

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
DOUTORADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

JÂNIO SOUSA SANTOS

OTIMIZAÇÃO MULTI-ANALÍTICA DE UM EXTRATO AQUOSO MISTO A PARTIR
DE *Camellia sinensis* Var *sinensis*, *Ilex paraguariensis* E *Aspalathus linearis*:
PROPRIEDADES QUÍMICAS, FUNCIONAIS E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

PONTA GROSSA
2020

JÂNIO SOUSA SANTOS

OTIMIZAÇÃO MULTI-ANALÍTICA DE UM EXTRATO AQUOSO MISTO A PARTIR
DE *Camellia sinensis* Var *sinensis*, *Ilex paraguariensis* E *Aspalathus linearis*):
PROPRIEDADES QUÍMICAS, FUNCIONAIS E APLICAÇÃO TECNOLÓGICA

Tese de doutorado apresentada à banca examinadora de defesa como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato

Coorientador: Dr. Heitor Daguer

PONTA GROSSA
2020

Santos, Jânio Sousa
S237 Otimização multi-analítica de um extrato aquoso misto a partir de *Camellia sinensis* var *sinensis*, *Ilex paraguariensis* e *Aspalathus linearis*: propriedades químicas, funcionais e aplicação tecnológica / Jânio Sousa Santos. Ponta Grossa, 2020.
155 f.

Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Área de Concentração: Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Granato.

Coorientador: Prof. Dr. Heitor Daguer.

1. Composição fenólica. 2. Atividade antioxidante. 3. Otimização estatística. 4. Citotoxicidade. 5. Análise sensorial. I. Granato, Daniel. II. Daguer, Heitor. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Ciências e Tecnologia de Alimentos. IV.T.

CDD: 664

TERMO DE APROVAÇÃO

JÂNIO SOUSA SANTOS

“Otimização multi-analítica de um extrato aquoso misto a partir de *Camellia sinensis* Var *sinensis*, *Ilex paraguariensis* e *Aspalathus linearis*: Propriedades químicas, funcionais e aplicação tecnológica”.

Tese aprovada como requisito para obtenção do grau de Doutor no Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pela seguinte banca examinadora:

Orientador:



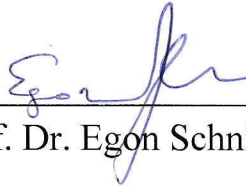
Prof^a. Dr^a. Neiva Deliberati Rosso - UEPG - PR



Prof^a. Dr^a. Rosemary Hoffmann Ribani - UFPR - PR



Prof. Dr. André Carlos Auler - UFPR - PR



Prof. Dr. Egon Schnitzler - UEPG- PR



Prof^a. Dr^a. Renata Dinnies Santos Salem - UEPG- PR

Ponta Grossa, 10 de março de 2020.

Dedico aos meus pais, Maria de Nazaré Sousa Silva e Francelino Fernandes dos Santos, por todo incentivo, apoio e amor incondicionalmente oferecido durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me concedido a graça divina conhecida como vida, por ter me dado força, saúde e sabedoria para que eu pudesse me manter firme em meus objetivos e por sempre estar ao meu lado nos momentos mais difíceis de minha jornada até aqui.

À minha mãe Maria de Nazaré Sousa Silva, que eu tanto amo e sempre amarei. Por todo esforço e luta empregado para que eu pudesse estar aqui, pelos seus conselhos e por todos os incentivos a mim oferecidos, para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida.

Ao meu bom e velho pai, Francilino Fernandes dos Santos, por quem eu tenho muito apreço, carinho respeito e amor. Por seu esforço incontestável, por ser um pai amigo e companheiro em todos os momentos.

À minha esposa Leonária dos Santos Nascimento, que sempre me apoiou nas realizações de meus sonhos e que jamais mediu esforços, para ajudar que eu alcançasse meus objetivos.

Ao meu orientador prof. Dr. Daniel Granato, pelas orientações, não só para execução do presente trabalho, mas sim, para toda minha vida acadêmica. Sou imensamente grato pelo incentivo, apoio e confiança, que foram fatores importantíssimos para realização e conclusão deste trabalho. Uma pessoa dedicada e detentora de um grande conhecimento, a qual eu tenho ampla admiração pela forma que trabalha, demonstrando entusiasmo e amor pela pesquisa.

À Prof^a Dr^a Neiva Deliberali Rosso, por todo apoio prestado do primeiro dia que nos conhecemos até hoje, pelas dicas e conselhos a mim concedidos, no âmbito acadêmico e pessoal, por todas as técnicas repassadas e auxílios no entendimento de estruturas e reações químicas, além de todas contribuições imensuráveis durante os anos que estive na UEPG.

Ao meu coorientador Dr. Heitor Daguer (MAPA-SC) e aos parceiros Prof. Dr. Adriano Gomes da Cruz (IFRJ), Prof. Dr. Anderson de Souza Sant'Ana (UNICAMP), Prof. Dr. Domingos Savio Nunes (UEPG), Prof^a. Dr^a. Luciana Azevedo (UNIFAL), Prof^a. Dr^a. Mariza Boscacci Marques (UEPG), Prof^a. Dr^a. Maria Inés Genovese (USP), Dr^a. Alice Fujita (USP), pelas contribuições prestadas no desenvolvimento do presente estudo.

Aos meus colegas Graziela Bragueto Escher, Marina Fidelis e Pablo Inocêncio Monteiro, pela parceria e todo apoio prestado durante o doutorado, o qual foi crucial para eu conseguir concluir, mais essa fase de minha vida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação Araucária, pela bolsa de estudos de doutorado.

A todos meu muitíssimo obrigado!

RESUMO

Atualmente é notório um aumento da procura por parte dos consumidores por produtos naturais com menor teor ou ausência de aditivos químicos sintéticos. Desta forma, objetivo do presente estudo foi otimizar uma formulação de bebida orgânica mista composta por chá branco (*Camellia sinensis* var *sinensis*), erva mate tostada (*Ilex paraguariensis*) e rooibos vermelho (*Aspalathus linearis*) com os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante maximizados, avaliar funcionalidades em meio químico e biológico e aplicar o extrato otimizado liofilizado em um gelado comestível. Uma otimização simultânea foi aplicada em torno do conteúdo fenólico total, capacidade inibitória da lipoperoxidação, poder quelante do Fe^{2+} , capacidade redutora do cobre e intensidade de gosto umami. A formulação otimizada apresentou 82,9% chá branco + 10,9% chá mate + 6,2% chá rooibos, com uma função desejável (valor d) de 0,7905. Este chá otimizado inibiu 64% da lipoperoxidação *in vitro* e apresentou um alto conteúdo fenólico, especialmente caempferol, (+) - catequina, (-) - epicatequina, quercetina-3-rutinoside, (-) - epigalocatequina e (-) - epicatequina-2-O-galato. De fato, o efeito antioxidante foi confirmado pela diminuição de 30% da geração de espécies de oxigênio em células de carcinoma de hepatoma humano (HepG2, 100 e 240 $\mu\text{g/mL}$). No ensaio de viabilidade celular, o GI_{50} para células epiteliais do adenocarcinoma colo-retal humano (Caco-2) foi de cerca de 547 $\mu\text{g/mL}$ e 481 $\mu\text{g/mL}$ para HepG2. O processo de pasteurização (65 °C/30 min) não afetou o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante da formulação otimizada do chá. Uma comparação multivariada foi aplicada para comparar a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, a atividade citotóxica/antiproliferativa frente a células cancerosas, a atividade inibitória da α -amilase, α -glucosidase e enzima conversora da angiotensina I, bem como capacidade de proteção da cisão em DNA de extratos aquosos de *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* e do extrato otimizado. Os extratos de *Camellia sinensis* e o otimizado apresentaram maior atividade antioxidante, maior capacidade em inibir a α -amilase e proliferação das células HCT8 e maior capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu. O extrato de *Aspalathus linearis* apresentou menor capacidade em inibir a α -glucosidase, porém apresentou capacidade de inibir a oxidação do LDL similar ao extrato de *Camellia sinensis*. Já o extrato de *Ilex paraguariensis* apresentou a maior inibição da lipoperoxidação de homogenato de cérebro de ratos Wistar, atividade anti-hipertensiva e inibição da proliferação de células A549. Na sequência, o extrato otimizado foi aplicado em gelados comestíveis adicionados de proteína animal (soro do leite) e/ou vegetal (arroz). Os gelados comestíveis adicionados do extrato otimizado liofilizado apresentaram maior conteúdo fenólico total em relação aos controles (sem adição). O gelado comestível formulado com proteína animal e extrato otimizado apresentou a maior capacidade antioxidante, em relação ao poder de redução do ferro e captura do radical DPPH, respectivamente. Em relação à análise sensorial, os maiores índices de aceitação, 91 e 88% foram observados nas formulações adicionadas de proteína animal sem e com extrato otimizado, respectivamente.

Palavras-Chave: Composição fenólica; Atividade antioxidante, Otimização estatística; Citotoxicidade; Análise sensorial

ABSTRACT

Currently, there is a notable increase in consumer demand for natural products with a lower content or absence of synthetic chemical additives. Thus, the aim of the present study was to optimize a mixed organic drink formulation consisting of white tea (*Camellia sinensis* var *sinensis*), toasted yerba mate (*Ilex paraguariensis*) and red rooibos (*Aspalathus linearis*) with the maximum levels of phenolic compounds and antioxidant activity, evaluate functionalities in chemical and biological environment and apply the optimized lyophilized extract in an edible ice cream. Simultaneous optimization was applied around the total phenolic content, lipoperoxidation inhibitory capacity, Fe²⁺ chelating power, copper reducing capacity and umami flavor intensity. Which resulted in an optimized formulation containing 82.9% white tea + 10.9% matte tea + 6.2% rooibos tea. With a desirable function (d value) of 0.7905. This optimized tea inhibited 64% of lipoperoxidation *in vitro* and had a high phenolic content, especially caempferol, (+)- catechin, (-)-epicatechin, quercetin-3-rutinoside, (-)-epigallocatechin and (-)-epicatechin- 2-O-gallate. In fact, the antioxidant effect was confirmed by a 30% decrease in the generation of oxygen species in human hepatoma carcinoma cells (HepG2, 100 and 240 µg/mL). In the cell viability assay, the GI50 for human colorectal adenocarcinoma epithelial cells (Caco-2) was about 547 µg/mL and 481 µg/mL for HepG2. The pasteurization process (65 °C/30 min) did not affect the total phenolic content and the antioxidant activity of the optimized formulation of the tea. A multivariate comparison was applied to compare the antioxidant activity *in vitro* and *ex vivo*, the cytotoxic/antiproliferative activity against cancer cells, the inhibitory activity of α-amylase, α-glucosidase and angiotensin I converting enzyme, as well as the ability to protect against DNA scission of aqueous extracts of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* and the optimized extract. The extracts of *Camellia sinensis* and the optimized showed greater antioxidant activity, greater capacity to inhibit α-amylase and HCT8 cell proliferation and greater capacity to reduce the reagent Folin-Ciocalteu. The *Aspalathus linearis* extract showed less capacity to inhibit α-glucosidase, however it showed the ability to inhibit LDL oxidation similar to the *Camellia sinensis* extract. The *Ilex paraguariensis* extract, on the other hand, showed the greatest inhibition of the lipoperoxidation of Wistar rat brain homogenate, antihypertensive activity and inhibition of A549 cell proliferation. Then, the optimized extract was applied to edible ice creams with animal (whey) and/or vegetable (rice) proteins. The edible ice creams added to the lyophilized optimized extract showed higher total phenolic content compared to the controls (without addition). The edible ice cream formulated with animal protein and optimized extract showed the highest antioxidant capacity, in relation to the power of reducing iron and capturing the DPPH radical, respectively. In relation to sensory analysis, the highest acceptance rates, 91 and 88% were observed in formulations added with animal protein without and with optimized extract, respectively.

Keywords: Phenolic composition; Antioxidant activity, Statistical optimization; Cytotoxicity; Sensory analysis

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Quantidade média em toneladas de chá produzida no mundo entre 2013-2014	18
Figura 2 - Crescimento em percentual da produção de chá por região no período de 2004 - 2014	19
Figura 3 - Principais etapas de processamento de diferentes tipos de chás de <i>Camellia sinensis</i>	21
Figura 4 - Rota metabólica simplificada dos metabólitos secundários em vegetais	27
Figura 5 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos.....	29
Figura 6 - Exemplo dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos	30
Figura 7 - Estrutura típica de um flavonoide	31
Figura 8 - Estruturas moleculares das principais subclasses de flavonoides	32
Figura 9 - Gráficos de contorno para mostrar os efeitos dos chás branco, mate e rooibos no conteúdo fenólico total (A), flavonoides totais (B), taninos condensados (C), flavonóis (D), <i>orto</i> -difenois, (E) , CUPRAC (F), capacidade redutora total (G) atividade de eliminação do radicais ABTS ⁺ (H), atividade quelante de ferro (I), inibição da lipoperoxidação (J), amargor (K), acidez (L), salinidade (M) e umami (N) dos chás branco, mate torrado ,rooibos e chá misto otimizado	72
Figura 10 - Perfis para valores previstos e desejabilidade	74
Figura 11 - Avaliação sensorial dos chás de <i>Camellia sinensis</i> , <i>Ilex paraguariensis</i> , <i>Aspalathus linearis</i> e OT - Chá otimizado (82,9% <i>Camellia sinensis</i> + 10,9% <i>Ilex paraguariensis</i> + 6,2% <i>Aspalathus linearis</i>).....	78
Figura 12 - Monitoramento do conteúdo fenólico total (A) e da capacidade redutora total (B) do chá otimizada antes e após da pasteurização (63 °C por 30 min).	79
Figura 13 – Citotoxicidade celular <i>in vitro</i> de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) (A, C, E) e de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (B, D, F).....	81
Figura 14 - Resultados da medição intracelular de ERO em células HepG2 e Caco-2 por espectrofluorimetria	83

Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos aquosos da <i>Camellia sinensis</i> , <i>Ilex paraguariensis</i> , <i>Aspalathus linearis</i> e extrato otimizado (82,9% <i>C. sinensis</i> + 10,9% <i>I. paraguariensis</i> + 6,2% <i>A. linearis</i>).....	101
Figura 16 - Avaliação da capacidade inibitória da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos Wistar dos extratos aquosos liofilizados de <i>Camellia sinensis</i> (A), <i>Ilex paraguariensis</i> (B), <i>Aspalathus linearis</i> (C) e extrato otimizado composto por 82,9% <i>C. sinensis</i> + 10,9% <i>Ilex paraguariensis</i> + 6,2% <i>Aspalathus linearis</i> (D).	102
Figura 17 - Perfil antihemolítico dos extratos aquosos de <i>C. sinensis</i> (A), <i>I. paraguariensis</i> (B), <i>A. linearis</i> (C) e extrato otimizado (D) com tipagem O ⁺	105
Figura 18 - Efeitos de extratos de <i>C. sinensis</i> (A), <i>I. paraguariensis</i> (B), <i>A. linearis</i> (C) e otimizado (D) sobre a atividade enzimática da α -glucosidase.....	107
Figura 19 - Efeitos de extratos de <i>C. sinensis</i> (A), <i>I. paraguariensis</i> (B), <i>A. linearis</i> (C) e otimizado (D) sobre a atividade enzimática da α -amilase	108
Figura 20 - Inibição da oxidação induzida por LDL-colesterol (A) e os efeitos dos extratos liofilizados de <i>C. sinensis</i> , <i>I. paraguariensis</i> , <i>A. linearis</i> e extrato otimizado (OT) na oxidação de LDL-colesterol (B).....	110
Figura 21 - Capacidade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA), dos extratos aquosos	112
Figura 22 - Capacidade de absorção de radicais de oxigênio, dos extratos aquosos.....	113
Figura 23 - Inibição dos extratos <i>C. sinensis</i> , <i>I. paraguariensis</i> , <i>A. linearis</i> , extrato otimizado liofilizados e padrão de catequina contra cisão de DNA induzida por radical peroxil, comparação estatística (A) e eletroforese (B)	114
Figura 24 - Análise por componentes principais dos extratos aquosos.....	115
Figura 25 - Conteúdo fenólico total e taninos condensados totais dos gelados comestíveis	126
Figura 26 - Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos gelados comestíveis	128
Figura 27 - Comparação entre as formulações com e sem adição de extrato otimizado em relação a aceitação global.....	130
Figura 28 - Índice de aceitação dos gelados comestíveis enriquecidos com proteína animal e/ou vegetal	131

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Proporções entre os chás para formulação das infusões	42
Tabela 2 - Parâmetros do método CLAE-MS para quantificação de compostos fenólicos em chás.....	47
Tabela 3 - Composição química da mistura dos extratos de chá branco, mate e roibos e suas combinações e misturas.....	57
Tabela 4 - Quantificação de compostos fenólicos da mistura entre extratos aquosos branco, mate e roibos utilizando LC-ESI-MS/MS.....	61
Tabela 5 - Capacidade antioxidante redutora de íons metálicos, sequestradora de radical e quelante de metal de transição da mistura entre chá branco, mate e roibos.....	63
Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e roibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes	66
Tabela 7 - Valores previstos e experimentais para a mistura ternária otimizada de chás branco (82,9%), mate (10,9%) e roibos (6,2%).....	75
Tabela 8 - Perfil de sabor instrumental dos chás branco, mate e roibos, e suas misturas binária e ternária	77
Tabela 9 - Espectrometria de massa para transições de MRM no modo positivo [M + H] + e negativo [M - H] - *	90
Tabela 10 - Composição química de extratos aquosos de <i>Camellia sinensis</i> , <i>Ilex paraguariensis</i> , <i>Aspalathus linearis</i> e extrato otimizado analisado por LC-ESI-MS/MS.....	99
Tabela 11 - Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de <i>C. sinensis</i> , <i>I. paraguariensis</i> , <i>A. linearis</i> e otimizado	103
Tabela 12 - Formulações dos gelados comestíveis	121
Tabela 13 - Composição proximal e propriedades físico-químicas dos gelados comestíveis adicionados de proteína animal e/ou vegetal e extrato misto liofilizado.....	124
Tabela 14 – Valores médios e desvio padrão dos atributos sensoriais odor, sabor, consistência e cor atribuídos aos gelados comestíveis.	129

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
OBJETIVO GERAL	16
CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.2 CHÁ BRANCO (<i>Camellia sinensis</i>)	19
1.3 CHÁ MATE (<i>Ilex paraguariensis</i>)	22
1.4 ROOIBOS (<i>Aspalathus linearis</i>)	24
1.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS	26
1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS	28
1.6.1 Ácidos fenólicos	30
1.6.2 Flavonoides	31
1.7 ESPÉCIES REATIVAS.....	32
1.8 ANTIOXIDANTES	33
1.9 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS.....	36
CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO MULTI-ANALÍTICA DE UMA BEBIDA MISTA COMPOSTA POR CHÁ BRANCO, MATE E ROOIBOS: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA	38
2.1 INTRODUÇÃO	39
2.2.1 Materiais.....	41
2.2.1.1 Produtos químicos.....	41
2.2.1.2 Matéria prima	41
2.2.2 Planejamento experimental e preparação das infusões	42
2.2.3 Caracterização química dos extratos	43
2.2.3.1 Quantificação dos compostos fenólicos totais.....	413
2.2.3.2 Quantificação dos flavonoides totais	413
2.2.3.3 Quantificação de taninos condensados totais	414
2.2.3.4 Quantificação de flavonóis	414
2.2.3.5 Quantificação de orto-difenólicos	415
2.2.3.6 Quantificação do conteúdo fenólico individual por CLAE/MS.....	413
2.2.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	48
2.2.4.1 Capacidade antioxidante de redução frente ao íon cúprico (CUPRAC)	418
2.2.4.2 Atividade antioxidante da capacidade redutora total (CRT)	419

2.2.4.3 Atividade antioxidante frente a captura do radical ABTS ⁺	419
2.2.4.4 Poder antioxidante de inibição da lipoperoxidação	50
2.2.4.4 Poder quelante do ferro.....	50
2.2.5 Atividade antimicrobiana	51
2.2.6 Perfil de sabor instrumental.....	52
2.2.7 Aceitação sensorial	52
2.2.8 Efeito da pasteurização nos fenólicos e atividade antioxidante.....	53
2.2.9 Ensaio biológico.....	53
2.2.9.1 Citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	53
2.2.9.2 Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares	54
2.2.10 Análise de dados e otimização estatística.....	54
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
2.3.1 Classes de compostos fenólicos	55
2.3.2 Composição fenólica individual CLAE-MS	59
2.3.3 Atividade antioxidante	62
2.3.4 Correlação.....	64
2.3.5 Metodologia de superfície de resposta e otimização.....	65
2.3.6 Atividade antimicrobiana	75
2.3.7 Perfil de sabor instrumental e análise sensorial	76
2.3.8 Efeito da pasteurização	78
2.3.9 Citotoxicidade celular <i>in vitro</i>	79
2.3.10 Medição de EROs intracelular	82
2.4 CONCLUSÃO.....	84
CAPÍTULO 3 - UM NOVO CONCEITO ANALÍTICO BASEADO EM QUÍMICA E	
TOXICOLOGIA PARA ANÁLISE DE EXTRATOS DE ERVAS: DA	
COMPOSIÇÃO FENÓLICA À BIOATIVIDADE	85
3.1 INTRODUÇÃO	86
3.2.1 Material químico e linhagens celulares	87
3.2 ERVAS	88
3.2.3 Preparo das infusões.....	88
3.2.4 Conteúdo fenólico por LC-ESI-MS/MS.....	88
3.2.5 Atividade antioxidante química.....	92
3.2.6 Atividade antioxidante em meio biológico <i>in vitro</i>	92
3.2.7 Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	93

3.2.8 Efeito antihemolítico <i>in vitro</i>	93
3.2.9 Inibição da α -amilase e α -glucosidase <i>in vitro</i>	94
3.2.10 Capacidade de inibição da oxidação do colesterol LDL	95
3.2.11 Atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA)	96
3.2.12 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)	96
3.2.13 inibição da cisão do DNA induzida por radical peroxil.....	96
3.2.14 Análises dos dados	97
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.3.1 Conteúdo fenólicos por LC-ESI-MS/MS	98
3.3.2 Atividade antioxidante química.....	99
3.3.3 Atividade antioxidante em meio biológico <i>in vitro</i>	101
3.3.4 Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	102
3.3.5 Efeito antihemolítico <i>in vitro</i>	103
3.3.6 Inibição da α -amilase e α -glucosidase <i>in vitro</i>	106
3.3.7 – Capacidade de inibição da oxidação do colesterol LDL	108
3.3.8 Atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA)	111
3.3.9 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)	112
3.3.10 Inibição da cisão do DNA induzida por radical peroxil.....	113
3.3.11 Correlação pela análise por componentes principais	114
3.4 CONCLUSÃO.....	116

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO MISTO LIOFILIZADO

COMPOSTO POR *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, E *Aspalathus linearis* NAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DE GELADOS COMESTÍVEIS

ADICIONADO DE PROTEÍNAS	117
4.1 INTRODUÇÃO	118
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	119
4.2.1 Reativos químicos	119
4.2.2 Material vegetal e obtenção do extrato misto	120
4.2.3 Perfil fenólico e antioxidante do extrato otimizado liofilizado.....	120
4.2.4 Preparo dos gelados comestíveis	120
4.2.5 Composição proximal das formulações.....	121
4.2.6 Compostos fenólicos totais, taninos condensados totais e atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos gelados comestíveis.....	122

4.2.7 Análise sensorial	122
4.2.8 Análise estatística	123
4.3 RESULTADOS	123
4.3.1 Caracterização fenólica e antioxidantes do extrato misto liofilizado (EML)	123
4.3.2 Composição proximal e propriedades físico-químicas dos gelados comestíveis.....	124
4.3.3 Composição fenólica total e taninos condensados do gelado comestível	125
4.3.4 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos gelados comestíveis.....	127
4.3.5 Análise sensorial	129
REFERÊNCIAS.....	133
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE:	
65493717.9.0000.0105)	151
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	152
ANEXO C - CARTA DE APROVAÇÃO	154
ANEXO D - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE:	
94830318.1.0000.0105)	155

INTRODUÇÃO

É fato que os chás se encontram entre as bebidas mais populares e largamente consumidas em todo o mundo. O consumo de chás, seja na forma de sachê ou bebidas prontas para o consumo, vem crescendo a cada dia no Brasil. Durante a última década, houve um aumento no consumo de aproximadamente 30% em todo o mundo. Boa parte deste aumento é devido as funcionalidades apresentadas por alguns chás que são tratadas por muitos autores como funções benéficas a saúde, além de fatores sensoriais, como aromas atraentes e sabores suáveis (DA SILVEIRA et al., 2014; ROSSI; BASSETT; SAMMÁN, 2018)

Alguns chás fazem parte da cultura de uma determinada população. Os chás de *Camellia sinensis* são parte cultural de populações asiáticas. Os quais são produzidos a partir da *Camellia sinensis* (L.) Kuntze (Theaceae), uma planta originária da Ásia, e é amplamente cultivada e consumida no Sri Lanka, Índia, China, Japão, Taiwan e em muitos outros países tropicais e subtropicais (SHARANGI, 2009). Nos últimos 10 anos, ocorreu o desenvolvimento e lançamento de diferentes chás comerciais produzidos a partir de folhas de *C. sinensis*, (vermelho, amarelo, preto, oolong, *pu-erh*, e branco) e tem aumentado o consumo em muitos países, por todo o mundo (GRANATO et al., 2014). Entre as diversas variedades de chás de *C. sinensis*, o chá branco merece destaque por conter a maior atividade antioxidante frente aos demais tipos de chás da mesma planta (ZIELINSKI et al., 2015).

Chá mate ou simplesmente mate, é uma bebida amplamente consumida em países latino-americanos do sul, principalmente no Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil. Essa bebida está ganhando aceitação no mercado mundial de chás, incluindo os Estados Unidos e Europa devido às suas propriedades sensoriais. Este chá é fabricado a partir da infusão de folhas secas de *Ilex paraguariensis* St. Hilaire, uma planta da família *Aquifoliaceae* típica de regiões subtropicais e nativa da América do Sul (DA SILVEIRA, 2016).

O chá de rooibos fermentado é produzido a partir de um arbusto leguminoso africano, o *Aspalathus linearis*, o qual tem por característica ser uma bebida ausente de cafeína e que contém baixo teor de taninos, o que lhe proporciona gosto adocicado e suave, com aroma de mel, flor, caramelo (KOCH et al., 2012). A presença da diidrocalcona aspalatina, encontrada unicamente nessa espécie, a torna especial frente a outros chás. Esse marcador químico é tido como parâmetro de qualidade no

produto comercial (KRAFCZYK; GLOMB, 2008).

Estudos demonstram que o consumo de chás e compostos fenólicos de outras matrizes tem sido associado com múltiplos efeitos benéficos, como hepatoproteção (ZHANG et al., 2014), efeito antioxidante *in vitro* (PELUSO; SERAFINI, 2017) e *in vivo* (BOAVENTURA et al., 2012), ação anti-inflamatória (LUZ et al., 2016), antihemolítica (SANTOS et al., 2016) e anti-hipertensiva (SHAW; WU; WANG, 2017), dentre outras. Ervas de diferentes origens botânicas podem apresentar distintas funcionalidades, desta forma a obtenção de um extrato misto de ervas mostra-se interessante pela possibilidade de se obter, em um único extrato, funcionalidade única ou até mesmo maximizada.

Por meio da pesquisa realizada no dia 14 de junho de 2017 acerca da anterioridade no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) (palavras chaves: chá funcional, bebida multicultural e mistura de chás) e por meio da Classificação Internacional de Patentes, IPC, (códigos A 23F 3/00, A61K 36/81, A23F 3/22, A 23F 3/16, A23L 2/44), nenhuma das invenções encontradas (BR 10 2015 004792 4; PI 0700195-9; PI 0515610-6; PI 0008074-8; PI 0701881-9; BR 11 2015 020691 3; BR 10 2014 001065 3; BR 11 2015 029503 7) refere-se ao desenvolvimento de uma bebida mista composta por com chá branco (*Camellia sinensis* var. *sinensis*), mate tostado (*Ilex paraguariensis*) e rooibos fermentado (*Aspalathus linearis*).

De forma análoga e complementar, não há registros de inventos assim como é ausente na literatura científica estudos que proponham o desenvolvimento de uma bebida com conteúdo fenólico e atividade funcional *in vitro* maximizado por meio da aplicação de ferramentas matemáticas. Desta forma, o desenvolvimento de uma bebida mista que apresente elevada atividade antioxidante, aceitação sensorial, e teor de compostos fenólicos é de interesse científico, industrial e de consumidores que buscam uma alimentação mais saudável. Portanto, a presente proposta abrange exatamente essa vertente, contribuindo tanto para o conhecimento científico quanto para as aplicações tecnológicas das espécies vegetais utilizadas.

OBJETIVO GERAL

Otimizar uma formulação de bebida orgânica mista composta por chá branco (*Camellia sinensis* var *sinensis*), erva mate tostada (*Ilex paraguariensis*) e roibos vermelho (*Aspalathus linearis*) com os teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante maximizados, avaliar funcionalidades em meio químico e biológico e aplicar o extrato otimizado liofilizado em um gelado comestível.

CAPÍTULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E PRODUÇÃO DE CHÁS

Os chás estão entre as bebidas mais consumidas no mundo. Esse tipo de bebida, além de ser reconhecida por sua variedade de sabores e aromas, também é considerada saudável. Do início do seu consumo até os dias atuais, essa bebida é de preferência de pessoas que buscam hábitos de vida saudáveis (YANG; KONG, 2016; MICEK et al., 2018; LI et al., 2018). Diby, Kahia e Kouamé (2017) relatam que, historicamente, há indícios do consumo de chá na China há mais de 5000 anos, sendo que seu consumo era voltado para cura de doenças. Com o passar do tempo, o consumo dessa bebida tornou-se popular em todos os continentes por questões nutricionais e culturais. Os mesmos autores afirmam que o consumo de chás se tornou popular no século XVII após sua introdução na Índia pelos britânicos. Atualmente, o consumo de chá assim como a produção, encontram-se difundidos por todo o mundo. Já são disponíveis no mercado diversas formas de chás, dos sachês às bebidas prontas para o consumo.

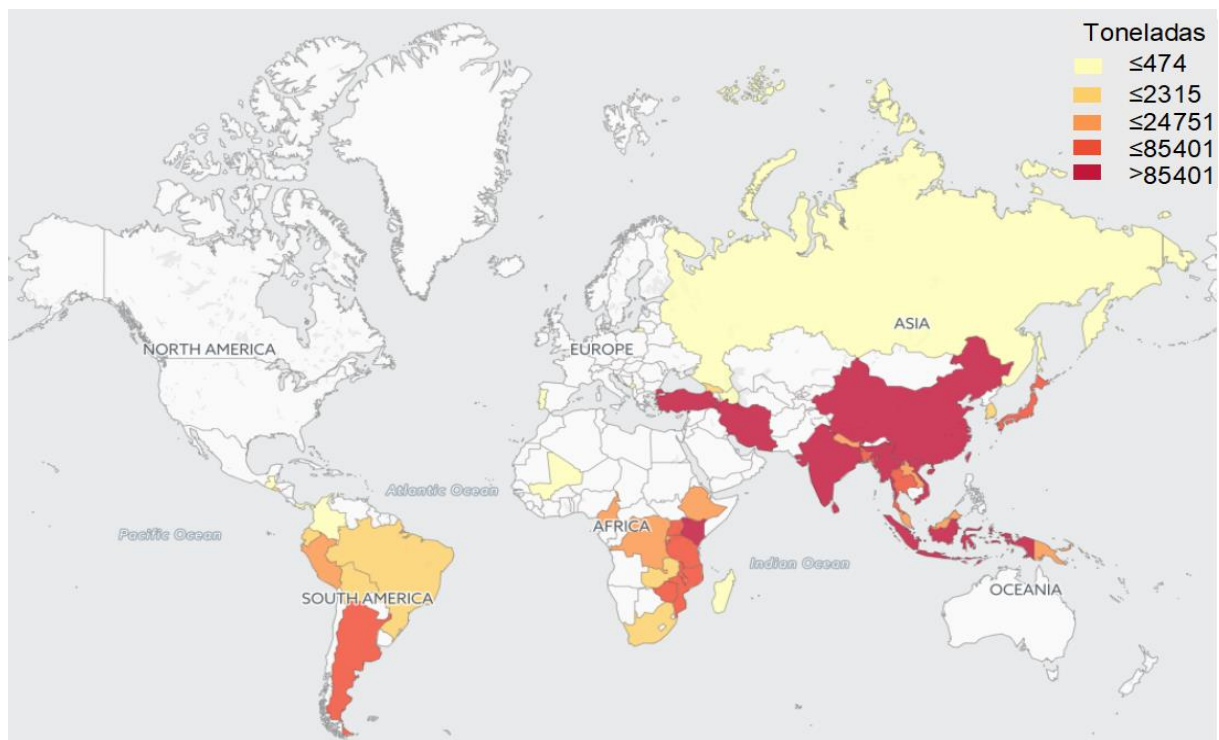
No Brasil, a Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) fixou a identidade e as características mínimas de qualidade que devem ser obedecidas para chá. Por meio da legislação sanitária federal disposta na Resolução RDC ANVISA nº 277, de 22 de setembro de 2005, define como chá “o produto constituído de uma ou mais partes de espécie(s) vegetal(is) inteira(s), fragmentada(s) ou moída(s), com ou sem fermentação, tostada(s) ou não, constantes de Regulamento Técnico de Espécies Vegetais para o Preparo de Chás. O produto pode ser adicionado de aroma e ou especiaria para conferir aroma e ou sabor”. De acordo com a mesma Resolução o produto deve ser designado de "Chá", seguido do nome comum da espécie vegetal utilizada, podendo ser acrescido do processo de obtenção e ou característica específica. Podem ser utilizadas denominações “consagradas pelo uso” (BRASIL, 2005).

Além dos parâmetros regulamentadores vigentes, existem outros indicadores que podem apontar a qualidade de um chá. De acordo com Qian et al. (2018) a composição fenólica assim como os compostos voláteis são fundamentais para expressar a qualidade de um chá. A qualidade do chá pode ser influenciada por uma combinação de fatores internos e externos, como condições ambientais do ambiente

de crescimento do vegetal, gramatura, variedade, assim como o método de preparo da bebida, além da possibilidade de se avaliar a qualidade com base no brilho, cor, sabor, aparência e odor (NITIN-SEETOHUL et al., 2013; LI et al., 2018).

A produção mundial de chá vem aumentando assim como o consumo, sendo que 99,9% da produção encontra-se distribuída entre a Ásia, África e as Américas de acordo com dados apresentados pela FAO (2014). A quantidade de chá produzida no mundo, por região, pode ser observada na Figura 1.

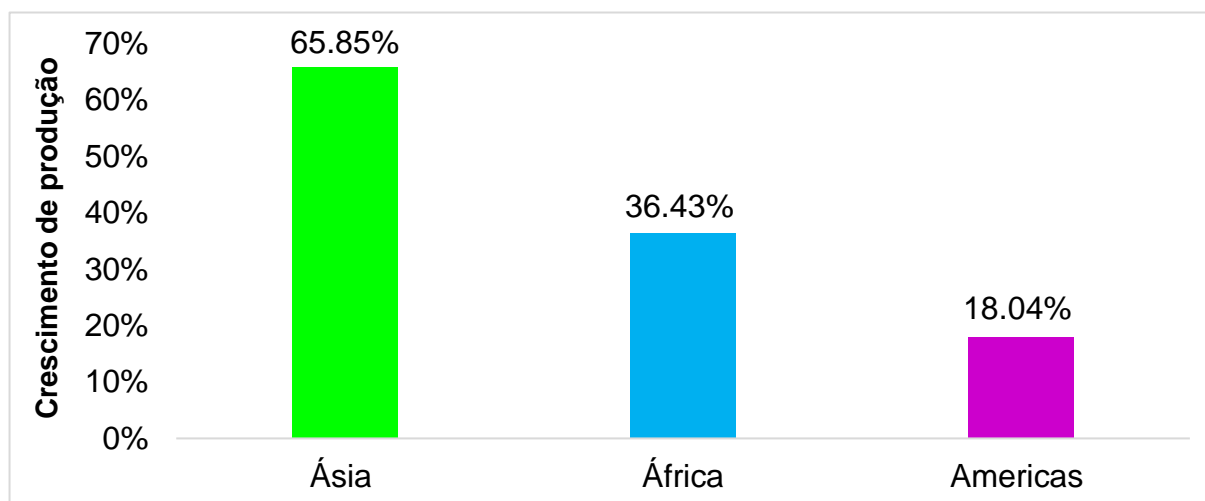
Figura 1 - Quantidade média em toneladas de chá produzida no mundo entre 2013-2014



Fonte: FAO, 2014.

Entre as regiões produtoras, dados apresentam alto crescimento na produção de chá (Figura 2), mostrando assim, a contínua expansão do cultivo, para que consiga atender a demanda pelo aumento do consumo. O Brasil, em 2014, foi o segundo maior produtor das Américas, com produção atingindo cerca de 1400 toneladas, ficando atrás apenas da Argentina (FAO, 2014).

Figura 2 - Crescimento em percentual da produção de chá por região no período de 2004 - 2014



Fonte: FAO, 2014

Dentre a variedade de chás produzidos, alguns destacam-se, principalmente, por sua composição química. Cada região produz chás característicos, os quais são conhecidos em todo o mundo, como é o caso dos chás branco, mate e roibos, endêmicos da Ásia, América do Sul e África, respectivamente.

1.2 CHÁ BRANCO (*Camellia sinensis*)

A *Camellia sinensis* L. Kuntze (Theaceae) é uma planta endêmica do leste, sul e sudeste da Ásia, sendo uma árvore que pode chegar até aos 15 metros de altura e que dá origem aos chás mais conhecidos e consumidos do mundo. Esse vegetal é cultivado e consumido no Sri Lanka, Índia, China, Japão, Taiwan e em muitos outros países tropicais e subtropicais (SHARANGI, 2009). Nos últimos anos, ocorreu o desenvolvimento e lançamento de diferentes chás comerciais, com destaque para os chás verde, vermelho, amarelo, preto, oolong, *pu-erh* e branco. Esses chás têm se popularizado e seu consumo vem aumentando em muitos países ocidentais (GRANATO et al., 2014).

O crescente consumo de chás de *C. sinensis* está parcialmente atrelado aos seus efeitos funcionais: atividade imunomoduladora (CHATTOPADHYAY et al., 2012), hipoglicêmica (TENORE et al., 2013), cicatrizante (ASADI et al., 2013), efeitos protetor de DNA, inibidor da proliferação de células cancerígenas do cólon (HAJIAGHAALIPOUR et al., 2015), antioxidante, antifúngica (CAMARGO et al., 2016), capacidade em reduzir os níveis séricos de colesterol total e LDL *in vivo* (IMBE

et al., 2016), ação anti-inflamatória e anti-hepatotóxica (THITIMUTA et al., 2017), potencial antimicrobiano (GUPTA; KUMAR, 2017; SANTOS et al., 2018).

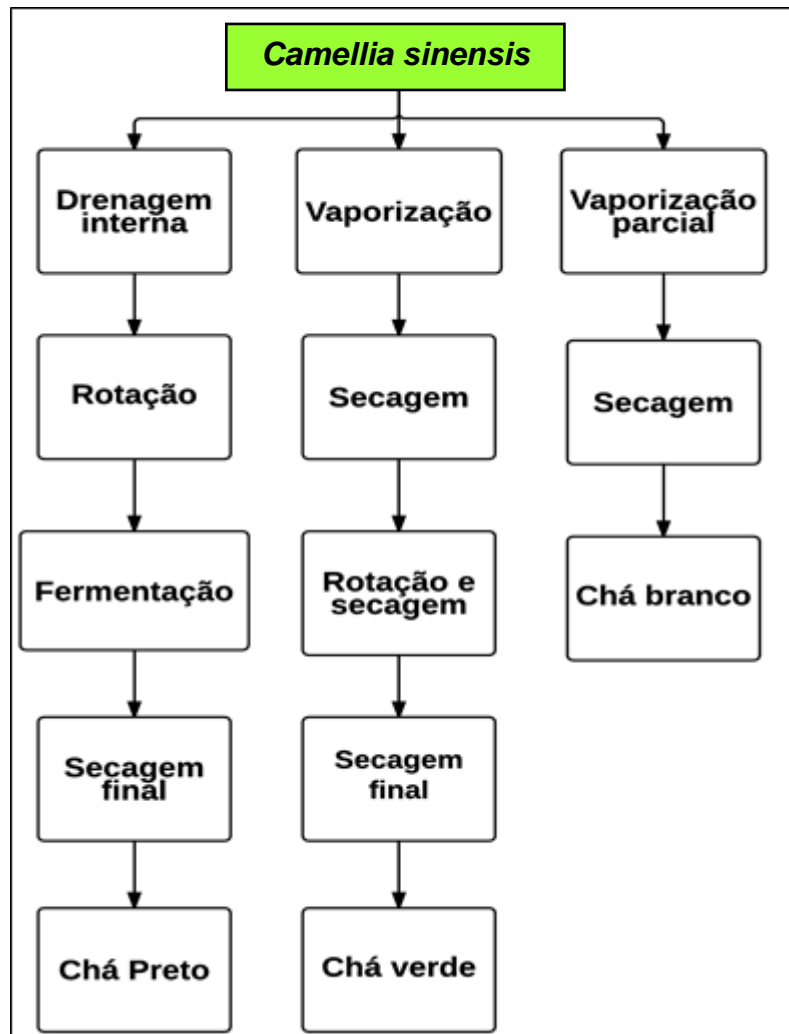
Maity, Vedasiromoni e Ganguly (1995), relataram que extratos aquosos de *C. sinensis* possuem atividade anti-úlceras, e sugerem que efeitos farmacológicos presentes no extrato estão relacionados com a presença de polifenóis. Rietveld e Wiseman (2003) relataram que esses benefícios à saúde são atribuídos à presença de metabólitos secundários, principalmente os compostos fenólicos, com destaque para os teores elevados de catequinas que têm sido descritos como agentes antioxidantes e que apresentam um potencial benéfico frente a diminuição do risco de doenças relacionadas às espécies reativas. Cai et al. (2004) avaliaram a atividade antioxidante e conteúdo fenólico de 112 plantas medicinais tradicionais chinesas associadas à atividade anticancerígena, incluindo *C. sinensis* e observaram correlação linear, positiva e significativa ($r \geq 0,95$) entre o conteúdo fenólico e atividade antioxidante. Em extrato *C. sinensis*, essa associação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante também foi observada por Anesini et al. (2008), De Oliveira et al. (2015) assim como por Gramza-Michałowska et al. (2016).

Entre as diversas variedades de chás de *C. sinensis*, o chá branco merece destaque por apresentar maior atividade antioxidante em relação aos demais tipos de chás da mesma espécie (ZIELINSKI et al., 2015). Recentemente, Dai et al. (2017) em estudo da caracterização metabolômica do chá branco e comparação com o chá verde e preto, constataram maior número de metabólitos no chá branco em relação ao chá verde e preto. Tal resultado foi obtido por meio da aplicação da cromatografia líquida de alta eficiência associada à espectrometria de massas com quadrupolo de tempo de voo.

O processo de produção do chá branco se diferencia dos demais chás de *C. sinensis* e essa peculiaridade pode estar diretamente ligada aos maiores níveis de compostos fenólicos, uma vez que o chá branco é produzido a partir de brotos e folhas jovens de *C. sinensis* cobertos de pequenos pelos prateados, colhidos apenas uma vez por ano, no início da primavera antes que as flores desabrochem. Para tanto, os botões foliares estão protegidos da luz do sol, impedindo a formação de clorofila. Após a colheita as folhas são imediatamente levadas a um curto processo de cocção a vapor e secas rapidamente para evitar a oxidação (RUSAK et al., 2008; SHARANGI, 2009). Os mesmos autores afirmam que, por esta razão, o chá branco mantém os maiores níveis de compostos antioxidantes e os menores níveis de cafeína do que

qualquer outro chá de *C. sinensis*. O processamento, mais curto, do chá branco em comparação com a produção de outros chás de *C. sinensis* pode ser observado na Figura 3.

Figura 3 - Principais etapas de processamento de diferentes tipos de chás de *Camellia sinensis*



Fonte: Adaptado de Hilal e Engelhardt (2007)

Na literatura, encontra-se um grande número de publicações acerca da composição química de chás, em especial os oriundos de *C. sinensis* (CHOI et al., 2016; KELEBEK 2016; RODRIGUES et al., 2016; WU et al., 2016; JESZKA-SKOWRON; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK; FRANKOWSKI, 2018). Entre os compostos presentes em chás de *C. sinensis*, os flavan-3-óis, também conhecidos como catequinas, são os mais abundantes e principais compostos contidos na espécie (PINTO, 2013). De acordo com Friedman et al. (2005), dependendo da configuração

estereoquímica, as catequinas podem apresentar como dois isômeros: *trans* (catequina) e *cis* (epicatequina). Para cada um destes compostos ocorrem dois isômeros ópticos: (+)-catequina e (-)-catequina e (+)-epicatequina e (-)-epicatequina. Ainda há a possibilidade das catequinas serem modificadas por esterificação com o ácido gálico de modo a formar (-)-catequina-3-galato, epicatequina-3-galato, (-)-epigallocatequina-3-galato e (-)-galocatequina-3-galato.

Além das catequinas, já foram detectados vários outros compostos fenólicos em *Camellia sinensis*. Os principais fenólicos além das catequinas são quercetina, caempferol, miricetina e apigenina com porções variadas de mono, di e triglicosídeos (DAI et al., 2017). Outros compostos encontrados em chás de *C. sinensis* são os ácidos fenólicos de baixa massa molecular, como os ácidos gálico, *p*-cumárico e cafeico (RUSAK et al, 2008). Por essa complexa composição fenólica associada aos benefícios já relatados à saúde, o chá branco encontra-se entre os chás mais consumidos, não só na Ásia, mas em todos os continentes.

1.3 CHÁ MATE (*Ilex paraguariensis*)

Chá mate ou simplesmente mate, é uma bebida amplamente consumida nos países latino-americanos do sul, principalmente no Uruguai, Argentina, Paraguai e Brasil. Essa bebida é reconhecida em vários países e continua ganhando a cada dia mais aceitação no mercado de chás, incluindo os Estados Unidos e Europa, devido às suas propriedades sensoriais. Este chá é fabricado a partir da infusão de folhas secas de *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil., uma planta da família *Aquifoliaceae* típica de regiões subtropicais e nativa da América do Sul (GRIGIONI et al., 2004; SCHAPOVALOFF et al., 2015; DA SILVEIRA, 2016).

O tradicional chá mate é elaborado a partir da erva-mate tostada. Para fabricação dessa erva, inicialmente as folhas são submetidas a altas temperaturas (600-800 °C) por 2 min em secador rotatório. Essa primeira etapa do processo tem como principal função inativar enzimas que podem causar oxidação das folhas, alterando suas características sensoriais. Posteriormente, as folhas são submetidas à uma pré-secagem em temperatura de 280 °C por mais 3 min. Em seguida, inicia-se de fato a secagem das folhas a qual ocorre por meio de fluxo de ar quente por cerca de 5 horas até ser alcançada a umidade de 5 g/100 g. Para o produto adquirir sabor, aroma e cor, após seco é envelhecido. O envelhecimento pode ser de dias até vários

meses dependendo das condições e objetivo do produto final. Então as folhas são trituradas e passam por torrefação a 160 °C por cerca de 12 min (ISOLABELLA et al., 2010; DE GODOY et al., 2013). É válido ressaltar que, como descrito por Isolabella et al. (2010), mesmo que as operações unitárias sejam basicamente as mesmas, o processo de industrialização varia entre indústrias.

Além do seu sabor e odor agradável, o chá mate destaca-se como uma bebida rica em compostos fenólicos principalmente um grupo de compostos formados a partir de isômeros de ésteres do ácido cafeico, nomeados como ácidos cafeoilquínicos (MARQUES; FARAH, 2009; PERES et al., 2013). Também foi identificada uma grande variedade de outros compostos fenólicos em chá mate como os ácidos gálico, siríngico, ferúlico, *p*-cumárico e cafeína além de quercetina-3-rutinoside, quercitrina, e glicosídeos de caempferol (PAGLIOSA et al., 2010; BIZZOTTO et al., 2012; FRIZON et al., 2015; NUNES et al., 2015; MATEOS et al., 2018).

A composição química minoritária em *I. paraguariensis* é associada a múltiplos efeitos funcionais, com ação antimutagênica (MIRANDA et al., 2008), antidiabete (KANG et al., 2012), atividade antimicrobiana frente *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e *Listeria monocytogenes* ATCC 07644 (MARTIN et al., 2013), potencial efeito anti-obesidade (DE RESENDE et al., 2015), auxílio na cicatrização de feridas cutâneas *in vivo* (ROMANA-SOUZA, PIRES; MONTE-ALTO-COSTA, 2015), capacidade ansiolítica, estimulante e neuroprotetora *in vivo* (SANTOS et al., 2015), efeito anti-inflamatório *in vivo* (LUZ et al., 2016), atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (MATEOS et al., 2018; DE LIMA et al., 2018), e capacidade em reduzir a hiperglicemia e normalizar os parâmetros de estresse oxidativo *in vivo* (DE LIMA et al., 2018).

Devido a sua composição química juntamente com as mais diversas funcionalidades, o chá mate vem se destacando tanto pelo aumento no consumo como pelo número de pesquisas que vêm sendo desenvolvidas atualmente. Um exemplo de estudo que aliou a ciência com a tecnologia de alimentos, Ramos et al. (2017) desenvolveram leite fermentado adicionado de extrato aquoso de *I. paraguariensis*, *Syzygium aromaticum* e *Cymbopogon citratus* e observaram um aumento significativo do poder redutor, atividade antioxidante e fenólicos totais na matriz láctea após 21 dias de refrigeração. Os mesmos autores sugerem que extratos de ervas incluído erva-mate podem ser utilizados para desenvolver novos produtos lácteos com potenciais propriedades funcionais.

1.4 ROOIBOS (*Aspalathus linearis*)

O *Aspalathus linearis* é um arbusto leguminoso, de origem indígena e endêmico da África do Sul, o chá de rooibos é produzido a partir das folhas do *A. linearis*. O chá de rooibos verde (não fermentado) é de uso tradicional e começou a ganhar destaque há muitos anos por apresentar propriedades medicinais, em especial para aliviar alergias, problemas dermatológicos, asma, cólica infantil, náuseas e azias (VAN WYK; VAN OUDTSHOORN; GERICKE, 2009). Entretanto, para ampliar as opções desse produto amplamente consumido pelos africanos, a indústria de alimentos desenvolveu um processo tecnológico baseado na fermentação de folhas e talos para estabilizar a erva e exportar para diversos países, criando o rooibos fermentado (vermelho).

Desta forma, o chá de rooibos foi ganhando mercado com seu sabor suave e apelos funcionais. De acordo com Joubert e De Beer (2011), o chá de rooibos não tinha valor comercial até o início do século XX, mas na atualidade é um produto bem conhecido e consumido em mais de 37 países. O rooibos não fermentado apresenta cor verde brilhante característica natural da planta de origem, também é tradicionalmente comercializado nos países europeus e americanos, porém em menor escala, representando cerca de 10% do total produzido de chá a partir de *A. linearis*. Já o chá rooibos vermelho é produzido pela fermentação natural das folhas verdes de *A. linearis*, o qual apresenta como característica final a cor caramelo e odor peculiar (KOTINA et al., 2012).

A superioridade mercadológica do rooibos vermelho pode ser explicada pelo fato que os consumidores buscam além de um produto com alto conteúdo fenólico e atividade antioxidante, uma bebida que seja agradável sensorialmente. Como relatado por Joubert e De Beer (2014), o extrato de rooibos verde é uma bebida rica em antioxidantes, mostrando-se superior neste quesito em relação ao chá fermentado. No entanto, os extratos de rooibos verde podem resultar em uma bebida com um sabor indesejável, devido à sua adstringência e sabor “gramado” acentuado (MARINI et al., 2017).

Processos que alteram a composição fenólica, como é o caso da fermentação, tem papel importante nas características sensoriais de chá de ervas. Koch et al. (2013), avaliaram o impacto da pasteurização a vapor no perfil sensorial e na composição fenólica das infusões de chá rooibos (*Aspalathus linearis*) e concluíram

que tal tratamento térmico promove alterações no perfil do sabor. Os mesmos autores afirmam que tal redução se apresenta diretamente relacionada com a diminuição de sólidos solúveis, teor total de polifenóis e na concentração de aspalatina (MARAIS et al., 2000).

Entre as várias alterações químicas decorrentes da fermentação, uma das principais é a oxidação de aspalatina por meio de seus análogos, tendo como produto quantidades de isoorientina e orientina. Esse processo também é o principal responsável pela mudança de coloração das folhas devido às fortes alterações no cromóforo dos compostos, passando de verde para uma cor vermelha-castanha característica de ervas fermentados. De acordo com Heinrich, Willenberg e Glomb (2012), as reações responsáveis pela mudança de coloração iniciam-se com a oxidação de aspalatina em sua *orto*-quinona que também é oxidada formando compostos coloridos de estruturas dibenzofurânicas.

Os primeiros estudos realizados com rooibos tinham por foco elucidar sua composição química e caracterizar quimicamente a aspalatina. Koeppen e Roux (1965) estabeleceram uma metodologia espectrofotométrica para detectar a presença da aspalatina em extrato aquoso de rooibos. No mesmo estudo foi sugerido que a máxima absorção deste composto é obtida no comprimento de onda de 290 nm, em etanol. Os mesmos autores ainda caracterizaram a aspalatina como um composto glicosilado, assim como a orientina e vitexina, também presentes em rooibos.

Nos últimos anos foram atribuídas uma gama de funcionalidades em torno dos extratos de *A. linearis*. Dentre elas destacam-se ação na diminuição à resistência à insulina (MAZIBUKO et al., 2013), diminuição de risco da obesidade (SANDERSON et al., 2014; PEREIRA et al., 2017), atividade cardioprotetora (DLUDLA et al., 2014), potencial anti-inflamatório (KU et al., 2015), ação antihemolítica (SANTOS et al., 2016), propriedades anti-mutagênicas (GELDERBLOM et al., 2017) e atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* (MONSEES; OPUWARI, 2017; SANTOS et al., 2018),

O rooibos apresenta todas essas propriedades devido à sua composição química, a qual apresenta quantidades apreciáveis de vários compostos fenólicos. Dentre os compostos já identificados, citam-se a quercetina-3-rutinoside, quercetina, luteolina, vitexina, isovitexina, orientina, isoorientin, e uma mistura de isoquercitrina e hiperosídeo, além da presença da aspalatina, uma dihidrocalcona que representa o marcador quimiotaxonômico da planta (BRAMATI et al., 2002; JOUBERT; BEER, 2011).

Além dos compostos fenólicos já citados, Santos et al. (2016) avaliando a influência do tempo e temperatura no conteúdo fenólico, quantificaram ácido 3, 4-dihidroxibenzóico, ácido sináptico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido ferúlico, ácido siríngico, ácido salicílico, ácido *p*-cumarico, naringenina, pinobanskim, siringaldeido e sinapaldeido em extratos aquosos de roibos vermelho.

1.5 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE PLANTAS

Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos. Esses compostos podem ter origem em vias metabólicas diferentes no vegetal, uma vez que os vegetais são capazes de produzir metabólitos primários e secundários. O metabolismo primário é responsável pela produção de substâncias comuns e essenciais como, lipídios, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos (MARTINS et al., 2015; GIADA 2013).

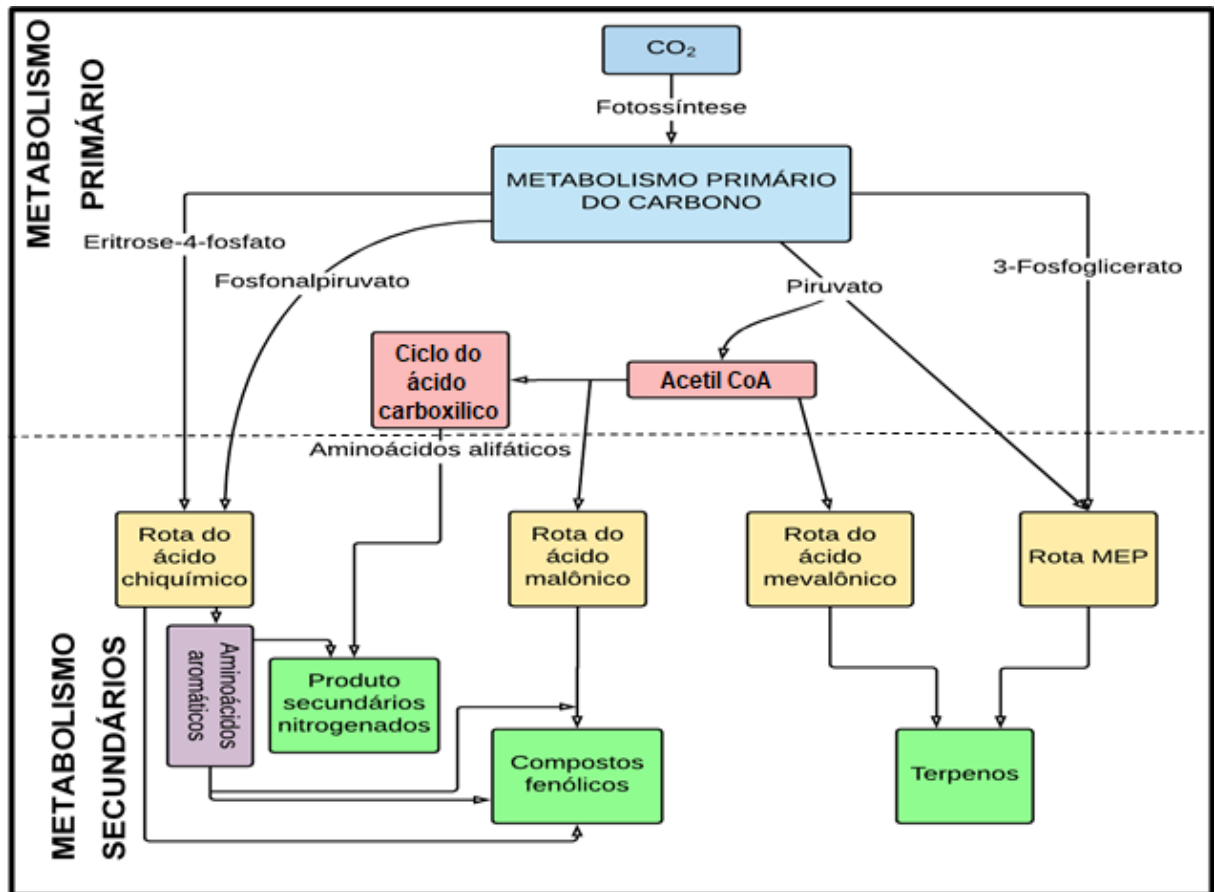
Já os metabólitos secundários não apresentam ação direta conhecida nos processos vitais do vegetal como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, assimilação de nutriente e síntese de proteínas, carboidratos e lipídios (TAIZ; ZEIGER 2009). De acordo com os mesmos autores, os metabólitos secundários diferem-se dos metabólitos primários em relação à sua distribuição no reino vegetal, uma vez que metabólitos secundários podem ser específicos de uma determinada espécie vegetal, por outro lado os metabólitos primários são encontrados em todo o reino vegetal.

Os compostos derivados do metabolismo secundário de vegetais mesmo que não apresentem envolvimento direto com as funções vitais dos vegetais já citadas, desempenham funções nas respostas de defesa contra micro-organismos patogênicos e herbívoros, além de diminuir os danos provocados por raios ultravioletas (SAHEBI et al., 2017). Outra característica dos metabólitos secundários é que eles desempenham funções especializadas em uma ampla variedade de organismos vivos, sendo considerados como compostos biologicamente ativos (GOUVEA et al., 2012).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grandes grupos: Os terpenos, compostos fenólicos e os compostos nitrogenados como apresentados na Figura 8. A rota simplificada da biossíntese dos metabólitos secundários de vegetais apresentada na Figura 4, foi descrita por Taiz e Zeiger (2009). A mesma figura mostra

as principais vias metabólicas, com destaque para as duas principais vias que são a do ácido chiquímico e a do acetil CoA.

Figura 4 - Rota metabólica simplificada dos metabólitos secundários em vegetais



Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2009)

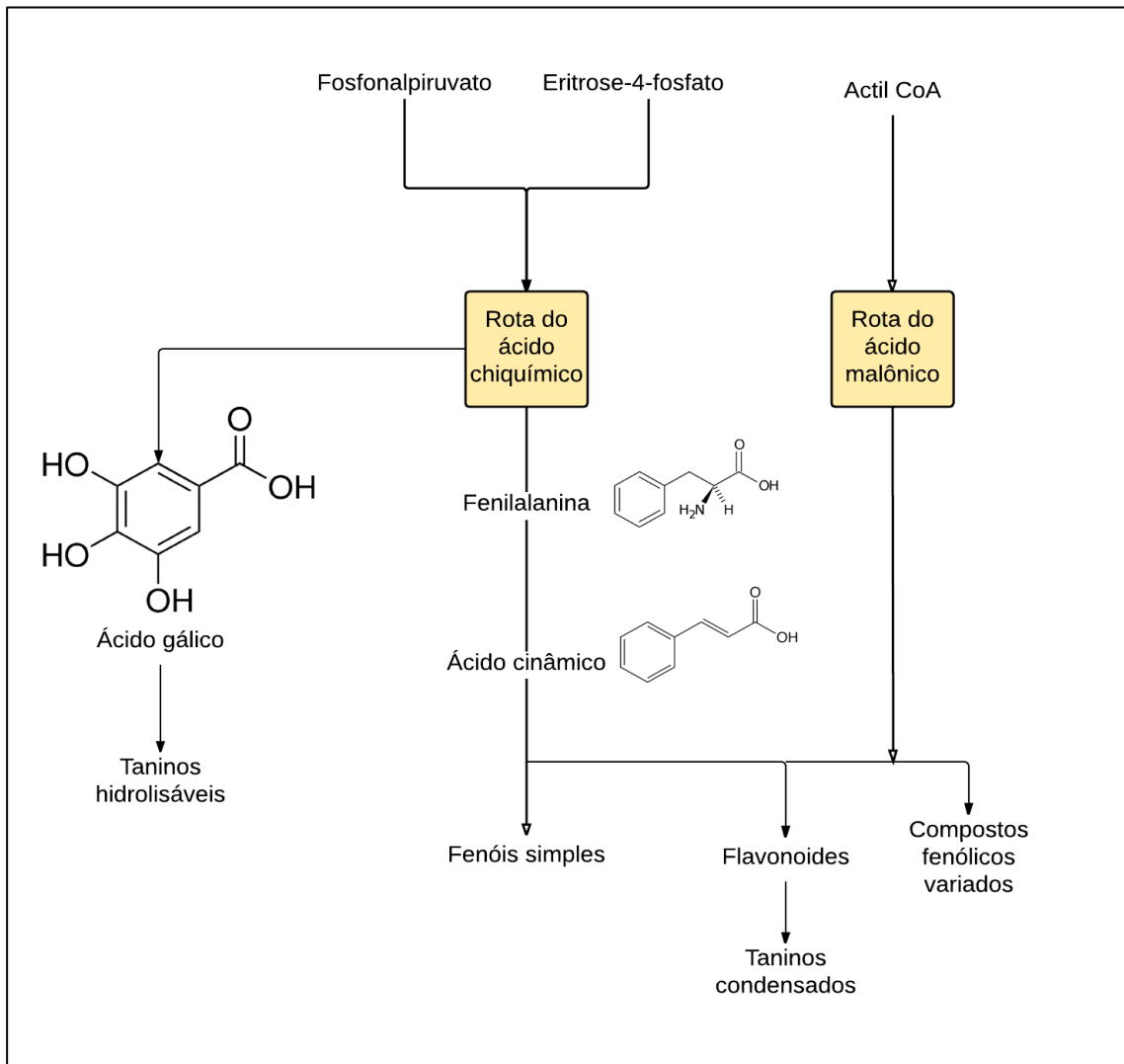
Entre os metabólitos secundários, uma classe de que vem sendo a cada dia mais explorada por pesquisadores do mundo inteiro, são os compostos fenólicos. Sendo que inúmeras pesquisas apontam os compostos fenólicos como o grupo de compostos responsáveis por algumas atividades funcionais tanto *in vitro* como *in vivo* (JUNIOR; MORAND 2016). Como relatado por Gumay, Bakri e Utomo, (2017), o chá verde melhora a função da memória espacial assim como a atividade da enzima superóxido dismutase em camundongos com demência induzida por D-galactose.

1.6 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos constituem uma importante classe de metabólitos secundários dos vegetais sendo amplamente distribuídos, com mais de 8000 estruturas atualmente identificadas (SCALBERT; WILLIAMSON 2000; MARTINS et al., 2015). O termo "fenólico" ou "polifenol" pode ser quimicamente definido como uma substância que apresenta um ou mais grupos hidroxila ligados diretamente a um ou mais anéis aromáticos, respectivamente. Os compostos fenólicos podem variar de moléculas simples, tais como os ácidos fenólicos e ligninas, até estruturas de alta complexidade como é o caso das proantocianidinas (DAI; MUMPER, 2010; SANTOS-BUELGA et al., 2012; CUTRIM; CORTEZ, 2018).

Os compostos fenólicos encontram-se distribuídos nos vegetais, como frutas, cereais, legumes e castanhas. Estão presentes, também, em bebidas como chá, café, cerveja, vinho entre outras (DAI; MUMPER, 2010). Os mesmos autores afirmam que essas classes de compostos são responsáveis por algumas propriedades sensoriais dos alimentos vegetais como adstringência, além de serem responsáveis pela pigmentação de muitas frutas e hortaliças.

Biogeneticamente, os compostos fenólicos resultam de duas vias metabólicas principais. A via do ácido chiquímico e via do ácido malônico (Figura 5). A via mais elucidada e considerada a mais importante é a do ácido chiquímico o qual dá origem à fenilalanina (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; HOLLMAN, 2001). A fenilalanina é desaminada para formar ácido cinâmico, o qual entra na via fenilpropanol. Esta via metabólica tem como ponto chave, a introdução de um ou mais grupos hidroxila no anel aromático produzindo os compostos fenólicos.

Figura5 - Biossíntese geral dos compostos fenólicos

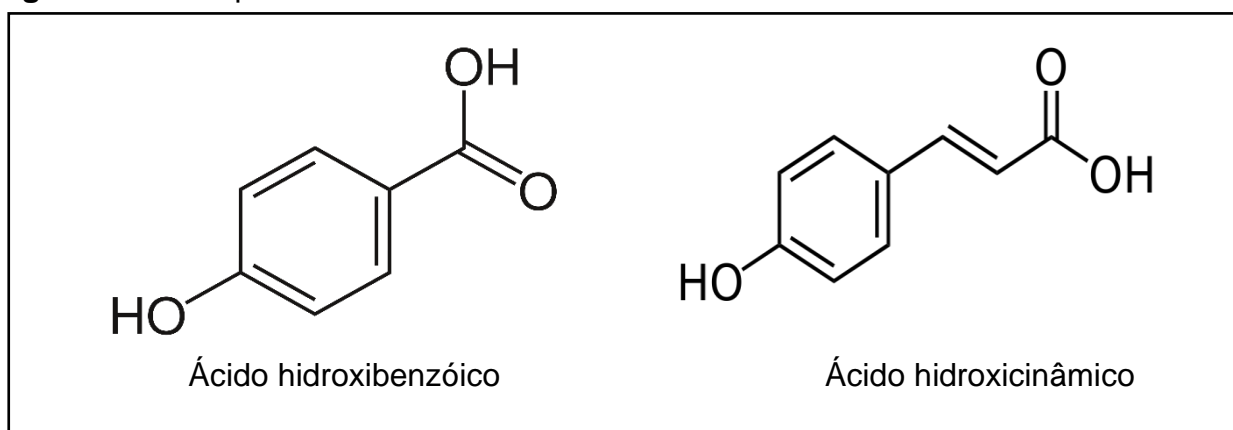
Fonte: Adaptado de Taiz e Zeiger (2009)

A maioria dos compostos fenólicos são sintetizados por meio da fenilalanina, como mostra a Figura 5. A via do ácido chiquímico dá origem principalmente a compostos mais simples como os ácidos fenólicos, ligninas e cumarinas. Já a combinação de ambas as vias (via do ácido chiquímico e via do ácido malônico) conduz à formação dos compostos com massa molecular maior como os flavonoides, o grupo mais abundante de compostos fenólicos na natureza (SÁNCHEZ-MORENO, 2002), além de outros grupos mais complexos como os taninos condensados.

1.6.1 Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em duas classes: Os ácidos benzóicos ou hidroxibenzóicos e os ácidos cimâmicos ou hidroxicinâmicos (Figura 6). Os ácidos hidroxibenzóicos tem por característica apresentar em sua estrutura sete átomos de carbono (C₆-C₁), sendo os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. São exemplos de ácidos hidroxibenzóicos os ácidos: Gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico assim como o ácido siríngico. Já os ácidos hidroxicinâmicos, exibem em sua estrutura nove átomos de carbono (C₆-C₃), e tem como representantes de sua classe os ácidos *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico. Salienta-se que o ácido cafeico é o mais abundante em frutas e hortaliças e é frequentemente esterificado com ácido quínico dando origem aos ácidos clorogênicos (D ARCHIVIO et al., 2007; DAI; MUMPER, 2010)

Figura 6 – Exemplo dos ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos



Fonte: O autor

Os ácidos fenólicos têm por característica geral a presença de um anel benzênico, com um grupo carboxílico. Além da presença de um ou mais grupo hidroxila ligado ao anel benzênico sendo possível a presença de metoxila na molécula, conferindo propriedades funcionais para essas substâncias (YANG et al., 2001; MANCUSO; SANTANGELO, 2014).

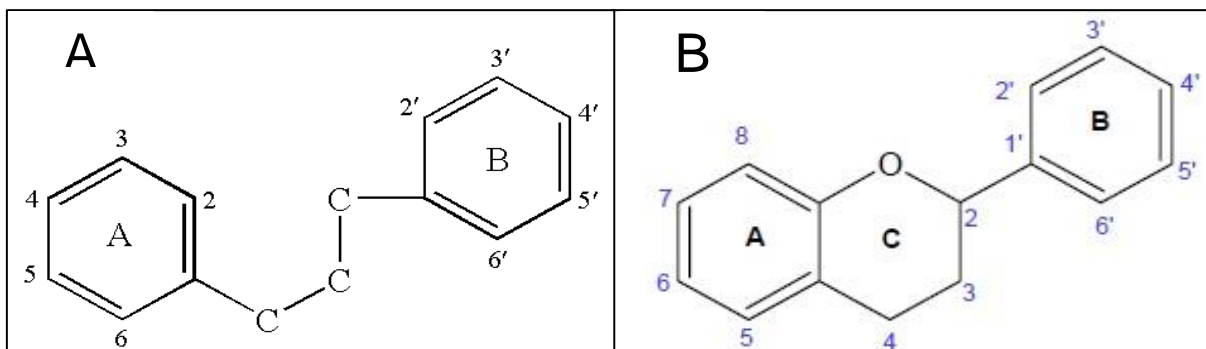
Em chás a presença dos ácidos fenólicos é comumente relatada na literatura como no estudo realizado por Jeszka-Skowron, Krawczyk e Zgoła-Grześkowiak (2015), no qual avaliaram a composição fenólica de chá branco (*Camellia sinensis*) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa e

determinaram quantidades dos ácidos gálico, clorogênico, protocatecuico, *p*-cumárico, cafeico, ferúlico e sinápico.

1.6.2 Flavonoides

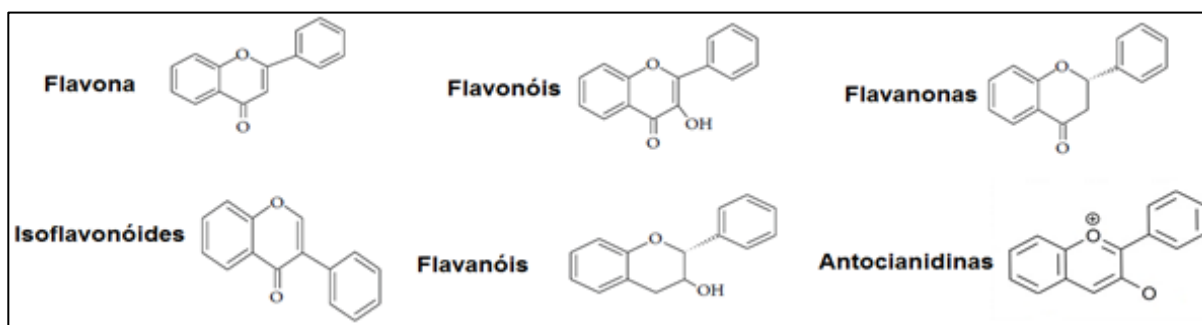
Os flavonoides compartilham um esqueleto de carbono comum de difenilpropano ($C_6-C_3-C_6$), sendo dois anéis de benzeno (A e B) unidos por uma cadeia linear de três carbonos (Figura 7A). Essa cadeia central de três carbonos pode formar um anel pirano (anel C) sendo que o anel C dos flavonoides apresenta o heteroátomo de oxigênio como apresentado na Figura 7B (D ARCHIVIO et al., 2007; KAY et al., 2017).

Figura 7 – Estrutura típica de um flavonoide



Fonte: O autor

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes na dieta humana tendo em vista que cerca de 7000 flavonoides já foram identificados em plantas, e a lista está crescendo constantemente (GRANATO et al., 2016). E eles podem ser encontrados na natureza divididos em várias subclasses. A determinação de cada classe de flavonoide está relacionada principalmente ao grau de hidroxilação e presença de dupla ligação no pirano central (SÁNCHEZ-MORENO, 2002). As principais classes de flavonoides são: flavonóis, flavonas, flavanonas, isoflavonoides, antocianidinas e flavanóis (Figura 8).

Figura 8 - Estruturas moleculares das principais subclasses de flavonoides

Fonte: Adaptado de KUMAR e PANDE (2013)

Esses compostos apresentam uma série de propriedades funcionais que os fazem atuar sobre sistemas biológicos. Por conseguinte, muitas dessas propriedades atuam de forma benéfica para a saúde humana, tornando-se componentes importantes na dieta humana. Como relatado por Sherbet (2017), os flavonoides podem inibir a proliferação celular, induzem a apoptose e suprimem a angiogênese por interferência na sinalização do fator de crescimento, sendo potenciais agentes anticâncer. Ahmad et al. (2015), em revisão do potencial terapêutico dos flavonoides, concluíram que esses fitoquímicos possuem atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante *in vitro* e *in vivo*.

1.7 ESPÉCIES REATIVAS

Dentre as diversas funcionalidades dos compostos fenólicos já relatadas, as mais estudadas e conseqüentemente, mais elucidadas são as que agem sobre o estresse oxidativo. De acordo com Persson, Popescu e Cedazo-Minguez (2014) o estresse oxidativo pode ser definido como o desequilíbrio entre o surgimento de espécies oxidativas e a habilidade dos sistemas de defesa antioxidante em combatê-las. A formação de espécies reativas é um mecanismo inevitável em organismos aeróbicos, uma vez que em situações normais somente 95 a 97% do oxigênio absorvido, é reduzido na cadeia respiratória por meio do transporte de elétrons, bem como no retículo endoplasmático, tendo por produto final água (KEHRER, 2014).

As fontes que cedem os cátions de hidrogênio e os elétrons necessários para a reação são, basicamente, dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido (NADH), dinucleótido de flavina e adenina reduzido (FADH) e a coenzima Q (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). As moléculas de oxigênio que não são devidamente reduzidas

pelo sistema endógeno (3 a 5%) recebem apenas um elétron, o qual vai ocupar um dos orbitais externos, ao mesmo tempo em que o outro continua não emparelhado, produzindo intermediários altamente reativos, denominados Espécies Reativas de Oxigênio – EROs, Equação 1, 2, 3 e 4 (SLATER, 1988):



A formação de EROs tem sido relacionada a danos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos em diferentes sistemas biológicos e, por conseguinte, deficiência funcional e estrutural em diferentes moléculas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015). Para evitar ou retardar os danos ocasionados pelo estresse oxidativo em humanos, o consumo de compostos com propriedades antioxidantes tem sido recomendado (SAKANAKA; TACHIBANA; OKADA, 2005).

1.8 ANTIOXIDANTES

De acordo com Halliwell e Gutteridge (2007), um antioxidante é uma substância que, quando presente em baixa concentração, em relação ao substrato na forma oxidável, retarda ou inibe a oxidação do mesmo. Os compostos fenólicos e carotenoides são os principais compostos bioativos em alimentos de origem vegetal como frutas, verduras, chás entre outros. Por natureza, são capazes de proteger as células dos agentes oxidantes, evitando efeitos deletérios em diversos órgãos.

As defesas antioxidantes podem ser de origem endógena (enzimáticos), como as enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathiona-peroxidase (GPx) e catalase (CAT), e exógena (não-enzimáticas), as quais apresentam uma gama de minerais e substâncias, destacando-se algumas vitaminas, carotenoides, ácidos fenólicos e flavonoides. Os antioxidantes têm papel fundamental na prevenção e diminuição dos

efeitos prejudiciais do estresse oxidativo (KAO et al., 2010; FUKAI; USHIO-FUKAI, 2011).

Os antioxidantes podem ser caracterizados por vários critérios como: sua polaridade, função e mecanismo de ação. Em relação à polaridade, López e Denicol (2013) afirmam que a capacidade de um antioxidante de chegar ao local onde as espécies reativas são geradas é um aspecto crítico e por essa razão, a polaridade do composto antioxidante deve ser levada em consideração no mecanismo de ação. Neste contexto, os compostos antioxidantes podem ser classificados como hidrofílicos (solúveis em água), tais como ácido ascórbico, antocianinas, ácido gálico entre outros, ou como lipofílicos (solúveis em solventes orgânicos) como α -tocoferol, licopeno e β -caroteno (SIES, 2007). Quanto à sua função, os antioxidantes podem apresentar a capacidade sequestrante de radicais livres (ácido ascórbico, tocoferóis entre outros), sequestrante de oxidantes não-radicalares (catalase e tióis), além da função inibitória da geração de oxidantes (agentes quelantes de metais, tais como os compostos fenólicos) e capacidade de induzir a produção de antioxidantes (isotiocianatos) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2015).

O processo de neutralização da ação deletéria de espécies reativas nas membranas celulares, por antioxidantes, pode ocorrer por três mecanismos principais: a transferência de átomo de hidrogênio, transferência de elétrons e também podem apresentar capacidade de quelar metais de transição, tais como zinco, ferro e cobre (PRIOR; WU, SCHAICH, 2005). Também, pode ocorrer uma ação combinada de mecanismos de transferência de átomo de hidrogênio e transferência de elétrons. O mecanismo de transferência de átomos de hidrogênio ocorre quando o antioxidante, ArOH por exemplo, reage com o radical livre R \cdot , por meio da transferência de átomo de hidrogênio, Equação 5 (APAK et al., 2016).



A Equação 6 ilustra o mecanismo de transferência de um elétron, supondo que um antioxidante doa um elétron para a molécula oxidante.



Os produtos de reação por meio dos dois mecanismos são: uma espécie neutra não reativa (HR), um íon fenolato estável (ArO^\bullet), uma espécie catiônica também estabilizada por ressonância (ArOH^+) e uma espécie reduzida e energeticamente estável (R^-), respectivamente (OROIAN; ESCRICHE, 2015). O radical livre, ArO^\bullet , e a espécie catiônica, ArOH^+ , são estabilizadas pela deslocalização de elétrons pi do anel aromático. Além destes dois mecanismos de reação, tem sido citado na literatura análises que medem capacidade antioxidante por meio da habilidade de um composto em quelar íons metálicos.

De acordo com Santos, Brizola e Granato (2017), os íons de cobre e ferro estão altamente relacionados com a produção de diferentes espécies reativas, em especial as de oxigênio, decorrente das reações de Fenton (Equação 7) e de Haber-Weiss (Equação 8). Canabady-Rochelle et al. (2015) afirmam que compostos com capacidade de quelar metais de transição atuam indiretamente como antioxidante uma vez que a reação de Fenton e de Haber-Weiss são inibidas por sua ação.



Fonte: Santos, Brizola e Granato (2017)

Tendo em vista a variabilidade entre os mecanismos de ação de uma substância antioxidante, Apak et al. (2013) ressaltam que uma vez que muitos mecanismos e reações múltiplas estão envolvidos, nenhum método irá refletir de forma fidedigna a atividade de todos os compostos antioxidantes em uma matriz complexa como sucos, chás e vinhos. Desta forma, torna-se conveniente a utilização de mais de um método e com distintos mecanismos de ação, buscando compreender de forma mais ampla o potencial antioxidante de produtos naturais.

1.9 APLICAÇÃO TECNOLÓGICA DE EXTRATOS RICOS EM COMPOSTOS FENÓLICOS

Atualmente, é uma tendência a adição de frutas, sucos ou extratos ricos em compostos fenólicos em diversos produtos alimentícios. De acordo com Cutrim e Cortez (2018), os principais produtos estudados para adição de compostos fenólicos são os lácteos tais como os leites fermentados e queijos, como o estudo realizado por Rashidinejad et al. (2015) no qual, avaliaram o teor fenólico total e atividade antioxidante de um queijo duro com baixo teor de gordura fortificado com diferentes concentrações de catequina além de avaliarem ao longo de 90 dias de maturação. Foi constatado que o conteúdo fenólico assim como atividade antioxidante aumentaram no queijo fresco, assim como, durante o período maturação a 8 °C. Os autores ainda concluíram que este estudo mostra a viabilidade de incorporar antioxidantes fenólicos em um alimento rico em proteínas, como queijo. Desta forma, é cada vez mais comum encontrar estudos que fazem adição de compostos funcionais em matrizes proteicas, como os produtos lácteos.

Ramos et al. (2017) realizaram uma otimização analítica de um extrato de ervas ricas em fenólicos e posteriormente adicionaram esse extrato em leite fermentado. Os resultados obtidos apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) no conteúdo fenólico e atividade antioxidante para o leite fermentado adicionado do extrato liofilizado de ervas em comparação com o leite fermentado controle. Os mesmos autores ainda acompanharam o armazenamento do produto por 21 dias e observaram que o conteúdo fenólico assim como a capacidade redutora total se manteve estável durante o período de armazenamento de três semanas.

Jaster et al. (2018), em estudo do aumento da atividade antioxidante e propriedades físico-químicas de iogurte enriquecido com pasta de morango crioconcentrado, concluíram que o uso do crioconcentrado de morango na produção de iogurtes não afetou a sobrevivência das bactérias ácido-láticas durante 7 dias de armazenamento. Também foi observado que o uso de 30% de crioconcentrado de morango promoveu um produto com alto teor de antocianinas e atividade antioxidante. Adicionalmente, o produto apresentou coloração semelhante a duas marcas comerciais que usam corantes artificiais.

Recentemente Cullere et al. (2019) formularam rissóis de carne de coelho com níveis crescentes de extrato de roibos fermentado (*Aspalathus linearis*), e

observaram que o aumento dos níveis de incorporação de extrato reduziu os valores de pH de rissóis de carne de coelho e aumentou seus índices para cor vermelha e amarela. Além de avaliarem que após a fritura dos rissóis os tratados com extratos de rooibos fermentado foram protegidos da oxidação lipídica em comparação com o controle ($p < 0,001$) e concluíram que o rooibos pode ser considerado um aditivo natural promissor na fabricação de rissóis de carne de coelho, até o nível de incorporação de 0,5%.

Como apresentado nos estudos relatados, além das funcionalidades já conhecidas *in vitro* e *in vivo*, extratos ricos em compostos fenólicos estão sendo aplicados em alimentos, com o intuito de elevar a vida útil, diminuir danos oxidativos assim como melhorar aspectos sensoriais como a cor. Além de possibilitar a entrega de um alimento com aditivos naturais e potencialmente funcional para o consumidor.

CAPÍTULO 2 - OTIMIZAÇÃO MULTI-ANALÍTICA DE UMA BEBIDA MISTA COMPOSTA POR CHÁ BRANCO, MATE E ROOIBOS: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIPROLIFERATIVA

RESUMO

Um estudo de otimização estatística foi conduzido para obter um chá contendo rooibos fermentado (*Aspalathus linearis*), chá branco (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) e mate tostado (*Ilex paraguariensis*). Uma combinação ideal destas espécies foi proposta. Este chá otimizado inibiu 64% da lipoperoxidação *in vitro* e apresentou um alto conteúdo fenólico, especialmente caempferol, (+) - catequina, (-) - epicatequina, quercetina-3-rutinoside, (-) - epigallocatequina e (-) - epicatequina-2-O-galato. De fato, o efeito antioxidante foi confirmado pela diminuição de 30% da geração de espécies de oxigênio em células de carcinoma de hepatoma humano (HepG2, 100 e 240 µg/mL). No ensaio de viabilidade celular, o GI₅₀ para células epiteliais do adenocarcinoma colo-retal humano (Caco-2) foi de cerca de 547 µg/mL e 481 µg/mL para HepG2. O processo de pasteurização (65 °C/30 min) não afetou o conteúdo fenólico total e a atividade antioxidante da formulação otimizada do chá. O teste sensorial indicou um índice de aceitabilidade de 78%, mostrando que a abordagem analítica adotada foi viável para desenvolver uma bebida rica em fenólicos e com elevada aceitação sensorial.

Palavras-Chave: Compostos fenólicos, antioxidante, desejabilidade funcional, viabilidade celular

Capítulo publicado:

Santos, J. S., Deolindo, C. T., Hoffmann, J. F., Chaves, F. C., do Prado-Silva, L., Sant'Ana, A. S., ... & Granato, D. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348-358, 2018.

2.1 INTRODUÇÃO

Os chás estão entre as bebidas mais conhecidas e largamente consumidas no mundo. O aumento no consumo de chá em todo o mundo vem sendo relacionado com funcionalidades apresentadas por alguns chás, tanto *in vitro* quanto *in vivo* que mostraram uma relação direta entre o consumo contínuo e a diminuição de risco de doenças degenerativas não-transmissíveis (ROSSI; BASSETT; SAMMÁN, 2018; SANTOS et al., 2016). Entre a grande variedade de chás produzidos, alguns são dignos de destaque principalmente por sua rica composição fenólica, como é o caso dos chás branco, mate e roibos, os quais são de diferentes origens botânicas e endêmicos de regiões globais distintas. Esses fatores tornam possível que esses chás apresentem características químicas e sensoriais peculiares.

O chá branco é produzido a partir de brotos e folhas jovens de *C. sinensis* cobertos de pequenos pelos prateados, colhidos antes que as flores desabrochem (RUSAK et al., 2008). Os mesmos autores afirmam que por esta razão, o chá branco mantém os maiores níveis de compostos antioxidantes e os menores níveis de cafeína do que qualquer outro chá de *C. sinensis*. As catequinas são os compostos fenólicos majoritários em *C. sinensis*, porém sua composição química também apresenta quantidades de flavonóis, flavonas e ácidos fenólicos (RUSAK et al., 2008).

O chá mate é produzido a partir de folhas de *I. paraguariensis*, uma planta da família *Aquifoliaceae* típica de regiões subtropicais e nativa da América do Sul. Destaca-se como uma bebida rica em compostos fenólicos como os ácidos clorogênicos, e em especial uma família de compostos formados a partir de isômeros de ésteres do ácido cafeico, como os ácidos 3- e 4-monocafeoilquínicos e 3,4-, 3,5- e 4,5-dicafeoilquínicos (MARQUES; FARAH, 2009; PERES et al., 2013). A literatura relata a presença de quercetina-3-rutinoside, ácido gálico, siríngico, ferúlico, e *p*-cumárico em extratos aquosos de mate (BIZZOTTO et al., 2012; FRIZON et al., 2015; NUNES et al., 2015).

O chá de roibos fermentado é produzido a partir de folhas e talos de um arbusto leguminoso africano, o *A. linearis*, no qual seu extrato tem por característica ser uma bebida ausente de cafeína e que contém baixo teor de taninos, o que lhe proporciona gosto adocicado e suave (KOCH et al., 2012). A composição química de extratos aquosos de roibos é complexa, contendo determinadas quantidades de

alguns flavonoides como a quercetina-3-rutinoside, quercetina, luteolina, vitexina, orientina, isoorientina e isoquercetrina. Entretanto, a presença da diidrocalcona aspalatina, encontrada unicamente nessa espécie, a torna especial frente a outros chás (SANTOS et al., 2016; KRAFCZYK; GLOMB, 2008).

Grande parte dos estudos relacionados às propriedades funcionais de chás são baseados em apenas uma variedade tendo por foco avaliar os efeitos de diferentes solventes usados para extrair os maiores teores de compostos fenólicos (RUSAK et al., 2008; HANDA, et al., 2016). Também foi realizado estudo que avaliou os efeitos na atividade antioxidante e redutora, perfil de sabor instrumental, e composição química de misturas de chás, porém da mesma origem botânica - *C. sinensis* (GRANATO et al., 2014). Entretanto, ainda não foram localizados estudos na literatura sobre a composição química, atividade antioxidante, potencial antimicrobiano, e perfil de sabor instrumental de misturas de chás de diferentes origens botânicas.

Do ponto de vista sensorial, o chá branco tem um sabor desagradável por causa de sua adstringência. Pelo contrário, chás mate e roibos têm um sabor agradável/odor e composição química única (DE GODOY et al., 2013). Portanto, o desenvolvimento de um chá misto composto de roibos, mate e chá branco é benéfica do ponto de vista químico, sensorial e funcional. Desta forma o objetivo do presente estudo foi otimizar uma formulação de bebida orgânica composta por chá branco, mate e roibos vermelho com um perfil fenólico diversificado, máxima atividade antioxidante e com perfil de sabor agradável. Além disso, a atividade antiproliferativa das ervas isoladas (roibos, mate torrado e chá branco) e a formulação otimizada de chá também foram avaliadas em relação a HepG2 (carcinoma de hepatoma humano) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano epitelial).

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Materiais

2.2.1.1 Produtos químicos

Ácido gálico, ácido clorogênico, reagente de Folin-Ciocalteu 2 N, álcool etílico, cloreto de ferro(III) hexahidratado, molibdato de sódio dihidratado, 2,2'-azinobis(3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico), caempferol, luteolina, (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina-3-rutinoside, quercetina, (-)-epicatequina-3-galato, reserpine, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido 2-tiobarbitúrico, vanilina, 2,2-difenil-1-picrilhidrazila, ferrozina, neocuproína e ácido ferúlico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Acetato de sódio anidro, nitrito de sódio, fosfato de sódio monosódico, cloreto de alumínio hexahidratado, isobutanol, ácido acético glacial P.A., ácido sulfúrico, persulfato de potássio, ácido ascórbico foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). Propanona, acetato de amônio e hidróxido de sódio foram adquiridos da Synth (Diadema, Brasil). Ferricianeto de potássio e persulfato de potássio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Sulfato de ferro (II) heptahidratado foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil). Cloreto de cobre dihidratado foi adquirido da Anidrol (São Paulo, Brasil). Água ultrapura foi usada em todos os experimentos.

2.2.1.2 Matéria prima

Chás branco (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) cultivado na China, mate tostado (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) cultivado no Paraná/Brasil, e rooibos vermelho (*Aspalathus linearis*) cultivado na África do Sul, todos orgânicos, foram adquiridos das empresas CLIPPERP® (Alemanha), Matte Leão® (Brasil), e Simon Lévelt® (Países Baixos), respectivamente. A certificação orgânica do material vegetal foi baseada em auditoria externa de acordo com a resolução 2001/112/EC e 834/2007/EC (União Europeia) e pela Resolução 6323 de 27/12/2007 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, Brasil). O material foi triturado e a gramatura padronizada

para 60 Tyler mesh. As amostras foram armazenadas em frascos de polietileno de baixa densidade e congeladas (-20 °C) até o preparo das infusões.

2.2.2 Planejamento experimental e preparação das infusões

Um delineamento de mistura simplex-centróide aumentado contendo três componentes, totalizando 10 ensaios experimentais, foi utilizado, para avaliar os efeitos isolados, binários e ternários das infusões, sobre o perfil de sabor instrumental, composição química, atividade antioxidante e antimicrobiana. As variáveis independentes (fatores) foram os chás branco, mate e rooibos. Todas as infusões foram preparadas de acordo com o delineamento apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Proporções entre os chás para formulação das infusões

Amostras	Chá branco	Chá mate	Chá de rooibos
1	1	0	0
2	0	1	0
3	0	0	1
4	0,5	0,5	0
5	0,5	0	0,5
6	0	0,5	0,5
7	0,667	0,167	0,167
8	0,167	0,667	0,167
9	0,167	0,167	0,667
10	0,333	0,333	0,334

Fonte: O autor

O preparo de cada amostra foi por meio de 1 g do material de estudo (chás) em suas devidas combinações (isolada, binária e ternária) previamente moído e com granulometria de 60 Tyler mesh, em presença de 50 mL de água ultrapura em célula termostaticada com temperatura constante de $80 \pm 0,1$ °C por 10 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm em 4 °C. Em seguida filtrado em filtro de papel Whatman n° 1 e o extrato resultante foi dividido em alíquotas de 2 mL em eppendorfs e armazenado a -25 °C até o momento das análises.

2.2.3 Caracterização química dos extratos

2.2.3.1 *Quantificação dos compostos fenólicos totais*

Os compostos fenólicos totais (CFT) foram quantificados utilizando o ensaio Azul da Prússia, descrito por Price e Butler (1977) e adaptado por Margraf, et al. (2015). Resumidamente, as amostras foram diluídas com água ultrapura na proporção 1:50 (v/v) e uma alíquota de 100 μL foi adicionada numa microplaca de 96 poços com 100 μL de uma solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,5 mmol/L. Após 5 min de reação 100 μL de uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ a 0,5 mmol/L foi adicionada a cada poço. Após 15 min de reação a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 725 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada, utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A quantificação, dos compostos fenólicos totais foi realizada por meio de uma curva analítica ($R^2=0,997$) com diferentes concentrações de ácido gálico (5 - 35 mg/L). A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por litro de chá (mg AGE/L).

2.2.3.2 *Quantificação dos flavonoides totais*

Os flavonoides totais foram quantificados pelo método colorimétrico proposto por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) e modificado por Herald et al. (2012). Inicialmente, em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 100 μL de água ultrapura, 10 μL de NaNO_2 (0,725 mol/L) e 25 μL da amostra diluída em água ultrapura na proporção 1:10 (v/v). Após 5 min, foram adicionados 25 μL de $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ a 0,414 mol/L. Depois de mais 5 min foram adicionados 50 μL de NaOH (1 mol/L) em cada poço da microplaca. Deixou-se reagindo por 5 min sob agitação contínua, e em seguida a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 510 nm em leitor de microplaca (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A linha de base do equipamento foi registrada, utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A quantificação do teor de flavonoides totais foi realizada a partir de uma curva analítica ($R^2=0,998$) construída com (+)-catequina na faixa de concentração de 50 a 250 mg/L. O

experimento foi realizado em triplicata, e os resultados expressos em mg catequina equivalente por litro de chá (mg CE/L).

2.2.3.3 Quantificação de taninos condensados totais

O teor de taninos condensados foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Horszwald e Wilfried (2011), uma alíquota de 25 µL da amostra diluída em metanol 1:5 (v:v) foi adicionada em cada poço de uma microplaca de 96 poços, seguida de 150 µL de uma solução de vanilina (0,260 mol/L) e 75 µL de uma solução de ácido sulfúrico (0,323 mol/L). A microplaca foi agitada e permaneceu em repouso por 15 min à temperatura ambiente. A absorbância foi registrada em espectrofotômetro de microplacas, no comprimento de onda de 500 nm. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas proporções utilizadas com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. O teor de taninos condensados presentes nos extratos, foram calculados a partir de uma curva analítica ($R^2=0,993$) de catequina, na faixa de concentração de 100 - 600 mg/L. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de catequina equivalentes por litro de chá (mg CE/L).

2.2.3.4 Quantificação de flavonóis

O conteúdo de flavonóis foi estimado pela metodologia descrita por Yermakov et al. (1987), com modificações para microplaca. Para isso, as amostras foram diluídas em água ultrapura na proporção 1:20 (v/v) e uma alíquota de 80 µL deste extrato foi inserida em uma microplaca de 96 poços, seguida de 80 µL da solução alcoólica de $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ (82,84 mmol/L) e 120 µL de acetato de sódio (0,6 mol/L). A microplaca foi agitada por 20 segundos e após 60 min de incubação em temperatura ambiente a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 440 nm em leitor de microplaca. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A quantificação do teor de flavonóis totais, foi realizada a partir de uma curva analítica ($R^2=0,999$) construída com quercetina na faixa de concentração de 7 - 80 mg/L. O experimento foi realizado em triplicata, e os resultados expressos em mg quercetina equivalente por litro de chá (mg QE/L).

2.2.3.5 Quantificação de orto-difenólicos

Os *orto*-difenóis foram quantificados de acordo com a metodologia descrita por Durán et al. (1991), com modificações para microplacas. Brevemente, uma alíquota de 50 µL da amostra diluída em água ultrapura na proporção 1:20 (v/v) foi adicionada em uma microplaca de 96 poços juntamente com 200 µL de uma solução alcoólica de molibdato de sódio bihidratado a 0,204 mol/L. Após 25 min de reação, a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 370 nm em um espectrofotômetro de microplacas. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. A quantificação o teor de *orto*-fenólicos presente na amostra, foi realizada a partir de uma curva analítica ($R^2=0,995$) construída com ácido clorogênico na faixa de concentração de 20 a 160 mg/L. O experimento foi realizado em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido clorogênico equivalentes por litro de chá (mg CAE/L).

2.2.3.6 Quantificação do conteúdo fenólico individual por CLAE/MS

A quantificação dos compostos fenólicos individuais foi realizada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas. As amostras foram inicialmente preparadas com 10 mg de extrato liofilizado com 1 mL de álcool metílico contendo 1 mg de reserpina (padrão interno para controle de qualidade). A mistura foi mantida num banho de ultrassom durante 15 min e depois centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado, diluído (200 ng/mL em álcool metílico) e filtrado através de uma membrana de nylon de 0,22 µm. A quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), Shimadzu UFLC, em coluna de fase reversa (bidentado C₁₈ 2,2 µm 120 Å, com dimensões de 100x2,1 mm). A separação cromatográfica foi realizada na coluna a 40 °C e o volume da amostra injetada foi de 10 µL em um fluxo de 200 µL/min a 500 psi. A fase móvel consistiu de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O gradiente de eluição consistiu de: 0-15 min 95% A, 15-20 min 10% A e 20-25 min 95% A. O sistema de espectrômetro de massa foi um Bruker micrOTOF Impact HD (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha)

com uma fonte ESI. Os parâmetros para análise de MS foram estabelecidos usando o modo de ionização positiva com espectros adquiridos sobre uma faixa de massa de m/z 50 a 1200. Os parâmetros foram: tensão capilar, 3500 V; temperatura do gás de secagem, 180 °C; fluxo de gás de secagem, 8 L/min; pressão de nebulização, 2 bar; radiofrequência de colisão (RF), 60 tensão pico-a-pico (Vpp); tempo de transferência de 120 μ s e armazenamento pré-pulso de 8 μ s. Para a quantificação de compostos fenólicos, curvas analíticas externas com padrões grau HPLC foram preparadas e os parâmetros de validação encontram-se na Tabela 2. Os dados de MS foram processados por meio do software Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas em triplicatas.

Tabela 2 - Parâmetros do método CLAE-MS para quantificação de compostos fenólicos em chás

Compostos	[M-H] ⁻	Tempo de retenção (min)	Faixa linear (ng/mL)	Equação de regressão	R ²	LOD ¹ (ng/mL)	LOQ ² (ng/mL)	Recuperação (%) (n=9)
								Concentração em 312 ng/mL
ácido gálico	169,0132	2,83	78-2500	y=135,54x-3846	0,9999	15,28	46,30	100,88
(+)-catequina	289,0707	5,68	39-2500	y=54,33x+325,48	0,9989	15,09	45,72	92,02
(-)-epicatequina	289,0707	6,18	39-2500	y=57,82x+545,43	0,9990	6,17	18,70	92,90
Ácido cafeico	179,0338	6,28	78-2500	y=211,10x-4140,96	1,0000	5,35	16,23	93,46
quercetina-3-rutinoside	609,1450	6,97	39-2500	y=177,40x+731,41	0,9998	9,21	27,90	94,20
Ácido p-cumárico	163,0390	7,28	78-2500	y=116,55x+286,01	0,9997	9,88	29,93	92,30
Ácido ferúlico	193,0495	7,67	156-2500	y=55,45x-1971,50	0,9999	9,73	29,48	113,42
Luteolina	285,0394	9,21	39-2500	y=389,68x+1873,7	0,9998	6,13	18,57	101,19
Quercetina	301,0343	9,24	39-2500	y=248,75x-1910,9	0,9995	2,32	7,04	114,04
Caempferol	285,0393	10,21	39-2500	y=907,02x-2899,6	0,9992	6,17	18,69	106,20

Fonte: O autor

Nota: ¹LOD = limite de detecção; ²LOQ= Limite de quantificação. Com exceção da recuperação, a validação do método foi baseada nos dados publicados por Hoffmann et al. (2018)

2.2.4 Atividade antioxidante *in vitro*

A capacidade antioxidante *in vitro* foi realizada por meio de cinco ensaios atividade antioxidante de redução de íon cúprico (CUPRAC), capacidade redutora total pelo método de Folin-Ciocalteu modificado (CRT), ação antioxidante frente ao radical 2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺), capacidade antioxidante de ácidos graxos insaturados em homogenato de gema de ovo (sistema biológico) e poder quelante do ferro (íon ferroso).

2.2.4.1 Capacidade antioxidante de redução frente ao íon cúprico (CUPRAC)

A atividade antioxidante pelo método CUPRAC foi realizada conforme metodologia descrita por Apak (2008), na qual a capacidade antioxidante é avaliada a partir da habilidade que o composto antioxidante em estudo apresenta em reduzir os íons cúpricos, sendo que esse método é sensível aos antioxidantes lipofílicos, hidrofílicos e tióis. Para a realização deste método foram preparadas as soluções de cloreto de cobre (II) a 0,01 mol/L, solução tampão de acetato de amônio a 1 mol/L (pH 7) e solução alcoólica de neocuproína 7,5 mmol/L.

Resumidamente, uma alíquota de 100 µL da amostra devidamente diluída em água ultrapura na proporção 1:20 (v/v) juntamente com 1 mL de cada solução (cloreto de cobre (II), neocuproína e acetato de amônia pH 7,0) e 1 mL de água ultrapura foi adicionada em tubos de ensaio perfazendo um volume final de 4,1 mL. Após 30 min de incubação 300 µL desta solução foram transferidos para uma microplaca de 96 poços e imediatamente sua absorbância foi registrada no comprimento de onda de 450 nm em leitor de microplacas. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções, com exceção da amostra, substituída por água ultrapura. Uma curva analítica ($R^2=0,999$) foi preparada com ácido ascórbico na faixa de concentração de 20 a 200 mg/L para quantificar a capacidade antioxidante pelo método CUPRAC. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por litro de chá (mg AAE/L).

2.2.4.2 Atividade antioxidante da capacidade redutora total (CRT)

A determinação da capacidade redutora total das amostras incluindo compostos hidrofílicos e lipofílicos foi baseada no método de Folin-Ciocalteu modificado descrito por Berker et al. (2013). Para isso, o reagente de Folin-Ciocalteu foi diluído em isobutanol na proporção 1:2 (v:v), respectivamente. Posteriormente 75 μL dessa solução e 50 μL da amostra diluída em acetona na proporção 1:20 (v/v) foram adicionados em tubos de ensaio. Após 2 min de reação em agitação contínua, 875 μL de uma solução de NaOH a 0,1 mol/L e 1,5 mL de água ultrapura foram adicionados e o tubo agitado novamente por 10 s. Após 20 min de reação, 250 μL dessa solução foram transferidos para as microplacas e a absorbância registrada no comprimento de onda de 665 nm, em leitor de microplacas. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções com exceção da amostra, substituída por acetona. A capacidade redutora total das amostras foi calculada a partir de uma curva analítica construída com quercetina na faixa de concentração de 80 a 500 mg/L ($R^2=0,997$). Os resultados foram expressos em mg de quercetina equivalente por litro de chá (mg QE/L).

2.2.4.3 Atividade antioxidante frente a captura do radical ABTS⁺

Atividade antioxidante por meio da captura do radical ABTS⁺ foi realizada conforme a metodologia descrita por Re et al. (1999) com modificações. Para a realização deste método foram preparadas as soluções de ABTS⁺ a 7 mmol/L, solução de persulfato de potássio 140 mmol/L. A solução estoque de ABTS⁺ foi preparada a partir de 5 mL da solução de ABTS⁺ (7 mmol/L) em 88 μL da solução de persulfato de potássio (140 mmol/L), a mistura permaneceu no escuro por 16 h à temperatura ambiente. A análise foi realizada, em uma microplaca de 96 poços, a partir de uma alíquota de 10 μL da amostra diluída em etanol na proporção 1:100 (v/v), seguida de 290 μL da solução do radical ABTS⁺. A mistura foi agitada por 15 s e posteriormente permaneceu em repouso no escuro por 6 min. Em seguida a absorbância foi registrada no comprimento de onda de 734 nm em leitor de microplacas. A linha de base do equipamento foi registrada utilizando uma solução com todos os reagentes nas devidas proporções com exceção da amostra, substituída por etanol. A quantificação da capacidade de captura do radical ABTS⁺ foi realizada a partir de uma curva

analítica com ácido ascórbico na faixa de concentração de 30 - 300 mg/L. Os resultados foram expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por litro de chá (mg AAE/L).

2.2.4.4 Poder antioxidante de inibição da lipoperoxidação

O poder antioxidante de inibição da lipoperoxidação em homogenato de gema de ovo induzida por FeSO_4 foi avaliado de acordo com o método descrito por Margraf et al. (2016). Resumidamente, duas gemas de ovos brancos de galinha foram emulsionadas com tampão de fosfato de sódio 0,10 mol/L a pH 7,4 a uma concentração de 25 g/L. Posteriormente 500 μL do homogenato de gema de ovo foi misturado com 50 μL da amostra previamente diluída em tubos de ensaio. Após 2 min de reação 50 μL de uma solução 4 mmol/L de FeSO_4 foram adicionados na reação para induzir a lipoperoxidação. Os tubos foram deixados reagir a 37 °C durante 45 min e, em seguida, 500 μL de uma solução de ácido acético (pH 3,5) a 20% (v/v) e 1 mL de uma solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,67% (m/v) foram adicionados. Os tubos foram aquecidos novamente desta vez a 95 °C por 30 min em banho-maria.

Após arrefecimento em banho de gelo e centrifugação dos tubos durante 10 min em 10.000 g, 300 μL do sobrenadante foram transferidos para uma microplaca de 96 poços. A formação de substâncias reativas ao TBA foi medida no comprimento de onda de 532 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). O controle positivo do experimento (máxima lipoperoxidação) foi composto por homogenato de gema de ovo (500 μL), solução de FeSO_4 (50 μL), e 50 μL água ultrapura. A inibição da lipoperoxidação foi calculada como mostrado na Equação 9. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos em percentual de inibição da lipoperoxidação.

$$\% \text{ inibição lipoperoxidação} = [(A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}) / A_{\text{controle}}] \times 100 \quad (9)$$

2.2.4.5 Poder quelante do ferro

O poder quelante do ferro (ion ferroso) dos extratos foi determinado pela medição da formação do complexo de Fe^{2+} -ferrozina de acordo com o método

proposto por Carter (1971), com modificações realizadas por Santos, Brizola e Granato (2017). Utilizando microplacas de 96 poços, uma alíquota de 50 μL de amostra previamente diluída em água ultrapura, 160 μL de água ultrapura e 15 μL de uma solução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ a 0,30 mmol/L foram adicionados, nessa ordem, em microplaca de 96 poços. Após 2 min de incubação, a reação foi iniciada pela adição de 30 μL de uma solução ferrozina a 0,80 mmol/L e a mistura final foi incubada por 15 min em temperatura ambiente. Água ultrapura (30 μL) em substituição à solução de ferrozina foi usada como um controle negativo (utilizado para corrigir a diferença de cor das soluções). A absorbância do complexo de Fe^{2+} -ferrozina foi medida em comprimento de onda de 562 nm utilizando um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). A percentagem de formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina foi calculada pela Equação 10. A análise foi realizada em triplicata e os resultados expressos percentual de formação do complexo Fe^{2+} -ferrozina.

$$\text{Poder quelante } \text{Fe}^{2+} (\%) = \frac{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{solução sem ferrozina}})]}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (10)$$

2.2.5 Atividade antimicrobiana

Foi avaliada a atividade antimicrobiana dos extratos frente aos seguintes micro-organismos: *Pseudomonas fluorescens* (ATCC 13525), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Pseudomonas aeruginosa* (IAL 1853), *Escherichia coli* (IAL 2064), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Salmonella enteritidis* (S 2887), *Salmonella Typhimurium* (IAL 2431), *Staphylococcus aureus* (ATCC 13565), e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os micro-organismos bactérias foram cultivados em caldo nutriente (Kasvi, São Paulo, Brasil) a 37 °C por 24 h. Já a cultura de *C. albicans* foi cultivada em caldo de extrato de malte (Cada litro contendo: 20 g de glicose; 20 g de extrato de malte e 1 g de peptona) a 30 °C durante 48 h. As suspensões de células bacterianas foram equalizadas pela escala de 0,5 McFarland (10^8 UFC/mL) utilizando um densímetro MCF 500 (MS TECNOPON, Piracicaba, Brasil) e inoculadas pela técnica de pour-plate em ágar nutriente. Para a cultura de *C. albicans*, a concentração foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer e posterior confirmação da concentração por plaqueamento superficial em ágar-ágar-extrato (Cada litro continha: 20 g de glicose; 20 g de extrato de malte; 1 g de peptona; e 15 g de ágar). Os testes foram realizados

de acordo com Cleeland e Squires (1991) com modificações, utilizando a metodologia de difusão em placas: Poços de 6 mm foram feitos nas placas e os extratos foram dissolvidos em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 5% (DMSO) até alcançar 2 mg de extrato aquoso liofilizado em cada poço (100 µL). As placas foram então incubadas a 37 ° C por 24 h (bactérias) e 30 ° C por 48 h (*C. albicans*). Os halos de inibição foram medidos usando um paquímetro digital (Digimess, São Paulo, Brasil) e expressa em mm de inibição. Todas as análises foram realizadas duas vezes e em triplicata.

2.2.6 Perfil de sabor instrumental

O perfil de sabor instrumental foi determinado pela quantificação do gosto salgado, amargo, ácido e umami por meio de uma língua eletrônica comercial. Para tanto, os extratos foram analisados em relação ao perfil de sabor instrumental por meio de um sistema Alpha MOS ASTREE E-tongue, equipado com um conjunto de sete sensores específicos e um eletrodo de referência Ag/AgCl, e um amostrador automático. A mensuração consiste na diferença potenciométrica entre cada sensor e o eletrodo de referência Ag/AgCl no estado de equilíbrio à temperatura ambiente. O tempo de aquisição e o tempo de análise foram fixados em 120 e 180 s, respectivamente. As amostras foram analisadas em quadruplicata. Os sensores foram limpos com água desionizada entre as medições. O tratamento de dados associados ao conjunto de sensores (conjunto #5) permite converter as respostas do sensor para percepção relativa de gosto: acidez, salgado e umami, em uma escala entre 0 e 12, da assimilação do sabor menos intenso para o mais intenso. O gosto amargo foi avaliado por uma curva padrão de cafeína em concentrações de 0,15 a 0,75 mg/mL e os resultados foram expressos em intensidade estimada de sabor (IES).

2.2.7 Aceitação sensorial

O procedimento adotado para avaliação sensorial foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, CAAE: 65493717.9.0000.0105 (ANEXO A) após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B), todos os avaliadores receberam informações orais e instruções escritas, sobre a análise.

A análise sensorial foi realizada em um laboratório de análise sensorial contendo cabines individuais, luz padrão e temperatura de 20 °C. Foram avaliadas quatro amostras de chás (chá branco, chá mate, chá roibos e chá misto otimizado)

em função do grau de aceitação do odor, sabor, aparência e impressão global das formulações por meio de uma escala hedônica de 9 pontos (1- desgostei extremamente, 5- indiferente, 9- gostei extremamente) (ISO, 2014). Cada chá foi avaliado por 75 consumidores não treinados, totalizando 300 avaliadores diferentes (63% do sexo feminino e 37% do sexo masculino, com 18 a 59 anos). O índice de aceitação para cada amostra foi calculado utilizando as médias dos escores utilizados na escala e os resultados foram expressos em percentual de aceitação.

2.2.8 Efeito da pasteurização nos fenólicos e atividade antioxidante

Tendo em vista a necessidade de submeter produtos alimentícios a tratamento térmico para garantir uma maior segurança alimentar ao consumidor, foi realizada uma pasteurização lenta (63 °C por 30 min) do chá otimizado. O conteúdo fenólico total assim como a capacidade redutora total foram avaliados antes e após a pasteurização conforme detalhados nos itens 2.3.1 e 2.4.2 respectivamente. Desta forma se torna possível verificar a existência ou não de perda ao longo do processo.

2.2.9 Ensaio biológicos

2.2.9.1 Citotoxicidade celular *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* foi realizada nos chás de ervas isolados (mate, chá branco e rooibos) e a formulação otimizada de chá em relação às linhagens celulares HepG2 (células de hepatocarcinoma humano) e Caco-2 células epiteliais de carcinoma colorretal). As células HepG2 foram mantidas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)/baixo teor de glucose Sigma-Aldrich, Brasil), a que se adicionou soro bovino fetal a 10% (FBS, Gibco, São Paulo, Brasil). Já as células Caco-2 foram mantidas em DMEM/alto teor de glucose (Sigma-Aldrich, Brasil) suplementado com 20% de FBS. Todos os meios continham 100 UI de penicilina/100 µg de estreptomicina (Sigma-Aldrich, Brasil).

Células (1×10^4 células/poço) foram colocadas em microplacas de 96 poços e diferentes concentrações entre 200 e 800 µg/mL de cada extrato de chá liofilizado foram testadas de acordo com Lao et al. (2016). Assim, a concentração capaz de inibição do crescimento celular em 50% (IC₅₀), a concentração do agente que inibe o

crescimento em 50% em comparação com células não tratadas (GI_{50}), e a concentração do agente que resulta em uma perda líquida de 50% de células em comparação com o número de células no início do tratamento (LC_{50}) foram determinados por Ramirez-mares, Kobayashi e De Mejia, 2016. A significância foi definida pela análise de variância unifatorial seguida do teste de comparação de médias Fisher LSD. A análise da dose-resposta sigmoidal foi realizada por regressão não linear (ajuste de curva) (RAMIREZ-MARES; KOBAYASHI, DE MEJIA, 2016). Os experimentos foram realizados duas vezes em medidas quadruplicadas.

2.2.9.2 Geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) intracelulares

Células (1×10^4 por poço) foram tratadas com chá branco, mate, rooibos e chá otimizado, diluídas em solução de DCFH-DA (25 mmol/L), em diferentes concentrações entorno de 10 $\mu\text{g/mL}$ (valores de IC_{25}). O procedimento seguiu o método proposto por Wolfe e Liu (2007), que foi modificado usando pré-tratamento com H_2O_2 (15 $\mu\text{mol/L}$) para todos os experimentos. Subsequentemente, as células foram incubadas a 37 °C durante 1 h e lavadas com PBS. Para o controle positivo, as células foram tratadas com H_2O_2 (15 $\mu\text{mol/L}$), e para o controle negativo, as células foram tratadas apenas com PBS, o qual foi tomado como referência para a porcentagem de proteção contra o H_2O_2 . A intensidade de fluorescência foi medida a um comprimento de onda de excitação de 485 nm e a um comprimento de onda de emissão de 538 nm. Os dados foram expressos como porcentagem da intensidade de fluorescência em relação aos poços controle.

2.2.10 Análise de dados e otimização estatística

Os dados foram expressos como média e desvio padrão. Para comparar as variáveis de resposta, inicialmente foi checada a homoscedasticidade dos dados pelos testes de Brown-Forsythe, sendo que diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial seguida do teste de comparação de média Fisher LSD. As correlações lineares entre as variáveis foram expressas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram adotados para rejeitar a hipótese nula.

Os efeitos isolado, binário e ternário das diferentes misturas de chás sobre as respostas foram avaliados usando a metodologia de superfície de resposta. A qualidade estatística dos modelos propostos foi avaliada pela porcentagem de variabilidade explicada pela equação de regressão linear múltipla (R^2), pelo coeficiente de determinação ajustado aos dados experimentais (R^2_{adj}), e pela significância do modelo (GRANATO; CALADO; JARVIS, 2014). Além disso, os resíduos foram avaliados pelo teste de Shapiro-Wilk. O software Statistica v. 13.2 (Statsoft, Tulsa, EUA) foi utilizado em todas as análises estatísticas.

A mistura otimizada dos três tipos de chás foi obtida por meio da aplicação da função de desejabilidade proposta por Derringer e Suich (1980) para maximizar o conteúdo fenólico total, capacidade antioxidante de redução frente ao íon cúprico, capacidade quelante de Fe^{2+} , capacidade inibitória da lipoperoxidação e intensidade do sabor umami. Sessenta iterações foram realizadas para obter a mistura de chás com o maior teor de compostos antioxidantes.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.3.1 Classes de compostos fenólicos

Os valores das classes de compostos fenólicos quantificados estão dispostos na Tabela 3. É possível observar que foi constatada diferença significativa ($p < 0,001$) para o conteúdo fenólico total (CFT). Sendo que, os valores do teor de compostos fenólicos totais variaram de 860 (rooibos) a 1293 (chá branco) mg AGE/L de chá. As amostras que continham 50% ou mais de chá branco apresentaram maiores teores de compostos fenólicos totais. Desta forma pode-se afirmar que entre os chás em estudo o chá branco foi o maior responsável pelo elevado conteúdo fenólico das combinações e misturas testadas. O elevado conteúdo fenólico em chá branco, já foi relatado por Zielinski et al. (2015) ao avaliarem a composição fenólica total em diferentes chás de *C. sinensis*.

Nota-se que o CFT da Amostra 7, a qual corresponde a uma mistura com 66,6% chá branco + 16,7% chá mate + 16,7% chá rooibos, não foi diferente da amostra a qual continha 100% de chá branco. O mais relevante nesse resultado, é que a mistura entre os três chás em estudo possibilitou um chá misto com conteúdo fenólico total não divergente do chá composto unicamente por *C. sinensis*, o qual já é reconhecido como um chá de elevado conteúdo fenólico. Desta forma, a mistura dos

extratos apresentou elevado conteúdo fenólico além de possivelmente apresentar maior diversificação nos compostos presentes.

Tabela 3 - Composição química da mistura dos extratos de chá branco, mate e roibos e suas combinações e misturas

Chá branco	Chá mate	Chá roibos	Amostras	Compostos fenólicos totais (mg AGE/L)	Flavonoides totais (mg CE/L)	Taninos condensados totais (mg CE/L)	Flavonóis totais (mg QE/L)	Orto-difenolicos totais (mg ACE/L)
1	0	0	1	1293±7 ^a	362±12 ^c	439±26 ^a	95±5 ^f	448±17 ^g
0	1	0	2	902±28 ^d	474±39 ^d	143±14 ^g	95±4 ^f	791±7 ^a
0	0	1	3	860±19 ^d	877±46 ^a	263±16 ^{cd}	282±3 ^a	718±16 ^c
0,5	0,5	0	4	1245±79 ^a	504±62 ^d	228±3 ^{ef}	96±3 ^f	614±10 ^e
0,5	0	0,5	5	1023±100 ^c	507±23 ^d	323±29 ^b	187±7 ^d	596±8 ^e
0	0,5	0,5	6	878±61 ^d	538±35 ^d	194±14 ^f	187±6 ^d	771±12 ^{ab}
0,666	0,167	0,167	7	1292±13 ^a	461±7 ^d	293±3 ^{bc}	124±1 ^e	560±15 ^f
0,167	0,666	0,167	8	1114±27 ^{bc}	505±55 ^d	115±6 ^g	120±3 ^e	726±24 ^c
0,167	0,167	0,666	9	1022±22 ^{bc}	679±30 ^b	198±13 ^f	234±8 ^b	738±13 ^{bc}
0,333	0,333	0,334	10	1112±14 ^b	530±37 ^d	241±3 ^{de}	158±1 ^c	671±33 ^d
p-Valor Homocedasticidade				0,265	0,879	0,962	0,836	0,935
p-Valor ANOVA/Welch				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: O autor

Nota: Letras diferentes na mesma coluna indica diferença significativa ao nível de 5% pelo teste de comparação de média Fisher LSD.

Em relação ao conteúdo de flavonoides totais apresentados na Tabela 3 as amostras apresentaram diferença significativa ($p < 0,001$). Na mesma tabela pode-se observar que os valores determinados variaram de 362 (100% chá branco) a 877 (100% chá roibos) mg CE/L. A amostra 3 (100% chá roibos) se destacou como a amostra com o maior teor de flavonoides totais entre as amostras estudadas, seguida da Amostra 9 a qual continha 66,70% de chá roibos. Essa superioridade do roibos neste parâmetro é explicada pela sua composição fenólica individual, a qual é composta majoritariamente por quercetina-3-rutinoside, quercetina e luteolina, todos compostos pertencentes à classe dos flavonoides. Já os outros chás envolvidos no presente trabalho têm como compostos majoritários em sua composição fenólica marcadores químicos de classes distintas como ácidos fenólicos e taninos condensados.

Observando a Tabela 3 é visto que a quantidade de taninos condensados determinada variou de 115 (16,7% chá branco + 66,6% chá mate + 16,7% chá roibos) a 438,85 (100% chá branco) mg QE/L. Na mesma tabela, observou-se diferença estatística ($p < 0,001$) entre as amostras estudadas. O nível mais elevado de taninos condensados foi determinado na amostra 1 a qual continha unicamente chá branco em sua composição. É característica de chá de *C. sinensis* apresentar em sua composição os flavan-3-óis como a subclasse de flavonoides mais abundante em sua composição, como dímeros e trímeros compostos por catequinas (GRANATO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016).

Elevados teores de taninos mostram-se interessante uma vez que de acordo com Hosu, Cristea e Cimpoi (2014) os taninos são considerados como compostos com elevada atividade antioxidante. Porém teores elevados do mesmo podem acarretar em maior adstringência (DEL BUBBA et al. 2009). Uma característica sensorial não tão apreciada em chás. Por essa razão, uma bebida composta de chá branco, com alto teor de taninos condensados, juntamente com chá mate e roibos que apresentam baixos teores desse composto, torna-se interessante pela possibilidade da ingestão dessas substâncias antioxidantes em uma bebida possivelmente mais suave.

O conteúdo de flavonóis totais apresentados na Tabela 3 variou de 95 (chá branco 100% e chá mate 100%) a 282 (chá roibos 100%) mg QE/L, apresentando diferença significativa ($p < 0,001$) entre as amostras. A amostra 3 composta por 100% do chá roibos teve o teor mais expressivo entre os chás testados, tanto de forma isolada como nas combinações entre os mesmos. A superioridade do chá de roibos em relação a essa variável é dada pelos teores de quercetina e quercetina-3-rutinosi de ambas pertencentes a classe dos flavonóis encontrados em roibos (JOURBERT; BEER, 2011). Além de que os outros chás envolvidos tanto o branco como o mate não têm por característica conter valores elevados desses compostos e sim de catequinas e ácidos fenólicos respectivamente (RODRIGUES et al., 2016, DA SILVEIRA et al., 2016).

O teor de *orto*-difenóis apresentou diferença estatística ($p < 0,001$) variando de 448 (chá branco 100%) a 791 (chá mate 100%) mg ACE/L. De acordo com Granato et al., (2014) os teores de *orto*-difenóis estão associados ao processamento do material em estudo. No presente estudo pode-se observar que quanto mais intenso for o processamento (secagem, fermentação ou torrefação) maior é o teor de *orto*-difenóis. A amostra 1, composta unicamente por chá branco, passa apenas por uma breve cocção a vapor e em seguida é seca rapidamente para evitar a oxidação (SHARANGI, 2009), obteve os menores teores de *orto*-fenóis. Já a amostra 3 composta por 100% do chá roibos passa pelo processo de secagem e fermentação oxidativa (KOTINA et al., 2012). Por sua vez, a amostra 2 composta unicamente por chá mate passa pelo mais intenso e rigoroso processamento entre os chás estudados, o qual de acordo com Basto et al. (2006) passa por uma trituração, branqueamento e torrefação a 160 °C por cerca de 12 min, foi a que apresentou os maiores valores de *orto*-difenóis. Desta forma confirmando a direta proporcionalidade entre intensidade de processamento e teor de *orto*-difenóis. Porém fatores como origem botânica, condições climáticas e qualidade do solo pode contribuir na síntese de determinadas classes de compostos nos vegetais.

2.3.2 Composição fenólica individual CLAE-MS

Os teores médios dos compostos fenólicos quantificados por HPLC-MS estão descritos na Tabela 4. Observou-se que as bebidas compostas majoritariamente por chá branco, amostras 1 (100% chá branco) e 7 (66,6% de chá branco + 16,7% chá

mate + 16,7% chá roibos), apresentaram os maiores teores de caempferol, (+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epigallocatequina, (-)-epicatequina-3-O-galato e ácido gálico, corroborando com os achados de Castro et al. (2010), Zielinski et al. (2015) e Utama-Ang et al. (2017). O teor de luteolina, quercetina-3-rutinoside, quercetina assim como ácido ferúlico foram superiores em roibos. Santos et al. (2016) avaliaram o efeito do tempo e temperatura de extração no teor de compostos fenólicos, e identificaram que quercetina, seus glicosídeos (quercetina-3-rutinosidee isoquercetina) e luteolina foram flavonoides mais abundantes identificados e quantificados nos extratos de roibos fermentado. Os mesmos autores relataram a presença de ácido ferúlico sendo o segundo ácido fenólico mais abundante nesse vegetal entre os analisados. Já o chá mate obteve os maiores teores ($p < 0,001$) de ácido cafeico entre as amostras avaliadas, seguido do extrato com 66,6% de mate (amostra 8).

Como esperado as amostras que continham a mistura dos três chás envolvidos apresentaram maior variedade de compostos fenólicos individuais. Como pode ser observado na Tabela 4, a amostra 7 (66,6% de chá branco + 16,7% chá mate + 16,7% chá roibos) apresentou em sua composição a maior variedade de compostos individuais identificados por CLAE-MS. Desta forma, fica claro a vantagem no que diz respeito a maior variedade de compostos químicos naturais em um chá misto, em relação a chás compostos unicamente por um vegetal. Esse resultado também aponta que a mistura ternária que contém maior teor de chá branco tende a se destacar em relação às outras estudadas.

Tabela 4 - Quantificação de compostos fenólicos da mistura entre extratos aquosos branco, mate e roibos utilizando LC-ESI-MS/MS

Chá branco	Chá mate	Chá roibos	Amostra	Compostos quantificados (mg/100g)											
				Flavonoides								Ácidos fenólicos			
				Caempferol	Luteolina	(+)- Catequina	(-)- Epicatequina	Quercetina	Quercetina- 3-rutinoside	(-)- epigalocatequina	(-)- epicatequina- 3-O-galato	Ácido p- cumárico	Ácido gálico	Ácido cafeico	Ácido ferúlico
1	0	0	1	1,1±0,3 ^a	nd	152±18 ^a	695±122 ^a	nd	106±10 ^d	627±110 ^b	3005±57 ^a	nd	114±19 ^a	3,2±0,2 ^{bc}	nd
0	1	0	2	nd	nd	nd	nd	nd	10±4 ^f	nd	19±1 ^h	nd	nd	5,2±0,8 ^a	nd
0	0	1	3	nd	7,8±08 ^a	nd	nd	32±5 ^a	255±22 ^a	nd	3,2±0,2 ^h	nd	nd	3,5±0,8 ^{bc}	33±4 ^a
0,5	0,5	0	4	nd	nd	72±3 ^d	533±86 ^b	nd	61±2 ^e	317±7 ^e	1793±37 ^d	nd	81±1 ^{bc}	3,8±0,1 ^b	nd
0,5	0	0,5	5	0,7±0,11 ^b	4,5±0,8 ^b	93±8 ^c	440±23 ^c	20±3 ^b	175±10 ^b	384±24 ^d	1647±54 ^e	nd	75±3 ^c	3,2±0,6 ^{bc}	18±3 ^c
0	0,5	0,5	6	Nd	1,2±0,2 ^d	nd	nd	8,0±0,5 ^d	66±2 ^e	nd	17±1 ^h	nd	nd	2,9±0,7 ^c	20±2 ^c
0,666	0,167	0,167	7	0,7±0,04 ^b	0,5±0,2 ^{ef}	128±3 ^b	681±58 ^a	7,8±0,5 ^d	126±10 ^c	710±62 ^a	1938±168 ^c	3,7±0,3 ^a	86±10 ^b	3,2±0,5 ^{bc}	12±1 ^d
0,167	0,666	0,167	8	nd	nd	27±3 ^f	157±7 ^e	4,7±0,3 ^e	53±3 ^e	111±9 ^f	360±36 ^g	nd	21±1 ^e	3,7±0,4 ^b	nd
0,167	0,167	0,666	9	nd	3,2±0,5 ^c	26±4 ^f	129±19 ^e	15±2 ^c	105±18 ^d	116±20 ^f	405±64 ^g	nd	20±3 ^e	2,9±0,4 ^c	27±3 ^b
0,333	0,333	0,334	10	nd	1,0±0,2 ^{de}	54±7 ^e	324±8 ^d	8,5±0,3 ^d	105±3 ^d	316±10 ^e	902±76 ^f	nd	43±1 ^d	3,6±0,3 ^{bc}	nd
0,833	0,107	0,060	OT	1,0±0,1 ^a	nd	144±9 ^a	650±33 ^a	4,0±0,4 ^e	110±2 ^d	564±32 ^c	2842±85 ^b	3,4±0,4 ^b	105±4 ^a	3.45±0.26 ^{bc}	nd
p-Value (one-way ANOVA)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: O autor

Nota: Letras diferentes na mesma coluna representam diferença nos valores médios ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD. OT = Extrato otimizada (82,9% *Camellia sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis*); nd = não detectado.

2.3.3 Atividade antioxidante

Os valores médios \pm desvio padrão ($n=3$) para todos os ensaios de atividade antioxidante da mistura entre chá branco, mate e rooibos estão dispostos na Tabela 5. A capacidade redutora total (CRT) variou de 1808 a 6300 mg AGE/L, apresentando diferença significativa entre as amostras ($p<0,001$). A amostra 1 (100% chá branco) mostrou-se superior em relação as outras estudadas. Esse comportamento também foi observado em relação a capacidade antioxidante de captura do radical ABTS⁺ a qual apresentou diferença significativa com valor $p<0,001$ entre as amostras avaliadas, com valores médios variando de 1017 a 2352 mg AAE/L.

A superioridade da amostra composta unicamente por chá branco é explicável, tendo em vista que já é uma característica de extratos de *C. sinensis* a presença de um conteúdo elevado de catequinas em sua composição. As catequinas, são compostos pertencentes ao grupo dos flavan-3-ols, o qual tem por característica apresentar atividade antioxidante, tanto atividade redutora de metais como de captura de radicais livres. Essas atividades exercidas estão relacionadas diretamente a quantidade de grupos hidroxila presentes em sua estrutura química e a posição as quais estão ligados nos anéis aromáticos (ARON; KENNEDY, 2008).

Já para a capacidade inibitória da lipoperoxidação em meio biológico (gema de ovo), os valores determinados apresentaram diferença significativa ($p<0,001$) com os valores médios variando de 4 a 70% de inibição da lipoperoxidação, e estão dispostos na Tabela 5. O maior valor foi determinado na amostra 7 a qual corresponde a uma mistura ternária contendo, 66,6% de chá branco + 16,7% mate + 16,7% rooibos. Fica notório o potencial antioxidante em meio biológico de uma mistura ternária de chás de diferentes origens botânicas. Como já relatado por Margraf et al. (2016) este resultado possibilita uma visão mais próxima de um método *in vivo* tendo em vista que é realizado em meio biológico com pH 7,4 e temperatura 37 °C simulando a oxidação lipídica em meio fisiológico induzida pela reação de Fenton (Equação 11).

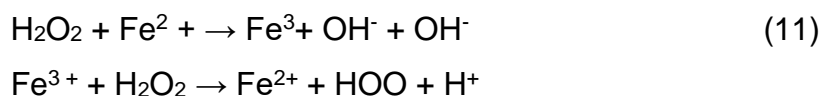


Tabela 5 - Capacidade antioxidante redutora de íons metálicos, sequestradora de radical e quelante de metal de transição da mistura entre chá branco, mate e roibos

Chá branco	Chá mate	Chá roibos	Amostra	CUPRAC (mg GAE/L)	CRT (mg QE/L)	ABTS (mg AAE/L)	Poder quelante Fe ²⁺ (% de formação do complexo Fe ²⁺ -ferrozina)	Inibição da lipoperoxidação (% inibição)
1	0	0	1	1038±22 ^{bc}	6300±77 ^a	2352±35 ^a	24±1 ^d	68±1 ^{ab}
0	1	0	2	804±24 ^f	1842±107 ^h	1017±62 ^e	14±<1 ^f	4±2 ^f
0	0	1	3	991±26 ^d	4032±104 ^c	1345±98 ^d	33±2 ^a	17±1 ^e
0,5	0,5	0	4	981±32 ^d	2159±104 ^f	1947±88 ^b	18±<1 ^e	32±10 ^d
0,5	0	0,5	5	1076±20 ^a	4537±121 ^b	1858±135 ^b	26±<1 ^c	59±1 ^{bc}
0	0,5	0,5	6	902±22 ^e	2535±59 ^e	1143±35 ^{de}	27±1 ^c	9±<1 ^{ef}
0,666	0,167	0,167	7	1061±24 ^{ab}	2800±15 ^d	2370±114 ^a	23±<1 ^d	70±1 ^a
0,167	0,666	0,167	8	935±4 ^e	1808±59 ^h	1279±3 ^{de}	18±<1 ^e	16±1 ^e
0,167	0,167	0,666	9	1006±22 ^{cd}	1962±65 ^g	1690±180 ^{cd}	28±<1 ^b	52±10 ^c
0,333	0,333	0,334	10	977±9 ^d	2039±89 ^{fg}	1738±101 ^{bc}	23±<1 ^d	55±11 ^c
p-Valor homocedasticidade				0,962	0,978	0,797	0,480	<0,001
p-Valor ANOVA/Welch				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: O autor

Nota: Letras diferentes na mesma coluna representam diferença nos valores médios ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD.

A capacidade antioxidante frente ao método CUPRAC, obteve valores médios variando de 804 a 1076 mg GAE/L, apresentando diferença significativa entre as amostras avaliadas ($p < 0,001$) como exposto na Tabela 5. A maior atividade antioxidante foi determinada na amostra 5 (50% chá branco + 50% Chá rooibos). A maior atividade sendo registrada em uma amostra que contenha mais de uma erva, mostra a superioridade em relação aos chás de ervas estudados compostos por apenas uma espécie. Métodos que mensuram a capacidade redutora são fundamentais para estabelecer o perfil antioxidante de determinadas matrizes. Como relatado por Prior, Wu, e Schaich, (2005) a capacidade redutora (doador de elétron) nada mais é do que um dos mecanismos de ação de um composto antioxidante.

Observando os valores obtidos para a capacidade quelante do Fe^{2+} na Tabela 5, é possível notar que houve diferença significativa ($< 0,001$) entre as amostras avaliadas. Os valores médios variaram de 14 a 33% de formação do complexo Fe^{2+} -Ferrozina. Sendo que a amostra 2 composta por 100% de chá mate, apresentou o menor valor médio de formação, ou seja, mostrou-se superior em relação as outras amostras testadas. A menor formação do complexo Fe^{2+} -Ferrozina indica que após a reação com o extrato em estudo, poucas moléculas de Fe^{2+} ficaram disponíveis para se ligar com a ferrozina, ou seja, o extrato apresentou elevada eficiência em quelar esse metal. Andjelković et al. (2006) em estudo da propriedade quelante de ácidos fenólicos, relataram que os ácidos clorogênico e cafeico apresentam forte capacidade quelante de íons ferrosos. Essa afirmação explica a forte atividade quelante da amostra 2 (100% chá mate). Como relatado por Souza et al. (2015) extratos de *Ilex paraguariensis* são reconhecidos como ricos em ácidos cafeico, clorogênicos e seus derivados.

2.3.4 Correlação

É válido salientar a importância em aplicar diferentes métodos para avaliar a atividade antioxidante de um determinado extrato. Como já relatado por Apak et al. (2016) e Avan et al. (2018), a utilização de métodos com mecanismos de ação, meio reacional e tempo de reação distintos são recomendados para que se tenha uma avaliação ampla da atividade antioxidante de matrizes complexas como chás. Também é recomendado, que quando há uma avaliação da atividade antioxidante por

diferentes métodos, a associação entre os métodos aplicados e composição fenólica seja avaliada.

Desta forma, a análise de correlação mostrou associação positiva e significativa ($p < 0,05$) entre a capacidade antioxidante de redução frente ao íon cúprico (CUPRAC) e o teor de compostos fenólicos totais ($r = 0,528$) e taninos condensados ($r = 0,715$). Já a capacidade de captura do radical ABTS⁺ mostrou-se correlacionada positivamente com o teor de compostos fenólicos totais ($r = 0,794$) e taninos condensados ($r = 0,796$). A capacidade quelante do Fe²⁺, apresentou correlação com flavonoides totais ($r = 0,646$) e flavonóis totais ($r = 0,869$). O Poder antioxidante de inibição da lipoperoxidação correlacionou-se positivamente com o conteúdo fenólico total ($r = 0,664$), flavonoides totais ($r = 0,895$) e taninos condensados ($r = 0,740$). Por sua vez a capacidade redutora total apresentou correlação com o teor de taninos condensados ($r = 0,903$).

Dentre os compostos fenólicos medidos por HPLC-MS, observou-se correlação positiva e significativa ($p < 0,05$) do teor de (-)-epicatequina-3-O-galato, com CUPRAC ($r = 0,673$), capacidade redutora total ($r = 0,633$), ABTS⁺ ($r = 0,921$) e capacidade inibitória da peroxidação lipídica ($r = 0,785$). O conteúdo de ácido gálico mostrou-se relacionado com CUPRAC ($r = 0,706$), ABTS⁺ ($r = 0,934$) e capacidade inibitória da peroxidação lipídica ($r = 0,805$). Já teor de (+)-catequina, apresentou associação com CUPRAC ($r = 0,726$), ABTS⁺ ($r = 0,944$) e capacidade inibitória da peroxidação lipídica ($r = 0,854$). Assim como para (-)-epicatequina, com CUPRAC ($r = 0,702$), ABTS⁺ ($r = 0,952$) e capacidade inibitória da peroxidação lipídica ($r = 0,818$). E (-)-epigallocatequina, CUPRAC ($r = 0,718$), ABTS⁺ ($r = 0,951$) e capacidade inibitória da peroxidação lipídica ($r = 0,873$). O que diz respeito ao conteúdo de quercetina-3-rutinoside apresentou correlação com CUPRAC ($r = 0,640$) e capacidade do Fe²⁺ ($r = 0,830$). O quantificado de Luteolina assim como de quercetina mostrou-se relacionado com a capacidade do Fe²⁺ com $r = 0,8036$ e $r = 0,8246$, respectivamente.

2.3.5 Metodologia de superfície de resposta e otimização

Por meio da aplicação da metodologia de superfície de resposta, os dados obtidos para classes de compostos fenólicos (fenólicos totais, flavonoides totais, taninos condensados, flavonóis totais e *orto*-difenois), atividade antioxidante (Capacidade redutora de íons cúprico, Capacidade redutora total, captura do radical

ABTS⁺, poder quelante Fe²⁺, e capacidade inibitória da peroxidação lipídica) e perfil de sabor instrumental (amargo, ácido, salgado e umami) foram modelados matematicamente e os resultados foram expostos na Tabela 6 assim como os parâmetros estatísticos dos mesmos. E os efeitos dos chás branco, mate e rooibos assim como suas misturas binárias e ternárias frente a esses parâmetros (composição fenólica, poder antioxidante e sabor instrumental) podem ser observados na Figura 9.

Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e rooibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes

(continua)

Componentes do modelo	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
Compostos fenólicos totais						
(A) Chá branco	1270	30	42	<0,001	1207	1333
(B) Chá mate	892	30	29	<0,001	829	956
(C) Chá rooibos	836	28	29	<0,001	776	895
AB	717	186	3,8	0,001	327	1107
ABC	3648	1084	3,4	0,003	1380	5916
AC(A-C)	-2426	519	-4,7	<0,001	-3513	-1340
R ²	0,904					
R ² ajustado	0,878					
p valor (modelo)	<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)	0,474					
Flavonoides totais						
(A) Chá branco	366	31	12	<0,001	301	431
(B) Mate tea	478	31	15	<0,001	413	544
(C) Chá rooibos	882	31	28	<0,001	816	947
AB	427	158	2,7	0,015	94	760
AC	-406	142	-2,8	0,011	-707	-106
BC	-545	158	-3,4	0,003	-878	-212
AB(A-B)	-2278	584	-3,9	0,001	-3511	-1045
AC(A-C)	2459	540	4,5	<0,001	1320	3599
R ²	0,908					
R ² ajustado	0,870					
P valor (modelo)	<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)	0,829					

Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e rooibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes

(continuação)

Componentes do modelo	do	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
Taninos condensados							
(A) Chá branco		418	24	18	<0,001	368	467
(B) Chá mate		129	24	5,3	<0,001	78	180
(C) Chá rooibos		251	20	13	<0,001	210	293
AB		-337	133	-2,5	0,019	-614	-61
AB(A-B)		-2048	438	-4,7	<0,001	-2962	-1133
R ²		0,806					
R ² ajustado		0,767					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,157					
Flavonóis totais							
(A) Chá branco		96	6,7	14	<0,001	82	110
(B) Chá mate		96	6,7	14	<0,001	82	110
(C) Chá rooibos		282	6,7	42	<0,001	268	296
AB (A-B)		-1695	152	-11	<0,001	-2011	-1379
AC (A-C)		1305	138	9,4	<0,001	1016	1594
R ²		0,960					
R ² ajustado		0,952					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,005					
<i>orto</i> -difenólicos							
(A) Chá branco		462	22	20	<0,001	415	509
(B) Chá mate		791	22	36	<0,001	745	837
(C) Chá rooibos		739	22	33	<0,001	692	786
AC (A-C)		1442	423	3,4	0,003	563	2321
R ²		0,829					
R ² ajustado		0,805					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,041					
Capacidade redutora íon cúprico (CUPRAC)							
(A) Chá branco		1033	17	59	<0,001	998	1069
(B) Chá mate		805	16	51	<0,001	773	838
(C) Chá rooibos		987	15	65	<0,001	956	1018
AB		288	78	3,7	0,001	127	450

Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e rooibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes

(continuação)

Componentes do modelo	do	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
AC		286	79	3,6	0,001	124	448
AB (A-B)		-1882	246	-7,6	<0,001	-2391	-1373
R ²		0,880					
R ² ajustado		0,855					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,077					
Capacidade redutora total							
(A) Chá branco		6004	299	20	<0,001	5388	6621
(B) Chá mate		1637	299	5,5	<0,001	1021	2254
(C) Chá rooibos		3492	262	13	<0,001	2952	4033
AB		-7193	1575	-4,6	<0,001	-10443	-3942
ABC		-28277	9019	-3,1	0,004	-46892	-9662
AB (A-B)		-21039	4629	-4,5	<0,001	-30592	-11485
R ²		0,867					
R ² ajustado		0,839					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,480					
Capacidade de captura do radical – ABTS ⁺							
(A) Chá branco		2370	129	18	<0,001	2103	2636
(B) Chá mate		1016	129	7,9	<0,001	750	1283
(C) Chá rooibos		1242	129	9,6	<0,001	976	1509
ABC		11398	3959	2,9	0,008	3226	19569
AB (A-B)		-6321	2504	-2,5	0,019	-11489	-1153
AC (A-C)		-7284	2504	-2,9	0,008	-12452	-2116
R ²		0,746					
R ² ajustado		0,693					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,649					
Poder quelante do Fe ²⁺							
(A) Chá branco		24	0,4	58	<0,001	23	25
(B) Chá mate		14	0,4	34	<0,001	13	15
(C) Chá rooibos		33	0,4	80	<0,001	32	33
AB		-5,8	1,8	-3,1	0,005	-10	-2
AC		-8,0	1,8	-4,4	<0,001	-12	-4
BC		12	1,8	6,5	<0,001	8	16
AB (A-B)		-167	6,7	-25	<0,001	-180	-153

Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e rooibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes

(continuação)

Componentes do modelo	do	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
AC (A-C)		95	6,7	14	<0,001	81	109
R ²		0,987					
R ² ajustado		0,982					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,178					
Inibição da lipoperoxidação							
(A) Chá branco		66	3,9	17	<0,001	57	74
(B) Chá mate		0,1	3,7	0,1	0,938	-7	8
(C) Chá rooibos		15	4,1	3,8	0,001	7	24
AC		70	19	3,6	0,001	30	109
ABC		723	115	6,3	<0,001	486	959
AB (A-B)		-516	69	-7,4	<0,001	-659	-373
AC (A-C)		-309	65	-4,7	<0,001	-443	-175
R ²		0,921					
R ² ajustado		0,902					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,004					
Gosto amargo							
(A) Chá branco		7,2	0,04	187	<0,001	7,1	7,3
(B) Chá mate		8,4	0,04	217	<0,001	8,3	8,4
(C) Chá rooibos		7,6	0,04	179	<0,001	7,5	7,6
AC		-2,9	0,20	-14	<0,001	-3,4	-2,5
BC		-2,8	0,20	-14	<0,001	-3,3	-2,4
ABC		3,6	1,2	2,9	0,007	1,0	6,1
AB (A-B)		8,8	0,69	13	<0,001	7,4	10,2
AC (A-C)		-1,5	0,68	-2,2	0,031	-2,9	-0,15
R ²		0,970					
R ² ajustado		0,964					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,369					
Gosto ácido							
(A) Chá branco		6,9	0,17	40	<0,001	6,5	7,2
(B) Chá mate		1,6	0,17	9,1	<0,001	1,2	1,9
(C) Chá rooibos		5,2	0,19	27	<0,001	4,8	5,6
AC		13	0,92	14	<0,001	11	15

Tabela 6 - Coeficientes de regressão obtidos pela metodologia de superfície de resposta dos chás branco (A), mate (B) e rooibos (C), e suas misturas binária e ternária na composição química, perfil do sabor instrumental e atividades antioxidantes

(conclusão)

Componentes do modelo	do	Coeficientes de regressão	Erro padrão	t-valor	p-valor	-95% Confiança	95% Confiança
BC		13	0,92	14	<0,001	11	15
ABC		-16	5,6	-2,9	0,007	-27	-4,7
AB (A-B)		-40	3,1	-13	<0,001	-46	-34
AC (A-C)		7,1	3,1	2,3	0,028	0,8	13
R ²		0,971					
R ² ajustado		0,965					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,472					
Gosto salgado							
(A) Chá branco		1,9	0,25	7,5	<0,001	1,4	2,4
(B) Chá mate		5,2	0,23	23	<0,001	4,8	5,7
(C) Chá rooibos		9,1	0,23	40	<0,001	8,7	9,6
AB		9,5	1,2	7,7	<0,001	6,9	12
AC		7,3	1,2	5,9	<0,001	4,8	10
ABC		-49,3	7,5	-6,6	<0,001	-64	-34
AB (A-B)		-41,1	4,1	-9,9	<0,001	-49	-33
AC (A-C)		33,9	4,1	8,2	<0,001	26	42
R ²		0,948					
R ² ajustado		0,937					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,107					
Gosto umami							
(A) Chá branco		1,4	0,36	3,9	<0,001	0,7	2,1
(B) Chá mate		8,8	0,32	28	<0,001	8,1	9,4
(C) Chá rooibos		6,7	0,35	19	<0,001	5,9	7,4
AC		5,9	1,8	3,3	0,002	2,3	9,6
AB (A-B)		34	5,7	6,0	<0,001	23	46
R ²		0,857					
R ² ajustado		0,840					
P valor (modelo)		<0,001					
P valor (normalidade dos resíduos)		0,267					

Fonte: O autor

Figura 9 - Gráficos de contorno para mostrar os efeitos dos chás branco, mate e roibos no conteúdo fenólico total (A), flavonoides totais (B), taninos condensados (C), flavonóis (D), *orto*-difenóis, (E), CUPRAC (F), capacidade redutora total (G) atividade de eliminação do radicais ABTS⁺ (H), atividade quelante de ferro (I), inibição da lipoperoxidação (J), amargor (K), acidez (L), salinidade (M) e umami (N) dos chás branco, mate torrado, roibos e chá misto otimizado.

(Continua)

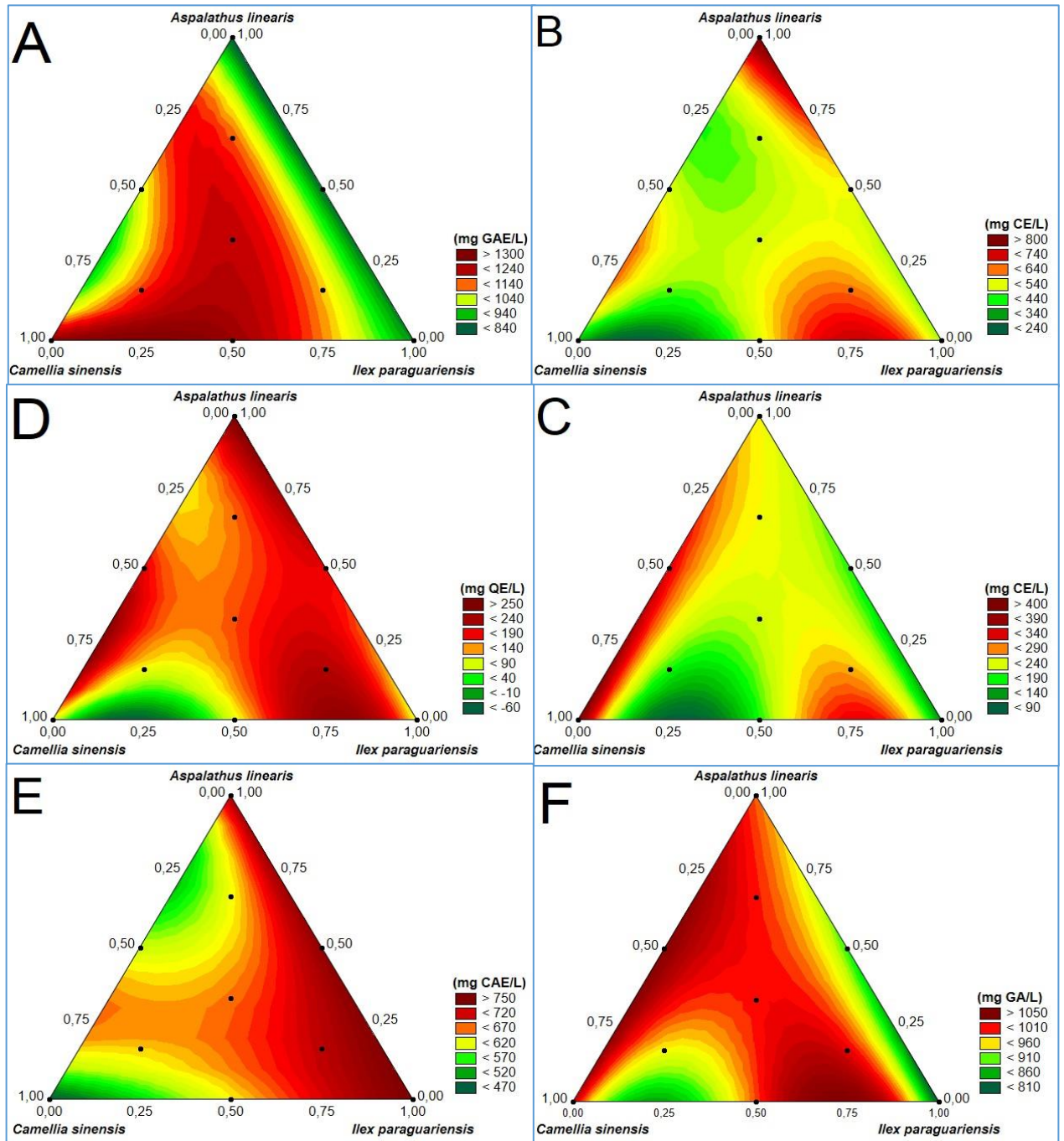


Figura 9 - Gráficos de contorno para mostrar os efeitos dos chás branco, mate e roibos no conteúdo fenólico total (A), flavonoides totais (B), taninos condensados (C), flavonóis (D), orto-difenóis, (E), CUPRAC (F), capacidade redutora total (G) atividade de eliminação do radicais ABTS⁺ (H), atividade quelante de ferro (I), inibição da lipoperoxidação (J), amargor (K), acidez (L), salinidade (M) e umami (N) dos chás branco, mate torrado, roibos e chá misto otimizado.

(Continuação)

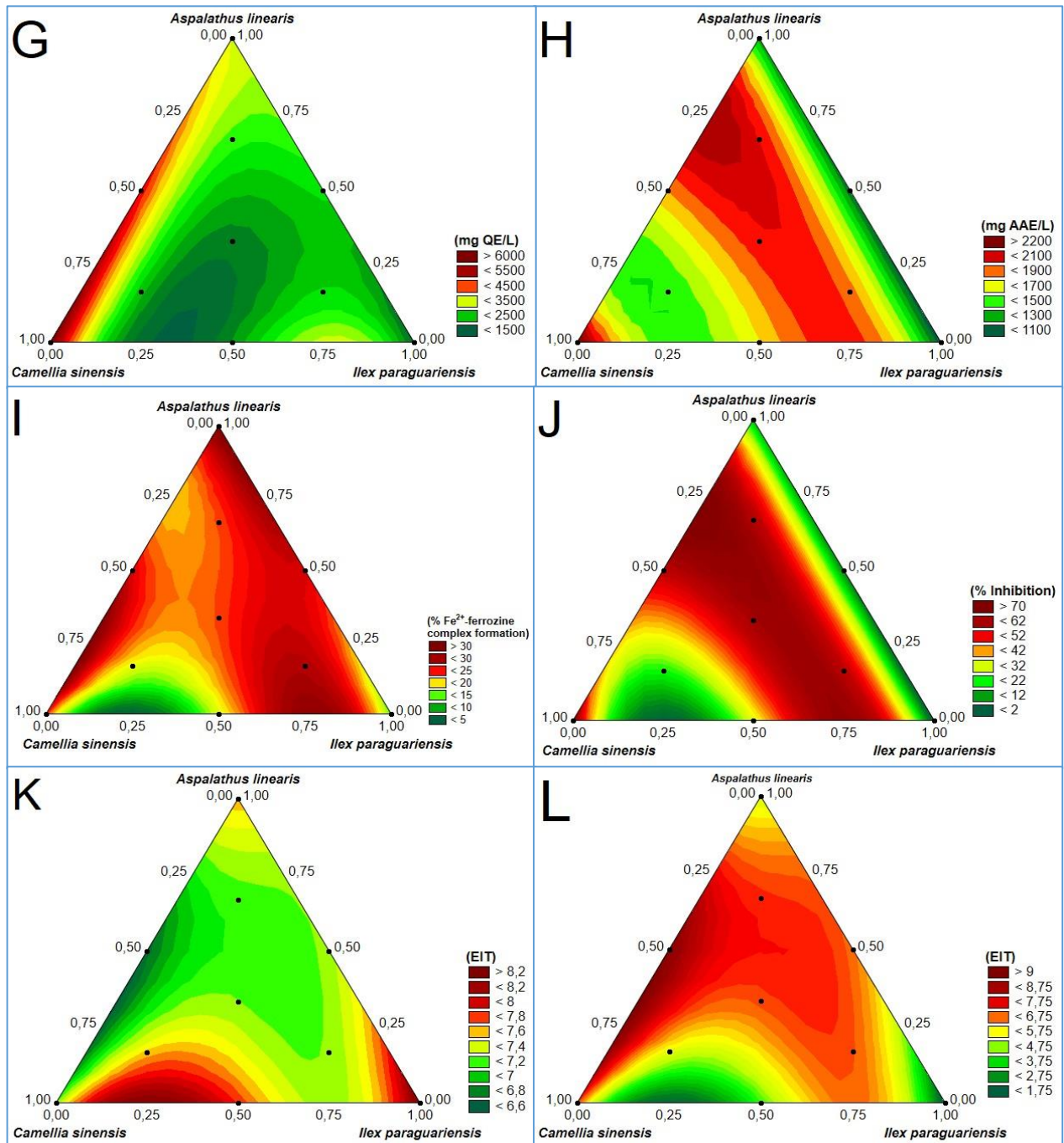
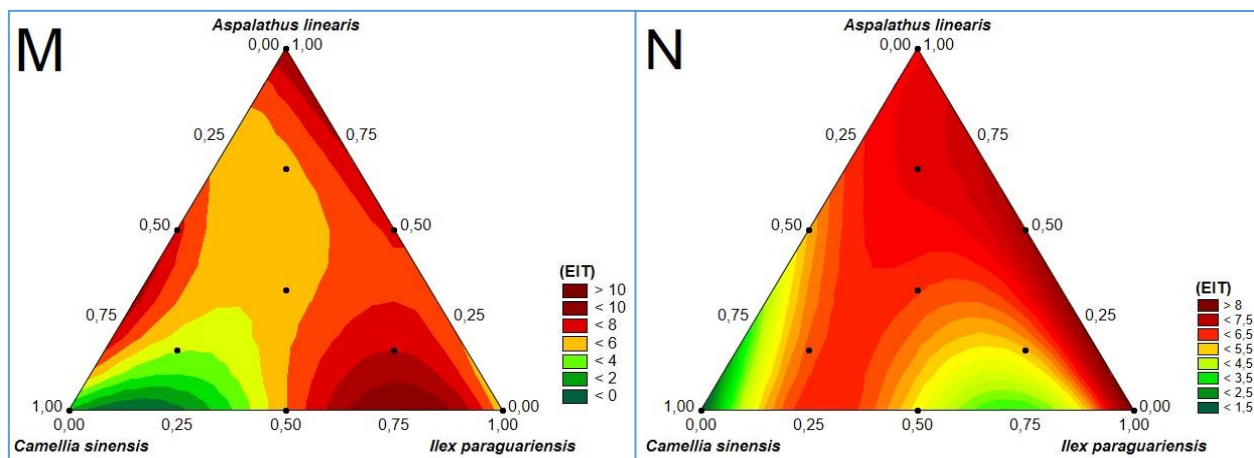


Figura 9 - Gráficos de contorno para mostrar os efeitos dos chás branco, mate e roibos no conteúdo fenólico total (A), flavonoides totais (B), taninos condensados (C), flavonóis (D), orto-difenóis, (E) , CUPRAC (F), capacidade redutora total (G) atividade de eliminação do radicais ABTS⁺ (H), atividade quelante de ferro (I), inibição da lipoperoxidação (J), amargor (K), acidez (L), salinidade (M) e umami (N) dos chás branco, mate torrado ,roibos e chá misto otimizado.

(Conclusão)



Fonte: O autor

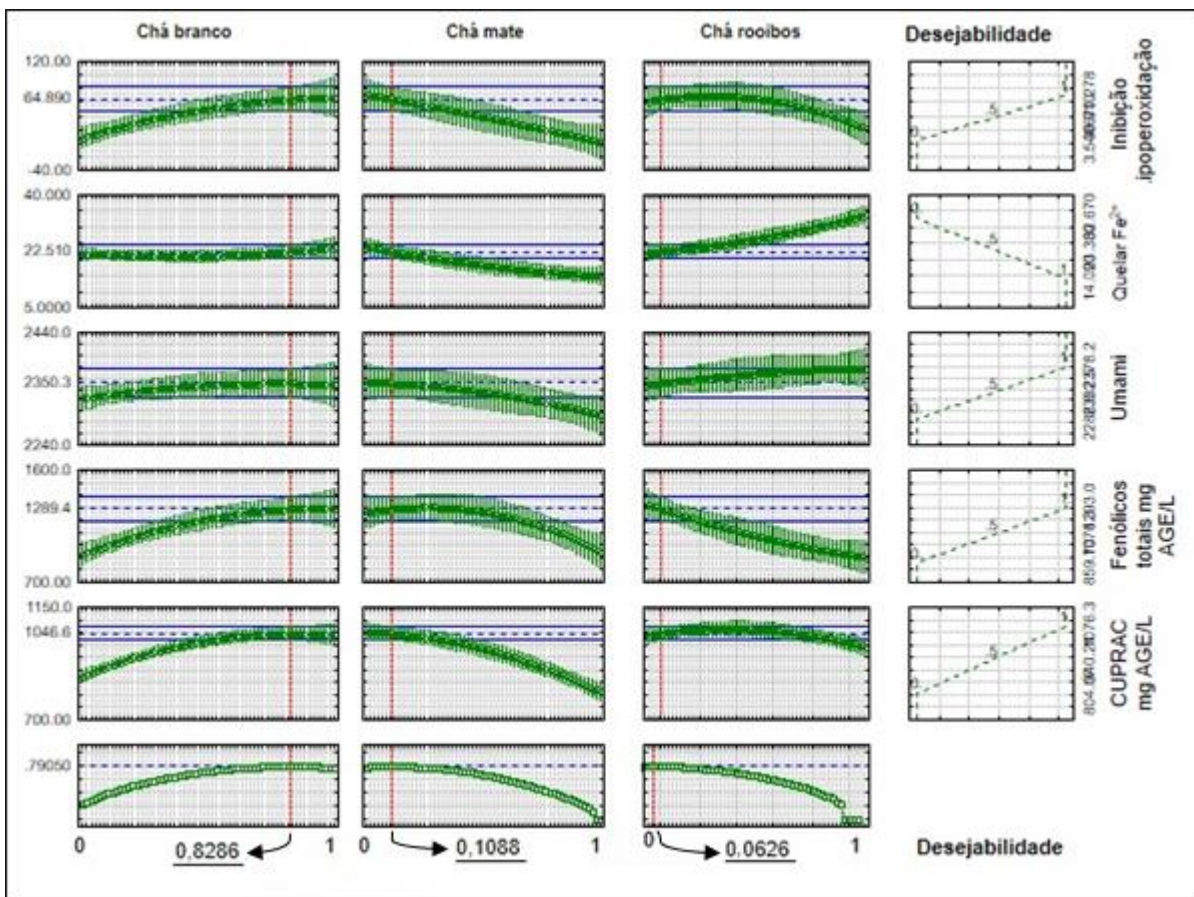
Todos os modelos de regressão múltipla propostos foram considerados significativos ($p < 0,001$) para explicar os efeitos dos parâmetros avaliados. Mais de 74% ($R^2 > 0,74$) da variabilidade dos dados foram explicadas, além de que o teste de normalidade dos resíduos aponta que não houve falta de ajuste ($p > 0,05$), indicando que os modelos gerados apresentaram boa qualidade estatística. Tais parâmetros fazem com que seja possível a aplicação de modelos de metodologia de superfície de resposta para prever o teor classes de compostos fenólicos, atividade antioxidante assim como o perfil de sabor instrumental.

É notório que houve efeitos significantes ($p < 0,05$) de cada tipo de chá em todas as variáveis de resposta estudadas. Sendo que combinações entre chá branco/chá mate apresentaram efeito significativo no aumento do conteúdo fenólico total, flavonoides totais, taninos condensados, flavonóis totais, CUPRAC, capacidade redutora total, captura do radical ABTS⁺ poder quelante do Fe²⁺, inibição da peroxidação lipídica, amargor, acidez, salgado e umami. Já combinações entre o chá branco/roibos afetou de forma significativa o conteúdo fenólico total, flavonoides totais, flavonóis totais, orto-difenóis, CUPRAC, captura do radical ABTS⁺, poder quelante do Fe²⁺, inibição da peroxidação lipídica, amargor, acidez, salgado e umami. A combinação entre chá mate/chá roibos apresentou efeito significativo no aumento

dos flavonoides totais, poder quelante do Fe^{2+} , amargor e acidez. Misturas ternárias entre os chás branco/mate/rooibos foram significativas para maximizar o conteúdo fenólico total, capacidade redutora total, Captura do radical ABTS^+ , inibição da peroxidação lipídica, amargor, acidez e salgado.

Uma otimização simultânea foi aplicada em torno do conteúdo fenólico total, capacidade inibitória da lipoperoxidação, poder quelante do Fe^{2+} , CUPRAC e umami (Figura 10), que resultou em uma formulação otimizada contendo 82,9% chá branco + 10,9% chá mate + 6,2% chá rooibos. Com uma função desejável (valor d) de 0,7905, apontando essa formulação como a melhor proporção entre os chás envolvidos no presente estudo que possibilite um alto conteúdo fenólico (Fenólicos totais), atividade antioxidante (CUPRAC, Inibição da lipoperoxidação, capacidade quelante do Fe^{2+}) e maior intensidade de sabor (umami).

Figura 10 - Perfis para valores previstos e desejabilidade



Fonte: O autor

Para avaliar a otimização, realizou-se uma validação externa (Tabela 7), na qual quantificou-se usando os mesmos ensaios experimentais, o conteúdo fenólico total, assim como o poder antioxidante em relação a inibição da lipoperoxidação,

capacidade quelante do Fe^{2+} e sabor instrumental umami da formulação proposta e esses valores foram comparados com os valores propostos pelo modelo de regressão.

Tabela 7 - Valores previstos e experimentais para a mistura ternária otimizada de chás branco (82,9%), mate (10,9%) e rooibos (6,2%)

Parâmetros avaliados	Valores médios previstos	-95% predição	+95% predição	Valores médios experimentais	Erro relativo (%) [*]
Compostos fenólicos totais	1289	1108	1470	1221±10	-0,05
capacidade quelante do Fe^{2+}	22	19	26	21±1	-0,05
inibição da lipoperoxidação	65	31	98	64±2	-0,02
Gosto umami	3,45	0,86	6,04	8,90±0,06 ^a	1,58

Fonte: O autor

Os dados experimentais obtidos encontram-se dentro dos intervalos de predição $\pm 95\%$ propostos pelo modelo. Desta forma os modelos de regressão podem ser considerados tanto significativo quanto preditivo já que apresentaram a capacidade de prever um resultado por meio dos modelos matemáticos propostos.

A amostra otimizada apresentou em sua composição quantidades de 10 dos 12 compostos quantificados no presente estudo (Tabela 4). Desta forma fica notório o quanto mais diversificado tornou-se o chá otimizado, em comparação aos extratos compostos por apenas uma das ervas envolvidas na mistura.

2.3.6 Atividade antimicrobiana

Frente aos micro-organismos testados foi constatado atividade inibitória para *Bacillus cereus* apresentando halo de inibição $\varnothing=9,78$ mm. Entre os extratos testados apenas a amostra otimizada (82,9% chá branco + 10,9% chá mate + 6,2% chá rooibos) e a combinação binária entre 50% de chá branco e 50% de chá rooibos, apresentaram ação inibitória frente a esse micro-organismo. Ausência do efeito antimicrobiano nas amostras compostas apenas por uma erva, aponta a importância de se estudar combinações de extratos naturais de diferentes origens botânicas. Já que a combinação binária (Chás branco/rooibos) e ternária (chás

branco/mate/rooibos) agiram de forma positiva para inibir o crescimento de *Bacillus cereus*. Desta forma os presentes resultados mostram que combinações entre duas ou mais ervas podem atuar de forma positiva em função do melhoramento ou até mesmo surgimento de certas funcionalidades como atividade antimicrobiana.

Como relatado por Almajano et al. (2008) a capacidade antimicrobiana em chás de ervas, é diretamente relacionada a composição fenólica e conseqüentemente a capacidade antioxidante apresentada. Essa afirmação corrobora com o resultado obtido no presente estudo, já que foi relatada ação antimicrobiana em amostras que apresentam em sua composição 50% ou mais de chá branco correspondendo às amostras com maior composição fenólica como relatado na Tabela 3. Almajano et al. (2008) avaliaram chás de *Camellia sinensis* em diferentes graus de oxidação (chás branco, verde, vermelho e preto) e concluíam que a atividade antimicrobiana do chá branco (não fermentado) é maior do que a dos chás que passam por algum processo fermentativo tais como os chás vermelho e preto.

2.3.7 Perfil de sabor instrumental e análise sensorial

Os resultados apresentados na Tabela 8 demonstram o perfil de gosto instrumental dos chás avaliados, os quais apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,001$) para todos os sabores avaliados. Na mesma tabela observa-se variação entre os valores médios de 8,38 a 6,82 intensidade estimada de gosto amargo. A amostra 2 composta por 100% de chá mate apresentou a maior intensidade de amargor entre as amostras avaliadas. O fato mais interessante é que a amostra otimizada apresentou o menor valor para intensidade estimada de sabor amargo ($6,84 \pm 0,15$) em relação aos chás individuais, e o segundo menor em relação a todas as amostras avaliadas. Como já relatado por Granato et al. (2014), forte intensidade de gosto amargo não é desejada pelos consumidores de bebidas à base de chás de ervas no ocidente.

Na Tabela 8 é possível notar que o gosto umami, apresentou maior intensidade na amostra otimizada (82,9% chá branco + 10,9% chá mate + 6,2% chá rooibos). O Umami é considerado o quinto gosto básico e apresenta papel fundamental durante a avaliação gustativa de chás (HAYASHI, et al 2008). A combinação entre 50% de chá branco e 50% de chá rooibos apresentou a maior intensidade de gosto ácido. Assim como o chá composto unicamente por rooibos

apresentou a maior intensidade de gosto salgado. A amostra otimizada apresentou valores intermediários para o sabor ácido assim como para o salgado (Tabela 8). Esses valores determinados, apresentam-se de forma satisfatória, já que tanto uma fraca intensidade, assim como, uma forte intensidade desses gostos não contribui para uma boa aceitação de um produto.

Tabela 8 - Perfil de sabor instrumental dos chás branco, mate e roibos, e suas misturas binária e ternária

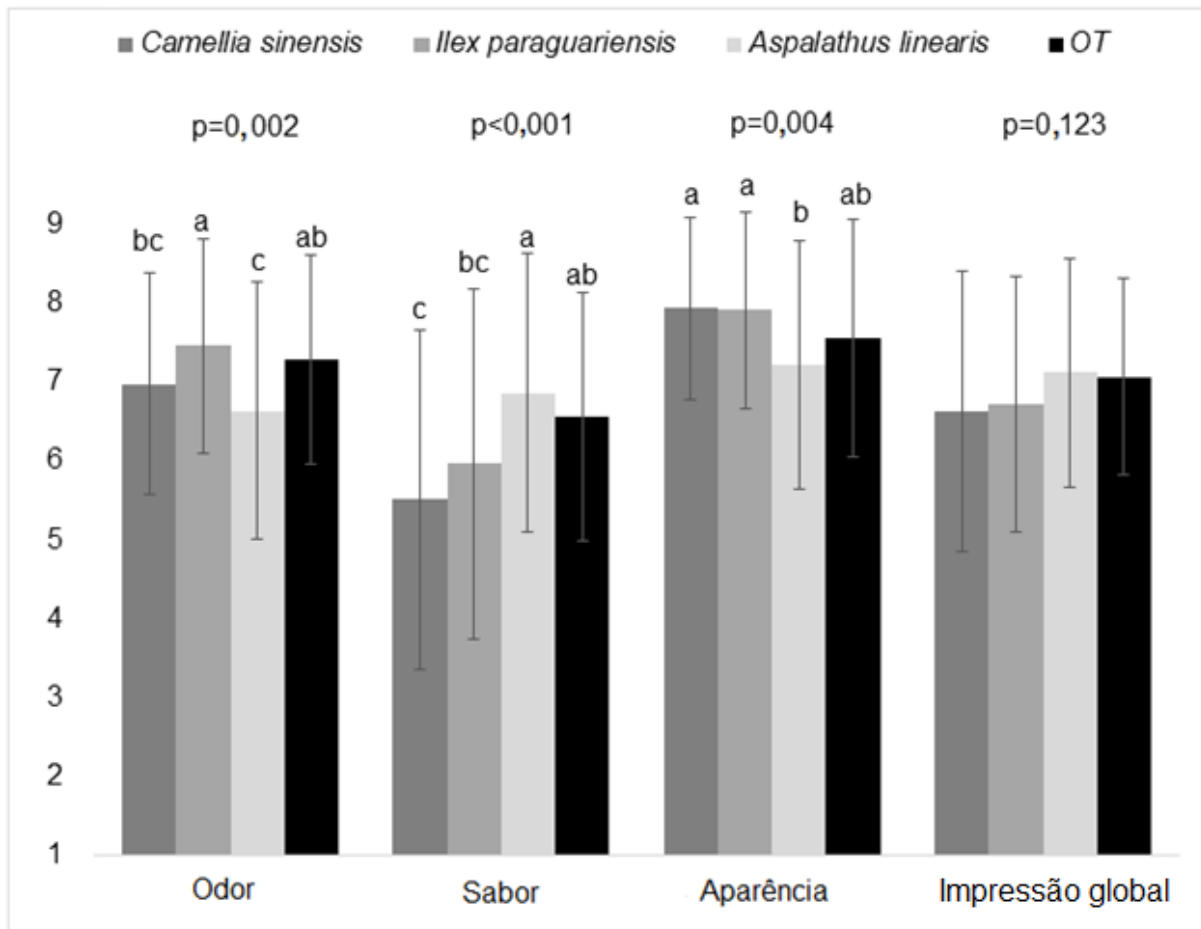
Chá branco	Chá mate	Chá roibos	Amostras	Gosto amargo	Gosto ácido	Gosto salgado	Gosto Umami
1	0	0	1	7,21±0,11 ^d	6,80±0,47 ^c	1,99±0,32 ^f	1,22±0,08 ^f
0	1	0	2	8,38±0,02 ^a	1,50±0,14 ^f	5,12±0,13 ^d	8,42±0,48 ^a
0	0	1	3	7,56±0,09 ^c	5,25±0,38 ^d	9,03±0,40 ^a	6,56±0,77 ^c
0,5	0,5	0	4	7,71±0,06 ^b	4,55±0,30 ^e	6,10±0,39 ^c	4,55±0,62 ^e
0,5	0	0,5	5	6,62±0,03 ^g	9,47±0,07 ^a	7,52±0,11 ^b	5,17±0,23 ^d
0	0,5	0,5	6	7,24±0,03 ^d	6,70±0,11 ^c	7,76±0,04 ^b	7,68±0,17 ^b
0,666	0,167	0,167	7	7,10±0,04 ^e	7,30±0,14 ^b	6,20±0,07 ^c	5,25±0,16 ^d
0,167	0,666	0,167	8	7,58±0,06 ^c	5,14±0,26 ^d	3,74±0,09 ^e	7,21±0,29 ^b
0,167	0,167	0,666	9	7,28±0,07 ^d	6,50±0,35 ^c	7,47±0,25 ^b	6,60±0,25 ^c
0,333	0,333	0,334	10	7,21±0,05 ^d	6,81±0,26 ^c	5,08±0,24 ^d	7,34±0,30 ^b
0,833	0,107	0,060	OT	6,84±0,15 ^f	5,18±0,15 ^d	4,81±0,01 ^d	8,90±0,06 ^a
p-Value (ANOVA)				<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: O autor

Nota: Letras diferentes na mesma coluna representam diferença nos valores médios ($p > 0,05$) de acordo com o teste de Fisher LSD. OT = Chá otimizado (82,9% *Camellia sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis*)

Em relação à análise sensorial, os resultados para aceitação em relação ao odor, sabor, aparência e impressão global dos chás são expostos na Figura 11. Na mesma Figura é possível verificar que foi detectado diferença significativa entre as amostras para odor, sabor e aparência ($p < 0,05$). Tanto para aparência como para o odor a amostra composta unicamente por chá mate apresentou o maior valor, porém não se diferenciando em relação a amostra otimizada. O fato de que a amostra otimizada obteve aceitação similar ao chá mate (*Ilex paraguariensis*), sendo que esse por sua vez já estabelecido no mercado é visto como um parâmetro positivo.

Figura 11 – Avaliação sensorial dos chás de *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* e OT - Chá otimizado (82,9% *Camellia sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis*)



Fonte: O autor

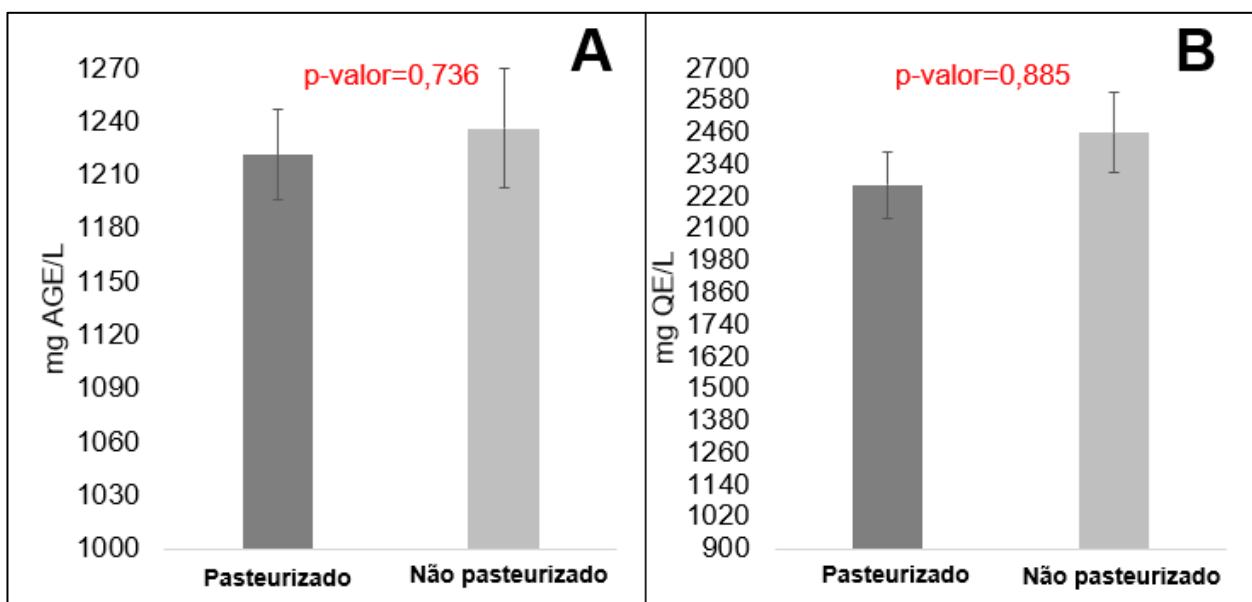
No parâmetro sabor o chá rooibos obteve a melhor aceitação, porém não se diferenciando dos valores obtidos para a amostra otimizada. Tal parâmetro é de fundamental importância já que apresenta relação direta com a palatabilidade. Em relação a impressão global não foi observada diferença entre as amostras estudadas, constatando uma impressão global do chá otimizado de aproximadamente 78% indicando alta aceitação dos potenciais consumidores do produto.

2.3.8 Efeito da pasteurização

Como apresentado na Figura 12, não há diferença significativa entre a amostra pasteurizada e não pasteurizada, apresentando valores $p > 0,05$. É fundamental verificar a manutenção do conteúdo fenólico bem como de funcionalidades após o tratamento térmico. Tendo em vista que a degradação dos compostos fenólicos e

consequentemente a perda da funcionalidade é indesejada, a não diferenciação do conteúdo fenólico antes e após a pasteurização é positiva. Os presentes resultados apresentam-se de forma satisfatória e conclusiva de que mesmo após a pasteurização o chá otimizado mantém-se rico em compostos fenólicos e apresentando alto poder antioxidante. Esses resultados corroboram com os relatados por Joubert et al. (2009), que avaliando o efeito do tratamento térmico em extratos aquoso de *Aspalathus linearis*, concluíram que a pasteurização industrial não apresentaria grande efeito sobre a composição fenólica do chá.

Figura 12 - Monitoramento do conteúdo fenólico total (A) e da capacidade redutora total (B) do chá otimizada antes e após da pasteurização (63 °C por 30 min).



Fonte: O autor

Nota: Os valores de probabilidade são baseados no teste *t de Student* pareado.

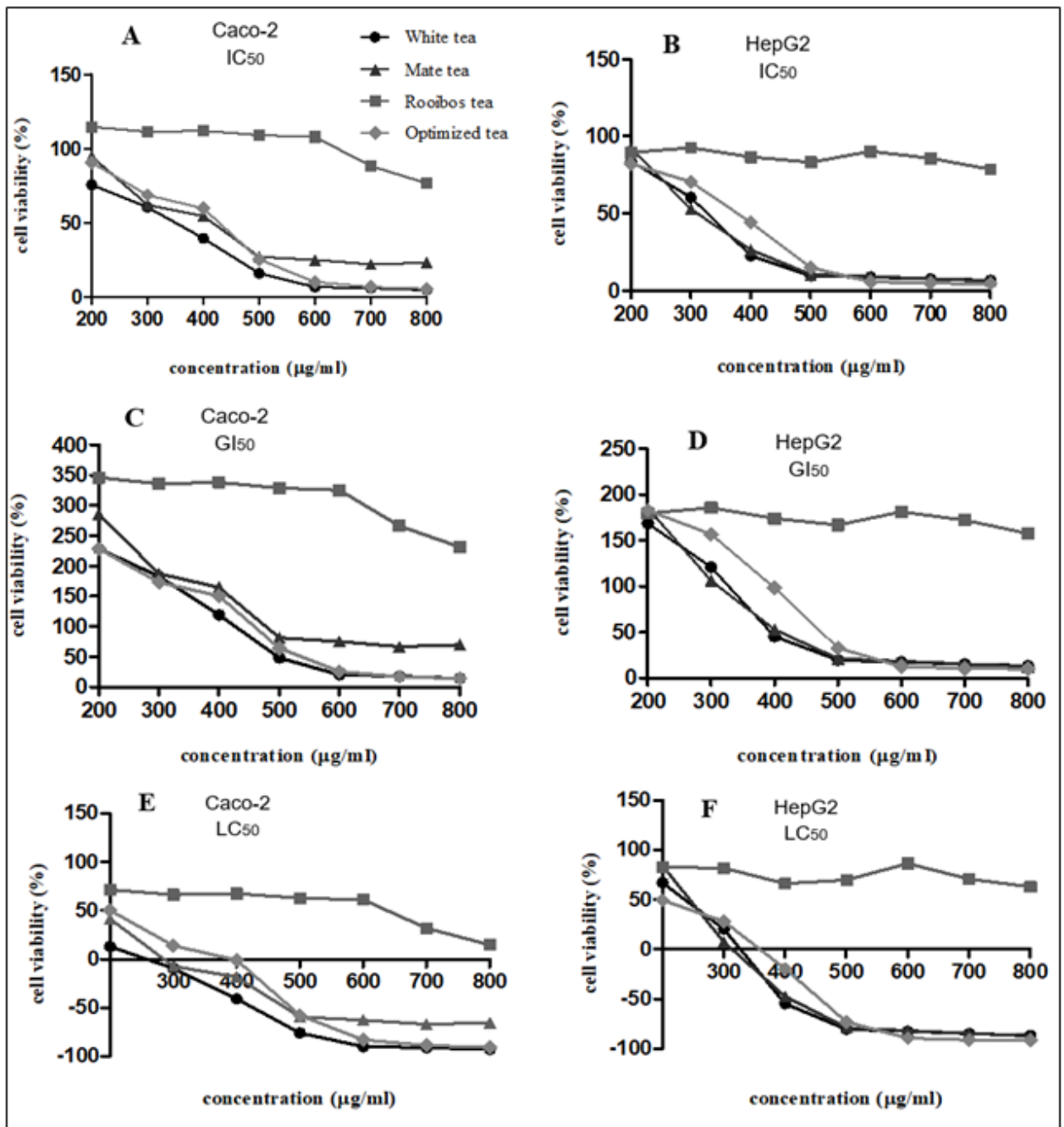
2.3.9 Citotoxicidade celular *in vitro*

Os resultados do teste citotoxicidade e proliferação celular *in vitro* (IC₅₀, GI₅₀ e LC₅₀) dos extratos estão apresentados na Figura 13. O chá branco, mate e chá otimizado exibiram um certo grau de citotoxicidade contra ambas as linhagens celulares, e não há diferença entre esses extratos, por tipo de célula. Nossos resultados mostraram que concentração de 408,3 µg/mL (chá branco), 424,9 µg/mL (chá de mate) e 480,7 µg/mL (chá otimizado) foi necessário para eliminar metade das células HepG2 (GI₅₀). Foram necessárias concentrações semelhantes para obter o mesmo efeito em células Caco-2: 513,8 µg/mL (chá branco), 862,2 µg/mL (chá mate)

e 547,1 µg/mL (chá otimizado). O chá de roibos exibiu altos valores de IC₅₀ e GI₅₀ (>800 µg/mL), que sugerem ser necessário o uso de concentrações maiores para inibir o crescimento da metade das células, o que significa nível de citotoxicidade. Entre as linhas celulares testadas, as células HepG2 exibem maior sensibilidade para todos os extratos, enquanto o Caco-2 as células mostraram o comportamento oposto.

De acordo com Chen et al. (2002); Tao, Forester e Lambert (2014) e Kabała-Dzik et al. (2017), altas concentrações de catequina, (-)-epigallocatequina-3-galato (presente no chá branco e chá otimizado) e ácido cafeico (contido no chá mate e chá otimizado) pode ter desempenhado um papel na inibição de células cancerosas HepG2, o que sugere que estes compostos podem ser essenciais para o seu efeito antitumoral. No presente estudo o chá de roibos fermentado exibiu o menor efeito antiproliferativo (IC₅₀ e GI₅₀>800 µg/mL). Porém o chá de roibos apresentou certa quantidade de flavonoides, como luteolina, quercetina-3-rutinoside e quercetina e propriedades antioxidantes consideráveis. Apesar desses aspectos, alguns estudos sugerem que a capacidade antioxidante assim como a concentração de polifenólicos podem não ser responsáveis por sua ação antiproliferativa (YAR KHAN et al., 2012). Por exemplo, o ácido elágico é 10 vezes mais antioxidante em relação ao ácido tânico, mas o ácido tânico é mais potente que o ácido elágico em inibir a promoção de tumor de pele (GALI et al., 1992).

Figura 13 – Citotoxicidade celular *in vitro* de adenocarcinoma colorretal humano (Caco-2) (A, C, E) e de células de hepatocarcinoma humano (HepG2) (B, D, F)



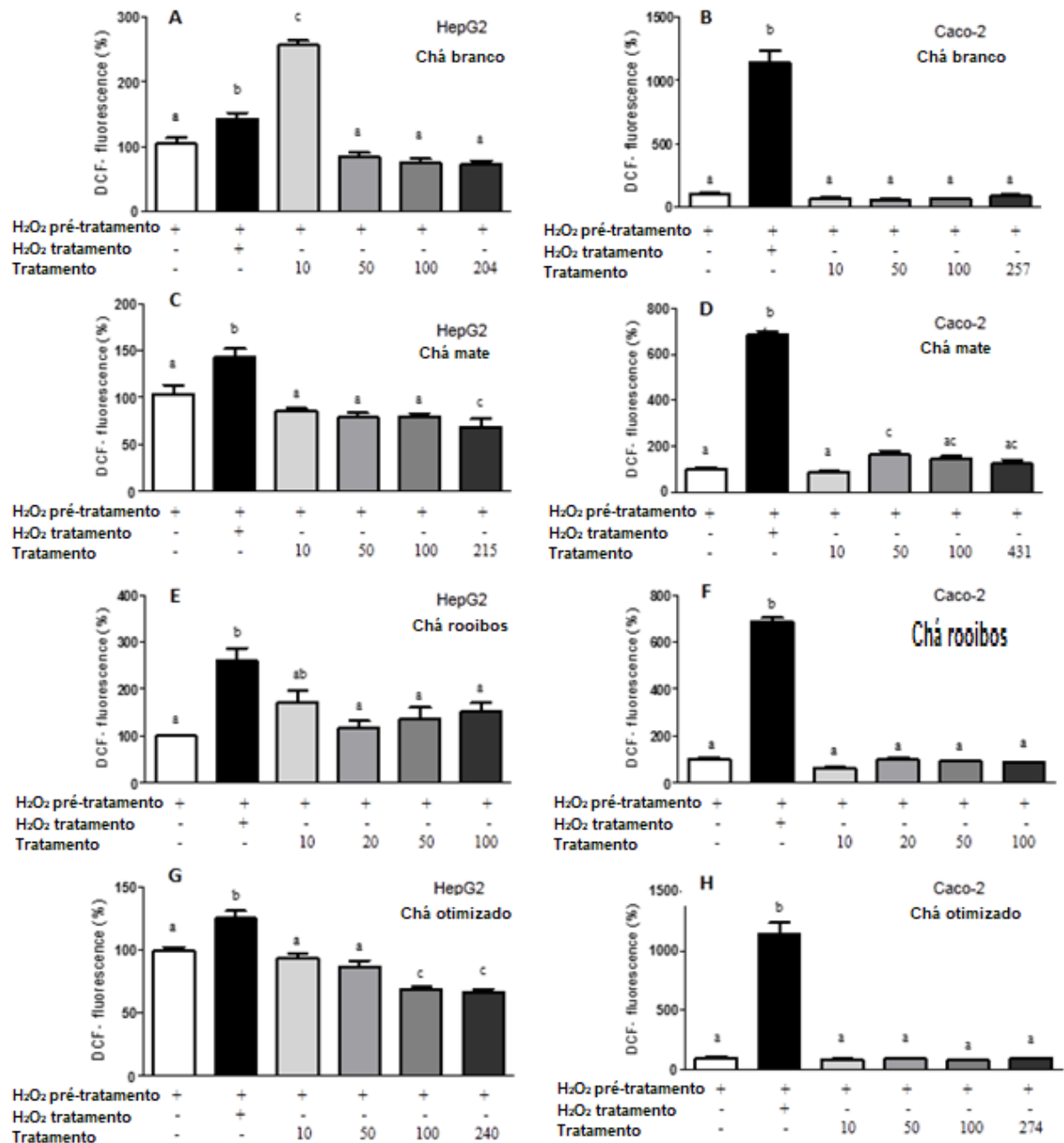
Fonte: O autor

Nota: Avaliação representativa do impacto dependente da concentração após 48 h de exposição a extratos de chá branco, mate tostado, rooibos fermentados e mistura otimizada de chá

2.3.10 Medição de EROs intracelular

Neste estudo, as EROs produzidas em células HepG2 e Caco-2 expostas a várias concentrações de extratos de chá foram acessadas usando DCFH-DA e os resultados estão apresentados na Figura 14. Os níveis de EROs induzidas pelo H₂O₂, em geral, foi superior ao controle e grupos de tratamento, em ambas as linhagens celulares e para todas as amostras de chá. É notório que a maior redução na geração de EROs foi observada com chá mate em sua maior concentração, reduzindo 34,9%, com a concentração de 215 µg/mL, em células HepG2 (Figura 14C) e com o chá otimizado com 30% de redução, em células HepG2, na concentração de 100 µg/mL assim como na de 240 µg/mL (Figura 14G). Rooibos e chá branco não mostraram efeitos nas concentrações testadas, bem como todos os extratos de chá para Caco-2 células. Este resultado mostra claramente que a formulação otimizada do chá, que contém mate, rooibos e chá branco, apresenta uma diminuição adequada Geração de EROs.

Figura 14 - Resultados da medição intracelular de ERO em células HepG2 e Caco-2 por espectrofluorimetria



Fonte: O autor

Nota: Tratamento = extratos de chá branco (A, B), chá mate torrado (C, D), chá de rooibos fermentado (E, F) e mistura otimizada de chá (G, H) a 10 µg/mL - IC₂₅. Os dados quantitativos são a média ± desvio padrão. Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro indicam uma diferença significativa (p<0,05).

De fato, os polifenóis são conhecidos como sequestradores de vários radicais livres, como relatado por Sobeh et al. (2017). Os polifenóis exibem propriedades antioxidantes e pró-oxidantes, dependendo da concentração e composição do meio. Este efeito ocorre porque os polifenóis recuperam as espécies reativas de oxigênio e formam radicais livres de semiquinona, que podem danificar macromoléculas principais, como proteínas ou DNA. Além disso, reações pró-oxidantes desencadeiam a geração de radicais $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$, aumentando o estresse oxidativo. Isto explica a geração de ERO induzida pelo chá branco a 10 $\mu g/mL$ (células HepG2, Figura 14A) e chá de mate a 50/mL (Caco-2, Figura 14D). Além disso, íons de metais de transição (Fe^{2+} , Cu^{2+}) e H_2O_2 podem induzir efeitos pró-oxidantes dos polifenóis (LABIENIEC; GABRYELAK, 2007). Como as células cancerosas contêm uma alta concentração de cobre, a oxidação de proteínas e lipídios e a clivagem do DNA podem ocorrer por causa da geração de EROs nas células (YAR KHAN et al., 2012). Portanto, concentrações específicas de polifenóis podem apresentar efeitos pró-oxidantes, que levam a morte pela geração EROs.

2.4 CONCLUSÃO

Diante do exposto, conclui-se que é viável a aplicação da metodologia de superfície de resposta, para o desenvolvimento de uma bebida mista a base de ervas de diferentes origens botânicas, já que foi possível obter um chá otimizado com elevado conteúdo fenólico e atividades antioxidantes *in vitro* maximizada. Além da obtenção de uma boa aceitação sensorial. Os modelos matemáticos propostos podem ser usados para prever funcionalidades dos chás estudados. Os resultados obtidos para o conteúdo fenólico individual por HPLC-MS demonstraram a riqueza na variedade e quantidade de compostos fenólicos da bebida otimizada composta por 82,9% chá branco + 10,9% chá mate + 6,2% chá rooibos.

CAPÍTULO 3 - UM NOVO CONCEITO ANALÍTICO BASEADO EM QUÍMICA E TOXICOLOGIA PARA ANÁLISE DE EXTRATOS DE ERVAS: DA COMPOSIÇÃO FENÓLICA À BIOATIVIDADE

Resumo

Estudos da bioatividade de chás baseiam-se, fundamentalmente, na composição fenólica e atividade antioxidante *in vitro* de espécies de ervas usadas no seu preparo. O objetivo da pesquisa foi comparar a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, a atividade citotóxica/antiproliferativa frente a células cancerosas, a atividade inibitória da α -amilase, α -glucosidase e enzima conversora da angiotensina I, bem como capacidade de proteção da cisão em DNA de extratos aquosos de *Camellia sinensis* var. *sinensis* (CS – chá branco), *Ilex paraguariensis* (IP – chá mate tostado), *Aspalathus linearis* (AL – chá roibos fermentado) e de um extrato otimizado (OT) com as três espécies de erva. Uma abordagem estatística bivariada e multivariada foi empregada para associar as atividades funcionais com a composição fenólica individual. Os extratos CS e OT apresentaram maiores teores de hesperidina, quercetina-3-rutinosídeo, (-)-epigalocatequina-3-galato e isoquercitrina. Os extratos CS e OT apresentaram maior atividade antioxidante, maior capacidade em inibir a α -amilase e proliferação das células HCT8 e maior capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu. O extrato AL apresentou menor capacidade em inibir a α -glucosidase, apresentou capacidade de inibir a oxidação do LDL e de proteção de eritrócitos humanos, sendo que quercetin-3-rutinoside, hesperidin e isoquercitrin foram seus compostos fenólicos majoritários. Já o extrato IP apresentou a maior inibição da lipoperoxidação de homogenato de cérebro de ratos Wistar, atividade anti-hipertensiva e inibição da proliferação de células A549, sendo que ácido clorogênico foi o composto fenólico maioritário. De uma forma geral, a funcionalidade *in vitro* de cada extrato é dependente de sua composição química. A amostra OT apresentou composição fenólica mais variada e atividade biológica similar ao CS, porém com apelo de possuir uma mistura de três espécies diferentes de ervas.

Palavras-chave: Citotoxicidade; Proteção do DNA; LC- ESI-MS/MS; PCA

Capítulo publicado:

SANTOS, J. S., ESCHER, G. B., DO CARMO, M. V., AZEVEDO, L., MARQUES, M. B., DAGUER, H., ... OH, W. Y., D. A. New analytical concept based on chemistry and toxicology for herbal extracts analysis: from phenolic composition to bioactivity. **Food Research International**, 2020. *In Press*

3.1 INTRODUÇÃO

Muitas pesquisas vêm sendo desenvolvidas para caracterizar as propriedades funcionais de produtos naturais, tais quais a atividade antioxidante, anti-inflamatória, inibição de enzimas metabólicas e, por conseguinte, diminuição do risco de doenças crônicas não-comunicáveis, como hipertensão, doença cardiovascular e diabetes tipo 2 (SINHA; ROY; ROY, 2010; LI et al., 2019). Granato et al. (2018a) enfatizaram a necessidade de utilizar métodos químicos, enzimáticos e biológicos simultaneamente, com mecanismos de ação diferentes, para se avaliar o potencial funcional de extratos vegetais e alimentos/bebidas. A pluralidade de mecanismos e metodologias empregadas possibilita a compreensão dos mecanismos de ação, identificando compostos químicos que mais influenciam as atividades biológicas. Estratégias analíticas para otimizar a produção de extratos com possível bioatividade em seres humanos devem estar alinhadas com os hábitos alimentares dos consumidores. Assim, faz-se necessário o emprego de métodos químicos e enzimáticos e baseados em biologia/fisiologia celular para guiar o desenvolvimento de novos alimentos funcionais.

Extratos aquosos obtidos de ervas, de origens geográficas distintas, vêm sendo estudados em relação às suas propriedades funcionais por diferentes protocolos experimentais. Entre esses extratos, os produzidos a partir de *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis* e *Aspalathus linearis* apresentam consumo disseminado em todos os continentes, devido aos seus atributos sensoriais e apelo nutricional (PERES et al., 2013; SANTOS et al., 2016). A composição fenólica e propriedades funcionais dessas três espécies têm sido amplamente divulgadas (DIAS et al., 2019; BARROSO et al., 2019; PIEK et al., 2019). Contudo, há apenas um relato da utilização de combinação ternária (mistura) dessas espécies na produção de um chá com atividade antioxidante e antiproliferativa (SANTOS et al., 2018).

Em estudo recente Santos et al. (2018) obtiveram a combinação de 82,9% *C. sinensis*, 10,9% *I. paraguariensis* e 6,2% *A. linearis* (V/V), como o extrato com maior teor de compostos antioxidantes. No mesmo estudo, o extrato otimizado apresentou mais de 1221 mg ácido gálico equivalente por 100 g de fenólicos totais, com atividade antioxidante *in vitro* usando diferentes mecanismos de ação e inibiu a multiplicação de *Bacillus cereus*. Adicionalmente, o extrato otimizado apresentou efeito citotóxico e antiproliferativo frente às células cancerosas - HepG2 (carcinoma de hepatoma

humano, GI₅₀ = 480,7 µg/mL) e Caco-2 (adenocarcinoma colorretal humano epitelial; GI₅₀ = 547,1 µg/mL).

Com a necessidade de aprofundar o conhecimento nas propriedades funcionais de misturas de ervas consumidas pela população, o objetivo da pesquisa foi comparar a atividade antioxidante *in vitro* e *ex vivo*, a atividade citotóxica/antiproliferativa frente a células cancerosas, a atividade inibitória da α -amilase, α -glucosidase e enzima conversora da angiotensina I, e a capacidade de proteção da cisão em DNA de extratos aquosos de *Camellia sinensis* var. *sinensis* (CS), *Ilex paraguariensis* (IP), *Aspalathus linearis* (AL) e de um extrato otimizado (OT) com as três espécies de erva.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Material químico e linhagens celulares

Reagente Folin-Ciocalteu 2 N, radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ácido gálico, 4,6-tris-(2-piridil)-S-triazina), enzima conversora da angiotensina I de pulmão de coelho (CAS 9015-82-1), violeta de pirocatecol (3,3', 4-ácido tri-hidroxifosulfato-2" sulfônico), CuSO₄.5H₂O, α -amilase VI-B de pâncreas suíno, α -glicosidase tipo I de *Saccharomyces cerevisiae*, 2,2'-Azobis dicloridrato de 2-amidinopropano – AAPH, acetonitrila, quercetina assim como todos os solventes orgânicos grau HPLC foram obtidos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Soro bovino fetal - FBS, meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM)/baixa glicose contendo 10% FBS e DMEM/alta glicose suplementada com 20% de FBS foram adquiridos da Gibco, (São Paulo, Brasil). As células A549 (adenocarcinoma epitelial de pulmão), HCT8 (carcinoma de cólon humano) e IMR90 (células normais de fibroblasto de pulmão humano) foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro - BCRJ (Rio de Janeiro, Brasil). Acetato de sódio, ácido ascórbico, álcool etílico 99,7%, álcool metílico e ácido acético glacial foram adquiridos da Vetec (Duque de Caxias, Brasil). Exceto quando especificados, os reagentes eram de grau analítico e as soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura.

3.2 ERVAS

Folhas orgânicas de *Camellia sinensis* var. *sinensis* (chá branco; China), *Ilex paraguariensis* (chá mate tostado, Brasil) e *Aspalathus linearis* (chá roibos fermentado; África do Sul), foram adquiridas das empresas CLIPPERP® (Alemanha), Matte Leão (Brasil), e Simon Lévelt (Países Baixos), respectivamente. A autenticidade orgânica do material vegetal foi baseada em auditoria externa de acordo com as Resoluções 2001/112/EC e 834/2007/EC (União Européia) e decreto N° 06.323 de 27/12/2007 (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, MAPA, Brasil).

3.2.3 Preparo das infusões

Um total de quatro extratos aquosos foram estudados: *Camellia sinensis* var. *sinensis* (CS), *Ilex paraguariensis* (IP), *Aspalathus linearis* (AL) e de um extrato otimizado (OT) nas proporções 82,9% CS + 10,9% IP + 6,2% AL. A obtenção das proporções otimizadas que compõem o extrato otimizadas está descrita por Santos et al. (2018). A extração por maceração foi conduzida a 80 ± 1 °C por 10 min na proporção erva/água de 1:50 m/v. Uma porção (4000 mL) foi liofilizada a vácuo a 1200 µHg à temperatura de -50 °C (Terroni, modelo LD 1500A, São Paulo, Brasil), para posteriores análises.

3.2.4 Conteúdo fenólico por LC-ESI-MS/MS

Os compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos foram identificados e quantificados de acordo com o procedimento descrito por Seraglio et al. (2016). Um cromatógrafo líquido modelo 1290 Infinity (Agilent Technologies, Deutschland GmbH, Waldbronn, Alemanha) acoplado ao espectrômetro de massa modelo 5500 QTRAP (Sciex, Framingham, EUA), equipado com uma fonte de ionização por *electrospray* (ESI) foi utilizado. A separação cromatográfica foi realizada em fase reversa com uma coluna C₁₈ da marca Venusil (100 mm x 2,1 mm; 3 µm de tamanho da partícula), fabricada por Bonna-Agela Technologies Inc. (Wilmington, USA). A coluna foi mantida a 40 °C para a separação cromatográfica, o volume de injeção de amostra foi de 5 µL e fluxo da fase móvel foi de 300 µL/min. A fase móvel A consistiu de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e fase móvel B, consistiu de acetonitrila com 0,1% de ácido

fórmico. O gradiente de eluição foi: 0-3 min (98% A), 3-10 min (80% A), 10-11 min (10% A) e 11-13 min (98% A).

A quantificação de cada composto foi realizada em triplicata por meio de calibração externa. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido como a menor concentração, com aceitável precisão de 10 µg/L; coeficiente de variação em percentual (CV%) ≤ 20%, com recuperação de 70-110%. O limite de detecção (LOD) foi a menor concentração detectável com reprodutibilidade aceitável de 1 µg/L (CV% ≤ 30%). O modo de ionização positivo e negativo foi configurado com voltagem de 5500 V para positivo e -4500 V para negativo; gás de cortina de 25 psi; nebulizador de gás e gás auxiliar 55 psi, a 550 °C em atmosfera de nitrogênio. Os parâmetros de monitoramento múltiplo de reação em modo positivo [M + H]⁺ e negativo [M - H]⁻ estão expressos na Tabela 9. Os resultados foram expressos em mg do composto quantificado por 100 g de erva seca (mg/100 g).

Tabela 9- Espectrometria de massa para transições de MRM no modo positivo [M + H]⁺ e negativo [M - H]⁻ *

(continua)

Composto	Precursor ion (ESI)	Transições (m/z)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Ácido benzoico	122,9 ^a	79,0 ^c	36	10	17	12
		51,0	36	10	51	24
Ácido p-aminobenzóico	138,0 ^a	77,0 ^c	56	10	29	10
		94,0	56	10	19	8
Cumarina	146,9 ^a	90,9 ^c	126	10	31	10
		103,0	126	10	23	8
Ácido hidroxibenzóico	2,4-di- 155,0 ^a	109,9 ^c	41	10	29	20
		137,0	41	10	19	8
Ácido hidroxibenzóico	2,5-di- 155,0 ^a	137,0 ^c	41	10	19	8
		114,0	41	10	29	52
Siringaldeído	183,0 ^a	123,1 ^c	41	10	17	8
		77,0	41	10	31	10
Ácido ferúlico	195,0 ^a	176,9 ^c	21	10	11	10
		89,0	21	10	41	10
Ácido Siríngico	199,0 ^a	140,0 ^c	16	10	21	10
		155,1	16	10	13	10
Pinocembrina	257,0 ^a	153,0 ^c	96	10	33	10
		76,9	96	10	73	10
Galangina	271,0 ^a	153,0 ^c	176	10	43	10
		115,1	176	10	59	8
Apigenina	271,0 ^a	153,0 ^c	181	10	41	10
		90,9	181	10	49	14
Luteolina	286,9	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
Kaempferol	286,9 ^a	153,0 ^c	111	10	43	10
		68,9	111	10	89	10
(-)-epicatequina	291,0 ^a	138,9 ^c	36	10	21	8
		123,0	36	10	21	8
(+)-catequina	291,0 ^a	139,0 ^c	16	10	21	10
		123,0	16	10	19	8
Ácido clorogênico	355,1 ^a	163,0 ^c	46	10	21	10
		89,0	46	10	75	14
Hesperidina	611,2 ^a	303,0 ^c	51	10	31	16
		153,1	51	10	67	10
Ácido salicílico	136,9 ^b	93,1 ^c	-15	-10	-22	-5
		64,9	-15	-10	-36	-11
Ácido 3,4-dihidroxibenzóico	152,9 ^b	109,0 ^c	-75	-10	-20	-7
		90,9	-75	-10	-32	-13

Tabela 9 - Espectrometria de massa para transições de MRM no modo positivo [M + H]⁺ e negativo [M - H]⁻ *

Composto	Precursor ion (ESI)	Transições (m/z)	DP (V)	EP (V)	(conclusão)	
					CE (V)	CXP (V)
Ácido <i>p</i> -cumárico	162,9 ^b	119,0 ^c	-90	-10	-20	-7
		93,0	-90	-10	-40	-5
Ácido vanílico	166,9 ^b	137,0 ^c	-140	-10	-12	-9
		109,1	-140	-10	-16	-7
Ácido gálico	168,9 ^b	124,9 ^c	-110	-10	-20	-7
		79,0	-110	-10	-30	-11
4-Metilumbeliferona	174,9 ^b	133,0 ^c	-135	-10	-28	-9
		119,1	-135	-10	-36	-7
Coniferaldeído	177,0 ^b	134,0 ^c	-30	-10	-28	-9
		160,8	-30	-10	-28	-11
Ácido cafeico	178,9 ^b	135,0 ^c	-115	-10	-22	-9
		107,0	-115	-10	-30	-7
Sinapaldeído	206,9 ^b	177,0 ^c	-20	-10	-26	-11
		148,9	-20	-10	-34	-9
Ácido 3,5-dinitrobenzóico	210,9 ^b	167,0 ^c	-50	-10	-14	-9
		136,9	-50	-10	-22	-9
Ácido sinápico	223,0 ^b	163,9 ^c	-120	-10	-20	-9
		192,9	-120	-10	-28	-11
Crisina	252,9 ^b	142,9 ^c	-170	-10	-36	-9
		209,1	-170	-10	-30	-11
Naringenina	270,9 ^b	151,0 ^c	-130	-10	-24	-25
		119,0	-130	-10	-34	-11
Pinobanksin	270,9 ^b	150,9 ^c	-140	-10	-24	-9
		119,1	-140	-10	-32	-7
Quercetina	301,0 ^b	150,9 ^c	-50	-10	-28	-9
		121,0	-50	-10	-34	-7
Isorhamnetina	315,0 ^b	300,00 ^c	-225	-10	-28	-15
		150,9	-225	-10	-38	-9
(-)-Galato de epigallocatequina	457,0 ^b	169,0 ^c	-165	-10	-20	-11
		125,0	-165	-10	-52	-9
Isoquercitrina	462,9 ^b	300,0 ^c	-215	-10	-36	-15
		271,0	-215	-10	-56	-13
Naringina	579,0 ^b	271,0 ^c	-255	-10	-42	-13
		151,0	-255	-10	-48	-9
Quercetina-3-rutinosídeo	609,0 ^b	299,9 ^c	-230	-10	-48	-15
		270,9	-230	-10	-32	-9

Fonte: O autor

Nota: *Dados adaptados de Seraglio et al. (2016). DP: potencial de desvalorização (V); PE: potencial de entrada (V); CE: energia de colisão (V); CXP: potencial de saída de célula de colisão (V); ^a Ion pai no modo de íon positivo; ^b Ion pai no modo de íon negativo; ^c Íon de quantificação.

3.2.5 Atividade antioxidante química

A capacidade antioxidante foi avaliada por quatro ensaios distintos: o poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) utilizou as condições experimentais descritas por Benzie e Stain (1996), com resultados expressos em mg de ácido ascórbico equivalente por litro (mg AAE/L); a avaliação da capacidade de redução do reagente Folin-Ciocalteu (FCRC), foi realizada de acordo com Singleton et al. (1999) e os resultados expressos em mg de ácido gálico equivalente por litro (mg AGE/L); a capacidade de captura do radical DPPH foi medida em sistema tamponado em pH 6, como descrito por Zheng et al. (2015), e os resultados expressos em mg AAE/L; a capacidade de quelar o íon Cu^{2+} foi quantificada pelo método violeta de pirocatecol de acordo com condições experimentais descritas por Santos, Brizola e Granato (2017), e os resultados expressos em percentagem de formação do complexo Cu^{2+} -pirocatecol violeta.

3.2.6 Atividade antioxidante em meio biológico *in vitro*

Ratos Wistar machos com 120 dias de idade e cerca de 400 g de massa corporal, foram utilizados para avaliar a capacidade inibitória da lipoperoxidação em meio biológico. Os animais foram alimentados com dieta padrão (AIN93) e mantidos em um ciclo claro/escuro de 12 h e acesso livre a dieta e água. Os animais foram anestesiados com ketamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg, respectivamente) e eutanasiados por luxação cervical. O cérebro foi removido, lavado com solução de NaCl a 0,9 g/100 g e o homogenato foi preparado em solução tamponada com fosfato de sódio a 0,10 mol/L e pH 7,4, na proporção 1:6 (m/v). Posteriormente o homogenato foi centrifugado (10.000 g por 10 min) e o sobrenadante separado para análise. Em tubos de ensaios, a peroxidação lipídica do homogenato de cérebro (500 μL) foi induzida pela adição de 50 μL de uma solução de FeSO_4 (4 mmol/L) por 45 min a 37 °C em banho-maria. Em seguida, 500 μL de ácido acético a 20% v:v (pH 3,5) foi adicionada para finalizar a reação. Para avaliação do teor de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), 1000 μL de uma solução de ácido 2-tiobarbitúrico a 46 mmol/L foram adicionados aos tubos e deixou-se reagir durante 30 min a 100 °C em um banho de glicerina (FIDELIS et al., 2018). TBARS foram determinadas por

espectrofotometria UV-VIS a 532 nm e os resultados foram expressos em IC₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50% da lipoperoxidação). O protocolo aplicado foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Protocolo 047/2017 (ANEXO C).

3.2.7 Atividade citotóxica *in vitro*

A citotoxicidade *in vitro* dos extratos aquosos liofilizados foi avaliada frente as linhagens cancerosas A549 e HCT8, além da linhagem MR90. As células foram mantidas em DMEM/Ham-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino adicionado de 100 UI de penicilina/100 µg de estreptomicina. As linhagens celulares foram cultivadas em incubadora a 37 °C contendo 5% de CO₂. As células foram plaqueadas (100 µL/poço) em microplacas de 96 poços a uma densidade de 5x10³ células/poço. Após 24 h, 100 µL dos extratos aquosos liofilizados foram adicionados em diferentes concentrações na faixa de 200 a 800 µg/mL seguindo o protocolo descrito por Lao et al. (2016). A concentração que causa 50% de inibição do crescimento celular (GI₅₀) e a concentração que causa 50% de morte celular (LC₅₀) foram obtidos de acordo com Ramirez-Mares; Kobayashi, De Mejia (2016). Os experimentos foram realizados em quadruplicata em três dias diferentes para assegurar a reprodutibilidade dos dados gerados, e a análise da dose-resposta foi determinada por regressão não-linear.

3.2.8 Efeito antihemolítico *in vitro*

O efeito antihemolítico dos extratos foi testado usando eritrócitos isolados de sangue humano tipo O⁺ adquirido do hospital universitário da UEPG, Ponta Grossa Brasil. O concentrado de hemácias foi isolado da amostra de sangue total por centrifugação e lavagens sucessivas com solução tampão fosfato de potássio 5 mmol/L, NaCl 154 mmol/L, pH 7,3. Posteriormente, concentrações entre 10 e 50 µg/mL dos extratos liofilizados foram preparadas em PBS e incubadas com hematócrito de 0,8%, à temperatura ambiente (20-25 °C). Os tubos permaneceram em repouso por 15 min e, na sequência, foram centrifugados a 700 g por 10 min. Do sobrenadante, 200 µL foram transferidos para microplaca de 96 poços e a absorbância em comprimento de onda 576 nm foi registrada em um leitor de microplacas (Synergy-BIOTEK, Winooski, VT, EUA). Os ensaios foram conduzidos, tendo como controle

positivo hemólise total (HT) – solubilização de eritrócitos em água ultrapura, causando a ruptura total das células e hemólise mecânica (HM) – hematócrito em tampão fisiológico, nesse caso, lise mínima. Os resultados do ensaio foram expressos em percentual de hemólise (SANTOS et al., 2016). O protocolo biológico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, CAAE: 94830318.1.0000.0105 (ANEXO D).

3.2.9 Inibição da α -amilase e α -glucosidase *in vitro*

A avaliação da capacidade dos extratos aquosos liofilizados em inibir as enzimas α -amilase (1 – 20 mg/mL), e α -glucosidase (50 – 500 μ g/mL), seguiu o método descrito por Johnson et al. (2011). Para o ensaio da α -amilase, 500 μ L dos extratos com diferentes concentrações (1 – 20 mg/mL), ou controle positivo (1 mmol acarbose) foram adicionados a 500 μ L de 13 U/mL de solução de α -amilase (tipo VI-B do pâncreas suíno em PBS a 0,02 mol, pH 6,9) em tubos de ensaio, a mistura permaneceu incubada por 10 min a 25 °C. Posteriormente, 500 μ L de solução de amido solúvel a 1% (dissolvida em PBS e fervida por 15 min) foi adicionada e a mistura foi incubada por mais 25 min. Em seguida, adicionou-se 1 mL de ácido dinitrosalicílico e os tubos foram aquecidos a 100 °C durante 5 minutos (JOHNSON, et al., 2011). A mistura foi diluída com 100 mL de água destilada. A absorbância foi lida a 520 nm. Os resultados foram apresentados como percentagem de inibição de acordo com a Equação 12.

$$\% \text{ de inibição } \alpha - \text{amilase} = \frac{A_{\text{controle}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (12)$$

Nota: A_{controle} é a absorbância sem amostra, A_{amostra} é a absorbância da amostra testada, e A_{branco} é a absorbância da amostra, mas sem solução enzimática.

Em relação a inibição da enzima α -glucosidase, o ensaio foi realizado em placa de 96 poços, na qual 50 μ L de extrato com diferentes concentrações (50 – 500 μ g/mL), ou controle positivo (1 mmol acarbose) foram adicionados a 100 μ L de uma solução de α -glucosidase 1 U/mL (em PBS a 0,1 mol, pH 6,9) e incubado por 10 min. Uma alíquota de 50 μ L de uma solução de p-nitrofenil- α -D-glucopiranosídeo (PNPG) a 5 mmol em PBS 0,1mol com pH de 6,9, foi adicionada a cada poço e incubada a 25 °C

por 5 min. Posteriormente a absorbância foi lida a 405 nm. Os resultados foram apresentados como percentagem de inibição da enzima α -glucosidase de acordo com a Equação 13.

$$\% \text{ de inibição } \alpha - \text{glucosidade} = \frac{A_{\text{controle}} - (A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}})}{A_{\text{controle}}} \times 100 \quad (13)$$

Nota: A_{controle} é a absorbância sem amostra, A_{amostra} é a absorbância da amostra testada, e A_{branco} é a absorbância da amostra, mas sem solução enzimática.

3.2.10 Capacidade de inibição da oxidação do colesterol LDL

A capacidade inibitória da oxidação do colesterol LDL (lipoproteínas de baixa densidade) induzida por cobre foi avaliada de acordo com Ambigaipalan e Shahidi (2015). Catequina foi usada como controle positivo (2,5 $\mu\text{g/mL}$). Os extratos (2,5 $\mu\text{g/mL}$) assim como a solução indutora de oxidação (CuSO_4) foram incubados a 37 °C por 10 min. Posteriormente, foram adicionados 50 μL da solução de CuSO_4 (50 $\mu\text{mol/L}$) nas amostras e incubadas por 10 h a 37 °C. O controle negativo foi construído com LDL, CuSO_4 e PBS, e o controle native com LDL e PBS. A formação de dienos conjugados (indicativo de oxidação) foi registrada em 234 nm usando um espectrofotômetro de arranjo de diodos (Agilent, Palo Alto, EUA) a cada 2 h até o tempo final de reação de 10 h. Para cada amostra foi realizado leitura do controle negativo. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da formação de dienos conjugados de acordo com a Equação 14:

$$\% \text{ inibição da oxidação do LDL} = \left(\frac{Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{sample}}}{Abs_{\text{control}} - Abs_{\text{native}}} \right) \times 100 \quad (14)$$

$$Abs_{\text{control}} = (A^{\circ}_0 - A^{\circ}_t) \quad (15)$$

$$Abs_{\text{sample}} = (A_0 - A_t) \quad (16)$$

Nota: Abs_{control} = absorbância do controle negativo; Abs_{sample} = absorbância de LDL, CuSO_4 e extrato/catequina; Abs_{native} = absorbância do controle native; A_0 = absorbâncias no tempo zero A_t = absorbâncias após a incubação; A°_0 = absorbâncias corrigidas para o controle no tempo zero; A°_t = absorbâncias no tempo t após a incubação.

3.2.11 Atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA)

A atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA) foi determinada pelo método descrito por Ramchandran e Shah (2010). Os extratos aquosos liofilizados foram testados na concentração de 33 mg/mL. Em resumo, 200 µL de Hip-His-Leu (5 mmol/L em 0,1 mol/L tampão borato) foram misturados com 60 µL de tampão borato (solução 0,1 mol/L contendo 0,3 mol/L de NaCl, pH 8,3) e 30 µL das amostras na concentração de 3,33 mg/mL e imediatamente essa mistura foi incubada a 37 °C durante 10 min. Posteriormente, 20 µL de ECA foram adicionados (0,1 unidade/mL) e os tubos foram incubados a 37 °C durante 30 min. A atividade enzimática foi encerrada com adição de 250 µL de HCl a 1 mol/L. O ácido hipúrico formado foi extraído por mistura em 1,7 mL de acetato de etila. Após repouso de 10 min, 1,2 mL da camada de solvente foi separada e seca em banho de água fervente. Após seco o ácido hipúrico foi dissolvido em 1 mL de água deionizada e absorbância medida a 228 nm usando leitor UV/Vis Pharmacia, LKB-Ultrospec III (Pharmacia, Uppsala, Suécia). Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de enzima conversora de angiotensina I.

3.2.12 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A capacidade de absorção de radicais de oxigênio foi determinada de acordo com Ambigaipalan, Al-Khalifa e Shahidi (2015), usando dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) - AAPH – como indutor de oxidação. A fluorescência foi registrada a cada minuto por 25 ciclos e o tempo de cada ciclo foi de 210 s. Um controle (tampão fosfato, fluoresceína e AAPH) e diferentes concentrações de (+)-catequina, como padrão, foram usadas. Os resultados foram apresentados como mg (+)-catequina equivalente por 100 g de extrato liofilizado.

3.2.13 inibição da cisão do DNA induzida por radical peróxil

A inibição da cisão do DNA dos extratos liofilizados foi determinada como descrito por Ambigaipalan e Shahidi (2015) com modificação. O DNA de pBR 322 supercondensado (50 pg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato (10 mmol/L, pH 7,4), e extratos de chá (1 mg/mL) foram dissolvidos em água. A indução de oxidação do DNA foi induzida por AAPH e um controle negativo (apenas DNA) e positivo (DNA com

AAPH) foram preparados. Após, as amostras foram submetidas à eletroforese utilizando um gel de agarose a 0,7% (m/v) em tampão Tris-ácido acético-EDTA (Tris acetato a 40 mmol/L, EDTA a 1 mmol/L, pH 8,5) a 60 V durante 5 h utilizando um sistema de eletroforese tipo mini gel horizontal B1A (Owl Separation Systems Inc. Portsmouth, USA). A intensidade das bandas nas fotografias foi analisada usando o *software* Alpha Innotech Co. (San Leandro, USA).

3.2.14 Análises dos dados

Os dados foram expressos como média e desvio padrão amostral (n=3). Para comparar as respostas, inicialmente foi checada a homoscedasticidade dos dados pelo teste de Brown-Forsythe. Diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial seguida do teste de Fisher para comparação de médias. As correlações lineares entre as respostas foram expressas pelo coeficiente de correlação de Pearson. Valores de probabilidade inferiores a 0,05 foram adotados para rejeitar a hipótese nula.

A análise de componentes principais (PCA) foi aplicada para associar a composição fenólica individual por LC-MS/MS, atividade antioxidante *in vitro* (meio químico e biológico) e inibição de enzimas (α -amilase e α -glicosidase), capacidade citotóxica e antihemolítica. Para tanto, as amostras dos extratos de *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* e *Aspalathus linearis*, assim como o extrato otimizado (n=12), foram inseridas em linhas, e as respostas (n=25; composição fenólica e propriedades funcionais dos extratos aquosos) foram colocadas em colunas, totalizando 300 dados. As médias de cada resposta foram auto escalonadas para a variância unitária antes do PCA e essa análise foi baseada na correlação linear. Cargas fatoriais superiores a 0,6 foram usadas para projetar as variáveis no plano bidimensional. O *software* TIBCO Statistica v.13 (TIBCO Statistica Ltd, USA) foi usado para todas as análises estatísticas.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Conteúdo fenólicos por LC-ESI-MS/MS

Em relação ao extrato de *C. sinensis*, 10 compostos fenólicos foram determinados (Tabela 10), apresentando os maiores teores ($p < 0,05$) de (-)-epigallocatequina-3-galato (1688 mg/100 g), hesperidina (1291 mg/100 g) e isoquercitrina (233 mg/100 g) entre os extratos testados. Jeszka-Skowron et al. (2018) também identificaram (-)-epicatequina e (-)-epigallocatequina-3-galato em extrato aquoso de *C. sinensis* (chá branco) porém com valores superiores aos quantificados no presente estudo (673 e 3972 mg/100 g, respectivamente). Por outro lado, os autores detectaram menores valores médios de (+)-catequina e quercetina-3-rutinosídeo (80 e 48 mg/100 g, respectivamente). Essa variação é comum em extratos vegetais, já que diversos fatores como tipo de solo, condições climáticas do local de cultivo, tempo e temperatura de extração, além do tipo de solvente, podem influenciar sua composição fenólica.

Por sua vez, o extrato aquoso de *I. paraguariensis* apresentou cinco dos compostos fenólicos em sua composição, sendo que o conteúdo de ácido 5-*O*-cafeoilquínico (1953 mg/100 g) foi o mais abundante entre as amostras analisadas. Altos teores do ácido 5-*O*-cafeoilquínico (1288 mg/100 g) também foram relatados por Correa et al. (2017) em extrato aquoso de *I. paraguariensis* (mate tostado).

No que diz respeito ao extrato aquoso de *A. linearis*, 11 compostos fenólicos foram quantificados, sendo que quercetina-3-rutinosídeo (214 mg/100 g), hesperidina (189 mg/100 g) e isoquercitrina (111 mg/100 g) foram os compostos majoritários. Verificou-se que os teores de ácido ferúlico (8,8 mg/100 g), quercetina (4,7 mg/100 g) e ácido salicílico (1,1 mg/100 g) foram significativamente ($p > 0,05$) mais elevados entre os extratos investigados. O extrato aquoso de *A. linearis* fermentado foi o único que apresentou ácido siríngico, pinobanksin e kaempferol, corroborando os achados de Jeszka-Skowron et al. (2018) em extratos aquosos da mesma espécie.

Tabela 10 - Composição química de extratos aquosos de *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* e extrato otimizado analisado por LC-ESI-MS/MS

Compostos quantificados	Extratos aquosos				p-valor
	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Ilex paraguariensis</i>	<i>Aspalathus linearis</i>	OT	
Siringaldeído	nd	nd	0,6±0,0 ^a	0,6±0,0 ^a	p=0,399*
Ácido ferúlico	1,5±0,1 ^b	nd	8,8±0,8 ^a	1,8±0,1 ^b	p<0,001
Ácido siríngico	nd	nd	0,5±0,1	nd	-
Pinobanksin	nd	nd	0,7±0,1	nd	-
Caempferol	nd	nd	5,5±0,3	nd	-
(-)-epicatequina	138±22 ^a	nd	nd	155±1 ^a	p=0,324*
(+)-catequina	130±16 ^a	nd	nd	117±12 ^a	p=0,327*
Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	6,5±0,1 ^c	1953±84 ^a	8,1±0,6 ^c	249±40 ^b	p<0,001
Hesperidina	1291±98 ^a	55±3 ^c	189±20 ^c	1102±8 ^b	p<0,001
Ácido salicílico	0,6±0,0 ^b	nd	1,1±0,1 ^a	0,6±0,0 ^b	p<0,001
Ácido 3,4-di-hidroxibenzóico	nd	nd	nd	0,6±0,0	-
Ácido gálico	8,4±0,8 ^b	nd	nd	222±2 ^a	p<0,001
Quercetin	0,9±0,1 ^c	1,2±0,3 ^b	4,7±0,1 ^a	1,1±0,1 ^{bc}	p<0,001
(-)-epigallocatequina-3-galato	1688±27 ^a	nd	nd	1518±29 ^b	p=0,002*
Isoquercitrina	233±2 ^a	0,9±0,1 ^d	111±2 ^c	225±17 ^b	p<0,001
Quercetina-3-rutinosídeo	702±18 ^a	6,3±0,7 ^c	214±1 ^b	621±54 ^a	p<0,001
Total identificado	4199,9	2016,4	544	4213,7	-
Compostos fenólicos totais (mg/100 g) [#]	6465	4510	4300	6105	-

Fonte: O autor

Nota: OT = Extrato otimizada (82,9% *Camellia sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis*); [#] = Valores obtidos de Santos et al., (2018); * = Valores de probabilidade obtidos pelo teste t-Student não pareado (p<0,05); nd = não detectado. Letras diferentes na mesma linha representam resultados significativamente diferentes (p<0,05) de acordo com o teste de Fisher LSD.

No extrato otimizado, foram quantificados 13 compostos, resultando na maior variedade de fenólicos quantificados neste trabalho (Tabela 10). A quercetina-3-rutinosídeo (621 mg/100 g), ácido gálico (222 mg/100 g), (-)-epicatequina (155 mg/100 g) e (+)-catequina (117 mg/100 g) foram os fenólicos mais abundantes. Este resultado mostra que uma mistura ternária, composta por *C. sinensis*, *A. linearis* e *I. paraguariensis*, apresenta um perfil fenólico mais diversificado que os chás isolados. Não houve diferença nos teores de quercetina-3-rutinosídeo, (-)-epicatequina e (+)-catequina entre o extrato de *C. sinensis* e o extrato otimizado (p>0,05).

3.3.2 Atividade antioxidante química

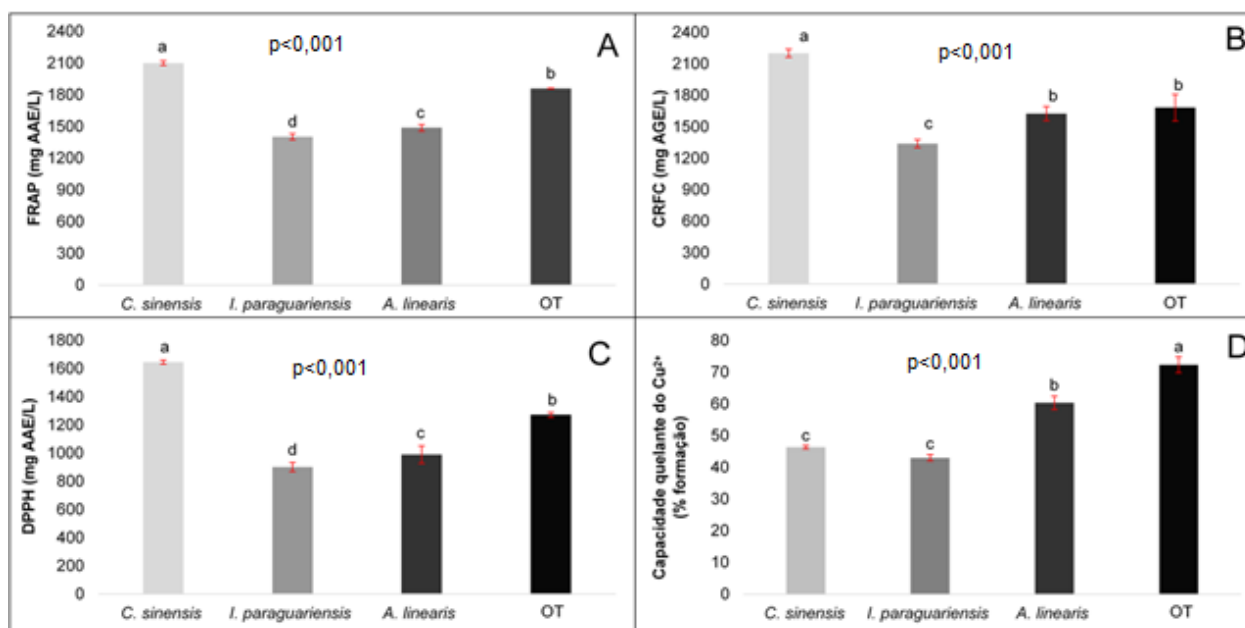
Houve diferença significativa nos valores de FRAP (Figura 15A) entre os quatro extratos (p<0,05). O extrato de *C. sinensis* apresentou o maior valor médio (2100 mg

AAE/L), seguido do extrato otimizado (1860 mg AAE/L), *A. linearis* fermentado (1488 mg de AAE/L) e *I. paraguariensis* tostado (1403 mg AAE/L). Comportamento similar foi observado para FCRC (Figura 15B) e captura do radical DPPH (Figura 15C).

Extratos aquosos de *C. sinensis* são reconhecidos como agentes antioxidantes tanto pelo método de FRAP como para FCRC (Pérez-Burillo et al., 2018). O teor de compostos fenólicos como os taninos condensados e flavan-3-óis, os quais são predominantes em extratos de *C. sinensis*, apresentam correlação direta com ensaios antioxidantes químicos, por apresentarem capacidade de doação de elétrons (oxidação) e também por conferirem adstringência às bebidas formuladas (GRANATO et al., 2014).

Em relação à capacidade quelante do Cu^{2+} (Figura 15D), o extrato de *C. sinensis* e *I. paraguariensis* apresentaram os menores valores médios de formação do complexo pirocatecol de violeta- Cu^{2+} (46 e 43% respectivamente), indicando maior efeito quelante. O extrato otimizado apresentou o maior percentual de formação do complexo pirocatecol de violeta- Cu^{2+} , ou seja, menor capacidade quelante. Mesmo sendo composto maioritariamente por chá branco, o poder quelante do íon Cu^{2+} parece ter sofrido efeito de matriz no extrato otimizado. Desta forma torna-se notório que não apenas o teor total de compostos fenólicos influencia a capacidade de quelar o íon Cu^{2+} , mas também a estrutura química de compostos presentes nos extratos.

Figura 15 - Atividade antioxidante dos extratos aquosos da *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, *Aspalathus linearis* e extrato otimizado (82,9% *C. sinensis* + 10,9% *I. paraguariensis* + 6,2% *A. linearis*)



Fonte: O autor

Nota: A = poder antioxidante redutor de ferro; B = capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu; C = Atividade sequestradora de radicais livres em relação ao radical DPPH; D = Capacidade quelante do Cu²⁺; OT = Extrato otimizada (82,9% *Camellia sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis*).

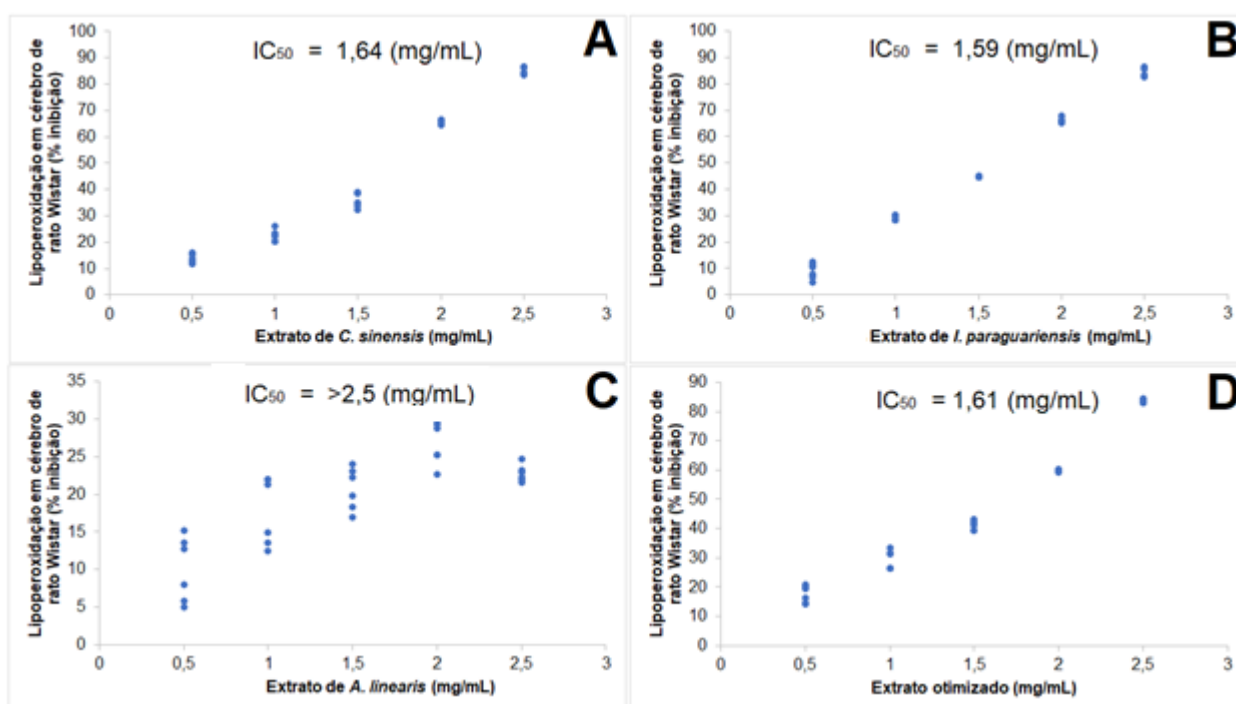
3.3.3 Atividade antioxidante em meio biológico *in vitro*

A inibição da peroxidação lipídica em cérebro de ratos *Wistar* (IC₅₀) dos extratos aquosos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis* e extrato otimizado foram de 1,64, 1,50 e 1,61 mg/mL, respectivamente (Figura 16A, 16B e 16D). O extrato aquoso de *A. linearis*, dentro da faixa de concentração testada, não atingiu 50% de inibição da lipoperoxidação (Figura 16C). Menores valores de IC₅₀ indicam maior capacidade de transferir átomo de hidrogênio para radicais livres gerados pela oxidação induzida por íon Fe²⁺. Assim sendo, o extrato de *I. paraguariensis* apresentou maior inibição da lipoperoxidação.

Avaliando a correlação entre a composição fenólica individual e a capacidade inibitória da lipoperoxidação, foi constatado que apenas o conteúdo do ácido clorogênico ($r=-0,895$) e quercetina ($r=-0,822$), apresentaram correlação significativa ($p<0,05$) com os valores IC₅₀ estimados. Essas correlações indicam que, quanto maior a concentração de ácido clorogênico e quercetina, menor a concentração necessária para inibir a lipoperoxidação, ou seja, maior atividade antioxidante. O ácido

clorogênico foi o composto com a maior concentração quantificada no extrato de *I. paraguariensis*. De forma análoga, Fidelis et al. (2018) constataram correlação entre o ácido clorogênico presente em exocarpo de semente de camu-camu (*Myrciaria dubia*) e a porcentagem de inibição da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos Wistar ($r= 0,729$).

Figura 16 - Avaliação da capacidade inibitória da lipoperoxidação em homogenato de cérebro de ratos Wistar dos extratos aquosos liofilizados de *Camellia sinensis* (A), *Ilex paraguariensis* (B), *Aspalathus linearis* (C) e extrato otimizado composto por 82,9% *C. sinensis* + 10,9% *Ilex paraguariensis* + 6,2% *Aspalathus linearis* (D).



Fonte: O autor

3.3.4 Atividade citotóxica *in vitro*

Os resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* (GI₅₀ e LC₅₀) frente às linhagens A549, HCT8 e IMR90 dos extratos estão apresentados na Tabela 11. Em relação as linhagens A549 e HCT8, os extratos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis* e otimizado apresentaram capacidade de inibir a proliferação e citotoxicidade. Para a linhagem A549, os resultados mostram que a concentração necessária de extrato para inibir a proliferação celular em 50% (IG₅₀) foi de 302,1 µg/mL (*C. sinensis*), 346 µg/mL (*I. paraguariensis*) e 431,3 µg/mL (extrato otimizado). Já a concentração necessária para matar 50% (LC₅₀) das células foi de 299,1 µg/mL (*C. sinensis*), 312,4 µg/mL (*I.*

paraguariensis) e 342,6 µg/mL (extrato otimizado). Recentemente, Maciel et al. (2018) avaliando efeito antiproliferativo de extrato de *Hibiscus sabdariffa* constataram efeito citotóxico do extrato aquoso de *H. sabdariffa* frente a linhagem de célula A549, no qual a concentração de 117 µg/mL foi o suficiente para eliminar 50% das células (LC₅₀).

Tabela 11 - Citotoxicidade e inibição da proliferação de células A549, HCT8 e IMR90 após 48 h de exposição aos extratos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* e otimizado

Linhagem celular	Parâmetro	Extratos aquosos µg/mL			
		<i>C. sinensis</i>	<i>I. paraguariensis</i>	<i>A. linearis</i>	Extrato otimizado
A549	GI ₅₀	302,1	346,0	>800	431,3
	LC ₅₀	299,1	312,4	>800	342,6
HCT8	GI ₅₀	444,4	>800	>800	444,8
	LC ₅₀	nd	645,0	nd	408,3
IMR90	GI ₅₀	>800	>800	>800	>800
	LC ₅₀	>800	>800	>800	>800

Fonte: O autor

Nota: nd – não detectado.

O extrato de *A. linearis* apresentou baixa atividade em inibir o crescimento das linhagens A549 e HCT8, indicando que esse extrato apresenta baixa atividade citotóxica. A faixa de concentração testada (200 - 800 µg/mL) não foi suficiente para calcular os valores de IG₅₀ e LC₅₀. Os resultados apresentados sugerem que é necessário utilizar concentrações mais elevadas para que seja alcançado citotoxicidade nas células testadas. Esses dados corroboram os achados de Santos et al. (2018), que avaliaram a citotoxicidade de extrato aquoso liofilizado de *A. linearis* frente as linhagens células HepG2 e Caco-2.

Em relação às células IMR90 (células pulmonares não cancerosas) todos os extratos não apresentaram citotoxicidade dentro da faixa de concentração testada. Desta forma os extratos aquosos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, e o extrato otimizado, mostraram relativa segurança toxicológica.

3.3.5 Efeito antihemolítico *in vitro*

Como apresentado na Figura 17, os extratos aquosos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* assim como o extrato otimizado apresentaram proteção às células eritrocitárias de sangue humano em meio isotônico. A ação protetiva das

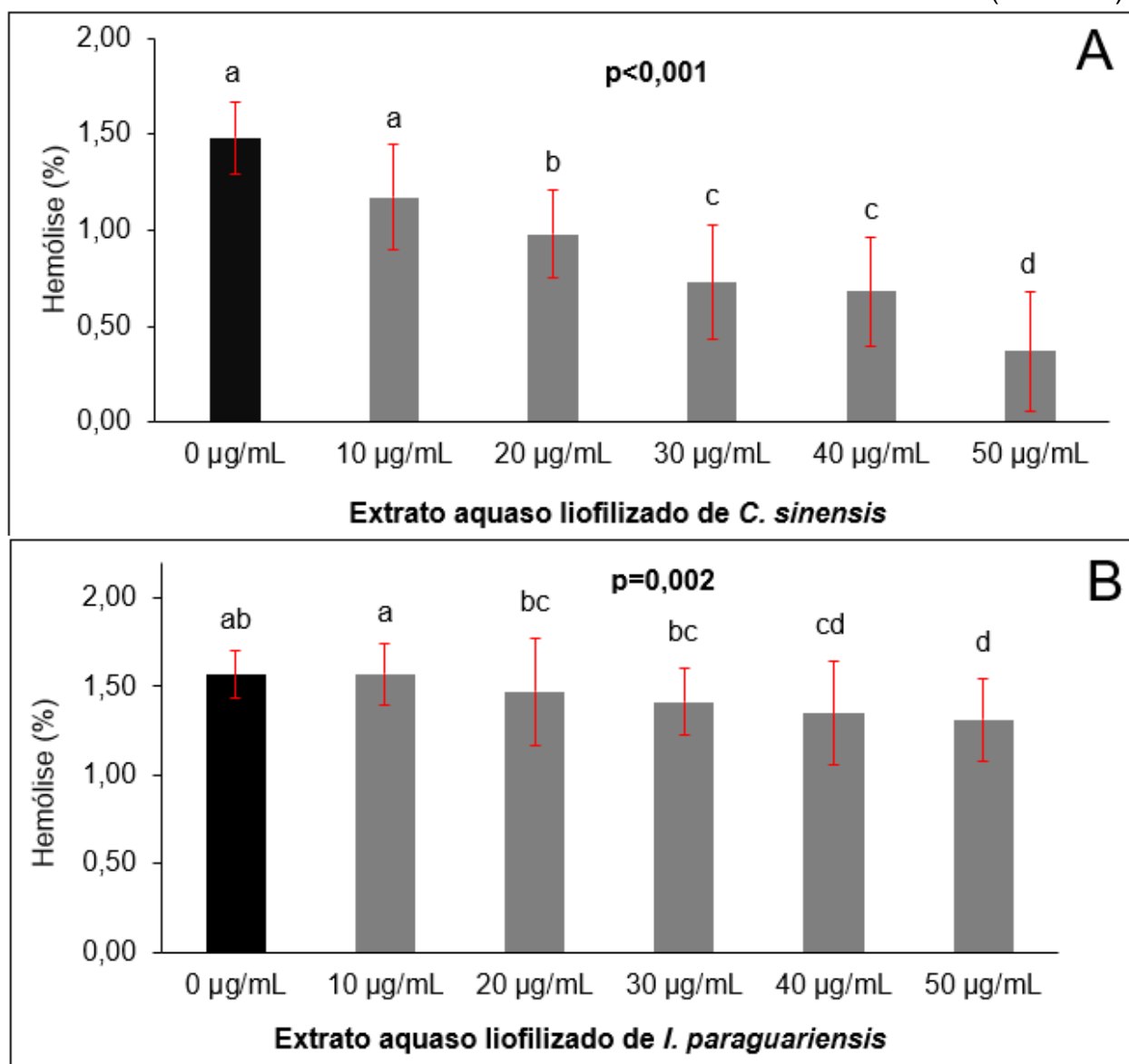
células é dada pelo fato que os extratos apresentaram comportamento não lítico nas condições experimentais empregadas. Ressalta-se que os extratos diminuíram o rompimento celular frente ao estresse mecânico em comparação com a amostra controle (sem extrato vegetal). Esses resultados demonstram que a interação entre os extratos e os eritrócitos é benéfica. De acordo com Phan et al. (2014), extratos com elevado conteúdo fenólico como os do presente estudo, podem diminuir a hemólise eritrocitária, reduzindo a fluidez da membrana célula.

Na Figura 17 é notório que a concentração de extrato interfere significativamente ($p < 0,05$) na diminuição da hemólise, ou seja, o efeito antihemolítico é dose-dependente (Figura 17A, 17B e 17C). As Figuras 17A, 17B, e 17C apresentam um efeito dose dependência acentuado com diminuições de 74,9, 16,3 e 66,9% de hemólise, dos extratos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis* e *A. linearis*, respectivamente. Entre o ensaio sem a presença do extrato e o ensaio com a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de extrato liofilizado. Efeitos protetores e de dose-dependência de extratos naturais já foram relatados na literatura, como no estudo de Santos et al. (2016) no qual observaram atividade antihemolítica em extrato *A. linearis*.

A Figura 17B mostra que a diminuição da hemólise com o aumento da concentração do extrato liofilizado de *I. paraguariensis* foi menos acentuado correspondendo apenas a 16,2% de hemólise entre o ensaio com ausência de extrato e a concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 17D mostra que o extrato otimizado apresentou redução acentuada da hemólise (67,8% de redução da hemólise) entre a amostra com ausência de extrato e com a presença de extrato na concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$. Em concentrações maiores que 20 $\mu\text{g/mL}$ não houve maior proteção, ou seja, nesse caso o extrato não apresentou comportamento dose-dependência. A capacidade protetiva contra hemólise do extrato aquoso de *I. paraguariensis* já foi observada por outros autores. Portela et al. (2017) constataram efeito protetor contra hemólise em sangue humano de extrato aquoso de *I. paraguariensis* nas concentrações de 0,02 mg/mL, 0,2 mg/mL e 2 mg/mL. Em trabalhos com chás pretos (*Camellia sinensis* var. *sinensis*), Zhang et al. (2019), constataram efeito protetor frente a hemólise dos eritrócitos humano em estado de fragilidade osmótica (NaCl de 0,1 a 0,5 (m/v)).

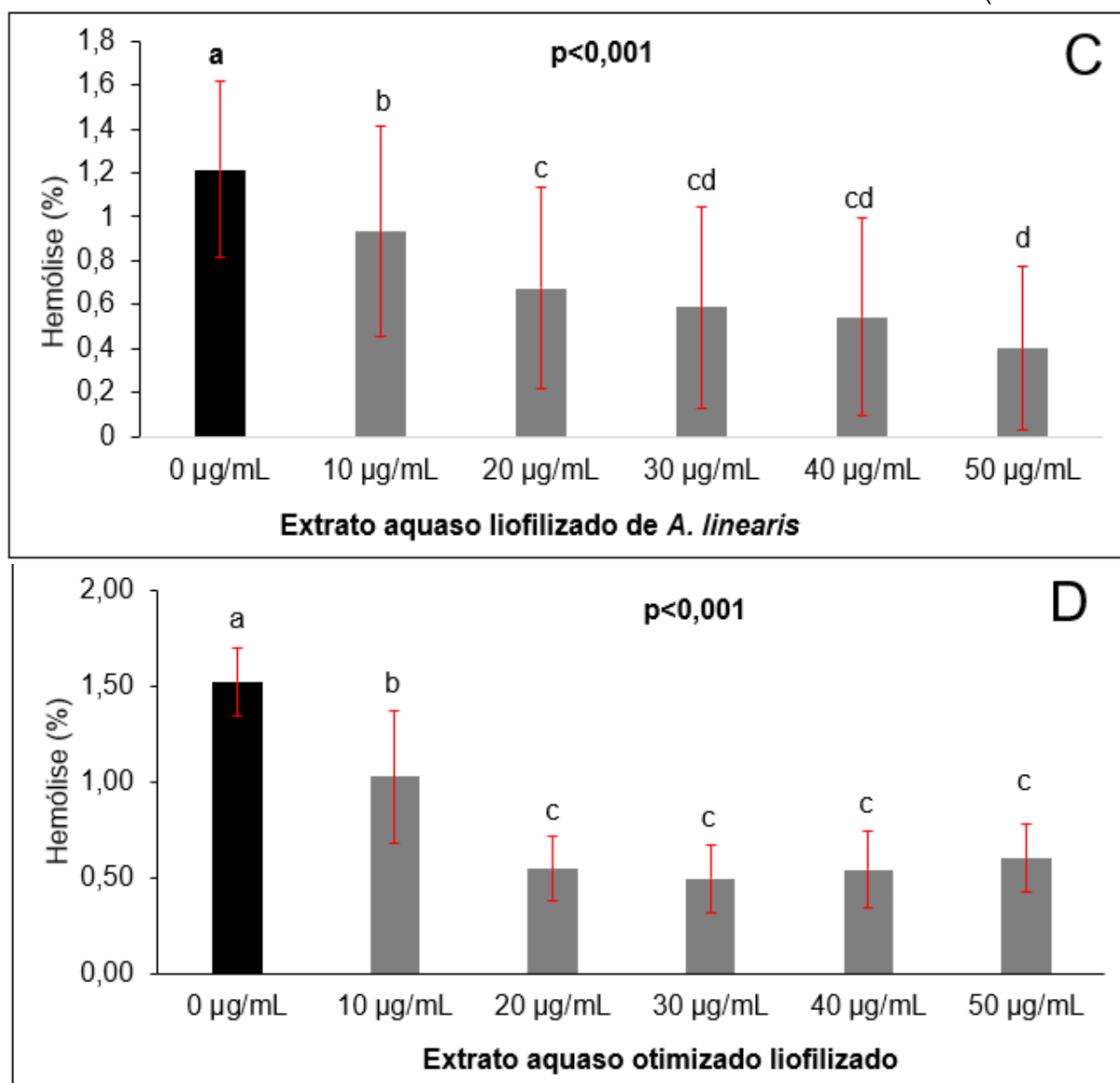
Figura 17 - Perfil antihemolítico dos extratos aquosos de *C. sinensis* (A), *I. paraguariensis* (B), *A. linearis* (C) e extrato otimizado (D) com tipagem O⁺

(Continua)



Fonte: O autor

Figura 17 - Perfil antihemolítico dos extratos aquosos de *C. sinensis* (A), *I. paraguariensis* (B), *A. linearis* (C) e extrato otimizado (D) com tipagem O⁺ (conclusão)



Fonte: O autor

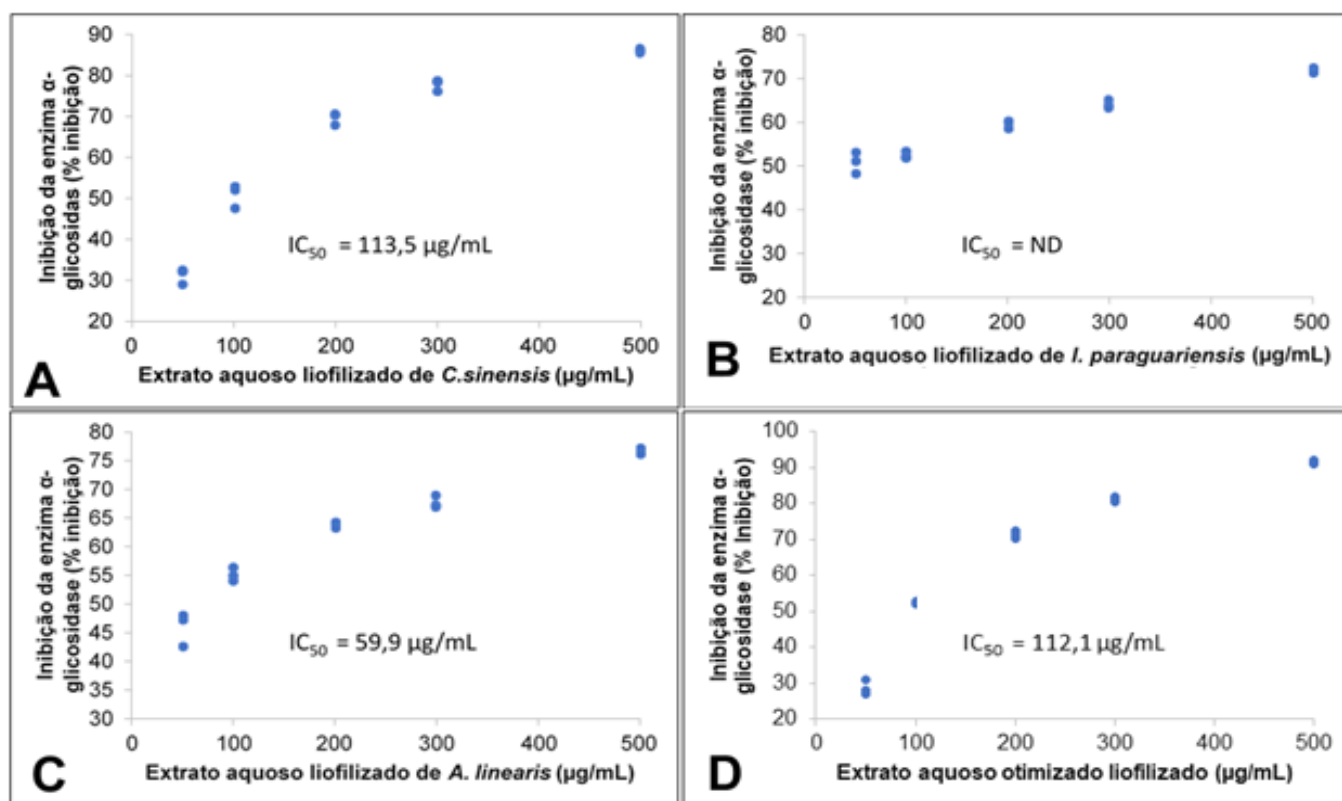
3.3.6 Inibição da α -amilase e α -glucosidase *in vitro*

Todos os extratos aquosos em estudo apresentaram atividade inibitória da enzima α -glucosidase, Figura 18. A maior inibição foi observada no extrato de *I. paraguariensis* (Figura 18B), o qual com a menor concentração testada (50 µg/mL) já ultrapassou 50% de inibição da enzima α -glucosidase. O extrato de *A. linearis* apresentou IC₅₀ = 59,9 µg/mL, ou seja, apresentou inibição de 50% da atividade enzimática com uma concentração baixa. Os extratos de *C. sinensis* e o extrato

otimizado apresentaram valores de IC_{50} numericamente semelhantes com 113,5 e 112,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Liu et al. (2017) ao avaliarem o efeito da temperatura de maceração nas atividades antioxidantes e inibitórias dos extratos de *C. sinensis* (chá verde) contra a α -amilase e α -glucosidase, constataram que o efeito inibidor dos extratos frente as enzimas estão diretamente correlacionado com o conteúdo de polifenóis e catequinas (α -amilase: $r=-0,873$ e $-0,915$; α -glucosidase: $r=-0,829$ e $-0,919$, respectivamente). Extratos naturais que apresentem capacidade inibitória das enzimas α -amilase e α -glucosidase são benéficos no controle de doenças associadas à hiperglicemia (PINTO et al., 2010; DHAMEJA; GUPTA, 2019).

Figura 18 - Efeitos de extratos de *C. sinensis* (A), *I. paraguariensis* (B), *A. linearis* (C) e otimizado (D) sobre a atividade enzimática da α -glucosidase



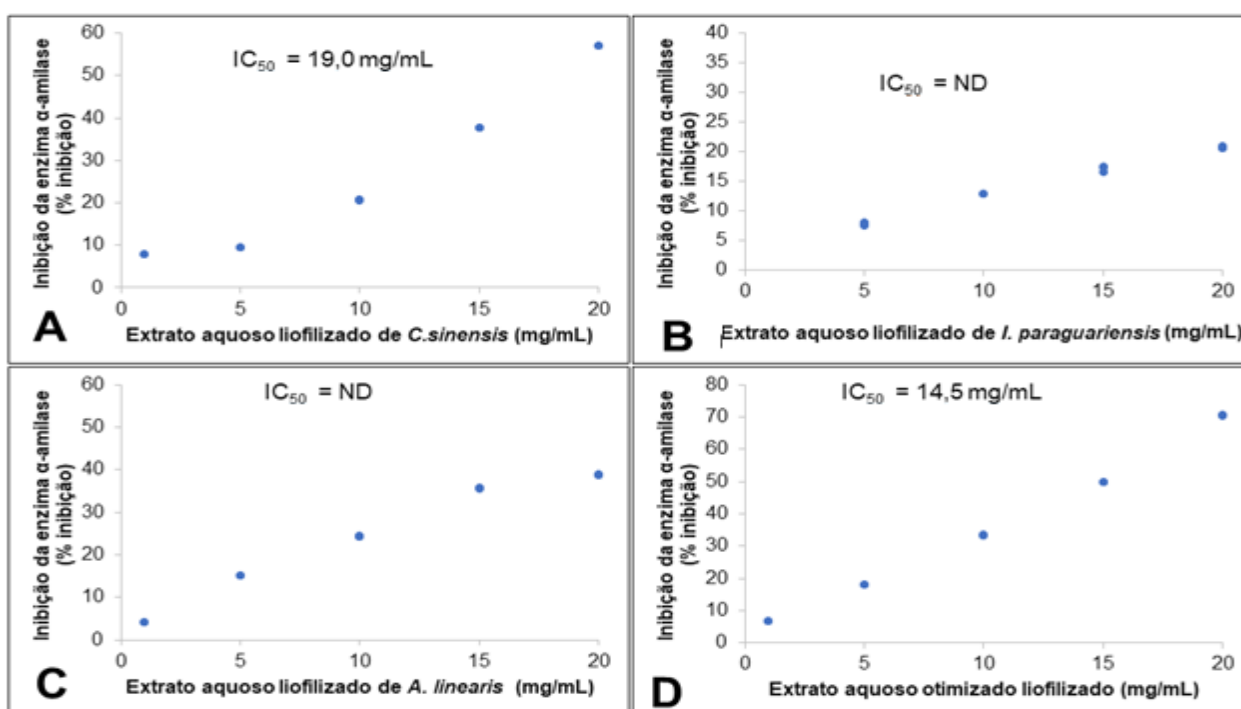
Fonte: O autor

Nota: Extrato otimizado = 82,9% *C. sinensis* + 10,9% *I. paraguariensis* + 6,2% *A. linearis*; ND = Não determinado porque a inibição foi $<50\%$.

Em relação à inibição enzima α -amilase também apresentada na Figura 19, é possível observar que somente o extrato de *C. sinensis* (Figura 19A) e o extrato otimizado (Figura 19D) atingiram valor de IC_{50} com as concentrações testadas (1-20

mg/mL). O extrato otimizado mostrou o menor $IC_{50} = 14,5$ mg/mL, ou seja, maior inibição da α -amilase. O extrato de *C. sinensis* apresentou $IC_{50} = 19,0$ mg/mL ao passo que o extrato de *I. paraguariensis* (Figura 19B) e *A. linearis* (Figura 19C) não alcançaram 50% de inibição (IC_{50}). Yang e Kong (2016) em estudo com diferentes chás de *C. sinensis* também constataram efeito inibidor dos extratos frente a enzima α -amilase. De modo geral, observou-se que a concentração de extrato necessária para apresentar atividade inibitória da enzima α -glucosidase foi inferior à usada para inibir a α -amilase. Esse comportamento é desejado uma vez que uma maior atividade inibitória da α -amilase pode acarretar desconforto intestinal pela presença de excesso de amido não digerido. Santos et al. (2016) avaliaram o efeito do tempo e da temperatura de extração de extratos de *A. linearis* e constataram que todos os extratos apresentaram capacidade inibitória frente as α -amilase e α -glucosidase, com valor de IC_{50} de 5 a 6 mg/mL e 1 e 0,5 mg/mL, respectivamente.

Figura 19 - Efeitos de extratos de *C. sinensis* (A), *I. paraguariensis* (B), *A. linearis* (C) e otimizado (D) sobre a atividade enzimática da α -amilase



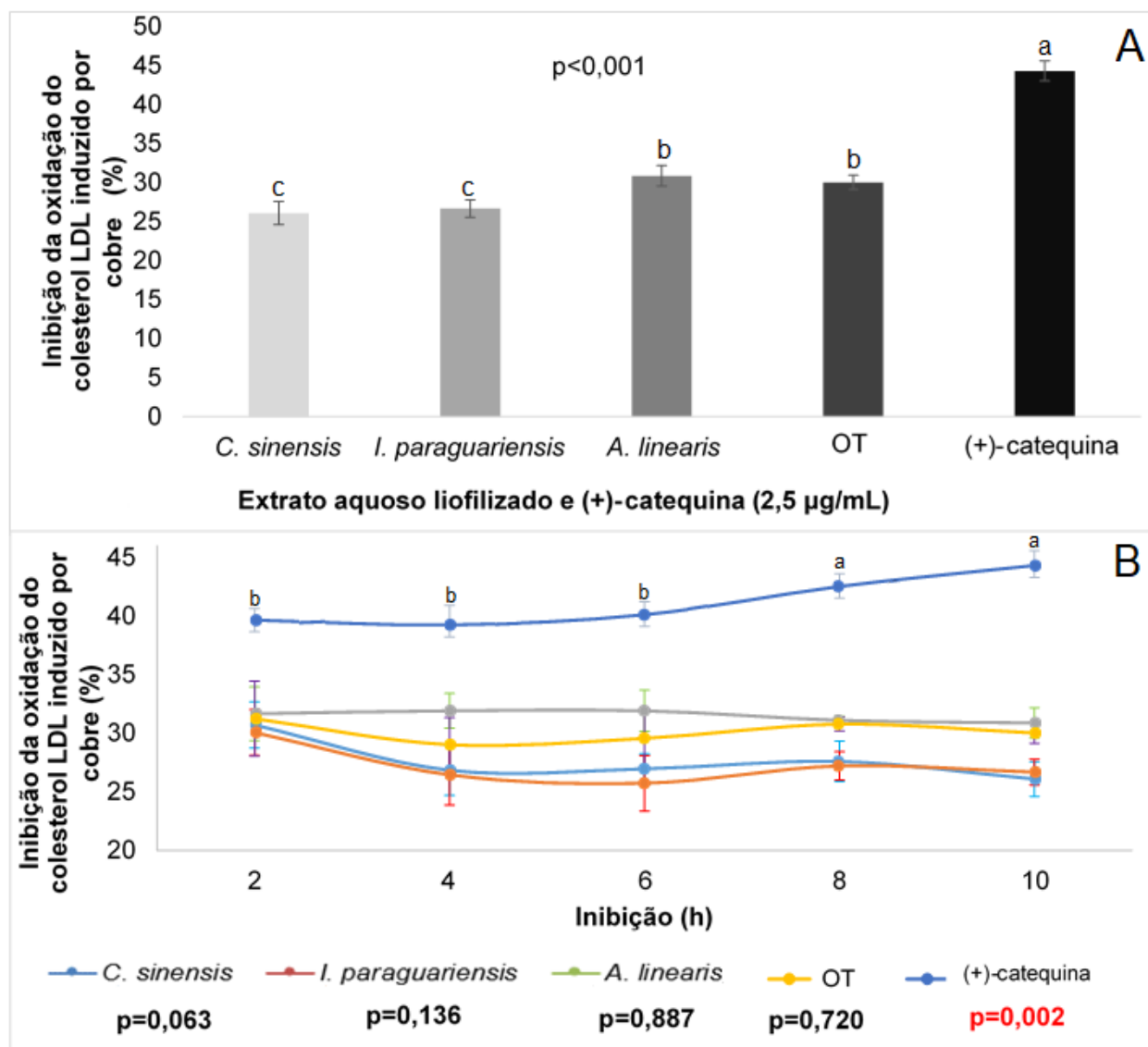
Fonte: O autor

3.3.7 – Capacidade de inibição da oxidação do colesterol LDL

Todos os extratos testados apresentaram proteção contra a oxidação do colesterol LDL no tempo final de incubação de 10 h, como apresentado na Figura 20A.

Os extratos de *A. linearis* e otimizado apresentaram maior capacidade inibitória da oxidação do LDL em relação aos extratos de *I. paraguariensis* e *C. sinensis*. Não houve diferença significativa entre os extratos de *A. linearis* e OT, os quais apresentaram 31 e 30% de inibição da oxidação do LDL. O mesmo comportamento foi encontrado ao comparar os extratos de *I. paraguariensis* e *C. sinensis* os quais apresentaram 26 e 27% de inibição da oxidação do LDL, respectivamente. O padrão de catequina apresentou melhor capacidade em inibir a oxidação do LDL com o valor de 44% de inibição. Entretanto, o fato que os extratos apresentaram a capacidade de proteger da oxidação o LDL é relevante. Como já relatado por Halliwell e Gutteridge (2015) a oxidação do LDL por espécies reativas entre elas íons metálicos, é uma das causas do desenvolvimento de lesões ateroscleróticas as quais podem acarretar em doenças cardíacas crônicas em seres humanos.

Figura 20 - Inibição da oxidação induzida por LDL-colesterol (A) e os efeitos dos extratos liofilizados de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* e extrato otimizado (OT) na oxidação de LDL-colesterol (B).



Fonte: O autor

Nota: Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

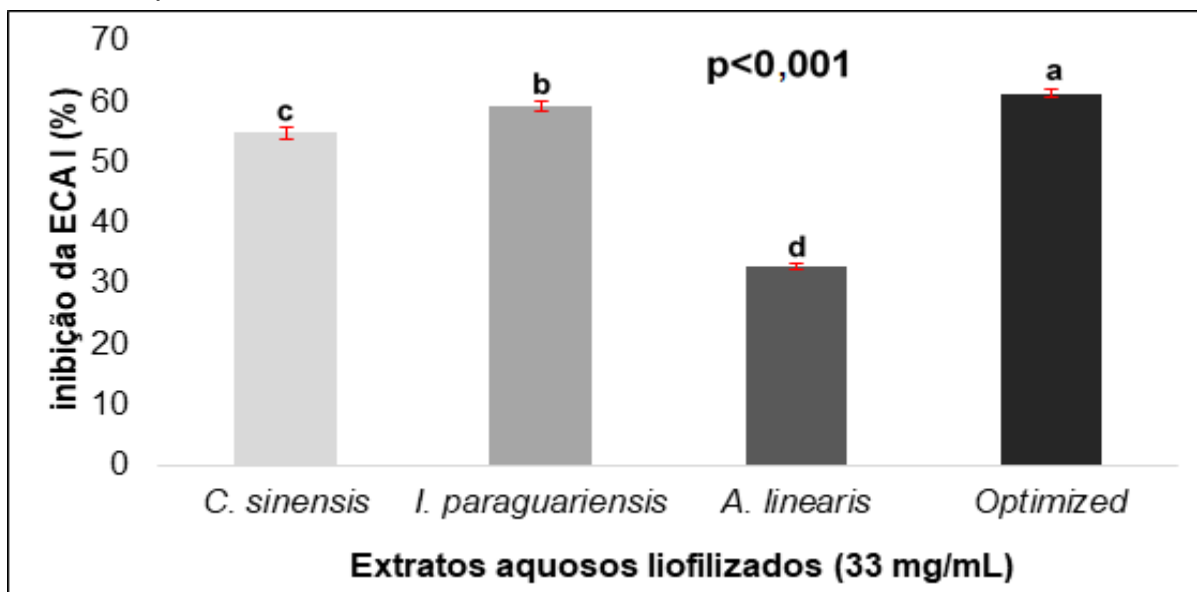
O comportamento dos extratos testados foi observado ao longo do período de incubação e os resultados estão expostos na Figura 20B. Todos os extratos não obtiveram variação significativa em relação ao tempo de incubação ($p > 0,05$). Esse resultado mostra que a partir das primeiras 2 h de incubação, a ação antioxidante já havia ocorrido e foi mantida até o tempo final de análise de 10 h. Ao contrário dos extratos teste, o padrão de catequina apresentou variação significativa ao longo do período de incubação ($p = 0,002$), tendo maior percentual de inibição do LDL a partir de

8 h de incubação. Isso sugere que a (+)-catequina precisa de um maior tempo de reação para atingir seu potencial protetor em comparação aos extratos testados.

3.3.8 Atividade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA)

Em relação à capacidade inibitória da enzima conversora de angiotensina I *in vitro*, observou-se diferença significativa entre os extratos aquosos (Figura 21). O extrato otimizado apresentou o maior percentual de inibição da ECA ($p < 0,05$) - 61%. A menor inibição foi observada no extrato de *A. linearis* (33%). Em estudo clínico randomizado Grassi et al. (2015) constataram que o consumo de *C. sinensis* reduz a pressão arterial em pacientes hipertensos. Uma vez que a inibição da ECA tem relação com a redução da pressão arterial, os resultados aqui obtidos devem ser confirmados usando protocolos biológicos, em especial estudos clínicos. Com a inibição da enzima converte angiotensina I, há o impedimento da conversação em angiotensina II que, por sua vez, aumenta a pressão arterial, por meio do estímulo da síntese e liberação de aldosterona, o qual causa retenção de sódio nos túbulos renais. Portanto é possível o controle da pressão arterial em pacientes hipertensos com substâncias capazes de inibir ECA (KWON et al., 2007). O fato de que a amostra otimizada apresenta o maior conteúdo fenólico total e a maior variedade de compostos em sua composição pode ter relação com sua maior inibição da ECA. Mancuso e Santangelo (2014) e Panche, Diwan e Chandra (2016) relataram que os compostos fenólicos apresentam capacidade inibitória da ECA, apresentando efeito benéfico ao reduzir o risco do desenvolvimento de hipertensão. Já no estudo desenvolvido por Fidelis et al. (2018) foi constatado correlação direta entre os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, cafeico, quercetina-3-rutinosídeo e quercetina na inibição da ECA *in vitro*. O chá otimizado apresenta em sua composição, todos esses compostos relatados, além de outros apresentados na Tabela 11.

Figura 21 – Capacidade inibitória de enzima conversora de angiotensina I (ECA), dos extratos aquosos



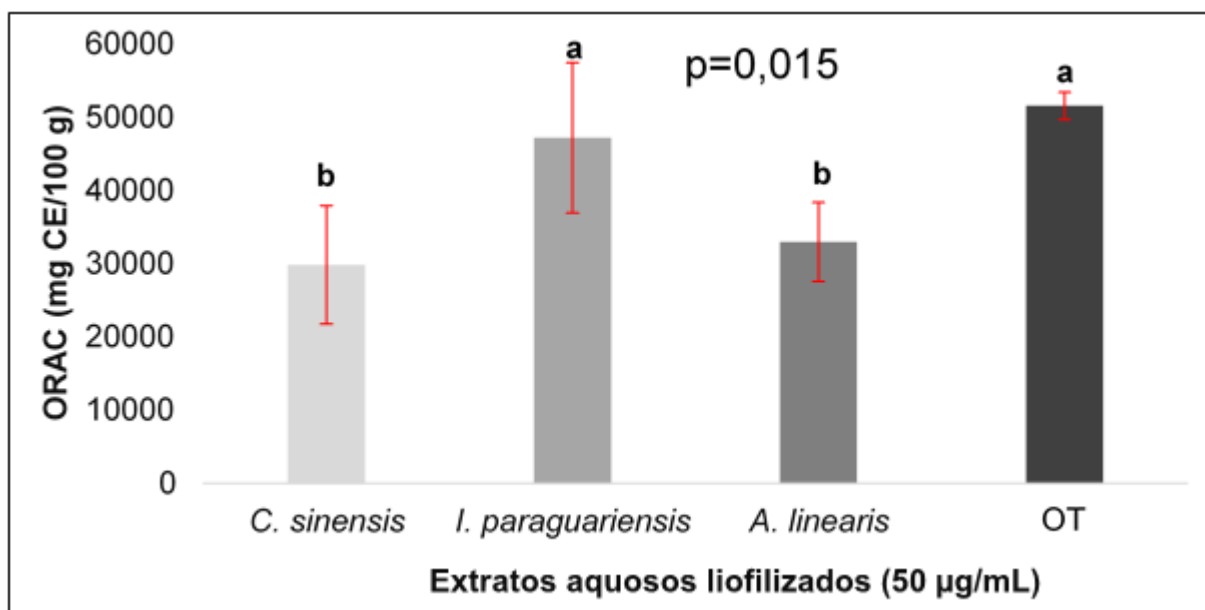
Fonte: O autor

3.3.9 Capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ORAC)

A capacidade antioxidante de absorção de radicais de oxigênio (ORAC) dos extratos aquosos liofilizados está apresentada na Figura 22. Foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* e extrato otimizado, com os valores médios de 29847, 47207, 32970 e 51569 mg CE/100 g de extrato liofilizado, respectivamente.

A atividade antioxidante frente a radicais de oxigênio, simula *in vitro* a ação de determinadas substâncias em relação a radicais biologicamente relevante (THAIPONG et al., 2006). Extrato de *C. sinensis*, *I. paraguariensis* e *A. linearis* já foram estudados em relação à atividade antioxidante medida por ORAC (RAMIREZ-MARES; KOBAYASHI, DE MEJIA, 2016.; LAWAL et al., 2019). Entretanto, esse é o primeiro relato na literatura que mostra que a atividade antioxidante medida por ORAC de um extrato aquoso misto (82,9% *C. sinensis* + 10,9% *I. paraguariensis* + 6,2% *A. linearis*) é superior aos valores observados para os extratos isolados de *C. sinensis* e *A. linearis*.

Figura 22 – Capacidade de absorção de radicais de oxigênio, dos extratos aquosos

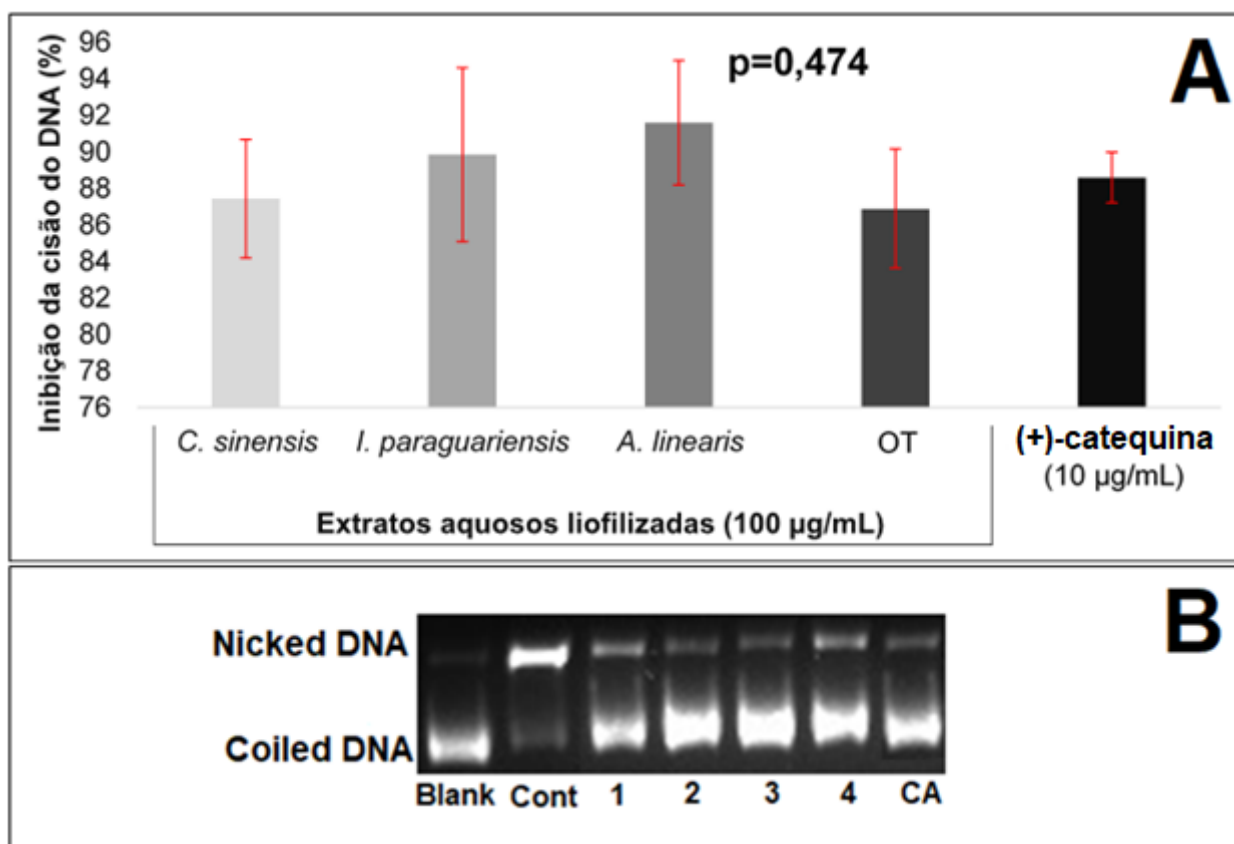


Fonte: O autor

3.3.10 Inibição da cisão do DNA induzida por radical peroxil

Os extratos liofilizados apresentaram proteção contra a cisão do DNA induzida pelo radical peroxila, Figura 23. As taxas de inibição encontradas para *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis*, extrato otimizado e o padrão de catequina foram de 87,4, 89,8, 91,6, 86,9 e 88,6% ($p=0,472$), respectivamente. O fato da atividade de proteção do DNA ser comparável ao padrão deixa claro o potencial antimutagênico *in vitro* dos extratos aquosos de *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* e extrato otimizado. Este é o primeiro relato da proteção do DNA de um extrato otimizado composto por *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis* em relação a espécie reativa de oxigênio - ERO. Os compostos fenólicos além da atividade antioxidante apresentam outras funções como prevenção da oxidação celular (PERERA et al., 2018).

Figura 23 - Inibição dos extratos *C. sinensis*, *I. paraguariensis*, *A. linearis*, extrato otimizado liofilizados e padrão de catequina contra cisão de DNA induzida por radical peroxil, comparação estatística (A) e eletroforese (B)



Fonte: O autor

Nota: Brank = somente DNA; Cont = controle contendo DNA com radical peroxil; 1= *C. sinensis*; 2 = *I. paraguariensis*; 3 = *A. linearis*; 4 = extrato otimizado CA = padrão de (+) – catequina

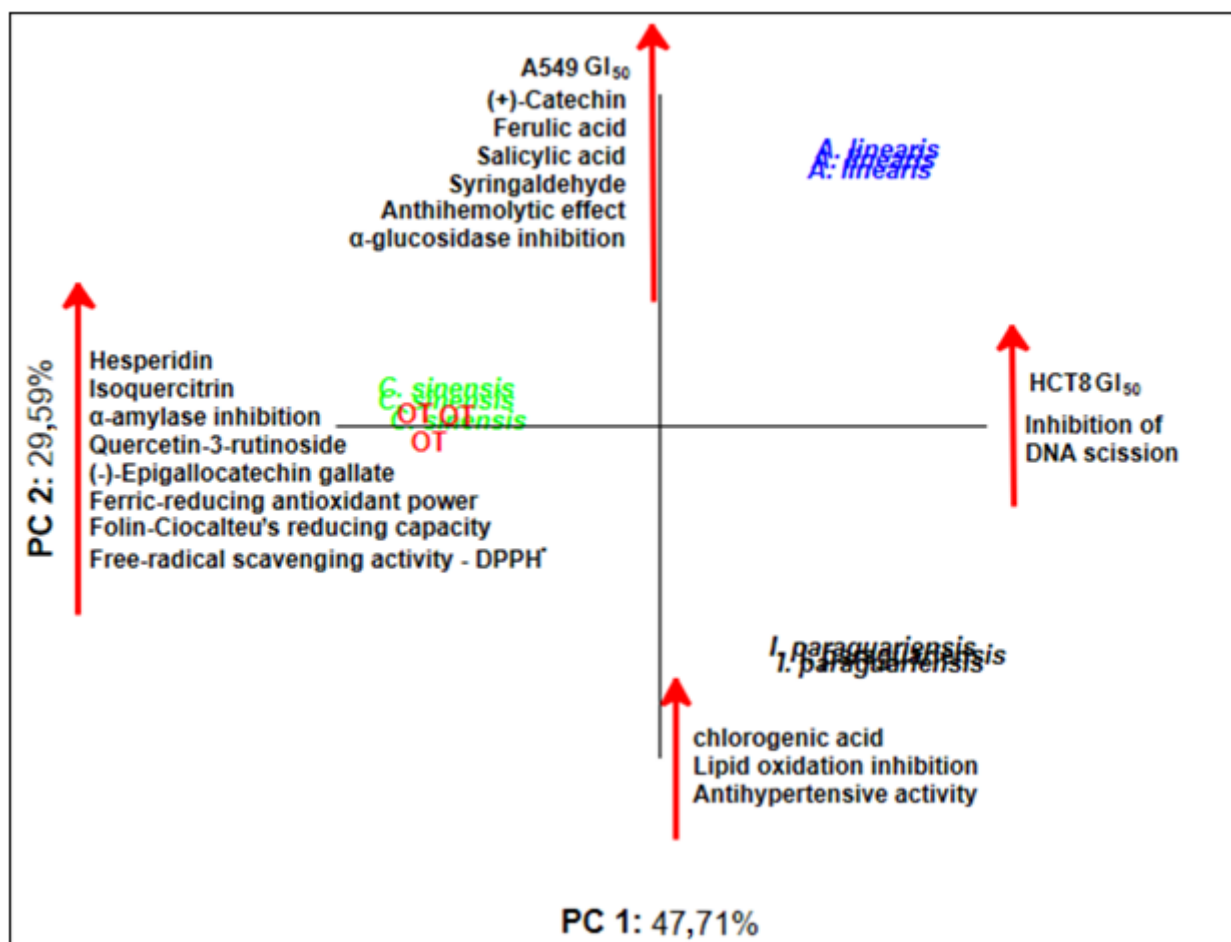
3.3.11 Correlação pela análise por componentes principais

A análise por componentes principais foi representada graficamente (PC1 X PC2) e os resultados estão apresentados na Figura 24. Nota-se uma nítida separação dos extratos de *I. paraguariensis* e *A. linearis*, ao passo que o extrato de *C. sinensis* apresenta-se agrupado ao extrato otimizado. É válido ressaltar que o extrato otimizado é composto majoritariamente por *C. sinensis* (82,9%) o que justifica as semelhanças apresentadas na projeção multivariada.

Avaliando a Figura 24, é possível observar que os extratos *C. sinensis* e o extrato otimizado apresentam a maior atividade antioxidante (DPPH, FRAP, e FCRC), maiores teores de hesperidina, quercetina-3-rutinosídeo, (-)-epigallocatequina-3-galato e isoquercitrina, maior inibição da α -amilase e maior inibição da proliferação das células HCT8. O extrato de *A. linearis* apresentou os maiores teores de ácido

ferúlico, ácido salicílico, (+)-catequina e siringaldeído, maior inibição da α -glucosidase e efeito protetor dos eritrócitos. Já o extrato de *I. paraguariensis* apresentou a maior concentração de ácido clorogênico, maior inibição da lipoperoxidação em cérebro de rato Wistar, maior atividade antihipertensiva e maior inibição da proliferação das células A549.

Figura 24 - Análise por componentes principais dos extratos aquosos



Fonte: O autor

Analisando a Figura 24, ainda é possível observar uma relação direta entre conteúdo de (+)-catequina, ácido ferúlico, ácido salicílico e siringaldeído com a capacidade protetora dos eritrócitos de sangue humano e a capacidade inibitória da enzima α -glucosidase. O teor de hesperidina, isoquercitrina, quercetina-3-rutinosídeo e (-)-epigallocatequina-3-galato estão diretamente associados as atividades antioxidante de captura do radical DPPH, FRAP e FCRC. Em relação ao teor de ácido clorogênico mostrou-se relacionado com inibição da lipoperoxidação em cérebro de rato Wistar, maior atividade antihipertensiva.

3.4 CONCLUSÃO

A partir dos dados obtidos, conclui-se que o extrato otimizado composto por 82,9% *C. sinensis* + 10,9% *I. paraguariensis* + 6,2% *A. linearis* apresenta a composição fenólica mais variada em relação aos extratos isolados. Com a aplicação da estatística multivariada foi possível identificar os compostos mais associados com as propriedades funcionais dos extratos avaliados. Desta forma, afirma-se que a funcionalidade *in vitro* de cada extrato aquoso é dependente de sua composição química particular. De forma ampla, um extrato com o maior conteúdo fenólico, não apresenta maiores resultados de proteção eritrocitária, inibição da lipoperoxidação, inibição contra a cisão do DNA e atividade citotóxica. Ao passo que os extratos com maior conteúdo fenólico apresentam maior capacidade antioxidante em meios químicos (DPPH, FRAP e FCRC). Sugere-se que trabalhos futuros sejam desenvolvidos com intuito de direcionar cada extrato aquoso para as atividades em que ele melhor atua e, possivelmente, aplicar em alimentos no intuito de diminuir ou eliminar antioxidantes sintéticos.

CAPÍTULO 4 – EFEITO DA ADIÇÃO DO EXTRATO MISTO LIOFILIZADO COMPOSTO POR *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis*, E *Aspalathus linearis* NAS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, SENSORIAIS E FUNCIONAIS DE GELADOS COMESTÍVEIS ADICIONADO DE PROTEÍNAS

RESUMO

Gelados comestíveis tipo picolé são consumidos em todo o mundo por suas propriedades sensoriais. Entretanto, sua composição nutricional é limitada aos carboidratos, edulcorantes e saborizantes sintéticos. Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver gelados comestíveis fontes de proteínas vegetal e/ou animal, acrescidos de um extrato misto liofilizado (EML) composto por chá branco, rooibos fermentado, e mate tostado, sem adição de edulcorantes/saborizantes artificiais e avaliar as propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais *in vitro*. Um total de seis formulações foram elaboradas contendo proteína de arroz (vegana), proteína concentrada de soro de leite bovino, ou uma mistura das duas proteínas, com ou sem adição do EML. Os gelados comestíveis adicionados de EML apresentaram maior conteúdo fenólico total em relação aos controles (sem adição). O maior conteúdo fenólico foi observado na formulação composta por proteína animal e adicionada de EML com 134 ± 10 mg ácido gálico equivalente/100 g (AGE/100 g). O gelado comestível formulado com proteína animal e EML apresentou a maior atividade antioxidante, apresentando valores médios de 272 ± 7 mg ácido ascórbico equivalente/100 g (AAE/100 g) e 167 ± 7 mg AAE/100 g para o poder de redução do ferro (FRAP) e captura do radical DPPH, respectivamente. Em relação à análise sensorial, os maiores índices de aceitação, 91 e 88% foram observados nas formulações adicionadas de proteína animal sem e com EML, respectivamente. Por outro lado, a formulação vegana com adição EML apresentou menor índice de aceitação - 68%. Conclui-se que a adição de EML e soro de leite concentrado é uma opção viável para incorporação de compostos fenólicos em gelados comestíveis tipo picolé fontes de proteínas.

Palavras-Chave: Aplicação tecnologia; sobremesas lácteas; desenvolvimento de alimento; picolé.

4.1 INTRODUÇÃO

A Resolução RDC nº 266, 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), define gelado comestível como “os produtos congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar. Podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto” (BRASIL, 2005). A produção de gelados comestíveis no Brasil tem apresentado estabilidade nos últimos anos. De acordo com Associação Brasileira da Indústria de Sorvete – ABIS, atualmente, o Brasil conta com oito mil empresas ligadas à produção e comercialização de sorvete. Os mesmos autores relatam que o setor gera cerca de 75 mil empregos diretos e 200 mil indiretos, tendo um faturamento anual acima de R\$ 13 bilhões (ABIS, 2020).

Sobremesas congeladas, como os gelados comestíveis, são populares em todo mundo. Isso decorre de características como gosto doce, versatilidade em termos de formulações e sensação refrescante. Os gelados comestíveis podem ser vendidos de várias formas no mercado como os convencionais, *light*, livre de gorduras, baixo teor de açúcar entre outras formas (GRANATO et al., 2018b). Estudos recentes, como o realizado por Öztürk et al. (2017), incentivam a adição de extratos vegetais em gelado comestível e outros produtos lácteos para agregar propriedades funcionais no produto. Martins et al. (2018) ao avaliarem as propriedades químicas, sensoriais e funcionais de picolés a base de soro de leite com suco de melancia concentrado, observaram que os picolés apresentaram atividade antioxidante, além de obter aceitação sensorial semelhante ao picolé sem adição de suco concentrado. Os mesmos autores ressaltam que é possível fabricar picolés ricos em compostos ativos combinando soro de leite e suco de melancia concentrado.

Uma diversidade de extratos de ervas já foi estudada em relação a propriedades funcionais, como funções antioxidantes, anticancerígenas, antiobesidade, antialérgicas e outras funções biológicas (KHAN; MUKHTAR, 2019). Um trabalho recente de Santos et al. (2018) relata o uso de um extrato misto composto por 82,9% de *Camellia sinensis* + *Ilex paraguariensis* + 10,9%, + 6,2% *Aspalathus linearis*, com elevado teor de compostos fenólicos totais (1200 mg ácido gálico equivalente/L) e atividade antioxidante. A bebida mista apresentou efeito antibacteriano e atividade antiproliferativa frente a células cancerosas (Caco-2 e

HepG2). Entretanto, observa-se que não foram localizados registros da utilização da mistura dessas ervas em produtos lácteos, em especial em gelados comestíveis tipo picolé.

Extratos naturais de ervas, flores comestíveis e outras fontes de compostos bioativos, devem ser mais exploradas pela indústria de alimentos, em especial, para desenvolvimento de produtos com menor teor (ou ausência) de aditivos químicos sintéticos (GRANATO et al., 2018). Desta forma, visando a demanda por produtos mais naturais e a necessidade tecnológica de desenvolver alimentos nutricionalmente balanceados. Desta forma, o objetivo deste estudo foi desenvolver gelados comestíveis fontes de proteínas vegetal e/ou animal, acrescidos de um extrato misto liofilizado (EML) composto por chá branco, rooibos fermentado, e mate tostado, sem adição de edulcorantes/saborizantes artificiais, e avaliar suas propriedades nutricionais, sensoriais e funcionais *in vitro*.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Reativos químicos

Reagente de Folin-Ciocalteu 2 N, radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), ácido gálico, TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina), cloreto de ferro (III) hexahidratado, e quercetina foram obtidos na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Ácido clorídrico, acetato de sódio, ferricianeto de potássio, ácido ascórbico, isobutanol, etanol absoluto, álcool metílico e ácido acético (glacial) foram adquiridos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil). O hidróxido de sódio foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil). As soluções aquosas foram preparadas utilizando água ultrapura. Para formulação dos gelados comestíveis foi utilizado água mineral (Royal Fit, Ponta Grossa, Brasil), sacarose orgânica (Native, sertãozinho Brasil), estabilizante em pó, super liga neutra e emulsificante EMUSTAB (Duas Rodas, Jaraguá do Sul, Brasil) cacau em pó (Marfil, Curitiba, Brasil), proteína do soro do leite concentrada (80%) e proteína de arroz concentrada (73%) (Growth Supplements, Bombinhas, Brasil).

4.2.2 Material vegetal e obtenção do extrato misto

Chás branco (*Camellia sinensis* var. *sinensis*), rooibos fermentado (*Aspalathus linearis*), e mate tostado (*Ilex paraguariensis*) orgânicos certificados, foram adquiridos das empresas CLIPPERP (Alemanha), Matte Leão (Brasil), e Simon Lévelt (Países Baixos), respectivamente. O material foi triturado e o tamanho de partículas padronizado em 60 Tyler mesh.

O material vegetal foi extraído a 80 °C por 10 min, em constante agitação. Após a obtenção dos extratos de cada erva, foi formulado um extrato misto composto por chá branco, rooibos fermentado e mate tostado nas proporções estudadas por Santos et al. (2018) 82,9% chá branco + 10,9% chá de mate + 6,2% chá de rooibos. Posteriormente o extrato misto aquoso foi desidratado a 1200 µHg em -50 °C por 120 h em liofilizador (Terroni LD, modelo LD1500, São Paulo, Brasil).

4.2.3 Perfil fenólico e antioxidante do extrato otimizado liofilizado

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método do azul da Prússia e os resultados expressos em mg ácido gálico equivalente por 100 g de extrato liofilizado (mg AGE/100 g). O conteúdo de taninos condensados totais foi determinado pelo método que emprega H₂SO₄ e vanilina e expresso em mg de catequina equivalente por 100 g de extrato liofilizado (mg CE/100 g). O poder antioxidante de redução do ferro, FRAP, e a ação antioxidante frente ao radical DPPH foram realizados e expressos em mg ácido ascórbico equivalente por 100 g de extrato liofilizado. A capacidade redutora total – CRT, foi avaliada pelo método modificado de Folin-Ciocalteu, e expressa em mg de quercetina equivalente por 100 g de extrato liofilizado (mg QE/100 g). A descrição completa dos métodos analíticos foi previamente relatada por Santos et al. (2018).

4.2.4 Preparo dos gelados comestíveis

Foram elaboradas seis formulações de gelados comestíveis tendo como formulação base 100 mL de água, 10 g/100 g de sacarose, 1 g/100 g de estabilizante, 1 g/100 g de emulsificante e 4 g/100 g de cacau em pó. As seis formulações estão expostas na Tabela 12.

Tabela 12 - Formulações dos gelados comestíveis

Formulações	Proteína animal (g/100 g)	Proteína vegetal (g/100 g)	Extrato otimizado (g/100 g)
F1	5	0	0
F2	5	0	1
F3	0	5	0
F4	0	5	1
F5	2,5	2,5	0
F6	2,5	2,5	1

Fonte: O autor

Nota: Proteína animal = proteína do soro do leite; Proteína vegetal = proteína de arroz; Extrato otimizado = 82,9% chá branco + 10,9% chá de mate + 6,2% chá de rooibos.

O processo tecnológico aplicado consistiu na mistura de todos os componentes em liquidificador com capacidade para 1,5 L e potência de 500 W (Mondial, Power NL26) por 5 min. A incorporação do estabilizante, emulsificante e cacau em pó foi realizada lentamente para facilitar dissolução. Posteriormente, as formulações foram pasteurizadas a 65 °C/30 min. Após resfriamento a 10 °C a mistura foi batida em Batedeira com capacidade de 4,3 L e potência de 300 W (KitchenAid, Stand Mixer Bowl Kitchen Aid KEA30CEPNA) por 5 min. Em seguida a mistura foi adicionada em moldes de policloreto de polivinila e submetidos a congelamento rápido em ultrafreezer a -74 °C. Finalmente, os picolés foram removidos dos moldes, embalados individualmente e armazenados até o momento das análises.

4.2.5 Composição proximal das formulações

Para caracterizar os picolés adicionados de extrato otimizado os teores de proteínas, umidade e cinzas foram determinados de acordo com os métodos n° 920.87; 925.09; 923.03, respectivamente (AOAC, 2005). O teor de lipídios foi determinado de acordo com o método 989.05 (AOAC, 1990). O pH, acidez titulável total e sólidos solúveis totais foram determinados de acordo com os métodos n° 981.12, 942.15 e 932.12, respectivamente (AOAC, 1997). O teor de carboidratos + fibras das formulações de gelado comestível foi calculado pela diferença entre 100 e a soma do conteúdo de proteínas, gorduras, umidade e cinzas. O valor calórico médio dos

gelados comestíveis foi calculado utilizando os fatores Atwater (proteínas e carboidratos = 4 kcal/g e lipídeos = 9 kcal/g), os resultados expressos em kcal/100 g.

4.2.6 Compostos fenólicos totais, taninos condensados totais e atividade antioxidante *in vitro* dos gelados comestíveis

Para determinar o conteúdo fenólico total e atividade antioxidante dos gelados comestíveis, foi realizado uma extração sobre agitação constante em agitador de tubos vortex por 10 min, de 4 g do gelado comestível na presença de 4 mL de álcool metílico (1:1 m/v). Posteriormente, a mistura foi centrifugada a 700 x g por 20 min, e a fase superior foi coletada e analisada imediatamente. Os compostos fenólicos totais, teor de taninos condensados totais, assim como atividade FRAP, ação antioxidante frente ao radical DPPH e capacidade redutora total – CRT foram avaliados como descrito no item 4.2.3, e os resultados foram expressos em mg do padrão utilizado para cada análise equivalente por 100 g de gelado comestível.

4.2.7 Análise sensorial

A análise sensorial foi realizada de acordo com os termos aprovados Comitê de Ética da UEPG, CAAE: 65493717.9.0000.0105, (Anexo A). Um total de 444 avaliadores não treinados, sendo 149 homens e 295 mulheres entre 18 e 50 anos, foram utilizados após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo B). Os gelados comestíveis, 15 g, foram servidos em embalagem plástica identificado com três dígitos aleatórios. A escala hedônica estruturada de nove pontos variando de 1 (desgostei extremamente) a 9 (gostei extremamente) foi usada para avaliar a aceitabilidade em relação ao odor, sabor, cor e impressão global. O índice de aceitação para cada amostra foi calculado utilizando a média do atributo impressão global multiplicada por 100 e dividida pelo escore máximo, ou seja, 9. Os resultados foram expressos em percentual de aceitação. O índice de aceitação de cada uma das 6 formulações foi comparado pelo procedimento de Marascuillo, com base no teste z com $p < 0,05$.

Adicionalmente, os avaliadores opinaram sobre o valor a ser pago a mais (R\$ 0 a R\$ 2.00) por uma unidade de 100 g de “picolé de chocolate com adição de extrato rico em compostos antioxidantes naturais” em comparação ao “gelado comestível comercial sem adição de extrato rico em compostos antioxidantes naturais” (R\$ 2.00),

respectivamente. Os avaliadores também foram questionados em relação a intenção de compra ao se deparar com o produto exposto à venda no mercado utilizando uma escala binária (sim/não).

4.2.8 Análise estatística

Os métodos analíticos foram realizados em triplicata e os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão. Para comparar as variáveis de resposta, diferenças entre os valores médios foram avaliadas pela análise de variâncias (ANOVA) unifatorial seguida do teste de Fisher para comparação das médias. Para comparação de duas amostras (presença ou ausência de extrato) o teste *t*-Student pareado foi aplicado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados para descartar a hipótese nula. O *software* TIBCO *Statistica* v 13.3 (TIBCO Statistica Inc., USA) foi usado para todas as análises estatísticas.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Caracterização fenólica e antioxidantes do extrato misto liofilizado (EML)

O conteúdo fenólico total médio determinado no EML foi de 30401 mg AGE/100 g, o que representa cerca de 30% da massa do extrato liofilizado. Extratos aquosos liofilizados de ervas apresentam um elevado conteúdo de compostos fenólicos, e assim são considerados uma fonte rica dessa classe de metabólitos secundários (GREMSKI et al., 2019). O teor de taninos condensados determinado no EML foi de 6844 mg AGE/100 g. Esse valor de taninos condensados determinado é atribuído ao extrato de *C. sinensis*, o qual é a fonte majoritária dessa classe de compostos entre os extratos estudados. Um estudo recente de Zeng et al. (2020), identificaram 11 catequinas diferentes em extrato de *C. sinensis*. A presença das catequinas justifica o teor de taninos condensados quantificados no extrato otimizado, tendo em vista que as catequinas são monômeros dos taninos condensados.

O EML foi avaliado em relação a capacidade antioxidante *in vitro* por três diferentes métodos. Em relação ao poder antioxidante de redução do ferro quantificada no extrato liofilizado foi de 70375 ± 2575 mg de AAE/100 g. No que diz respeito a captura do radical DPPH, foi determinada atividade equivalente a 43189 ± 630 mg de ácido ascórbico por 100 g de amostra liofilizada. A capacidade

reduzora total apresentou um valor médio de 43790 ± 2238 mg de QE/100 g. A elevada atividade antioxidante observada no extrato liofilizado está diretamente relacionada ao conteúdo de compostos fenólicos. Recentemente, Morais et al. (2020) observaram valores de correlação elevados e positivos ($r=0,9$) entre os compostos fenólicos e o poder antioxidante de redução do ferro.

4.3.2 Composição proximal e propriedades físico-químicas dos gelados comestíveis

As propriedades físico-químicas e composição proximal dos gelados comestíveis estão apresentadas na Tabela 13. Observa-se que não ocorreu diferença significativa no teor de lipídeos e valor de pH nas diferentes formulações ($p > 0,05$), com valores em torno de 1 g/100 g. Em relação ao teor de cinzas e proteínas ocorreu uma diferença significativa entre as formulações do gelado comestível adicionados de um tipo de proteína (animal ou vegetal) em relação a mistura das duas proteínas ($p < 0,05$). Os valores de cinzas variaram de $0,71 \pm 0,07$ g/100 g (proteína animal) a $0,47 \pm 0,02$ g/100 g (50% proteína de soro de leite e 50% proteína vegetal). Os teores de proteína variaram de $7,54 \pm 0,02$ g/100 g (proteína vegetal) a $6,11 \pm 0,13$ g/100 g (50% proteína animal e 50% proteína vegetal).

Tabela 13 - Composição proximal e propriedades físico-químicas dos gelados comestíveis adicionados de proteína animal e/ou vegetal e extrato misto liofilizado

Parâmetros avaliados	F2	F4	F6
Composição proximal			
Lipídeos (g/100 g)	$1,02 \pm 0,04^a$	$1,02 \pm 0,03^a$	$1,00 \pm 0,05^a$
Cinzas (g/100 g)	$0,71 \pm 0,07^a$	$0,62 \pm 0,03^a$	$0,47 \pm 0,02^b$
Proteína (N x 6,38; g/100 g)	$7,41 \pm 0,47^a$	$7,54 \pm 0,02^a$	$6,11 \pm 0,13^b$
Umidade (g/100 g)	$82,51 \pm 0,14^a$	$76,95 \pm 0,32^b$	$82,90 \pm 1,94^a$
Carboidratos (g/100 g)	$8,35 \pm 0,57^b$	$13,87 \pm 0,28^a$	$9,52 \pm 2,02^{ab}$
Valor calórico médio (kcal/100 g)	72,22	94,82	71,52
Propriedade físico-químicas			
pH	$6,29 \pm 0,03^a$	$6,71 \pm 0,01^a$	$6,61 \pm 0,01^a$
Acidez titulável (g/100 g)	$0,63 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,01^c$	$0,28 \pm 0,01^b$
Total de sólidos solúveis (°Brix)	24	14	18

Fonte: O autor

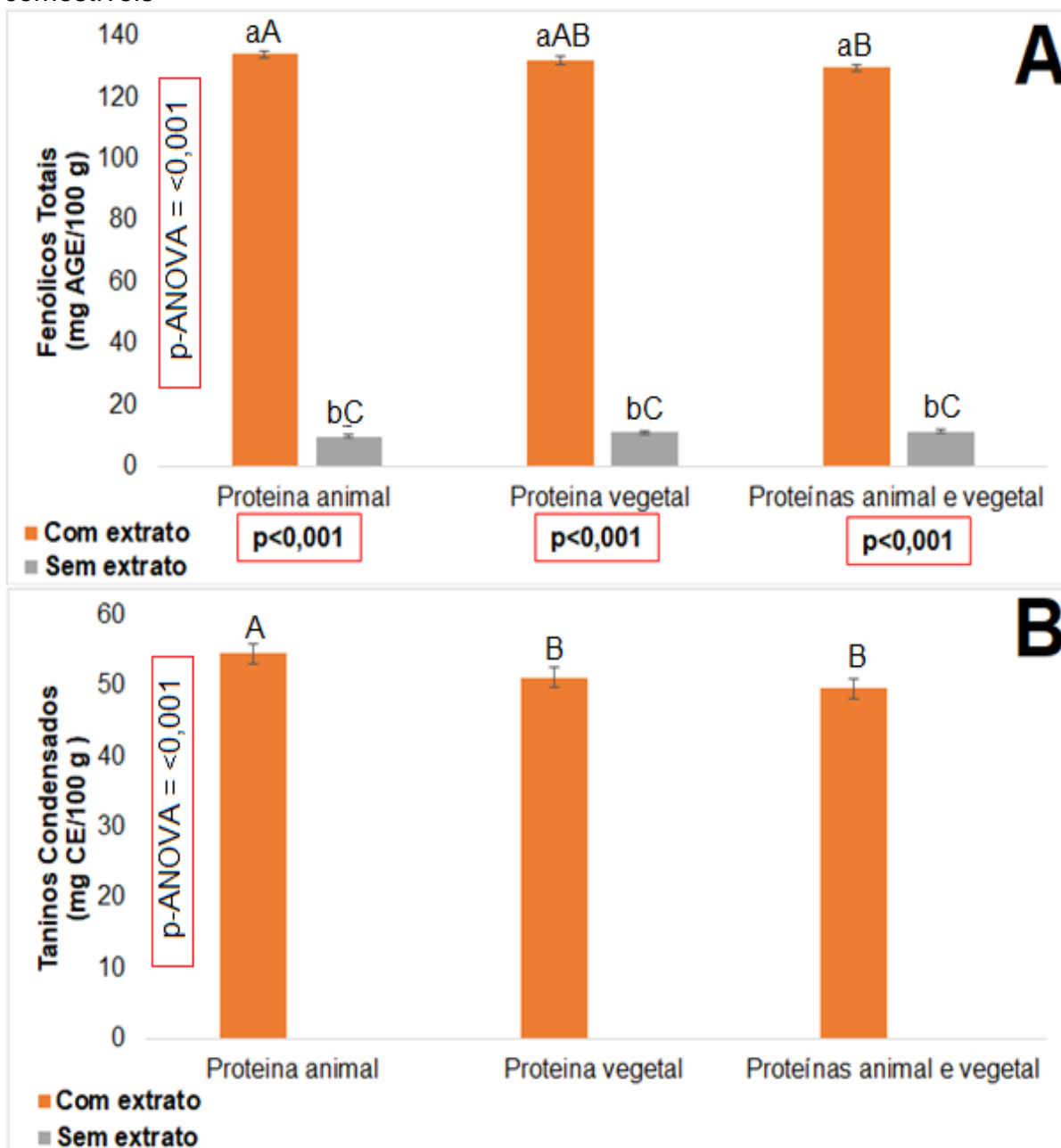
Nota: F2 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. F4 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. F6 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) e 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. Diferentes letras na mesma linha representam diferença estatística entre as amostras ($p < 0,05$).

Diferença significativa foi observada ($p < 0,05$) na análise de umidade entre a amostra adicionada de proteína vegetal com as outras duas formulações ($p < 0,05$), variando de $82,90 \pm 1,94$ g/100 g (50% proteína animal e 50% proteína vegetal) a $76,95 \pm 0,32$ (proteína vegetal). Em relação ao teor de carboidratos, diferença significativa ($p < 0,05$) foi observada entre a formulação adicionada de proteína animal e proteína vegetal ($p < 0,05$), variando de $13,87 \pm 0,28$ g/100 g (proteína vegetal) a $8,35 \pm 0,57$ g/100 g (proteína animal). Para os valores de acidez ocorreu diferença significativa entre todas as formulações ($p < 0,05$) com uma variação de $0,63 \pm 0,03$ g/100 g (proteína animal) a $0,18$ g/100 g (proteína vegetal).

4.3.3 Composição fenólica total e taninos condensados do gelado comestível

A Figura 25A apresenta o conteúdo de compostos fenólicos totais dos gelados comestíveis com e sem adição do extrato otimizado adicionado de proteína animal e/ou vegetal. O maior conteúdo de compostos fenólicos ($p < 0,001$) foi evidente nas amostras acrescidas de 1 g/100 g do extrato misto liofilizado. Também se observa que as proteínas animal e/ou vegetal não apresentaram interferência negativa na solubilidade e incorporação dos compostos fenólicos adicionados por meio do extrato otimizado. Extratos aquosos de ervas são reconhecidas fontes de compostos fenólicos. A incorporação desse tipo de extrato, em alimentos, tornou-se uma alternativa para levar até o consumidor compostos bioativos com atividade antioxidante entre outras funcionalidades (GRANATO et al., 2018b).

Figura 25 - Conteúdo fenólico total e taninos condensados totais dos gelados comestíveis



Fonte: O autor

Nota: A = Compostos fenólicos totais; B = Taninos condensados totais; Letras minúsculas diferentes entre as colunas da mesma proteína indica diferença significativa entre as formulações com e sem extrato pelo teste *t de Student* pareado ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes entre as colunas indica diferença significativa pelo ANOVA seguida do teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

A Figura 25B apresenta o teor de taninos condensados totais e observa-se um comportamento semelhante ao obtido no conteúdo fenólico total. Os gelados com a adição do extrato otimizado apresentaram valores entre 50 a 55 mg CE/100 g. Os gelados comestíveis sem a adição do extrato não apresentaram conteúdo de taninos quantificável pela metodologia aplicada. Ressaltasse que o extrato otimizado

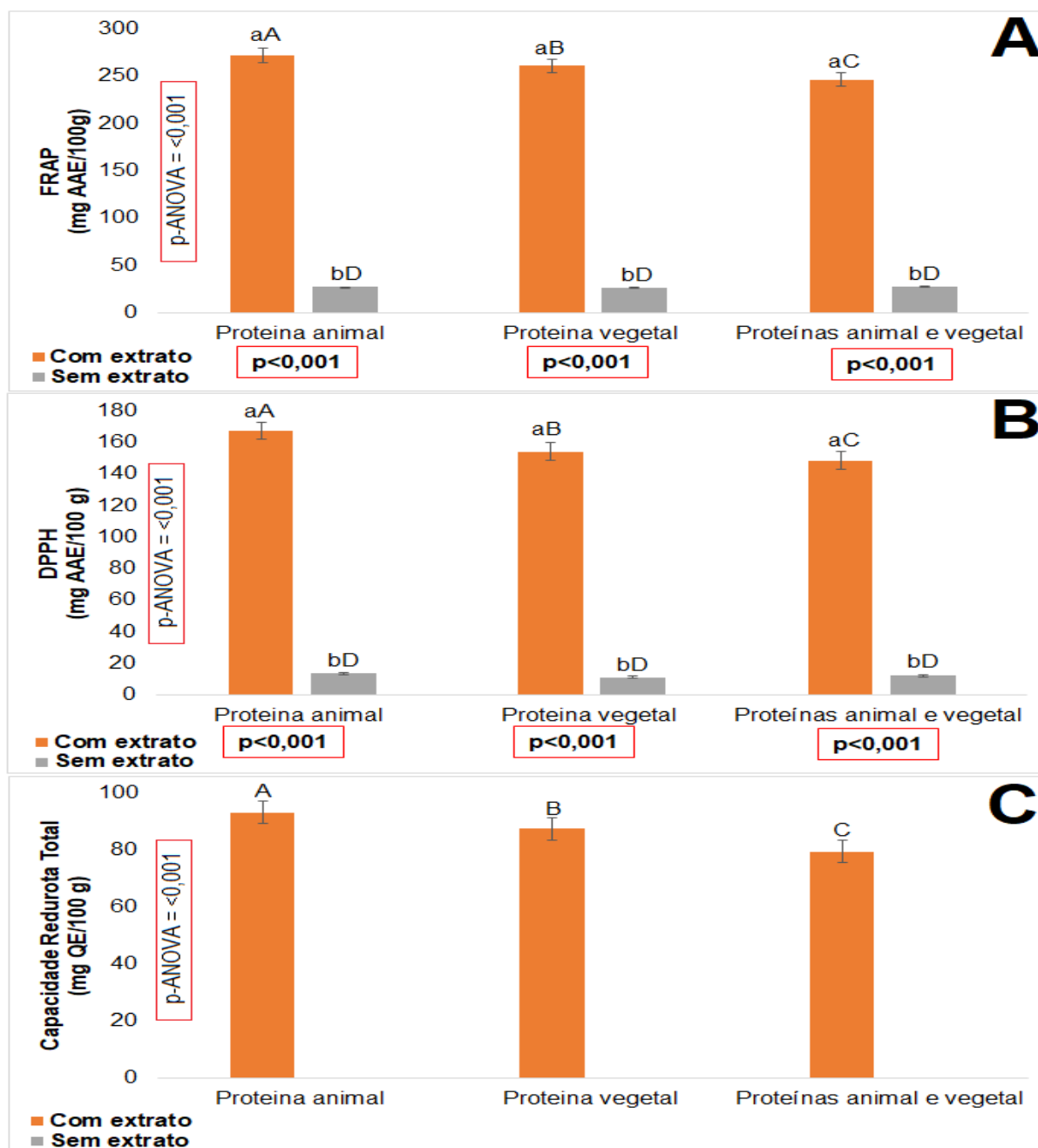
apresenta em sua composição 82,9% de extrato de *C. sinensis*. Esse extrato apresenta majoritariamente em sua composição (+)-catequina, (-)-epicatequina, quercetina, quercetina-3-rutinoside, (-)-epigallocatequina e (-)-epicatequina-2-O-galato. Esses compostos pertencem à classe dos flavan-3-óis (catequinas), que são monômeros dos taninos condensados isso justifica o teor apresentado no extrato otimizado (SANTOS et al., 2018).

4.3.4 Atividade antioxidante *in vitro* dos gelados comestíveis

A Figura 26 mostra os resultados da atividade antioxidante das formulações dos gelados comestíveis. Observa-se que ocorreu uma diferença significativa entre as diferentes formulações do gelado comestível com ou sem adição de extrato otimizado de ervas ($p < 0,001$) em relação ao ensaio de FRAP e da capacidade de captura do radical DPPH. E em relação a capacidade redutora total os gelados comestíveis sem a adição do extrato não apresentaram atividade redutora quantificável por meio da metodologia aplicada.

A Figura 26A mostra que os gelados comestíveis adicionados de 1 g/100 g de extrato liofilizados apresentaram atividade redutora do ferro superior a 245 mg de ácido ascórbico por g de gelado comestível. Ao passo que os gelados sem a adição do extrato apresentaram um valor de 28 mg AAE/100 g. Essa disparidade entre os gelados comestíveis com e sem adição do extrato liofilizado também foi observada no método de captura do radical DPPH (Figura 26B), o qual apresentou valores superiores a 145 mg de AAE/100 g para os gelados comestíveis com adição de extrato e valores inferiores a 15 mg AAE/100 g nos gelados comestíveis sem adição de extrato otimizado. A capacidade redutora total (Figura 26C) foi quantificada apenas nas amostras com adição de extrato misto liofilizado, variando de 93 mg de CE/100 g quantificadas no gelado comestível adicionado de proteína animal a 80 mg de CE/100 g no gelado adicionado de proteína animal e vegetal.

Figura 26 - Atividade antioxidante *in vitro* dos gelados comestíveis



Fonte: O autor

Nota: A = poder antioxidante de redução do ferro; B = Capacidade de captura do radical DPPH; C = Capacidade redutora total; Letras minúsculas diferentes entre as colunas da mesma proteína indica diferença significativa entre as formulações com e sem extrato pelo teste *t de Student* pareado ($p < 0,05$); Letras maiúsculas diferentes entre as colunas indica diferença significativa pelo ANOVA seguida do teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

Esses resultados mostram que a adição do extrato influenciou positivamente para o aumento da atividade antioxidante dos gelados comestíveis. Desta forma mostra-se mais uma alternativa para a incorporação de extratos naturais ricos em compostos antioxidantes num produto amplamente consumido por todas as faixas etárias de idade. Isso vai de encontro com a tendência mundial dos consumidores que

procuram alimentos que apresentam mais compostos naturais funcionais e menos aditivos sintéticos (GRANATO et al., 2018b).

4.3.5 Análise sensorial

Os dados para os atributos sensoriais odor, sabor, consistência e cor dos gelados comestíveis são apresentados na Tabela 14. Observa-se que ocorreu uma diferença significativa em todos os parâmetros avaliados. As formulações F1 e F2, as quais foram adicionadas com proteína de origem animal, foram melhor avaliadas pelos provadores em todos os parâmetros sensoriais investigados. A superioridade das formulações de gelado comestível adicionado de proteína animal foi notável independente da presença ou ausência do extrato liofilizado na formulação. As formulações que apresentaram menores notas em relação a todos os atributos avaliados (Tabela 14), foram F3 e F4, as quais foram acrescidas de proteína vegetal. Apenas no atributo sabor foi observado diferença ($p < 0,05$) entre as F3 e F4 mostrando que a presença do extrato liofilizado na formulação influenciou negativamente no parâmetro sabor entre as formulações adicionadas com proteína vegetal.

Tabela 14 – Valores médios e desvio padrão dos atributos sensoriais odor, sabor, consistência e cor atribuídos aos gelados comestíveis.

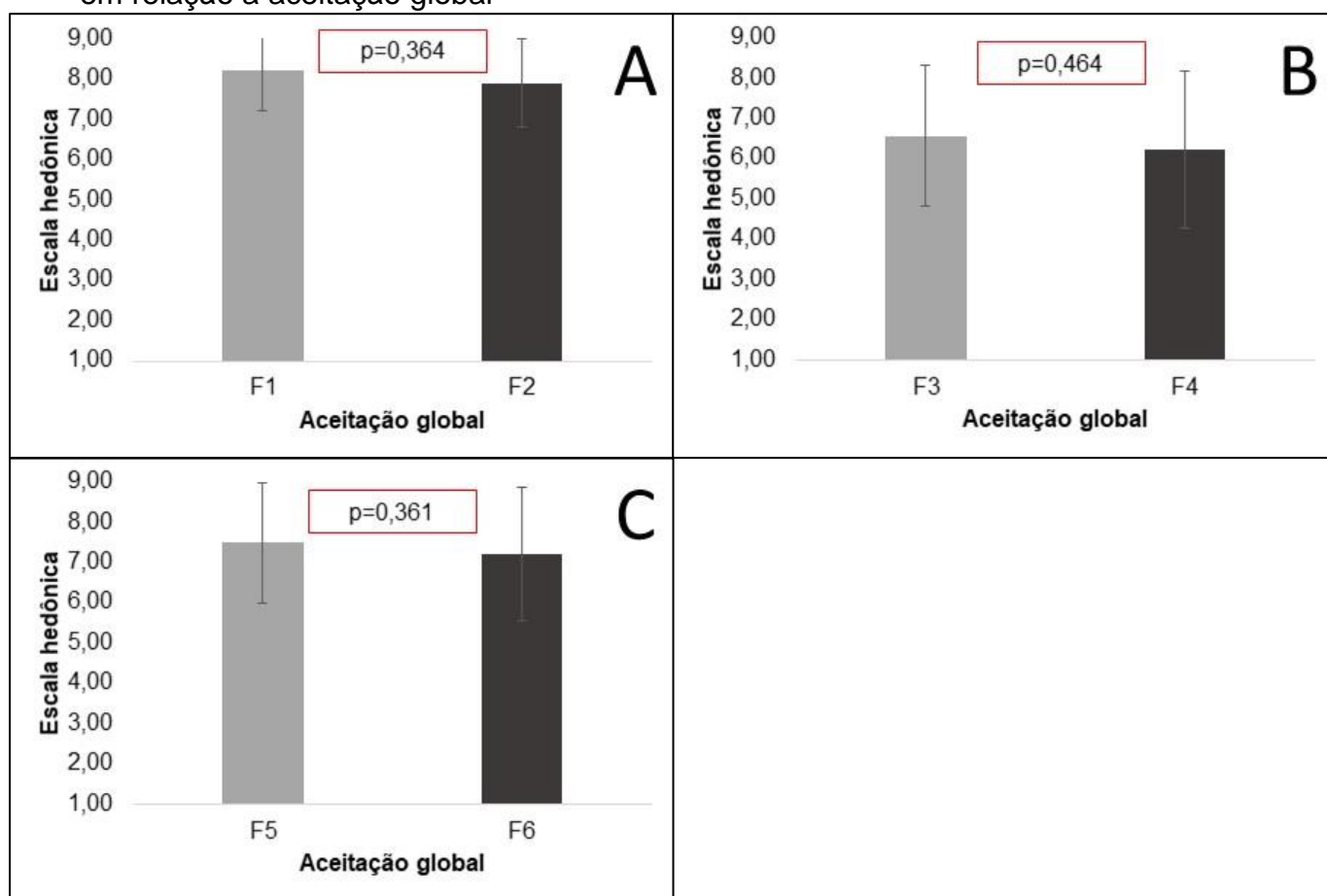
Formulações	ODOR	SABOR	CONSISTÊNCIA	COR
F1	7,1±1,5 ^{ab}	8,0±1,3 ^a	7,9±1,3 ^a	8,2±1,0 ^a
F2	7,4±1,6 ^a	7,7±1,3 ^{ab}	7,6±1,4 ^{ab}	8,2±1,2 ^a
F3	6,8±1,8 ^{bc}	6,6±1,9 ^c	6,5±1,8 ^c	6,9±1,7 ^b
F4	6,4±1,9 ^c	5,8±2,0 ^d	6,3±2,2 ^c	7,3±1,7 ^b
F5	7,5±1,6 ^a	7,4±1,5 ^b	7,3±1,6 ^b	8,2±1,3 ^a
F6	7,1±1,6 ^{ab}	6,8±1,9 ^c	6,7±1,9 ^c	8,3±1,2 ^a
p-homoscedasticidade	0,333	0,011	<0,001	<0,001
p-ANOVA/Welch	0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Fonte: O autor

Nota: F1 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) sem adição de extrato misto liofilizado; F2 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F3 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) sem adição de extrato misto liofilizado. F4 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F5 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e sem adição de extrato misto liofilizado. F6 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. Diferentes letras na mesma coluna representam diferença estatística entre as amostras pelo teste de Fisher LSD ($p < 0,05$).

A Figura 27 mostra a avaliação em relação a influência da adição de 1 g/100 g de extrato misto liofilizado nas formulações. Observa-se que em relação a impressão global dos produtos a adição do extrato otimizado não apresentou influência significativa ($p > 0,05$). Esses resultados mostram que o extrato otimizado não impactou negativamente na aceitabilidade dos gelados comestíveis.

Figura 27 – Comparação entre as formulações com e sem adição de extrato otimizado em relação a aceitação global

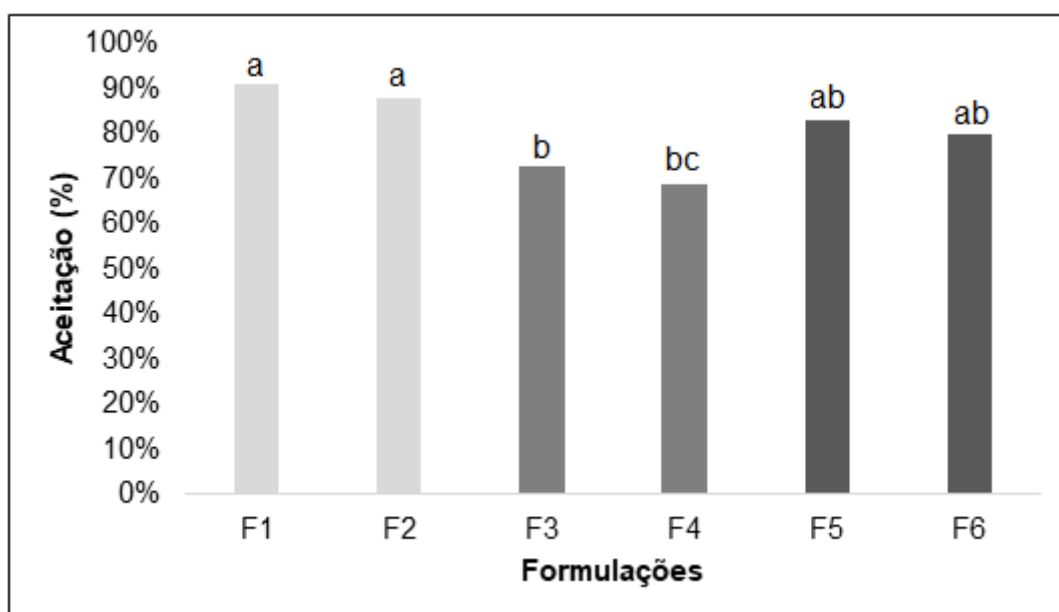


Fonte: O autor

Nota: A = comparação entre F1 e F2; B = comparação entre F3 e F4; C = comparação entre F5 e F6; F1 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) sem adição de extrato misto liofilizado; F2 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F3 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) sem adição de extrato misto liofilizado. F4 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F5 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e sem adição de extrato misto liofilizado. F6 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. Os valores de probabilidade são baseados no teste *t* de Student pareado.

A Figura 28 mostra o índice de aceitação das formulações de gelados comestíveis. Observa-se que não houve diferença significativa entre as formulações F1 e F2 ($p < 0,05$), essas formulações apresentaram os maiores índices de aceitação correspondendo a 91 e 88%, respectivamente. Esse resultado reafirma mais uma vez que a proteína adicionada é o fator determinante na aceitação do produto. E as formulações com proteína vegetal F3 e F4 foram as que apresentaram os menores índice de aceitação, 73 e 69%, respectivamente.

Figura 28 – Índice de aceitação dos gelados comestíveis enriquecidos com proteína animal e/ou vegetal



Fonte: O autor

Nota: F1 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) sem adição de extrato misto liofilizado; F2 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína animal (soro de leite) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F3 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) sem adição de extrato misto liofilizado. F4 = Formulação de gelado comestível adicionado de 5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado; F5 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e sem adição de extrato misto liofilizado. F6 = Formulação de gelado comestível adicionado de 2,5 g/100 g de proteína animal (soro de leite), 2,5 g/100 g de proteína vegetal (arroz) e 1 g/100 g de extrato misto liofilizado. Os valores de probabilidade são baseados no teste z ($p < 0,05$).

Quando os provadores foram questionados em relação a intenção de compra dos produtos, 77% responderam que comprariam o produto ao se deparar com ele disponível no mercado. Os avaliadores também opinaram sobre o valor pago a mais (R\$ 0 a R\$ 2.00) por uma unidade de 75 g de “picolé de chocolate com adição de extrato rico em compostos antioxidantes naturais” em comparação ao “gelado

comestível comercial sem adição de extrato rico em compostos antioxidantes naturais” (R\$ 2.00), respectivamente. O resultado obtido foi que 90% dos provadores pagariam no mínimo 50 centavos a mais no produto rico em compostos antioxidantes naturais. Esse resultado ressalta a exigência dos consumidores atuais, que se mostram preocupados não só com as questões sensoriais, mas também com a presença de compostos naturais com possíveis funcionalidades relacionadas ao consumo do produto.

4.4 CONCLUSÕES

A partir dos resultados conclui-se que a adição 1 g/100 g do extrato otimizado liofilizado nos gelados comestíveis proporcionou um aumento significativo de compostos antioxidantes, independente da proteína adicionada. O produto formulado com proteína animal e adicionado do extrato otimizado, apresentou aceitação de 88% por parte dos provedores, indicando potencial mercadológico. Desta forma o gelado comestível mostrou potencial como uma alternativa de produto para aplicação de extratos naturais ricos em compostos antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ABIS. Associação Brasileira da Indústria de Sorvete. Disponível em: http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html. Acessado em: 15 de janeiro de 2020.
- AHMAD, A.; KALEEM, M.; AHMED, Z.; SHAFIQ, H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. **Food Research International**, v. 77, p. 221-235, 2015.
- ALMAJANO, M. P.; CARBO, R.; JIMÉNEZ, J. A. L.; GORDON, M. H. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusions. **Food Chemistry**, v. 108, n. 1, p. 55-63, 2008.
- AMBIGAIPALAN, P.; AL-KHALIFA, A. S.; SHAHIDI, F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 1125-1137, 2015.
- AMBIGAIPALAN, P.; SHAHIDI, F. Antioxidant potential of date (*Phoenix dactylifera* L.) seed protein hydrolysates and carnosine in food and biological systems. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 864-871, 2015.
- ANDJELKOVIĆ, M.; VAN CAMP, J.; DE MEULENAER, B.; DEPAEMELAERE, G.; SOCACIU, C.; VERLOO, M.; VERHE, R. Iron-chelation properties of phenolic acids bearing catechol and galloyl groups. **Food Chemistry**, v. 98, n. 1, p. 23-31, 2006.
- ANESINI, C.; FERRARO, G. E.; FILIP, R. Total polyphenol content and antioxidant capacity of commercially available tea (*Camellia sinensis*) in Argentina. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 19, p. 9225-9229, 2008.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. Official methods of analysis of the AOAC. 18th Ed. AOAC, Arlington, VA. 2005.
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis, Washington, DC. 1990
- AOAC - **Association of Official Analytical Chemists**. Official Methods of Analysis; Edited by Sidney Williams. 16 ed. Arlington, 1997.
- APAK, R.; GORINSTEIN, S.; BÖHM, V.; SCHAICH, K. M.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K. Methods of measurement and evaluation of natural antioxidant capacity/activity (IUPAC Technical Report). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 5, p. 957-998, 2013.
- APAK, R.; GUCLU, K.; OZYUREK, M.; CELIK, S. E. Mechanism of antioxidant capacity assays and the CUPRAC (cupric ion reducing antioxidant capacity) assay. **Microchimica Acta**, v. 160, p. 413–419, 2008.
- APAK, R.; ÖZYÜREK, M.; GÜÇLÜ, K.; ÇAPANOĞLU, E. Antioxidant Activity/Capacity Measurement. 2. Hydrogen Atom Transfer (HAT)-Based, Mixed-Mode (Electron Transfer (ET)/HAT), and Lipid Peroxidation Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 5, p. 1028-1045, 2016.

ARON, P. M.; KENNEDY, J. A. Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity **Molecular Nutrition & Food research**, v. 52, n. 1, p. 79-104, 2008.

ASADI, S. Y.; PARSAEI, P.; KARIMI, M.; EZZATI, S.; ZAMIRI, A.; MOHAMMADIZADEH, F.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Effect of green tea (*Camellia sinensis*) extract on healing process of surgical wounds in rat. **International Journal of Surgery**, v. 11, n. 4, p. 332-337, 2013.

AVAN, A. N.; DEMIRCI ÇEKIÇ, S.; UZUNBOY, S.; APAK, R. Spectrophotometric Determination of Phenolic Antioxidants in the Presence of Thiols and Proteins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p. 1325, 2016

BARROSO, M. V.; GRAÇA-REIS, A.; CATTANI-CAVALIERI, I.; GITIRANA, L. B.; VALENCA, S. S.; LANZETTI, M. Mate tea reduces high fat diet-induced liver and metabolic disorders in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 109, p. 1547-1555, 2019.

BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTO, E. Y.; MARQUES, M. O. M.; FERRI, A. F.; TORRES, E. A. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p. 538-543, 2006.

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.

BERKER, K. I.; OZDEMIR OLGUN, F. A.; OZYURT, D.; DEMIRATA, B.; APAK, R. Modified Folin–Ciocalteu antioxidant capacity assay for measuring lipophilic antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 20, p. 4783-4791, 2013.

BIZZOTTO, C. S.; MEINHART, A. D.; RYBKA, A. C. P.; SOBRINHO, M. R.; JUNIOR, S. B.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. Quantification of phenolic compounds by capillary zone electrophoresis in extracts of four commercial types of mate herb before and after acid hydrolysis. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 763-768, 2012.

BOAVENTURA, B. C. B.; DI PIETRO, P. F.; STEFANUTO, A.; KLEIN, G. A.; MORAIS, E. C.; DE ANDRADE, F.; DA SILVA, E. L. Association of mate tea (*Ilex paraguariensis*) intake and dietary intervention and effects on oxidative stress biomarkers of dyslipidemic subjects. **Nutrition**, v. 28, n. 6, p. 657-664, 2012.

BRAMATI, L.; MINOGGIO, M.; GARDANA, C.; SIMONETTI, P.; MAURI, P.; PIETTA P. Quantitative characterization of flavonoid compounds in Rooibos tea (*Aspalathus linearis*) by LC-UV/DAD. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 20, p. 5513-5519, 2002.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. (2007) Decreto nº 6,323 de 27, de 23 de dezembro de 2007. Regulamenta a Lei no 10,831, de 23 de dezembro de 2003, que dispõe sobre a agricultura orgânica, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 28 dez.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 266, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 23 set. 2005.

CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157-2184, 2004.

CAMARGO, L. E. A.; PEDROSO, L. S.; VENDRAME, S. C.; MAINARDES, R. M.; KHALIL, N. M. Antioxidant and antifungal activities of *Camellia sinensis* (L.) Kuntze leaves obtained by different forms of production. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 2, p. 428-434, 2016.

CANABADY-ROCHELLE, L. L.; HARSCOAT-SCHIAVO, C.; KESSLER, V.; AYMES, A.; FOURNIER, F.; E GIRARDET, J. M. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food Chemistry**, v. 183, p. 129-135, 2015.

CARTER, P. Spectrophotometric determination of serum iron at the submicrogram level with a new reagent (ferrozine). **Analytical Biochemistry**, v. 40 n. 2, p. 450–458, 1971.

CASTRO, J.; PREGIBON, T.; CHUMANOV, K.; MARCUS, R. K. Determination of catechins and caffeine in proposed green tea standard reference materials by liquid chromatography-particle beam/electron ionization mass spectrometry (LC-PB/EIMS). **Talanta**, v. 82, n. 5, p. 1687-1695, 2010.

CHATTOPADHYAY, C.; CHAKRABARTI, N.; CHATTERJEE, M.; MUKHERJEE, S.; SARKAR, K.; CHAUDHURI, A. R. Black tea (*Camellia sinensis*) decoction shows immunomodulatory properties on an experimental animal model and in human peripheral mononuclear cells. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 1, p. 15, 2012.

CHEN, L.; YANG, X.; JIAO, H.; ZHAO, B. Tea catechins protect against lead-induced cytotoxicity, lipid peroxidation, and membrane fluidity in HepG2 cells. **Toxicological Sciences**, v. 69, n. 1, p. 149-156, 2002.

CHOI, S. J.; PARK, S. Y.; PARK, J. S.; PARK, S. K.; JUNG, M. Y. Contents and compositions of policosanols in green tea (*Camellia sinensis*) leaves. **Food Chemistry**, v. 204, p. 94-101, 2016.

CLEELAND, L.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and experimental animal infections. In: V. M. Lorian (Ed.), **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 739–788, 1991.

Communities, E. (2002). COUNCIL DIRECTIVE 2001/112/EC of 20 December 2001 relating to fruit juices and certain similar products intended for human consumption. *Official Journal of the European Communities*. L, 10.

CORREA, V. G.; GONÇALVES, G. A.; DE SÁ-NAKANISHI, A. B.; FERREIRA, I. C.; BARROS, L.; DIAS, M. I.; ... PERALTA, R. M. Effects of *in vitro* digestion and *in vitro* colonic fermentation on stability and functional properties of yerba mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) beverages. **Food Chemistry**, v. 237, p. 453-460, 2017.

CULLERE, M.; TASONIERO, G.; SECCI, G.; PARISI, G.; SMIT, P.; HOFFMAN, L. C.; DALLE ZOTTE, A. Effect of the incorporation of a fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) extract in the manufacturing of rabbit meat patties on their physical, chemical, and sensory quality during refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 108, p. 31-38, 2019.

CUTRIM, C. S.; CORTEZ, M. A. S. A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 71, n. 3, p. 564-578, 2018.

D ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.

DA SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: an optimization study. **Food Research International**, v. 60, p. 241-245, 2014.

DA SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; DE SOUZA, T. C. L.; TEIXEIRA FILHO, J.; GODOY, H. T. Phenolic compounds from yerba mate based beverages—A multivariate optimisation. **Food Chemistry**, v. 190, p. 1159-1167, 2016.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, p. 7313–7352, 2010.

DAI, W.; XIE, D.; LU, M.; LI, P.; LV, H.; YANG, C.; PENG, Q.; ZHU, Y.; GUO, L.; ZHANG, YUE., TAN, J.; LIN, Z. Characterization of white tea metabolome: Comparison against green and black tea by a nontargeted metabolomics approach. **Food Research International**, v. 96, p. 40-45, 2017.

DE GODOY, R. C. B.; DELIZA, R.; GHENO, L. B.; LICODIEDOFF, S.; FRIZON, C. T.; RIBANI, R. H.; DOS SANTOS, G. G. Consumer perceptions, attitudes and acceptance of new and traditional mate tea products. **Food Research International**, v. 53, p. 801-807, 2013.

DE LIMA, M. E.; COLPO, A. Z. C.; ROSA, H.; SALGUEIRO, A. C. F.; DA SILVA, M. P.; NORONHA, D. S.; SANTAMARÍA, A.; FOLMER, V. *Ilex paraguariensis* extracts reduce blood glucose, peripheral neuropathy and oxidative damage in male mice exposed to streptozotocin. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 9-16, 2018.

MORAIS, J. S.; SANT'ANA, A. S.; DANTAS, A. M.; SILVA, B. S.; LIMA, M. S.; BORGES, G. C.; MAGNANI, M. Antioxidant activity and bioaccessibility of phenolic compounds in white, red, blue, purple, yellow and orange edible flowers through a simulated intestinal barrier. **Food Research International**, p. 109046, 2020.

DE OLIVEIRA, C. C.; CALADO, V. M.; ARES, G.; GRANATO, D. Statistical approaches to assess the association between phenolic compounds and the *in vitro* antioxidant activity of *Camellia sinensis* and *Ilex paraguariensis* teas. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1456-1473, 2015.

DE RESENDE, P. E.; KAISER, S.; PITTOL, V.; HOEFEL, A. L.; SILVA, R. D. A.; MARQUES, C. V.; LUIZ CARLOS KUCHARSKI, L. C.; ORTEGA, G. G. Influence of crude extract and bioactive fractions of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. (yerba mate) on the Wistar rat lipid metabolism. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 440-451, 2015.

DEL BUBBA, M.; GIORDANI, E.; PIPPUCCI, L.; CINCINELLI, A.; CHECCHINI, L.; GALVAN, P. Changes in tannins, ascorbic acid and sugar content in astringent persimmons during on-tree growth and ripening and in response to different postharvest treatments. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 22, n. 7-8, p. 668-677, 2009.

DERRINGER, G.; SUICH, R. Simultaneous optimization of several response variables. **Journal of Quality Technology**, v. 12, n. 4, p. 214-219, 1980.

DHAMEJA, M.; GUPTA, P. Synthetic heterocyclic candidates as promising α -glucosidase inhibitors: An overview. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 343-377, 2019.

DIAS, T. R.; CARRAGETA, D. F.; ALVES, M. G.; OLIVEIRA, P. F.; SILVA, B. M. White Tea. In: **Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements**. Academic Press, 2019. p. 437-445.

DIBY, L.; KAHIA, J.; KOUAMÉ, C. **Tea, Coffee, and Cocoa** In: THOMAS, B., MURPHY, D. J., MURRAY, B. G. Encyclopedia of applied plant sciences 2. ed. Waltahm, MA: Academic Press, 2017. p. 420-425.

DLUDLA, P. V.; MULLER, C. J. F.; LOUW, J.; JOUBERT, E.; SALIE, R.; OPOKU, A. R.; JOHNSON, R. The cardioprotective effect of an aqueous extract of fermented rooibos (*Aspalanthus linearis*) on cultured cardiomyocytes derived from diabetic rats. **Phytomedicine**, v. 21, p. 595-601, 2014.

DURÁN, R.M.; BORJA PADILLA, R.; MARTÍN, A.; FIESTAS ROS DE URSINOS, J. A., ALBA MENDOZA, J. Biodegradación de los compuestos fenólicos presentes en el alpechín. **Grasas y Aceites**, v. 42, p. 271-276, 1991.

FAO Statistical. World food and agriculture. **Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome**, 2014.

FIDELIS, M.; SANTOS, J. S.; ESCHER, G. B.; DO CARMO, M. V., AZEVEDO, L.; DA SILVA, M. C.; AZEVEDO, L.; SILVA, M. C.; PUTNIK, P.; GRANATO, D. *In vitro* antioxidant and antihypertensive compounds from camu-camu (*myrciaria dubia mcvaugh, myrtaceae*) seed coat: A multivariate structure-activity study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 120, p. 479-490, 2018.

FRIEDMAN, M.; KIM, S. Y.; LEE, S. J.; HAN, G. P.; HAN, J. S.; LEE, K. R.; KOZUKUE, N. Distribution of catechins, theaflavins, caffeine, and theobromine in 77 teas consumed in the United States. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 9, p. C550-C559, 2005.

FRIZON, C. N. T.; PERUSSELLO, C. A.; STURION, J. A.; FRACASSO, A. F.; HOFFMANN-RIBANI, R. Stability of beverages of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) with soy. **Nutrition & Food Science**, v. 45, n. 3, p. 467-478, 2015.

FUKAI, T.; USHIO-FUKAI, M. Superoxide dismutases: role in redox signaling, vascular function, and diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 15, n. 6, p. 1583-1606, 2011.

GALI, H. U.; PERCHELLET, E. M.; KLISH, D. S.; JOHNSON, J. M.; PERCHELLET, J. P. Hydrolyzable tannins: Potent inhibitors of hydroperoxide production and tumor promotion in mouse skin treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate *in vivo*. **International Journal of Cancer**, v. 51, n. 3, p. 425-432, 1992.

GELDERBLOM, W. C.; JOUBERT, E.; GAMIELDIEN, K.; SISSING, L.; MALHERBE, C. J.; MARITZ, G. Rooibos (*Aspalathus linearis*), honeybush (*Cyclopia intermedia*) and cancer bush (*Sutherlandia frutescens* subsp. *microphylla*) protect against tobacco-specific mutagenesis *in vitro*. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 194-200, 2017.

GIADA, M. L. R. **Food phenolic compounds: main classes, sources and their antioxidant power**. In: Morales-González, J. A. Oxidative stress and chronic degenerative diseases-A role for antioxidants. InTech, p. 87-112, 2013.

GOUVEA, D. R.; MELONI, F.; RIBEIRO, A. D. B. B.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. A new HPLC-DAD-MS/MS method for the simultaneous determination of major compounds in the crude extract of *Lychnophora salicifolia* Mart.(Brazilian arnicão) leaves: Application to chemical variability evaluation. **Analytica Chimica Acta**, v. 748, p. 28-36, 2012.

GRAMZA-MICHAŁOWSKA, A.; KOBUS-CISOWSKA, J.; KMIĘCIK, D.; KORCZAK, J.; HELAK, B.; DZIEDZIC, K.; GÓRECKA, D. Antioxidative potential, nutritional value and sensory profiles of confectionery fortified with green and yellow tea leaves (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v. 211, p. 448-454, 2016.

GRANATO, D.; GREVINK, R.; ZIELINSKI, A. A.; NUNES, D. S.; VAN RUTH, S. M. Analytical strategy coupled with response surface methodology to maximize the extraction of antioxidants from ternary mixtures of green, yellow, and red teas (*Camellia sinensis* var. *sinensis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 42, p. 10283-10296, 2014.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; MACIEL, L. G.; NUNES, D. S. Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 80, p. 266-279, 2016.

GRANATO, D.; SANTOS, J. S.; SALEM, R. D.; MORTAZAVIAN, A. M.; ROCHA, R. S.; CRUZ, A. G. Effects of herbal extracts on quality traits of yogurts, cheeses, fermented milks, and ice creams: a technological perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 1-7, 2018b.

GRANATO, D.; SHAHIDI, F.; WROLSTAD, R.; KILMARTIN, P.; MELTON, L. D., HIDALGO, F. J.; ... ELMORE, S. Antioxidant activity, total phenolics and flavonoids contents: Should we ban *in vitro* screening methods?. **Food Chemistry**, v. 264, p. 471-475, 2018a.

GRANATO, D.; CALADO, V. M. A.; JARVIS, B. Observations on the use of statistical methods in food science and technology. **Food Research International**, v. 55, p. 137-149, 2014

GREMSKI, L. A.; COELHO, A. L. K.; SANTOS, J. S.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DO PRADO-SILVA, L., ... AZEVEDO, L. Antioxidants-rich ice cream containing herbal extracts and fructooligosaccharides: manufacture, functional and sensory properties. **Food Chemistry**, v. 298, p. 125098, 2019.

GRIGIONI, G.; CARDUZA, F.; IRURUETA, M.; PENSEL, N. Flavour characteristics of *Ilex paraguariensis* infusion, a typical Argentine product, assessed by sensory evaluation and electronic nose. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 5, p. 427-432, 2004.

GUMAY, A. R.; BAKRI, S.; UTOMO, A. W. The effect of green tea leaf extract on spatial memory function and superoxyde dismutase enzyme activity in mice with d-galactose induced dementia. **Sains Medika**, v. 8, n. 1, p. 8-14, 2017.

GUPTA, D.; KUMAR, M. Evaluation of *in vitro* antimicrobial potential and GC-MS analysis of *Camellia sinensis* and *Terminalia arjuna*. **Biotechnology Reports**, v. 13, p. 19-25, 2017.

HAJIAGHAALIPOUR, F.; HAJIAGHAALIPOUR, F.; KANTHIMATHI, M. S.; SANSUI, J.; RAJARAJESWARAN, J. White tea (*Camellia sinensis*) inhibits proliferation of the colon cancer cell line, HT-29, activates caspases and protects DNA of normal cells against oxidative damage. **Food Chemistry**, v. 169, p. 401-410, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford University Press, USA, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Oxford University Press, v. 4, 888 p, 2007.

HANDA, C. L.; DE LIMA, F. S.; GUELFY, M. F. G.; GEORGETTI, S. R.; IDA, E. I. Multi-response optimisation of the extraction solvent system for phenolics and antioxidant activities from fermented soy flour using a simplex-centroid design. **Food Chemistry**, v. 197, p. 175-184, 2016.

HAYASHI, N.; CHEN, R.; IKEZAKI, H.; UJIHARA, T. Evaluation of the umami taste intensity of green tea by a taste sensor. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 16, p. 7384-7387, 2008.

HEINRICH, T.; WILLENBERG, I.; GLOMB, M. A. Chemistry of color formation during rooibos fermentation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 20, p. 5221-5228, 2012.

HERALD, T. J.; GADGIL, P.; TILLEY, M. MICHAEL. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 11, p. 2326-2331, 2012

HILAL, Y.; ENGELHARDT, U. Characterisation of white tea—Comparison to green and black tea. **Journal Für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit**, v. 2, n. 4, p. 414-421, 2007.

HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, n. 9, p. 842-852, 2001.

HORSZWALD, A.; ANDLAUER, W. Characterisation of bioactive compounds in berry juices by traditional photometric and modern microplate methods. **Journal of Berry Research**, v. 1, n. 4, p. 189-199, 2011.

HOSU, A.; CRISTEA, V. M.; CIMPOIU, C. Analysis of total phenolic, flavonoids, anthocyanins and tannins content in Romanian red wines: Prediction of antioxidant activities and classification of wines using artificial neural networks. **Food Chemistry**, v. 150, p. 113-118, 2014.

IMBE, H.; SANO, H.; MIYAWAKI, M.; FUJISAWA, R.; MIYASATO, M.; NAKATSUJI, F.; HASEDA, F.; TANIMOTO, K.; TERASAKI, J.; MAEDA-YAMAMOTO, M.; TACHIBANA, H.; HANAFUSA, T. “Benifuuki” green tea, containing O-methylated EGCG, reduces serum low-density lipoprotein cholesterol and lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 ligands containing apolipoprotein B: A double-blind, placebo-controlled randomized trial. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 25-37, 2016.

International Organization for Standardization – ISO 11136: **Sensory analysis: Methodology: General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area**. Geneva: ISO. 2014.

ISOLABELLA, S.; COGOI, L.; LÓPEZ, P.; ANESINI, C.; FERRARO, G.; FILIP, R. Study of the bioactive compounds during yerba mate (*Ilex paraguariensis*) processing. **Food Chemistry**, v. 122, p. 95–699, 2010.

JASTER, H.; AREND, G. D.; REZZADORI, K.; CHAVES, V. C.; REGINATTO, F. H.; PETRUS, J. C. C. Enhancement of antioxidant activity and physicochemical properties of yogurt enriched with concentrated strawberry pulp obtained by block freeze concentration. **Food Research International**, v. 104, p. 119-125, 2018.

JESZKA-SKOWRON, M.; KRAWCZYK, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A. Determination of antioxidant activity, rutin, quercetin, phenolic acids and trace elements in tea infusions: Influence of citric acid addition on extraction of metals. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 40, p. 70-77, 2015.

JESZKA-SKOWRON, M.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; FRANKOWSKI, R. *Cistus incanus* a promising herbal tea rich in bioactive compounds: LC–MS/MS determination of catechins, flavonols, phenolic acids and alkaloids—A comparison with *Camellia sinensis*, Rooibos and Hoan Ngoc herbal tea. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 74, p. 71-81, 2018.

JOHNSON, M. H.; LUCIUS, A.; MEYER, T.; GONZALEZ DE MEJIA, E. Cultivar evaluation and effect of fermentation on antioxidant capacity and *in vitro* inhibition of α -amylase and α -glucosidase by highbush blueberry (*Vaccinium corombosum*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 16, p. 8923-8930, 2011.

JOUBERT, E.; BEER, D. Rooibos (*Aspalathus linearis*) beyond the farm gate: From herbal tea to potential phytopharmaceutical. **South African Journal of Botany**. v. 77, n. 4, p 869-886, 2011.

JOUBERT, E.; BEER, D. **Antioxidants of rooibos beverages: role of plant composition and processing**. In: PREEDY, V. R. Processing and Impact on Antioxidants in Beverages. Academic Press San Diego, p. 131-144, 2014.

JOUBERT, E.; VILJOEN, M.; DE BEER, D.; MANLEY, M. Effect of heat on aspalathin, iso-orientin, and orientin contents and color of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) iced tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 10, p. 4204-4211, 2009.

JUNIOR, E. L. C.; MORAND, C. Interest of mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) as a new natural functional food to preserve human cardiovascular health—A review. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 440-454, 2016.

KABAŁA-DZIK, A.; RZEPECKA-STOJKO, A.; KUBINA, R.; JASTRZĘBSKA-STOJKO, Ż.; STOJKO, R.; WOJTYCZKA, R.; STOJKO, J. Migration rate inhibition of breast cancer cells treated by caffeic acid and caffeic acid phenethyl ester: an *in vitro* comparison study. **Nutrients**, v. 9, n. 10, p. 1144, 2017.

KANG, Y. R.; LEE, H. Y.; KIM, J. H.; MOON, D. I.; SEO, M. Y.; PARK, S. H.; CHOI, K. H.; KIM, C. R.; OH, J. H.; CHO, S. W.; KIM, S. Y.; KIM, M. G.; CHAE, S. W.; KIM, O.; OH, H. G. Anti-obesity and anti-diabetic effects of Yerba Mate (*Ilex paraguariensis*) in C57BL/6J mice fed a high-fat diet. **Laboratory Animal Research**, v. 28, n. 1, p. 23-29, 2012.

KAO, M. P. C.; ANG, D. S. C.; PALL, A.; STRUTHERS, A. D. Oxidative stress in renal dysfunction: mechanisms, clinical sequelae and therapeutic options. **Journal of Human Hypertension**, v. 24, n. 1, p. 1-8, 2010.

KAY, C. D.; PEREIRA-CARO, G.; LUDWIG, I. A.; CLIFFORD, M. N.; CROZIER, A. Anthocyanins and flavanones are more bioavailable than previously perceived: a review of recent evidence. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 8, p. 155-180, 2017.

KEHRER, J. P.; TIPPLE, T. E.; ROBERTSON, J. D.; SMITH, C. V. Free radicals and reactive oxygen species. In: **Elsevier Inc.** 2014.

KELEBEK, H. LC-DAD–ESI-MS/MS characterization of phenolic constituents in Turkish black tea: Effect of infusion time and temperature. **Food Chemistry**, v. 204, p. 227-238, 2016.

KHAN, N.; MUKHTAR, H. Tea polyphenols in promotion of human health. **Nutrients**, v. 11, n. 1, p. 39, 2019.

KOCH, I. S.; MULLER, N.; DE BEER, D. NÆS, T., JOUBERT, E. Impact of steam pasteurization on the sensory profile and phenolic composition of rooibos (*Aspalathus linearis*) herbal tea infusions. **Food Research international**, v. 53, n. 2, p. 704-712, 2013.

KOCH, I. S.; MULLER, M.; JOUBERT, E.; VAN DER RIJST, M.; NÆS, T. Sensory characterization of rooibos tea and the development of a rooibos sensory wheel and lexicon. **Food Research International**, v. 46, n. 1, p. 217-228, 2012.

KOEPPEN, B. H.; ROUX, D. G. Aspalathin: a novel C-glycosylflavonoid from *Aspalathus linearis*. **Tetrahedron Letters**, v. 6, n. 39, p. 3497-3503, 1965.

KOTINA, E. L.; STEPANOVA, A. V.; TILNEY, P. M.; VAN WYK, B. E. The pharmacognostic value of leaf and stem anatomy in rooibos tea (*Aspalathus linearis*). **South African Journal of Botany**, v. 82, p. 129–133, 2012.

KRAFczyk, N.; GLOMB, M. A. Characterization of phenolic compounds in rooibos tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 3368–3376, 2008.

KU, S. K.; KWAK, S.; KIM, Y.; BAE, J. S. Aspalathin and nothofagin from Rooibos (*Aspalathus linearis*) Inhibits high glucose-induced inflammation *in vitro* and *in vivo*. **Inflammation**, v. 38, n. 1, p. 445-455, 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, p. 1-17, 2013.

KWON, Y. I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Evaluation of pepper (*Capsicum annuum*) for management of diabetes and hypertension. **Journal of Food Biochemistry**, v. 31, n. 3, p. 370-385, 2007.

LABIENIEC, M.; GABRYELAK, T. Antioxidative and oxidative changes in the digestive gland cells of freshwater mussels *Unio tumidus* caused by selected phenolic compounds in the presence of H₂O₂ or Cu²⁺ ions. **Toxicology in vitro**, v. 21, n. 1, p. 146-156, 2007.

LAO, L.; SHEN, J.; TIAN, H.; YAO, Q.; LI, Y.; QIAN, L.; ... WANG, J. C. Secreted phosphoprotein 24 kD inhibits growth of human prostate cancer cells stimulated by BMP-2. **Anticancer Research**, v. 36, n. 11, p. 5773-5780, 2016.

LAWAL, A. O.; DAVIDS, L. M.; MARNEWICK, J. L. Rooibos (*Aspalathus linearis*) and Honeybush (*Cyclopia species*) modulate the oxidative stress associated injury of diesel exhaust particles in human umbilical vein endothelial cells. **Phytomedicine**, p. 152898, 2019.

LI, L.; XIE, S.; NING, J.; CHEN, Q.; ZHANG, Z Evaluating green tea quality based on multisensor data fusion combining hyperspectral imaging and olfactory visualization systems. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 2018.

LI, Y.; YANG, P.; LUO, Y.; GAO, B.; SUN, J.; LU, W.; ... YU, L. L. Chemical compositions of chrysanthemum teas and their anti-inflammatory and antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 286, p. 8-16, 2019.

LIU, S.; AI, Z.; QU, F.; CHEN, Y.; NI, D. Effect of steeping temperature on antioxidant and inhibitory activities of green tea extracts against α -amylase, α -glucosidase and intestinal glucose uptake. **Food Chemistry**, v. 234, p. 168-173, 2017.

LÓPEZ, A.C.; DENICOL, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products. A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1-10. 2013.

LUZ, A. B. G.; DA SILVA, C. H. B.; NASCIMENTO, M. V. P.; DE CAMPOS FACCHIN, B. M.; BARATTO, B.; FRÖDE, T. S.; REGINATTO, F. H.; DALMARCO, E. M. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165-172, 2016.

MACIEL, L. G.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DE ALMEIDA, M. M.; ... ROSSO, N. D. *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: Chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 187-197, 2018.

MAITY, S.; VEDASIROMONI, J. R.; GANGULY, D. K. Anti-ulcer effect of the hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 46, n. 3, p. 167-174, 1995.

MANCUSO, C.; SANTANGELO, R. Ferulic acid: pharmacological and toxicological aspects. **Food and Chemical Toxicology**, v. 65, p. 185-195, 2014.

MARAIS, C.; JANSE, V. R. W.; FERREIRA, D.; STEENKAMP, J. A. (S) and (R)-Eriodictyol-6-C- β -D-glucopyranoside, novel keys to the fermentation of rooibos (*Aspalathus linearis*). **Phytochemistry**, v. 55, p. 43–49, 2000.

MARGRAF, T.; KARNOPP, A. R.; ROSSO, N. D.; GRANATO, D Comparison between Folin-Ciocalteu and Prussian Blue Assays to estimate the total phenolic content of juices and teas using 96-well microplates. **Journal of Food Science**, v. 80, n. 11, p. C2397-C2403, 2015.

MARGRAF, T.; SANTOS, É. N. T.; DE ANDRADE, E. F.; VAN RUTH, S. M.; GRANATO, D. Effects of geographical origin, variety and farming system on the chemical markers and *in vitro* antioxidant capacity of Brazilian purple grape juices. **Food Research International**, v. 82, p. 145-155, 2016.

MARINI, F.; DE BEER, D.; WALTERS, N. A.; DE VILLIERS, A.; JOUBERT, E.; WALCZAK, B. Multivariate analysis of variance of designed chromatographic data. A case study involving fermentation of rooibos tea. **Journal of Chromatography A**, v. 1489, p. 115-125, 2017.

MARQUES, V.; FARAH, A. Chlorogenic acids and related compounds in medicinal plants and infusions. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1370-1376, 2009.

MARTIN, J. G. P.; PORTO, E.; ALENCAR, S. M.; GLÓRIA, E. M.; CORRÊA, C. B.; CABRAL, I. S. R. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) against food pathogens. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 45, n. 2, p. 93-98, 2013.

MARTINS, C. P.; FERREIRA, M. V. S.; ESMERINO, E. A.; MORAES, J.; PIMENTEL, T. C.; ROCHA, R. S.; FREITAS, M. Q.; SANTOS, J. S.; RANADHEERA, C. S.; ROSA, L. S.; TEODORO, A. J.; MATHIAS, S. P.; SILVA, M. C.; RAICES, R. S. L.; COUTO, S. R. M.; GRANATO, D.; CRUZ, A. G. Chemical, sensory, and functional properties of whey-based popsicles manufactured with watermelon juice concentrated at different temperatures. **Food Chemistry**, v. 255, p. 58-66, 2018.

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I. C. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015.

MATEOS, R.; BAEZA, G.; SARRIÁ, B.; BRAVO, L. Improved LC-MSn characterization of hydroxycinnamic acid derivatives and flavonols in different commercial mate (*Ilex paraguariensis*) brands. Quantification of polyphenols, methylxanthines, and antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 241, p. 232-241, 2018.

MAZIBUKO, S. E.; MULLER, C. J. F.; JOUBERT, E.; BEER, D.; JOHNSON, R.; OPOKU, A.R.; LOUW, J. Amelioration of palmitate-induced insulin resistance in C2C12 muscle cells by rooibos (*Aspalathus linearis*). **Phytomedicine**, v. 20, p. 813-819, 2013.

MICEK, A.; GROSSO, G.; POLAK, M.; KOZAKIEWICZ, K.; TYKARSKI, A.; PUCH WALCZAK, A.; WOJCIECH DRYGAS, W.; KWAŚNIEWSKA, M.; PAJAŁ, A. Association between tea and coffee consumption and prevalence of metabolic syndrome in Poland—results from the WOBASZ II study (2013–2014). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 358-368, 2018.

MIRANDA, D. D.; ARÇARI, D. P.; PEDRAZZOLI, J.; CARVALHO, P. D. O.; CERUTTI, S. M.; BASTOS, D. H.; RIBEIRO, M. L. Protective effects of mate tea (*Ilex paraguariensis*) on H₂O₂-induced DNA damage and DNA repair in mice. **Mutagenesis**, v. 23, n. 4, p. 261-265, 2008.

MONSEES, T. K.; OPUWARI, C. S. Effect of rooibos (*Aspalathus linearis*) on the female rat reproductive tract and liver and kidney functions *in vivo*. **South African Journal of Botany**, v. 110, p. 208-215, 2017.

NITIN-SEETOHUL, L.; ISLAM, M.; O'HARE, W. T.; ALI, Z. Discrimination of teas based on total luminescence spectroscopy and pattern recognition. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 13, p. 2092-2098, 2006.

NUNES, G. L.; BOAVENTURA, B. C. B.; PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; MURAKAMI, F. S.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. D. M. C. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.

OROIAN, M.; ESCRICHE, I. Antioxidants: Characterization, natural sources, extraction and analysis. **Food Research International**, v. 74, p. 10-36, 2015.

ÖZTÜRK, H. İ.; DEMIRCI, T.; AKIN, N. Production of functional probiotic ice creams with white and dark blue fruits of *Myrtus communis*: The comparison of the prebiotic potentials on *Lactobacillus casei* 431 and functional characteristics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 339-345, 2018.

PAGLIOSA, C. M.; VIEIRA, M. A.; PODESTÁ, R.; MARASCHIN, M.; ZENI, A. L. B.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. D. M. C. Methylxanthines, phenolic composition, and antioxidant activity of bark from residues from mate tree harvesting (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.). **Food Chemistry**, v. 122, n. 1, p. 173-178, 2010.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, 2016.

PELUSO, I.; SERAFINI, M. Antioxidants from black and green tea: from dietary modulation of oxidative stress to pharmacological mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 11, p. 1195-1208, 2017.

PEREIRA, C. G.; BARREIRA, L.; BIJTTEBIER, S.; PIETERS, L.; NEVES, V.; RODRIGUES, M. J.; RIVAS, R.; VARELA, J.; CUSTÓDIO, L. Chemical profiling of infusions and decoctions of *Helichrysum italicum* subsp. *picardii* by UHPLC-PDA-MS and *in vitro* biological activities comparatively with green tea (*Camellia sinensis*) and rooibos tisane (*Aspalathus linearis*). **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 145, p. 593-603, 2017.

PERERA, N.; AMBIGAIPALAN, P., SHAHIDI, F. Epigallocatechin gallate (EGCG) esters with different chain lengths fatty acids and their antioxidant activity in food and biological systems. **J. Food Bioact**, v. 1, p. 124-133, 2018.

PERES, R. G.; TONIN, F. G.; TAVARES, M. F.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. 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, n. 4, p. 3859-3871, 2013.

PÉREZ-BURILLO, S.; GIMÉNEZ, R.; RUFÍAN-HENARES, J. A.; PASTORIZA, S. Effect of brewing time and temperature on antioxidant capacity and phenols of white tea: Relationship with sensory properties. **Food Chemistry**, v. 248, p. 111-118, 2018.

PERSSON, T.; POPESCU, B. O.; CEDAZO-MINGUEZ, A. Oxidative stress in Alzheimer's disease: why did antioxidant therapy fail? **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, 2014.

PHAN, H. T.; YODA, T.; CHAHAL, B.; MORITA, M.; TAKAGI, M.; MUN'DELANJI, C. V. Structure-dependent interactions of polyphenols with a biomimetic membrane system. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 10, p. 2670-2677, 2014.

PIEK, H.; VENTER, I.; RAUTENBACH, F.; MARNEWICK, J. L. Rooibos herbal tea: An optimal cup and its consumers. **Health SA Gesondheid (Online)**, v. 24, p. 1-9, 2019.

PINTO, M. S. Tea: A new perspective on health benefits. **Food Research International**, v. 53, n. 2, p. 558-567, 2013.

PINTO, M.S.; CARVALHO, J.E.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I.; SHETTY, K. Evaluation of antiproliferative, anti-type 2 diabetes, and antihypertension potentials of ellagitannins from strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) using in vitro models. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 5, p. 1027-1035, 2010.

PORTELA, J. L.; SOARES, D.; ROSA, H.; ROOS, D. H.; PINTON, S.; ÁVILA, D. S.; PUNTEL, R. L. *Ilex paraguariensis* crude extract acts on protection and reversion from damage induced by t-butyl hydroperoxide in human erythrocytes: a comparative study with isolated caffeic and/or chlorogenic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 7, p. 2007-2014, 2017.

PRICE, M. L.; BUTLER, L. G. Rapid visual estimation and spectrophotometric determination of tannin content of sorghum grain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 25, n. 6, p. 1268-1273, 1977.

PRIOR, R. L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standard methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 4290–4302, 2005.

QIAN, Y.; ZHANG, S.; YAO, S.; XIA, J.; LI, Y.; DAI, X.; WANG, W.; JIANG, X.; LIU, Y.; LI, M.; GAO, L.; GAO, L. Effects of *in vitro* sucrose on quality components of tea plants (*Camellia sinensis*) based on transcriptomic and metabolic analysis. **BMC Plant Biology**, v. 18, n. 1, p. 121, 2018.

RAMCHANDRAN, L.; SHAH, N. P. Characterization of functional, biochemical and textural properties of synbiotic low-fat yogurts during refrigerated storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 43, n. 5, p. 819-827, 2010.

RAMIREZ-MARES, M. V.; KOBAYASHI, H.; DE MEJIA, E. G. Inhibitory effect of *Camellia sinensis*, *Ilex paraguariensis* and *Ardisia compressa* tea extracts on the proliferation of human head and neck squamous carcinoma cells. **Toxicology Reports**, v. 3, p. 269-278, 2016.

RAMOS, R. L.; SANTOS, J. S.; DAGUER, H.; VALESE, A. C.; CRUZ, A. G.; GRANATO, D. Analytical optimization of a phenolic-rich herbal extract and supplementation in fermented milk containing sweet potato pulp. **Food Chemistry**, v. 221, p. 950-958, 2017.

RASHIDINEJAD, A.; BIRCH, E. J.; SUN-WATERHOUSE, D.; EVERETT, D. W. Total phenolic content and antioxidant properties of hard low-fat cheese fortified with catechin as affected by *in vitro* gastrointestinal digestion. **LWT-Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 393-399, 2015.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 9, p. 1231-1237, 1999.

REGULATION, C. (2007). No 834/2007 of 28 June 2007 on organic production and labelling of organic products and repealing Regulation (EEC) No 2092/91. **Official Journal of the European Union L**, 189(1), 28-7.

RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, p. 3285S-3292S, 2003.

RODRIGUES, M. J.; NEVES, V.; MARTINS, A.; RAUTER, A. P.; NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M.; VARELA, J.; BARREIRA, L.; CUSTÓDIO, L. *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of *Limonium algarvense* flowers' infusions and decoctions: A comparison with green tea (*Camellia sinensis*). **Food Chemistry**, v. 200, p. 322-329, 2016.

ROMANA-SOUZA, B.; PIRES, T. C.; MONTE-ALTO-COSTA, A. Mate tea-mediated reduction in catecholamine synthesis improves cutaneous wound healing of chronically stressed mice. **Food Research International**, v. 71, p. 32-40, 2015.

ROSSI, M. C.; BASSETT, M. N.; SAMMÁN, N. C. Dietary nutritional profile and phenolic compounds consumption in school children of highlands of Argentine Northwest. **Food Chemistry**, v. 238, p. 111-116, 2018.

RUSAK, G.; KOMES, D.; LIKIĆ, S.; HORŽIĆ, D.; KOVAČ, M. Phenolic content and antioxidative capacity of green and white tea extracts depending on extraction conditions and the solvent used. **Food Chemistry**, v. 110, n. 4, p. 852-858, 2008.

SAHEBI, M.; HANAFI, M. M.; VAN WIJNEN, A. J.; AKMAR, A. S. N.; AZIZI, P.; IDRIS, A. S.; TAHERI, S.; FOROUGH, M. Profiling secondary metabolites of plant defence mechanisms and oil palm in response to *Ganoderma boninense* attack. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 122, p. 151-164, 2017.

SAKANAKA, S.; TACHIBANA, Y.; OKADA, Y. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (*kakinoha-cha*). **Food Chemistry**, v. 89, n. 4, p. 569-575, 2005.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Compuestos polifenólicos: estructura y clasificación: presencia en alimentos y consumo: biodisponibilidad y metabolismo. **Alimentaria**, v. 329, p. 19-28, 2002.

SANDERSON, M.; MAZIBUKO, S. E.; JOUBERT, E.; DE BEER, D.; JOHNSON, R.; PHEIFFER, C.; LOUW, L.; MULLER, C. J. Effects of fermented rooibos (*Aspalathus linearis*) on adipocyte differentiation. **Phytomedicine**, v. 21, n. 2, p. 109-117, 2014.

SANTOS, E. C. S.; BICCA, M. A.; BLUM-SILVA, C. H.; COSTA, A. P. R.; DOS SANTOS, A. A.; SCHENKEL, E. P.; FARINA, M.; REGINATTO, F.H.; DE LIMA, T. C. M. Anxiolytic-like, stimulant and neuroprotective effects of *Ilex paraguariensis* extracts in mice. **Neuroscience**, v. 292, p. 13-21, 2015.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T. P.; ESMERINO, L. A.; GENOVESE, M. I.; FUJITA, A.; MARQUES, M. B.; ROSSO, N. D.; DAGUER, H.; VALESE, A. C.; GRANATO, D. Effects of time and extraction temperature on phenolic composition and functional properties of red rooibos (*Aspalathus linearis*). **Food Research International**, v. 89, p. 476-487, 2016.

SANTOS, J. S.; DEOLINDO, C. T.; HOFFMANN, J. F.; CHAVES, F. C.; DO PRADO-SILVA, L.; SANT'ANA, A. S.; AZEVEDO, L.; CARMO, M. A. V.; GRANATO, D. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chemistry**, v. 254, p. 348-358, 2018.

SANTOS, J. S.; BRIZOLA, V. R. A.; GRANATO, D. High-throughput assay comparison and standardization for metal chelating capacity screening: A proposal and application. **Food Chemistry**, v. 214, p. 515-522, 2017.

SANTOS-BUELGA, C.; GONZALEZ-MANZANO, S.; DUEÑAS, M.; GONZALEZ-PARAMAS, A. M. Extraction and isolation of phenolic compounds. **Natural Products Isolation**, p. 427-464, 2012.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S-2085S, 2000.

SCHAPOVALOFF, M. E.; ALVES, L. F. A.; URRUTIA, M. I.; LASTRA, C. C. L. Ocurrencia natural de hongos entomopatógenos en suelos cultivados con yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) en Misiones, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 47, n. 2, p. 138-142, 2015.

SERAGLIO, S. K. T.; VALESE, A. C.; DAGUER, H.; BERGAMO, G.; AZEVEDO, M. S.; GONZAGA, L. V.; FETT, R.; COSTA, A. C. O. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, v. 87, p. 60-67, 2016.

SHARANGI, A. B. Medicinal and therapeutic potentialities of tea (*Camellia sinensis* L.)—A review. **Food Research International**, v. 42, n. 5, p. 529-535, 2009.

SHAW, H. M.; WU, J. L.; WANG, M. S. Antihypertensive effects of *Ocimum gratissimum* extract: Angiotensin-converting enzyme inhibitor *in vitro* and *in vivo* investigation. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 68-73, 2017.

SHERBET, G. V. **The Anti-Cancer Potential of Flavonoids** in Molecular Approach to Cancer Management Elsevier p. 151–162, 2017

SIES, H. Total antioxidant capacity: appraisal of a concept. **Journal of Nutrition**, v. 137, p. 1493-1495. 2007.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: **Methods in Enzymology**. Academic press, 1999. p. 152-178.

SINHA, D.; ROY, S.; ROY, M. Antioxidant potential of tea reduces arsenite induced oxidative stress in Swiss albino mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 4, p. 1032-1039, 2010.

SLATER, T. F. Free radical mechanisms in tissue injury. In: **Cell Function and Disease**. Springer US, 1988. p. 209-218.

SOBEH, M.; HASSAN, S.; EL RAEY, M.; KHALIL, W.; HASSAN, M.; WINK, M. Polyphenolics from *Albizia harveyi* exhibit antioxidant activities and counteract oxidative damage and ultra-structural changes of cryopreserved bull semen. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1993, 2017.

SOUZA, A. H.; CORRÊA, R. C.; BARROS, L.; CALHELHA, R. C.; SANTOS-BUELGA, C.; PERALTA, R. M.; BRACHT, A.; MATSUSHITA, M.; FERREIRA, I. C.F.R. Phytochemicals and bioactive properties of *Ilex paraguariensis*: An *in-vitro* comparative study between the whole plant, leaves and stems. **Food Research International**, v. 78, p. 286-294, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. ed. 3, Porto Alegre: Artmed, 2009.

TAO, L.; FORESTER, S. C.; LAMBERT, J. D. The role of the mitochondrial oxidative stress in the cytotoxic effects of the green tea catechin, (–)-epigallocatechin-3-gallate, in oral cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 58, n. 4, p. 665-676, 2014.

TENORE, G. C.; STIUSO, P.; CAMPIGLIA, P.; NOVELLINO, E. *In vitro* hypoglycaemic and hypolipidemic potential of white tea polyphenols. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2379-2384, 2013.

THAIPONG, K.; BOONPRAKOB, U.; CROSBY, K.; CISNEROS-ZEVALLOS, L.; BYRNE, D. H. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, n. 6-7, p. 669-675, 2006.

THITIMUTA, S.; PITHAYANUKUL, P.; NITHITANAKOOL, S.; BAVOVADA, R.; LEANPOLCHAREANCHAI, J.; SAPARPAKORN, P. *Camellia sinensis* L. Extract and Its Potential Beneficial Effects in Antioxidant, Anti-Inflammatory, Anti-Hepatotoxic, and Anti-Tyrosinase Activities. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 401, 2017.

UTAMA-ANG, N.; PHAWATWIANGNAK, K.; NARUENARTWONGSAKUL, S.; SAMAKRADHAMRONGTHAI, R. Antioxidative effect of Assam Tea (*Camellia sinensis* Var. *Assamica*) extract on rice bran oil and its application in breakfast cereal **Food Chemistry**, v. 221, p. 1733-1740, 2017.

VAN WYK, B. E.; VAN OUDTSHOORN, B.; GERICKE, N. **Medicinal Plants of South Africa**. Briza, 2009.

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, n. 22, p. 8896-8907, 2007.

WU, Y.; JIANG, X.; ZHANG, S.; DAI, X.; LIU, Y.; TAN, H.; LIPING GAO, L., XIA, T. Quantification of flavonol glycosides in *Camellia sinensis* by MRM mode of UPLC-QQQ-MS/MS. **Journal of Chromatography B**, v. 1017, p. 10-17, 2016.

YANG, C. S.; LANDAU, J. M.; HUANG, M. T.; NEWMARK, H. L. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. **Annual Review of Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 381-406, 2001.

YANG, X.; KONG, F. Effects of tea polyphenols and different teas on pancreatic α -amylase activity *in vitro*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 66, p. 232-238, 2016.

YAR KHAN, H.; ZUBAIR, H.; FAHAD ULLAH, M.; AHMAD, A.; MUMTAZ HADI, S. A prooxidant mechanism for the anticancer and chemopreventive properties of plant polyphenols. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 14, p. 1738-1749, 2012.

YERMAKOV, A. I.; ARASIMOV, V. V.; YAROSH, N. P. Methods of biochemical analysis of plants Agropromizdat. **Leningrad** (in Russian), p. b25, 1987

ZENG, C.; LIN, H.; LIU, Z.; LIU, Z. Metabolomics analysis of *Camellia sinensis* with respect to harvesting time. **Food Research International**, v. 128, p. 108814, 2020.

ZHANG, L.; SANTOS, J. S.; CRUZ, T. M.; MARQUES, M. B.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; ... GRANATO, D. Multivariate effects of Chinese keemun black tea grades (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) on the phenolic composition, antioxidant, antihemolytic and cytotoxic/cytoprotection activities. **Food Research International**, v. 125, p. 108516, 2019.

ZHANG, X.; WU, Z.; WENG, P. Antioxidant and hepatoprotective effect of (-)-epigallocatechin 3-O-(3-O-methyl) gallate (EGCG3 "Me) from Chinese oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 41, p. 10046-10054, 2014.

ZHENG, L.; LIN, L.; SU, G.; ZHAO, Q.; ZHAO, M. Pitfalls of using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) assay to assess the radical scavenging activity of peptides: Its susceptibility to interference and low reactivity towards peptides. **Food Research International**, v. 76, p. 359-365, 2015.

ZHISHEN, J.; MENGEHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, p. 555-559, 1999.

ZIELINSKI, A. A. F.; GRANATO, D.; ALBERTI, A.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I. M.; HAMINIUK, C. W. I. Modelling the extraction of phenolic compounds and *in vitro* antioxidant activity of mixtures of green, white and black teas (*Camellia sinensis* L. Kuntze). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52 n. 11, p. 1-10, 2015.

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE: 65493717.9.0000.0105)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS COM INGREDIENTES BIOATIVOS: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL

Pesquisador: Daniel Granato

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 65493717.9.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.969.907

Apresentação do Projeto:

DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS COM INGREDIENTES BIOATIVOS: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Desenvolver diferentes produtos alimentícios, utilizando extratos aquosos de ervas, sementes, cascas, tubérculos e coproduto da indústria cervejeira.

Objetivo Secundário:

Analisar o teor de compostos bioativos e atividade antioxidante in vitro de extratos aquosos de ervas, sementes, cascas, tubérculos e coprodutos da indústria cervejeira; Otimizar a quantidade de dois ou mais extratos aquosos de ervas, sementes, cascas, tubérculos e coproduto da indústria cervejeira para a incorporação em sistemas modelos de produtos fermentados (iogurte, queijo), panificados (biscoitos, pães) e gelados

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748. UEPG, Campus Uvaíras, Bloco M, Sala 100.
Cidade: Uvaíras **CEP:** 84.030-900
UF: PR **Município:** PONTA GROSSA
Telefone: (41)3020-3108 **E-mail:** cep@uepg.br

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**Universidade Estadual de Ponta Grossa***Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação*

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS

Av.: Gen. Carlos Cavalcanti, 4748 CEP: 84030-900 Bloco M, Sala 100

Campus Uvaranas Ponta Grossa Fone: (42) 3220.3108 e-mail: seccoep@uegp.br

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você _____,

está sendo convidado a participar da pesquisa “DESENVOLVIMENTO DE PRODUTOS ALIMENTÍCIOS COM INGREDIENTES BIOATIVOS: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA, FÍSICO-QUÍMICA E SENSORIAL” tendo como pesquisador responsável Prof. Dr. Daniel Granato e como pesquisadores participantes Graziela B. Escher e Jânio S. Santos da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O objetivo da pesquisa é analisar a aceitabilidade de novos produtos alimentícios com a incorporação de extratos aquosos de ervas, sementes, cascas, tubérculos e coprodutos da indústria cervejeira fontes de minerais, fibras e, principalmente, compostos fenólicos.

A sua participação no estudo será de analisar sensorialmente alimentos desenvolvidos com adição de produtos naturais. As amostras serão apresentadas em ordem aleatória e uma por vez, utilizando copos plásticos codificados com três dígitos. Junto você receberá uma ficha contendo uma escala de 9 pontos (9 - gostei, extremamente 5 - indiferente, 1 - desgostei extremamente) para avaliar as características sensoriais com a atribuição de notas para aparência, cor, odor, sabor e textura. Na sequência será analisada a intenção de compras utilizando escala estruturada de 5 pontos (5 - certamente compraria e 1 - certamente não compraria). Ao final da sessão a ficha preenchida será retornada aos pesquisadores e os dados serão tabulados e interpretados.

Os riscos à saúde são considerados mínimos, uma vez que antecipadamente você responderá a um questionário no qual tem por objetivo detectar alergias alimentares ou intolerância a algum dos constituintes dos produtos alimentícios desenvolvidos. Caso haja algum acidente, você será levado imediatamente à uma unidade do Sistema Único de Saúde para atendimento médico especializado. A sua identidade será preservada, pois os resultados serão expressos como média das respostas, sendo que os dados pessoais não serão mencionados em nenhum momento, pois o questionário será anônimo. Essa pesquisa faz parte de projetos de alunos do doutorado, mestrado e graduação com objetivo da publicação dos resultados no meio científico. Portanto, você estará contribuindo no desenvolvimento de

novos produtos alimentícios com elevado valor nutricional e potencial funcional, com a substituição de corantes artificiais, aromatizantes por extratos aquosos de produtos naturais.

Após as análises você será informado dos resultados desta pesquisa da qual participa. Sua participação é voluntária, portanto, não receberá recompensa ou gratificação nem pagará para participar. Será garantido o livre acesso a todas as informações e retirada de dúvidas sobre o estudo, enfim, tudo o que você queira saber antes, durante e depois da participação na pesquisa. Você poderá deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem apresentar justificativas e, também, sem prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido, tendo também todas as dúvidas esclarecidas sobre a sua participação neste trabalho. Em caso de dúvidas, você poderá entrar em contato com qualquer um dos membros da pesquisa ou com a Comissão de Ética em Pesquisa da UEPG:

Nome do pesquisador responsável: Prof. Dr. Daniel Granato.

Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Campus Universitário de Uvaranas, Ponta Grossa/PR

Telefone: (42)99807-4728

e-mail: granatod@gmail.com

Nome dos pesquisadores participantes:

- Graziela Bragueto Escher.

- Jânio Sousa Santos

Telefone: (41) 99960-8588.

Telefone: (42) 99803-6851

e-mail: grazibraqueto@hotmail.com

e-mail: janio.redex@hotmail.com

Endereço: Av. Carlos Cavalcanti, 4748 - Campus Universitário de Uvaranas, Ponta Grossa/PR.

Comitê de Ética em Pesquisa

UEPG campus Uvaranas, Bloco M, sala 100

Telefone: (42) 3220-3108.

Ponta Grossa, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do convidado para a pesquisa

Assinatura pesquisador responsável

Assinatura pesquisador participante

ANEXO C - CARTA DE APROVAÇÃO

UEPG

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA DO USO DE ANIMAL**CARTA DE APROVAÇÃO****Processo CEUA – 047/2017****Protocolo UEPG – 18184/2017****Título – “Solicita 5 animais de descarte”****Interessado:** Daniel Granato (granatod@gmail.com)**Data de Entrada – 26/10/2017****Resultado:** Aprovado**Data/Prazo – 17/11/2017 a 17/11/2019****Considerações****Professor Daniel Granato (DEA):**

Em relação a utilização de animais no protocolo de pesquisa sob sua responsabilidade, a CEUA deliberou pela aprovação da autorizada a utilização de 5 ratos Wistar isogênicos de descarte.

Ponta Grossa, 17 de novembro de 2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
CEUA – Comissão de Ética do Uso de Animais
Dra. *Dionizio Kovler Scopelanti*
Coordenadora

ANEXO D - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP (CAAE: 94830318.1.0000.0105)

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
PONTA GROSSA - UEPG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS NATURAIS UTILIZANDO ERITRÓCITOS HUMANO COMO MODELO BIOLÓGICO

Pesquisador: Mariza Boscacci Marques

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 94830318.1.0000.0105

Instituição Proponente: Universidade Estadual de Ponta Grossa

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.896.929

Apresentação do Projeto:

ANÁLISE DA BIOATIVIDADE DE EXTRATOS NATURAIS UTILIZANDO ERITRÓCITOS HUMANO COMO MODELO BIOLÓGICO

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Utilizar eritrócitos humanos como modelo biológico para testes da atividade antioxidação de extratos naturais de diferentes origens botânicas.

Objetivo Secundário:

Isolar eritrócitos humanos de amostras de sangue de doadores anônimos fornecidas pelo Hospital Universitário Regional dos Campos Gerais –

HURCO; Analisar as atividades dos extratos naturais em condições isotônicas e hipotônicas; Avaliar a estabilidade da hemoglobina em presença dos diferentes extratos, sob ataque oxidativo com Peróxido de hidrogênio; Quantificar a concentração de glutatona residual sob condições isotônicas,

hipotônicas e sob ataque oxidativo

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

As amostras sanguíneas serão fornecidas pela Agência Transfusional do Hospital Universitário

Endereço: Av. Gen. Carlos Cavalcanti, nº 4748, UEPG, Campus Uvaíras, Bloco M, Sala 116-B
Bairro: Uvaíras CEP: 84.630-900
UF: PR Município: PONTA GROSSA
Telefone: (41)3233-3108 E-mail: cep@uepg.br