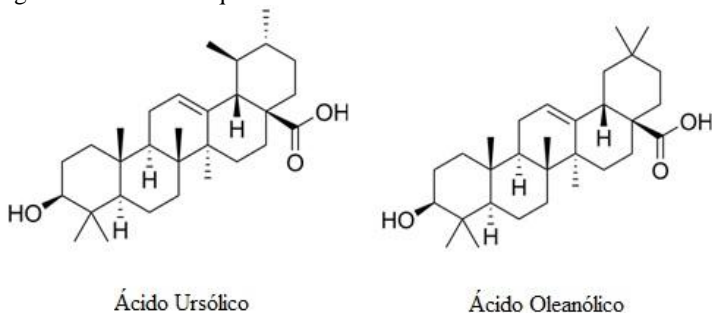
Figura 2 – Estruturas químicas da cafeína e da teobromina.



Fonte: Chemblink (2012).

As folhas de erva-mate também possuem elevadas quantidades de saponinas triterpenóides, contendo principalmente os núcleos de ácido ursólico ou de ácido oleanólico (Figura 3) (GNOATTO; SHENKEL; BASSANI, 2005).

Figura 3 – Estruturas químicas do ácido ursólico e do ácido oleanólico.



Fonte: Chemblink (2012).

As saponinas isoladas da erva-mate, bem como do extrato aquoso da planta inibiram, *in vitro*, a difusão passiva de ácido cólico, mimetizando a inibição da absorção de ácidos biliares pelas células intestinais (FERREIRA et al., 1997), proporcionando assim efeito na diminuição do colesterol. De fato, De Moraes et al. (2009) verificaram

redução significativa do colesterol em indivíduos hipercolesterolêmicos após 40 dias de consumo de infusão de erva-mate. Os autores relacionaram essa diminuição à atividade das saponinas presentes na erva-mate.

### 3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA ERVA-MATE

#### 3.1 Atividade antioxidante da erva-mate *in vitro*

Diversos estudos reportaram o elevado potencial antioxidante do extrato aquoso de erva-mate *in vitro* (BASTOS et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007). Zielinski et al. (2014) observaram que o extrato aquoso de erva-mate promoveu melhor atividade antioxidante ao avaliar o sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e potencial antioxidante redutor férrico (FRAP), quando comparado ao extrato de outras espécies vegetais, exceto o de *Camellia sinensis* (chá verde). Todavia, Macedo et al. (2011) verificaram que os valores da capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC) foram semelhantes nas amostras de erva-mate e de chá verde.

A atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate está relacionada, principalmente, com o elevado teor de compostos fenólicos presentes na planta. Bravo, Goya e Lecumberri (2007) e Zielinski et al. (2014) observaram aumento concomitante de alguns marcadores de avaliação de atividade antioxidante em relação ao teor de compostos fenólicos do extrato de erva-mate. Além disso, Anesini et al. (2012) constataram que dentre os compostos fenólicos, os ácidos clorogênicos são os principais constituintes presentes na erva-mate responsáveis por sua capacidade antioxidante. Entretanto, embora Peres et al. (2013) tenham observado a presença majoritária dos ácidos 4,5 dicafeoilquínico, 3-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico e 4-cafeoilquínico em bebidas à base de erva-mate, verificaram que os principais contribuintes isolados da atividade antioxidante são o ácido 3-cafeoilquínico, a quercetina-3-*O*-ramnosilglicosídeo e a quercetina-3-*O*-glicosídeo.

Apesar de a erva-mate apresentar elevada atividade antioxidante, esta capacidade pode variar de acordo com o processamento industrial da planta. Turner et al. (2011) observaram que os diferentes estágios do processamento das folhas de erva-mate como a colheita, o sapeco, a secagem e a maturação podem interferir, negativamente, na atividade antioxidante da planta.

### 3.2 Atividade antioxidante da erva-mate *in vivo*

A produção de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (EROs), principalmente na forma de ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e radical hidroxila ( $HO^\bullet$ ), ocorre em condições fisiológicas nas células (GUTTERIDGE, 1995). A produção excessiva de radicais livres e EROs induz danos celulares provocados pelo estresse oxidativo (SIES, 1997). O estresse oxidativo promove um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a um desarranjo da sinalização e do controle redox e/ou a um dano molecular (JONES, 2006).

A excessiva produção de radicais livres e EROs está relacionada com danos celulares a macromoléculas biológicas como lipídios, proteínas e DNA, os quais estão associados à etiologia e à patogênese de diversas doenças, tais como as cardiovasculares, câncer e diabetes (FANG; YANG; WU, 2002). O organismo humano possui um sistema de defesa antioxidante endógeno, composto principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx). Estas enzimas antioxidantes compõem a defesa antioxidante primária do organismo, impedindo a formação ou neutralizando os radicais livres e EROs, desempenhando assim um papel crucial na manutenção das funções celulares (RAHMAN, 2007; CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Apesar de o organismo humano apresentar mecanismos endógenos para combater o estresse oxidativo, esse sistema de defesa antioxidante nem sempre é suficiente para neutralizar os agentes oxidantes (YANG; LIU, 2012). Dessa forma, a utilização de antioxidantes exógenos derivados da dieta, particularmente os compostos fenólicos presentes na erva-mate, parece ser importante estratégia na proteção contra as doenças crônicas.

O pioneiro estudo de Gugliucci (1996) com seres humanos saudáveis mostrou que o consumo agudo da infusão de erva-mate diminuiu a oxidação de lipoproteína de baixa densidade (LDL). Menini et al. (2007) demonstraram que o consumo agudo de infusão de erva-mate inibiu a oxidação de lipoproteínas de alta densidade, induzida pelos radicais peroxil e preservou as apolipoproteínas A-I e a atividade da enzima paroxonase-1. A atividade antioxidante promovida pelo consumo agudo da infusão de erva-mate também foi avaliada por Da Silva et al. (2008), que observaram aumento na capacidade antioxidante e na resistência à peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis. Matsumoto et al. (2009) verificaram que o consumo agudo de infusão de

erva-mate tostada promoveu aumento na expressão gênica das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx de mulheres saudáveis. Igualmente, nesse estudo, foi observada diminuição significativa na peroxidação lipídica após sete dias de consumo da infusão de mate. Fernandes et al. (2012) demonstraram que a ingestão após duas horas e após uma semana de infusão de erva-mate verde ou tostada modulou, positivamente, a expressão relativa de mRNA e a atividade da enzima antioxidante paraoxonase-2 em monócitos e macrófagos em testes *in vitro* e com seres humanos. Ao avaliar o consumo prolongado de infusão de erva-mate tostada em indivíduos com dislipidemia, Boaventura et al. (2012) verificaram aumento significativo na capacidade antioxidante e na concentração da glutathiona reduzida (GSH) após 20, 40, 60 e 90 dias de consumo, em relação aos valores do período basal do estudo. Ainda, Boaventura et al. (2013) demonstraram que o consumo de erva-mate atenuou o estresse oxidativo em indivíduos diabéticos e pré-diabéticos, contribuindo, assim, para a prevenção das complicações relacionadas à doença.

#### 4 DIGESTÃO DA ERVA-MATE

Apesar de os compostos fenólicos estarem presentes em grandes quantidades no extrato aquoso de erva-mate, não significa que todo o seu teor será utilizado pelo organismo. Pouco se conhece sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate, sendo que estes compostos podem ter uma atividade intrínseca baixa, ser pouco absorvidos pelo intestino ou ainda ser rapidamente metabolizados e excretados (MANACH et al., 2004).

O metabolismo dos compostos fenólicos ocorre através de uma via comum, onde as agliconas são absorvidas pelo intestino. Contudo, a maioria dos compostos fenólicos está presente nos alimentos na forma esterificada, glicosilada ou polimerizada, as quais não podem ser absorvidas pelo organismo. Essas substâncias devem ser hidrolisadas por enzimas intestinais ou pela microbiota para serem absorvidas. Durante a absorção, os compostos fenólicos são conjugados no intestino delgado e, posteriormente, no fígado, sendo que este processo inclui principalmente a metilação, a sulfatação e a glucuronidação na porção distal do intestino delgado, podendo ser reabsorvidos posteriormente (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; MANACH et al., 2004).

Os compostos fenólicos circulantes são derivados conjugados extensivamente ligados à albumina, sendo capazes de penetrar nos tecidos, particularmente, naqueles onde eles serão metabolizados. Os



compostos fenólicos e seus derivados são eliminados principalmente na urina e na bile, sendo excretados através da via biliar para o duodeno. Neste local, eles estão sujeitos à ação de enzimas bacterianas, especialmente à glicuronidase (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000; MANACH et al., 2004).

A biodisponibilidade difere muito de um polifenol para outro, de modo que os polifenóis mais abundantes na dieta não são necessariamente os que conduzem a maiores concentrações de metabólitos ativos em tecidos-alvo. Os metabólitos presentes no sangue, resultado da atividade digestiva e hepática, normalmente diferem dos compostos intactos (MANACH et al., 2005). No caso dos ácidos clorogênicos, a absorção desses compostos ocorre principalmente no cólon, após a hidrólise por esterases microbianas (MANACH et al., 2005). Desta forma, deve-se considerar que a microbiota intestinal exerce um papel essencial no metabolismo dos compostos fenólicos, em especial dos ácidos clorogênicos, sendo que a maior parte dos ácidos clorogênicos ingeridos é encontrada no plasma e na urina na forma de metabólitos formados pela ação da microflora e posterior metabolização tecidual (OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

Oliveira (2013), ao avaliar a metabolização dos ácidos clorogênicos do chá mate em ratos, verificou que apesar de uma pequena parcela desses compostos ser efetivamente encaminhada para a corrente sanguínea, os ácidos cafeoilquínicos e dicafeoilquínicos provenientes da erva-mate são absorvidos pelas células do trato gastrointestinal, podendo atuar localmente nestes tecidos. Adicionalmente, Oliveira (2013) demonstrou a presença dos ácidos cafeoilquínicos intactos e seus metabólitos no estômago, intestino delgado, intestino grosso, fígado, rins, músculo, plasma e urina.

Apesar de não terem sido encontrados, na literatura, estudos que avaliaram a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate em seres humanos, alguns trabalhos investigaram a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos do café, que apresenta constituintes semelhantes aos encontrados na erva-mate. (MONTEIRO et al., 2007; DUARTE; FARAH, 2011). Monteiro et al. (2007) ao investigarem a biodisponibilidade dos ácidos clorogênicos após o consumo agudo de café, constataram a presença de seis ácidos clorogênicos intactos no plasma humano, sendo eles o ácido 3-cafeoilquínico, o ácido 4-cafeoilquínico, 5-cafeoilquínico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, o ácido 3,4-dicafeoilquínico e o ácido 4,5-dicafeoilquínico. Os autores também observaram que a urina não parece ser uma via de excreção dos ácidos clorogênicos intactos. Farah et al.

(2008) também notaram que após o consumo agudo de café verde ocorreu a absorção dos ácidos clorogênicos pelo organismo humano. Esses autores verificaram que os principais ácidos clorogênicos encontrados nas amostras de café verde são altamente biodisponíveis em seres humanos, fato que pode facilitar a atuação antioxidante destes constituintes. De fato, Duarte e Farah (2011) reportaram que, após o consumo agudo de café por seres humanos, a absorção média dos ácidos clorogênicos e metabólicos no trato digestório é de, aproximadamente, 68%.

Embora a biodisponibilidade da erva-mate no plasma e tecidos ainda não esteja esclarecida na literatura, supõe-se que a concentração dos compostos bioativos no extrato da planta pode alterar após a digestão gastrointestinal, o primeiro passo do metabolismo, para exercer seus efeitos biológicos *in vivo*, inclusive a atividade antioxidante. Neste sentido, metodologias *in vitro* que simulam os processos digestivos do trato gastrointestinal têm sido utilizadas por serem consideradas simples e rápidas para avaliar a biodisponibilidade e a atividade antioxidante de compostos bioativos ou extratos vegetais (WOLFE; LIU, 2007; LIU; GLAHN; LIU, 2004; SIRACUSA et al., 2011).

## 5 CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS DA ERVA-MATE

Levando em consideração o elevado teor de compostos bioativos presentes na erva-mate e sua associação positiva com a atividade antioxidante, foi usada em estudos a tecnologia de separação por membranas, a fim de concentrar compostos de interesse do extrato aquoso de erva-mate (MURAKAMI et al., 2011; PRUDÊNCIO et al., 2012). Esses autores aplicaram a nanofiltração com o intuito de concentrar os compostos fenólicos das folhas e resíduos de erva-mate respectivamente. Em ambos os estudos, foi verificado aumento significativo do teor de compostos fenólicos totais dos extratos após a aplicação desta tecnologia de concentração. Adicionalmente, Murakami (2010) e Prudêncio et al. (2012) constataram aumento significativo na atividade antioxidante dos extratos aquosos de folhas e resíduos de erva-mate, medida através do sequestro do radical DPPH.

A nanofiltração tem sido amplamente utilizada com a finalidade de manter os compostos termoinstáveis, considerando que utiliza baixas temperaturas e mínimo consumo energético. Do ponto de vista nutricional, essa tecnologia se mostrou efetiva para concentrar compostos bioativos da erva-mate, pois, em geral, a concentração de

extratos naturais é tradicionalmente realizada com a aplicação de altas temperaturas por um longo período de tempo, promovendo alterações nutricionais significativas no produto, principalmente quando se trata de compostos termoinstáveis como os compostos fenólicos (NAKAGAWA; MAEBASHI; MAEDA, 2010).

Contudo, embora a nanofiltração tenha sido considerada eficaz para concentrar os compostos fenólicos da erva-mate, esta tecnologia apresenta constante necessidade de manutenção devido ao *fouling* da membrana (AIDER; HALLEUX, 2009). Desta forma, torna-se interessante avaliar outras tecnologias de concentração, a fim de verificar a aplicabilidade e a eficácia no extrato aquoso de erva-mate. Neste contexto, ressalta-se a crioc Concentração, a qual é considerada promissora para a concentração de bioingredientes em produtos alimentares naturais (AIDER; DE HALLEUX, 2009).

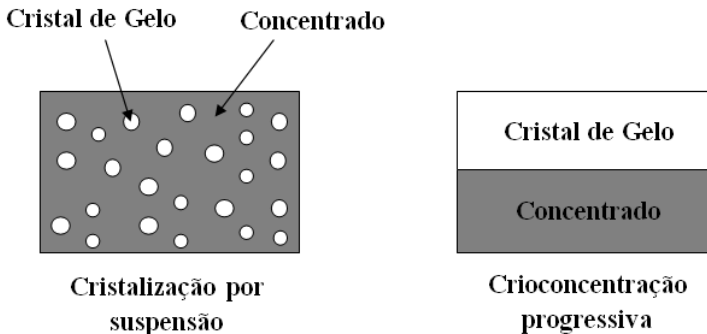
## 5.1 Crioc Concentração

A crioc Concentração é uma operação que promove a concentração de produtos alimentares líquidos, por meio de congelamento e da subsequente separação de uma parte da água congelada, a partir do produto líquido (BELÉN et al., 2012). Devido às baixas temperaturas empregadas no processo, a crioc Concentração é uma tecnologia alternativa às convencionais utilizadas, atualmente, pela indústria de alimentos, as quais empregam temperaturas maiores que a do ambiente, como a evaporação (HERNÁNDEZ et al., 2009), favorecendo a perda de componentes termolábeis presentes nos alimentos, tais como os compostos fenólicos (AIDER; DE HALLEUX, 2009).

De acordo com Aider e Halleux (2009), há diferentes métodos de aplicação da crioc Concentração. O método de cristalização por suspensão é a forma de crioc Concentração que apresenta o sistema mais complexo. Este sistema é composto por trocadores de calor de paredes raspadas para a geração dos cristais de gelo; tubo de recristalização para o crescimento dos cristais; torre de lavagem para a separação dos cristais de gelo. O líquido a ser concentrado é bombeado do tanque de alimentação para o trocador de calor de paredes raspadas, onde pequenos cristais são formados instantaneamente. Os cristais menores são bombeados para o recristalizador, onde são misturados com os cristais maiores. Após essa etapa, os cristais e o concentrado são transportados à coluna de lavagem, ocorrendo o derretimento dos cristais de gelo e obtenção do concentrado final (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Outro método de aplicação é a crioc Concentração

progressiva, a qual promove a formação de um único grande cristal de gelo ao invés de vários cristais menores (Figura 4). Esse sistema é composto de um compartimento cilíndrico, um banho de resfriamento e um sistema de condução da amostra, sendo que o cristal é formado na superfície de resfriamento do reservatório de cristalização (MIYAWAKI et al., 2005; AIDER; DE HALLEUX, 2009).

Figura 4 – Métodos de cristalização por suspensão e crioc concentração progressiva.



Fonte: Adaptado de Miyawaki et al. (2005).

A crioc concentração eutética é outra forma de aplicação da crioc concentração, sendo que este método é baseado no princípio da separação de sais inorgânicos e suas soluções aquosas, onde ocorre simultaneamente a cristalização dos sais e do gelo. Este processo é realizado pelo resfriamento da solução perto ou abaixo da temperatura eutética, considerando que o ponto eutético é quando todos os constituintes cristalizam, simultaneamente, à temperatura de fusão da solução líquida (HIMAWAN et al., 2002; AIDER; DE HALLEUX, 2009).

A crioc concentração em blocos, de forma parcial ou completa, também é uma forma de se empregar esta tecnologia. O princípio da crioc concentração em blocos, de forma parcial, consiste na introdução de uma solução alimentar líquida em uma câmara de cristalização e no congelamento parcial do centro, através da introdução de um tubo com um agente refrigerante. Quanto à crioc concentração em blocos, de forma completa, o princípio deste método é baseado no congelamento total de uma solução, seguido por um procedimento de descongelamento parcial,

sob a separação gravitacional simples (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2009).

A crioconcentração já foi aplicada, efetivamente, em diversos alimentos líquidos. Aider, De Halleux e Akbache (2007) verificaram que a aplicação da crioconcentração no soro do leite preservou a composição nutricional do produto, sendo possível obter um produto final com, aproximadamente, 35% de sólidos totais. Ao aplicar a crioconcentração nos sucos de cereja e damasco, Aider e De Halleux (2008) observaram aumento significativo no teor de ácido ascórbico e compostos aromáticos. Hernández et al. (2009) também obtiveram resultados promissores ao aplicar a crioconcentração nos sucos de maçã e pera, sendo observado aumento nos teores de sólidos solúveis de ambas as amostras. Resultados semelhantes em relação ao teor de sólidos solúveis também foram encontrados ao aplicar a crioconcentração no suco de laranja, no mosto de uvas brancas, no soro do queijo e na água residual da produção de tofu (HERNÁNDEZ et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2010; SÁNCHEZ et al., 2011; BELÉN et al., 2012). Além disto, Moreno et al. (2014) verificaram que a crioconcentração é uma técnica efetiva para preservar as propriedades funcionais de alimentos como o café, pois proporcionou aumento dos teores dos compostos bioativos, com concomitante aumento da atividade antioxidante *in vitro* do extrato.

## REFERÊNCIAS

- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maple sap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 65-72, 2008.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT- Food Science and Technology**, v. 45, n.2, p. 299-304, 2012.
- BASTOS, D. H. M. et al. Yerba maté: pharmacological properties, research and biotechnology. **Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology**, v. 1, p. 37-46, 2007.
- BELÉN, F. et al. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 364-373, 2012.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, 1057-1064, 2013.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.
- BRASIL, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura, 2012. In: banco de dados agregados,

sistema IBGE de recuperação automática SIDRA. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br>>. Acesso em: 29 de setembro de 2014.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

DA SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

DE MEJIA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

DUARTE, G. S.; FARAH, A. Effect of simultaneous consumption of milk and coffee on chlorogenic acids' bioavailability in humans. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 14, p. 7925-7931, 2011.

FANG, Y. Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, p. 872-879, 2002.

FARAH, A. et al. Chlorogenic acids from green coffee extract are highly bioavailable in humans. **Journal of Nutrition**, v. 138, n. 12, p. 2309-2315, 2008.

FERREIRA, F. et al. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by the *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. saponins. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 79-81, 1997.

FERNANDES, E. S. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: *In vitro* and *in vivo* studies. **Nutrition**, v. 28, p.1157-1164, 2012.

GNOATTO, S. C. B.; SCHENKEL, E. P.; BASSANI, V. L. HPLC method to assay total saponins in *Ilex paraguariensis* aqueous extract. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 723-726, 2005.

GUGLIUCCI A. Antioxidant effects of *Ilex paraguariensis*: induction of decreased oxidability of human LDL *in vivo*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, p. 224-338, 1996.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry**, v. 41, n. 12, p. 1819-1828, 1995.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HERNÁNDEZ, E. et al. Concentration of apple and pear juices in a multi-plate freeze concentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 10, n. 3, p. 348-355, 2009.

HERNÁNDEZ, E. et al. Freeze concentration of must in a pilot plant falling film cryoconcentrator. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 130-136, 2010.

HIMAWAN, C. et al. Dynamic modeling and simulation of eutectic freeze crystallization. **Journal of Crystal Growth**, v. 237-239, n. 1-4 III, p. 2257-2263, 2002.

ISOLABELLA, S. et al. Study of the bioactive compounds variation during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 695-699, 2010.

JONES, D. P. Redefining oxidative stress. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 8, p. 1865-1879, 2006.



LIU, C. S.; GLAHN, R. P.; LIU, R. H. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4330-4337, 2004.

MACEDO, J. A. et al. Increasing the antioxidant power of tea extracts by biotransformation of polyphenols. **Food Chemistry**, v. 126, p. 491-497, 2011.

MANACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.

MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MATSUMOTO, R. L. T. et al. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1775-1780, 2009.

MEINHART, A. D. et al. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2188-2193, 2010.

MENINI, T. et al. Protective action of *Ilex paraguariensis* extract against free radical inactivation of paraoxonase-1 in high-density lipoprotein. **Planta Medica**, v. 73, p. 1141-1147, 2007.

MIYAWAKI, O. et al. Tubular ice system for scale-up of progressive freeze-concentration. **Journal of Food Engineering**, v. 69, p. 107-113, 2005.

MONTEIRO, M. et al. Chlorogenic acid compounds from coffee are differentially absorbed and metabolized in humans. **Journal of Nutrition**, v. 137, p.2196-2201, 2007.

MORENO, F. L. et al. Block freeze-concentration of coffee extract: Effect of freezing and thawing stages on solute recovery and bioactive compounds. **Journal of Food Engineering**, v. 120, p. 158-166, 2014.

MURAKAMI, A.N.N. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

NAKAGAWA, K.; MAEBASHI, S.; MAEDA, K. Freeze-thawing as a path to concentrate aqueous solution. **Separation and Purification Technology**, v. 73, n. 3, p. 403-408, 2010.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de Ácidos. **Química Nova**, v. 34, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, D.M. **Estudo da biodisponibilidade de compostos fenólicos do chá mate (*Ilex paraguariensis*)**. 141 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Programa de Pós Graduação em Nutrição e Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2013.

PERES et al. HPLC-DAD-ESI/MS identification and quantification of phenolic compounds in *Ilex paraguariensis* beverages and on-line evaluation of individual antioxidant activity. **Molecules**, v. 18, p. 3859-3871, 2013.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical Interventions in Aging**, v. 2, n. 2, p. 219-236, 2007.

SÁNCHEZ, J. et al. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644-651, 2010.

SÁNCHEZ, J. et al. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: Process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p. 147–155, 2011.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 2073-2085, 2000.

SIES, H. Oxidative stress: Oxidants and antioxidants. **Experimental Physiology**, v. 82, n. 2, p. 291-295, 1997.

SILVA, R. D. et al. The effect of aqueous extract of gross and commercial yerba mate (*Ilex paraguariensis*) on intra-abdominal and epididymal fat and glucose levels in male wistar rats. **Fitoterapia**, v. 82, n. 6, p. 818-826, 2011

SIRACUSA, L. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12453-12459, 2011.

TURNER, S et al. Evaluation of the antioxidant activity and polyphenols content of *Ilex paraguariensis* (mate) during industrialization. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, p. 23-30, 2011.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907, 2007.

YANG, J.; LIU, R. H. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2013.

ZIELINSKI, A. A. F. et al. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different brazilian teas using multivariate statistical techniques. **Food Research International**, v. 60, p. 246-254, 2014.

## **CAPÍTULO 2 – Efeito da crioc concentração no teor de compostos bioativos e na atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**

Este estudo foi publicado na forma de artigo original no periódico *Food Research International* (ISSN 0963-9969), v.53, 686-692, 2013 (ANEXO A). Resultados parciais deste capítulo também foram apresentados na forma de pôster no 16º IUFoST, em Foz do Iguaçu-PR em 2012 (ANEXO B). Solicitou-se o depósito de patente do processo de crioc concentração do extrato aquoso de erva-mate, o qual ainda está em análise (ANEXO C).

### **RESUMO**

Objetivou-se, neste estudo, a verificação dos efeitos da crioc concentração do extrato aquoso de folhas de erva-mate, em relação ao teor de compostos bioativos e à atividade antioxidante *in vitro*. Cinco estágios de crioc concentração foram avaliados, sendo obtidas as frações de fluido concentrado e gelo de cada um dos estágios. Quanto ao teor de sólidos totais, o fator de concentração aumentou oito vezes ao final do processo. Os fluidos concentrados de todos os estágios da crioc concentração apresentaram maiores teores de compostos fenólicos quando comparados ao extrato inicial. Os compostos fenólicos isolados como ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido gálico, aumentaram significativamente após todos os estágios da crioc concentração. O teor das metilxantinas, cafeína e teobromina, também aumentou significativamente com a aplicação da crioc concentração. A atividade antioxidante do concentrado obtido em cada estágio, mensurada pelos métodos de FRAP e do sequestro do radical DPPH, foi significativamente maior quando comparada à do extrato inicial. Além disto, ambos os parâmetros de avaliação da atividade antioxidante foram significativamente correlacionados com os teores de compostos fenólicos e metilxantinas do extrato aquoso de erva-mate. A crioc concentração se mostrou uma técnica efetiva para aumentar os teores dos compostos bioativos e melhorar a atividade antioxidante do extrato aquoso de folhas de erva-mate.

**Palavras-chave:** Crioc concentração. *Ilex paraguariensis*. Compostos fenólicos. Metilxantinas. Potencial antioxidante.

## 1 INTRODUÇÃO

*Ilex paraguariensis* A. St. Hil., também conhecida como erva-mate, é uma planta importante da região subtropical da América do Sul. A infusão das folhas de erva-mate é amplamente consumida por um grande número de pessoas nos países sul-americanos (DE MEJIA et al., 2010; BRACESCO et al., 2011). Algumas das propriedades farmacológicas, atribuídas à erva-mate, têm sido relacionadas ao seu alto teor de compostos fenólicos, particularmente os ácidos clorogênicos (HECK; DE MEJIA, 2007; DE MORAIS et al., 2009). A significativa atividade antioxidante do chá mate é relacionada principalmente ao elevado teor de polifenóis presente no extrato de erva-mate (FILIP et al., 2000; HECK; DE MEJIA, 2007; BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007). De fato, o potencial antioxidante do extrato aquoso de erva-mate foi relatado, a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; DA SILVA et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012).

Considerando o alto teor de compostos fenólicos presentes na erva-mate e sua associação positiva com a atividade antioxidante, Murakami et al. (2011) e Prudêncio et al. (2012) mostraram que é possível e vantajoso concentrar os compostos fenólicos de folhas e casca de erva-mate a partir da nanofiltração. A tecnologia de membranas, tais como a nanofiltração, torna possível reter os compostos fenólicos devido ao tamanho dos poros da nanomembrana ser menor do que a sua massa molar. Embora tenha sido demonstrado que esta tecnologia foi efetiva para concentrar os compostos fenólicos da erva-mate, ela pode ser afetada pelo *fouling*. Este fenômeno diminui a eficiência do processo de separação e requer manutenção frequente da membrana (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007).

Para um avanço de longa duração nas indústrias de alimentos e/ou farmacêuticas, torna-se importante utilizar tecnologias de baixo custo, eficazes, que não agridam o meio ambiente e que possibilitem a preservação, não apenas do valor nutritivo dos produtos processados, mas também das atividades biológicas dos seus constituintes fitoquímicos (KLIMCZAK et al., 2007; AIDER; DE HALLEUX; MELNIKOVA, 2009). Neste contexto, a tecnologia de crioc concentração é considerada promissora para a concentração de bioingredientes em produtos alimentares naturais (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Esta tecnologia promove a concentração de produtos alimentares líquidos, por meio de congelamento e da subsequente separação de uma parte da água congelada do produto (BELÉN et al., 2012). Do ponto de vista da

indústria alimentar, a crioc concentração é uma tecnologia muito interessante, devido à sua capacidade de manter a qualidade nutricional de alimentos líquidos, por causa da utilização de baixas temperaturas. Este processo minimiza a perda de componentes termolábeis, resultando em um produto final com qualidade dificilmente obtida pelos processos convencionais de concentração, atualmente, utilizados na indústria de alimentos, tais como a evaporação (AIDER; DE HALLEUX, 2009; SÁNCHEZ et al., 2010).

Considerando os aspectos positivos da crioc concentração e os benefícios potenciais dos constituintes da erva-mate, o propósito deste estudo foi o de aplicar esta tecnologia no extrato aquoso de folhas de erva-mate e avaliar seus efeitos, referente aos compostos bioativos e à atividade antioxidante *in vitro*.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) foram colhidas em Catanduvas/SC durante o período de safra de 2011. As folhas higienizadas e branqueadas foram secas em estufa (FABBE, 171, São Paulo, Brasil) durante 24 h a 40 °C e moídas em moinho de facas (Marconi, MA-580, Piracicaba, Brasil) até atingir um tamanho de partícula menor do que 3,50 mm. As amostras foram embaladas em sacos de polietileno fechados a vácuo e armazenadas a - 18 °C até a preparação do extrato.

### 2.2 Preparação do extrato aquoso de erva-mate

O extrato aquoso de folhas de erva-mate foi preparado com 30 g de folhas suspensas em 1 L de água destilada, de acordo com o protocolo descrito por Murakami et al. (2011). Após 3 min a 90 °C, o extrato de erva-mate foi filtrado duas vezes com papel filtro de 12,5 cm de diâmetro e 25 mm de tamanho de poro, utilizando-se uma bomba a vácuo (Primatec, 131, Itu, Brasil). Finalmente, o volume do extrato foi completado para 1 L com água destilada.

### 2.3 Aplicação do protocolo de crioc concentração

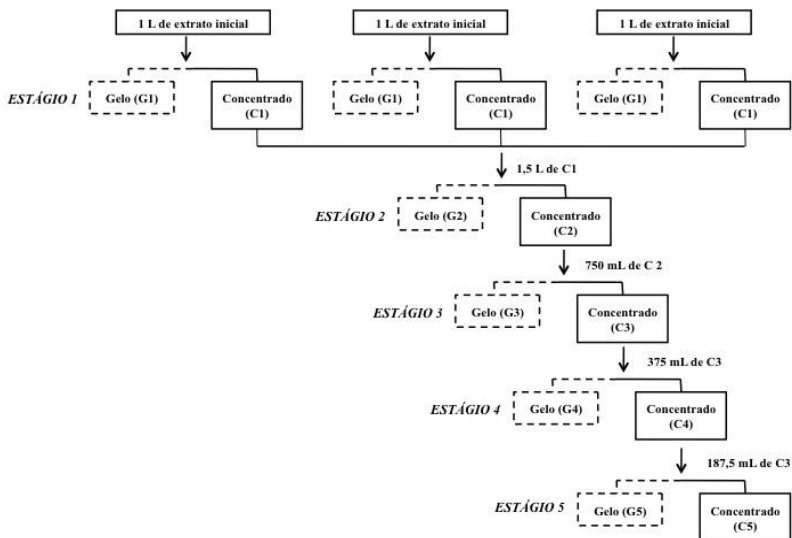
A tecnologia de crioc concentração por blocos (AIDER; DE HALLEUX, 2009) foi empregada no extrato aquoso de erva-mate. O

princípio deste método é baseado no congelamento total de uma solução, seguido por um procedimento de descongelamento parcial, sob a separação gravitacional simples. Este método torna possível obter duas frações: o fluido concentrado (C) e o gelo (G) (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007).

Um esquema do procedimento de crioconcentração aplicado pode ser observado na Figura 5. A crioconcentração foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Aider e Ounis (2012) com algumas modificações. Um volume inicial de 3 L de extrato aquoso de folhas de erva-mate foi dividido em três lotes de 1 L, os quais foram congelados a  $-20 \pm 2$  °C. O processo de congelamento foi realizado em um freezer convencional, através de congelamento indireto. Uma vez que a solução inicial estava congelada, descongelou-se 50% do volume inicial à temperatura ambiente ( $20 \pm 2$  °C). O líquido descongelado constituiu o concentrado do primeiro estágio de crioconcentração (C1). Este concentrado obtido na primeira etapa foi congelado a  $-20 \pm 2$  °C e utilizado como solução de alimentação na segunda fase da crioconcentração. No final da segunda fase da crioconcentração, 50% da solução congelada foi descongelada, recolhida e congelada novamente. Este procedimento foi repetido no terceiro, quarto e quinto estágios do processo de crioconcentração. Cada concentrado obtido nas distintas etapas da crioconcentração foi congelado a  $-20 \pm 2$  °C e utilizado como solução de alimentação da fase seguinte. O gelo remanescente e uma alíquota do concentrado dos cinco estágios do processo foram armazenados a  $-20 \pm 2$  °C para posteriores análises químicas.



Figura 5 – Esquema do procedimento de crioconcentração aplicado.



## 2.4. Determinação dos sólidos totais

O teor de sólidos totais das amostras foi determinado por medição da perda de peso após secagem em estufa a 80 °C e expresso como teor de sólidos totais/massa total (g/100g) (AOAC, 2005). Todas as análises dos concentrados e dos gelos foram realizadas em triplicata.

## 2.5 Avaliação do processo de crioconcentração

O fator de concentração de cada estágio de crioconcentração foi calculado de acordo com a metodologia proposta por Aider e Ounis (2012), em função do aumento da concentração da solução em relação à quantidade de teor de sólidos totais do extrato inicial de erva-mate. Obteve-se o fator de concentração (%) a partir da Equação 1:

$$\text{Fator de concentração} = \frac{S T_n}{S T_0} \times 100 \quad (1)$$

Em que  $ST_n$  é o teor de sólidos totais (g) do concentrado de cada etapa de crioconcentração e  $ST_0$  é o teor de sólidos totais do extrato aquoso inicial de folhas de erva-mate.

A eficiência do processo de crioconcentração (BELÉN et al., 2012) foi determinada com base no teor de compostos fenólicos totais (CFT). A eficiência do processo é referida como o aumento de CFT no concentrado em relação ao teor de CFT remanescente no gelo de cada etapa da crioconcentração. A eficiência do processo foi calculada a partir da Equação 2:

$$\text{Eficiência} = \frac{CFTC_n - CFTG_n}{CFTG_n} \times 100 \quad (2)$$

Sendo que  $CFTC_n$  é o teor de CFT (mg) do concentrado em uma determinada etapa da crioconcentração e  $CFTG_n$  é o teor de CFT (mg) no gelo na mesma etapa da crioconcentração.

## 2.6 Determinação do teor dos compostos bioativos

### 2.6.1 Compostos fenólicos

O teor de CFT das amostras foi determinado de acordo com o método de Folin-Ciocalteu descrito por Singleton, Joseph e Rossi (1965). Em resumo, 1 mL da amostra, 4,5 mL de água destilada e 0,5 mL de reagente Folin-Ciocalteu foram misturados e deixados em repouso durante 5 minutos. Subsequentemente, 4 mL de solução  $Na_2CO_3$  (7,5 g/100 mL) foi adicionada à mistura e então deixada em repouso durante 1 hora. A absorbância das amostras foi medida a 765 nm em espectrofotômetro (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). O ácido 5-cafeoilquínico foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em mg de equivalente de ácido 5-cafeoilquínico por mL de extrato aquoso de folhas de erva-mate.

Adicionalmente, os compostos fenólicos isolados foram caracterizados por CLAE, a partir da injeção de 10  $\mu$ L das amostras em cromatógrafo Shimadzu LC-20AT (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (Supelco C18, 5  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm) termostatizada a 40 °C e detector UV-visível DAD (Shimadzu SPD-M20A,  $\lambda = 280$  e 320 nm), de acordo com método previamente descrito (STRASSMANN et al., 2008). A fase móvel utilizada foi composta de água:acetato de etila:n-butanol (350:1:10, v/v/v), com fluxo de 0,8

mL/min. Os compostos foram identificados e quantificados através da utilização de padrões externos.

### 2.6.2 Metilxantinas

O teor de metilxantinas (caféina e teobromina) das amostras foi determinado por CLAE, em cromatógrafo Shimadzu LC-20AT (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (Supelco C18, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 30 °C e detector UV-visível DAD (Shimadzu SPD- M20A,  $\lambda = 272$  nm), conforme o método previamente descrito (STRASSMANN et al., 2008). A fase móvel isocrática utilizada foi de acetonitrila:ácido fórmico 0,1% (15:85, v/v), com fluxo de 1,0 mL/min e injeção de 10  $\mu$ L de amostra. Os compostos foram identificados e quantificados através da utilização de padrões externos.

## 2.7 Determinação da atividade antioxidante

### 2.7.1 Potencial antioxidante redutor férrico (FRAP)

O potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) foi determinado nas amostras de acordo com o método proposto por Benzie e Strain (1996) com algumas modificações. Uma alíquota de 100  $\mu$ L das amostras foi adicionada a 100  $\mu$ L de  $\text{FeCl}_3$  (3 mmol/L em ácido cítrico 5 mmol/L), e os tubos foram incubados por 30 min em banho maria a 37 °C. Adicionou-se 1,8 mL de solução de 2,4,6-tri(2-pyridil)-s-triazina (TPTZ) 1 mmol/L em HCl 50 mmol/L, e os tubos foram homogeneizados. Após 10 minutos, a absorbância foi medida a 620 nm em espectrofotômetro (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão). O trolox foi utilizado como padrão e os resultados foram expressos em  $\mu$ mol de equivalente de trolox/mL.

### 2.7.2 Atividade do sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante das amostras, a partir do sequestro do radical DPPH foi determinada pelo método proposto por Brand-Williams, Cuvelier, e Berset (1995). Uma alíquota de 100  $\mu$ L das amostras foi misturada com 3,9 mL de uma solução de DPPH  $6 \times 10^{-5}$  mol/L em metanol. A mistura foi homogeneizada e a sua absorbância foi medida a 515 nm (Hitachi, U-1800, Tóquio, Japão) a cada 10 min até a estabilização. O metanol foi utilizado como branco. Os resultados foram

expressos em  $EC_{50}$  (mg amostra/g DPPH), calculados desde a concentração necessária para sequestrar 50% do radical DPPH inicial.

## 2.8 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  DP. A significância das diferenças entre as médias das amostras foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. A correlação linear, desde a análise de regressão foi realizada para verificar a relação entre atividade antioxidante e teor dos compostos bioativos. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando  $p < 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* STATISTICA versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa-OK, EUA).

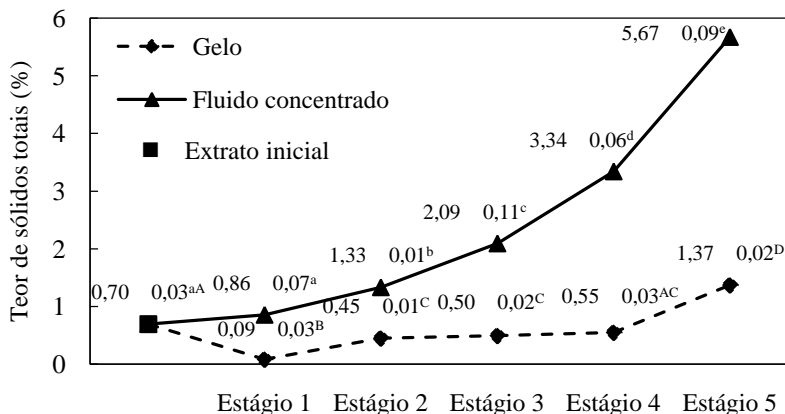
## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1 Teor de sólidos totais e fator de concentração

A evolução do teor de sólidos totais em função do estágio de criocongelação está apresentada na Figura 6. O teor de sólidos totais das frações concentradas aumentou ( $p < 0,05$ ) nos estágios 2 a 5 (C2, C3, C4 e C5) quando comparado ao extrato inicial. O fator de concentração aumentou significativamente em todos os estágios da criocongelação em comparação com o extrato inicial, obtendo-se valores de  $122,83 \pm 11,83\%$  na primeira etapa;  $191,57 \pm 0,40\%$  na segunda;  $300,41 \pm 16,50\%$  na terceira;  $479,59 \pm 9,91\%$  na quarta;  $813,76 \pm 13,73\%$  na quinta etapa.

O teor de sólidos totais do gelo diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) no primeiro (G1), segundo (G2) e terceiro (G3) estágios, quando comparado ao do extrato inicial. No quarto estágio (G4) não foi observada diferença significativa no teor de sólidos totais. No entanto, no quinto estágio (G5) se observou aumento significativo de sólidos totais em relação ao extrato inicial. De acordo com Aider e Ounis (2012), o aumento de sólidos totais no gelo pode ser explicado pelo fato de que os sólidos tendem a ficar retidos nas frações congeladas durante os estágios finais da criocongelação.

Figura 6 – Evolução do teor de sólidos totais dos concentrados e dos gelos em função dos estágios da crioconcentração.



Os dados estão expressos em média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ) do teor de sólidos totais dos concentrados e dos gelos de cada etapa do processo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o extrato inicial e o concentrado de cada estágio da crioconcentração. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o extrato inicial e o gelo de cada estágio da crioconcentração.

### 3.2 Eficiência da crioconcentração

O teor de compostos fenólicos totais (CFT) dos concentrados e dos gelos está apresentado na Tabela 1. A crioconcentração promoveu aumento ( $p < 0,05$ ) no CFT em função da evolução do processo. Foi observado que o CFT do G1 foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) do que as frações de gelo dos demais estágios. Contudo, o CFT do G5 aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparado às demais frações de gelo. Devido às ligações de hidrogênio, os compostos fenólicos são capazes de se ligar a um grande número de moléculas de água. Ao aumentar a concentração de compostos fenólicos na solução, a água intersticial se torna menos disponível para o congelamento. Como resultado, durante o processo de separação do concentrado e do gelo, a fase congelada permanece com alto teor de compostos fenólicos. Este fenômeno pode ser responsável pela diminuição da eficiência da crioconcentração (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007). A maior eficiência do processo foi observada no primeiro estágio da crioconcentração, com um valor de  $89,37 \pm 0,96\%$  na recuperação do CFT (Tabela 1). Nos estágios consecutivos, a eficiência do processo diminuiu significativamente ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao primeiro

estágio (Tabela 1). De acordo com Belén et al. (2012), a eficiência da crioconcentração, normalmente, declina em função da evolução dos estágios devido ao aumento da retenção de sólidos no gelo. Apesar disso, deve levar-se em consideração que a eficiência do último estágio da crioconcentração foi de  $73,93 \pm 1,62\%$ . Este resultado se torna relevante quando comparado a estudos com outros fluidos alimentares, que reportaram declínio na eficiência para valores entre 30 e 50% nos estágios finais da crioconcentração (AIDER; DE HALLEUX; AKBACHE, 2007; AIDER; DE HALLEUX, 2008).

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos totais (CFT) do extrato inicial, dos concentrados e dos gelos de cada estágio da crioconcentração e a eficiência do processo em relação ao teor de CFT.

		CFT (mg eq. ácido 5- cafeoilquínico /mL)	Eficiência (%)
Extrato inicial		$2,68 \pm 0,08^{aA}$	
Estágio 1	C1	$5,33 \pm 0,36^b$	$89,37 \pm 0,96^*$
	G1	$0,56 \pm 0,01^B$	
Estágio 2	C2	$7,60 \pm 0,14^c$	$75,99 \pm 0,93^\dagger$
	G2	$1,82 \pm 0,10^A$	
Estágio 3	C3	$10,34 \pm 0,14^d$	$77,67 \pm 1,43^\dagger$
	G3	$2,30 \pm 0,11^A$	
Estágio 4	C4	$17,14 \pm 0,69^e$	$78,06 \pm 0,98^\dagger$
	G4	$3,76 \pm 0,06^A$	
Estágio 5	C5	$22,45 \pm 0,50^f$	$73,93 \pm 1,62^\dagger$
	G5	$5,95 \pm 0,31^C$	

Os dados estão expressos em média  $\pm$  desvio padrão ( $n = 3$ ). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o extrato inicial e o concentrado de cada estágio da crioconcentração. Letras maiúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o extrato inicial e o gelo de cada estágio da crioconcentração. Símbolos diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na eficiência de cada estágio da crioconcentração. C, concentrado; G, gelo.

### 3.3 Concentração dos compostos bioativos

Os teores de compostos fenólicos isolados do extrato aquoso inicial de folhas de erva-mate e do concentrado de cada estágio da criocentração estão apresentados na Tabela 2. Na Figura 7 (A, B e C) é apresentado um cromatograma representativo dos compostos fenólicos identificados e quantificados nas amostras. Além de ser o principal composto da família dos ácidos clorogênicos quantificado nas amostras de erva-mate, observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) do teor de ácido 5-cafeoilquínico após cada estágio da criocentração. Bravo, Goya e Lecumberri (2007) também observaram que o ácido 5-cafeoilquínico é o principal derivado cafeoilquínico encontrado nas amostras de erva-mate. Quando comparado ao extrato inicial, o teor de ácido 5-cafeoilquínico aumentou 670% depois do último estágio da criocentração. O ácido 3,5-dicafeoilquínico principal isômero dicafeoil encontrado nas folhas de erva-mate (MARQUES; FARAH, 2009) aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) após todas as etapas da criocentração. Quando comparado ao extrato inicial, o teor do ácido 3,5-dicafeoilquínico alcançou um aumento de 676% após a aplicação do último estágio da criocentração. O ácido cafeico também apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após cada etapa do processo, aumentando 978% ao final da criocentração. O teor de ácido gálico, um importante componente hidroxibenzoico presente nas folhas de erva-mate, aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) após todos os estágios da criocentração. Em comparação ao extrato inicial, o teor de ácido gálico aumentou 684% ao final do processo. O teor de ácido 3,4-diidroxibenzoico também aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) depois de cada estágio da criocentração, aumentando de  $4,11 \pm 0,04$   $\mu\text{g/mL}$  para  $41,35 \pm 2,44$   $\mu\text{g/mL}$  ao final do processo. O ácido *p*-cumárico também apresentou aumento significativo ( $p < 0,05$ ) após todos os estágios da criocentração. O teor de ácido *p*-cumárico apresentou o maior aumento após a aplicação da criocentração, variando de  $0,60 \pm 0,01$   $\mu\text{g/mL}$  para  $7,54 \pm 0,89$   $\mu\text{g/mL}$ .

As metilxantinas, cafeína e teobromina, as quais são os principais alcalóides purínicos encontrados na erva-mate (MEINHART et al., 2010), também foram efetivamente concentradas após a aplicação da criocentração (Tabela 2). Na Figura 7 (D) é apresentado um cromatograma representativo das metilxantinas identificadas e quantificadas nas amostras de erva-mate. O teor de cafeína nas amostras analisadas foi maior do que o teor de teobromina. Resultados semelhantes foram observados por Pagliosa et al. (2010). Ao comparar

com o extrato inicial, o teor de cafeína apresentou um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 1.012% após o último estágio. A teobromina também aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) após cada etapa da crioconcentração, variando aproximadamente 11% ao final do processo. Observou-se variação linear positiva e significativa ( $p < 0,05$ ) no teor de todos os compostos fenólicos e metilxantinas analisados, depois da aplicação de cada estágio da crioconcentração. Apesar de a variação de aumento de alguns compostos não modificar ou declinar em alguns estágios, não foi observada redução no teor dos constituintes analisados. Todos os compostos analisados aumentaram, pelo menos, seis vezes após a aplicação do último estágio da crioconcentração, quando comparado aos teores do extrato inicial.

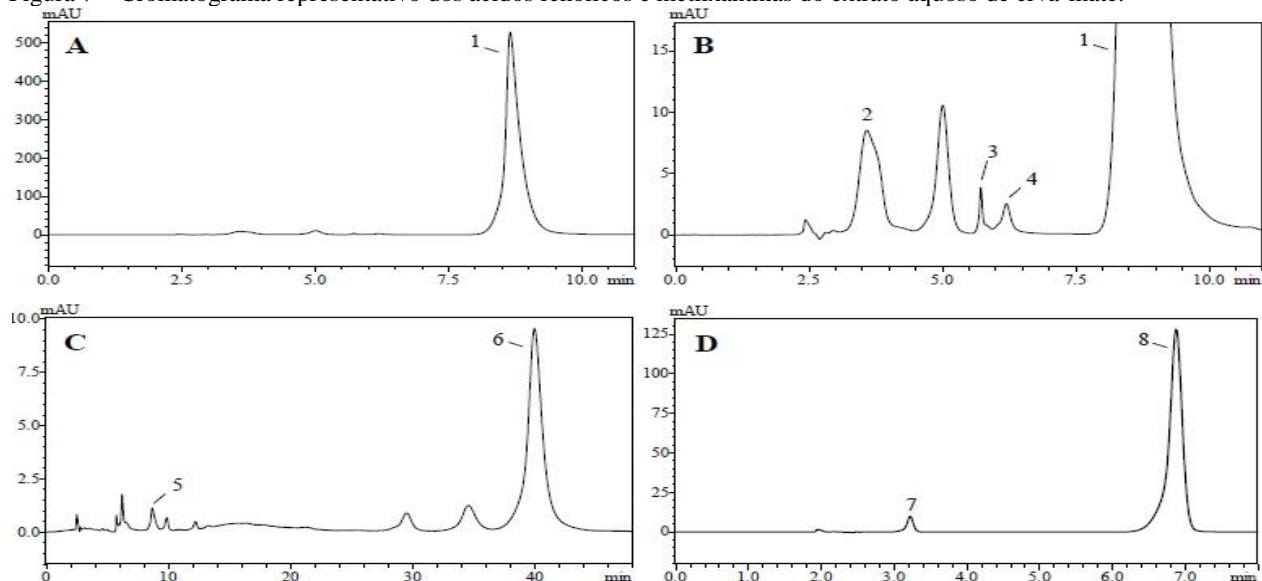


Tabela 2 – Compostos fenólicos, metilxantinas e atividade antioxidante do extrato inicial e dos fluidos concentrados de cada estágio da crioconcentração.

	Extrato inicial	C1	C2	C3	C4	C5
Ácido 5-cafeoilquínico (mg/mL)	1,7 ± 0,03 <sup>a</sup>	3,0 ± 0,24 <sup>b</sup>	4,1 ± 0,19 <sup>c</sup>	6,1 ± 0,32 <sup>d</sup>	9,0 ± 0,51 <sup>e</sup>	11,5 ± 0,85 <sup>f</sup>
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (µg/mL)	104,6 ± 1,13 <sup>a</sup>	173,6 ± 2,18 <sup>b</sup>	307,4 ± 2,73 <sup>c</sup>	482,5 ± 5,88 <sup>d</sup>	630,4 ± 14,30 <sup>e</sup>	707,4 ± 10,37 <sup>f</sup>
Ácido cafeico (µg/mL)	0,9 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,7 ± 0,06 <sup>b</sup>	5,4 ± 0,61 <sup>c</sup>	6,8 ± 0,51 <sup>d</sup>	8,4 ± 0,24 <sup>e</sup>	9,4 ± 0,68 <sup>f</sup>
Ácido 3,4-diidroxibenzoico (µg/mL)	4,1 ± 0,04 <sup>a</sup>	6,2 ± 0,06 <sup>b</sup>	9,5 ± 0,10 <sup>c</sup>	16,2 ± 0,55 <sup>d</sup>	25,0 ± 1,92 <sup>e</sup>	41,3 ± 2,44 <sup>f</sup>
Ácido p-cumárico (µg/mL)	0,6 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,9 ± 0,03 <sup>b</sup>	1,3 ± 0,03 <sup>c</sup>	2,9 ± 0,07 <sup>d</sup>	4,5 ± 0,24 <sup>e</sup>	7,5 ± 0,89 <sup>f</sup>
Ácido gálico (µg/mL)	25,5 ± 0,09 <sup>a</sup>	34,1 ± 0,14 <sup>b</sup>	55,7 ± 1,37 <sup>c</sup>	89,4 ± 1,24 <sup>d</sup>	124,0 ± 2,61 <sup>e</sup>	174,9 ± 1,49 <sup>f</sup>
Cafeína (mg/mL)	0,8 ± 0,02 <sup>a</sup>	1,3 ± 0,06 <sup>b</sup>	2,4 ± 0,03 <sup>c</sup>	4,3 ± 0,37 <sup>d</sup>	6,9 ± 0,31 <sup>e</sup>	9,0 ± 0,75 <sup>f</sup>
Teobromina (µg/mL)	42,0 ± 0,10 <sup>a</sup>	62,1 ± 1,24 <sup>b</sup>	104,5 ± 1,89 <sup>c</sup>	153,7 ± 3,55 <sup>d</sup>	269,7 ± 11,88 <sup>e</sup>	393,1 ± 9,49 <sup>f</sup>
DPPH (EC <sub>50</sub> ) (µg/mL)	127,7 ± 1,03 <sup>a</sup>	63,2 ± 2,36 <sup>b</sup>	45,7 ± 0,44 <sup>c</sup>	19,4 ± 0,67 <sup>d</sup>	8,7 ± 1,22 <sup>e</sup>	3,8 ± 0,04 <sup>f</sup>
FRAP (µmol/mL)	4,1 ± 0,01 <sup>a</sup>	8,2 ± 0,52 <sup>b</sup>	11,4 ± 0,09 <sup>c</sup>	14,9 ± 1,32 <sup>d</sup>	27,0 ± 1,32 <sup>e</sup>	37,9 ± 0,08 <sup>f</sup>

Os dados estão expressos em média ± desvio padrão (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre o extrato inicial e o concentrado de cada estágio da crioconcentração.

Figura 7 – Cromatograma representativo dos ácidos fenólicos e metilxantinas do extrato aquoso de erva-mate.



(A) compostos fenólicos com absorvância em 280 nm; (B) compostos fenólicos com absorvância em 280 (aumentado); (C) compostos fenólicos com absorvância em 325 nm; (D) metilxantinas com absorvância em 272 nm; (1) ácido 5-cafeoilquínico; (2) ácido gálico; (3) ácido p-cumárico; (4) 3,4-diidroxibenzoico; (5) ácido cafeico; (6) ácido 3,5-dicafeoilquínico; (7) teobromina; (8) cafeína.

### 3.4 Avaliação da atividade antioxidante

As atividades antioxidantes do extrato inicial de folhas de erva-mate e da fração concentrada derivada de cada estágio da criocentralização, determinadas por DPPH e FRAP, estão apresentadas na Tabela 2. A análise de DPPH foi descrita em EC<sub>50</sub>, indicando que baixos valores representam alto potencial antioxidante. Neste estudo, observou-se aumento significativo ( $p < 0,05$ ) no potencial antioxidante de todos os concentrados obtidos em cada um dos estágios da criocentralização (Tabela 2). Foi observado que apenas  $3,88 \pm 0,04$   $\mu\text{g/mL}$  do C5 são suficientes para sequestrar 50% do radical DPPH, enquanto que do extrato inicial são necessários  $127,70 \pm 1,03$   $\mu\text{g/mL}$  ( $p < 0,05$ ). Murakami (2010) e Prudêncio et al. (2012) também verificaram diferença significativa entre os valores de DPPH do extrato aquoso inicial de folhas e resíduos de erva-mate respectivamente, em relação ao extrato obtido após a concentração por membranas de nanofiltração.

O ensaio de FRAP foi adicionalmente conduzido para complementar a avaliação da atividade antioxidante dos extratos de erva-mate (Tabela 2). Os valores de FRAP aumentaram significativamente ( $p < 0,05$ ) nos concentrados obtidos em todas as etapas da criocentralização, variando de  $4,11 \pm 0,01$   $\mu\text{mol/mL}$  no extrato inicial para  $37,95 \pm 0,08$   $\mu\text{mol/mL}$  após a aplicação do último estágio. Diversos estudos já reportaram sobre a atividade antioxidante da erva-mate, relacionando tanto a inibição da oxidação da LDL, quanto o aumento das defesas antioxidantes *in vivo* proporcionadas pela planta (GUGLIUCCI; STAHL, 1995; DA SILVA et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012).

As correlações entre o teor de compostos fenólicos totais (CFT) e isolados com os valores de DPPH e FRAP, também, foram avaliadas. Foi encontrada correlação significativa ( $p < 0,05$ ) entre os valores de CFT e os parâmetros de FRAP e DPPH ( $r = 0,99$  e  $r = - 0,84$ , respectivamente). Resultados semelhantes foram encontrados por Bravo, Goya e Lecumberri (2007), que observaram que a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate está relacionada principalmente aos compostos fenólicos presentes na planta. Além disso, verificou-se que o teor de ácido 5-cafeoilquínico, o ácido clorogênico mais abundante presente na erva-mate, foi significativamente correlacionado com os valores de FRAP e DPPH ( $r = 0,99$  e  $r = - 0,86$ , respectivamente). Os ácidos clorogênicos são importantes constituintes produzidos pelas plantas em resposta às condições de estresse ambiental, sendo que suas atividades biológicas estão relacionadas, principalmente, ao seu elevado

potencial antioxidante (FARAH; DONANGELO; 2006). Vale destacar que, dentre os derivados cafeoil presentes na erva-mate, os ácidos clorogênicos são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da planta (ANESINI et al., 2012). Outros compostos cafeoil, tais como o ácido cafeico e o ácido 3,5-dicafeoilquínico, também apresentaram correlação significativa com os parâmetros de FRAP ( $r = 0,94$  e  $r = 0,94$ , respectivamente) e DPPH ( $r = -0,95$  e  $r = -0,95$ , respectivamente). Foi observado que o teor de ácido gálico apresentou correlação com os valores de FRAP e DPPH ( $r = 0,98$  e  $r = -0,82$ , respectivamente). Yen, Duh e Tsai (2002) notaram que elevadas concentrações de ácido gálico exibiram maior atividade antioxidante, a qual pode estar relacionada à sua capacidade de sequestrar os radicais hidroxil. Os ácidos 3,4-diidroxibenzoico e *p*-cumárico foram correlacionados apenas com os valores de FRAP ( $r = 0,99$  e  $r = 0,98$ , respectivamente). Em geral, a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate está fortemente correlacionada com todos os compostos fenólicos analisados. O substancial aumento do potencial antioxidante do extrato aquoso de erva-mate, ao longo da aplicação da criocôncênção, não foi associado à presença de um único constituinte. Parece que o aumento sinérgico do teor de compostos fenólicos, após cada estágio da criocôncênção, pode ter influenciado, positivamente, no aumento da capacidade antioxidante do extrato aquoso da erva-mate.

#### 4 CONCLUSÃO

Esse estudo mostrou que é possível aumentar o teor dos compostos bioativos e a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate por criocôncênção. Essa técnica se mostrou uma alternativa para preservar a qualidade nutricional do extrato aquoso de erva-mate. A criocôncênção promoveu aumento no fator de concentração em relação ao teor de sólidos totais do extrato. O fluido concentrado apresentou aumento no teor de compostos fenólicos totais em todos os estágios da criocôncênção. Embora a eficiência do processo tenha decrescido, devido à retenção dos compostos fenólicos na fração de gelo, ainda assim permaneceu em torno de 75% em todos os estágios. O ácido 5-cafeoilquínico, o ácido 3,5-dicafeoilquínico, o ácido cafeico, o ácido *p*-cumárico, o ácido gálico, a cafeína, a teobromina e a atividade antioxidante, medida por FRAP e DPPH, aumentaram significativamente após todos os estágios da criocôncênção. Além disso, os teores de compostos fenólicos e de metilxantinas foram

correlacionados com o potencial antioxidante do extrato aquoso da planta.

## REFERÊNCIAS

- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; AKBACHE, A. Whey cryoconcentration and impact on its composition. **Journal of Food Engineering**, v. 82, p. 92-102, 2007.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Passive and microwave-assisted thawing in maple sap cryoconcentration technology. **Journal of Food Engineering**, v. 85, p. 65-72, 2008.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D.; MELNIKOVA, I. Skim milk whey cryoconcentration and impact on the composition of the concentrated and ice fractions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 2, p. 80-88, 2009.
- AIDER, M.; OUNIS, W. B. Skim milk cryoconcentration as affected by the thawing mode: gravitational vs. microwave-assisted. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 195-202, 2012.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT- Food Science and Technology**, v. 45, n.2, p. 299-304, 2012.
- AOAC. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland, 2005.
- BELÉN, F. et al. One option for the management of wastewater from tofu production: Freeze concentration in a falling-film system. **Journal of Food Engineering**, v. 110, n. 3, p. 364-373, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative

stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.

BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

DA SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

DE MEJIA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23-36, 2006.

FILIP, R. et al. Antioxidant activity of *Ilex paraguariensis* and related species. **Nutrition Research**, v. 20, n. 10, p. 1437-1446, 2000.

GUGLIUCCI, A.; STAHL, A. J. C. Low-density-lipoprotein oxidation is inhibited by extracts of *Ilex paraguariensis*. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 35, n. 1, p. 47-56, 1995.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and

technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

KLIMCZAK, I. et al. Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 313-322, 2007.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MEINHART, A. D. et al. Methylxanthines and phenolics content extracted during the consumption of mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil) beverages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2188-2193, 2010.

MURAKAMI, A.N.N. **Concentração de compostos fenólicos de extrato aquoso de folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.)**. 2010, 156 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciências dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

PAGLIOSA, C. M. et al. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

SÁNCHEZ, J. et al. Progressive freeze concentration of orange juice in a pilot plant falling film. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 4, p. 644-651, 2010.



SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

STRASSMANN, B. B. et al. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8348-8353, 2008.

YEN, G.; DUH, P.; TSAI, H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chemistry**, v. 79, p. 307-313, 2002.



### **CAPÍTULO 3 – Avaliação da atividade antioxidante da infusão de erva-mate crioconcentrada (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) em indivíduos saudáveis**

Este estudo foi aceito para publicação na forma de artigo original no periódico *LWT - Food Science and Technology* (ISSN 0023-6438) (ANEXO D). Resultados parciais desse estudo também foram apresentados na forma de pôster no IFT 2013 *Annual Meeting and Food Expo*<sup>®</sup> em Chicago, IL/EUA (ANEXO E).

#### **RESUMO**

Esse estudo avaliou se o consumo agudo de infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) crioconcentrada (MC) promove melhora nos parâmetros antioxidantes e de peroxidação lipídica em indivíduos saudáveis, quando comparado ao consumo da infusão de erva-mate tradicional (MT). Nesse estudo *cross-over*, 31 voluntários em jejum ingeriram 200 mL de MT, MC ou água (controle). As amostras de sangue foram coletadas imediatamente antes e 1 h após a ingestão das bebidas para a avaliação das atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathione peroxidase (GPx) e das concentrações de glutathione reduzida (GSH), capacidade antioxidante do soro (FRAP) e peroxidação lipídica (LOOH). O consumo de MC promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) nas atividades das enzimas antioxidantes CAT (28,7%), SOD (21,3%), e GPx (9,6%) e, adicionalmente, aumentou os valores de GSH (8,8%) e FRAP (7,5%). A ingestão aguda de MT promoveu aumento significativo ( $p < 0,05$ ) apenas nos valores de GSH (8,3%). Os níveis séricos de LOOH não alteraram após a ingestão aguda de ambas as infusões de erva-mate ou do controle. O consumo agudo de MC por indivíduos saudáveis melhorou a defesa antioxidante no sangue, de forma mais eficiente do que a MT, não provocando efeitos pró-oxidantes.

**Palavras-chave:** Crioconcentração. *Ilex paraguariensis*. Compostos fenólicos. Estresse oxidativo. Seres humanos.

## 1 INTRODUÇÃO

Os danos celulares e teciduais induzidos pelo estresse oxidativo estão relacionados à etiologia de doenças crônicas. Em sistemas biológicos, a defesa antioxidante é constituída por agentes que impedem os efeitos nocivos dos radicais livres (VALKO et al., 2007). Os sistemas antioxidantes endógenos incluem a glutatona reduzida, as atividades das enzimas antioxidantes glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), dentre outros. No entanto, as defesas antioxidantes endógenas nem sempre são suficientes para neutralizar completamente as espécies reativas de oxigênio. Portanto, os antioxidantes derivados da alimentação, incluindo os compostos fenólicos, parecem ser particularmente importantes na proteção contra doenças crônicas, melhorando a capacidade antioxidante do organismo (YANG; LIU, 2013).

O extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) é uma bebida largamente consumida em vários países da América do Sul, como o Uruguai, Argentina, Brasil e Paraguai. A bebida é preparada por meio da infusão em água quente das folhas secas e moídas de erva-mate e é muito apreciada por seu gosto amargo e suas propriedades estimulantes (BRACESCO et al., 2011). O potencial antioxidante da infusão de erva-mate tem sido amplamente relatado em estudos *in vitro* e *in vivo* (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; DA SILVA et al., 2008; MATSUMOTO et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012; FERNANDES et al., 2012). A significativa atividade antioxidante da erva-mate é atribuída, principalmente, ao seu alto teor de compostos fenólicos, especialmente os ácidos clorogênicos (BRAVO et al., 2007; HECK; DE MEJIA, 2007; ANESINI et al., 2012).

Considerando o alto teor de compostos fenólicos presentes na erva-mate e sua associação positiva com a atividade antioxidante, alguns estudos foram realizados com o objetivo de aplicar tecnologias emergentes, a fim de aumentar a quantidade de compostos bioativos no extrato aquoso da planta (MURAKAMI et al., 2011; PRUDÊNCIO et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013; MURAKAMI et al., 2013). Dessa forma, foi verificado que a utilização da tecnologia de crioc concentração proporcionou aumento relevante no teor de compostos fenólicos e na atividade antioxidante *in vitro* do extrato de erva-mate (BOAVENTURA et al., 2013). De fato, a crioc concentração é capaz de aumentar a qualidade nutricional de alimentos líquidos e é considerada uma ferramenta promissora à concentração de compostos bioativos em vegetais (AIDER; DE HALLEUX, 2009). Contudo, apesar de já ter sido

demonstrado que o extrato aquoso de erva-mate crioconcentrado possui elevado teor de compostos fenólicos e significativa atividade antioxidante *in vitro*, torna-se ainda necessário avaliar se também proporciona aumento da atividade antioxidante *in vivo*, não induzindo efeitos pró-oxidantes. Diante do exposto, o objetivo nesse trabalho foi verificar se o consumo agudo da infusão de erva-mate crioconcentrada promove melhora nos parâmetros antioxidantes e/ou diminuição na peroxidação lipídica de indivíduos saudáveis, quando comparado ao consumo da infusão de erva-mate tradicional.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes químicos

Os reagentes glutatona reduzida (GSH), glutatona redutase, albumina, 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), ácido 5-5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) (DTBNB), solução tert-butil hidroperóxido, peróxido de hidrogênio,  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleotídeo 2-fosfato reduzido (NADH), butil hidroxitolueno (BHT), azida sódica e trifetilfosfina (TEPP) foram adquiridos da Sigma-Aldrich Ltda. (St. Louis-MO, EUA). Metanol, ácido sulfúrico, cianeto de potássio e sulfato de ferro II e amônio foram obtidos da Vetec (Duque de Caxias-RJ, Brasil). O cloreto férrico foi adquirido da Labsynth® (Diadema-SP, Brasil). Os kits de reagentes para determinação de parâmetros bioquímicos séricos foram obtidos da Labtest Diagnostics SA (Lagoa Santa-MG, Brasil).

### 2.2 Erva-mate e preparo das infusões

As folhas de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil foram colhidas em Catanduvas-SC, em junho de 2012. As amostras foram higienizadas, branqueadas, secas em estufa de ar circulante (FABBE, 171, São Paulo-SP, Brasil) durante 24 h a 40 °C e, posteriormente, moídas em moinho de facas (Marconi, MA-580, Piracicaba-SP, Brasil) até chegar a uma granulometria inferior a 3,50 mm. As amostras foram embaladas em sacos de polietileno fechados a vácuo e armazenadas a - 18 °C até o preparo das infusões.

A infusão tradicional de erva-mate (MT) foi preparada, utilizando-se 30 g de folhas moídas em 1 L de água destilada a 90 °C, de acordo com o protocolo descrito por Murakami et al. (2011). Após 3 minutos, a infusão foi filtrada duas vezes em papel filtro com 12,5 cm

de diâmetro e tamanho de poro de 25 µm, em bomba a vácuo (Primatec, 131, Itu-SP, Brasil). A infusão de erva-mate crioconcentrada (MC) foi obtida a partir da terceira etapa do processo de crioconcentração descrito anteriormente (BOAVENTURA et al., 2012). A identificação e quantificação dos compostos fenólicos foram previamente reportadas (BOAVENTURA et al., 2012).

### 2.3 Sujeitos e desenho do estudo

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (ANEXO F) e todos os participantes assinaram consentimento livre e esclarecido para participarem da pesquisa. Foram incluídos voluntários adultos, sem condição clínica de doença, que não possuíssem histórico de alcoolismo, que não faziam uso de cigarro, drogas, medicamentos e/ou suplementos de uso contínuo e que não apresentassem intolerância ou complicações gástricas decorrentes da ingestão da infusão de erva-mate ou de algum de seus componentes.

Trinta e seis homens e mulheres saudáveis, com índice de massa corporal (IMC) menor que 30 kg/m<sup>2</sup> e idade entre 20 e 44 anos foram elegíveis para iniciar o estudo. Cinco voluntários abandonaram o estudo por motivos pessoais. Portanto, trinta e um voluntários (2 homens e 29 mulheres) participaram, efetivamente, do estudo. Os voluntários foram orientados a manter a dieta e a atividade física habituais e a não ingerir qualquer suplemento dietético e/ou bebidas derivadas da erva-mate um mês antes e durante todo o período do estudo.

Para assegurar uma adequada avaliação da variação proporcionada pelo efeito agudo da ingestão de MT e MC nos parâmetros antioxidantes e de peroxidação lipídica e melhorar a homogeneidade das características basais, os participantes seguiram uma dieta pobre em antioxidantes por 48 horas antes do dia da intervenção, não ingerindo alimentos e/ou bebidas ricos em compostos fenólicos (frutas, legumes, sucos de frutas, chá, café, vinho ou chocolate) e álcool. Nesse período, foram aplicados registros dietéticos para monitorar o cumprimento da dieta com baixo teor de antioxidantes. Além disto, 24 horas antes do estudo, os participantes foram instruídos a não praticar qualquer exercício físico.

Neste estudo *cross-over*, cada indivíduo recebeu, aleatoriamente, três tratamentos (MT, MC, ou água), em três dias diferentes, com um período de *washout* de duas semanas entre cada tratamento. A ingestão de água foi considerada como tratamento controle (LEENEN et al.,

2008; VILLANO et al., 2010; VIEIRA et al., 2012.). Os participantes foram randomizados para um dos grupos de tratamento, a fim de receber MT, MC ou água (grupo controle). Os experimentos foram repetidos até que todos os participantes tivessem recebido todos os três tipos de tratamento. Após jejum de 12-14 h, eles receberam 200 mL de MT, MC ou controle. As amostras de sangue foram coletadas, imediatamente, antes e após 60 minutos da ingestão das bebidas. Esse protocolo de modelo de ingestão aguda foi escolhido, porque é uma ferramenta considerada confiável para avaliar a contribuição de bebidas ricas em antioxidantes nas defesas antioxidantes endógenas (PECORARI et al., 2010). Sugere-se que a avaliação do consumo agudo seja livre de interferências por diferentes variáveis em seres humanos, tais como o consumo alimentar, a atividade física e o gasto energético, o que torna possível identificar o efeito das bebidas testadas nos biomarcadores avaliados (PECORARI et al., 2010). Além disto, este protocolo está baseado na concentração fenólica plasmática máxima, observada após uma hora do consumo de bebidas ricas em compostos fenólicos (LEENEN et al., 2000; SUNG et al., 2000; VILLANO et al., 2010; VILLANO et al., 2012).

## **2.4 Análises bioquímicas**

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa com sistema a vácuo (Vacutainer, BD, São Paulo-SP, Brasil) em tubos com e sem ácido etilenodiaminotetracético (EDTA). Todos os tubos foram imediatamente centrifugados (1.000 x g, 15 minutos) para a obtenção do soro, e as alíquotas de sangue total foram separadas para determinar a GSH eritrócita e as enzimas antioxidantes. As amostras foram armazenadas a - 80 ° C até o momento das análises. Todos os ensaios bioquímicos foram realizados em período máximo de 7 dias após a coleta das amostras sanguíneas. Determinações adicionais de creatinina, ácido úrico e das atividades da alanina aminotransferase e da aspartato aminotransferase foram mensuradas com o objetivo de monitorar eventual toxicidade das infusões. Para medir esses parâmetros, foram utilizados kits comerciais em equipamento automatizado (Cobas Mira Plus, a Roche, Basel, Suíça), de acordo com as instruções do fabricante.

## **2.5 Atividade antioxidante sérica e eritrocitária**

A capacidade antioxidante sérica foi determinada a partir do potencial antioxidante redutor férrico (FRAP) de acordo com a técnica

descrita por Benzie e Strain (1996). Dez microlitros de soro foram misturados ao reagente de trabalho ( $\text{FeCl}_3$ , TPTZ e tampão acetato de sódio) e a mistura foi incubada por 15 min a 37 °C. A absorbância do produto colorido foi lida a 513 nm em espectrofotômetro (Bioplus BIO 2000, Barueri-SP, Brasil) e o trolox utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$  de equivalentes de trolox.

A glutationa reduzida (GSH), forma majoritária de tióis de baixo peso molecular, foi quantificada no sangue total de acordo com o método descrito por Beutler, Kelly e Duron (1963). Alíquotas de sangue-EDTA (600  $\mu\text{L}$ ) foram submetidas à precipitação com o ácido tricloroacético (TCA) a 20%. Após centrifugação (5.000 x g, 4 °C, 10 minutos), 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foi misturado com 50  $\mu\text{L}$  de ditionitrobenzóico (DTNB) e 800  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 0,2 M pH 8,0. A absorbância do ânion tiolato, formado após 3 minutos à temperatura ambiente, foi medida em 412 nm em espectrofotômetro semiautomatizado (Bioplus BIO 2000, Barueri-SP, Brasil) contra o branco da reação. A concentração de GSH sanguínea foi calculada utilizando-se GSH comercial como padrão. Os resultados foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

## 2.6 Atividade antioxidante enzimática

As atividades das enzimas antioxidantes SOD, CAT e GPx foram quantificadas nos eritrócitos. Alíquotas de sangue (1 mL) foram centrifugadas (700 x g, 4 °C, 10 minutos) e as hemácias separadas do plasma. Às hemácias foi adicionado igual volume de solução fisiológica, e os tubos foram homogeneizados e centrifugados (700 g, 4°C, 10 min). Este procedimento foi repetido por três vezes. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de eritrócitos foram misturados com 1 mL de solução hemolizante (sulfato de magnésio 4 nM e ácido acético 1 nM). Para a medida da atividade da SOD, alíquotas do hemolisado foram misturadas com solução de clorofórmio:etanol (3:5, v/v) e água deionizada, na proporção de 1:3:1 (v/v/v). Após centrifugação (700 x g, 4 °C, 3 minutos), 200  $\mu\text{L}$  do sobrenadante foram removidos e misturados com 600  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:etanol (3:5) e com 200  $\mu\text{L}$  de água deionizada. A mistura foi novamente centrifugada e o sobrenadante límpido foi usado para a medida da atividade da SOD (McCORD; FRIDOVICH, 1969).

A atividade da SOD foi determinada com base na inibição da reação do radical superóxido com adrenalina (BOVERIS et al., 1983). A oxidação da adrenalina leva à formação de produto colorido, o adenocromo, detectado espectrofotometricamente. A atividade da SOD



foi determinada, medindo-se a velocidade de formação do adenocromo a 480 nm, em meio de reação contendo glicina-NaOH e adrenalina. Uma unidade de enzima equivale à quantidade de enzima que inibe em 50% a oxidação da adrenalina por minuto e por miligrama de proteína. Os resultados foram expressos em Unidade SOD/mg de proteína.

A atividade da CAT foi quantificada a partir do monitoramento da decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 2 minutos a 240 nm (AEBI, 1984). O sistema de reação continha 955  $\mu\text{L}$  de tampão fosfato 50 mM pH 7,0, 35  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0,3 M e 10  $\mu\text{L}$  de amostra. Uma unidade de CAT equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 mol de substrato por minuto e por miligrama de proteína de eritrócitos. Os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981), que utiliza o peróxido de *tert*-butila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx e gerando GSSG, a qual é convertida em GSH pela glutationa redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH. A cinética da reação foi acompanhada em 340 nm e, para o cálculo da atividade, utilizou-se o coeficiente de absorvidade molar do NAPH a 340 nm,  $6,22 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Uma unidade de GPx equivale à quantidade de enzima que hidrolisa 1 mol de substrato por minuto por mg de proteína. Os resultados foram expressos em mU/mg de proteína.

As proteínas totais foram determinadas de acordo com o método de Bradford (1976), utilizando a albumina bovina como padrão. Aliquotas dos hemolisados (50  $\mu\text{L}$ ) foram adicionadas em 2 mL de *Coomassie blue* e mantidas por 5 minutos à temperatura ambiente e em local escuro. A leitura da absorbância foi realizada a 595 nm (Spectrum SP-2000, Xangai, China).

## 2.7 Peroxidação lipídica

Os hidroperóxidos lipídicos (LOOH) presentes no soro foram quantificados pelo método de oxidação do ferro com alaranjado de xilenol, conhecido como método FOX2 (em inglês, *Ferrous Oxidation in Xylenol Orange, version 2*), conforme descrito por Nourooz-Zadeh, Tajaddini-Sarmadi e Wolff (1994). O princípio do método é baseado na rápida oxidação do  $\text{Fe}^{+2}$  a  $\text{Fe}^{+3}$  em meio ácido, induzida pelos peróxidos lipídicos. O  $\text{Fe}^{+3}$ , na presença de alaranjado de xilenol, forma um complexo ( $\text{Fe}^{+3}$ -alaranjado de xilenol) que é quantificado em 560 nm (Spectrum SP-2000, Xangai, China). Aliquotas de 90  $\mu\text{L}$  de soro foram misturadas com 10  $\mu\text{L}$  de trifetilfosfina 20 mM (TEPP), para a redução

dos hidroperóxidos lipídicos ou com 10 µL de metanol. Os tubos foram agitados e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos, agitando-os a cada 10 minutos. Após este período, 900 µL de reagente de trabalho FOX2, contendo alaranjado de xilenol 1,0 mM e sulfato de ferro e amônio 2,5 mM, preparados em H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mM, e BHT 4,4 mM, foram adicionados aos tubos. Em seguida, os tubos foram agitados e mantidos em temperatura ambiente, no escuro, por 1 hora, com agitações subsequentes a cada 10 minutos. Após centrifugação (1.600 x g, 10 minutos), a absorbância do sobrenadante foi lida em 560 nm contra o branco de água deionizada. A concentração de LOOH foi calculada pela diferença entre as absorbâncias das amostras com metanol (hidroperóxidos totais) e com TPP (hidroperóxidos não lipídicos), utilizando-se o peróxido de hidrogênio como padrão. Os resultados foram expressos em µmol/L equivalentes de peróxidos de hidrogênio.

## 2.8 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EP). O teste de Shapiro-Wilk foi aplicado para verificar a normalidade dos dados. Devido ao fato de que o modelo de ingestão aguda de cada sujeito representa o seu próprio controle, o teste t de Student pareado foi realizado em cada grupo de tratamento, comparando os valores antes e depois da ingestão aguda de MT, MC ou água. O tamanho mínimo da amostra necessário para detectar uma diferença, estatisticamente, significativa foi calculado com base no poder igual a 0,8. Para detectar uma diferença de 10% nos parâmetros de FRAP e GSH, o tamanho da amostra foi estimado em 27 e 17 indivíduos, respectivamente, assumindo um desvio padrão das respostas de 70 mmol/L para FRAP e 110 mmol/L para GSH. A fim de detectar uma diferença de 0,03 U/mg de proteína da atividade da SOD, o tamanho da amostra necessário foi de 29 indivíduos, considerando um desvio padrão de 0,055 U/mg de proteína. Para detectar uma diferença de 10% nas atividades das enzimas CAT e GPx, estimou-se o tamanho da amostra em 31 indivíduos, com um desvio padrão das respostas de 0,071 e 5,7 mU/mg de proteína, respectivamente.

O teste de correlação de Pearson foi aplicado para verificar associações entre os biomarcadores antioxidantes e LOOH. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ . Realizou-se a análise estatística no *software* Statística versão 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA).

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Teor de compostos fenólicos nas infusões

Os teores dos compostos fenólicos de 200 mL de MC e MT estão demonstrados na Tabela 3. O teor de compostos fenólicos totais, expresso em equivalentes de ácido 5-cafeoilquínico, mostrou-se, significativamente, maior no MC em comparação ao teor do MT ( $p < 0,05$ ). Além disto, os teores de ácidos fenólicos isolados analisados foram significativamente maiores no MC ( $p < 0,05$ ) em relação ao MT. O teor de ácido 5-cafeoilquínico foi, aproximadamente, 3,6 vezes maior no MC em comparação ao MT. Baseado nesses resultados, a aplicação da tecnologia de crioconcentração promoveu importante aumento no teor dos compostos fenólicos, sem afetar a composição qualitativa da infusão de erva-mate.

Potenciais propriedades benéficas dos ácidos clorogênicos à saúde como antioxidante, hipoglicêmica, antiviral e hepatoprotetora foram previamente descritas em estudos *in vitro* e epidemiológicos (MARQUES; FARAH, 2009). As folhas de erva-mate apresentam elevado teor de ácidos clorogênicos quando comparadas a outras plantas medicinais como *Camellia sinensis* (MARQUES; FARAH, 2009). Anesini et al. (2012) reportaram que o elevado teor de ácidos clorogênicos, presente na infusão de erva-mate, é o principal responsável pelo potencial antioxidante da planta.

Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos em 200 mL de infusão de erva-mate tradicional (MT) e crioconcentrada (MC) ingeridas pelos voluntários do estudo.

	MT	MC
Compostos Fenólicos Totais (mg EAC)	536,00 ± 1,16	2.069,11 ± 20,91*
Ácido 5-cafeoilquínico (mg)	344,00 ± 3,57	1.238,00 ± 11,32*
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (mg)	20,93 ± 0,56	96,51 ± 2,68*
Ácido 3,4-diidroxibenzoico (mg)	0,82 ± 0,08	3,24 ± 0,35*
Ácido cafeico (mg)	0,19 ± 0,03	1,37 ± 0,11*
Ácido <i>p</i> -cumárico (mg)	0,12 ± 0,001	0,58 ± 0,09*
Ácido gálico (mg)	5,11 ± 0,26	17,89 ± 1,49*

Dados estão expressos em média ± erro padrão (n = 3). \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na mesma linha comparado aos valores de MT. EAC, equivalente de ácido 5-cafeoilquínico.

### 3.2 Potencial antioxidante das infusões

Até o momento não foram encontrados, na literatura, estudos que avaliassem os efeitos do consumo da infusão de erva-mate em diferentes concentrações de compostos fenólicos na atividade antioxidante, enzimática e não enzimática e na peroxidação lipídica de seres humanos, particularmente, utilizando infusão de erva-mate crioconcentrada.

Adicionalmente, o efeito da ingestão de água (controle) foi investigado para assegurar que não houve variações fisiológicas nos parâmetros analisados dos indivíduos do estudo, os quais pudessem interferir nos resultados significativos dos tratamentos com as infusões de erva-mate. De fato, nenhum dos parâmetros bioquímicos analisados apresentou alterações significativas após a ingestão do controle (Figura 8 A-F). Assim, qualquer variação significativa dos parâmetros analisados nos grupos de tratamento com as infusões de erva-mate (MC e MT) pode ser atribuída aos efeitos dos componentes presentes na planta, tais como os compostos fenólicos.

O consumo de MC aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) a capacidade antioxidante do soro, medida pelo método FRAP ( $500,6 \pm 13,2$  para  $538,1 \pm 12,1$   $\mu\text{mol/L}$ ; Figura 8 A) e os valores de GSH ( $915,0 \pm 20,3$  para  $995,3 \pm 28,1$   $\mu\text{mol/L}$ ; Figura 8 B) dos participantes do estudo, quando comparado aos valores basais. Concomitantemente, as atividades de todas as enzimas antioxidantes avaliadas aumentaram significativamente após o consumo agudo de MC (Figura 8 C-E;  $p < 0,05$ ), sendo que as atividades da GPx, da CAT e da SOD aumentaram 10%, 30% e 21% respectivamente.

Por outro lado, o consumo de MT promoveu aumento significativo apenas nos valores de GSH ( $917,30 \pm 19,08$  para  $994,04 \pm 20,60$ ; Figura 8 B). Nenhuma das infusões de erva-mate ou a água afetaram os valores séricos de LOOH (Figura 8 F). Análises de correlação demonstraram associação significativamente positiva ( $p < 0,05$ ) entre a atividade da enzima antioxidante GPx com os valores de GSH, CAT e SOD após o consumo de MC (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** B-D). Além disto, significativa associação negativa ( $p < 0,05$ ) foi encontrada entre os parâmetros de LOOH e FRAP (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A).

Os ácidos fenólicos são importantes compostos bioativos presentes na erva-mate. Estes compostos oferecem atividade antioxidativa como quelantes de metais e sequestradores de radicais livres, com especial impacto nos radicais peroxila e hidroxila, ânions superóxido e peroxinitrito (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Por

exemplo, os ácidos clorogênicos, presentes na erva-mate, podem doar átomos de hidrogênio de seu anel fenólico para os radicais livres, inibindo assim o processo de oxidação (ZANG et al., 2003). Por outro lado, os compostos fenólicos também podem atuar como pró-oxidantes (CAROCHO; FERREIRA, 2013). A presença de O<sub>2</sub> e metais de transição, como o ferro e o cobre, catalisa a ciclagem redox dos compostos fenólicos e pode conduzir à formação de espécies reativas e de radical fenoxil, causando danos ao DNA, lípidos e outras moléculas biológicas (GALATI; O'BRIEN, 2004).

Como reportado por Carochó e Ferreira (2013), os antioxidantes são benéficos e podem exibir um papel importante na homeostase, no entanto, eles podem também atuar como agentes pró-oxidantes. Nesse contexto, estudos devem ser realizados a fim de investigar sobre os mecanismos *in vivo* dos antioxidantes, particularmente em relação às concentrações ótimas de compostos bioativos, a fim de avançar sobre a utilização dos antioxidantes na prevenção e tratamento de doenças (CAROCHO; FERREIRA, 2013).

Considerando que o MC apresenta elevadas quantidades de compostos fenólicos (Tabela 1), torna-se necessário determinar ambos os parâmetros antioxidantes e pró-oxidantes para avaliar o possível mecanismo do consumo desta bebida. Adicionalmente, determinações de creatinina, ácido úrico, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase foram medidas a fim de assegurar que a dose aguda de MC ou MT não provocou efeitos tóxicos renais ou hepáticos nos voluntários do presente estudo (dados não mostrados).

Como demonstrado por de Moraes et al. (2009), diferentes tipos de erva-mate, como a tostada e a erva-mate verde, apresentam diferentes concentrações de compostos fenólicos. Considerando que a atividade antioxidante da erva-mate está positivamente relacionada com o teor de compostos fenólicos (ANESINI et al., 2012) e que a atividade antioxidante *in vitro* de MC foi significativamente maior que MT (BOAVENTURA et al., 2013), pressupõe-se que o mesmo padrão possa ocorrer *in vivo*. De fato, foi observado, nesse estudo, que após uma hora de consumo de MC houve melhora importante no estado antioxidante de indivíduos saudáveis, apresentando uma otimização dos resultados quando comparado ao consumo de MT. Nos estudos em que foi investigado o papel antioxidante do consumo de infusões de plantas medicinais por seres humanos, houve relato de aumento da capacidade antioxidante do soro (FRAP) após a primeira hora de consumo (LEENEN et al., 2000; VILLAÑO et al., 2012); como também, o aumento linear de antioxidantes plasmáticos após o consumo de doses

umentadas de chá verde por indivíduos saudáveis, fortalecendo as evidências sobre a relação entre a ingestão de maiores concentrações de chá verde e a modulação do estresse oxidativo em seres humanos (SUNG et al., 2000; PECORARI et al., 2010).

Corroborando outros estudos em que foi verificado o aumento da capacidade antioxidante do soro a partir do consumo de chá verde e chá *oolong* em seres humanos (SUNG et al., 2000; VILLAÑO et al., 2012), observou-se no presente estudo aumento da capacidade antioxidante do soro (FRAP) após o consumo agudo de MC, porém não após o consumo de MT. Estes resultados sugerem o envolvimento de elevadas concentrações de compostos bioativos presentes no MC, principalmente os compostos fenólicos, no aumento da capacidade antioxidante sérica dos indivíduos do estudo. De fato, Pecorari et al. (2010) verificaram que há correlação linear entre a concentração de chá verde e a capacidade antioxidante sérica em seres humanos, medida pelo método do FRAP, após o consumo agudo da infusão da planta. Contudo, em outros estudos não foi observado aumento da capacidade antioxidante do soro, a partir dos valores de FRAP, após o consumo agudo ou de curta duração de chá verde em concentrações normais (LEENEN et al., 2000; KIMURA et al., 2002).

Apesar do diferente teor de fitoquímicos entre MT e MC, percebeu-se que ambas as infusões promoveram aumento significativo nos valores sanguíneos de GSH. Como sugerido por Lahouel et al. (2010), os antioxidantes fenólicos podem exercer papel na preservação dos valores de GSH, a partir da diminuição da oxidação e favorecem também o aumento na síntese de GSH. A GSH, o principal tiol participante das reações de redox celular, promovendo o sequestro de radicais livres, também atua como substrato para a GPx durante o processo de detoxificação do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (SIES, 1999). Recentemente, foi demonstrado que a ingestão de 1 L de chá de erva-mate tostada promoveu aumento significativo nos valores sanguíneos de GSH em indivíduos dislipidêmicos (BOAVENTURA et al., 2012).

O sistema antioxidante do organismo humano é caracterizado por uma interação sinérgica complexa entre as espécies antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (VILLAÑO et al., 2012). No presente estudo, foi demonstrado que a ingestão de MC proporcionou modulação em ambos os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. O consumo agudo de MC aumentou as atividades das principais enzimas antioxidantes, tais como a CAT, a SOD e a GPx. Apesar de Matsumoto et al. (2009) não terem avaliado a atividade dessas enzimas, os autores

observaram aumento significativo na expressão gênica dessas enzimas após o consumo de chá-mate por uma semana. Da mesma forma, Fernandes et al. (2012) verificaram que o consumo agudo e de curta duração de infusão de erva-mate aumentou, significativamente a atividade e a expressão gênica da enzima antioxidante paraoxonase-2 em mulheres saudáveis. Considerando que a atividade aumentada de enzimas antioxidantes parece inibir o dano oxidativo, foi demonstrado que ratos que consumiram por um mês gengibre em elevada concentração, alimento rico em compostos fenólicos, apresentaram aumento nas atividades das enzimas CAT, SOD e GPx com concomitante diminuição na peroxidação lipídica (KOTA; KRISHNA; POLASA, 2008).

Vale ressaltar que o aumento das enzimas antioxidantes nem sempre é benéfico. Uma vez que as células cancerígenas produzem níveis elevados de radicais livres, tornando as células malignas mais dependentes de enzimas antioxidantes para eliminar os radicais tóxicos, mecanismos que diminuem ou inibem a atividade das enzimas antioxidantes podem ser alvo ideal para tratamentos contra o câncer (HILEMAN; ACHANTA; HUANG, 2001). No entanto, o papel das enzimas antioxidantes na prevenção do câncer ainda é controverso. Alguns estudos sugerem que o crescimento de células cancerígenas é inibido pela expressão aumentada das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx (VENKATARAMAN et al., 2005; LIU et al., 2006; NELSON et al., 2006; YANG et al., 2013). Além disto, as enzimas antioxidantes também têm sido utilizadas na prevenção de metástase (NISHIKAWA; HASHIDA, 2006).

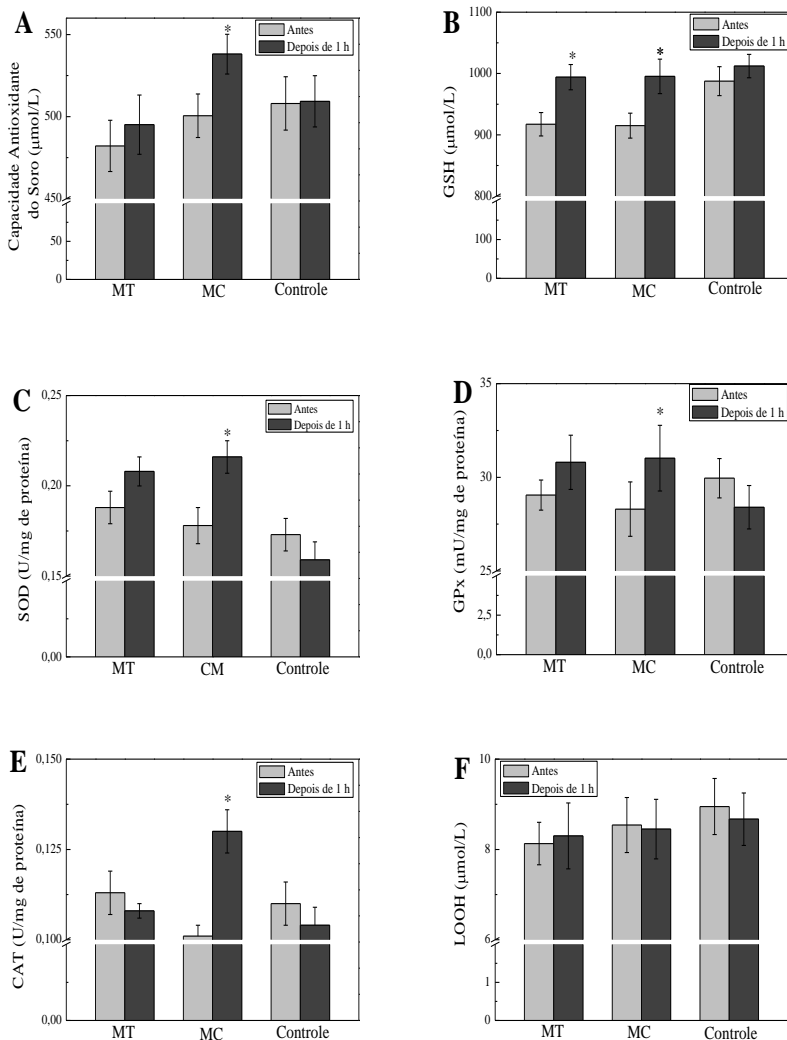
Não foram observadas variações significativas na peroxidação lipídica após o consumo de ambas as infusões de erva-mate. Os resultados de oxidação lipídica em indivíduos que consumiram infusões de erva-mate ainda são controversos. Matsumoto et al. (2009) reportaram que o consumo por uma semana de chá mate diminuiu a peroxidação lipídica, medida a partir das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Por outro lado, Boaventura et al. (2012) não observaram variação significativa nos níveis de LOOH, medida pela técnica de FOX2, após o consumo prolongado de chá-mate.

Apesar de não ter sido observada diminuição nos valores de LOOH, deve destacar-se que o consumo de MC não provocou efeito pró-oxidante nos participantes, mantendo os valores basais de LOOH, simultaneamente, ao aumento nos parâmetros antioxidantes, como mencionado anteriormente. De fato, após o consumo de MC, foi encontrada correlação negativa significativa entre os valores de LOOH e

de capacidade antioxidante (**Erro! Fonte de referência não encontrada.** A). O equilíbrio entre os oxidantes e antioxidantes é um ponto crucial na manutenção de sistemas biológicos. Sob as condições de estresse oxidativo, o sistema antioxidante endógeno pode não ser suficiente para prevenir os danos oxidativos, e os antioxidantes dietéticos podem ser requeridos para auxiliar na manutenção das funções celulares ótimas. Nesse contexto, o aumento no sistema de defesa antioxidante se torna uma estratégia interessante de intervenção para prevenir doenças relacionadas aos efeitos deletérios das espécies reativas.

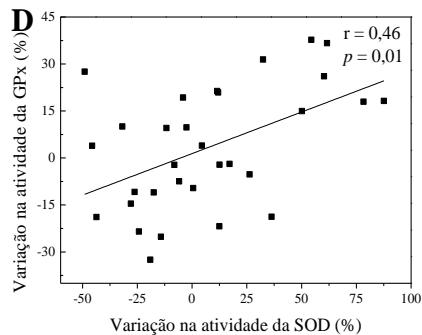
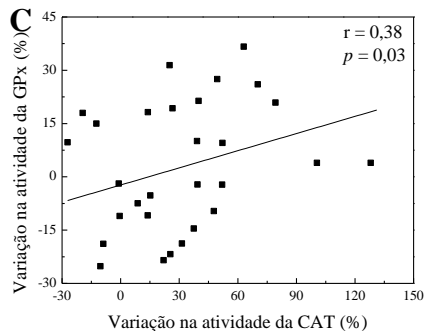
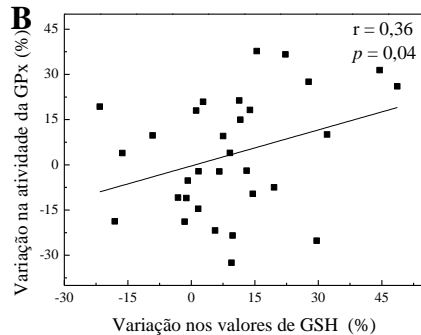
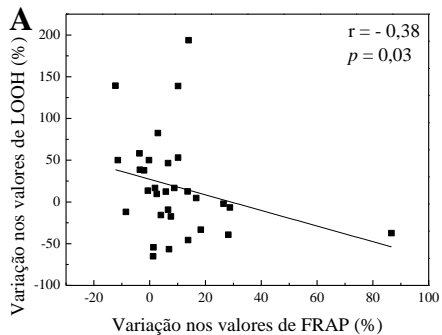


Figura 8 – Concentrações de FRAP (A), GSH (B), e LOOH (F), e atividades das enzimas antioxidantes SOD (C), GPx (D) e CAT (E) de indivíduos saudáveis antes e após uma hora do consumo de infusão de erva-mate tradicional (MT), infusão de erva-mate crioconcentrada (MC) e controle.



Os dados estão expressos em média  $\pm$  erro padrão. \* Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparada aos valores anteriores ao consumo de MT, MC e do controle.

Figura 9 – Correlações entre as variações dos valores percentuais de LOOH e FRAP (A), GPx e GSH (B), GPx e CAT (C) e GPx e SOD (D) após a ingestão de infusão de erva-mate crioconcentrada (MC).



## 4 CONCLUSÃO

Embora a atividade antioxidante da infusão crioconcentrada de erva-mate se mostrou interessante a partir de estudos *in vitro*, foi necessário avaliar se esta infusão também promoveria aumento da atividade antioxidante *in vivo*, não induzindo efeitos tóxicos e/ou pró-oxidantes.

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que o consumo agudo de MC foi capaz de promover aumento do estado antioxidante de indivíduos saudáveis, quando comparado ao consumo agudo de TM. Além disto, não foi observada variação no dano oxidativo de lipídios, fato que demonstra que o consumo agudo de CM não provocou atividade pró-oxidante. Não foram observados efeitos tóxicos renais ou hepáticos nos indivíduos estudados. A ingestão de controle (água) não alterou nenhum parâmetro bioquímico analisado.

Os resultados desse estudo sugerem que a MC pode ser utilizada no futuro por indústrias alimentares e farmacêuticas, para aumentar o valor nutricional de produtos alimentares; e na formulação de nutracêuticos e suplementos dietéticos. No entanto, são necessários estudos de longo prazo para demonstrar um efeito antioxidante *in vivo* mais consistente de CM, considerando inclusive o consumo de CM concomitantemente à alimentação habitual dos sujeitos estudados.

## REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AIDER, M.; DE HALLEUX, D. Cryoconcentration technology in the bio-food industry: Principles and applications. **LWT- Food Science and Technology**, v. 42, p. 679-685, 2009.
- ANESINI, C. et al. Study of the participation of caffeine and polyphenols on the overall antioxidant activity of mate (*Ilex paraguariensis*). **LWT- Food Science and Technology**, v. 45, n.2, p. 299-304, 2012.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 61, p. 882-90, 1963.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**, v. 53, p. 686-692, 2013.
- BOVERIS, A. et al. Increased chemiluminescence and superoxide production in the liver of chronically ethanol-treated rats. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 227, p. 534-541, 1983.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.

DA SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.

DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

FERNANDES, E. S. et al. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*) enhances the gene modulation and activity of paraoxonase-2: *In vitro* and *in vivo* studies. **Nutrition**, v. 28, p.1157-1164, 2012.

GALATI, G.; O'BRIEN, P. J. Potential toxicity of flavonoids and other dietary phenolics: significance for their chemopreventive and anticancer properties. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 287-303, 2004.

HECK, C. I.; DE MEJIA, E. G. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): A comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. R138-R151, 2007.

HILEMAN, E. A.; ACHANTA, G.; HUANG, P. Superoxide dismutase: An emerging target for cancer therapeutics. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 5, p. 697-710, 2001.

KIMURA, M. et al. The relation between single/double or repeated tea catechin ingestions and plasma antioxidant activity in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56, p. 1186–1193, 2002.

KOTA, N.; KRISHNA, P.; POLASA, K. Alterations in antioxidant status of rats following intake of ginger through diet. **Food Chemistry**, 106, 991-996, 2008

LAHOUEL, M. et al. Polyphenolic fractions of algerian propolis reverses doxorubicin induced acute renal oxidative stress. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, p. 712-720, 2010.

LEENEN, R. et al. A single dose of tea with or without milk increases plasma antioxidant activity in humans. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 87-92, 2000.

LIU, J. et al. Suppression of the malignant phenotype in pancreatic cancer by overexpression of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. **Human Gene Therapy**, v. 17, p. 105-116, 2006.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1370-1376, 2009.

MATSUMOTO, R. L. T. et al. Effects of maté tea (*Ilex paraguariensis*) ingestion on mRNA expression of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and total antioxidant status in healthy young women. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1775-1780, 2009.

McCORD, J.M.; FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049-6055, 1969.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of phenolic compounds in aqueous mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil) extract through nanofiltration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 2211-2216, 2011.

MURAKAMI, A. N. N. et al. Concentration of biologically active compounds extracted from *Ilex paraguariensis* St. Hil. by nanofiltration. **Food Chemistry**, v. 141, p. 60-65, 2013.

NELSON, S. K. et al. The induction of human superoxide dismutase and catalase in vivo: a fundamentally new approach to antioxidant therapy. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 40, p. 341-347, 2006.

NISHIKAWA, M.; HASHIDA, M. Inhibition of tumour metastasis by targeted delivery of antioxidant enzymes. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 3, p. 355-369, 2006.

NOUROOZ-ZADEH, J.; TAJADDINI-SARMADI, J.; WOLFF, S. P. Measurement of plasma hydroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xylenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. **Analytical Biochemistry**, v. 220, p. 403-409, 1994.

PECORARI, M. et al. Biomarkers of antioxidant status following ingestion of green teas at different polyphenol concentrations and antioxidant capacity in human volunteers. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 54, p. S278-S283, 2010.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SUNG, H. et al. *In vivo* antioxidant effect of green tea. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 54, p. 527-529, 2000.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VENKATARAMAN, S. et al. Manganese superoxide dismutase overexpression inhibits the growth of androgen-independent prostate cancer cells. **Oncogene**, v. 24, p. 77-89, 2005.

VIEIRA, F. G. K. et al. Improvement of serum antioxidant status in humans after the acute intake of Apple juices. **Nutrition Research**, v. 32, p. 229-232, 2012.

VILLAÑO, D. et al. Unfermented and fermented rooibos teas (*Aspalathus linearis*) increase plasma total antioxidant capacity in healthy humans. **Food Chemistry**, v. 123, p. 679-683, 2010.

VILLAÑO, D. et al. Effect of acute consumption of oolong tea on antioxidant parameters in healthy individuals. **Food Chemistry**, v. 132, p. 2102-2106, 2012.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325-333, 1981.

YANG, Y. et al. Reactive oxygen species in cancer biology and anticancer therapy. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 3677-3692, 2013.

YANG, J.; LIU, R. H. The phenolic profiles and antioxidant activity in different types of tea. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 48, p. 163-171, 2013.

ZANG, L. Y. et al. Effect of chlorogenic acid on hydroxyl radical. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 247, 205-210, 2003.



## **CAPÍTULO 4 – Efeito da digestão simulada do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na atividade antioxidante celular, citotoxicidade e inibição da proliferação de células HepG2**

Resultados parciais deste estudo foram apresentados na forma de pôster no *First International Workshop: Innovation in Food Science* em Florianópolis, SC/Brasil (ANEXO G).

### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da digestão gastrointestinal simulada do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) na atividade antioxidante celular (CAA), citotoxicidade e proliferação de células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2). Após a digestão simulada foi observada redução significativa nos valores de compostos fenólicos totais e isolados, flavonoides totais e da atividade antioxidante total do extrato de erva-mate. O extrato de erva-mate digerido promoveu menor CAA e inibição de células HepG2 quando comparado ao extrato não digerido ( $p < 0,05$ ). Contudo, não foi observada diferença significativa nos valores de citotoxicidade. Para ambas as amostras, digerida e não digerida, foram encontradas correlações significativas ( $p < 0,05$ ) entre a concentração dos extratos e os valores de CAA ( $r = 0,896$ ), de citotoxicidade ( $r = 0,935$ ) e de inibição da proliferação ( $r = 0,853$ ). Os extratos de erva-mate digeridos e não digeridos apresentaram atividade antioxidante, citotóxica e antiproliferativa em células de câncer de fígado, indicando que essa planta pode ter papel interessante na prevenção e no desenvolvimento dessa doença.

**Palavras-chave:** *Ilex paraguariensis*. Compostos fenólicos. Digestão simulada. Antiproliferação. Citotoxicidade. Atividade antioxidante celular.

## 1 INTRODUÇÃO

Diversos mecanismos bioquímicos estão envolvidos na formação e no desenvolvimento do câncer, tais como o estresse oxidativo, o qual é induzido pelos radicais livres, causando dano ao DNA (AMES; GOLD, 1991). Sugere-se que esse importante dano oxidativo pode ser prevenido ou restringido por fitoquímicos dietéticos (KSOURI et al., 2013; LIU, 2013). Estudos demonstraram que os fitoquímicos dietéticos possuem mecanismos de ação na prevenção do câncer como o sequestro dos radicais livres e diminuição do dano oxidativo; inibição da proliferação celular; indução da diferenciação celular; inibição da expressão oncogênica; indução da expressão gênica de supressão do tumor; regulação do ciclo celular e indução de apoptose (LIU, 2004; WILLIAMS; SPENCER; RICE-EVANS, 2004; LIU; FINLEY, 2005; LIU, 2013). Nesse contexto, recomenda-se o consumo de alimentos de origem vegetal ricos em fitoquímicos bioativos.

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.), espécie vegetal da região subtropical da América do Sul, é uma planta rica em compostos antioxidantes, os quais podem intervir contra o desenvolvimento do câncer. Devido ao seu elevado consumo, disponibilidade comercial e efeitos benéficos à saúde, a ingestão de erva-mate tem se popularizado na América do Norte e na Europa (DE MEJIA et al., 2010; BRACESCO et al., 2011). Diversas propriedades farmacológicas dessa planta são atribuídas à presença de compostos fenólicos, principalmente os ácidos clorogênicos (DE MORAIS et al., 2009; PAGLIOSA et al., 2010; KLEIN et al., 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* reportaram o elevado potencial antioxidante (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; DA SILVA et al., 2008; BOAVENTURA et al., 2012; BOAVENTURA et al., 2013) e propriedades quimiopreventivas da erva-mate (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004; DE MEJIA et al., 2005). Contudo, a propriedade antioxidante da planta em células cancerígenas ainda é desconhecida. Além disso, são escassos os estudos que avaliaram os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da erva-mate em células cancerígenas (RAMIREZ-MARES; CHANDRA; DE MEJIA, 2004).

Wolfe e Liu (2007) desenvolveram uma técnica para avaliar a atividade antioxidante celular (CAA) em células de carcinoma hepatocelular humano HepG2, a qual consideraram um modelo biológico relevante para mensurar a atividade antioxidante de extratos vegetais em células. Esse método proporciona, sob as condições fisiológicas *in vitro*, o rastreamento dos antioxidantes, considerando a captação celular, a

distribuição e a eficiência da proteção contra os radicais peroxil (WOLFE; LIU, 2007). Portanto, a avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate em cultura celular pode ser uma importante ferramenta na avaliação do potencial bioativo desta planta no câncer.

Sabe-se que os compostos fenólicos são altamente metabolizados após a ingestão e absorção gastrointestinal, resultando possivelmente em diminuída atividade antioxidante dos metabólitos plasmáticos em relação às moléculas precursoras (MANACH et al., 2004). Embora pouco se saiba a respeito da biodisponibilidade dos compostos fenólicos da erva-mate no plasma e tecidos (OLIVEIRA, 2013), supõe-se que a diminuição da concentração desses compostos após a digestão gastrointestinal, primeiro passo do metabolismo, pode influenciar nos efeitos biológicos da planta. Neste sentido, metodologias *in vitro*, que simulam os processos digestivos do trato gastrointestinal são utilizadas por serem simples e rápidas para se aproximar dos ensaios *in vivo* (MILLER et al., 1981; FAILLA; CHITCHUMROONCHOKCHAI, 2005; SIRACUSA et al., 2011). Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da digestão gastrointestinal simulada do extrato de erva-mate na atividade antioxidante celular (CAA), na citotoxicidade e na antiproliferação de células HepG2. Os teores de compostos fenólicos totais, compostos fenólicos isolados e flavonoides totais também foram aferidos após a digestão simulada.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Reagentes químicos

Metanol (MeOH), ácido hidrocloreídrico (HCl), ácido acético, acetona, tampão fosfato salino (PBS), carbonato de sódio e fosfato de potássio foram adquiridos da Mallinckrodt Chemicals (Phillipsburg-NJ, EUA). Etanol (EtOH, anidro, 100%), boroidreto de sódio (NaBH<sub>4</sub>), cloranil, vanilina, butil hidroxil tolueno (BHT), extrato de bile, pepsina, pancreatina, 2',7'-diacetado de diclorofluoresceína (DCFH-DA), ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox), reagente Folin-Ciocalteu, dihidrato de quercetina, acetato de etila, 1-butanol, ácido 5-cafeoilquínico, ácido 3,5-dicafeoilquínico, ácido 3,4-diidroxibenzoico e epigalocatequina galato (EGCG) foram obtidos da Sigma-Aldrich, Inc. (St. Louis-MO, EUA). Tetraidrofurano (THF), cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O) e dimetilsulfóxido (DMSO) foram adquiridos da Fisher Scientific (Pittsburgh-PA, EUA). 2,2-Azobis (2-

amidinopropano) (ABAP) foi adquirido da Wako Chemicals Inc. (Richmond-VA, EUA). O ácido gálico foi adquirido da ICN Biomedical Inc. (Costa Mesa-CA, EUA). As células de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville-MD, EUA). Williams' Medium E (WME) e Solução Salina Tamponada de Hank (HBSS), adquiridos da Gibco Life Technologies (Grand Island-NY, EUA). O Soro bovino fetal (FBS) foi obtido da Atlanta Biologicals (Lawrenceville-GA, EUA). Todos os reagentes químicos utilizados foram de grau analítico.

## 2.2 Preparação do extrato de erva-mate

As folhas de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) foram colhidas em Catanduvas-SC/Brasil, em junho de 2012. As folhas foram higienizadas, branqueadas, secas em estufa (FABBE, 171, São Paulo-SP, Brasil) por 24 h a 40 °C e moídas em moinho de facas (Marconi, MA-580, Piracicaba-SP, Brasil) antes da extração dos fitoquímicos.

Os fitoquímicos da erva-mate foram extraídos de acordo com o método modificado de Wolfe e Liu (2003), em que 10 g de folhas secas e moídas de erva-mate foram homogeneizadas (VirTis Co., Gardiner-NY, EUA) em 50 mL de acetona 80% a 4 °C por 10 minutos. A mistura foi filtrada em papel Whatman n° 1. O solvente foi evaporado em rotaevaporador a 45 °C até que o volume do filtrado estivesse abaixo de 10% do volume inicial. As amostras foram ressuspensas em água destilada até o volume final de 25 mL e armazenadas a - 40 °C até a realização dos experimentos. Todas as extrações foram realizadas em triplicata, com coeficiente de variação máximo de 10%.

## 2.3 Digestão gastrointestinal simulada

A digestão simulada foi conduzida a partir do método descrito por Miller et al. (1981) com modificações de Liu, Glahn e Liu (2004). Em resumo, 2,25 mL de extrato de erva-mate ou de água ultrapura (controle), em triplicata, foram misturados com solução de NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L e BHT 150 µmol/L até o volume final de 9 mL e acidificados até pH 2,0 com HCl 0,1 mol/L. As amostras foram homogeneizadas com 0,25 mL de solução de pepsina (0,2 g de pepsina em 5 mL de HCl 0,1 mol/L) e incubadas por 1 hora em banho com agitação a 37 °C. Após a digestão gástrica simulada, o pH da mistura foi aumentado para 6,9 com NaHCO<sub>3</sub> 0,1 mol/L. Em seguida, a digestão intestinal simulada foi realizada com a adição de solução pancreatina-

bile (0,45 g de extrato de bile e 0,075 g de pancreatina em 37,5 mL de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 mol/L), e as amostras foram incubadas por 2 horas em banho com agitação a 37 °C. O volume final foi ajustado para 12 mL com solução de NaCl 140 mmol/L, KCl 5 mmol/L e BHT 150  $\mu\text{mol/L}$ . As amostras digeridas foram armazenadas a -70 °C até o momento das análises.

## **2.4 Análise do perfil de compostos fenólicos do extrato de erva-mate**

### **2.4.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais**

Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais, a partir do método colorimétrico proposto por Singleton, Joseph e Rossi (1965) com algumas modificações (WOLFE; LIU, 2007; WOLFE et al., 2008). Em resumo, 100  $\mu\text{L}$  dos extratos de erva-mate foram misturados com 400  $\mu\text{L}$  de água deionizada. Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de reagente Folin-Ciocalteu e, após 5 minutos, a reação foi neutralizada com carbonato de sódio 7%. Depois de 90 minutos, a absorbância das amostras foi medida a 760 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, Sunnyvale-CA, EUA). O ácido gálico foi utilizado como padrão e o teor de compostos fenólicos totais foi expresso em equivalente de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP.

### **2.4.2 Determinação do teor de flavonoides totais**

O teor de flavonoides totais dos extratos de erva-mate foi determinado por meio do método proposto por He, Liu e Liu (2008). Em resumo, 4 mL dos extratos foram evaporados e reconstituídos em 1 mL de tetraidrofurano/etanol (THF/EtOH, 1:1, v/v). Foi adicionado 1 mL de solução de  $\text{NaBH}_4$  50 mmol/L e 0,5 mL de solução de  $\text{AlCl}_3$  74,6 mmol/L, e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 30 minutos. Um volume adicional de 0,5 mL de  $\text{NaBH}_4$  50 mmol/L foi inserido, e os tubos foram mantidos por mais 30 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 2 mL de ácido acético 0,8 mol/L, mantendo os tubos no escuro por 15 minutos. Logo após, foi adicionado 1 mL de cloranil 20,0 mmol/L, e os tubos foram mantidos por 1 hora em banho com agitação a 95 °C. Os tubos foram esfriados em água gelada e preenchidos com MeOH até o volume final de 4 mL. Posteriormente, foram adicionados e homogeneizados 1 mL de vanilina 1,052 mmol/L e 2 mL de HCl 12 mol/L, e os tubos foram mantidos no

escuro por mais 15 minutos. As absorvâncias foram medidas a 490 nm em espectrofotômetro (Molecular Devices, Sunnyvale-CA, EUA). O teor de flavonoides totais foi expresso em g% de equivalentes de catequina por 100 g de amostra. Os dados foram apresentados como média  $\pm$  DP.

#### 2.4.3 Determinação dos compostos fenólicos por CLAE

A determinação dos compostos fenólicos isolados por CLAE foi realizada a partir da injeção de 10  $\mu$ L das amostras em cromatógrafo Shimadzu LC-20AT (Quioto, Japão), equipado com coluna de fase reversa (Supelco C18, 5  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm) termostaticada a 40 °C e detector UV-visível DAD (Shimadzu SPD- M20A,  $\lambda$  = 280 e 320 nm), de acordo com método previamente descrito (STRASSMANN et al., 2008). A fase móvel utilizada foi composta de água:acetato de etila:n-butanol (350:1:10, v/v/v), com fluxo de 0,8 mL/min. Os ácidos 5-cafeoilquínico e 3,5-dicafeoilquínico foram identificados e quantificados através da utilização de padrões externos. A concentração final dos compostos avaliados foi determinada em miligramas de cada composto por 100 g de amostra, a partir da média de três injeções consecutivas.

### 2.5 Atividade antioxidante total do extrato de erva-mate

#### 2.5.1 Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

A eficácia dos extratos de erva-mate em sequestrar os radicais peroxil foi mensurada a partir do ensaio de ORAC (PRIOR et al., 2003). Em resumo, foram adicionados em triplicata 20  $\mu$ L de amostras de erva-mate, trolox ou branco, feitos em solução tampão fosfato de potássio com pH 7,4 em uma placa de 96 cavidades. Em cada uma das cavidades foi adicionado um volume de 200  $\mu$ L de fluoresceína 0,96  $\mu$ mol/L, preparada em tampão, e a placa foi mantida a 37 °C por 20 minutos em agitação intermitente. Logo após, foram adicionados 20  $\mu$ L de ABAP 119 mmol/L, preparado imediatamente antes do uso, e a microplaca foi imediatamente inserida em leitor de placas Fluoroskan Ascent FL (Thermo Labsystems, Franklin-MA, EUA) termostaticado a 37 °C. O decaimento da fluorescência a 538 nm foi mensurado com excitação a 485 nm a cada 5 minutos durante 2,5 horas. O trolox foi utilizado como padrão e os resultados de ORAC foram expressos em média  $\pm$  DP de milimoles de equivalentes de trolox por 100 g de amostra.

### 2.5.2 Capacidade de sequestro do radical peroxil (PSC)

A atividade antioxidante dos extratos em relação à capacidade de sequestro dos radicais peroxil foi medida, adicionalmente, pelo método PSC, proposto por Adom e Liu (2005). O composto DCFH-DA (2,48 mmol/L, em metanol) foi hidrolisado com 900 µL de hidróxido de potássio 1,0 mmol/L durante 5 minutos para a remoção do diacetato. Esta mistura foi diluída com tampão fosfato de potássio (75 mmol/L, pH 7,4) até o volume final de 6 mL. Volumes de 100 µL das amostras foram misturados com 100 µL de DCFH e agitados por 20 segundos. A reação foi iniciada pela adição de 50 µL de ABAP e conduzida a 37 °C por 40 minutos, onde a fluorescência foi monitorada com filtros de emissão a 538 nm e excitação a 485 nm em espectrofotômetro de fluorescência (Thermo Labsystems, Franklin-MA, EUA). Os resultados de PSC foram expressos em média ± DP de milimoles equivalentes de ácido ascórbico por 100 g de amostra.

### 2.6 Cultura celular

As células HepG2 foram cultivadas em meio de cultura (WME suplementado com soro bovino fetal 5%, Hepes 10 mmol/L, L-glutamina 2 mmol/L, insulina 5 µg/mL, hidrocortisona 0,05 µg/mL, 50 unidades/mL de penicilina, estreptomomicina 50 µg/mL e gentamicina 100 µg/mL) e foram mantidas a 37°C e em CO<sub>2</sub> 5% (LIU; SUN, 2003). As células utilizadas estavam entre as passagens 12 a 31.

### 2.7 Atividade antioxidante celular (CAA)

O ensaio da atividade antioxidante celular (CAA) em células HepG2 foi realizado de acordo com o método proposto por Wolfe e Liu (2008). Volumes de 100 µL de suspensão de células em meio de cultura foram incubados a uma densidade de  $6 \times 10^4$  células/cavidade em microplaca estéril preta de 96 cavidades. Após a incubação de 24 horas, o crescimento de células excessivo foi removido a partir da lavagem das cavidades da placa com PBS. As células foram tratadas em triplicata por 1 hora com 100 µL de meio, contendo os extratos e 25 µM de DCFH-DA, e as cavidades foram lavadas com 100 µL de PBS. Logo após, um volume de 100 µL de ABAP em HBSS foi aplicado às células, e a placa foi colocada em um leitor de fluorescência (Thermo Labsystems, Franklin-MA, EUA) a 37°C, com filtros de emissão a 538 nm e excitação a 485 nm, sendo que a leitura foi feita a cada 5 minutos por 1

hora. Após a subtração do branco e subtração dos valores de fluorescência iniciais, a área abaixo da curva de fluorescência em função do tempo foi integrada para o cálculo do valor do CAA, de acordo com a Equação 3:

$$CAA = 100 - (\int SA / \int CA) \times 100 \quad (3)$$

Onde  $\int SA$  representa a área integrada da amostra em função do tempo e  $\int CA$ , a área integrada da curva controle. Os valores de EC50 foram determinados para as amostras, a partir do efeito mediano interpolado em  $\log (fa/fu)$  versus  $\log (dose)$ , em que  $fa$  é a fração afetada (CAA) e  $fu$ , a não afetada ( $1 - CAA$ ) pelo tratamento. Os valores de EC50 foram apresentados em média  $\pm$  DP e convertidos em valores de unidades de CAA, expressos em micromoles equivalentes de quercetina por 100 g de amostra.

## 2.8 Avaliação da citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade em células HepG2 foi realizado de acordo com o método proposto por Liu e Sun (2003). Para este teste, volumes de 100  $\mu$ L de suspensão celular, na densidade de  $4 \times 10^4$  células/cavidades foram adicionados em placa de 96 cavidades com posterior incubação de 24 horas a 37°C. O meio foi removido, e as células foram lavadas com 100  $\mu$ L de tampão PBS. Foram adicionados 100  $\mu$ L de diferentes concentrações dos extratos de erva-mate ou de água ultrapura (controle) em meio completo, e a placa foi incubada novamente por 24 horas a 37 °C. Após este período, as células foram lavadas com PBS e avaliadas pelo método de coloração por azul de metileno (FELICE; SUN; LIU, 2009). Foram adicionados 50  $\mu$ L de solução de corante azul de metileno em cada cavidade e a placa foi incubada a 37 °C por 1 hora. O corante foi removido e a placa imersa em água destilada por quatro vezes. A água foi retirada totalmente das cavidades e acrescentou-se 100  $\mu$ L de tampão de eluição (50% etanol, 49% PBS e 1% ácido acético) em cada uma das cavidades. A placa foi agitada por 20 minutos para dissolução uniforme, e a absorbância foi mensurada a 570 nm em leitor de placas (Dybex Technologies, Inc., Chantilly-VA, EUA), subtraindo-se o valor do branco. Foram consideradas citotóxicas as concentrações do extrato que apresentaram decaimento da absorbância superior a 10% em relação ao controle. Os



valores de citotoxicidade foram expressos em  $CC_{50}$ , que é caracterizado pela concentração de extrato tóxico para diminuir 50% das células.

## 2.9 Avaliação da inibição da proliferação celular

O ensaio antiproliferativo com linhagem de células HepG2 foi realizado a partir do protocolo descrito por Liu et al. (2002). Uma suspensão celular de 100  $\mu$ L em meio completo, na densidade de  $2,5 \times 10^4$  células por mL, foi adicionada em uma placa de 96 cavidades. Após 4 horas, o meio completo foi removido e um meio contendo várias concentrações do extrato ou água ultrapura (controle) foi adicionado às células. Após 72 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS. Realizou-se o protocolo de coloração por azul de metileno, (FELICE; SUN; LIU, 2009) descrito no ensaio de citotoxicidade. Os valores de atividade antiproliferativa foram apresentados em  $EC_{50}$ , que considera a concentração do extrato necessária para inibir a proliferação de 50% das células.

## 2.10 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* SigmaPlot 12.0 (Systat Software Inc., San Jose-CA, EUA). Usou-se o teste t de Student para detectar diferenças significantes entre as amostras. A Correlação de Pearson foi aplicada para avaliar a associação entre as concentrações dos extratos de erva-mate e os valores de CAA, citotoxicidade e inibição da proliferação celular. Considerou-se nível de significância quando  $p < 0,05$ .

# 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 3.1 Perfil fenólico da erva-mate

Os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais dos extratos de erva-mate, antes e após a digestão simulada, estão apresentados na Tabela 4. Após a digestão simulada, os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais das amostras diminuíram, aproximadamente, 23 e 17% ( $p < 0,05$ ) respectivamente. Outros estudos também reportaram o decréscimo da concentração de compostos fenólicos em amostras vegetais após a digestão simulada (SIRACUSA et al., 2011; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013). Como sugerido por Rodríguez-Roque et al. (2013), os compostos fenólicos

presentes na fração bioacessível do extrato de erva-mate podem ser influenciados pelas variações de pH e interações com outros constituintes durante a digestão gastrointestinal simulada. Apesar da significativa diminuição dos teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais após a digestão simulada, o percentual de flavonoides totais, em relação ao teor total de compostos fenólicos, permaneceu em torno de 20% antes e depois do processo digestivo.

Tabela 4 – Teores de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e de ácidos fenólicos isolados e atividade antioxidante do extrato de erva-mate antes e após a digestão simulada.

	Extrato de erva-mate (100 g de amostra)	
	Não digerido	Digerido
Compostos fenólicos totais (g)	3,99 ± 0,05 <sup>a</sup>	3,07 ± 0,06 <sup>b</sup>
Flavonoides totais (g)	1,38 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,15 ± 0,04 <sup>b</sup>
Ácido 5-cafeoilquínico (mg)	971,7 ± 2,5 <sup>a</sup>	314,3 ± 2,1 <sup>b</sup>
Ácido 3,5-dicafeoilquínico (mg)	731,9 ± 3,8 <sup>a</sup>	nd <sup>b</sup>
ORAC (mmol equivalente de Trolox)	70,63 ± 2,16 <sup>a</sup>	54,85 ± 2,67 <sup>b</sup>
PSC (mmol equivalente de ácido ascórbico)	102,20 ± 4,63 <sup>a</sup>	74,01 ± 4,05 <sup>b</sup>

Valores médios ± DP na mesma linha e com letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). nd, não detectado; ORAC, capacidade de absorção do radical oxigênio; PSC, capacidade de sequestro do radical peroxil.

Na Tabela 4 também estão apresentadas as variações do perfil cromatográfico dos ácidos fenólicos isolados presentes no extrato de erva-mate, antes e após a digestão simulada. Como reportado anteriormente em outros estudos (BRAVO; GOYA; LECUMBERRI, 2007; DE MORAIS et al., 2009), e também observado neste estudo, os ácidos fenólicos 5-cafeoilquínico ( $971,7 \pm 2,5$  mg/100 g de amostra) e 3,5-dicafeoilquínico ( $731,9 \pm 3,8$  mg/100 g de amostra) foram quantificados nas amostras de erva-mate analisadas. Após a digestão simulada, observou-se diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) de 67% no teor de ácido 5-cafeoilquínico, principal ácido clorogênico encontrado na erva-mate. O ácido 3,5-dicafeoilquínico, composto também pertencente à família dos ácidos clorogênicos, não foi identificado nas amostras digeridas de extrato de erva-mate. Corroborando os resultados deste estudo, Siracusa et al. (2011) observaram diminuição de aproximadamente 82% do teor de ácido 5-cafeoilquínico em amostras

de *Crithmum maritimum* L. após a digestão simulada. Estes autores também verificaram que o ácido 3,5-dicafeoilquínico foi totalmente degradado imediatamente após a digestão gástrica simulada. De acordo com Friedman e Jürgens (2000), os ácidos clorogênicos não são estáveis em valores de pH aumentados, como encontrado na digestão intestinal.

Destaca-se que a biodisponibilidade difere muito de um polifenol para outro, de modo que os polifenóis mais abundantes não são necessariamente os que conduzem a maiores concentrações de metabólitos ativos em tecidos-alvo. Os metabólitos, resultado da atividade digestiva, normalmente diferem dos compostos intactos (MANACH et al., 2005). No caso dos ácidos clorogênicos, a absorção desses compostos ocorre principalmente no cólon, após a hidrólise por esterases microbianas (MANACH et al., 2005).

### **3.2 Atividade antioxidante total**

As atividades antioxidantes das frações não digerida e digerida do extrato de erva-mate estão apresentadas na Tabela 4. A capacidade antioxidante total do extrato de erva-mate, medida a partir dos ensaios de ORAC e PSC, diminuiu 22,3 e 27,6% ( $p < 0,05$ ) respectivamente, após a digestão simulada. Faller, Fialho e Liu (2012) também observaram que a digestão simulada provocou significativa diminuição na atividade antioxidante dos extratos de feijoadá. Da mesma forma, Dinnella et al. (2010) verificaram que a atividade antioxidante do azeite de oliva foi negativamente afetada pela digestão simulada. Vale ressaltar que a digestão simulada do extrato de erva-mate afetou, similarmente, tanto os teores de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, como também a atividade antioxidante. De fato, a associação positiva entre o teor de compostos fenólicos e os valores de ORAC e PSC já foi reportada (MALTA et al., 2013). Os compostos fenólicos são altamente sensíveis às condições alcalinas encontradas no intestino delgado, sendo que suas possíveis modificações estruturais podem induzir alterações na atividade antioxidante (SIRACUSA et al., 2011; RODRÍGUEZ-ROQUE et al., 2013).

### **3.3 Atividade antioxidante celular**

Os resultados deste estudo demonstraram que a digestão simulada do extrato de erva-mate provocou variação significativa na atividade antioxidante celular (CAA) (Tabela 5). A CAA, a partir dos valores de  $EC_{50}$ , indicando que é necessária quantidade significativamente maior ( $p$

< 0,05) de extrato de erva-mate digerido para sequestrar 50% dos radicais peroxil, sendo que o valor médio de EC<sub>50</sub> do extrato, antes da digestão, foi de 15,8 ± 1,2 mg/mL e, após a digestão, de 19,6 ± 1,0 mg/mL.

Ao observar os valores de CAA, a partir de unidades equivalentes de quercetina, verificou-se também uma efetividade do extrato não digerido em relação ao digerido (39,3 ± 2,5 µmol vs. 31,01 ± 2,8 µmol EQ em 100 g de amostra). Corroborando os resultados encontrados, os valores de CAA encontrados na *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. (*bayberry* chinesa), diminuíram significativamente após a digestão gastrointestinal simulada (HUANG et al., 2014). Por outro lado, Faller, Fialho e Liu (2012) relataram aumento dos valores de CAA após a digestão simulada da feijoada, sugerindo que a matriz das amostras pode influenciar nos valores de CAA.

Tabela 5 – Atividade antioxidante celular (CAA) do extrato de erva-mate antes e após a digestão simulada.

	Extrato de erva-mate (100 g de amostra)	
	Não digerido	Digerido
EC <sub>50</sub> (mg/mL)	15,8 ± 1,2 <sup>a</sup>	19,6 ± 1,0 <sup>b</sup>
CAA (µmol EQ/100 g)	39,3 ± 2,5 <sup>a</sup>	31,01 ± 2,8 <sup>b</sup>

Valores médios ± DP na mesma linha e com letras diferentes indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ). EQ, equivalente de quercetina.

Apesar dos valores diminuídos de CAA nas amostras digeridas de erva-mate, estes valores são ainda similares aos encontrados em amostras de *raspberry* e *cranberry*, as quais possuem os mais elevados valores de CAA entre as espécies vegetais avaliadas por Wolfe et al. (2008). Vale destacar que em ambas as amostras, digerida e não digerida, foi encontrada correlação positiva ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações dos extratos e os valores de CAA ( $r = 0,950$  e  $r = 0,965$  respectivamente). Comportamento similar foi reportado por Huang et al. (2014), que observaram associação positiva entre o teor de compostos fenólicos e CAA em *bayberry* chinesa.

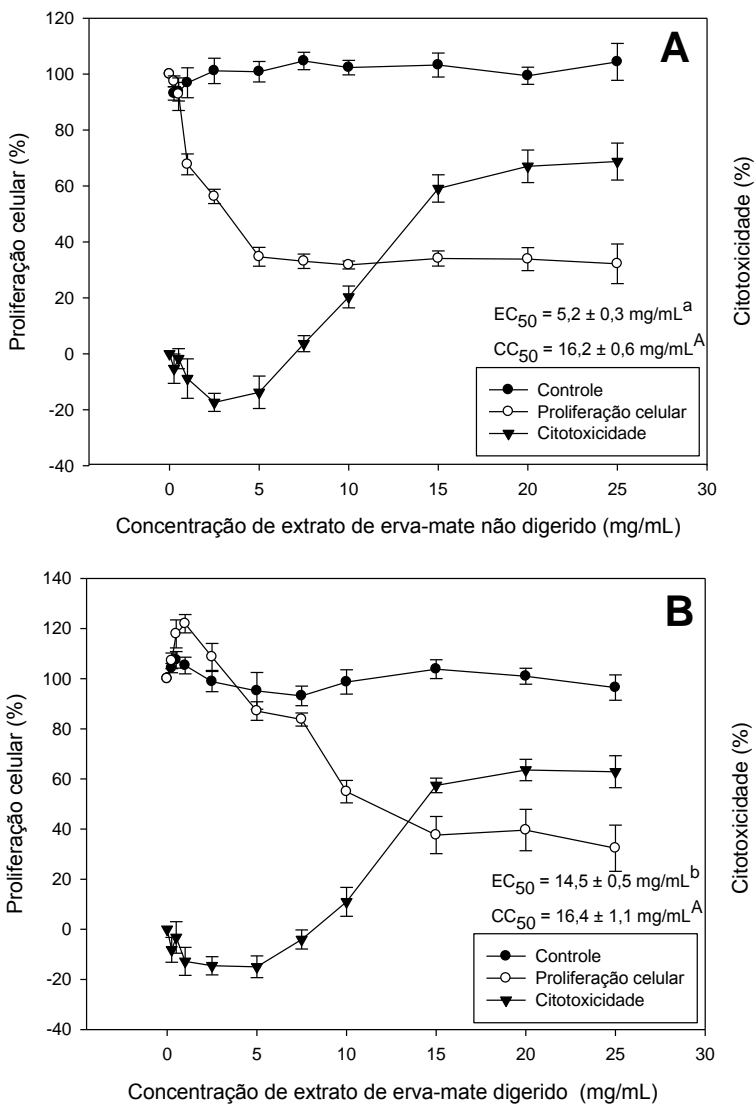
### 3.4 Citotoxicidade e proliferação celular

Os valores de citotoxicidade e de inibição da proliferação celular de células HepG2 do extrato de erva-mate, antes e após a digestão simulada, estão demonstrados na Figura 10 A e B. Em relação aos valores de citotoxicidade, os extratos não digerido e digerido de erva-

mate apresentaram atividades significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle, não havendo diferença significativa da atividade citotóxica depois da digestão simulada. Ramirez-Mares et al. (2004), De Mejia et al. (2005) e De Mejia et al. (2010) verificaram que o extrato de erva-mate apresenta atividade citotóxica em células cancerígenas hepáticas, orais e do cólon, respectivamente. Além disso, Ramirez-Mares et al. (2004) constataram que o extrato de erva-mate possui citotoxicidade superior para as células HepG2 quando comparado aos extratos de *Camelia sinensis* e *Ardisia compressa*.

O extrato de erva-mate apresentou declínio significativo em relação à inibição da proliferação das células HepG2 ( $p < 0,05$ ), com valores de  $EC_{50}$  de 5,2 para 14,5 mg/mL, considerando que menores valores de  $EC_{50}$  indicam maior atividade antiproliferativa. Desta forma, como não houve diferença nos valores de citotoxicidade após a digestão simulada, sugere-se que a atividade antiproliferativa do extrato de erva-mate não tenha sido causada por toxicidade às células HepG2 e sim por outro mecanismo relacionado à inibição da proliferação destas células como, por exemplo, a apoptose (LIU; SUN, 2003). Vale destacar, também, que o efeito antiproliferativo das amostras digeridas do extrato de erva-mate foi similar ao de outras espécies vegetais, tais como o *cranberry*, que foi a espécie vegetal com maior atividade antiproliferativa observada por Sun et al. (2002). A diminuição da inibição da proliferação celular, observada após a digestão simulada, foi possivelmente causada pelo concomitante declínio do teor de compostos bioativos, tais como os compostos fenólicos. De fato, a atividade antiproliferativa do extrato de erva-mate ocorreu de forma dose-dependente, sendo que foram encontradas correlações negativas significativas ( $p < 0,05$ ) entre a inibição da proliferação de células HepG2 e as concentrações dos extratos não digerido ( $r = - 0,942$ ) e digerido ( $r = - 0,887$ ). Adicionalmente, correlações positivas significantes ( $p < 0,05$ ) foram observadas entre a citotoxicidade e a concentração do extrato não digerido ( $r = 0,931$ ) e do digerido ( $r = 0,867$ ).

Figura 10 – Citotoxicidade e inibição da proliferação celular em células HepG2 do extrato de erva-mate antes (A) e após (B) a digestão simulada.



Os valores de EC<sub>50</sub> e CC<sub>50</sub> estão apresentados em média ± DP. Letras minúsculas diferentes na Figura 10 A e na Figura 10 B indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de proliferação celular. Letras maiúsculas diferentes na Figura 10 A e na Figura 10 B indicam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) de citotoxicidade.

#### 4 CONCLUSÃO

Após a digestão simulada, o extrato de erva-mate apresentou atividade antioxidante e antiproliferativa em células HepG2. Além disto, observou-se que a digestão gastrointestinal simulada não afetou o potencial citotóxico do extrato de erva-mate nessas células neoplásicas.

Apesar da significativa diminuição no teor de fitoquímicos e das atividades antioxidante e antiproliferativa avaliadas, a amostra digerida de erva-mate manifestou perfil similar a outras espécies vegetais não digeridas que apresentam elevadas atividades antioxidante e antiproliferativa em células HepG2.

Diante do exposto, sugere-se que investigações *in vivo* sejam conduzidas, a fim de elucidar a influência da digestão do extrato de erva-mate na sua atividade quimiopreventiva.

## REFERÊNCIAS

- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Rapid peroxy radical scavenging capacity (PSC) assay for assessing both hydrophilic and lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 6572-6580, 2005.
- AMES, B. N.; GOLD, L. S. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. **Mutation Research**, v. 250, 3-16, 1991.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, p. 657-664, 2012.
- BOAVENTURA, B. C. B. et al. Antioxidant potential of mate tea (*Ilex paraguariensis*) in type 2 diabetic mellitus and pre-diabetic individuals. **Journal of Functional Foods**, v. 5, 1057-1064, 2013.
- BRACESCO, N. et al. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 378-384, 2011.
- BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Research International**, v. 40, p. 393-405, 2007.
- DA SILVA, E. L. et al. Acute ingestion of yerba mate infusion (*Ilex paraguariensis*) inhibits plasma and lipoprotein oxidation. **Food Research International**, v. 41, n. 10, p. 973-979, 2008.
- DE MEJIA, E. G. et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) tea on topoisomerase inhibition and oral carcinoma cell proliferation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1966-1973, 2005.
- DE MEJIA, E. G. et al. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.
- DE MORAIS, E. C. et al. Consumption of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) improves serum lipid parameters in healthy



dyslipidemic subjects and provides an additional LDL-cholesterol reduction in individuals on statin therapy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 18, p. 8316-8324, 2009.

DINNELLA, C. et al. Bioaccessibility and antioxidant activity stability of phenolic compounds from extra-virgin olive oils during in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8423-8429, 2007.

FAILLA, M. L.; CHITCHUMROONCHOKCHAI, C. **In Vitro Models As Tools for Screening the Relative Bioavailabilities of Provitamin A Carotenoids in Foods**, HarvestPlus Technical Monograph 3, International Food Policy Research Institute and International Center of Tropical Agriculture. Washington, 2005.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of feijoadá whole meal coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 4826-4832, 2012.

FELICE, D. L.; SUN, J.; LIU, R. H. A modified methylene blue assay for accurate cell counting. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 109-118, 2009.

FRIEDMAN, M.; JÜRGENS, H. S. Effect of pH on the stability of plant phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2101-2110, 2000.

HE, X.; LIU, D.; LIU, R. H. Sodium borohydride/chloranil-based assay for quantifying total flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 9337-9344, 2008.

HUANG, H. et al. In vitro digestion combined with cellular assay to determine the antioxidant activity in Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. et Zucc.) fruits: A comparison with traditional methods. **Food Chemistry**, v.146, p.363-370, 2014.

KLEIN, G. A. et al. Mate tea (*Ilex paraguariensis*) improves glycemic and lipid profiles of type 2 diabetes and pre-diabetes individuals: a pilot study. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 20, p. 320-332, 2011.

- KSOURI, W. M. et al. LC-ESI-TOF-MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, anti-inflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. **Food Chemistry**, v. 139, p. 1073-1080, 2013.
- LIU, C. S.; GLAHN, R. P.; LIU, R. H. Assessment of carotenoid bioavailability of whole foods using Caco-2 cell culture model coupled with an in vitro digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 4330-4337, 2004.
- LIU, M. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of raspberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 2926-2930, 2002.
- LIU, R. H.; SUN, J. Antiproliferative activity of apples is not due to phenolic-induced hydrogen peroxide formation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1718-1723, 2003.
- LIU, R. H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **Journal of Nutrition**, v. 134, p. 3479S-3485S, 2004.
- LIU, R. H.; FINLEY, J. Potential cell culture models for antioxidant research. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4311-4314, 2005.
- LIU, R. H. Dietary bioactive compounds and their health implications. **Journal of Food Science**, v. 78, p. A18-A25, 2013.
- MALTA, L. G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417-425, 2013.
- MANACH, C. et al. Polyphenols: Food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MANACH, C. et al. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. review of 97 bioavailability studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 81, p. 230S-242S, 2005.

MILLER, D. D. et al. An *in vitro* method for estimation of iron availability from meals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 34, p. 2248-2256, 1981.

PAGLIOSA, C. M. et al. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, p. 173-178, 2010.

PEREIRA, D. F. et al. Influence of the traditional brazilian drink *Ilex paraguariensis* tea on glucose homeostasis. **Phytomedicine**. v. 19, p. 868-877, 2012.

PRIOR, R. L. et al. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma and other biological and food samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 3273-3279, 2003.

PRUDÊNCIO, A. P. A. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of the aqueous extract of bark from residues from mate tree (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) bark harvesting concentrated by nanofiltration. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, p. 399-405, 2012.

RAMIREZ-MARES, M. V.; CHANDRA, S.; DE MEJIA, E. G. In vitro chemopreventive activity of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts and selected polyphenols. **Mutation Research**, v. 554, p. 53-65, 2004.

RODRÍGUEZ-ROQUE, M. J. et al. Changes in vitamin C, phenolic, and carotenoid profiles throughout in vitro gastrointestinal digestion of a blended fruit juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 1859-1867, 2013.

SINGLETON, V. L.; JOSEPH, A.; ROSSI, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolibdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-149, 1965.

SIRACUSA, L. et al. Phenolic composition and antioxidant activity of aqueous infusions from *Capparis spinosa* L. and *Crithmum maritimum* L. before and after submission to a two-step in vitro digestion model.

**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, p. 12453-12459, 2011.

STRASSMANN, B. B. et al. Quantitation of methylxanthinic alkaloids and phenolic compounds in mate (*Ilex paraguariensis*) and their effects on blood vessel formation in chick embryos. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 18, p. 8348-8353, 2008.

SUN, J. et al. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 36, p. 838- 849, 2004.

WOLFE, K.; LIU, R. H. Apple peels as a value-added food ingredient. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1676-1683, 2003.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity (CAA) assay for assessing antioxidants, foods, and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 8896-8907, 2007.

WOLFE, K. L. et al. Cellular antioxidant activity of common fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8418-8426, 2008.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo foi o pioneiro na aplicação da tecnologia de criocentração no extrato aquoso de erva-mate sobre o perfil de fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* e em seres humanos. Observou-se que é possível aumentar o teor de compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos e metilxantinas, e a atividade antioxidante do extrato aquoso de erva-mate a partir da criocentração. Adicionalmente, verificou-se que o consumo agudo do extrato aquoso de erva-mate, submetido ao processo de criocentração, proporcionou melhora no estado antioxidante de seres humanos saudáveis, quando comparado ao consumo agudo da versão não criocentrada.

Este estudo também avaliou o efeito da digestão simulada do extrato de erva-mate sobre o teor de fitoquímicos e as atividades antioxidante, antiproliferativa e citotóxica em células de carcinoma hepatocelular humano. Apesar dos compostos fenólicos, atividade antioxidante celular e antiproliferativa diminuírem após a digestão simulada, não foi observada variação na citotoxicidade do extrato de erva-mate nas células neoplásicas.

Diante do exposto, após ter sido verificada a aplicabilidade e a eficácia da tecnologia de criocentração no extrato aquoso de erva-mate *in vitro* e *in vivo*, sugere-se uma possível utilização do extrato criocentrado na indústria alimentícia e farmacêutica. A partir deste extrato criocentrado, rico em compostos bioativos e com elevado potencial antioxidante, pode-se, futuramente, desenvolver produtos alimentares, tais como bebidas e xaropes, enriquecidos com os compostos bioativos da erva-mate; utilizar o criocentrado como antioxidante natural na conservação de alimentos; encapsular o criocentrado como forma alternativa de consumo da erva-mate, aumentando assim o seu consumo pelas pessoas que não apreciam o seu gosto amargo.

Contudo, sugerem-se novos estudos de longo prazo que avaliem o potencial antioxidante do extrato aquoso de erva-mate criocentrado, considerando a alimentação completa dos indivíduos estudados, sem os interferentes metodológicos de estudos agudos.

Sugere-se também que novos estudos *in vivo* sejam conduzidos a fim de elucidar sobre o papel da digestão do extrato de erva-mate em suas atividades biológicas, elucidando assim os principais metabólitos que podem influenciar nas atividades quimiopreventivas do extrato. Desta forma, torna-se imprescindível a determinação do teor dos compostos fenólicos e de seus metabólitos a partir de análises de

identificação mais precisas, como por exemplo, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada com detector de massas.

Vale destacar que os resultados deste estudo geraram duas publicações e uma submissão de artigos científicos em periódicos internacionais de alto fator de impacto na área de Ciência dos Alimentos. Adicionalmente, solicitou-se o pedido de depósito de patente relacionado à aplicação da tecnologia de crioconcentração no extrato aquoso de erva-mate.

Ressalta-se ainda que a execução de parte deste estudo na Cornell University (NY/EUA), durante o período sanduíche, além de contribuir para a formação acadêmica e profissional, promoveu a internacionalização do Programa de Pós Graduação em Ciência dos Alimentos da UFSC, proporcionando futuras oportunidades de intercâmbio estudantil.

## APÊNDICE A – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS  
ALIMENTOS**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Resolução n. 196 de 10 de outubro de 1996, segundo o Conselho Nacional de Saúde

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa cujo título é “**Efeito da concentração da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na atividade antioxidante e avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate em indivíduos saudáveis**”. O consumo regular de erva-mate tem sido associado ao aumento da atividade antioxidante no organismo, o que está relacionado com a prevenção de diversas doenças crônicas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. No entanto, ainda não se sabe qual a concentração da infusão de erva-mate é suficiente e/ou necessária para verificar uma melhora no perfil antioxidante de seres humanos saudáveis. Além disso, pouco se sabe sobre a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate, os quais são os principais responsáveis pela atividade antioxidante da planta.

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o efeito do consumo agudo de infusão de erva-mate preparada em diferentes concentrações sobre a atividade antioxidante e verificar a biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate após o consumo agudo em indivíduos saudáveis.

As etapas e os procedimentos da pesquisa serão as seguintes:

- Restrição do consumo de frutas, vegetais, chás, bebidas alcoólicas, café e chocolate por 48 horas antes do consumo da infusão de erva-mate; Restrição de exercício físico 24 horas antes da coleta;
- Jejum de 10 horas antes da 1ª coleta sanguínea e consumo da infusão de erva-mate;

- Consumo da infusão de erva-mate;
- Coleta sanguínea, por profissional devidamente treinado, antes e 1 hora após o consumo de infusão de erva-mate.

Todas estas etapas serão realizadas no Laboratório de Leite e Derivados da USFC. Os alunos que aceitarem participar livremente do estudo receberão, ao final do estudo, orientações sobre alimentação saudável e sobre seu estado nutricional atual. Espera-se a produção de novos conhecimentos científicos, que possibilitem conduzir a implementação de estratégias, mediante incentivo do consumo infusão de erva-mate, rica em antioxidantes, que promovam uma diminuição do estresse oxidativo, com conseqüente redução do risco e incidência de diversas doenças crônicas não transmissíveis. Este estudo não trará nenhum risco para sua integridade física ou moral. Entretanto, poderá ocorrer dor durante a coleta sanguínea. Os materiais para coleta sanguínea serão descartáveis.

Garantimos que as informações fornecidas serão utilizadas apenas neste trabalho sem a identificação dos participantes. Sua participação é voluntária, podendo desistir a qualquer momento do estudo, sem qualquer conseqüência para você. Caso tenha alguma dúvida em relação ao estudo ou não quiser mais fazer parte do mesmo, pode entrar em contato com a pesquisadora principal, Brunna Cristina Bremer Boaventura, através do telefone (48) 3721-5366, (48) 9165-4005 ou email [brunnab@gmail.com](mailto:brunnab@gmail.com).

Eu, \_\_\_\_\_, fui esclarecido sobre a pesquisa “Efeito da concentração da infusão de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) na atividade antioxidante e avaliação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva-mate em indivíduos saudáveis” e aceito participar livremente da mesma.

Florianópolis, \_\_\_ de \_\_\_ de 2012.

---

Assinatura do Participante

---

Assinatura da Pesquisadora Principal  
Brunna Cristina Bremer Boaventura

---

Assinatura da Pesquisadora Responsável  
Renata Dias de Mello Castanho Amboni



## APÊNDICE B – Orientações gerais

### ORIENTAÇÕES GERAIS QUANTO À ALIMENTAÇÃO DURANTE O ESTUDO E QUANTO AOS PROCEDIMENTOS REALIZADOS NO DIA DO CONSUMO DA INFUSÃO DE ERVA-MATE.

- **Duas semanas antes de iniciar o estudo e durante todo o período do estudo (1 mês)** não é permitido ingerir suplementos nutricionais (vitaminas, complexos vitamínicos e outros do gênero), chimarrão ou chá mate;
- **Durante todo o estudo evitar** o consumo de medicamentos (ex: antiácidos, analgésicos, anti-inflamatórios, anti-histamínicos, diuréticos, entre outros), exceto anticoncepcional oral;
- **Durante todo o estudo manter** o mesmo estilo de vida quanto à alimentação e à atividade física;
- **Durante as 48 horas precedentes ao estudo**, não consumir frutas, verduras, sucos de frutas e verduras, óleo de coco, café, capuccino, chás em geral, chá mate, chimarrão, vinho e outras bebidas alcoólicas, energéticos, refrigerantes com cafeína (coca-cola, pepsi), nozes, castanhas, chocolate e medicamentos em geral (exceto anticoncepcional oral).
- **Durante as 24 horas precedentes ao estudo**, não fazer exercício físico;
- **Realizar jejum alimentar 10 horas** antes da coleta sanguínea e do consumo de infusão de erva-mate;

### *PROCEDIMENTOS NO DIA DA COLETA SANGUÍNEA E DO CONSUMO DA INFUSÃO DE ERVA-MATE:*

- No dia da coleta sanguínea e da ingestão da infusão de erva-mate, dirigir-se ao laboratório de Leite e Derivados, localizado no Bloco A do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, **no horário agendado previamente, \_\_\_\_:\_\_\_\_.**
- Após sua chegada ao laboratório você descansará por 10 minutos para a realização da coleta sanguínea. A coleta sanguínea será realizada de acordo com procedimentos padrões na veia intermédia do braço por profissional treinado;
- Após esta etapa você consumirá a de infusão de erva-mate;
- Será realizada uma nova coleta sanguínea 1 hora após o consumo da infusão de erva-mate;
- Durante o período entre as coletas sanguíneas você deverá permanecer sem fazer atividades exaustivas e sem consumir qualquer alimento ou bebida, inclusive água; Serão coletados 10 mL (2 tubos) em cada coleta sanguínea.



## ANEXO A – Artigo original “Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology”

BOAVENTURA et al. Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology. **Food Research International**. v.53, 686-692, 2013. doi: 10.1016/j.foodres.2012.07.042

Food Research International 53 (2013) 686–692



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)



### Enhancement of bioactive compounds content and antioxidant activity of aqueous extract of mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) through freeze concentration technology



Brunna Cristina Bremer Boaventura <sup>a</sup>, Aureanna Nairne Negrão Murakami <sup>a</sup>,  
Elane Schwinden Prudêncio <sup>a</sup>, Marcelo Maraschin <sup>b</sup>, Fábio Seigi Murakami <sup>c</sup>,  
Edna Regina Amante <sup>a</sup>, Renata Dias de Mello Castanho Amboni <sup>a,\*,8</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Department of Phytotechnology, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil

#### ARTICLE INFO

##### Article history:

Received 22 March 2012

Received in revised form 18 July 2012

Accepted 21 July 2012

##### Keywords:

Cryoconcentration

Yerba mate

Tea

Phenolic compounds

Methylxanthines

Antioxidant potential

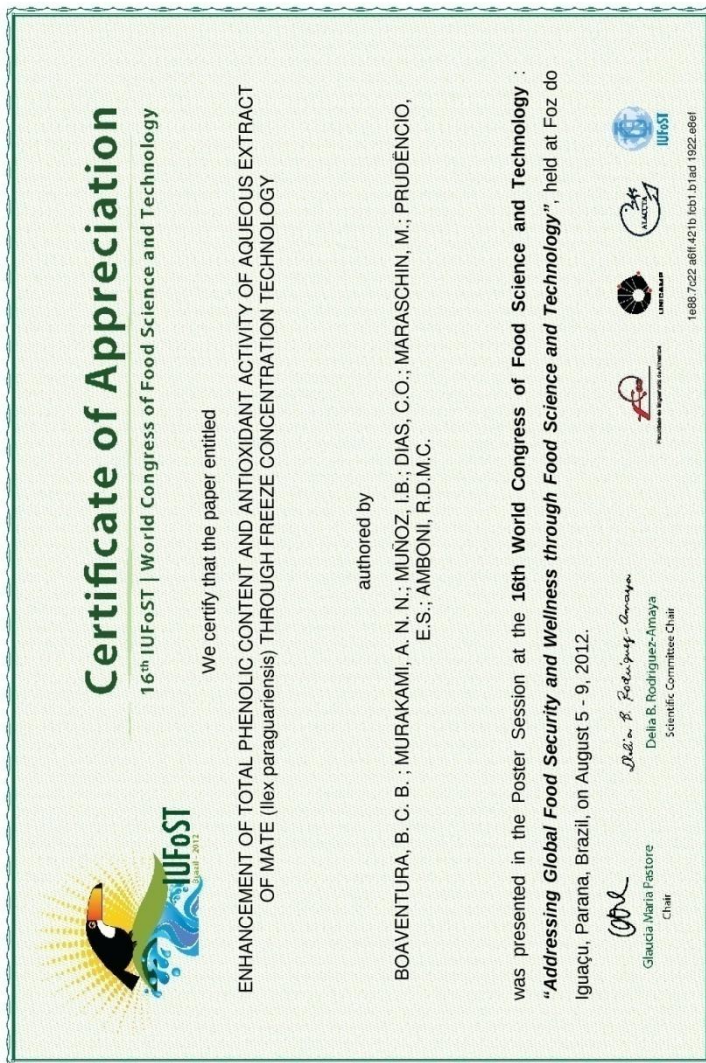
#### ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate the effects of freeze concentration of aqueous extract of mate leaves on the content of bioactive components and antioxidant activity of the concentrated fluid and the ice obtained. Five stages of freeze concentration were studied. In relation to the total dry matter content, the concentration factor increased eightfold by the end of the process. The concentrated fluid showed increasing values of phenolic compounds in all the freeze concentration stages. Although process efficiency reduced significantly in comparison with the first stage due to the retention of phenolic compounds in ice, it remained about 75% in all the stages. The isolated phenolic compounds detected by HPLC, such as chlorogenic acid, 3,5-dicaffeoylquinic acid, caffeic acid, p-coumaric acid, 3,4-dihydroxybenzoic acid and gallic acid, improved substantially in all freeze concentration stages. The methylxanthines caffeine and theobromine contents also increased significantly with the application of the freeze concentration procedure. The antioxidant activity of the concentrated fluid of each freeze concentration stage, measured by FRAP and DPPH assay, was significantly higher in comparison to that of the feed extract. Moreover, the values of both antioxidant assays were significantly correlated with the content of phenolic compounds and methylxanthines of the aqueous extract of mate. Freeze concentration is an effective technique to raise the content of bioactive components and enhance the antioxidant activity of aqueous extract of mate leaves.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.



## ANEXO B – Trabalho parcial apresentado no 16º IUFoST em Foz do Iguaçu-PR/Brasil





## ANEXO C – Comprovante de solicitação de depósito da patente do processo de crioconcentração do extrato aquoso de erva-mate

À Diretora do DIT/PRPE  
 Profa. Dra. Rozangela Curi Pedrosa



Assunto: Solicitação de Depósito de Patente

Senhora,

Eu, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, RG 2.952.333, 932.703.489-91, professora do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, encaminho a este Departamento os documentos abaixo relacionados, para dar início à avaliação de pertinência do pedido de depósito da Patente de Invenção ou Modelo de Utilidade denominada "Crioconcentração do extrato aquoso de erva mate"

Relação de documentos anexos:

	Material	Nº de páginas
( X )	Formulário de Avaliação de Pedido de Patente	2-15
( X )	Publicações relacionadas ao presente invento	16-46
( X )	Cópia de material de divulgação e/ou atestados de participação em eventos e/ou cópia de anais, onde o invento tenha sido divulgado/apresentado.	47-48
( )	Cópia do contrato de Direitos de Propriedade Industrial firmado entre a UFSC e Empresa(s) participante(s), quando for o caso.	
( X )	Outros documentos julgados pertinentes: - Resolução Normativa 0132008 de propriedade intelectual CNPq	49

Florianópolis, 25 de agosto de 2014.\*

Atenciosamente,

Renata de M. Castanho Amboni  
 Assinatura

**RECEBIDO**  
 EM 26/08/2014  
 João Carlos Vicente  
 Assistente em Administração - SARE 1968756  
 Departamento de Inovação Tecnológica  
 - Península de Pesquisa - PROPEQUFSC





**ANEXO D – Artigo original “Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals”**

BOAVENTURA et al. Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals. **LWT – Food Science and Technology**, 2015.

**De:** "LWT - Food Science & Technology" <[lwt@elsevier.com](mailto:lwt@elsevier.com)>  
**Data:** 22 de fevereiro de 2015 23:43:11 BRT  
**Para:** [ramboni@cca.ufsc.br](mailto:ramboni@cca.ufsc.br)  
**Assunto:** Your Submission

Ms. Ref. No.: LWT-D-14-01922R2  
Title: Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals  
LWT - Food Science and Technology

Dear Dr. Renata Dias de Mello Castanho Amboni,

I am pleased to inform you that your paper "Effect of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) infusion obtained by freeze concentration technology on antioxidant status of healthy individuals" has been accepted for publication in LWT - Food Science and Technology.

Below are comments from the editor and reviewers.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to LWT - Food Science and Technology.

Yours sincerely,

Rakesh K. Singh, Ph.D.  
Editor in Chief  
LWT - Food Science and Technology

Comments from the editors and reviewers:

Congratulation, your manuscript has been accepted for publication in LWT - Food Science and Technology. Thank you.

\*\*\*\*\*



**ANEXO E – Trabalho parcial apresentado no IFT 2013 *Annual Meeting and Food Expo*® em Chicago, IL/EUA**





## ANEXO F – Parecer do comitê de ética em pesquisas com Seres humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (CEPSH-UFSC)

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

### PROJETO DE PESQUISA

**Título:** Efeito da infusão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) na atividade antioxidante e avaliação da Área Temática: biodisponibilidade dos compostos presentes na erva mate em indivíduos saudáveis

**Pesquisador:** Renata Dias de Mello Castanho Amboni

**Versão:** 1

**Instituição:** Universidade Federal de Santa Catarina

**CAAE:** 02518512.2.0000.0121

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

**Número do Parecer:** 27839

**Data da Relatoria:** 28/05/2012

#### Apresentação do Projeto:

Este estudo será realizado em três momentos, sendo que em cada momento será feita uma intervenção com consumo agudo de infusão de erva mate em concentração diferente. O grupo de estudo será composto por voluntários, de ambos os sexos, regularmente matriculados, nos Programas de Pós-Graduação em Nutrição e Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC. Serão incluídos os indivíduos não fumantes, não usuários de suplementos vitamínicos e não portadores de quaisquer patologias, processos infecciosos ou inflamatórios visíveis ou conhecidos. A amostra será de conveniência, constituída de todos os alunos voluntários que aceitarem participar e que cumprirem todas as etapas do estudo. Os participantes integrarão um único grupo, sendo eles mesmos o seu próprio controle (sistema pareado). Cada participante participará dos três momentos do estudo ingerindo as três diferentes concentrações de infusão de erva mate. Será realizado um período de washout de duas semanas entre a ingestão das diferentes concentrações de infusão de erva mate. Os participantes serão orientados, verbalmente e por escrito, a não consumirem frutas, vegetais, chás, bebidas alcoólicas, café e chocolate nas 48 horas que antecederem a aplicação do protocolo experimental. Serão fornecidas também aos participantes informações, verbais e por escrito, de todos os procedimentos a serem realizados no dia do consumo da infusão de erva mate. A hipótese a ser testada é de que quanto maior a concentração da infusão de erva mate, maior será o seu potencial antioxidante em humanos saudáveis.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliação do efeito do consumo agudo de infusão de erva mate (*Ilex paraguariensis*) preparada em diferentes concentrações sobre a atividade antioxidante e verificação da biodisponibilidade dos compostos fenólicos presentes na erva mate após consumo agudo em indivíduos saudáveis. Objetivos específicos: Determinar a atividade antioxidante *in vitro*, o conteúdo de fenólicos totais e isolados das diferentes concentrações de infusão de erva mate; Analisar o efeito do consumo agudo de diferentes concentrações de infusão de erva mate na atividade antioxidante plasmática total, glutationa reduzida, superóxido dismutase, catalase, oxidação lipídica plasmática e oxidação de proteínas; Verificar a biodisponibilidade dos principais compostos fenólicos presentes na erva mate após o consumo agudo da infusão de erva mate.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos mencionados no corpo do projeto e no texto de submissão são que os procedimentos considerados invasivos serão a medida do peso e a altura, aplicação dos três recordatórios de 24 horas e as coletas de sangue e de urina. A medida do peso e altura e aplicação dos R24h será realizada pela pesquisadora Brunna Cristina Bremer Boaventura. A coleta sanguínea será realizada por profissional devidamente treinado e com prática na coleta sanguínea. No que se refere aos benefícios é mencionado que os voluntários que aceitarem participar livremente do estudo receberão, ao final do estudo, orientações sobre alimentação saudável e sobre seu estado nutricional atual.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo bem elaborado e bem delineado. O pesquisador principal (responsável segundo a Res. CNS 196/96) tem a competência bem estabelecida e tem relevância social e acadêmica. Os objetivos propostos estão condizentes com a metodologia empregada e os preceitos éticos estão

previstos na condução do projeto.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A documentação apresentada está de acordo com o exigido pelas normas vigentes e o TCLE está adequadamente escrito com as informações necessárias para que os sujeitos da pesquisa tenham a autonomia das decisões no que diz respeito à pesquisa proposta, assegurada na medida do razoável.

**Recomendações:**

Nenhuma recomendação se faz necessária para este projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Recomenda-se ao CEPESH- UFSC a aprovação do presente estudo.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 28 de Maio de 2012

---

Assinado por:

Washington Portela de Souza

**ANEXO G – Trabalho parcial apresentado no “*First International Workshop: Innovation in Food Science*” em Florianópolis, SC/Brasil.**

